

1. INTRODUCCION

La producción de trucha se ha desarrollado en los últimos diez años en la región Interandina de país, especialmente en las provincias del Azuay y Pichincha. Según Idrovo (2006), se estima que hay 213 criaderos en el país (citado por Ortiz, 2006b). Los 12 criaderos más grandes rinden entre 80 y 150 toneladas al año, el resto tienen un promedio de 30 toneladas y los artesanales menos de 5 toneladas (Castro y Quintong, 2003).

La crioconservación del semen en peces, constituye una alternativa biotecnológica útil para el almacenamiento de gametos por tiempo indefinido, facilitando la conservación de especies en peligro de extinción y evitando cualquier deterioro genético (Medina, Velasco y Cruz, 2005).

En las últimas décadas se han realizado investigaciones donde se reportan distintos procedimientos para la crioconservación de espermatozoides. Se han reportado resultados con gran variabilidad entre especies, principalmente en relación a los porcentajes de fertilidad (Guarnizo, 2007).

La característica más importante a mejorar en los peces, es el crecimiento, el cual es lento y tiene una estrecha relación con la temperatura del agua. Estudios sobre mejoramiento genético han progresado a través de la biotecnología, aprovechando que las truchas hembras crecen más rápido que los machos, lo cual permite que los criadores intensifiquen su producción y se interesen más en cultivar hembras que machos. El rápido desarrollo del cultivo de salmónidos durante la década del 70 en Europa y Norteamérica incrementó el interés de controlar el sexo de las truchas. La mayoría de los peces llegan a su

madurez sexual cuando han alcanzado cierto tamaño, siendo característico para cada especie y no está directamente correlacionado con la edad. Como la velocidad de crecimiento disminuye cuando el pez alcanza la madurez sexual, es ventajoso criar hembras. El tamaño crítico de la madurez es alcanzado primero por los machos, por lo que en sus primeras etapas utilizan la energía procedente de los alimentos para reproducirse y no para crecer, por lo cual los machos son más pequeños que las hembras. Por el contrario, las hembras durante el primer año aprovechan la energía para crecer y no para reproducirse (Bastardo y Sofía., 2003).

Al comparar los ritmos de crecimiento entre sexos, se observa que los mejores caracteres comerciales (coloración, peso, longitud) y productivos (factor de conversión alimenticia, índice de condición corporal, supervivencia, tasa de crecimiento específico) tienen las truchas hembras. Así, criar hembras en altos porcentajes será el objetivo primordial en un plantel de reproductores, sin embargo es vital mantener machos como recurso de material genético, lo que implica que el costo de mantenimiento sea alto, debido a que los parámetros comerciales y productivos que no son ideales para la producción, pero necesarios para la reproducción.

La crioconservación de semen de machos normales y pseudomachos, incidirá significativamente en los costos operativos, ahorro de alimento balanceado, liberación de infraestructura y cruzamiento planificado entre grupos de reproductores (Ortiz, 2008a).

La masculinización de las hembras permite obtener machos homogaméticos (XX), los cuales se comportan fenotípicamente como machos y genotípicamente siguen siendo hembras. El semen de estos machos funcionales

es utilizado para fertilizar ovas normales permitiendo que los descendientes de estos cruces sean 100% hembras, los cuales pueden consumirse sin restricciones y ser utilizados en programas de reproducción (Bastardo y Sofía, 2003).

Con la crioconservación del semen se tiene la oportunidad de mejorar las líneas de reproducción y conservar las mejores características genéticas. Además se pueden realizar estudios genéticos para realizar cruces para generaciones sucesivas y conservar la variabilidad genética (Suquet, Dreanno, Fauvel, Cosson y Billard, 2000).

La presente investigación realizada en las instalaciones de Acuicultura (Pailones) de la Carrera de Ciencias Agropecuarias (IASA), Hacienda el Prado ubicada en la Provincia de Pichincha, cantón Rumiñahui, parroquia San Fernando; busca la reproducción artificial de la trucha, contribuyendo al conocimiento de las características seminales y a la estandarización de protocolos para la crioconservación de semen de neomacho de trucha arco iris. Cabe destacar que esta investigación es parte del proyecto “Crioconservación de semen para “pseudomachos” de *Oncorhynchus mykiss* en el programa de mejoramiento genético del CENIAC – Papallacta”.

RESUMEN

Se evaluaron cinco medios para crioconservar semen para trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) y semen de truchas reversadas, con el objetivo de alcanzar el mayor porcentaje de fertilización. Las técnicas utilizadas permitirán el ahorro de espacio (infraestructura) para el mantenimiento de reproductores machos, así como la facilidad de manipulación y transferencia de genotipos específicos. Además se analizó la eficacia de la reversión sexual de la hormona 17 α -metilttestosterona suministrada en el alimento a los alevines para obtener truchas reversadas. Para el análisis de los porcentajes de fertilización, el mejor medio de crioconservación fue el tratamiento B, que contenía glucosa y metanol al 10% como crioprotector. El porcentaje de fertilización obtenido con dicho medio fue del 69.25%. La congelación del semen se realizó manteniendo las pajuelas 10 cm por encima del nivel del nitrógeno líquido durante 10 minutos, y descongeladas a 37°C por 60 segundos. De 225 ejemplares que se sacrificaron y que fueron alimentados con hormona para reversión sexual, 9 peces no formaron conducto gonadal, concluyendo que éstos son neomachos formados. Con la baja cantidad de peces reversados, es necesaria la complementación de la técnica con la inmersión de los alevines en la hormona. Los parámetros microscópicos estuvieron dentro de los rangos encontrados por otros autores. La temperatura durante los procesos organogénéticos fue un factor importante, ya que a 11°C en 22 días los óvulos pasaron a estadio de neurula, mientras que a 15°C en 23 días pasaron a fase de embrión. Cabe destacar que el tratamiento A, que contenía cloruro de sodio, cloruro de potasio, glucosa, bicarbonato de calcio y metanol al 10%, tuvo un menor índice de mortalidad, siendo éste un factor vital para obtener altos porcentajes de fertilidad.

ABSTRACT

Five extenders to cryopreservate semen of trout (*Oncorhynchus mykiss*) and semen of “neomacho” were evaluated with the aim to achieve the best percentage of fertilization. The techniques used will save space (infrastructure) for the maintenance of breeding males, ease of handling and transfer of specific genotypes. Also, we examined the efficacy of the 17 α -methyltestosterone hormone sexual reversion supplied in the food to the fishes in order to raise “neomachos”. For the analysis of fertilization rates, the best extender of cryopreservation was treatment B, which contained glucose and methanol 10% as cryoprotectant. The fertilization rate obtained with this extender was 69.25%. The freezing of the semen was performed by keeping the straws 10 cm above the liquid nitrogen for 10 minutes, and thawed at 37°C for 60 seconds. From 225 specimens which were sacrificed and fed with the hormone for sex reversal, only 9 of them did not form gonadal ducts. Concluding that these were the “neomachos” formed. With this low quantity of reversed fish, it becomes necessary to supplement the reversion with the immersion of the fishes in the hormone. The microscopic parameters were, mostly, inside the ranges found by other authors. The temperature during the organogenetics process was an important factor, because at 11 ° C after 22 days the eggs changed to stage of neurula, whereas at 15 ° C after 23 days they changed to embryo stage. Moreover, the extender A, containing sodium chloride and potassium chloride, glucose, calcium bicarbonate and methanol 10%, was suitable for the parameter of mortality, being, as well, a vital factor for getting high fertility rates.

1.1 Marco teórico

1.2.1 Trucha arco iris

Según Blanco (1995), la trucha arco iris se caracteriza por la forma fusiforme que presenta su cuerpo cubierto por finas escamas. La coloración depende del ambiente en que vive, del sexo, de la edad y del estado de maduración sexual, entre otros factores. La coloración de su dorso varía entre el castaño y el verdoso, sus flancos son de tonalidad grisácea y el vientre es de color blanco con pintas oscuras que se las aprecia esparcidas por el cuerpo y las aletas. Este pez es carnívoro y se alimenta en la naturaleza de presas vivas, como insectos, larvas, moluscos, crustáceos y pequeños peces (citado por Araujo, 2007).

Son denominados poiquiloterms, esto quiere decir que la temperatura del agua es la misma que tiene el pez. No son capaces de tolerar los cambios bruscos de temperatura, es por esto que a nivel industrial se necesitan aguas estables, que presenten pocas variaciones térmicas diarias y preferentemente temperaturas de 15°C, que son óptimas para el engorde y crecimiento de la trucha arco iris (Blanco, 1995).

Gall & Crandell (1992) afirman que en 1874 se inicia la propagación artificial de la trucha arco iris mediante la transferencia de óvulos fecundados del río MacCloud en el norte de California hacia Caledonia, Nueva York. La primera exportación que se realizó con éxito fue en 1874, a Tokio. Se introdujo en Francia en 1879 y así, difundida en toda Europa. En 1890 se inicia el cultivo como actividad industrial en Dinamarca.

La actividad metabólica está ligada con la temperatura, es por esto que en invierno con aguas frías, las truchas ingieren poca cantidad de alimento y su crecimiento es lento, en comparación con el verano, en el cual la trucha es muy voraz. Este pez tiene mejores crecimientos que los comunes, ya que puede adaptarse fácilmente a la alimentación artificial, siendo éste uno de los motivos de ser una típica especie de cultivo (Blanco, 1995).

1.2.2 Características biológicas y taxonomía

La clasificación de la trucha arco iris (*Orcorhynchus mykiss*) ha sido objeto de debate así como otros salmónidos (Tabla 1.1). Ha sido demostrado que el número de vértebras de la trucha arco iris difiere entre lotes y depende de la temperatura del agua a la que sea incubado el huevo, principalmente durante el periodo embrionario de formación vertebral. Mientras son incubadas a temperaturas altas, el grado de desarrollo del número de vértebras decrece y viceversa (Dávila y Garcés, 2007).

Tabla 1.1 Clasificación taxonómica de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*)

Categoría	Nombre
Reino	Animal
Subreino	Metazoos
Tipo	Cordados
Subtipo	Vertebrados
Superclase	Gnatostomados
Clase	Osteichthyes
Subclase	Actinopterigios
Orden	Salmoniformes
Suborden	Salmonoidei
Familia	Salmonidae
Subfamilia	Salmoninae
Género	<i>Oncorhynchus</i>
Especie	<i>Oncorhynchus mykiss</i> (Suckley)
Nombre común	Trucha arco iris

Fuente: Blanco, (1995).

1.2.3 Reproducción

Para su reproducción intervienen hembra y macho, es decir es sexual. Una de las principales características que presentan es que sus órganos sexuales son indiferenciados los primeros períodos de vida, de manera que no es posible determinar microscópicamente si la glándula sexual de un ejemplar es testículo u ovario, este fenómeno es conocido como gonocorismo indiferenciado, el cual lo presentan las truchas en los primeros meses de vida. Hasta luego de aproximadamente 4 meses, estos órganos no adquieren la estructura histológica funcional típica (Dávila y

Garcés, 2007). Las truchas arco iris completan su maduración sexual a los 2 años de edad con un peso de alrededor de 1.000 gramos.

Al finalizar el primer año de vida, algunos machos se presentan maduros sexualmente, sin embargo, este proceso puede ser perjudicial para la ganancia de peso (Araujo, 2007).

Según Bromage, Porter y Randall (2001) existen varios factores ambientales que regulan la función reproductiva en los peces. Como pueden ser, el fotoperíodo y la temperatura; que son los más importantes, especialmente en salmónidos. El principal factor es el fotoperíodo, ya que es determinante de la maduración y del desove, actuando sobre el mecanismo de la pubertad, gametogénesis y ovulación. La temperatura del agua actúa como modulador, regulando la progresión del proceso reproductivo, como la liberación de los gametos, la fertilización, la embriogénesis, la diferenciación sexual, etc.

Con la investigación de Estay, Díaz, Valadares y Dazarola (1995), determinaron que la pubertad consiste en una serie de mecanismos fisiológicos que promueven la primera maduración gonadal, cuando son activados los procesos de gametogénesis y la producción de hormonas sexuales, que culminarán posteriormente con la maduración sexual. Este proceso implica la maduración de los gametos, la expresión de las características sexuales secundarias y el comportamiento reproductivo. El desencadenamiento de la pubertad depende de la especie, de la edad, del peso y del perfil genético del animal.

Cuando se encuentran libres en la naturaleza las truchas emigran a las cabeceras de los ríos en busca de aguas más limpias y lugares seguros de los depredadores para poder realizar su reproducción, ya que solo desovan una vez al año en las estaciones con temperatura más baja. Para el desove las hembras cavan un nido en zonas con fondo arenoso y con poca corriente. Los huevos son depositados en estas fosas, fertilizados por el macho y luego son cubiertos con arena, donde permanecen hasta la eclosión (Blanco, 1995).

Existen diferencias cuando crecen en tanques ya que la trucha no se puede reproducir naturalmente. Tanto los reproductores hembras y machos alcanzan la madurez sexual, sin embargo no los pueden liberar naturalmente, necesitando así la intervención del hombre para completar el proceso de reproducción (Araujo, 2007).

Esta intervención se da mediante extracción manual de los ovocitos y espermatozoides por compresión abdominal, sin ser necesaria la aplicación de hormonas, como el extracto crudo de pituitaria de carpa, el cual es normalmente usado en la reproducción de otras especies de peces que han sido mantenidas en cautiverio. Según Springate, Bromage, Elliot y Hudson (1984), la productividad máxima puede ser alcanzada cuando los huevos son fertilizados entre cuatro y diez días después de la ovulación, bajo temperatura del agua de 10°C.

La fertilización se inicia cuando un espermatozoo penetra al huevo a través del micrópilo y se fusiona con la membrana plasmática del mismo; solo un espermatozoo puede tener acceso al oocito, debido al tamaño de la abertura del micrópilo. Algunos autores señalan que el espermatozoo infértil

obstruye el micrópilo impidiendo la entrada del espermatozoo capaz de fertilizar al huevo. (Bastardo, 1992).

En los criaderos suelen fertilizar una proporción de huevos con semen de varios machos, con el propósito de compensar posibles muestras infértiles; sin embargo, si el micrópilo es obstruido por el espermatozoo infértil, la fertilidad puede verse comprometida, aunque se haya añadido semen viable (Bastardo, 1992).

1.2.4. Ciclo reproductor de la trucha arco iris

Mediante medios artificiales es posible manipular el fotoperíodo para poder adelantar o retrasar la maduración sexual de los reproductores, aumentar tanto en calidad como en cantidad los productos sexuales, mejorar los índices de fertilidad, seleccionando y cambiando a los reproductores a medios ambientales óptimos (Blanco, 1995).

La trucha tiene un ciclo reproductor anual y es indispensable que tanto el macho y la hembra sean adultos y sexualmente maduros. La hembra esta lista para reproducirse a partir de los dos años.

En el proceso de reproducción se distinguen algunas fases:

El primer estadio se le denomina de reposo o punto de partida. Aquí las gónadas no se encuentran en actividad y son de pequeño tamaño, filiformes.

El segundo estadio se llama premaduración. Este inicia cuando los períodos de luz disminuyen y las gónadas comienzan su actividad

fisiológica. Durante esta fase se da inicio a la gametogénesis, comienza la diferenciación especializada de células sexuales. Al mismo tiempo se engrosan los ovarios y los testículos, aumenta la vascularización y adquieren gran actividad.

El tercer estadio trata de la maduración específica de las células sexuales. Aquí finaliza el proceso previo de maduración y adquieren el calificativo de gametos (Blanco, 1995).

La maduración de la hembra está definida biológicamente como la migración del núcleo celular o vesícula germinativa, al polo animal del óvulo.

La maduración en lo machos está definida como espermiogénesis. Al final de este periodo de maduración se puede diferenciar entre machos y hembras debido a las manifestaciones de los dimorfismos sexuales.

La espermatogénesis de los peces está relacionada con la estructura testicular. Se diferencia de aquellos con estructura tubular y los que presentan estructura lobular, por esta razón se distinguen diferentes patrones en salmónidos (lobular) y ciprinidos (tubular). En los salmónidos los dos principales eventos del ciclo testicular son espermatogénesis y espermiación. Estos están separados por un estadio de maduración de los espermatozoos, en el cual estos sufren cambios fisiológicos. La iniciación de un nuevo ciclo de espermiación ocurre cuando los espermatozoos han sido liberados desde los testículos, esto demuestra la independencia

espacial de la espermatogenesis y la espermiación (Bastardo, Guedez y León, 2004).

Cuando la maduración culmina, las células sexuales abandonan sus lugares de formación. Los óvulos que se encontraban en la superficie interna de los ovarios dentro de los folículos, caen en la cavidad ovárica, debido a la ruptura de estas formaciones y al mismo tiempo podemos encontrar líquido folicular, este proceso se conoce como ovulación. En el caso del macho los espermatozoides mezclados con líquido seminal, se encuentran almacenados en los conductos espermáticos, que están cerca de los orificios naturales de salida (Blanco, 1995).

1.2.5 Control de sexualidad en peces

Las técnicas de control de la sexualidad en los peces es de mucho interés para los piscicultores, pues tienen una gran potencial para aumentar la productividad en los cultivos, permitiendo obtener beneficios asociados con el sexo que tienen las características morfológicas, de interés económico fisiológicas o de comportamiento (Tabata y Mizuta, 1997).

A diferencia de la mayoría de peces que sí presentan gonocorismo diferenciado, es decir los tejidos embrionarios van a dar origen a testículos u ovarios, es imposible la modificación de su desarrollo en otro sentido (Blanco, 1995).

Este fenómeno ha sido de gran ayuda para los piscicultores para conseguir artificialmente lotes de peces monosexos, obteniéndose todas hembras o todos machos (Blanco, 1995).

A nivel industrial una de las principales ventajas obtenidas por el cultivo monosexo, es cuando los ejemplares de uno de los sexos presentan, en relación al otro, una marcada superioridad en la tasa de crecimiento. Dependiendo de la especie el uso de las técnicas de control de los sexos pueden traer otros beneficios, como: supresión de la reproducción, contención de gastos energéticos con la actividad reproductiva, uniformidad de tamaño en la cosecha, reducción de los efectos de la maduración sexual en la apariencia y en la calidad de la carne (Beardmore, Mair y Lewis, 2001).

Genéticamente la mitad de los alevines procedentes de la incubación de un lote de huevos deben ser machos y la otra mitad hembras. Cuando se les suministra hormonas masculinizantes en la alimentación durante sus primeros días de vida, como la testosterona, produce que a esa mitad que le correspondía desarrollar ovarios, desarrolle testículos. Estos individuos transformados mediante esta técnica, se le denomina “falsos machos”, que aunque presenten testículos y produzcan espermatozoides poseen el código genético de hembra (Blanco, 1995).

En muchas especies de peces para cultivo, las hembras tienen tasas de crecimiento más elevadas que los machos llegando a tener tamaños más grandes. Dentro de algunos grupos incluyendo los salmónidos, los machos maduran antes de llegar al peso comercial, poniendo en peligro la calidad y la rentabilidad del cultivo. El proceso de madurez sexual afecta a la productividad debido a que durante este período la energía para el crecimiento somático se dedica a la producción de gametos, teniendo como resultado una disminución en el crecimiento, la eficiencia de la alimentación, la supervivencia y la calidad del pescado (Bye y Lincoln, 1986).

La trucha arco iris ha sido tradicionalmente comercializada en la forma de trucha porción, con un peso aproximado de 250gramos, que puede ser alcanzado antes del inicio de la actividad reproductiva. En los machos existen problemas, ya que una considerable proporción de ellos alcanza su madurez sexual el primero año de vida, mientras las hembras lo hacen a los dos años de edad (Tabata y Ports, 2004).

Además de esto, después de que alcancen la maduración sexual, los machos salmónidos desarrollan algunas características sexuales secundarias como la proyección de la mandíbula en forma de gancho, el espesamiento y oscurecimiento de la piel, las cuales son indeseables para la comercialización. Estos cambios se los asocia también con la disminución de su resistencia y el aumento del comportamiento agresivo que los predispone a infecciones por hongos y bacterias ocasionando la muerte del animal, comprometiendo así la venta de los animales (Brown & Roberts, 1982).

1.2.6 Manejo ambiental de huevos y alevines

El agente principal para el mantenimiento de los huevos y alevines es el agua. Su calidad o idoneidad está definida por sus aspectos físicos, químicos y biológicos. Dentro de los aspectos físicos tenemos la temperatura del agua y la inexistencia de materias en suspensión que son los más importantes (Valladares, 2002).

La temperatura del agua debe ser registrada constantemente, de modo que es necesario colocar un termómetro que esté sumergido en el agua permanentemente. Además el pH también debe ser controlado, los filtros deben ser limpiados y revisados para que el agua no sea alcalina (Drummond, 1988).

El tiempo de permanencia de los alevines en los tanques depende del espacio disponible y del abastecimiento del agua. Es de vital importancia mantener los alevines bajo condiciones controladas hasta que la osificación haya sido completada y los ejemplares comiencen a ser inmunes a la *Myxosomiasis* o *torneo*. Este periodo acontece luego de 10-12 semanas de alimentación cuando los peces alcanzan tamaños de 5-8 cm de longitud (Drummond, 1988).

1.2.6.1 Crecimiento

El periodo de alevinaje, post alevinaje pre-engorde comprenden la primera etapa, hasta el momento que los ejemplares hayan alcanzado el peso de 5 gramos (Bastidas y Cartagena, 2002).

Los periodos de alevinaje y post alevinaje van desde el nacimiento hasta la primera alimentación. Dichos períodos duran de 12 a 14 días en el que los alevines deben permanecer alejados de la luz. Cuando ya comienzan a nadar libremente es necesario empezar a alimentarlos de forma inmediata, en intervalos seguidos y pocas cantidades de alimento (Bastidas y Cartagena, 2002).

Cuando las truchas se encuentran con un peso entre 1 y 5 gramos se encuentran en la etapa de pre-engorde. Una vez que los peces han superado el peso de 1 gramo deben ser trasladados a otros estanques para proceder a la primera clasificación. La segunda etapa del crecimiento comprende desde el engorde hasta trucha porción, en donde los peces pesan entre 5 a 280 gramos. Dentro de este lapso el cultivo necesita mayores requerimientos de alimentación, mejores recursos de infraestructura, además los ejemplares necesitan ser trasladados a estanques al aire libre, de

dimensiones de 10x10x5 metros y cargas de hasta 45 Kg.m⁻³. El engorde final dura de 2 a 4 meses y es necesario medir el oxígeno requerido ya que la escasez hará que los peces se acumulen en la entrada de agua de las piscinas. A nivel industrial es recomendable colocar redes en forma perpendicular a la caída y al pelo del agua, es decir a 45° del plano horizontal, para que las truchas no se escapen de los estanques ya que nadan a contracorriente (Bastidas y Cartagena, 2002).

1.2.6.2 Oxígeno

El aumento de temperatura del agua ocasiona una disminución del oxígeno disuelto que la trucha necesita para sobrevivir. Las complicaciones llegan cuando aumentan las necesidades por el oxígeno, ya que siendo un animal poiquiloterma presenta una actividad metabólica proporcional a la temperatura del agua, estableciéndose dentro de unos límites (Bastidas y Cartagena, 2002).

Blanco (1995) sustenta que cuando existen cantidades inferiores a 5 mg.L⁻¹ de oxígeno, a la trucha se le dificulta la extracción del oxígeno del agua, para ser transportado a través de las branquias al torrente circulatorio.

El agua puede absorber el oxígeno del aire equilibrando su presión parcial con la del oxígeno del aire, en la interfase aire-agua. Es necesario conocer los miligramos de oxígeno disuelto por litro de agua (mg.L⁻¹) que ingresan a los estanques, pues indicará la cantidad de peces que podemos tener en cada piscina. Los parámetros señalados serán fundamentales para que la piscifactoría

tenga un buen aprovechamiento y una buena producción (Bastidas y Cartagena, 2002).

1.2.6.3 Transparencia cristalina del agua

Durante la incubación es importante que el agua destinada para esta etapa se mantenga transparente, cristalina y sin partículas en suspensión. Los huevos fertilizados que están colocados en las bandejas de incubación actúan como filtros de las partículas en suspensión, sin importar si su tamaño es pequeño. El flujo continuo del agua hace que dichas partículas queden retenidas entre los huevos, ocasionando la obstrucción de los poros microscópicos por los cuales el embrión recibe el oxígeno disuelto del agua. Como resultado se obtienen bajas tasas de supervivencia y se empeora con las manipulaciones que reciben los huevos fertilizados con el objetivo de eliminar el limo depositado sobre ellos (Valladares, 2002).

1.2.6.4 Luminosidad ambiental

En los inicios de la piscicultura se conocieron los efectos negativos de la luz sobre los huevos embrionados y larvas. Siendo indispensable que tanto huevos como larvas se almacenen en la oscuridad (Valladares, 2002).

Las larvas son fotonegativas y se comportan de distinta manera cuando son sometidas a la luz u oscuridad. Cuando están sometidas a la oscuridad su actividad es escasa y permanecen agrupadas en el fondo de las pilas, apoyándose sobre un lado de su cuerpo, formando conglomerados que son muy típicos en la trucha arco iris. En cambio cuando están en la luz muestran una gran actividad, buscando la oscuridad y agrupándose en aquellos espacios de las pilas que ofrecen mejores condiciones. Esto provoca

un gasto de energía a expensas de las reservas nutricias del saco vitelino, ocasionando una disminución de las energías necesarias para un buen desarrollo corporal, por este motivo, se debe evitar la mayor actividad posible de las larvas para obtener alevines vigorosos. Una vez que se ha completado la total reabsorción del saco vitelino y empiezan a comer, comienzan a buscar progresivamente la luz (Valladares, 2002).

1.2.7 Generalidades del semen

El espermatozoide puede ser morfológicamente dividido en cabeza, pieza intermedia y cola (Nagahama, 1983). En la mayoría de los grupos de peces el acrosoma está ausente, el cual se forma en todos los otros grupos de vertebrados. La carencia del acrosoma es compensada por la presencia del micrópilo, que es un agujero en corion del huevo y ayuda a la penetración de los espermatozoides (Cosson, Billard, Cibert, Dréanno y Suquet, 1999). La cola o flagelo puede subdividirse en cuello, pieza intermedia, principal y terminal; como ocurre para el esperma de los mamíferos domésticos. El cuello es la conexión basal de la cola con la cabeza. Esta pieza intermedia se compone de una vaina mitocondrial dispuesta en hélice que es responsable de la generación de energía necesaria para que se muevan los espermatozoides (Hafez, 2004).

1.2.7.1 Concentración espermática

Los métodos utilizados para la determinación de la concentración espermática son la cuenta en cámara de Neubauer y el establecimiento de la relación entre volumen celular: volumen de fluido seminal, obtenida por medio del espermocrito y por espectrofotometría. Siendo el más apropiado el número de espermatozoides por mL de semen. El semen altamente concentrado no siempre ofrece una elevada motilidad o altas tasas de fertilización.

Este parámetro no es confiable para conocer la capacidad de fertilización del semen y puede variar en cada especie o en un mismo individuo a lo largo de la vida. (Araujo, 2007).

Existen algunos rangos de valores encontrados en relación con el número de espermatozoos.mL⁻¹ para la trucha arco iris, *Oncorhynchus mykiss*, como pueden ser 9-16 x 10⁶.mL⁻¹; 26 x 10⁶.mL⁻¹ (Bastardo, 1992).

1.2.7.2 Caracterización seminal

Con todas las especies animales es necesario evaluar la calidad espermática para asegurar el éxito de la inseminación artificial y así poder monitorear los procedimientos de manipulación del material seminal, junto con la movilidad y el tiempo de activación; la concentración espermática es una de las variables más utilizadas para determinar la calidad seminal en peces (Guarnizo,2007).

La calidad del semen puede ser evaluada en diferentes niveles de complejidad: espermatozocrito, viabilidad espermática, porcentaje de movilidad espermática, intensidad de movilidad espermática, ultraestructura de los espermatozoides, composición química del plasma seminal o la capacidad de fertilización que poseen los espermatozoides (Guarnizo, 2007).

1.2.7.2.1 Características macroscópicas

1.2.7.2.1.1 Volumen Seminal

Es medido directamente dentro del recipiente de recolección. El volumen de semen producido por un reproductor depende de muchos factores, como la especie hasta la habilidad de la persona que realiza su extracción (Cruz y Velasco, 2005).

El volumen de semen producido por los peces es muy variable. Depende de la especie, la edad y el tamaño del ejemplar, también de la época del año en la que fue recogido, si al principio o al final del período reproductivo. Entre los factores ya mencionados, el volumen depende más de la edad y del tamaño de los peces, por ejemplo el volumen obtenido en la trucha arco iris con 3 años de edad es de 3 veces mayor que la obtenida en individuos con 2 años (Bedore, 1999).

1.2.7.2.2 Características microscópicas

Al realizarse la extracción del semen los análisis microscópicos deben determinarse dentro de las 8 horas siguientes a su recolección, pues a medida que transcurre el tiempo, su calidad disminuye considerablemente, siendo la más afectada la movilidad espermática.

1.2.7.2.2.1 Movilidad Espermática

El parámetro más utilizado para la evaluación seminal es la movilidad. Los cambios presentados en las concentraciones del plasma seminal, como en la concentración de iones, en el pH y en la osmolaridad, provocan la despolarización de la membrana celular e inducen la movilidad o activación espermática. En algunas especies las concentraciones altas de cationes (potasio), pH ácido y condiciones isotónicas podrían ser las causantes de la inhibición de la movilidad espermática. Mientras que algunos de estos factores, tales como la dilución de iones, variaciones de pH y el aumento de la osmolaridad en los teleósteos marinos o la disminución en teleósteos de agua dulce, activan la movilidad (Cosson, Linhart, Mims, Shelton y Rodina, 2000).

Se puede utilizar una solución de bicarbonato de sodio para activar la movilidad espermática de semen crioconservado. La muestra así diluida debe observarse con objetivo de bajo aumento (máximo 10X) (Cruz, Pardo, Lombo, Lombo y Pardo, 2004).

Debido al gran número de divisiones espermatogónicas la producción espermática en peces es muy alta. En comparación con el esperma de los mamíferos una de las diferencias radica en que la secreción espermática de los peces permanece inmóvil

en la gónada y al ser expulsada, su movilidad se activa al entrar en contacto con el agua. Esta activación se refiere a la disminución de la presión osmótica y a la disminución de las altas concentraciones de potasio existentes en la secreción testicular de los espermatozoides y pueden permanecer móviles por un corto periodo de tiempo, siendo pocas veces superiores a 50 segundos (Billard, 1988).

La calidad del semen basada en motilidad y concentración está influenciada por el contenido de ácido ascórbico en la dieta, pues una deficiencia reduce tanto la concentración como la movilidad de los espermatozoides, afectando la fertilidad de la trucha arco iris (Bastardo *et al.*, 2004).

1.2.7.2.2.2 Tiempo de Activación

La duración e intensidad de la movilidad espermática es evaluada junto con la movilidad, cronometrando el tiempo que transcurre desde el momento en que se adiciona la solución activadora al semen, hasta la ausencia de movilidad espermática en la muestra. Esta duración varía ampliamente entre las especies de peces. Coincidiendo en general, con el periodo fértil del espermatozoide (Cruz y Velasco, 2005).

La duración de la movilidad del espermatozoide es determinada por el volumen de la solución activadora utilizada. Una solución de bicarbonato al 1% aumenta el tiempo de activación de espermatozoides de yamú (*Brycon amazonicus*) y cachama (*Piaractus brachypomus*) (Guarnizo, 2007).

1.2.7.2.2.3 Viabilidad Espermática

Con la coloración diferencial, utilizando una solución de eosina y como colorante de contraste nigrosina, se determina el porcentaje de células espermáticas muertas o con daños graves en la integridad de su membrana celular. La toma de datos se basa en que, los espermatozoides muertos son permeables a los colorantes y aparecen coloreados al ser observados al microscopio. Para esto se debe mezclar una pequeña gota de semen con la solución de los dos colorantes mencionados anteriormente (50 μ L), sobre una lámina portaobjetos limpia y seca, se deja secar al ambiente y luego es analizada al microscopio óptico (100X) y realizar la diferenciación correspondiente (Guarnizo, 2007).

1.2.8 Reversión sexual

La administración hormonal en peces para el control artificial del sexo se inició con los trabajos realizados a finales de 1930 y principio de 1940. Estos estudios mostraron información sobre los mecanismos genéticos de la diferenciación sexual y también las potencialidades de sus aplicaciones

en especies económicamente importantes, cuyos cultivos pueden ser mono sexos (Araujo, 2007).

Para que la reversión sexual sea exitosa se deben tomar en cuenta ciertos parámetros como el tipo, la naturaleza y la concentración de la hormona que sea utilizada, así también como de la vía de administración, la época de inicio y de la duración del tratamiento. La respuesta que presenta cada individuo varía mucho de acuerdo con la etapa de desarrollo, por lo tanto, el tratamiento es conducido durante la fase de mayor sensibilidad al esteroide exógeno y es más importante que la dosis o duración del tratamiento (Piferrer y Donaldson, 1993).

Una reversión sexual eficiente tiene a lugar cuando la administración de los esteroides sexuales inicia antes de la aparición de las primeras señales de la diferenciación y se debe continuar hasta la fase en que la diferenciación se haya estabilizado. En las especies gonocóricas diferenciadas la reversión del sexo obtenida de modo artificial probablemente es permanente, pues la acción de los genes determinantes del sexo gonadal se limita al periodo de la diferenciación, mientras que, en las especies hermafroditas, los genes ligados al sexo pueden expresarse en estadios más avanzados del desarrollo gonadal (Yamazaki, 1983).

La masculinización ha sido conducida utilizando 17 alfametilttestosterona (MT), que por ser un esteroide sintético, es más potente que los naturales y por lo tanto la dosis utilizada es menor. Por otra parte, demanda de más tiempo para ser degradados en la naturaleza y es más perjudicial para el medio ambiente (Lee y Donaldson, 2001).

Las hembras masculinizadas presentan testículos morfológicamente alterados, la mayoría de las veces sin ductos espermáticos. Es necesario sacrificar los animales para retirar las gónadas y extraer el semen. El mismo es recolectado directamente del testículo y presenta una reducción en la tasa de fertilización, podría ser por la presencia de gran cantidad de espermátides (Araujo, 2007).

Cuando la hormona 17 alfametiltestoterona es administrada en dosis altas de alrededor de 25 mg.kg^{-1} de la dieta, promueve la esterilización de las gónadas. En dónde se desea promover la esterilidad reproductiva, los autores recomiendan el uso de baños de inmersión, seguido por el suministro de la hormona en la dieta (Mellito da Silveira, Tabata y Rigolino, 1995).

Los espermatozoides que han sido extraídos directamente del testículo pueden no haber completado su madurez metabólica. A nivel experimental se ha observado que los espermatozoides de peces teleósteos son capaces de producir energía durante su movilidad y durante su almacenamiento estando inmóviles. Han sido capaces de utilizar la glicólisis, el ciclo de los ácidos tricarbóxicos, la fosforilación oxidativa, el catabolismo de lípidos y la β -oxidación de los ácidos grasos, como las rutas bioquímicas para la obtención de dicha energía; por lo tanto, las condiciones aeróbicas y anaeróbicas determinarán la eficiencia y el uso de una ruta específica (Betancur, Montoya, Mira, Rojas y Olivera, 2008).

Esta técnica de mejoramiento genético es ampliamente utilizada para incrementar el crecimiento de los peces y la productividad del cultivo en Norteamérica y otros países (Bastardo y Sofía, 2003).

1.2.9 Crioconservación de semen de peces

Las investigaciones del semen de peces ha sido objeto de investigadores durante mucho tiempo, especialmente de los salmónidos. Siendo de mayor interés las relacionadas con la preservación de semen mediante técnicas de congelamiento, para almacenarlo y usarlo posteriormente en la propagación artificial de los peces a nivel de criaderos (Bastardo, 1992).

La tecnología de la crioconservación de semen comenzó hace 50 años aproximadamente, cuando se descubrió que el glicerol podía actuar como crioprotector. Con dicho hallazgo se facilitó la congelación de espermatozoides y su almacenamiento por largos periodos, para usarlos posteriormente en programas de inseminación artificial. La crioconservación es una técnica de conservación de tejidos, células u otros materiales biológicos a muy bajas temperaturas, en la cual los tejidos permanecen genéticamente estables y metabólicamente inertes (Hafez, 1986).

La crioconservación es la rama de la criobiología, que se trata del estudio de la vida a bajas temperaturas, por medio de la cual se espera prolongar indefinidamente la vitalidad y las funciones metabólicas de las células a temperaturas a -196°C . La Criobiología es la ciencia que estudia los sistemas celulares, que pueden ser inducidos a variaciones extremas en las propiedades químicas, térmicas y eléctricas, las cuales pueden alterar las membranas celulares y los organelos (Ávila, Madero, López, Leon, Acosta, Gómez, Delgado, Gómez, Lozano y Reguero, 2006).

Con la ayuda de esta técnica han existido cambios dramáticos en la industria pecuaria. A nivel mundial el semen que es congelado es usado como una herramienta esencial en los programas de mejoramiento animal. Por otra parte, el uso de semen congelado pretende aumentar el tamaño genéticamente efectivo de las poblaciones y así poder mantener su diversidad genética, especialmente de aquellas mantenidas en cautiverio (Phronen, 1994). Como beneficios de la preservación de gametos en peces teleósteos, incluyen:

- Suministrar los gametos de individuos genéticamente mejorados a través de su almacenamiento
- Proporciona protección sanitaria con la introducción de nuevas líneas genéticas reduciendo el peligro de transmisión de patógenos desconocidos en los cultivos de peces (Asturiano, 2003).
- Facilita el suministro permanente de gametos para su utilización en criaderos o para investigación.
- Evita pérdidas económicas en el mantenimiento de criaderos, ya que se proporciona un resguardo por pérdidas en líneas genéticas.
- Permite que el transporte de material genético entre criaderos sea más fácil, brindando protección genética a los gametos y embriones crioconservados (Guarnizo, 2007).

La crioconservación abarca procedimientos que permiten el almacenamiento de espermatozoides en nitrógeno líquido a una temperatura de aproximadamente -196°C . Manteniéndose la viabilidad de

los gametos por tiempo indefinido. La tecnología para la criopreservación de gametos de peces aún se encuentra en desarrollo y su utilización en producciones comerciales sigue siendo bastante escasa, comparada con algunas especies de animales domésticos (Araujo, 2007).

Estudios relativos a la congelación del semen de machos normales de trucha arco iris han sido llevados a cabo por varios autores (Baynes y Scott, 1987; Cabrita, Robles, Alvarez y Herráez, 2001), sin embargo, los trabajos relacionados a la utilización y a la aplicación del semen obtenido de hembras masculinizadas aún son muy escasos (Araujo, 2007).

El tipo de recipiente utilizado para envasar el semen es un otro aspecto importante en el proceso de crioconservación. Se utilizan pajuelas de diferentes capacidades (0,25 mL; 0,5 mL; 1,0 mL; 1,2 mL; 1,8 mL; 2,5 mL; 4,0 mL y 5,0mL) (Lahnsteiner, Weismann y Patzner, 1997).

Por otro lado es conocido que las células espermáticas crioconservadas están sometidas a daños o perjuicios por la formación de hielo, lo que se presenta frecuentemente durante la descongelación que durante la congelación. También es necesario destacar que cuando las pajuelas se descongelan a menor velocidad, se forman pequeños cristales de hielo. Sin embargo, algunas células de otras especies son capaces de tolerar amplias velocidades de descongelación que otras (Bolla, Holmefjord y Refstie, 1987). El hielo intracelular produce efectos perjudiciales, debido al aumento del volumen del agua al congelarse, a la recrystalización que se produce durante el descongelamiento y al estrés osmótico celular al fundirse el hielo intracelular. Las muestras de semen que estén contaminadas con orina, materia fecal o bilis, y sean almacenadas por

periodos prolongados antes de la congelación, son más difíciles de crioconservar (Rana, 1995).

En el proceso de la crioconservación se producen daños en un gran número de espermatozoides. Por consiguiente, el número de espermatozoides viables, sólo será una pequeña fracción después de los procesos de congelación y descongelación. Es por esto que se requiere de mayor volúmenes de semen crioconservado que de semen fresco (alrededor de 10 veces) para fertilizar un número igual de oocitos (Billard y Cosson, 1992). A pesar de que se aumente el número de espermatozoides crioconservados, no siempre se obtendrán resultados exitosos en la fertilización, como con el semen fresco (Guarnizo, 2007).

1.2.10 Diluyentes y crioprotectores

Los diluyentes son soluciones de sales o de carbohidratos que se añaden al semen. Su función es mantener la viabilidad de las células espermáticas durante el cambio de temperatura. Las condiciones mínimas requeridas de los diluyentes son: isotonicidad necesaria para que no exista activación previa de los espermatozoides; estabilidad, pues sus características físico-químicas no deben ser alteradas durante el contacto con el semen; alta conductividad térmica, permitiendo la rápida transferencia de temperatura del medio externo para los espermatozoides; esterilidad, para evitar microorganismos potencialmente nocivos para las células espermáticas. Es importante que la motilidad de los espermatozoides no sea activada ni antes ni durante la congelación y descongelación, ya que esto ocasionaría el agotamiento de la reserva energética necesaria a la fertilización (Legendre y Billard, 1980).

El uso de diluidores puede estabilizar las condiciones físico-químicas durante el almacenamiento del semen, prolongando la viabilidad de los espermatozoides. Han sido empleadas soluciones que contienen glucosa y soluciones salinas como diluidores de semen de trucha arco iris (Araujo, 2007).

El mecanismo de actuación de los crioprotectores no es muy conocido, pero están asociados con la prevención de la peroxidación de lípidos, pérdidas de la fluidez de la membrana, desestabilizaciones de la capa lipídica, pérdida de los compuestos de la membrana y estabilización de las proteínas de las membranas (Cabrita *et al.*, 2001).

Se han utilizado soluciones salinas que tienen éxito como diluidor del semen de diversas especies. Las soluciones que contienen NaCl con niveles de entre 100 y 200 mm, presentan un pequeño riesgo de daños hipoosmótico o hiperosmótico a los espermatozoides de los salmónidos (Scott y Baynes, 1980).

Según Chao (1991), hay un gran riesgo en la utilización de crioprotectores internos porque estos pueden promover alternativamente la desnaturalización proteica, especialmente bajo elevadas temperaturas, causando así una toxicidad en los sistemas enzimáticos y celulares.

Eso ocurre cuando las concentraciones de crioprotectores internos son muy elevadas. Los crioprotectores internos más efectivos son aquellos que penetran la membrana celular rápidamente. El DMSO y el metanol son los crioprotectores intracelulares más utilizados en la crioconservación del

semen de trucha arco iris. En salmónidos el crioprotector extracelular más usado es la yema de huevo, además su uso es esencial para mantener la viabilidad de los espermatozoides después del proceso de congelación y descongelación (Lahnsteiner, Berger, Weismann y Patzner, 1996).

El grado de toxicidad del crioprotector y su velocidad de difusión a través de la membrana plasmática, dependen de la temperatura a la cual son incorporados a la solución de semen y del tiempo de exposición celular. Esta difusión puede verse afectada por el descenso de la temperatura, ya que durante este proceso la membrana celular aumenta la proporción de colesterol con el propósito de lograr mayor estabilidad mecánica; sin embargo, este aumento del colesterol también disminuye la permeabilidad de la membrana a pequeñas moléculas, pudiendo afectar la penetración del crioprotector en la célula de una manera efectiva (Medina, Velasco y Cruz, 2007).

Los crioprotectores pueden ser divididos en dos grupos: los intracelulares o permeables a la membrana plasmática y los extracelulares o no solubles. El determinante son las propiedades físico-químicas (principalmente el peso molecular) y la interacción que existe entre la sustancia y la membrana plasmática. El papel de los crioprotectores intracelulares es evitar, o disminuir, la formación de microcristales de hielo intracelulares, mientras los crioprotectores extracelulares actúan como estabilizadores y reparadores de la membrana celular. Los crioprotectores intracelulares brindan protección a las enzimas lábiles como la catalasa y mantienen estables las proteínas en soluciones acuosas (Araujo, 2007).

1.2.10.1 Crioprotectores no permeables

Son aquellos que tienen la capacidad de recubrir la membrana plasmática de los espermatozoides protegiendo su estructura de los cambios de temperatura. Estos no atraviesan la membrana espermática debido a su alto peso molecular y tienen la propiedad de prevenir el choque osmótico por medio del control de la rehidratación intracelular durante la descongelación (Medina *et al.*, 2005).

Entre los compuestos que no atraviesan la membrana celular o extracelular, tenemos azúcares como la glucosa o sacarosa; proteínas y glicoproteínas como las contenidas en la yema de huevo, actúan en la superficie de la célula cubriendo y estabilizando su membrana, e interactuando con los crioprotectores que se atraviesan la membrana celular, para inhibir el punto de congelación y aumentar la temperatura de transición del estado de líquido a sólido de los cristales de hielo (Guarnizo, 2007).

1.2.10.1.1 Glucosa

Los azúcares ejercen un efecto positivo sobre la viabilidad espermática debido al aporte energético al espermatozoide, ya que éstos pueden metabolizar glucosa, fructosa, manosa y arabinosa; su acción como crioprotectores contribuye a mantener el equilibrio osmótico. Ramos (1986) afirma que los azúcares (fructosa y glucosa) proveen de energía a los espermatozoides para sus procesos vitales y también aportan sustitutos de electrolitos para el mantenimiento de la presión osmótica.

1.2.10.2 Crioprotectores permeables

Los crioprotectores permeables como el glicerol, dimetilsulfóxido (DMSO) y metanol (MET) son los más comúnmente utilizados para disminuir el punto de congelación del medio extracelular, minimizando así los efectos letales de los cristales de hielo y regulando la tasa de deshidratación celular. Estos crioprotectores protegen los espermatozoides en el proceso de congelación y descongelación, ya que debido a su alta solubilidad en el agua permite la formación de enlaces con el hidrógeno, manteniéndose en solución a temperaturas en que se forman los primeros cristales de hielo; esta propiedad presentada puede alterar las condiciones físicas del hielo y las soluciones que rodean a la células, produciendo una sobrevivencia celular, al disminuir los daños electrolíticos causados en la membrana celular, causado por la mayor concentración de iones en la fase líquida. Además pueden penetrar al interior de la célula, produciendo deshidratación celular por la sustitución del agua intracelular. De esta manera amortiguan el incremento de la concentración de solutos del medio extracelular, impidiendo la formación de cristales de hielo en su interior. Los crioprotectores permeables son sustancias que poseen un bajo peso molecular. La exposición del espermatozoide a los crioprotectores por mucho tiempo, y a altas concentraciones puede causar desnaturalización de las proteínas celulares (Medina *et al.*, 2005).

1.2.10.2.1 Dimetilsulfóxido (DMSO)

Ha sido muy utilizado en estudios relaciones con crioconservación, en los cuales se reportan resultados positivos en la descongelación del semen. Los mecanismos de interacción del DMSO con la célula parecen ser una

interacción electrostática entre el grupo sulfóxido polar del DMSO y la bicapa de fosfolípidos de la membrana plasmática (Neira, Cruz, Jiménez y Muñoz, 1992).

1.2.10.2.2 Metanol (MET)

Este crioprotector suele ser menos tóxico en unas especies que en otras. Su propiedad es que puede salir y entrar más rápidamente de la célula que otros crioprotectores, lo cual podría generar un menor daño de la membrana espermática por formación de cristales de hielo (Guarnizo, 2007).

1.2.11 Congelación - Descongelación del semen de peces

En el momento de la congelación si el semen es colocado directamente en el nitrógeno líquido la membrana plasmática y la pieza intermediaria pueden desaparecer enteramente. Por otro lado, cuando el semen es colocado en el vapor de nitrógeno líquido, los espermatozoides sufren una congelación paulatina y las estructuras membranosas no son muy alteradas (Billard, 1983).

Las condiciones de crioconservación del semen presentan variaciones entre las diferentes especies de peces. Sin embargo en estudios con diferentes especies de salmónidos, no se observaron diferencias en cuanto a la temperatura de descongelación; y los resultados referidos a motilidad espermática y fertilización fueron eficientes con semen descongelado a 25°C por 30 segundos, para todas las especies estudiadas (Lahnsteiner, Weismann y Patzner, 1995).

Durante el proceso de congelación es necesario proceder con tiempos rápidos para que el choque térmico sea mínimo, pero al mismo tiempo no puede ser exageradamente rápido, esto es requerido para permitir la formación de cristales de hielo intracelular. Asimismo se recomienda que el semen crioconservado se descongele lo más rápidamente posible para evitar la recristalización del agua intracelular (Guarnizo, 2007).

La descongelación rápida ha sido utilizada como medida importante en la prevención de la recristalización de hielo intracelular, letal para las células. Las tasas de descongelación exitosas son aquellas que alcanzan altas temperaturas y reducido intervalo de tiempo de exposición (Scott y Baynes, 1980).

Las pajuelas son descongeladas normalmente por inmersión a baño María. Al ser retirada la pajuela del tanque de nitrógeno líquido, debe ser agitada en baño María por pocos segundos, para que se descongele uniformemente. Con pajuelas de más volumen este proceso se hace más difícil, ya que la descongelación no es uniforme y la superficie se descongela más rápido que la porción céntrica (Cruz, 2001).

1.2.12. Proporción espermatozoide: óvulos para fertilización artificial

La fertilización artificial de gametos de peces representa un avance importante a nivel comercial. Esta técnica presenta varias ventajas, de entre las cuales se sobresalen en el aprovechamiento de gametos, el mayor número de huevos fértiles y de embriones factibles. Con eso, el semen extraído de un único macho podría fertilizar hasta cinco hembras (Billard, 1990).

Existe gran variación de la proporción de número de espermatozoide por huevo que se han tomado en los trabajos de fertilización con semen criopreservado de salmónidos. La proporción recomendada para las culturas comerciales de trucha arco iris es de 10×10^6 espermatozoides por huevo. Proporciones de $3,5 \times 10^6$, $2,7 \times 10^6$, 20×10^6 y 16×10^6 espermatozoides por huevo han sido usadas para el semen criopreservado (Araujo, 2007).

Después del proceso de fertilización los ovocitos son llevados hacia las incubadoras en donde permanecen por aproximadamente 300°C días hasta la eclosión. En salmónidos el tiempo de incubación es dado en unidades térmicas acumuladas (UTA) en °C días, de modo que, conociéndose la temperatura medía del agua, es posible prever el número de días necesarios para el desarrollo de cada etapa del embrión. A los 180°C días transcurridos de la fertilización, la organogénesis está bien avanzada presentando los ojos de los embriones bien pigmentados y visibles a través de la cáscara del huevo. Esta fase es denominada “fase de ojo”, los embriones son muy resistentes y permiten una serie de manipulaciones que posibilitan su comercialización. A los 500°C días, los embriones ya presentan dos tercios del saco vitelino absorbido, su desarrollo ya está completo y pueden ser llamados de alevinos (Araujo, 2007).

Para obtener una alta tasa de fertilización, se requiere aproximadamente $1-2 \times 10^5$ espermatozoides por huevo (Bastardo *et al.*, 2004).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de Acuicultura y en las instalaciones de Acuicultura (Pailones) de la Carrera de Ciencias Agropecuarias, IASA, Hacienda el Prado. Su ubicación geográfica está en la Provincia de Pichincha, cantón Rumiñahui, parroquia San Fernando, a $78^{\circ} 24' 44''$ (Oeste) y $0^{\circ} 23' 20''$ (Sur) a una altitud de 2748 msnm. Trabajos complementarios como recolección de óvulos maduros de hembras reproductoras de trucha arco iris se desarrollaron en "Gammarus Corp" ubicado en el cantón Cayambe, a 2827 msnm $0^{\circ} 00' 41''$ (Norte) y $78^{\circ} 08' 25''$ (Oeste), (Figuras 2.1, 2.2, 2.3 y 2.4).

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo desde el primero de febrero del 2009. La fecha de culminación de la parte experimental fue el 27 de noviembre del 2009.



Figura 2.1 Fotografía aérea del IASA.
Fuente: Google Earth



Figura 2.2 Fotografía de las instalaciones acuícolas del IASA - Pailones



Figura 2.3 Fotografía aérea de las instalaciones acuícolas de Gammarus Corp – Cayambe
Fuente: Google Earth



Figura 2.4 Fotografía de las instalaciones acuícolas de Gammarus Corp – Cayambe

La metodología llevada a cabo en la presente investigación es detallada a continuación en el diagrama de flujo (Figura 2.5).

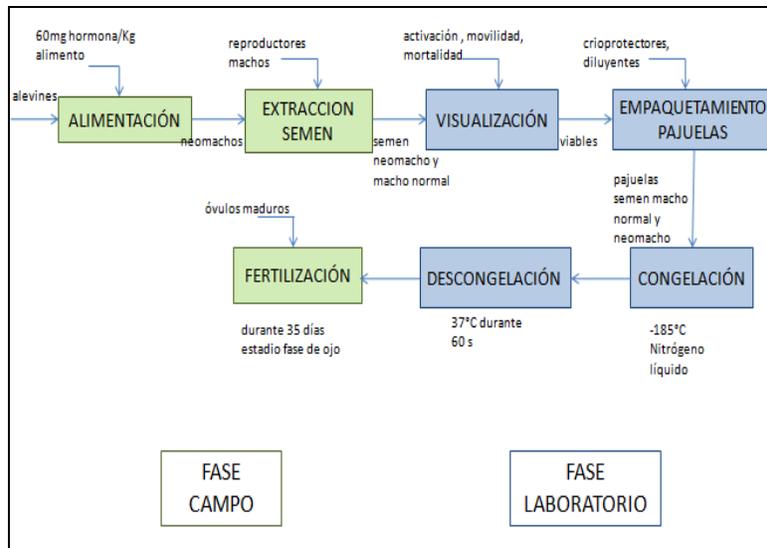


Figura 2.5 Diagrama de flujo de los procedimientos de crioconservación de semen de trucha macho y neomacho.

2.1 Tipo de diseño

Para este proyecto se aplicó un diseño de bloques completamente al azar con cuatro repeticiones.

El modelo matemático que se utilizó fue el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + B_i + T_j + e_{ijk}$$

Donde:

Y_{ijk} = variable aleatoria

μ = media general

B_i = efecto del i-ésimo bloque

T_j = efecto del j-ésimo tratamiento

e_{ijk} = error experimental

Análisis funcional

Se realizaron pruebas de contrastes ortogonales y pruebas de comparación de media de Tukey al 5%.

Descripción de las parcelas experimentales

Tratamientos: medio a, a2, b, c, d y testigo (semen sin congelar)

Repeticiones: cuatro

Variable: cantidad de óvulos fecundados

Unidad experimental: 24 cajas de madera y mallas de plástico de 0.50x0.50x0.50m

Cantidad de óvulos por caja: 12g.unidad⁻¹

Cantidad de semen por caja: 3mL.unidad⁻¹

2.2 Procedimientos:

2.2.1 Reversión Sexual

Para la reversión sexual de los alevines de trucha se utilizó 60mg de la hormona 17 α -metil testosterona (SBS M7252 solid photosensitive) diluida en 700mL de alcohol al 96 % por cada kilogramo de alimento balanceado altamente digerible y con un contenido del 50% de proteína animal. Se utilizó 5 Kg de alimento Biomix® para la alimentación de 475 alevines durante 3 meses.

Además se trabajó con 475 peces previamente tratados con la hormona de transformación en el mes de octubre del 2008.

2.2.2 Extracción del semen de machos normales

Se utilizaron reproductores del Proyecto Piscícola “Pailones” perteneciente a la ESPE, ubicado a 4 km del área administrativa del IASA. Los peces permanecieron 24 horas sin alimentación previa extracción, para obtener muestras de semen sin heces. Para tranquilizarlos y manipularlos fueron sumergidos en una solución de 100 ppm de aceite de clavo durante 3 a 5 minutos, luego de que el eje de nado perdió su funcionalidad, se hicieron masajes abdominales para recolectar muestras de semen en envases plásticos estériles, (Figura 2.6), descartando muestras contaminadas con orina o heces. Finalmente se guardaron las muestras dentro de un contenedor térmico con hielos a -4°C para transportarlos al Laboratorio de Acuicultura del IASA.



Figura 2.6 Recolección de las muestras de semen en vasos estériles

2.2.3 Extracción del semen de “neomachos” o hembras masculinizadas

Se procedió a matarlos mediante el corte en la cuarta arteria branquial y fueron depositados en tinas con agua para su desangrado total, sin ensuciar las vísceras con sangre. Una vez que se desangraron completamente fueron extraídos, se pesaron y se midieron los ejemplares. Se realizó un corte longitudinal desde el orificio urogenital hasta la cabeza.

Se pesaron las vísceras y las gónadas. Los testículos fueron almacenados en cajas estériles, a -4°C y llevados al laboratorio. Para el macerado de los testículos se preparó una solución salina, con 132g de glucosa, 20 g de KCl en 2L de agua destilada. Los testículos fueron sumergidos en la solución anterior durante 1 hora y se utilizó el sobrenadante, (Figura 2.7).



Figura 2.7.- Testículos de neomachos macerados en solución salina de cloruro de potasio y glucosa.

2.2.4 Preparación de medios de conservación y congelamiento

Los medios utilizados fueron correctamente esterilizados en el autoclave (Harvey Sterile Max), (Tabla 2.1). El semen de los machos normales y de los neomachos fue diluido en una relación 1:3 (semen:medio).

Tabla 2.1 Descripción de los medios de crioconservación empleados para el semen normal y de “neomacho”

Medio	Descripción						
	NaCl Mg	NaHCO3 mg	KCl mg	Glucosa mg	Agua Destilada	pH	Metanol
A	622.5	166	31.5	83	100	8.5	10%
A2	-	146	575.2	73	100	8	10%
B	-	-	-	5600	100	7	10%
C	-	-	-	4870	100	7	10%
D	-	-	780	5200	100	8	10%

El semen fue llenado en pajuelas (Minitub) de 0.5mL, absorbiendo la dilución preparada con el extremo sellado de la pajuela. Luego se sellaron las mismas con una pinza caliente.



Figura 2.8 Estabilización de temperaturas del semen diluido previo ingreso al tanque de nitrógeno

Antes de colocar las pajuelas en el tanque del nitrógeno (Accelerated Genetics), se estabilizó la temperatura durante 5 minutos a -4°C , (Figura 2.8). Para finalizar se colocaron las pajuelas dentro del termo de nitrógeno, diez centímetros arriba del nivel de nitrógeno líquido durante diez minutos y posteriormente se introdujeron lentamente las pajuelas dentro del termo.

Todo este proceso fue realizado dentro de la cámara de flujo laminar (ESCO) para evitar la contaminación de las muestras de semen y de los medios de criopreservación.

2.2.5 Visualización y descripción de gametos sexuales

2.2.5.1 Grado de movilidad global

La movilidad fue dividida en tres grupos, móviles, semi-móviles e inmóviles. El porcentaje se estimó contabilizando 10 espermatozoides en 10 campos diferentes con el lente de 40x del microscopio óptico binocular (Olympus) y se los clasificó según el grado de movilidad.

2.2.5.2 Tiempo de Activación

Para la determinación del tiempo de activación se cronometró el tiempo transcurrido desde el momento en que se activaron los espermatozoides, con solución salina de cloruro de sodio al 0.8%, hasta la inmovilidad del 90% de los espermatozoides; observando en el lente de 40X.

2.2.5.3 Concentración Espermática

Se realizó una dilución 1:2000 de la muestra de semen con agua destilada. Luego se colocó una gota de la dilución en la cámara de Neubauer. La cual se mantuvo durante 10 minutos para permitir que los espermatozoides se ubiquen por decantación en un mismo plano focal y se observó al microscopio con un aumento de 40X. Se contabilizaron los espermatozoides que permanecieron en los cinco cuadrantes de la cámara de Neubauer.

2.2.5.4 Viabilidad

El porcentaje de células espermáticas muertas fueron determinadas por medio de la tinción con eosina 1% - nigrosina 10%, y se observó en un microscopio óptico a un aumento de 100X, para evaluar dentro de un campo 10 espermatozoides. Se tomó en consideración que los espermatozoides vivos conservan su forma, mientras que los muertos tomaron la coloración de la eosina debido a que su membrana se vuelve permeable, absorben el colorante y aumentan de tamaño (Guarnizo, 2007).

2.2.5.5 Color, textura

Estos parámetros macroscópicos se valoraron observando el color de las muestras de semen y la textura que no haya sido ni muy líquida ni muy viscosa, de textura homogénea y de color blanco.

2.2.6 Comprobación de reversión de sexo

Para comprobar si los animales se reversaron genéticamente, se realizó un masaje abdominal-caudal antes del faenamiento y los animales que expulsaban semen, fueron considerados como machos normales. Luego cuando se procedió a decapitarlos y extraer las vísceras, se analizó los animales que no tenían gonoducto y éstos fueron considerados como neomachos.

Durante el crecimiento de truchas reversadas se midieron variables bioproductivas como tasa de crecimiento específica e índice de crecimiento corporal.

Para el cálculo de la tasa de crecimiento específica se utilizó la siguiente fórmula:

$$\left[\frac{L_n W_{xf} - L_n W_{xi}}{t(\text{días})} \right] \times 100;$$

Wxf = peso final (g)

Wxi = peso inicial (g)

t=días de crianza

Para el cálculo del índice de crecimiento corporal la fórmula es:

$$\left(\frac{P}{Lt^3}\right) \times 100;$$

P= peso corporal (g)

Lt= longitud total (cm)

2.2.7 Descongelación

Se sacaron las pajuelas del tanque de nitrógeno y previa descongelación de las mismas, se mantuvieron en un tanque térmico durante 5 minutos a -4°C . Luego fueron sumergidas en agua temperada a 37°C durante 60 segundos.

2.2.8 Fertilización

Las fertilizaciones artificiales se realizaron en las instalaciones de “Gammarus Corp” en Cayambe y en Pailones - IASA. Se seleccionaron las hembras con óvulos maduros, luego se procedió a realizar masajes abdominales para obtener los huevos. Se colocaron 12 gramos de óvulos en una solución de sal al 0.8% e instantáneamente se adicionó el contenido de 6 pajuelas, previamente descongeladas, de 0.5 mL de semen con los 5 diferentes medios de congelación, (Figura 2.9). Luego se hicieron dos lavados con agua, se colocaron los huevos en las canastillas y todo esto, dentro de las piscinas de incubación, (Figura 2.10). Finalmente se colocó un plástico negro encima de las piscinas para evitar la luz.



Figura 2.9 Fertilización artificial, mezclado de óvulos con semen

empacado en pajuelas, previamente descongelado



Figura 2.10 Piscinas con celdillas de incubación
conteniendo óvulos fertilizados

2.3 Análisis de Datos

Los datos obtenidos fueron analizados con el programa Infostat 2009.

3. RESULTADOS

3.1 Fase de laboratorio

3.1.1 Parámetros macroscópicos y microscópicos

Los resultados que se muestran a continuación, (en su mayoría son de laboratorio a excepción de la fertilización), son los análisis de varianza de los parámetros macroscópicos y microscópicos, que se obtuvieron al analizar el semen de macho y neomacho en el laboratorio, antes de la crioconservación.

Tabla 3.1 Análisis de varianza de los parámetros macroscópicos y microscópicos del semen de machos normales y neomachos antes de la congelación con nitrógeno líquido.

	Semen machos n=23	Semen neomachos n=5	p valor
Volumen (mL)	18.04 ± 1.85 b	0.50 ± 0.00 a	0.0002
Tiempo activación (s)	30.96 ± 0.53 a	34.00 ± 1.00 b	0.0207
Móvil	82.61 ± 4.59 a	97.00 ± 2.00 a	0.1629
semimóvil	13.13 ± 3.45 a	3.00 ± 2.00 a	0.1913
inmóvil	4.26 ± 1.34 a	0.00 ± 0.00 a	0.1552
vivos	91.39 ± 0.74 a	90.40 ± 2.94 a	0.6327
mueertos	8.61 ± 0.74 a	9.60 ± 2.94 a	0.6327
#esp.mL ⁻¹	18.13e6 ± 2.08 a	6.40e6 ± 0.24 a	0.0545

Prueba no paramétrica. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

Al analizar la Tabla 3.1 se puede apreciar que los parámetros de movilidad, mortalidad y número de espermatozoides por mililitro no presentan significancia, mientras que se observó un efecto significativo en el volumen ($p=0.0002$) y tiempo de activación ($p=0.0207$) entre el semen de machos normales y neomachos.

A continuación se realizó un análisis de varianza de parámetros microscópicos de muestras de semen de machos normales y neomachos luego de descongelarlos a 37°C por 60 segundos y la determinación del porcentaje de fertilización.

Tabla 3.2 Análisis de varianza de los parámetros microscópicos y porcentaje de fertilización del semen de machos normales y neomachos descongelados.

	tiempo activación	semimóvil	inmóvil	vivos	mueertos	#esp/mm3	%fertilización
Modelo	<0.0001	0.0002	0.0002	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.2884
Tipo de semen	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.9725
Medio	0.4013	0.2365	0.2365	0.4971	0.4971	0.2639	0.0430
Tipo x medio	0.0597	0.4035	0.4035	0.2300	0.2300	0.3505	0.9914
CV %	7.12	59.05	4.74	17.44	18.55	31.99	14.04

($p < 0.05$) significativo

En la Tabla 3.2 observamos que existe significancia para el tipo de semen, tiempo de activación ($p < 0.0001$), semimóviles ($p < 0.0001$), inmóviles ($p < 0.0001$), vivos ($p < 0.0001$), muertos ($p < 0.0001$), esp/mL ($p < 0.0001$). Aunque en la fertilización no se observa diferencia estadística ($p=0.9725$).

Para el análisis con respecto al medio de crioconservación, solo se observa significancia para la fertilización ($p=0.0430$).

El análisis de varianza para la interacción entre tipo de semen y el medio de crioconservación únicamente presenta diferencia significativa el parámetro del tiempo de activación ($p=0.0597$).

A continuación se muestran las pruebas de varianza entre semen de macho normal y neomacho, realizadas para parámetros microscópicos y para fertilización, luego de haber sido descongelados a 37°C por 60 segundos

Tabla 3.3.- Pruebas de varianza de los parámetros macroscópicos, microscópicos y porcentaje de fertilización del semen de macho normal y neomacho, luego del descongelamiento

	semen normal	neomacho
tiempo activación	28.75 ± 0.50 b	15.60 ± 0.21 a
móvil	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
semimóvil	11.75 ± 1.33 b	3.10 ± 0.51 a
inmóvil	88.25 ± 1.33 a	96.90 ± 0.51 b
vivos	75.80 ± 2.83 b	27.30 ± 0.63 a
muertos	24.20 ± 2.83 a	72.70 ± 0.63 b
#esp/mm3	46.00E5 ± 2.69 b	6.85E5 ± 0.57 a
%fertilización	64.85 ± 2.61 a	64.75 ± 1.50 a

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

En la Tabla 3.3 observamos que existe diferencia significativa de los parámetros microscópicos entre los dos tipos de semen, de neomachos y machos normales luego de la descongelación. Para el tiempo de activación el promedio mayor fue 28.75 ± 0.50 ; para semimovilidad 11.75 ± 1.33 ; para inmovilidad 96.90 ± 0.51 ; vivos 75.80 ± 2.83 ; muertos 72.70 ± 0.63 ; concentración espermática $46E5 \pm 2.69$. El promedio de la fertilización fue similar.

A continuación se muestran las pruebas de varianza de los parámetros microscópicos y porcentajes de fertilización obtenidas para comparar los cinco medios de crioconservación, luego del descongelamiento.

Tabla 3.4.- Pruebas de varianza de los parámetros microscópicos y porcentaje de fertilización para los medios de crioconservación.

	Medio A	A2	B	C	D
tiempo activación	22.63 ± 2.40 a	22.00 ± 2.20 a	21.25 ± 2.45 a	22.50 ± 2.83 a	22.50 ± 2.83 a
Móvil	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Semimóvil	7.25 ± 2.51 ab	7.63 ± 2.50 ab	5.00 ± 1.55 a	10.25 ± 2.45 b	7.00 ± 2.04 ab
Inmóvil	92.75 ± 2.51 ab	92.38 ± 2.50 ab	95.00 ± 1.55 b	89.75 ± 2.45 a	93.00 ± 2.04 ab
Vivos	55.13 ± 10.71 a	52.50 ± 9.47 a	48.25 ± 9.10 a	48.75 ± 8.31 a	53.13 ± 10.75 a
Muertos	44.88 ± 10.71 a	47.50 ± 9.47 a	51.75 ± 9.10 a	51.25 ± 8.31 a	46.88 ± 10.75 a
#esp/mm3	28.75E5 ± 8.64 a	25.00E5 ± 7.13 a	29.75E5 ± 9.02 a	27.63E5 ± 8.49 a	21.00E5 ± 6.24 a
%fertilización	67.75 ± 2.80 b	67.13 ± 3.62 b	69.25 ± 3.49 b	55.75 ± 1.57 a	64.13 ± 3.01 ab

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

Según Duncan en la Tabla 3.4 para el análisis del tiempo de activación con todos los medios de crioconservación, no presentó diferencias significativas, ($p > 0.05$) siendo similar el promedio, entre 21.25 y 22.63 segundos, presentando el mayor tiempo con el medio A. Para el parámetro de movilidad el resultado fue 0 luego de la descongelación del semen. La semimovilidad presenta diferencia entre los 5 medios, teniendo el medio C el mejor resultado 10.25%. Para la inmovilidad el medio C fue el mejor con promedio 89.75%. Los mejores promedios de porcentajes de espermatozoides vivos fue de 55.13% y de muertos 44.80% obtenidos con el medio A. La concentración espermática con mayor porcentaje fue con el medio B, 29.75 esp.mm⁻³. El promedio mayor de fertilización fue 69.25% con el medio B.

Las siguientes pruebas de varianza son de los parámetros microscópicos y porcentaje de fertilización luego de la descongelación, realizadas para encontrar el mejor medio de crioconservación para semen de machos normales y neomachos.

Tabla 3.5 Pruebas de varianza de los parámetros macroscópicos, microscópicos y porcentaje de fertilización del semen de machos normales y neomachos comparados con los medios de crioconservación luego del descongelamiento.

	Tiempo	semim	Inmovil	Vivos	Muertos	#esp/mm ³	%fert.
A normal	28.75 ± 1.25 b	12.50 ± 3.23 cd	87.50 ± 3.23 ab	83.25 ± 2.06 c	16.75 ± 2.06 a	50.00E5 ± 6.72 c	67.00 ± 5.43 a
A neomacho	16.50 ± 0.50 a	2.00 ± 0.71 a	98.00 ± 0.71 d	27.00 ± 2.04 a	73.00 ± 2.04 c	7.50E5 ± 1.44 a	68.50 ± 2.60 a
A2 normal	27.50 ± 1.44 b	13.25 ± 2.69 cd	86.75 ± 2.69 ab	76.50 ± 5.69 bc	23.50 ± 5.69 ab	42.00E5 ± 6.26 bc	68.25 ± 7.53 a
A2 neomacho	16.50 ± 0.50 a	2.00 ± 0.91 a	98.00 ± 0.91 d	28.50 ± 1.32 a	71.50 ± 1.32 c	8.00E5 ± 2.38 a	66.00 ± 1.91 a
B normal	27.50 ± 1.44 b	7.25 ± 2.63 abc	92.75 ± 2.63 bcd	69.75 ± 8.66 bc	30.25 ± 8.66 ab	53.00E5 ± 4.26 c	68.75 ± 7.47 a
B neomacho	15.00 ± 0.00 a	2.75 ± 0.95 a	97.25 ± 0.95 d	26.75 ± 1.75 a	73.25 ± 1.75 c	6.50E5 ± 0.87 a	69.75 ± 1.03 a
C normal	30.00 ± 0.00 b	15.75 ± 2.17 d	84.25 ± 2.17 a	68.25 ± 8.31 b	31.75 ± 8.31 b	48.50E5 ± 6.74 bc	56.50 ± 2.63 a
C neomacho	15.00 ± 0.00 a	4.75 ± 1.75 ab	95.25 ± 1.75 cd	29.25 ± 0.25 a	70.75 ± 0.25 c	6.75E5 ± 0.63 a	55.00 ± 2.04 a
D normal	30.00 ± 0.00 b	10.00 ± 3.54 bcd	90.00 ± 3.54 abc	81.25 ± 3.50 bc	18.75 ± 3.50 ab	36.50E5 ± 4.66 b	63.75 ± 5.66 a
D neomacho	15.00 ± 0.00 a	4.00 ± 1.00 ab	96.00 ± 1.00 cd	25.00 ± 0.00 a	75.00 ± 0.00 c	5.50E5 ± 0.29 a	64.50 ± 3.20 a

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

En la Tabla 3.5, según Duncan para semen en machos normales, observamos que en la interacción tipo de semen y medios de crioconservación, si existen diferencias entre los promedios. Siendo así, los tratamientos C y D, son los mejores medios para el tiempo de activación, con 30 segundos. La movilidad fue 0 para todos los medios luego de la descongelación. La semimovilidad e inmovilidad fueron mejores con el medio C con 15.75% y 84.25% respectivamente. El medio A presento mejores resultados para espermatozoides vivos y muertos con 83.25% y 16.75% respectivamente. La concentración espermática y porcentaje de fertilización presentaron mejores resultados con el medio B, teniendo 53 espermatozoides/mL y 68.75% respectivamente.

En la Tabla 3.5 observamos que el tiempo de activación con el semen de neomachos presentó mejores resultados con los tratamientos A y A2. Para la semimovilidad e inmovilidad el medio C presentó mejores porcentajes 4,75% y 95,25% respectivamente. El medio C presentó 29,25% y 70,75 % de espermatozoides vivos y muertos respectivamente. El medio A2 tuvo la mayor

concentración espermática con 8 espermatozoides/mL. Finalmente la fertilización alcanzó el 69,75% con el medio B.

3.1.2 Comparación entre dos crioprotectores de semen de trucha

Análisis y comparación de los crioprotectores DMSO al 7% y Metanol al 10% utilizados para la criconservación con el fin de encontrar el más viable para la investigación.

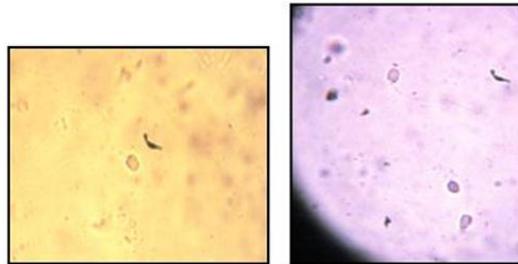


Figura 3.1 Espermatozoides de macho normal criconservados con DMSO al 7% y yema de huevo al 10% observados al microscopio 40x



Figura 3.2 Espermatozoides de macho normal observados al microscopio 40x, usando metanol al 10% como crioprotector.

Se observan espermatozoides criconservados con DMSO al 7% y metanol al 10%, (Figuras 3.1 y 3.2). No se obtuvieron análisis de varianza para comparar entre los dos crioprotectores. Con el DMSO no se realizó fertilización. El porcentaje de movilidad presentado por los espermatozoides de macho normal luego de la descongelación utilizando dimetilsulfóxido fue de 5.25%. El porcentaje de movilidad utilizando metanol como crioprotector fue del 11,75%.

3.1.3 Comparación entre los espermatozoides maduros e inmaduros de semen de neomacho

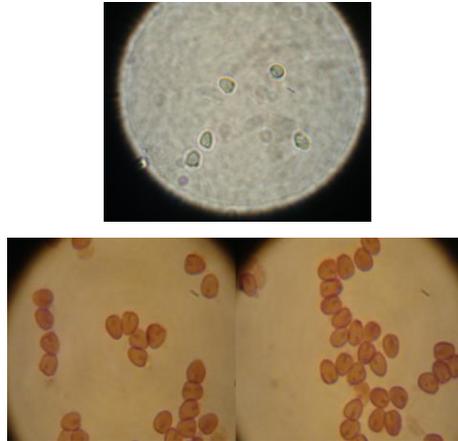


Figura 3.3 Arriba espermatozoides de semen de neomachos con cola 40x, abajo espermatozoides de semen de neomachos sin cola 100x.

Se observan espermatozoides de neomacho con cola y otros sin cola que se encontraban inmaduros aún en desarrollo, ambas muestras antes de la congelación, (Figura 3.3).

3.2 Fase de campo

3.2.1 Reversión sexual

A continuación se muestran resultados de campo tanto de la reversión sexual como de la fertilización. Dentro de la reversión sexual constan los pesos de los animales alimentados con la hormona de reversión y los animales que se consideran como neomachos y aquellos que no se reversaron sexualmente. Con respecto a la fertilización, están los porcentajes obtenidos.

Tabla 3.6 Promedios de los parámetros macroscópicos de los ejemplares neomachos antes del sacrificio y extracción de semen

Piscina 1				
Variable	n	Media	Mín	Máx
Peso animal(g)	124	425.32 ± 10.08	200.00	890.00
Long. Total(cm)	124	32.02 ± 0.24	25.00	39.00
ancho(cm)	124	7.51 ± 0.09	6.00	11.00
Piscina 2				
Variable	n	Media	Mín	Máx
peso animal(g)	101	456.53 ± 16.95	180.00	780.00
Long. Total(cm)	101	32.15 ± 0.45	23.00	57.00
ancho(cm)	101	7.67 ± 0.12	5.00	10.00

En la Tabla 3.6 se muestra los promedios, con sus números máximos y mínimos del peso de los neomachos, longitud total, ancho, peso de vísceras y peso de gónadas, de las dos piscinas luego del crecimiento por 12 y 10 meses respectivamente.

Tabla 3.7 Conteo del número de hembras y machos que se formaron, previa alimentación en etapa de alevines con la hormona 17 α -metil testosterona, luego de 12 y 10 meses de crecimiento y número de ejemplares que desarrollaron gonoducto.

	Piscina 1	Piscina 2
Machos	39	9
Hembras	85	92
Formación gonoducto	115	101
No formaron gonoducto	9	0

En la Tabla 3.7 se muestra el número de animales machos y hembras que crecieron y los machos que desarrollaron y no desarrollaron gonoducto. Se puede observar que en la piscina 1 se reversaron 9 peces y en la piscina 2 no hubo ningún pez reversado.

Tabla 3.8 Tasa de crecimiento específico (TCE) e índice de condición corporal (ICC) medidos a los 222, 241, 253 y 311 días respectivamente.

Piscina 1				
	I	II	III	IV
TCE	1%	1.2%	1.2%	-
ICC	1.82	1.56	1.44	1.31
Piscina 2				
	I	II	III	IV
TCE	0.05%	1.2%	1.2%	-
ICC	1,83	1,56	1,48	1,40

En la Tabla 3.8 observamos el aumento de la tasa de crecimiento específica (TCE), para las dos piscinas de crecimiento. Hay tres valores que se tomaron a los 241, 253 y 311 días de pesaje de los ejemplares.

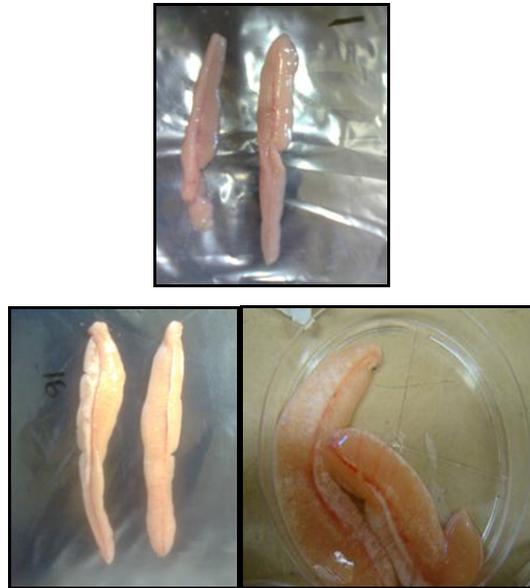


Figura 3.5 Arriba testículos de neomachos sin conductos gonadales sin semen, abajo testículos de neomachos sin conductos gonadales con semen.

Podemos observar testículos de neomachos, alimentados con hormona de reversión, sin conductos gonadales conteniendo semen y sin semen (Figura 3.5).

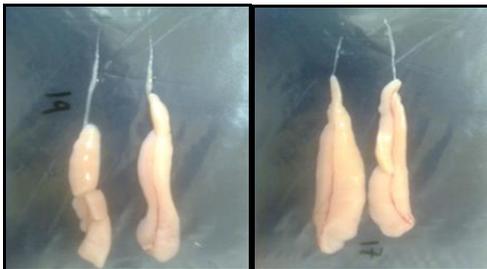


Figura 3.6 Testículos de truchas con gonoducto que fueron alimentadas con hormona.

Se observan testículos con gonoducto de truchas fenotípicamente machos que fueron alimentadas con 17 alfa metil testosterona, (Figura 3.6).

3.2.2 Fertilización artificial

Los resultados de los porcentajes de fertilización con el semen de machos y neomachos sin congelar y congelados, se muestran a continuación:

El porcentaje de fertilización obtenido realizó por primera vez, con semen de macho normal descongelado, fue del 56%. Esto se realizó en Cayambe en las instalaciones "Gammarus Corp". El porcentaje de fertilización con semen sin congelar de macho normal, fue del 61%, realizado en 6 repeticiones.

En las Tablas 3.3, 3.4 y 3.5 se muestran los análisis de varianza de los porcentajes de fertilización obtenidos con el semen de macho normal y neomacho descongelado.

Comprobación de la fertilización artificial con semen de trucha y óvulos maduros. Primera fertilización realizada en el mes de Julio del 2009 con semen de macho normal.

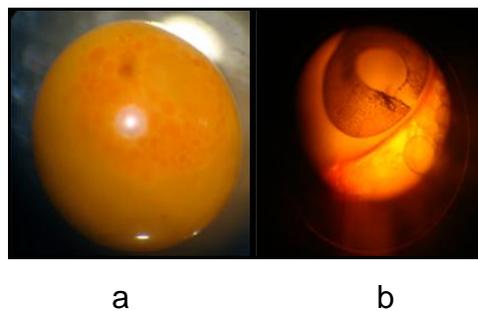


Figura 3.7 a y b Embrión 10 días después de la fertilización, en estado de gástrula. a. visto con estereoscopio; b. visto al microscopio 4x



Figura 3.8 Embrión visto al microscopio
luego de 15 días de fertilización en estado de neurula 15°C

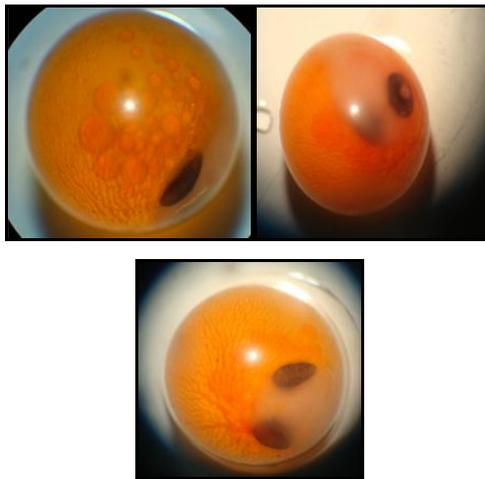


Figura 3.9 Embriones vistos con estereoscopio
luego de 23 días estado de embrión

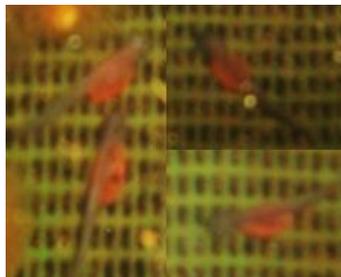


Figura 3.10 Alevines en estado de saco vitelino luego de 33 días

A las seis horas de la fertilización se observa el inicio de la segmentación del vitelo. A las 24 horas se aprecia el inicio de la mórula. Transcurridas las 48 horas se da la formación de la blástula. La gástrula se inicia a partir de los 8 días, (Figura 3.7 a y b). Alrededor de los 15 días se inicia la formación de la neurula,

(Figura 3.8). A partir de los 20 días se aprecia la formación del embrión completo, este periodo se denomina oculación o fase de ojos visibles, (Figura 3.9). La oculación completa ocurre a los 23 días a partir de la fecundación. La eclosión ocurre a los 40 días. Los alevines inmediatamente después de su nacimiento poseen un saco vitelino adherido, el cual contiene una especie de yema de alto valor nutricional, el mismo que se reabsorbe en 18 días, (Figura 3.10).

Comprobación de la segunda fertilización realizada en Noviembre del 2009 utilizando semen de macho normal y semen de neomacho.



Figura 3.11 Embrión fertilizado con semen de macho normal visto al microscopio 4x a los 8 días en período de gástrula.

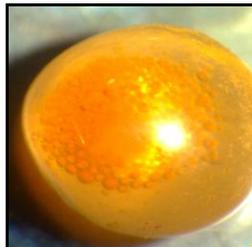


Figura 3.12 Embrión fertilizado con semen de neomacho visto al microscopio 4x a los 15 días en período de neurula.

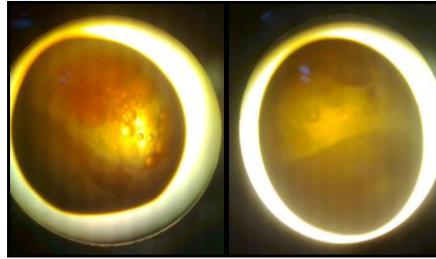


Figura 3.13 Embrión en estadio de neurula con semen de neomacho luego de 22 días

Se observan los diferentes estadios de organogénesis que atravesaron los óvulos desde su fertilización con semen de neomachos hasta los 22 días, (Figuras 3.11, 3.12 y 3.13)

4. DISCUSIÓN

En el trabajo de investigación tenemos tres procedimientos prioritarios, para el cumplimiento de objetivos, así como de alcanzar las metas establecidas, y que son los siguientes: 1. La formación de reproductores, extracción de gametos masculinos y femeninos, la obtención de embriones y la transformación sexual con la hormona 17 α -metil testosterona hasta llevarlos a edad de reproducción. 2. Análisis de gametos, vialidad, así como la comprobación de la efectividad de los medios de conservación y su capacidad de fertilización. 3. Trabajos de postfertilización con semen crioconservado de reproductores normales, como reversados.

A continuación se muestra el análisis de los parámetros macroscópicos y microscópicos de los gametos masculinos antes de la congelación con nitrógeno líquido.

Según Bastardo *et.al.*, (2004), el volumen que presentan a los 3 años los machos normales de trucha es de 10-13 mL. Estos rangos son comparables con la investigación realizada ya que los volúmenes fueron similares para truchas normales con edades entre los 2 – 4 años. Sin embargo los volúmenes de semen de los neomachos, se mantuvieron en los rangos entre los 0,5 – 0,6 mL. Las diferencias estadísticas son significativas ($p > 0,05$) entre los volúmenes de machos normales y neomachos. La edad es un factor determinante en los volúmenes de producción de gametos masculinos, por tanto los neomachos tratados tuvieron una edad de 10 a 12 meses aproximadamente.

Como se observa en la Tabla 3.1, el tiempo que permanecieron en movimiento los espermatozoides del semen de neomachos es mayor al de los machos normales, debido al número de muestra, en el caso de los normales fueron 23, mientras que para los neomachos fueron 5. Cabe mencionar que únicamente se tomaron 5 animales ya que solo éstos presentaron semen, el resto de ejemplares no tenían. Los números mínimos y máximos del tiempo de activación de los espermatozoides de machos normales fueron 30 y 38 segundos respectivamente, mientras que para los neomachos fueron 30 y 35 segundos. El tiempo de activación para reproductores de entre 2 y 4 años va desde 31 hasta 37 segundos (Ortiz, 2008a). Comparando con los resultados de esta investigación observamos que sí se encuentran dentro de los rangos obtenidos.

Según la Tabla 3.1, la movilidad no tuvo diferencias significativas entre las dos muestras de semen. Sus valores fueron positivos, ya que en ambos casos se aprecia valores altos en la movilidad indicando que tienen un buen movimiento cuando son activados.

La concentración de semen de neomachos es mucho menor comparando con la otra muestra, debido a la edad que tenían los ejemplares, como ya se mencionó anteriormente, aún no estaban en totalmente maduros por lo que la concentración espermática todavía es baja. Para neomachos de 2 años, el mayor volumen de semen de obtenido fue 5mL, concentración espermática de 36×10^6 espermatozoides. mm^{-3} y movilidad del 80% Araujo (2007).

Según Ortiz (2008a), la concentración espermática de los machos normales entre los 9 y 12 meses de edad es de 4,5 - 9,5 millones de espermatozoides por mL. Para los neomachos se obtuvo 6,4 millones de espermatozoides por mL, por lo que se puede decir que se encuentra dentro del rango para truchas menores de un año. Con respecto a la concentración del semen de reproductores de 2 - 4 años de edad, tenemos 17 millones de espermatozoides. mm^{-3} , así como lo indican los parámetros establecidos, ya que según Araujo (2007), la concentración espermática puede variar entre 15,3 - 20,69 millones. mm^{-3} .

Los siguientes análisis corresponden a los parámetros microscópicos de gametos masculinos luego de descongelar las pajuelas a 37°C durante 60 segundos.

Con respecto a los parámetros post congelación de la Tabla 3.3, observamos significancia. Debido a que el efecto de la congelación y descongelación provoca que el espermatozoide se torne un poco más lento. Por el sometimiento a bajas temperaturas de -185°C, incluso cuando se descongela, sufre un poco de lesiones en la estructura celular, disminuyendo su calidad. Según Medina *et al.*, 2005, los protocolos de crioconservación producen daños

potenciales sobre las células ocasionados por el choque térmico, el estrés tóxico y osmótico originado por la exposición a crioprotectores y la formación y disolución de cristales en el ambiente intra y extracelular.

En la Tabla 3.3 observamos que los parámetros post-congelación del semen de macho normal presenta mejores resultados, mientras que el semen de neomacho no. Esto es atribuido a que el volumen de semen de neomacho fue de 0.5 mL presentado por cada testículo y solamente se obtuvieron 5 peces con semen de los 9 que se reversaron. Se obtuvieron semimovilidades del 3% y 6.8×10^5 espermatozoides.mL⁻¹. La cantidad de volumen, disminuyó mas cuando los testículos fueron macerados en una solución salina para extraer los espermatozoides que contenían los tejidos gonadales. En cuanto al tiempo de activación, movilidad y mortalidad los resultados son bajos debido a la mezcla, que ocasionó la maceración. Los espermatozoides de buena calidad se mezclaron con los espermatozoides inmaduros sin colas, que estaban en los tejidos gonadales. El volumen y concentración espermática del semen de macho normal se encontró dentro de los rangos señalados por otros autores. Los volúmenes de semen de neomachos fueron insuficientes, ya que estaban en una edad temprana de maduración.

Según la Tabla 3.4 podemos observar que existe significancia en la mayoría de los parámetros, teniendo promedios cercanos dentro de cada medio de crioconservación. A pesar de esto tenemos al medio B, que presenta mejores concentraciones espermáticas y mayor porcentaje de fertilización. Según Araujo (2007), la glucosa desempeña un papel importante en la movilidad espermática del semen, ya que los espermatozoides de trucha arco iris utilizan triglicéridos y glucosa como fuentes primarias de energía; utilizando las concentraciones adecuadas de glucosa se puede suprimir esas necesidades metabólicas de las células espermáticas.

Según las Tablas 3.4 y 3.5, podemos observar que el medio C, fue el mejor para la movilidad ya que con este medio presentan el mayor promedio entre los porcentajes de movilidades. Este resultado indica que luego de la descongelación y activación de espermatozoides, los mismos son capaces de iniciar un movimiento conveniente en comparación con los empaquetados en otros medios. Los medios B y C contenían glucosa 5,6g y 4,8g respectivamente, y pH 7.

Los medio A, A2 y D contenían NaCl, NaHCO₃ y KCl, aparte de la glucosa, pero tuvieron menores resultados con respecto a la movilidad luego de la activación. Por lo que sus componentes con cloro están ejerciendo un efecto negativo en las células espermáticas. Según Araujo (2007), el uso de soluciones salinas como NaCl, han sido usadas con éxito, pero presentan un pequeño riesgo de daños hipo o hiperosmótico para los espermatozoides de salmónidos. Según (Tekin, Secer, Akcay, Bozkurt., 2003), el parámetro de movilidad y fertilidad para semen de macho normal, tuvo mejor resultado cuando se utilizó el medio con glucosa, obteniendo 60% y 94,6% respectivamente.

Durante los primeros experimentos para la criconservación de semen de truchas, se utilizó dimetilsulfóxido al 7% como crioprotector, pero la movilidad presentó bajos porcentajes. Debido a este problema se cambió de crioprotector y se utilizó metanol al 10%, con lo cual se mejoraron los porcentajes de movilidad, 11.75%. En el caso de la Figura 2.14 se observa que las células sexuales fueron sensibles al DMSO. Se utilizó la yema de huevo como diluyente y los espermatozoides no fueron protegidos. El crioconservante y el diluyente no tenían las concentraciones adecuadas. Debido a esto los efectos fueron negativos durante la congelación y descongelación. Durante estos procesos las células sexuales sufren daños celulares y se requiere la protección para evitar el shock

térmico evitando altas mortalidades. Según Medina *et al.*, (2005), el DMSO varía su eficacia en las especies de peces, también el metanol suele ser menos tóxico en unas especies que en otras y su efecto puede ser atribuido a su capacidad de salir y entrar más rápidamente de la célula que otros criopreservantes.

En la Figura 2.18 observamos espermatozoides contenidos en los testículos que no presentaban semen, fueron obtenidos de acuerdo a la técnica descrita en la metodología. Podemos observar que no presentan colas, de manera que aún se encuentran en el proceso de espermiogénesis que es la finalización para que el espermatozoide adquiera las características morfológicas y funcionales típicas.

La Figura 2.19 muestra los espermatozoides de semen de neomacho siendo activados con NaCl al 0.8%. Dichos espermatozoides fueron tomados de los cinco ejemplares que presentaron semen en los testículos, de manera que los sus células espermáticas ya empezaban a madurar ya que presentan colas y movimiento.

Con respecto a la reversión sexual con la hormona 17 alfa metil testosterona tenemos que, durante el sacrificio de los neomachos se fue contabilizando el número de peces que formaron gonoducto. Aquellos que no formaron gonoducto fueron considerados como neomachos, (Figuras 2.20 y 2.21).

Con la hormona incorporada en la alimentación, todos los ejemplares que crecieron debieron ser machos ya que se les suministró testosterona. También debieron presentar testículos sin conducto gonadal, pero únicamente fueron 9 los animales que se consideraron como neomachos de 225 alevines que inicialmente fueron sometidos a reversión sexual con hormonas, Tabla 3.7.

El bajo resultado de la reversión de sexo de las truchas podría ser por la cantidad de hormona que se suministró que fue 60mg.Kg^{-1} alimento durante 3 meses. Según Araujo (2007), las dosis adecuadas para reversión de sexo van de 0,01 hasta 100 mg.Kg^{-1} durante 8 semanas, a partir del inicio de la alimentación a una temperatura de 10°C . Siendo el mayor porcentaje obtenido de 84,4% de machos con dosis de $0,5\text{ mg.Kg}^{-1}$ de dieta. Por otro lado cuando se administran dosis elevadas de 25 mg.Kg^{-1} de alimento, promueve la esterilización de las gónadas (Mellito da Silveira *et al.*, 1995).

Tiempos superiores a 120 días producen porcentajes elevados de esterilidad, lo que también se produce al aumentar la concentración de la hormona (Díaz, 2005). En esta investigación se utilizó 60mg de hormona por cada kilo de alimento balanceado, por lo que esto pudo haber sido el factor limitante para la reversión del sexo.

La inmersión de los embriones próximos a eclosionar, en la hormona, alcanzan la producción de machos, ya que en esta etapa aun poseen el saco vitelino y sirve de reserva para la hormona que luego se absorbe durante la fase de diferenciación sexual (Araujo, 2007).

Además según Díaz y Neira (2005), en Chile obtuvieron truchas monosexo por inmersión e ingestión de $17\ \alpha$ -metiltestosterona, alcanzando un 81% de machos. En esta investigación se alimentó con hormona de reversión durante la primera alimentación de los alevines. La inmersión en la hormona no se realizó por lo que se hace necesario dar este tratamiento para obtener un buen porcentaje de reversión.

De acuerdo a la Tabla 3.8 los ritmos de crecimiento específico van aumentando en cada piscina, presentando crecimientos más rápidos en la piscina 2, aunque los alevines que estaban contenidos aquí son dos meses menores a los de la piscina 1. Este resultado puede estar atribuido a factores como la luz, temperatura, cantidad de alimento y el manejo que se les dio a los peces. Los rangos de TCE e ICC para las truchas son del 1.5% (Ortiz, 2007a). En esta investigación los resultados obtenidos están dentro de los rangos de porcentajes establecidos para las truchas, indicando óptimas tasas de crecimiento e índice de condición corporal.

Se obtuvo 61% de fertilización con semen sin congelar de macho normal realizado con 6 repeticiones en las instalaciones de Cayambe y Pailones. Dicho porcentaje es del grupo control usando semen sin congelar y es menor que el porcentaje presentado en el segundo proceso de fertilización con semen congelado 69.25%.

La primera fertilización que se realizó con semen crioconservado en los 5 medios de prueba, se obtuvo un solo porcentaje de fertilización del 56%. Solo se obtuvo un porcentaje, mas no 5 porcentajes como se esperaban que sean de cada medio de crioconservación. Debido a que los óvulos se contaminaron rápidamente con hongos, quedando algunas canastillas de incubación con óvulos sanos y otras con óvulos totalmente muertos, por lo que se tuvo que tratar de reunir los óvulos sanos para comprobar que la fertilización se podía alcanzar.

Araujo (2007) obtuvo 42% de fertilización con semen de neomachos, las tasas de fertilización que obtuvimos aquí fueron del 69.75%, siendo éstas mayores. Según (Tekin et al., 2003), el porcentaje de fertilidad para semen des

congelado de macho normal obteniendo fue 94,6%. Aquí se obtuvo el 68.75% de fertilidad con semen de trucha de macho normal. El porcentaje de fertilización pudo haber sido mayor, pero el agua que ingresaba a las piscinas de Cayambe contenían cantidades de materiales en suspensión. Las piscinas se ensuciaban con facilidad provocando el apareamiento de micosis causada por Saprolegnia en los óvulos que se encontraban incubados.

5. CONCLUSIONES

El porcentaje de mortalidad, movilidad y tiempo de activación fueron los parámetros que tuvieron buenos resultados en común, concluyendo así que los parámetros microscópicos antes de la congelación fueron de buena calidad y los espermatozoides se encontraban biológicamente en buen estado.

Con respecto a la fertilización, en Cayambe los embriones tenían los ojos formados y estaban en estadio de embrión a los 23 días, mientras que los óvulos fecundados en Pailones a los 22 días presentaban la estructura de estadio de neurula a 11°C. La eclosión de los óvulos de Cayambe sucedió a los 33 días a una temperatura de 15°C. Podemos concluir que a mayor temperatura de incubación, el tiempo que dura la organogénesis se acorta.

Además también podemos concluir que la profundidad de las canastillas de incubación incide en el crecimiento ya que si son más profundas, los óvulos están más propensos a contaminarse de saprolegnia.

En base a que el porcentaje de fertilización es similar en las Tablas 3.4 y 3.5, podemos concluir que el factor que incide notablemente es el activador espermático. En el momento de la fertilización artificial se mezcla el semen con los óvulos conteniendo fluido ovárico, Favoreciendo a la activación espermática y produciendo así una correcta fertilización.

Podemos concluir que el mejor medio de crioconservación fue el medio B, ya que presentó los mayores porcentajes de fertilidad, tanto en el análisis para el medio de crioconservación y para a interacción entre el tipo de semen y el medio. Siendo el parámetro de la fertilidad el más importante para llevar a cabo esta investigación.

El medio C solo contenía 4,8 g de glucosa y metanol al 10%, por lo que se puede concluir que dicho medio cumple con las cantidades requeridas de glucosa para que las células espermáticas puedan consumir energía del mismo medio. Manteniendo a las células en buen estado para el momento de la activación para la fertilización.

Se puede concluir que los medios con cloro activan a los espermatozoides cuando son empacados en las pajuelas, de modo que malgastan energía antes de ser congelados, debido a esto su movilidad es baja luego de la descongelación.

Con respecto a los crioprotectores, podemos concluir que el mejor fue el metanol al 10% ya que presentó mejores movilidades luego de la descongelación y también se observó que no sufrió daños celulares, manteniendo su estructura completa incluyendo las colas.

De acuerdo a los requerimientos e inconvenientes que se fueron presentando, como el cambio del crioprotector DMSO 7% a Metanol 10%, se estandarizaron las técnicas de crioconservación con semen de machos normales para esta investigación, así como las concentraciones de glucosa para los diluyentes.

Los peces neomachos aún se encontraban inmaduros, solo cinco se encontraron con semen en los testículos, por lo que se requería de más tiempo de crianza para obtener ejemplares que ya comiencen a producir semen. De manera que entre los 10 y 12 meses los peces ya estarían listos para realizarles la extracción de semen.

Las cantidades de hormona 17α metil testosterona que se dieron en la comida a los alevines para la reversión sexual, fueron altas. Además el proceso de inmersión de los alevines en la misma hormona, no se efectuó.

Concluyendo así en primer lugar que la concentración de hormona incluida en la alimentación es primordial, para no producir esterilidad en los peces. En segundo lugar que la fusión de ambos tratamientos tanto ingesta, como inmersión, son importantes para obtener altas tasas de reversión sexual en trucha arco iris.

6. RECOMENDACIONES

Es recomendable realizar un “pool” de semen, es decir una mezcla de las mejores muestras de semen que hayan presentado buena calidad tanto en el tiempo de activación, en la movilidad y en la supervivencia, ya que con esto se aseguraría una óptima tasa de fertilización.

Se recomienda también utilizar reproductores que se encuentren entre 1-3 años de modo que sus espermatozoides aún sean viables, tengan una buena concentración espermática y sean de buena calidad.

Es recomendable mantener la entrada de agua de las piscinas de incubación con una malla para eliminar la mayoría de impurezas que llegan con el caudal. Es importante mantener las piscinas en óptimas condiciones, de manera que no se contaminen con micosis los óvulos fecundados en proceso de crecimiento. Cuando se observen óvulos con micosis deben ser retirados inmediatamente para evitar la expansión del hongo hacia los óvulos sanos.

Es primordial mantener la asepsia durante el proceso del empaquetamiento de pajuelas y también durante la fertilización y procurar no contaminar a los óvulos.

Además durante la recolección de óvulos para la fertilización artificial, es recomendable observar que los mismos estén con coloración tomate y tengan una forma circular precisa, esto nos indica que están maduros listos para ser fertilizados, ya que algunos óvulos presentan coloraciones mas claras, son mas pequeños y son completamente circulares, afectando con la viabilidad del semen.

Se recomienda trabajar con poca luz durante el proceso de fertilización ya que los óvulos son sensibles a la misma y se pueden causar pérdidas.

Es recomendable realizar el proceso de fertilización artificial de manera rápida y eficiente, ya que el tiempo de activación de los espermatozoides luego del descongelamiento es muy corto y la movilidad es baja, de manera que se debe aprovechar el tiempo para obtener un recomendable porcentaje de fertilización.

Como se mencionó anteriormente el tratamiento de inmersión en la hormona también es importante, por lo que se recomienda realizarlo en conjunto con la hormona incluida en la alimentación, para obtener crecimientos de truchas fenotípicamente machos, que presenten gónadas sexuales masculinas.

Es importante continuar con los procesos de reversión sexual con el fin de optimizar los protocolos para que posteriormente se obtengan altas cantidades de peces reversados.

Sería conveniente utilizar los procesos de ginogénesis, los cuales permiten la eliminación del genoma paterno mediante agentes físicos como radiaciones ionizantes o luz ultravioleta.

7. BIBLIOGRAFÍA:

Araujo, R. (2007). Criopreservación de semen de machos XX de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*)

Asturiano, J. 2003. El control de la reproducción de peces. Grupo de Investigación en Recursos Acuícolas, Departamento de Ciencia Animal. Universidad Politécnica de Valencia: FEDER. Valencia, España. 1-2p.

Ávila, P., Madero, J., López, C., Leon, M., Acosta, L., Gómez, C., Delgado, L., Gómez, C., Lozano, J., Reguero, M. 2006. Fundamentos de crioconservación. Revista Colombiana de obstetricia y ginecología. Vol. 57. No. 4. Bogotá (Colombia). 291-300p.

Bastardo, H. 1992. Semen de la trucha arco iris, (*Oncorhynchus mykiss*): concentración y volumen durante un periodo reproductivo, en Mérida, Venezuela. Veterinaria Tropical 17: 53-66.

Bastardo, H., Guedez, C., León, M. 2004. Características del semen de trucha arco iris de diferentes edades, bajo condiciones de cultivo en Mérida, Venezuela. *Zootecnia Tropical* 22(3):277-288.

Bastardo, H. Sofía, B. 2003. Venezuela. Masculinización de la trucha arco iris, *Oncorhynchus mykiss*, para obtener descendencia todas hembras en un criadero venezolano. PP: 27-41.

Bastidas, F. Cartagena, J. 2002. Evaluación del crecimiento de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) en su etapa juvenil mediante alimentos alternativos a 2880 msnm.

Baynes, S., Scott, A. 1987. Cryopreservation of rainbow trout spermatozoa: The influence of sperm quality, egg quality and extender composition on postthaw fertility. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 66, n. 1, p. 53-67.

Beardmore, J., Mair, G., Lewis, R. 2001. Monosex male production in finfish as exemplified by tilapia: applications, problems and prospects. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 197, n. 1/4, p. 283-301.

Bedore, A. 1999. Características criopreservação do sêmen de pacu-caranha (*Piaractus mesopotamicus*) e de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*). 53 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

Betancur, J., Montoya, A., Mira, T., Rojas, F., Olivera, M. 2008. Estandarización del manejo y la criopreservación de semen de hembras masculinizadas de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*. *Revista Colombiana de ciencias pecuarias*

Billard, R. 1983. Ultrastructure of trout spermatozoa: changes after dilution and deep-freezing. *Cell Tissue Research*, New York, v. 228, n. 2, p. 205-218.

Billard, R. 1988. Artificial insemination and gamete management in fish. *Marine behavior and physiology*. No14. 3-21p.

Billard, R. 1990. Artificial insemination in fish. In: LAMING, G. E. (Org.). *Marshall's physiology of reproduction*. 4. ed. New York: Churchill Livingstone. Chap. 9, p. 870-887.

Billard, R., Cosson, M. 1992. Some problems related to the assesment of sperm motility in fresh water fish. *The Journal of Experimental Zoology*. 261: 222-131p.

Blanco, C. 1995. España. La Trucha Cría Industrial. Mundi Prensa, pp.: 40, 48, 54, 139

Bolla, S., Holmefjord, I., Refstie, T. 1987. Cryogenic preservation of Atlantic halibut sperm. *Aquaculture*. 65:371-374p.

Bromage, N., Porter, M., Randall, C. 2001. The environmental regulation of maturation in farmed finfish with special reference to the role of photoperiod and melatonin. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 197, n. 1/4, p. 63-98.

Brown, L., Roberts, R. 1982. Production of neutered salmonids. *Comparative Biochemistry Physiology*, Oxford, v. 73b, n. 1, p. 177-180.

Bye, V., Lincoln, R. 1986. Commercial methods for the control of sexual maturation in rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). *Aquaculture*, Amsterdam, v. 57, n. 1/4, p. 299-309.

Cabrita, E., Robles, V., Alvarez, R., Herráez, M. 2001. Cryopreservation of rainbow trout sperm in large volume straws: application to large scale fertilization. *Aquaculture*. 201:301-304p.

Castro, R. Quintong, F. 2003. Ecuador. Escuela Superior Politécnica del Litoral. Proyecto para la producción y exportación de trucha ahumada.

Chao, N. 1992. Fish sperm cryopreservation. In: Technology advancement and extension efforts. Taiwan: Department of Aquaculture, Taiwan Fishery Research Institute, 1991. p. 31. (Paper on International Symposium on Reproductive Biology in Aquaculture).

Cosson, J., Billard, R., Cibert, C., Dréanno, C., Suquet, M. 1999. Ionic factors regulating the motility of fish sperm. In: GAGNON, C. (Ed.) The male gamete: from basic science to clinical applications. Vienna: Cache River Press. Chap. 16, p. 162-186.

Cosson, J., Linhart, O., Mims, S., Shelton, W., Rodina, M. 2000. Analysis of motility parameters from paddlefish and shovelnose sturgeon spermatozoa. J. Fish Biol. Vol. 56. 1348-1367p.

Cruz, V. 2001. Criopreservação do sêmen de curimatá (*Prochilodus lineatus*). 59 p. Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte.

Cruz, P., Velasco, Y. 2005. Determinación de las características seminales y seminación artificial en peces. Reproducción de peces en el trópico. INCODER. Bogotá (Colombia). 175-195p.

Cruz, P., Pardo, S., Lombo, P., Lombo, D., Pardo, J. 2004. Cryopreservation of Yamú *Brycon Siebenthalae* Milt. World Aquaculture Society, 35(4):529-535p.

Dávila, A., Garcés, J. 2007. Optimización de tres protocolos de extracción de ADN en las especies *Oncorhynchus mykiss* y *Astroblepus ubidiai* y su cuantificación con técnicas moleculares para la acuicultura.

Díaz, N., Neira, R. 2005. Chile. Biotecnología Aplicada a la Acuicultura I. Biotecnologías clásicas aplicadas a la reproducción de especies cultivadas. Departamento de Producción Animal Facultad de Ciencias Agronómicas Universidad de Chile.

Drummond, S. 1988. Cría de la trucha. Editorial Acribia S.A. España. Reproductores, producción de huevos de alevines de trucha. Pag. 33, 91.

Estay, F., Díaz, N., Valadares, L., Dazarola, G. 1995. Manejo reproductivo de salmonidos. Chile, 1995. 61 p. (Serie Publicaciones para la Acuicultura, 2)

Fresneda, A. Lenis, G. Agudelo, E. Olivera, M. 2004. Colombia. Espermación inducida y crioconservación de semen de Cachama Blanca (*Piaractus brachypomus*)

Gall, G., Crandell, P. 1992. The rainbow trout. Aquaculture, Amsterdam, v. 100, n. 1/3, p. 1-10.

Guarnizo, M. 2007. Caracterización seminal y ensayos preliminares de crioconservación de semen de bagre rayado (*pseudoplatystoma fasciatum* - linnaeus 1766).

Hafez E. 1986. Reproducción e inseminación artificial en animales. México D.F. McGraw-Hill. 483-493p.

Hafez, E. 2004. Reprodução animal. 7. ed. São Paulo: Manole. 513 p.

Lahnsteiner, F., Weismann, T., Patzner, R. 1997. Methanol as cryoprotectant and the suitability of 1,2 and 5 mL straws for cryopreservation of semen from salmonid fishes. *Aquaculture Research*, Oxford, v. 28, n. 6, p. 471-479.

Lahnsteiner, F., Berger, B., Weismann, T., Patzner, R. 1996. The influence of various cryoprotectants on semen quality of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) before and after cryopreservation. *Journal Applied Ichthyology*, Berlin, v. 12, n. 2, p. 99-106.

Lahnsteiner, F., Weismann, T., Patzner, R. 1995. A uniform method for cryopreservation of semen of salmonid fishes (*Oncorhynchus mykiss*, *Salmo trutta f. fario*, *Salmo trutta f. lacustris*, *Coregonus sp*). *Aquaculture Research*, Oxford, v. 26, n. 6, p. 801-807.

Lee, C., Donaldson, E. 2001. General discussion on reproductive biotechnology in finfish aquaculture. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 197, n. 1/4, p. 303-320.

Legendre, M., Billard, R. 1980. Cryopreservation of rainbow trout sperm by deep-freezing. *Reproduction Nutrition Development*, Paris, v. 20, n. 6, p. 1859-1868.

Medina, V. Velasco, Y. Cruz, P. 2005. Colombia. Aspectos generales de la crioconservación espermática en peces teleósteos.

Medina, V., Velasco, Y., Cruz, P. 2007 Efecto del volumen de empaque sobre la tasa de congelación-descongelación y la fertilidad de semen crioconservado de yamú (*Brycon amazonicus*). *Arch. Med. Vet.* 39, Nº 3.

Mellito Da Silveira, M., Tabata, Y., Rigolino, M. 1995 Análises macro e microscópica de gônadas de *Oncorhynchus mykiss* esterilizadas ou masculinizadas pela 17alfa-metiltestosterona. *Boletim do Instituto de Pesca, São Paulo*, v. 22, n. 1, p. 93-102.

Morales, G. 2004. Crecimiento y eficiencia alimentaria de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) en jaulas bajo diferentes regímenes de alimentación.

Nagahama, Y. 1983. The functional morphology of teleost gonads. In: Hoar, W. S.; Randall, D. J.; Donaldson, E. M. (Ed.). *Fish physiology*. New York: Academic Press. v. 9, p. 233-275.

Neira, J., Cruz, P., Jiménez, J., Muñoz, D. 1992. Caracterización Y congelación de semen de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) P 141-14.

Programa Nacional de Ciencia y Tecnología del mar- Investigación y Desarrollo Tecnológico en Acuicultura. 141-146p.

Ortiz, J. (2008a). Producción dulce acuícola en el Ecuador. Publicación científico-técnica; 1, 26, 27, 30, 31, 47.

Ortiz, J. (2008b). I Congreso de acuicultura en aguas continentales ESPE; 1, 6-9.

Phronen J. 1994. Composition and cryopreservation of sperm from some Fin fish teleost fish. *Finnish Fish Research*.15: 27-48p.

Piferrer, F., Donaldson, E. 1993. Sex Control In Pacific Salmon. In: Muir, J. F.; Roberts, R. J. (Ed.). Recent advances in aquaculture. Oxford: Blackwell Scientific Publications. v. 4, p. 67-77.

Rana, K. 1995. Cryopreservation of aquatic gametes and embryos: recent advances and applications. Proceedings of the fifth International Symposium on the Reproductive Physiology of fish. University of texas at Austin. 147p.

Ramos, S. 1986. Anotaciones sobre inseminación artificial. Facultad de Medicina Veterinaria. Universidad de la Salle. Bogotá

Scott, A., Baynes, S. A review of the biology, handling and storage of salmonid spermatozoa. *Journal of Fish Biology*, London, v. 17, n. 6, p. 707-739.

Springate, J., Bromage, N., Elliot, J., Hudson, D. 1984. The timing of ovulation and stripping and their effects on the rates of fertilization, and survival to eying, hatching and swim-up in the rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). *Aquaculture*, Amsterdam, v. 43, n. 1/3, p. 313-322.

Suquet, M. Dreanno, C. Fauvel, C. Cosson, J. Billard, R. 2000. Cryopreservation of sperm in marine fish

Tabata, k., Mizuta, A. 1997. Cryopreservation of sex reversed gynogenetic female sperm hirame. *Fisheries Science*, Tokyo, v. 63, n. 3, p. 482-483.

Tabata, Y., Ports, L. 2004. Truticultura em clima tropical. In: Cyrino, J. E. P. et al. (Ed.) *Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva*. São Paulo: TecArt/ Sociedade Brasileira de Aqüicultura e Biologia Aquática. Cap. 11, p. 308-341.

Tekin, N., Secer, S., Akcay, E., Bozkurt, Y. 2003. Cryopreservation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) semen. 208-212.

Valladares. 2002. Estudio comparativo de adaptación y desarrollo con ovas embrionadas de trucha arco iris de cuatro productores nacionales en la hacienda el Prado a 2940 msnm.

Yamazaki, F. 1983. Sex control and manipulation in fish. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 33, n. 1/4, p. 329-354.