

I. INTRODUCCIÓN

El cultivo de trucha arco iris es un medio de sustento de muchas comunidades, en diferentes provincias del Ecuador, debido al contenido proteico y alto valor nutricional que ofrece. El objetivo de los piscicultores radica en la obtención de peces con mayor tamaño y peso corporal, además fáciles de manejar en las piscinas de cultivo. Pero la gran mayoría se ha visto en la necesidad de sacrificar a sus animales antes de la época de maduración por los problemas que esta etapa conlleva (Pineda *et al.*, 2003).

La maduración sexual de los Salmónidos como la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) es un proceso que provoca efectos poco deseados en su desarrollo con cambios fisiológicos y morfológicos marcados. La ovogénesis y espermatogénesis están acompañados por una fuerte alteración hormonal. En los machos el incremento de los niveles de testosterona genera una mayor agresividad y territorialidad provocando un difícil manejo en las instalaciones piscícolas. Además, debido a la segregación endócrina, la calidad de la carne pierde sus características organolépticas de sabor y consistencia. En las hembras el problema es aún mayor debido a que existe una disminución del crecimiento y pierden el 30% de su peso corporal en producción de gametos. Esto significa que las truchas no ocupan su energía metabólica en la producción de carne sino en la formación de gónadas (Pérez *et al.*, 1999).

La Biotecnología es sin duda una de las más prometedoras actividades para el mejoramiento de la producción acuícola en el mundo sobre todo en el campo de la reproducción y mejoramiento genético. La manipulación cromosómica es una técnica biotecnológica que permite obtener peces triploides, es decir individuos que tienen más de un juego de cromosomas. Esto provoca una atrofiación gonadal en las hembras con la consecuente esterilidad, y en el caso de los machos una atenuación de las características sexuales y una pobre fertilidad, disminuyendo los problemas antes citados en su desarrollo (Pineda *et al.*, 2003).

Las ventajas de producir peces triploides son obtener peces estériles, que no ocupen sus reservas en la reproducción sino en su crecimiento; facilitar el manejo en las instalaciones de cría intensiva para reducir los niveles de agresividad y eliminar problemas de consanguinidad, puesto que al ser estériles se elimina el cruzamiento entre líneas familiares directas (endogamia) (Blanco, 1995).

El beneficio primordial de la triploidización en trucha, es que se obtendría un considerable aumento de la producción, a bajo costo. Esto ayudaría al mejoramiento de los ingresos de los piscicultores que se dedican al cultivo de trucha arco iris. El Ecuador está experimentando una amplia acogida en la producción de trucha con la implementación de 250 criaderos aproximadamente generando una importante fuente de empleo para cientos de personas, especialmente de bajos recursos económicos. No se ha reportado ningún estudio en el país sobre la triploidización en salmónidos, por lo que es importante estandarizar éste método, y así utilizar una nueva técnica biotecnológica para mejorar la producción piscícola y pueda ser aplicada especialmente por los pequeños piscicultores del alto andino (Imaki, 2003; Pineda *et al.*, 2003; Idrovo, 2008. Com. personal).

Cabe recalcar que esta investigación fue realizada en una primera fase experimental, en el Centro de Investigaciones Acuícolas, ubicado en la provincia del Napo, Parroquia Papallacta, a una altitud de 3300 m. con una temperatura media de 8 - 12°C.

El centro contó con todas las instalaciones necesarias para el inicio del experimento

La segunda fase, se llevó a cabo en el IASA I, ubicado en la Hda. El Prado, Cantón Rumiñahui, parroquia San Fernando, a una altitud de 2748 m. con temperatura de 13-14°C. (Pozo *et al.*, 2003).

1.1 Objetivos de la investigación

1.1.1 Objetivo general

Inducir triploidía mediante la estandarización del choque térmico en trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) en el Centro de Investigaciones Acuícolas CENIAC, Provincia de Napo, Cantón Quijos, Parroquia Papallacta.

1.1.2 Objetivos específicos

1. Recolectar los gametos de reproductoras del CENIAC (ovas y esperma) para la fertilización artificial de la trucha arco iris.
2. Reconocer las distintas fases de embriogénesis.
3. Evaluar el porcentaje de triploides obtenido con los diferentes tratamientos térmicos, así como también la supervivencia.
4. Determinar la triploidía mediante medición del volumen nuclear eritrocitario y comprobar el aumento del ADN nuclear en individuos triploides.
5. Evaluar los parámetros morfométricos como peso y longitud corporal, y comprobar la condición triploide en truchas.
6. Analizar las variables temperatura de choque, tiempo de duración e inicio del tratamiento para definir una metodología estándar en la utilización de esta técnica.

1.2 Marco teórico

1.2.1 Trucha arco iris

1.2.1.1 Antecedentes

La trucha arco iris es una especie utilizada en actividades de acuicultura en todo el mundo, por su facilidad de adaptarse a zonas de agua fría. El Ecuador por sus condiciones climáticas y de altura optó, décadas atrás (1930), por la construcción de salas de incubación y alevinaje en las provincias de Imbabura, Cotopaxi y Azuay. La introducción de ovas embrionadas de trucha sirvió para poblar los ríos y lagunas de la Región Interandina (Imaki,2003).

En 1993, el Gobierno del Japón otorgó al Ecuador un préstamo no reembolsable que permitió la construcción del Centro de Investigaciones Acuícolas (CENIAC), ubicado en Papallacta, Provincia de Napo, que se inauguró en 1996. Las actividades del centro se enfocaron principalmente en la producción de huevos y alevines de trucha, investigación y capacitación, todas tendientes al fomento y desarrollo de la piscicultura. En 1998, el CENIAC-P se constituyó en un soporte significativo de la difusión de truchicultura en el país. Por razones logísticas pasó a depender del Ministerio de Comercio Exterior Industrialización Pesca y Competitividad (MICIP) ¹ (Imaki, 2003).

En el 2006, el CENIAC-P, realizó el Primer Censo Piscícola de Producción de Trucha en las Zonas Norte, Centro y Sur de la Región Interandina, mediante visitas, entrevistas y aplicación de cuestionarios a los propietarios y empleados de los criaderos por parte de los técnicos del centro. El principal objetivo del censo fue obtener una base de datos que sirva para hacer proyección de mercado e identificar necesidades del sector piscícola. Además conocer problemas relevantes en relación a genética, asistencia técnica, capacitación, producción, financiamiento y mercado (Idrovo, 2008).

¹ Desde el 2008 el CENIAC es una dirección perteneciente al Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuicultura y Pesca.

Cuadro 1.1 Estadística productiva de la piscicultura de altura en Ecuador de acuerdo al censo Trucha 2006-2007

Provincia	Criaderos	Vol. Producción. M3	Producción ton/año	%	Técnicos	Operarios
Azuay	47	11.999	190	19	7	82
Bolívar	25	1.811	38	4	1	51
Cañar	13	3.275	45	5	6	32
Carchi	10	5.830	35,7	4	2	16
Chimborazo	18	5.934	64,4	7	2	35
Cotopaxi	7	1.152	22,8	2	1	9
Imbabura	11	1.805	30,7	3	4	12
Loja	11	1.550	17	2	3	13
Napo	19	5.482	94,2	10	4	39
Pichincha	26	13.374	332,7	33	15	66
Sucumbíos	6	1.918	18,9	2	1	12
Tungurahua	20	4.746	92,9	9	1	39
Total	213	58.876	982,3	100	47	406

Fuente: Censo 2006 (Idrovo, 2008).

1.2.1.2 Filogenia y taxonomía

Nelson (1994), realizó un mapa filogénico y taxonómico completo de los peces donde detalló el número de especies en cada uno de los 57 órdenes, con el objeto de encontrar algún fenómeno significativo en la evolución de los peces. Antiguamente el nombre científico asignado a la trucha arco iris fue *Salmo gairdneri* pero a partir de 1988 se cambió por el género *Oncorhynchus* que abarcó a todas las especies de salmón y truchas (Smith *et al.*, 1992).

Cuadro 1.2 Clasificación taxonómica de la trucha arco iris

Oncorhynchus mykiss

Reino	Animal
Sub Reino	Metazoa
Phylum	Chordata
Sub Phylum	Vertebrata
Super Clase	Gnatostomata

Grado	Teleostomi
Clase	Actinopterygii
Sub Clase	Neopterygii
División	Teleostei
Subdivisión	Euteleostei
Superorden	Protacanthopterygii
Orden	Salmiformes
Sub Orden	Salmoneidei
Familia	Salmonidae
Género	Oncorhynchus
Nombre Científico	<i>Oncorhynchus mykiss</i>
Nombre Común	Trucha arco iris

Fuente: Fishes of the world (Nelson, 1994)

1.2.1.3 Origen

La trucha arco iris es originaria de las Costas del Pacífico de América del Norte, cubriendo una región que va desde Alaska hasta México. Desde 1874 ha sido introducida en casi todos los sistemas acuáticos del mundo excepto la Antártica. En 1950 la industria pesquera apostó por la producción de trucha desarrollándose una verdadera cultura de cultivo y domesticación en especial en muchos países tropicales y subtropicales de Asia, África Oriental y Sudamérica (FAO, 2002).

La trucha arco iris fue introducida a Sudamérica desde los Estados Unidos. A fines del siglo pasado fue introducida por primera vez en los países sureños sin éxito; posteriormente, en varias oportunidades a partir de 1904, fue llevada a Chile en forma de huevos embrionados, desde donde fue sembrada en muchos ambientes del resto del continente. En la actualidad ha sido introducida en casi todos los ambientes propicios del mundo (AquaTIC, 1999).

El nombre común de la trucha arco iris se debe a su coloración que va de un verdoso oscuro a castaño, tanto las aletas dorsal, caudal y anal como los flancos presenta unas manchas negras. Lo más representativo es la presencia de una franja longitudinal roja en cada lado desde la región cefálica hasta la caudal, siendo más visible en los peces maduros y especialmente en los machos durante la época de reproducción.

El nombre de la trucha “arco iris” tiene su origen en el color de una franja rojiza sobre la línea lateral del cuerpo, esta franja de coloración es notable, especialmente en los machos en la época de desove y la presencia de un sin número de escamas iridiscentes (Imaki, 2003).

1.2.1.4 Morfología

La trucha arco iris es un pez de tamaño grande y vientre redondeado, con el cuerpo cubierto por numerosas escamas pequeñas. Es alargado y fusiforme, de complejión aerodinámica para poder habitar en ríos y lagunas. Posee una aleta dorsal, adiposa, caudal, anal, ventral y pectoral. Puede llegar a medir hasta 65 cm. y llegar a pesar 12 Kg. (FAO, 2002).



Figura 1. 1 Morfología externa de la trucha arco iris (juvenil).

Los principales órganos internos son corazón, hígado, riñón, estómago, bazo, ciego pilórico, vejiga natatoria, uréter; distribuidos en la región ventral y abdominal. Sus músculos son fuertes para manejar su movimiento natatorio.

Posee de 60-66 vértebras, 3-4 espinas dorsales, 10-12 rayos dorsales suaves, 3-4 espinas anales, 8-12 rayos anales suaves, 19 rayos caudales (<http://riosclaros.blogspot.com/2007/10/trucha-arco-iris.html>).



Fuente: Ing. José Vaca

Figura 1.2 Morfología interna de la trucha arco iris (juvenil).

1.2.1.5 Hábitat y biología

La trucha de arco iris es un pez de crecimiento rápido, tolerante a diferentes ambientes donde predominen los ríos y lagos de aguas frías, son fáciles de manejar. Son bastante exigentes en cuanto a la calidad de agua que debe ser limpia y con suficiente cantidad de oxígeno disuelto. Poseen una vida anadroma². Son peces poiquiloterms, mantienen su temperatura corporal acorde con la temperatura del agua (Fisheries and Aquaculture Department FAO, 2002).

Existe una contradicción en cuanto a la tolerancia a las variaciones de temperaturas pues hay autores que lo describen como un pez sensible a los cambios térmicos bruscos mientras que otros como Blanco, C. (1995), cita:

“La trucha arco iris muestra una mayor docilidad a la cautividad, tolerancia y adaptación social a la alta densidad poblacional, con

² Peces que viven en el océano pero se reproducen en ríos correntosos dulceacuícolas.

comportamientos menos agresivos que la trucha común. Tiene un amplio margen de adaptación a temperaturas de las aguas y a las diversas condiciones ambientales de los recintos artificiales donde se encuentra confinada, acudiendo con gran avidez a la distribución del alimento”.

Los factores físicos (temperatura, calidad de agua), factores genéticos y técnicas de manejo influyen en el crecimiento de las truchas (Bastardo, 1999).

1.2.1.6 Alimentación

En el ambiente natural la trucha se alimenta de insectos, moluscos, crustáceos, huevos de peces incluso peces más pequeños. El alimento más importante y quien le confiere la coloración rosada en la carne por contener pigmentos carotenoides como astaxantina, es el camaroncillo de río o Gammarus. Cuando se encuentran en estanques, se alimenta de balanceado con un alto grado de proteína animal (Imaki, 2003).

1.2.1.7 Genética

Actualmente, 1700 especies de peces han sido caracterizadas a nivel citogenético aunque sólo un 10% de ellas poseen cromosomas sexuales claramente diferenciados. La trucha arco iris tiene entre 58 y 64 cromosomas, con un tamaño de genoma de 2.4×10^9 pb (Young *et al.*, 1998, Sakamoto *et al.*, 2000).

Oncorhynchus mykiss posee cuatro grupos de cromosomas más el par sexual, distribuidos en:

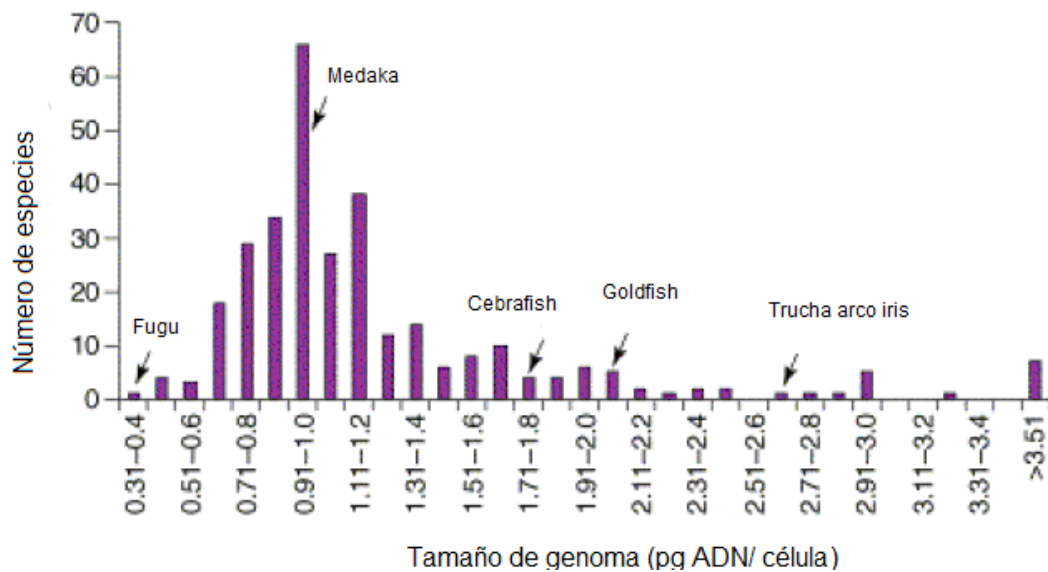
Grupo A: 7 pares de cromosomas metacéntricos grandes

Grupo B: 7 pares de cromosomas submetacéntricos grandes

Grupo C: 8 pares de cromosomas metacéntricos medianos

Grupo D: 7 pares de cromosomas telocéntricos

Par sexual: XY (Ortiz *et al.*, 2006)



Fuente: Young *et al.*, 1998.

Figura 1.3 Tamaño del genoma en distintas especies de peces incluyendo *Oncorhynchus mykiss*.

1.2.1.8 Condiciones de calidad del agua

Para un normal desarrollo de *Oncorhynchus mykiss* es indispensable que el agua cumpla con condiciones de calidad exigentes esto garantiza que las truchas tengan un ambiente óptimo para su subsistencia. Los parámetros abióticos como temperatura, pH y oxígeno disuelto, entre otros, representan las condiciones químicas que determinan la factibilidad del uso del agua para la crianza de peces.

Temperatura: Durante la incubación de los huevos, debe evitarse la temperatura mayor a 13°C por lo menos desde la fecundación hasta el embrionamiento. Pasando el período embrionario la ova puede eclosionar sin obstáculo grave a una temperatura de 18°C (Imaki, 2003).

Oxigenación: Cuando el oxígeno disuelto está por debajo de 4 mL. ocasiona un mal desarrollo de la incubación con aparición de alevines deformes en tasa elevada (Imaki, 2003).

Cuadro 1.3 Parámetros óptimos del agua para el desarrollo de la trucha arco iris

Parámetros físico-químicos	Rango óptimo
Oxígeno Disuelto	6,5 – 9 ppm
pH	6,5 – 8,5
CO ₂	<7ppm
Alcalinidad	20 – 200 mg/lit Ca CO ₂
Dureza	60 – 300 mg/lit Ca CO ₂
NH ₃	No mayor de 100 mg/lit
H ₂ S	Máximo aceptado de 0.002 mg/lit
Nitratos	No mayor de 100 mg/lit
Nitritos	No mayor de 0, 055 mg/lit
Nitrógeno Amoniacal	No mayor de 0,012 mg/lit
Fosfatos	Mayores de 500 mg/lit
Sulfatos	Mayor de 45 mg/lit
Hierro	Menores de 0.1 mg/lit
Cobre	Menores de 0,05 mg/lit
Plomo	0.03 mg/lit
Mercurio	0,05 mg/lit

Fuente: Fisheries and Aquaculture Department (FAO, 2002).

1.2.2 Biología de reproducción de *Oncorhynchus mykiss*

En su hábitat natural *Oncorhynchus mykiss*, busca aguas correntosas para su reproducción, en especial ríos y arroyos de aguas limpias y frescas. Las hembras cavan surcos en el fondo con potentes movimientos de sus colas, luego depositan sus óvulos al mismo tiempo que los machos liberan el esperma para fecundarlos; posteriormente, las hembras cubren los huevos con arena. Cuando se encuentran en estanques de cautiverio, este proceso reproductivo no se realiza, es por esta razón que se efectúa el desove o extracción de gametos o células sexuales para proceder a la reproducción asistida (Scott *et al.*, 1980).

La biología reproductiva de machos y hembras de trucha difiere en diferentes aspectos, entre ellos la edad a la cual maduran sus gametos; en el caso de los machos ocurre al año de edad, mientras que las hembras maduran a los dos años. Igualmente, las hembras maduran una sola vez por año y los machos lo hacen varias veces durante un ciclo anual (Bastardo, 1999).

1.2.2.1 Diferenciación sexual

La trucha arco iris presenta dimorfismo sexual, esto significa que fácilmente se pueden observar marcadas diferencias morfológicas en los machos y hembras reproductoras, por ejemplo, los machos adultos presentan la cabeza más alargada que las hembras y la mandíbula prominente, mientras que las hembras conservan su mandíbula redondeada (Imaki, 2003).

Cuadro 1.4 Características principales para la diferenciación de sexos de trucha arco iris

	MACHO	HEMBRA
Boca y mandíbula	Grande y puntiaguda	Pequeña y redondeada
Dientes	Agudos	No muy agudos
Musculatura	Dura	Suave
Abdomen	Duro	Más blando por ovas
Poros genitales	No prominente	Prominente
Color Nupcial	Muy Negruzco	Normal
Anchura	Angosta	Ancha
Forma del cuerpo	Delgada	Redondeada

Fuente: Imaki, 2003.

1.2.2.2 Desarrollo y maduración de los gametos

1.2.2.2.1 Espermatozoides

En los machos al llegar a su madurez se presentan dos fases del ciclo testicular, espermatogénesis y espermiación, la primera que consiste en la formación de células sexuales o espermatozoos y la segunda representada por la liberación de las células desde los testículos, bien sea por un proceso normal o por reabsorción intratesticular (Billard *et al.*, 1982).

La estructura de los espermatozoides de los salmónidos difiere de los mamíferos. Ellos carecen de acrosoma, parte anterior de la cabeza, el cual

hace contacto con el huevo libera lisina para disolver localmente la membrana del huevo favoreciendo la penetración y fertilización. El huevo de los salmónidos está rodeado por un corion particularmente fuerte, pero puede ser penetrado vía micrópilo, poro a través del cual los espermatozoos nadan hasta alcanzar la membrana más delicada del huevo (Cohen, 1977).

Scott *et al* (1980), indica que el semen de los salmónidos y de muchos otros animales es inmóvil dentro del testículo y en el semen no diluido, la actividad solo se inicia por dilución con agua, solución salina o fluido ovárico, además señalan que el semen de las truchas presenta una alta concentración, (9 millones espermatozoides / mm³).

La calidad del semen (motilidad y concentración) está influenciada por el contenido de ácido ascórbico en la dieta, una deficiencia reduce tanto la concentración como la movilidad de los espermatozoos, afectando la fertilidad de la trucha arco iris (Ciereszko y Dabrowski, 1995).

1.2.2.2 Óvulos

Al llegar la maduración de los óvulos, la envoltura que los rodea (estrato folicular) se desgarran, permitiendo la salida de las ovas hacia la cavidad abdominal, se puede decir que ha llegado al estado denominado ovulación donde los gametos pueden ser fecundados. El fenómeno por el cual se expulsa las ovas maduras fuera del cuerpo se denomina el desove (Imaki, 2003).

Los óvulos de trucha arco iris mejor conocidas como ovas tienen un peso de 0,06-0,07 g y un diámetro de 4-6 mm. Su estructura es la siguiente; una membrana externa llamada corion, el citoplasma con una cantidad importante de deutoplasma o vitelo que constituye el material nutritivo y el núcleo que almacena la información genética. En un análisis microscópico, se encuentra un micrópilo que es una abertura apropiada para el ingreso del espermatozoide en el momento de la fecundación. De acuerdo a la cantidad de vitelo y su disposición, los óvulos de los salmónidos pertenecen a los telolecitos

es decir que todo su material nutritivo está localizado en un polo (Imaki, 2003; Naturenotes, 2008).

1.2.2.3 Reproducción artificial

La reproducción artificial de la trucha arco iris, bajo condiciones de cultivo, involucra un conjunto de áreas técnicas que conducen a la producción de ovas y alevines. Es importante que para que exista un buen manejo productivo se tenga un previo conocimiento de las bases biológicas que sustentan el proceso reproductivo. Entre los aspectos biológicos más destacados tenemos: los aspectos genéticos, relacionados con la conservación de líneas genéticas; y los aspectos fisiológicos relacionados con el conocimiento del ciclo reproductivo. Entre los aspectos técnicos podemos hablar de una correcta selección de reproductores, manejo de gametos para la fecundación, bioseguridad, control de alimento y control de parámetros del agua. Es necesario destacar que la obtención de ovas y semen de excelente calidad dependerá de un riguroso proceso de manejo de los reproductores cuyo proceso iniciará meses incluso años atrás (Fisheries and Aquaculture Department FAO, 2002).

El proceso de desove comienza con la clasificación de los reproductores según su sexo, la madurez sexual se puede comprobar en los mismos estanques de crianza con un ligero masaje abdominal. En las hembras, al efectuar la palpación en la región ventral, ésta deberá encontrarse relajada, suave al tacto y distendida, e incluso las ovas saldrán con facilidad por el poro genital. En los machos, a pesar de que se encuentran maduros en todas las épocas, la diagnosis sexual es similar y con una pequeña presión sobre el vientre, el semen es expulsado de inmediato agua (Fisheries and Aquaculture Department FAO, 2002).

Al término de la ovulación, las ovas que no fueron expulsadas se convierten en sobre-maduras y con una capacidad de fecundación nula. Éstas ovas son

fácilmente reconocidas por la presencia de una vesícula liposa (gotitas de aceite) en la parte superior (Imaki, 2003).

1.2.2.4 Desove

Los reproductores a ser desovados deben estar libres de deformidades, y tener un color plateado en la piel. La trucha es seleccionada como reproductor, tres años después de la primera alimentación. Un año antes de la selección de los reproductores, los peces con apariencia de madurez, es decir, color café, o con deformidades o con crecimiento lento (bajo peso), son cosechados. En la selección final de los reproductores, se consideran solamente truchas plateadas de forma esbelta (Acuagen, 2005).

Los reproductores son anestesiados para evitar el estrés en el momento del desove, se acostumbra usar anestésicos de origen natural para no afectar la salud posterior de los animales, el sedante más indicado es el aceite de clavo de olor cuyo principio activo es el compuesto conocido como eugenol, el cual adormece lentamente a los animales y disminuye su excitación nerviosa (Ortiz *et al.*, 2006).

Se conocen dos métodos de desove, bipersonal y unipersonal, el primer método es efectuado por dos personas quienes sostienen a la trucha hembra por la región cefálica y la región caudal, de inmediato se procede a la aplicación de los masajes abdominales para que las ovas desciendan verticalmente. Para el segundo método, se cuenta con un soporte de extracción de ovas, la trucha es colocada en posición inclinada en el apoyo del soporte de manera que su cuerpo quede arqueado y su tronco hacia atrás, con movimientos repetitivos en el abdomen y de arriba hacia abajo se van removiendo las ovas de la cavidad abdominal (Imaki, 2003).



Figura 1.4 Método de desove unipersonal con soporte de extracción de ovas.

Cualquiera que sea el método utilizado, el cuidado de la integridad de los reproductores debe ser lo primordial, evitando presionar con excesiva fuerza ya que en la zona ventral se encuentran otros órganos importantes y mucho menos presionar cerca del corazón, caso contrario se corre el riesgo de la muerte del animal.

En la actualidad se están investigando nuevas técnicas de desove para evitar el estrés causado por la manipulación excesiva, por ejemplo el desove por presión, en donde los huevos son removidos de las hembras, bajo anestésico, por aplicación de presión en la zona pélvica mediante la inserción de una inyección hipodérmica de 10 mm dentro del cuerpo cerca de la cavidad pélvica, la presión del aire debe ser de 2 psi. Los óvulos maduros son expelidos inmediatamente por el poro genital. El aire es removido del cuerpo del pez por masajes ligeros. Con esta técnica se puede recolectar 2000 huevos por Kg. para realizar la fecundación artificial (Fisheries and Aquaculture Department, FAO, 2002).

1.2.2.5 Fecundación artificial

La fecundación se produce externamente, las ovas y el semen son depositados en un recipiente plástico evitando el contacto con cualquier sustancia. Pasados unos minutos, se procede al lavado de las ovas eliminando excedentes de semen y ovas no fecundadas, seguidamente se realiza la hidratación con exposición mínima de agua dulce, se cuentan las ovas y se colocan en los recipientes incubatorios, estas operaciones deben realizarse sin exposición al sol pues las ovas son muy sensibles (Shepherd *et al.*,1999).

Durante la fecundación, los espermatozoides son activados por el agua, desarrollan movimientos y rodean al óvulo. Uno o varios espermatozoides pueden alcanzar el micrópilo, pero sólo uno será capaz de penetrarlo. Con motivo de la entrada del espermatozoide, el ovocito hasta entonces en fase de reposo biológico, detenido en la metafase de la segunda división meiótica, se activa, aproximadamente, en 30 segundos y la meiosis se reinicia. En el transcurso de 20-30 minutos se completa la meiosis. El resultado final es la existencia en el citoplasma de dos formaciones o agrupaciones cromosómicas procedentes del núcleo primitivo del óvulo, cada uno de ellos con un número haploide de cromosomas. De estas dos formaciones, una de ellas, el denominado segundó corpúsculo polar, es reabsorbido y desaparece, siendo el resultado final un oocito, llamado ahora óvulo, con un gran citoplasma y con una dotación cromosómica haploide. El pronúcleo portador del material cromosómico del macho, situado ya en el citoplasma ovular, alcanza el pronúcleo de la hembra y se fusionan, siendo el resultado final la formación de una célula, denominada ahora huevo, con un número de cromosomas $2n$ o diploide. Esta fusión recibe el nombre de cariogamia y se realiza inmediatamente, en comparación con otras especies. La mitad de este material cromosómico es aportado por el macho y la otra mitad por la hembra, son por tanto; individuos diploides. De los treinta cromosomas aportados por el ovocito, uno de ellos hace referencia al sexo y es siempre X, puesto que la hembra tiene un código genético que es siempre XX, es decir, dos cromosomas sexuales iguales. El cromosoma sexual aportado por el espermatozoide puede ser X o Y, ya que el código genético del macho es XY (Blanco, 1995).



Figura 1.5 Fecundación artificial de trucha arco iris.

1.2.2.6 Incubación

El proceso de incubación comprende la etapa de desarrollo que se extiende entre la fecundación y la eclosión. La eficiencia de su manejo tiene una importancia fundamental en las tasas de supervivencia medidas dentro de esta etapa. Existen diversos tipos de incubadores con los más variados materiales y diseños, (fibra de vidrio o plástico sobre canastillas; en incubadoras verticales, en baldes; en botellas, etc.). Independientemente de la opción escogida, los aspectos críticos que deben ser destacados en el manejo de la incubación son: temperatura del agua (rango 6-12⁰ C, óptimo 10-12⁰ C), buena circulación de agua a través de las ovas; suficiente oxígeno, oscuridad o semi-oscuridad, ausencia de todo movimiento sobre las ovas (antes de la oculación) y eliminación de ovas muertas para evitar la proliferación de hongos (*Saprolegnia*) (Fisheries and Aquaculture Department, FAO, 2002).

La duración de la incubación es inversamente proporcional a la temperatura media del agua. El período embrionario se confirma con la presencia de dos puntos negruzcos en el interior de la ova observables a simple vista. Las ovas embrionadas adquieren mayor resistencia contra los

choques y vibraciones. Se conoce con el nombre de acumulación de temperatura al producto que se obtiene por la multiplicación de la temperatura media diaria del agua³ por el número de días requeridos para la incubación, y se expresa en grados acumulados. Se puede definir también como la cantidad de temperatura que requiere un ser viviente para su desarrollo en un tiempo determinado (Imaki, 2003).

Cuadro 1. 5 Duración de la incubación según la temperatura media del agua

Temperatura °C	Ovas en estado embrionario		Eclosión	
	Días	Acumulación de temperatura °C	Días	Acumulación de temperatura °C
6	30	180	60	360
7	25	175	50	350
8	21	168	42	336
9	18	162	36	324
10	16	160	32	320
11	14	154	28	319
12	13	156	26	312
13	12	156	24	312

Fuente: Imaki, 2003.

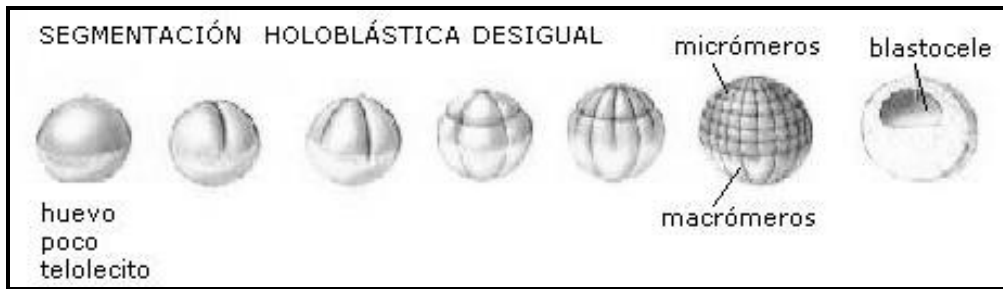
1.2.2.7 Desarrollo embrionario

El desarrollo embrionario en los peces puede dividirse en tres fases: segmentación, gastrulación y embrionamiento (Naturenotes, 2008).

1.2.2.7.1 Segmentación

Es una serie de divisiones mitóticas que no están acompañadas por crecimiento celular. De acuerdo a las distintas clasificaciones los peces poseen una segmentación holoblástica desigual debido a que el vitelo está acumulado en el polo vegetativo y cuando ocurre la división se hace por la zona de menor resistencia. Se forman 8 blastómeros desiguales (Naturenotes, 2008).

³ Temperatura promedio día expresada en grados centígrados.



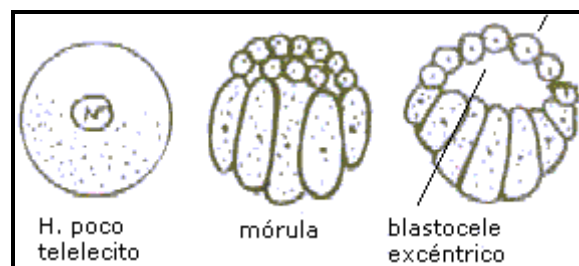
Fuente: Naturenotes, 2008.

Figura 1.6 Segmentación holoblástica de los huevos de los peces.

La mórula se asemeja a un balón de células, tiene un polo animal formando por muchas células pequeñas y un polo vegetativo con pocas células y grandes.

1.2.2.7.2 Blastulación

La segmentación morular produce una masa de células llamada blástula, sin aumento del tamaño, simplemente hay más células pero son más pequeñas, lo que sí aumenta en gran número es el material genético. Las células se disponen alrededor de una cavidad llena de fluido llamada blastocele excéntrico es decir ubicado hacia el polo (Naturenotes, 2008).



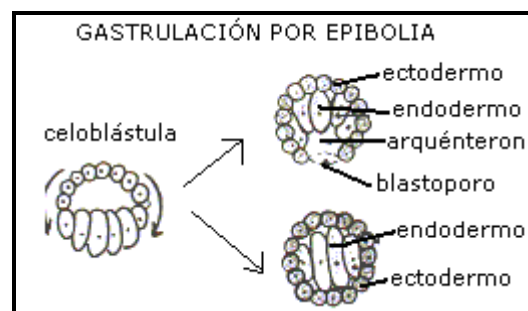
Fuente: Naturenotes, 2008.

Figura 1.7 Blastulación de los huevos de los peces.

1.2.2.7.3 Gastrulación

El proceso de gastrulación implica un crecimiento embrionario, aumentando el tamaño. También hay una reorganización celular que lleva a la aparición de las capas germinales. Ahora aparecen dos de estas capas, el

endodermo y el ectodermo. En los peces se origina una gastrulación por epibolia en donde la capa de células exterior (micrómeros) serán el ectodermo y las células internas (macrómeros) serán el endodermo. Tienen un pequeño arquéteron y un blastoporo pero desaparece el blastocele. Los micrómeros se unen en el polo vegetativo, las capas germinales son las mismas pero no hay ni blastocele ni arquéteron. El animal tendrá tubo digestivo completo pero se formará en etapas más tardías (Naturenotes, 2008).



Fuente: Naturenotes, 2008.

Figura 1.8 Gastrulación de los huevos de los peces.

Bustos *et al.*, (2005) afirma que: “durante este proceso se evidencia el engrosamiento del escudo embrional. El escudo embrional es una masa de células en forma de campana que prolifera hacia dentro desde el margen del blastodisco, formando el eje del embrión. Adicionalmente, se hace evidente una pigmentación puntiforme y uniforme sobre el vitelo”.

En trucha arco iris, desde el día tres hasta el diecisiete de incubación, las ovas son sumamente frágiles. Esta situación se debe a la diferenciación del blastodermo en sus tres capas germinativas (ectodermo, mesodermo y endodermo), a la formación del blastoporo y en definitiva, en aquellos estadíos en que tiene lugar la organogénesis. A partir del cierre del blastoporo, el embrión va adquiriendo progresivamente un aspecto cada vez más parecido a un pez, hasta el momento de la eclosión, que vuelve a ser una situación crítica (Blanco, 1995).

1.2.2.7.4 Embrionamiento

Una vez formadas las capas germinales, darán inicio a la formación de los diferentes tejidos, órganos y aparatos que en su conjunto constituirán un embrión completo. De esta forma tenemos:

Ectodermo: cubierta exterior del cuerpo, tubo neural, nervios motores, ganglios simpáticos, cráneo, arcos branquiales.

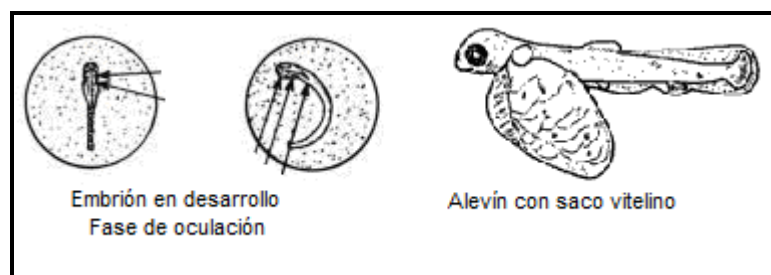
Endodermo: tubo digestivo primitivo, epitelio del tracto respiratorio, faringe, tiroides, hígado, páncreas

Mesodermo: órganos internos, riñón, gónadas, sistema circulatorio, sangre, músculo esquelético, hueso y cartílago del esqueleto (Naturenotes, 2008).

1.2.2.8 Eclosión del huevo

La finalización de la etapa embrionaria tiene lugar por eclosión del huevo. El individuo que nace es conocido como alevín o larva, cuya morfología difiere del adulto y carece de madurez sexual.

Los alevines al eclosionar, poseen una longitud de 14 a 16 mm. y un peso de 0,08 a 1,12 g. Durante esta etapa son delicados, siendo apenas móviles. Tienen un saco vitelino (reserva nutricional), necesario para su crecimiento (Imaki, 2003).



Fuente: Blanco, 1995; Naturenotes, 2008.

Figura 1.9 Eclosión de la larva de trucha arco iris.

1.2.2.9 Alevinaje

El primer alevinaje comprende desde el nacimiento hasta la primera alimentación. Este período dura de 12 a 14 días, tiempo en el cual se mantienen alejados de la luz. Al empezar a nadar libremente es necesario alimentarlos en forma inmediata, en pocas cantidades y con mucha frecuencia. El alimento debe poseer un alto contenido proteínico. Las tablas de Leitritz muestran las tasas de alimento diario según la temperatura del agua y el peso de los peces (Leitritz *et al*, 1980).

Cuadro 1.6 Frecuencia de la alimentación diaria para alevines

Peso corporal (g)	Frecuencia de alimentación (veces/día)
0.2-0.3	8-10
0.5	6
1	4
9	3-4

Fuente: Imaki, 2003.

1.2.3 Biotecnología aplicada a la acuicultura

Boyer (2000), definió a la Biotecnología como una ciencia multidisciplinaria que se centra en el uso práctico de las células biológicas y los componentes celulares.

En la actualidad existe una beneficiosa interacción entre la biotecnología, concebida como un conjunto de técnicas que utilizan o se aplican a organismos vivos para modificar o fabricar un producto de consumo o uso. La acuicultura, definida como la producción de organismos acuáticos en sistemas controlados y con aplicaciones tecnológicas que permiten manejar densidades poblacionales mayores que las naturales. De esta manera se optimiza su manejo en los cultivos, lo que habla de una acuicultura intensiva. A manera de resumen, Hew *et al.*, (2001), concluyó que la biotecnología puede

proveer los medios para incrementar la intensidad y capacidad de la acuicultura para aumentar en varias veces su producción en los próximos años.

En las últimas décadas, la biotecnología ha hecho grandes contribuciones en campos como agropecuaria y por su puesto en la acuicultura. El eje principal de las investigaciones radican en el mejoramiento de las características productivas y reproductivas (selección genética, manipulación cromosómica) (Pineda *et al.*, 2003; Díaz *et al.*, 2005).

1.2.3.1 Manipulación cromosómica para la inducción de triploidía

Una de las principales aplicaciones de la biotecnología, para mejorar los aspectos de la reproducción, constituye el estudio de la manipulación cromosómica para producir peces poliploides, es decir individuos que presentan un número mayor de cromosomas que el normal, que le conferirá mejores características productivas en especial al crecimiento y peso (Thorgaard 1981).

Desde la década de los setenta, se ha venido investigando sobre técnicas de manipulación cromosómica para inducir poliploidía en peces, entre las principales familias estudiadas se encuentran *Salmonidae*, *Characidae*, *Cyprinidae*, *Centrarchidae*, *Ciclilidae*, *Pleuronectidae* ya que son las de mayor valor comercial (Chourrout, 1980; Shireman, 1984; Dillon, 1988; Rougeot *et al.*, 2003; Vozzi *et al.*, 2003).

1.2.3.2 Efectos de la maduración sexual

En los salmónidos, el proceso de maduración sexual y desarrollo gonadal, es una etapa prolongada que conlleva cambios fisiológicos y morfológicos marcados como son: disminución en los índices de crecimiento, incremento de la mortalidad y el deterioro de las características organolépticas

de la carne. Las hembras, llegan a invertir un 30% de su peso corporal en el desarrollo gonadal. El desarrollo de las gónadas se acompaña de una drástica alteración endocrina, que ocasiona cambios en la composición corporal y en el comportamiento de los animales. El incremento de los niveles de testosterona en machos origina una mayor agresividad lo que implica dificultades en su manejo y un aumento de la mortalidad (Pérez *et al.*, 1999).

El periodo sexual, además de afectar el grado de crecimiento de los peces, trastorna y altera considerablemente su cría a nivel de una instalación industrial. El comportamiento agresivo y competitivo de los machos molesta considerablemente a las hembras que son objeto de lesiones externas. Los machos adquieren un aspecto poco deseable, su piel se oscurece y se cubre con una secreción mucosa desagradable, desluciendo su presentación en el mercado (Pérez *et al.*, 1999).

Blanco (1995), cita otros efectos generados por la madurez sexual, “la aptitud para la salmonización de la carne desciende considerablemente, al ser los pigmentos salmonizantes, incluidos en la alimentación, retenidos por las gónadas. La calidad de la carne es deficiente, con aspecto de ser blanda, poco consistente y desciende la riqueza nutritiva e incluso su sabor. El detrimento cárnico a efectos de venta es todavía económicamente mas acusado desde que es habitual la comercialización en forma eviscerada o simplemente en filete, ya que las gónadas llegan a pesar hasta el 20% del peso total del individuo”.

1.2.3.3 Inducción de triploidía

La ploidía es un término utilizado para indicar el grado de repetición de los sets o conjuntos de cromosomas de una determinada especie, la mayoría de los seres vivos poseen dos conjuntos de cromosomas denominándose diploides, pero existen algunas plantas y animales que de forma natural o inducida, presentan tres o cuatro conjuntos completos de cromosomas

denominándose triploides y tetraploides. Esta característica no afecta su viabilidad y tienen como ventaja principal su esterilidad. Algunos peces y anfibios han presentado estas características inusuales siendo un tema importante para el estudio filogenético y taxonómico (Le Comber *et al.*, 2004).

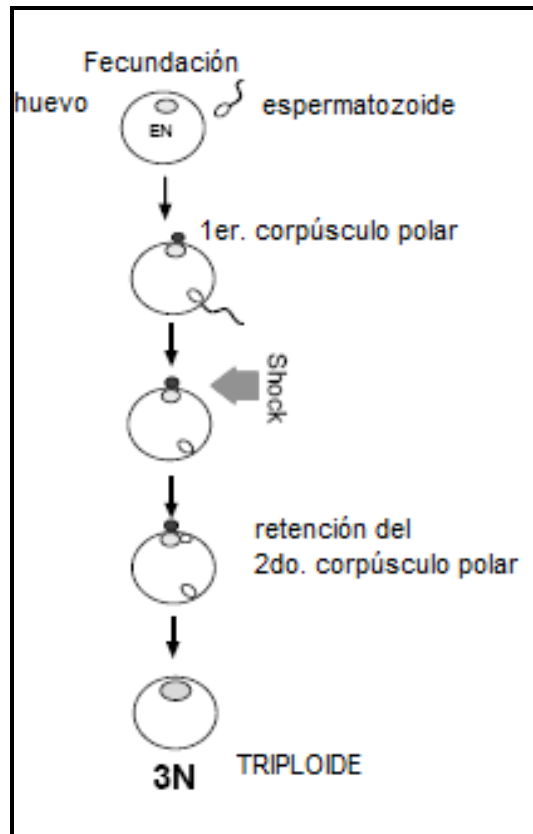
El término poliploidía se define como el aumento del número de sets de cromosomas en las células de un individuo (Lacadena, 1981).

El principal objetivo para la producción de peces triploides es la esterilidad debido a su dotación cromosómica triploide $3n$ que se derivó en un inicio de sus células germinales. Esto ayuda a atenuar las consecuencias producto de la madurez sexual, ya mencionado anteriormente (Blanco, 1995; Pérez *et al.*, 1999).

Esta metodología es eficiente y con baja mortalidad, cuya única desventaja es la pobre respuesta por parte de los machos. Sin embargo el éxito total radica en poblaciones todo hembras (Díaz *et al.*, 2005).

1.2.3.4 Técnica de retención del segundo cuerpo polar

La triploidización es una técnica de manipulación cromosómica conseguida artificialmente mediante la utilización de tratamientos físicos o químicos del óvulo recién activado por el espermatozoide. Estos choques van a ocasionar el bloqueo de la segunda división meiótica (por retención del segundo cuerpo polar), formando un cigoto triploide con tres pares de cromosomas. Dos dotaciones proceden del óvulo y por lo tanto los cromosomas sexuales serán siempre XX y la otra dotación procede del espermatozoide que puede ser X o Y. Por lo tanto existe la posibilidad de que el 50% de los individuos sean hembras triploides (XXX) y el otro 50% machos triploides (XXY). La presencia de trivalentes en la meiosis impide casi por completo la maduración sexual en hembras y parcialmente en machos. Luego del choque térmico a las ovas fertilizadas, se reanuda la meiosis detenida en el óvulo y se proporciona una dotación cromosómica adicional. El resultado final es un individuo con una carga genética $3n$ o triploide (Blanco, 1995; Rougeot *et al.*, 2003; Vozzi *et al.*, 2003).

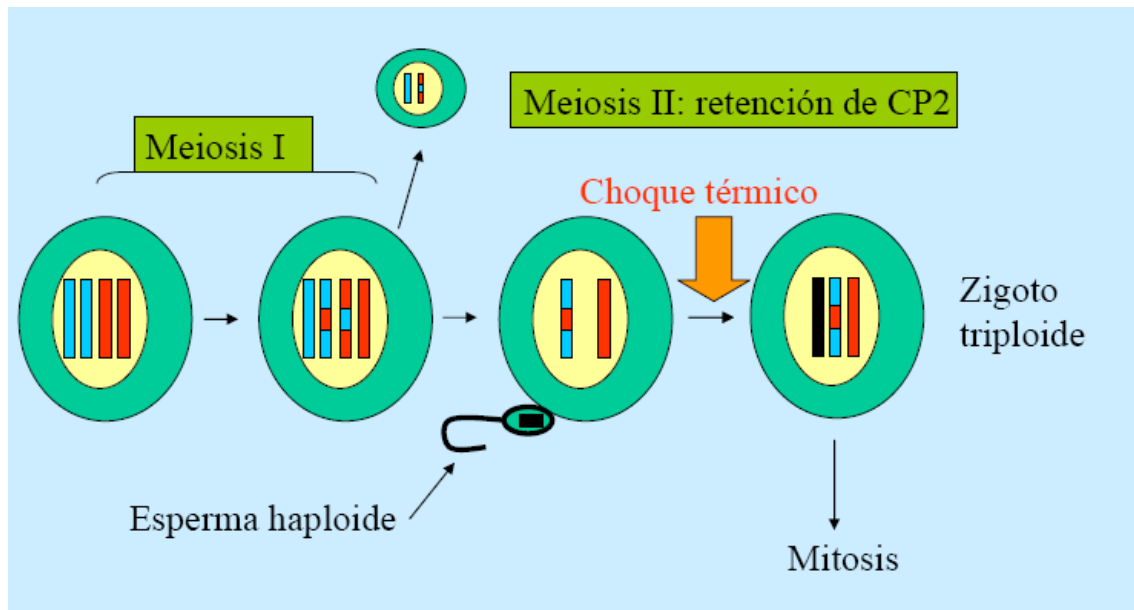


Fuente: Blanco, 1995.

Figura 1.10 Inducción de triploidía por retención del segundo corpúsculo polar mediante choques mecánicos.

Swarup (1959), describió inicialmente las alteraciones que ocurren en la gametogénesis de individuos triploides y la consiguiente interrupción de la meiosis. Las causas concretas de éste detenimiento meiótico permanecen sin esclarecer, aunque parecen relacionarse con la alteración del apareamiento cromosómico provocada por la presencia de tres cromosomas homólogos que compiten entre sí. Al finalizar la anafase de la primera división meiótica, como resultado de una disyunción cromosómica anormal, las células hijas poseen 1, 2, 3 o ningún cromosoma para cada par cromosómico (trío en triploides), lo que resulta en la formación de gametos con graves desequilibrios cromosómicos y por tanto, inviables. En cualquier caso, la interrupción de la meiosis se traduce a su vez en la alteración del proceso de formación de gametos (gametogénesis) generando esterilidad, o

al menos una disminución del potencial reproductivo de los individuos manipulados (Carrasco *et al.*; 1999).



Fuente: Neira, 1996.

Figura 1.11 Obtención de cigotos triploides por aplicación de choques térmicos a las ovas fecundadas de trucha arco iris.

1.2.3.5 Métodos de triploidización

Los métodos experimentales utilizados para la obtención de triploides corresponden a:

1. Métodos físicos (choques térmicos de calor o frío, de presión o termoeléctricos).
2. Métodos químicos, por aplicaciones de citocalasina B, colchicina o 6-dimetilaminopurina
3. Métodos genéticos, por cruzamientos de hembras diploides con machos tetraploides.

De todas estas técnicas la más utilizada por sus altos porcentajes de efectividad y costo razonable es el choque térmico a altas temperaturas. La

base para su aplicación radica en que la temperatura es un factor primordial para el desarrollo de los peces; además se necesitan temperaturas muy definidas desde la fertilización artificial hasta el levantamiento de los alevines. El cambio drástico de temperatura durante los primeros momentos de la fertilización va ocasionar que los procesos biológicos se vean alterados, específicamente en el número de cromosomas (Díaz *et al.*, 2005; Pineda *et al.*, 2003).

El éxito de la operación usando el choque térmico se basa fundamentalmente en el control exacto de la temperatura de choque, tiempo de duración y tiempo de inicio para actuar en el preciso momento que tiene lugar la triploidización. Este éxito se mide en porcentaje total de individuos triploides y supervivencia de los mismos. Cabe destacar que el índice de mortalidad se da por el estrés producido por el choque más no por la condición triploide. Las temperaturas adecuadas para el choque oscilan entre 26-30 °C y el tiempo de duración de 10 minutos, a temperaturas mayores (30°C) se obtiene un 100% de triploidía pero con supervivencia baja y a temperaturas menores (26°C) la relación es viceversa (Blanco, 1995).

Cuadro 1.7 Condiciones apropiadas de choque térmico para un alto porcentaje de peces triploides en trucha arco iris

Temperatura de choque (°C)	Tiempo de duración (min)	Tiempo postfertilización (min)	%
25±0,5	3	8	alto diploides
28±0,5	3	8	alto triploides
31±0,5	3	8	alta mortalidad
28±0,5	3	10	alto triploides

Fuente: Pineda *et al.*, 2003.

Se pueden obtener tanto triploides (sí el choque térmico se hace al poco tiempo después de la fertilización de tal forma que el segundo cuerpo polar es retenido -choque térmico meiótico o temprano), como tetraploides (si el choque térmico se hace una vez se han iniciado las divisiones mitóticas, de tal

forma que se duplique el número cromosómico - choque térmico mitótico o tardío) (Khan, 2000).

1.2.3.6 Ventajas de individuos triploides

La producción de individuos triploides tiene varias aplicaciones posibles, siendo éstos total o parcialmente estériles. Tienen utilidad para aumentar la eficiencia de producción de carne al reducir el gasto de energía en el proceso de maduración sexual, incrementando el crecimiento, evitando el deterioro en la calidad de la carne y previniendo cambios en la coloración de la piel. Con la utilización de peces estériles se puede además retrasar las cosechas, logrando peces de mayor peso y edad. También se evita la aparición de machos precoces entre los peces destinados a cosecha (Pérez *et al.*, 1999).

La venta de individuos estériles permite al productor mantener el control sobre las líneas comercializadas, beneficiándose de programas de selección generalmente costosos y de larga duración (Thorgaard, 1981).

La esterilidad facilita también la introducción de especies exóticas en nuevos ecosistemas, previene la pérdida de biodiversidad causada por los escapes de peces en áreas que soportan niveles intensivos de Acuicultura, y supone una importante medida de control en los experimentos con individuos manipulados genéticamente, peces transgénicos, (Pérez *et al.*, 1999).

Los beneficios de producir individuos triploides con la ayuda de la biotecnología son mucho más evidentes en los aspectos productivos y económicos ya que se obtendría un aumento de la producción a un menor costo. Así mismo, una independencia de las importaciones obligadas de ovas triploides o sólo hembras, que en algunos casos generan una incertidumbre respecto de su calidad (Pineda *et al.*, 2003).

En resumen podemos destacar los beneficios de la eliminación de los peces sexualmente maduros en la población de trucha (Aquatic, 1999):

- Carne de mejor calidad.
- Los peces estériles transfieren más energía al crecimiento que a los tejidos reproductivos.
- Más potencial en el margen de ganancia especialmente con truchas de tamaño grande.
- Crecimiento comparable durante el ciclo completo de vida con poblaciones regulares de truchas hembras.
- Uso más eficiente y productivo de las instalaciones de crianza al remover los peces reproductores innecesarios.
- Peces apropiados para regresar al medio ambiente sin impacto genético.

1.2.3.7 Análisis de determinación de ploidía

El análisis de ploidía se lleva a cabo por métodos indirectos tales como la medida del volumen nuclear y electroforesis de proteínas; y por métodos directos como citogenética mediante conteo cromosómico y la determinación del contenido de ADN por citometría de flujo.

1.2.3.7.1 Cuantificación mediante citometría de flujo

Esta técnica permite determinar la cantidad de ADN sobre células previamente teñidas con un colorante específico, el cual se hace fluorescente cuando es apropiadamente excitado por la luz de un láser, por lo tanto, la cantidad de fluorescencia es directamente proporcional a la cantidad de ADN en cada célula. De esta forma, si un organismo contiene en sus células una cantidad de ADN marcado para diploides, triploides o tetraploides, el citómetro de flujo definirá, bajo una gráfica, el porcentaje de células marcadas. Esta metodología consume tiempo en su estandarización e importación de fluorocromos, pero es la más confiable por la precisión de los resultados (Chourrout *et al*, 1988).

1.2.3.7.2 Citogenética

Determina el número de cromosomas de una especie, el cual tiene un significado adaptativo y evolutivo. En el caso de la trucha arco iris (*O. mykiss*) se ha determinado que su número diploide es $2n= 58-63$ cromosomas (Colihueque *et al*, 2001).

En citogenética, la determinación se realiza contando el número de cromosomas en la metafase de las células, lo que significa que para esta especie un organismo haploide tendría un número $n= 29-32$, triploide $3n= 87-94$ y tetraploide $4n= 116-126$ cromosomas (Thorgaard, 1977).

1.2.3.7.3 Medición del volumen de núcleo del eritrocito

Debido al aumento de ADN nuclear en los individuos triploides o tetraploides, el volumen del núcleo celular de los eritrocitos se incrementa, proporcionando un valor comparativo con el núcleo de los individuos diploides (Arai, 2000).

Los eritrocitos o glóbulos rojos son células esféricas que presentan un núcleo elíptico, y un citoplasma que se tiñe con colorantes ácidos en medio alcalino (Fernández *et al*, 2008).

La fórmula propuesta para conocer el volumen promedio de los núcleos de los eritrocitos para esta especie fue descrita por Bunge *et al* (1993), así:

$V = 4/3\pi ab^2$ donde: a= eje mayor; b= eje menor.

1.2.4 Proyectos relacionados e investigaciones previas

En 1945, Svardson logró satisfactoriamente la primera inducción de triploidía en salmónidos y esto sirvió de base para la investigación de la inducción de ploidías en otros peces de interés económico, por ejemplo *Perca fluviatilis* (Rougeot *et al.*, 2003), *Rhamdia quelen* (Vozzi *et al.*, 2003). La

mayoría de los proyectos están enfocados al análisis de los efectos de la temperatura y la duración de los choques en la supervivencia y porcentaje de triploidías. A continuación se detallan algunas investigaciones realizadas en trucha arco iris que nos ayudarán a comprender de mejor manera la inducción de triploidía en esta especie.

Chourrout (1980), presentó un estudio sobre la inducción de triploidía en trucha arco iris por medio de la aplicación de un choque térmico de 27-30 °C por 10 minutos iniciándose este tratamiento durante la primera hora de desarrollo postfertilización, los resultados que se obtuvieron fueron satisfactorios lográndose de un 90-95% de peces triploides. Tomando como base el trabajo anterior, miembros del Instituto de Medicina Veterinaria de Croacia lograron una triploidización del 100% en trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) exponiendo a las ovas a una temperatura de 26°C durante 20 minutos y en un tiempo de pos fertilización también de 20 minutos. La supervivencia de los especímenes fue de 46.97% frente al 81.09% del grupo control.

Valdebenito *et al.*, (1996), investigaron la inducción comercial de triploidía en trucha arco iris aplicando un choque térmico de 28°C por 10 minutos a ovas recién fecundadas, el porcentaje de triploidización fue de 90 ± 8.2% del total de ovas tratadas, se realizó el seguimiento de los especímenes triploides adultos de 2 y 3 años de edad en donde se mostró una ausencia total de los caracteres sexuales secundarios en las hembras mientras que en los machos se notó un desarrollo gonadal importante.

Pérez *et al.*, (1999), estudiaron diferentes parámetros morfométricos como longitud caudal, peso corporal, peso gonadal y peso del canal eviscerado en ejemplares triploides de trucha arco iris a lo largo de 44 meses post eclosión, la triploidía fue inducida mediante la aplicación de un choque térmico de 27°C por 13 minutos luego de 11 minutos después de la fertilización. Se logró un 46% de triploidía en el grupo tratamiento analizado 5 meses post eclosión teniendo una eficiencia relativamente baja. No se apreciaron mayores diferencias entre los individuos diploides y triploides antes de los 20 meses de edad, luego de esto y en especial a los 44 meses de edad se notó un aumento

significante en el peso del canal eviscerado de 19.4% y 24.7% respectivamente, esto constituye un buen parámetro para evaluar el rendimiento en la producción de truchas, puesto que se obtienen animales de mayor tamaño para venta de carne en filete.

Thorgaard (2002), basó su investigación en estandarizar las condiciones apropiadas de choque térmico para obtener un alto porcentaje de peces triploides de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), los resultados fueron que a una temperatura de $28\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ con un tiempo de duración de tres minutos y un tiempo de inicio del choque de 8-10 minutos pos fertilización se logra un alto porcentaje de triploides, mientras que a una temperatura de choque de $31\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ la mortalidad de los peces es alta aún cuando sus porcentajes de triploidía fueron de 100%. Con este estudio se llegó a la conclusión que la temperatura de choque es directamente proporcional al porcentaje de triploides e inversamente proporcional a la supervivencia de los grupos tratados (Blanco, 1995).

1.2.5 Futuro de las técnicas biotecnológicas en la acuicultura

En los últimos años han comenzado a desarrollarse diferentes técnicas biotecnológicas que permiten manipular el proceso reproductivo. Esto se traduce en la posibilidad de manipular el ciclo sexual, conservar gametos por tiempo indefinido o producir ovas con un valor agregado por su condición de mejoradas. Dentro de las biotecnologías de mayor importancia se pueden mencionar: la inducción hormonal de la ovulación, la manipulación fotoperiódica de la maduración sexual, la criopreservación de semen, la utilización de la reversión hormonal del sexo para la obtención de neomachos y la técnica antes descrita como inducción de triploidía. La utilización de estas dos últimas técnicas permite contar con ovas mejoradas del tipo monosexo “todo hembra” y ovas “estériles” (todo hembra triploides), las cuales otorgan significativas ventajas en el rubro de la producción de carne (Estay, 1996).

1.2.5.1 Técnicas naturales para retardar la madurez sexual

1.2.5.1.1 Aplicación de fotoperíodos largos

Técnica instaurada artificialmente, produce la maduración de las gónadas en períodos de tiempo no correspondientes al natural, e incluso acorta el tiempo de maduración. De igual manera, a partir de este fenómeno, es posible inhibir temporalmente la maduración manteniendo artificialmente a los reproductores en períodos de luz prolongada.

El fotoperíodo más fácil de aplicar es el de 24 horas luz, sobre otros como 16 horas luz o crecimiento lumínico progresivo de 16 a 24 horas luz, todos ellos a partir del inicio de verano. De esta forma los peces conservan más tiempo su aspecto inmaduro, como respuesta al nivel fisiológico modificado por la acción de la luz. La cría en condiciones de oscuridad o claridad total constante, después del estado de alevín joven, permite llegar a una reproducción autónoma, dos o tres años después que las truchas arco iris control (Blanco, 1995).

1.2.5.2 Técnicas de manipulación artificial del sexo fisiológico

1.2.5.2.1 Reversión hormonal del sexo fisiológico.

Existe una amplia gama de procedimientos para producir reversión de sexo, tanto para producir masculinización como feminización. Pandian *et al.* (1995) hizo una revisión de los procedimientos empleados para esta manipulación utilizando 31 esteroides diferentes, en 47 especies de peces entre ellas la familia *Salmonidae*.

Básicamente existen dos formas para la administración de las hormonas: por inmersión o por ingestión. La segunda es la más practicada, incorporando la hormona en la dieta normal, con la cual los peces son alimentados por un período dado. Las variables a considerar son la naturaleza

de la hormona, concentración en la dieta, lapso de tiempo del suministro y el momento del inicio del tratamiento. Para producir lotes todo macho (masculinización) se emplea hormonas (andrógenos), tales como, testosterona, 11 ketotestosterona y androstenediona, de origen natural. Entre los sintéticos, el más usado es 17 α -metiltestosterona. La hormona se incluye en el alimento disuelto en etanol absoluto, el que se evapora posteriormente. El rango de concentración se ha determinado por ensayo y error; pero la tendencia es usar la menor concentración que permita tener un porcentaje apropiado de reversión. En trucha arco iris, los mejores resultados se obtienen al iniciar el tratamiento con la primera alimentación. Con relación al tiempo de suministro, los mejores resultados se obtienen entre los 60 y 90 días. Tiempos superiores a 120 días producen porcentajes elevados de esterilidad, lo que también se produce al aumentar la concentración de la hormona (Díaz *et al.*, 2005).

En peces también es factible la feminización mediante el tratamiento hormonal con estrógenos, produciendo lotes todo hembra. Estos tratamientos son menos eficaces en revertir los machos a hembras y por lo tanto se necesitan dosis más elevadas para producir buenas tasas de reversión. Otra diferencia importante con la masculinización es que los tratamientos orales deben ser acompañados de inmersión en soluciones de estrógenos. El estrógeno más usado es el 17 β estradiol, que es de fácil obtención y gran estabilidad química. Este es incluido en el alimento en una solución de etanol absoluto (Yamamoto, 1953).

1.2.5.3 Técnicas de manipulación artificial del sexo genético

La determinación del sexo genético ocurre al momento de la fecundación. En algunas especies de peces, entre las que se cuentan algunos salmónidos, el sistema de determinación del sexo genético es del tipo XX/XY y la diferenciación de los cromosomas sexuales es suficientemente evolucionada ya que permite el reconocimiento de estos cromosomas al examinar el cariotipo de los individuos (Blanco, 1995).

Estas situaciones permiten utilizar mecanismos como la inducción artificial de partenogénesis para controlar el sexo genético en la progenie de un cruzamiento determinado. Las formas de partenogénesis son la ginogénesis y la androgénesis, ambas posibles de inducir experimentalmente.

En la ginogénesis se producen individuos cuyo material genético procede sólo del progenitor hembra. Consiste en lograr el desarrollo del embrión activando ovocitos con espermatozoides inactivados genéticamente. La producción de ginogenéticos requiere combinar la inactivación del semen con la diploidización del complemento cromosómico materno. Primero se induce el desarrollo haploide del huevo, previo tratamiento de los espermatozoides para eliminar su aporte genético, y luego, los huevos son sujetos a otro tratamiento, impidiendo la segunda división meiótica o la primera división mitótica, para duplicar su material genético(Díaz *et al.*, 2005).

La androgénesis permite sólo la herencia paterna, y experimentalmente puede ser producida inactivando cromosómicamente las ovas, fecundando con espermios normales, e inhibiendo la primera división mitótica del huevo.

Los peces androgenéticos también exhiben baja supervivencia; esta mejora cuando se utiliza espermatozoides diploides de tetraploides naturales o inducidos. La principal ventaja es una mayor rapidez de crecimiento por menores tiempos generacionales de los machos en varias especies (Díaz *et al.*, 2005).

1.3 Hipótesis

Hipótesis afirmativa

El tratamiento térmico de alta temperatura, moderada duración y en las fases iniciales de fecundación produce un mayor porcentaje de truchas arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) triploides y con mayor supervivencia.

Hipótesis alternativa

El tratamiento térmico de alta temperatura, moderada duración y en las fases iniciales de fecundación no produce un mayor porcentaje de truchas arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) triploides y con mayor supervivencia.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Participantes

Esta investigación contó con la participación del Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca por medio del Centro de Investigaciones Acuícolas Papallacta (CENIAC), el cual facilitó sus instalaciones, materiales e instrumentos para desarrollar la primera fase experimental; además se contó con la ayuda de los Sres. Técnicos: Lic. Jaime Idrovo, Jefe de Investigación y Desarrollo, encargado de los proyectos de investigación y tesis de grado; Ing. José Vaca, Jefe del Departamento de Nutrición, encargado del Área de Bromatología y Análisis de Alimento; Lic. Luís Quisanga, Jefe de Producción y todo el personal del CENIAC-P quienes ayudaron en la ejecución de la primera parte del proyecto.

Por parte de la Escuela Politécnica del Ejército existió la colaboración del Instituto Agropecuario Superior Andino (IASA I), Hacienda El Prado, Estación de Pailones, además la grata participación de un profesional destacado en el campo de la Acuacultura en el país como es el Ing. Juan Ortiz, docente de la ESPE, Departamento de Ciencias de la Vida, Carrera de Ingeniería Agropecuaria, encargado de dirigir este proyecto de investigación.

2.2 Zona de Estudio

2.2.1 Localización del Experimento

La primera fase experimental del proyecto de investigación se llevó a cabo en el Centro de Investigaciones Acuícolas Papallacta (CENIAC-P), el mismo que es una Dirección del Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca (MAGAP), ubicado en la Provincia del Napo, Cantón Quijos, Parroquia Papallacta, Sector Llanura de Baños a 1 1/2 Km. Se utilizó

la Sala de Incubación, el laboratorio de Biotecnología e Investigación y el Laboratorio de Patología e Histología.



Figura 2. 1 Vista panorámica del Centro de Investigaciones Acuícolas Papallacta CENIAC-P.

Fotografía: Ing. Pedro Manuel Santistevan

Datos generales

Longitud: 78° 08'
Latitud: 00° 21'
Altitud: 3300 m.
Temperatura: 8 - 12°C
Precipitación anual: 1560 mm.
Humedad Relativa: 86 %

La segunda fase experimental se realizó en la Hacienda El Prado, perteneciente a la Carrera de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias (IASA I), ubicado en la Provincia de Pichincha, Cantón Rumiñahui, Sector San Fernando. Se ocuparon los estanques de crianza y el laboratorio de Acuicultura.



Figura 2.2 Estanques de crianza del IASA I.

Datos generales

Longitud: 78° 24' 44"
Latitud: 0° 23' 20" (S)
Altitud: 2748 m.
Temperatura: 13-14°C
Precipitación anual: 1200 mm.

2.3 Tipo de Investigación

El tipo de investigación es explicativo porque permite conocer, entender y explicar distintos fenómenos biológicos desde el momento mismo de la fecundación de la trucha arco iris, sus etapas, desarrollo, inducción de triploidía y los diferentes análisis para su demostración. Además se contó con las herramientas necesarias para la interpretación de los resultados a través del

diseño estadístico que permitió analizar el comportamiento de las variables que intervienen en el método experimental.

2.4 Técnica Estadística

El tipo de diseño utilizado fue un Diseño de Bloques Completamente al Azar (DBCA), debido a su precisión y disminución del error experimental.

Dentro de este diseño se dispuso los arreglos factoriales con adicionales los cuales a través de las interacciones de los factores se pudo analizar los datos con mayor claridad.

2.4.1 Factores

Temperatura del choque térmico (T):

26 °C BAJA TEMPERATURA

28 °C ALTA TEMPERATURA

Tiempo de duración del choque (D):

5 min BAJA DURACIÓN

10 min MODERADA DURACIÓN

15 min ALTA DURACIÓN

Tiempo de inicio del choque posfecundación (P):

10 min NORMAL

20 min TARDÍO

2.4.2 Tratamientos

Número de tratamientos: T x D x P

$$2 \times 3 \times 2 = 12$$

2.4.3 Tratamiento Satélite o Adicional (Control)

Para este proyecto se evaluaron tres factores y sus respectivas interacciones, además se necesitó evaluar un tratamiento satélite o control que si bien es cierto no es parte constitutiva del factorial sin embargo ayuda a complementar la información de dicho proyecto.

El control está definido por la fertilización artificial y desarrollo normal de las ovas de trucha arco iris, según protocolos establecidos.

<p>T x D x P + n 2x3x2 + 1 13 TRATAMIENTOS</p>
--

2.4.4 Descripción de los Tratamientos

De la combinación de los tres factores en estudio más el tratamiento testigo se obtuvieron 13 tratamientos.

Cuadro 2.1 Interacción de tres factores para la obtención de los diferentes tratamientos.

N°	NOMENCLATURA	DESCRIPCIÓN		
		T° de choque (°C)	Duración (min)	Postfertilización (min)
T1	T1D1P1	26	5	10
T2	T1D2P1	26	10	10
T3	T1D3P1	26	15	10
T4	T1D1P2	26	5	20
T5	T1D2P2	26	10	20
T6	T1D3P2	26	15	20
T7	T2D1P1	28	5	10
T8	T2D2P1	28	10	10
T9	T2D3P1	28	15	10
T10	T2D1P2	28	5	20
T11	T2D2P2	28	10	20
T12	T2D3P2	28	15	20
T13	T0D0P0	/	/	/

2.4.5 Repeticiones

Se realizaron 3 repeticiones en cada tratamiento para garantizar la estandarización de la técnica.

2.4.6 Descripción de la Unidad Experimental

Las unidades experimentales (U.E.) están representadas por las ovas fecundadas de trucha arco iris a las cuales se les aplicaron los tratamientos antes mencionados. Cada U.E. está conformada por 1000 ovas. En total se cuenta con 39 unidades experimentales.

U.E.= # TRATAMIENTOS x # REPETICIONES 13 x 3 39 UNIDADES EXPERIMENTALES

Cuadro 2.2 Interacción de tres factores para la obtención de los diferentes tratamientos con su respectiva repetición R1, R2, R3.

		T (°C)	D (min)	P (min)	
R1	T1	T1R1	26	5	10
	T2	T2R1	26	10	10
	T3	T3R1	26	15	10
	T4	T4R1	26	5	20
	T5	T5R1	26	10	20
	T6	T6R1	26	15	20
	T7	T7R1	28	5	10
	T8	T8R1	28	10	10
	T9	T9R1	28	15	10
	T10	T10R1	28	5	20
	T11	T11R1	28	10	20
	T12	T12R1	28	15	20
	T13	T13R1	Condiciones normales		

			T (°C)	D (min)	P (min)
R2	T1	T1R2	26	5	10
	T2	T2R2	26	10	10
	T3	T3R2	26	15	10
	T4	T4R2	26	5	20
	T5	T5R2	26	10	20
	T6	T6R2	26	15	20
	T7	T7R2	28	5	10
	T8	T8R2	28	10	10
	T9	T9R2	28	15	10
	T10	T10R2	28	5	20
	T11	T11R2	28	10	20
	T12	T12R2	28	15	20
	T13	T13R2	Condiciones normales		

			T (°C)	D (min)	P (min)
R3	T1	T1R3	26	5	10
	T2	T2R3	26	10	10
	T3	T3R3	26	15	10
	T4	T4R3	26	5	20
	T5	T5R3	26	10	20
	T6	T6R3	26	15	20
	T7	T7R3	28	5	10
	T8	T8R3	28	10	10
	T9	T9R3	28	15	10
	T10	T10R3	28	5	20
	T11	T11R3	28	10	20
	T12	T12R3	28	15	20
	T13	T13R3	Condiciones normales		

2.4.7 Esquema Gráfico de Tratamientos y Repeticiones

Cuadro 2.3 Distribución de tratamientos y repeticiones en las incubadoras

	REPETICIONES		
	I	II	III
T	T2	T5	T13
R	T7	T11	T1
A	T12	T1	T8
T	T1	T13	T10
A	T5	T4	T2
M	T11	T9	T9
I	T3	T6	T3
E	T9	T12	T7
N	T6	T2	T6
T	T4	T7	T11
O	T10	T3	T5
S	T8	T10	T12
	T13	T8	T4

Para determinar valores de variancia y reportarlos estadísticamente se realizó el Análisis de Varianza ADEVA.

Cuadro 2.4 Fuentes de variación del ADEVA y sus respectivos grados de libertad.

Fuente de Variación	Grados de libertad
TOTAL	38
TRATAMIENTOS	12
TEMPERATURA (T)	1
DURACIÓN (D)	2
POSTFERTILIZACIÓN (P)	1
TD	2
TP	1
DP	2
TDP	1
ADICIONAL O CONTROL	1
FACTORIAL vs ADICIONAL	1
REPETICIONES	2
ERROR EXPERIMENTAL	24

2.5 Análisis Funcional y Pruebas de Significancia

El error experimental se calculó mediante el coeficiente de variación (CV) expresado en porcentaje (%.) e indica la variabilidad del experimento. Para identificar y determinar cuál o cuáles son los mejores y peores tratamientos o tienen una alta y baja respuesta estadística se aplicó la prueba de Tukey al 1% y 5%.

2.6 Procedimientos

2.6.1 Materiales de campo

- Agua
- Balanceado de truchas N° 0, N° 1, N° 2 línea BIOMIX
- Bandejas
- Botas de caucho
- Canastillas de incubadora con tapa
- Cedazos
- Cepillos
- Coches de transportación
- Escobas
- Esmalte
- Etiquetas de madera
- Fundas plásticas quintaleras
- Guantes de caucho
- Hoja de registro de mortalidad
- Hoja de registro de parámetros (temperatura, oxígeno disuelto y pH)
- Incubadora Horizontal
- Mangueras
- Manteles
- Montacargas
- Nasas o redes
- Paleta contadora de ovas
- Pedazos de madera de 10 cm x 12 cm

- Piedras difusora de oxígeno
- Pipetas de extracción de ovas
- Recipientes plásticos
- Red de Arrastre
- Sonda de viacrisis
- Soporte de extracción de ovas
- Tanques de oxígeno
- Tina de transportación de reproductores
- Tinajas de alevinaje
- Truchas reproductores machos y hembras

2.6.2 Reactivos de campo

- Esencia de clavo de olor (eugenol)
- Desinfectante OSVAN (cloruro de belzankonium)
- Sal
- Solución isotónica (agua y sal)

2.6.3 Equipos de campo

- Balanza de 5 Kg.
- Balanza analítica METTLER PM100
- Calibrador MITUTOYO
- Equipo de baño maría ADVANTEC LD-270 WATER BATH
- Ictiómetro
- Oxímetro
- pH-metro
- Timer o cronómetro
- Termómetro

2.6.4 Materiales de laboratorio

- Balón Kjeldahl
- Bandejas plásticas
- Cajas Petri
- Capilares de vidrio

- Cápsula de porcelana
- Desecador
- Fundas Ziploc
- Fundas plásticas
- Guantes quirúrgicos
- Mandil de laboratorio
- Materiales de disección
- Matracas de 250 y 500 mL.
- Mechero Bunsen
- Papel filtro 1.12 m.m.
- Papel aluminio
- Peras de succión
- Pinzas
- Pipetas
- Porta y cubreobjetos
- Tijeras
- Toallas absorbentes
- Vasos de precipitación de 50, 100 mL.

2.6.5 Equipos de laboratorio

- Balanza analítica METTLER PM100
- Balanza con lámpara infrarrojo
- Estereoscopio NIKON SMZ-10
- Microscopio de luz NIKON OPTIHOT-2
- Mufra
- Refrigerador

2.6.6 Reactivos de laboratorio

- Aceite de inmersión
- Acido Sulfúrico (H₂SO₄ 0,1 N)
- Colorante Sanguíneo Wright
- Hidróxido de Sodio (NaOH 45% y 0,1 N)
- Metanol

- Peróxido de hidrógeno
- Rojo de metilo
- Sulfato Cúprico (CuSO₄)
- Sulfato de Potasio (K₂SO₄)

2.6.7 Insumos de oficina

- Cámara fotográfica digital SONY MPEG MOVIE VX, 5.1 MP.
- Cámara fotográfica digital SONY Cybershot 7,2 MP.
- Calculadora
- CD-R y CD-RW
- Computadora
- Esferos, Lápices, Marcadores
- Fotocopiadora
- Flash Memory Corsair 512 Mb
- Hojas de papel bond
- Impresora
- Libreta de apuntes
- Libros de consulta
- Pliego de cartulina
- Plástico

2.6.8 Procedimientos y Protocolos

2.6.8.1 Identificación del Experimento y de tratamientos

Para la rotulación del experimento se utilizó un cartel emplastado de 1 m x 1,20 m, que fue ubicado tanto en el CENIAC como en el IASA I. El rótulo contó de la información necesaria para la identificación de la investigación como: nombre de las instituciones participantes, título de la tesis, nombre del investigador, nombre del director, nombre del tutor y año de realización de la tesis. Los tratamientos se rotularon con pequeños pedazos de madera de 10

cm. x 12 cm., estos se colocaron en cada una de las canastillas de incubación que contendrán a los diferentes tratamientos.

2.6.8.2 Análisis del agua

Para medir la temperatura del agua se tomaron diariamente tres muestras de agua, en la mañana (07:00 a.m.), en la tarde (14:00 p.m.) y en la noche (18:30 p.m.), estas temperaturas se registraron a diario en las hojas de registro de parámetros. El potencial hidrógeno pH se midió una vez por semana en un inicio con las bandas indicadoras del pH y luego usando un pH-metro. El oxígeno disuelto se evaluó con un oxímetro esto se realizó una vez al día.

2.6.8.3 Preparación de la sala de incubación

Las incubadoras (1.00 m x 1.80 m), las canastillas (45 cm x 45 cm) y las tapas fueron lavadas, retirando la suciedad adherida para evitar algún tipo de contaminación, se empleó un desinfectante no tóxico como es el OSVAN cuyo principio activo es el cloruro de belzankonium. También se limpiaron los pisos, recipientes plásticos y el pediluvio ubicado en la entrada de la sala de incubación el mismo que se utilizó para desinfectar el calzado al ingresar a esta área.

2.6.8.4 Preparación de materiales para shock térmico

Se calibró el equipo de baño maría ADVANTEC LD-270 WATER BATH para estabilizar la temperatura requerida para la aplicación de los choques térmicos. Para evitar la falta de oxígeno dentro del equipo se adaptó un oxigenador a un motor de acuario utilizando una sonda de viacrisis (suero) con esto se garantiza la regulación de la fuerza de las burbujas de oxígeno en el agua.

2.6.8.5 Diagnósis de la madurez sexual de reproductores

De los estanques D2, D3 y D4 se procedió a verificar el estado de madurez sexual de las truchas hembras presionando suavemente el abdomen para comprobar la existencia de ovas maduras. En este caso la región ventral se encontró distendida y relajada incluso las ovas se desprendieron con facilidad. Los machos adultos por lo general se mantienen en estado maduro durante toda la época (Imaki, 2003).

2.6.8.6 Transporte de reproductores

Los ejemplares seleccionados fueron separados del estanque y llevados hacia la sala de desove con la ayuda de un montacargas. Se transportaron en tinas plásticas con suficiente cantidad de agua. Cuidadosamente se depositaron las truchas adultas en la piscina adjunta a la sala de desove para sacarlos a medida que se los fue necesitando.

2.6.8.7 Disminución de la excitación nerviosa

Para evitar el estrés de los reproductores que puede ocasionar lesiones e incluso la muerte se procedió a anestésarlos usando aceite de clavo (eugenol) que no afecta al animal ni al personal que lo manipula con una concentración de 100 ppm, éste sedante se colocó en una tina plástica con suficiente cantidad de agua, además con piedras difusoras de oxígeno para que los peces puedan respirar durante todo el proceso de desove hasta su recuperación.

2.6.8.8 Preparación de la sala de desove

Antes de iniciar con la extracción de los gametos sexuales se preparó una solución isotónica compuesta por agua y sal en una concentración de 1,01% que equivale a 10 g de NaCl por cada litro de agua, para conservar y lavar las ovas extraídas. Se emplearon materiales limpios y previamente

desinfectados como son manteles, recipientes plásticos y de aluminio y malla de recolección de ovas.

2.6.8.9 Desove

Para efectuar el desove se tomó por la parte caudal a una trucha hembra previamente anestesiada secándose con una toalla limpia, dando prioridad a la región ventral. Enseguida se colocó sobre el soporte de extracción de ovas manteniendo su cuerpo en posición inclinada arqueando el tronco hacia atrás, se eliminaron los excrementos para evitar cualquier contaminación que afecte a los gametos y se masajeó suavemente el abdomen con movimientos repetitivos de arriba hacia abajo. De esta forma las ovas caen y se depositan en la malla recolectora, éste procedimiento es conocido como método unipersonal. De inmediato las ovas son lavadas con la solución isotónica para eliminar algún tipo de impureza que puedan afectar a la fecundación (Imaki, 2003).

Para los reproductores machos el procedimiento es similar ya que para obtener su semen se presionó suavemente su abdomen y de manera repetitiva, el material seminal se recogió en una caja petri.

2.6.8.10 Toma de datos de reproductores

Antes de ser devueltos los padrotes hacia sus respectivos estanques se procedió a pesarlos y medirlos utilizándose una balanza de 5 Kg. y un ictiómetro de fabricación manual respectivamente. En el caso de las hembras el peso promedio fue 2462 ± 20 g y la longitud promedio $53,83 \pm 8$ cm.; en los machos fue de $2011,67 \pm 22$ g y $53,67 \pm 6,3$ cm.

2.6.8.11 Análisis de la calidad de las células sexuales

Los espermatozoides se encuentran inactivos dentro del material seminal y para observar la motilidad y garantizar la fecundación se tomó una pequeña cantidad de semen depositándolo en un portaobjeto con una pipeta se

aplicó una gota de agua dulce esto permite que los espermatozoides se activen de inmediato, la observación se realizó con un microscopio NIKON OPTIHOT-2 (Imaki, 2003).

La calidad de las ovas se observó a simple vista y está en función al grado de madurez que los gametos presentan. Las ovas sobre maduras contienen una vesícula liposa en forma de gotitas de aceite agrupadas en la parte superior y su fecundidad es escasa o nula, en este caso las ovas fueron inmediatamente desechadas, mientras que las ovas que se encuentran en plena madurez presentaron un color naranja, traslúcido y su contenido homogéneo (Owaga, 1992).

2.6.8.12 conteo de ovas

Para manejar las unidades experimentales con un número aproximado de 1000 ovas se realizó un conteo volumétrico. Para ello se tomaron 1000 ovas que se depositaron en un vaso de precipitación dando un volumen de 75 mL.. Conocido éste dato se pudo distribuir porciones iguales para la aplicación de los tratamientos.

2.6.8.13 Fecundación artificial

Se recolectaron aproximadamente 3088 gramos de ovas que corresponden alrededor de 39000 ovas de 12 hembras las cuales fueron fertilizadas con el semen de 6 machos. El método utilizado para realizar la fecundación artificial es el método seco para lo cual las unidades experimentales representadas por 1000 ovas previamente lavadas se colocaron en un recipiente plástico con solución isotónica, a continuación se roció una suficiente cantidad de semen mezclándose uniformemente. El proceso de fecundación se inicia al poner en contacto los gametos con el agua dulce. Al cabo de un minuto se cambió el agua repetidamente para eliminar los desechos.

2.6.8.14 Aplicación de choques térmicos

Las ovas fecundadas fueron sometidas a la inducción de triploidía mediante la aplicación de los choques térmicos por baño termostático usando un equipo de baño maría ADVANTEC LD-270 WATER BATH. Se tomó en cuenta tres factores importantes como son temperatura, tiempo de duración y tiempo de inicio del choque. Los shocks térmicos se aplicaron por inmersión de las ovas a baño maría y mantenidas a temperaturas y tiempos experimentales ya definidos en la descripción de tratamientos. Se realizaron tres réplicas para cada tratamiento de esta manera se garantizó la certeza de los resultados finales (Dillon, 1988).

2.6.8.15 Incubación

Las ovas sometidas a los diferentes tratamientos fueron inmediatamente llevadas con la ayuda de un cedazo hasta las canastillas de incubación previamente identificadas, para ser depositadas suavemente evitando los movimientos bruscos y sobre todo sin presencia de la luz puesto que en esta etapa las ovas son muy sensibles a estos factores.

La incubación se realizó a temperaturas entre 8-9°C, oxigenación a saturación (> 5.4 ppm) y caudal de 0.320 L x s⁻¹ (Dillon, 1988; Imaki, 2003).

2.6.8.16 Pesaje y medición de ovas

De cada canastilla se tomó una muestra de ovas, éstas son depositadas en cajas petri y conducidas al laboratorio para su pesaje con una balanza analítica METTLER PM100, la medición se lleva a cabo con un calibrador MITUTOYO para calcular su diámetro expresado en mm.

2.6.8.17 Estudio de embriogénesis

Se realizó un estudio gradual de la embriogénesis, desde el momento de la fecundación, para conocer los diferentes estadios de la ova fecundada y el tiempo en el que ocurre cada cambio. Para esto se tomó muestras de las

incubadoras en un inicio a cada hora y luego una vez por semana, colocándose en cajas petri identificadas para ser llevadas al Laboratorio de Biotecnología. La observación de las ovas se realizó con un estereoscopio marca NIKON SMZ-10, con el lente 10XA/24, las fotografías fueron tomadas con una cámara SONY MPEG MOVIE VX, 5.1 MP.

2.6.8.18 Selección de ovas

Luego de la aplicación de los choques térmicos, se esperó 3 días para empezar la eliminación de las ovas muertas y así evitar la proliferación de hongos, este procedimiento se lo realizó en cada incubadora, los datos de mortalidad fueron recogidos a diario en la hoja de registros (Imaki, 2003).

2.6.8.19 Preparación del Laboratorio de Biotecnología

El Laboratorio de Biotecnología está equipado con tinas de alevinaje (80 x 60 x 60) cm, dispuestas en dos columnas. Cada una de ellas cuenta con un suministro de agua propio y filtros para evitar la acumulación de impurezas como hojas, insectos etc. Las tinas fueron lavadas y desinfectadas con OSVAN, la temperatura promedio del agua fue de 9°C, pH de 6,5 y oxígeno disuelto de 6,26 mg/l.

2.6.8.20 Alevinaje

Las ovas embrionadas se trasladaron a las tinas de alevinaje mediante sifoneo con una manguera. Cuando el saco vitelino del alevín se reabsorbió casi en su totalidad se inició la alimentación, de lo contrario los animales adelgazan y mueren por desnutrición. La frecuencia de alimentación fue de 8-10 veces por día sin tener en cuenta el desperdicio y la cantidad se dispuso según la tabla de alimentación propuesta por [Leitritz y Lewis \(1980\)](#). El alimento proporcionado es de la línea BIOMIX, iniciando con el pellet granulado N° 1 y a medida que van creciendo se administra el alimento N° 2 y N° 3 respectivamente.

2.6.8.21 Análisis de comportamiento y reflejos

El mejor indicador de salud de los alevines es su comportamiento y reflejos pues dan una idea de su vivacidad y energía. Espontáneamente se pasó la mano sobre las tinajas, en este caso los alevines deben huir inmediatamente.

Se tomó una muestra representativa de cada tratamiento y se lo depositó en un vaso de precipitación de esta forma observamos su comportamiento y su movimiento de seguimiento hacia los dedos.

2.6.8.22 Traslado de alevines

Luego de dos meses de eclosión se procedió al traslado de 5000 alevines desde el Centro de Investigaciones Acuícolas Papallacta hasta los estanques de Pailones perteneciente a la Hacienda El Prado (IASA) para continuar su desarrollo del primer alevinaje. El sistema de transporte de alevines fue a través de fundas plásticas gruesas de 70 cm. x 100 cm. con 15 litros de agua. En cada funda se trasladó un tratamiento diferente con 200 animales de muestra, cabe recalcar que a los alevines se les suspendió el alimento 24 horas antes para limpiar su sistema digestivo (Imaki, 2003).

Al llegar al IASA las fundas fueron colocadas en los estanques sin abrirlas, para nivelar la temperatura del agua, de esta manera los animales no se estresan por el cambio brusco de temperatura. Cada división de los estanques tiene una dimensión de 1 x 1 x 1 m. En este espacio los alevines permanecieron hasta su análisis de ploidía.

2.6.8.23 Medición de parámetros morfométricos

Los alevines fueron pesados y medidos cada quince días a partir de su reabsorción y consumo de alimento, se utilizó una balanza analítica METTLER PM100 y un calibrador, con los datos obtenidos se procedió a calcular los parámetros morfométricos como peso, longitud, conversión alimenticia y eficiencia del alimento.

2.6.8.24 Obtención de muestras para la determinación de triploidía

Se tomó una muestra representativa de cada tratamiento (8 alevines) usando el criterio de la fórmula epidemiológica para el manejo de muestras $2\sqrt{n}$, donde n es el número total de individuos. Los animales se transportaron en fundas plásticas pequeñas con suficiente cantidad de agua y fueron llevados al laboratorio de Acuicultura del IASA para realizar la extracción de sangre.

2.6.8.25 Preparación de placas de frotis sanguíneos

Se secó cuidadosamente la superficie del pez y se cortó el pedúnculo caudal en la región posterior a las aletas adiposa y anal respectivamente. La sangre que brota fue recogida en un capilar, se depositó una gota sobre un portaobjetos limpio y libre de grasa a una distancia de 1,5 cm de la parte terminal. Con un cubreobjeto manteniendo un ángulo de 45° se procedió a preparar un frotis delgado mediante un movimiento suave y cuidadoso que extiende la gota de sangre fresca sobre la superficie del portaobjeto. Se identificó cada placa con el número de tratamiento, repetición y fecha, se cubrió con cinta adhesiva para proteger la información. Una vez seco el frotis se adicionó suficiente cantidad de metanol sobre las placas para fijar la muestra, se dejó secar al ambiente y se adicionó gotas de peróxido de hidrógeno por 10 seg. Finalmente se realizó la tinción de las placas usando colorante sanguíneo Wright por 10 minutos, al cabo de este tiempo se secaron y se almacenaron en un lugar oscuro para su observación (Conroy, *et al.*, 1987).

2.6.8.26 Medición de volumen nuclear eritrocitario

Con el lente de 100x se observaron los frotis sanguíneos para medir los eritrocitos con un micrómetro, se registraron dos medidas el diámetro del eje mayor y el eje menor, el núcleo presenta una forma esferoide. La fórmula propuesta para conocer el volumen promedio de los núcleos para esta especie es $V = \frac{4}{3} \pi ab^2$ donde: a=eje mayor; b= eje menor. Se fotografiaron los

eritrocitos medidos con una cámara SONY Cybershot 7.1 MP (Pineda *et al.*, 2003).

2.6.8.27 Análisis Bromatológico del Alimento BIOMIX

Se procedió a realizar el análisis bromatológico de los alimentos iniciadores N° 1 y N° 2 de la línea BIOMIX. La formulación del balanceado consta de ingredientes como Harina de pescado, aceites marinos, harinas vegetales, premezclas vitamínicas y minerales, antioxidantes y antimicóticos.

2.6.8.28 Humedad: Método Balanza Lámpara Infrarrojo

Se tomaron 5 gramos de alimento y se colocó en la balanza con lámpara infrarrojo, al cabo de 10 minutos tiempo en el cual alcanza una temperatura de 95°C se evaporó la humedad contenida en la muestra, el resultado es expresado en % de humedad.

2.6.8.29 Ceniza

Se calentó la cápsula de porcelana en la mufla a 600°C por 30 minutos, luego se enfrió en el desecador. 1 g de muestra fue colocada en la cápsula e inmediatamente llevada al interior de la mufla por 5 horas a 600°C. Una vez transcurrido este tiempo se llevan las cápsulas hacia el desecador y se pesan.

Cálculo

$$\% \text{Ceniza} = \frac{((Pc + \text{ceniza}) - (Pcv))}{Pm} \times 100$$

Pc = Peso crisol

Pcv = Peso crisol vacío

Pm = Peso muestra

2.6.8.30 Proteína

1 g de muestra se transfirió al balón Kjeldahl con 3 g de catalizador (CuSO₄ + K₂SO₄ 1:9). Se agregó 15 mL. de H₂SO₄ concentrado. El balón

fue colocado en forma inclinada en la hornilla del aparato Kjeldahl por aproximadamente 2 horas hasta que la solución tomó un color verde brillante. Una vez retomada la temperatura ambiente, se añadió 130 mL. de agua destilada.

Para la destilación, se agregó al balón 1 mL. de H₂SO₄ concentrado, 10 mL. de NaOH al 45% y se conectó el balón Kjeldahl al condensador mediante una ampolla de destilación a fuego alto. En el extremo de salida del condensador se colocó un matraz conteniendo 10 mL. de H₂SO₄ 0,1 N con 3 gotas de rojo de metilo, se tapó el matraz con papel aluminio para evitar la emanación de gases. Una vez iniciada la condensación se dejó la destilación 15 minutos para titular el contenido del matraz con una solución de NaOH 0,1 N. Se realizó una muestra blanco (Niwa *et al.*, 1997).

Cálculo

$$\% \text{ Proteína} = \frac{(mlB - mlM)N \times 1.4 \times 6.25}{Pm}$$

B = Blanco

M = Muestra

Pm = Peso muestra

N= 0.0895695

Proteína de carne = 6.25

2.7 Análisis de variables

2.7.1 Mortalidad de ovas luego de la aplicación del choque térmico

Expresado en número y porcentaje, los datos se obtuvieron a través de las Hojas de Registro de Mortalidad a los tres días de aplicación de los choques térmicos.

2.7.2 Mortalidad de ovas hasta la eclosión

Se llevó a diario el registro de mortalidad de las ovas en cada una de las incubadoras que contenía cada tratamiento, desde el inicio de la

fecundación, su posterior embrionamiento hasta la eclosión de los alevines. Los resultados son expresados en número y porcentaje.

2.7.3 Supervivencia de los alevines

Al finalizar el periodo embrionario se realizó el cálculo de alevines supervivientes de este proceso así como también su supervivencia en el laboratorio bajo condiciones controladas. Los resultados son expresados en número y porcentaje.

2.7.4 Análisis de triploidía

La determinación de triploidía se llevó a cabo por la medición de los núcleos de los eritrocitos, los datos obtenidos son diámetro y volumen, expresados en μm y μm^3 respectivamente. También se demostró el éxito de cada tratamiento en cuanto a la inducción de triploidía de los individuos expresado en porcentaje.

2.7.5 Parámetros morfométricos

Se pesaron y midieron a los alevines cada quince días para registrar su crecimiento los datos son expresados en g y cm. respectivamente.

2.7.6 Conversión Alimenticia y Eficiencia alimenticia

Los datos de peso y longitud de los alevines así como la cantidad de alimento fueron utilizados para calcular la conversión alimenticia indicando la relación existente entre la cantidad de balanceado suministrado y el aumento de peso corporal. El resultado se expresa en un factor de conversión. La eficacia del alimento es expresado en porcentaje y es representado por el inverso del factor.

$$\text{FC} = \text{Cantidad de alimento suministrado} / \text{Aumento de peso corporal}$$

III. RESULTADOS

3.1 Análisis de embriogénesis de la trucha arco iris

Los huevos de *Oncorhynchus mykiss* son de forma esférica, con un peso medio de $0,079 \text{ g} \pm 0,007 \text{ g}$ y $5.3 \text{ mm.} \pm 0,4 \text{ mm.}$ de diámetro. Su color es naranja claro, translúcido. Está formado por una membrana externa llamada corión, citoplasma en donde se aprecia una gota oleosa en su interior y el núcleo. Una vez fecundados los huevos inician su división celular. A las 6 horas se observa una acumulación del material vitelino en un extremo de la ova fecundada. Todo el material que se encontraba en un inicio diseminado forma un solo cúmulo de reserva alimenticia (Figura 3.1).

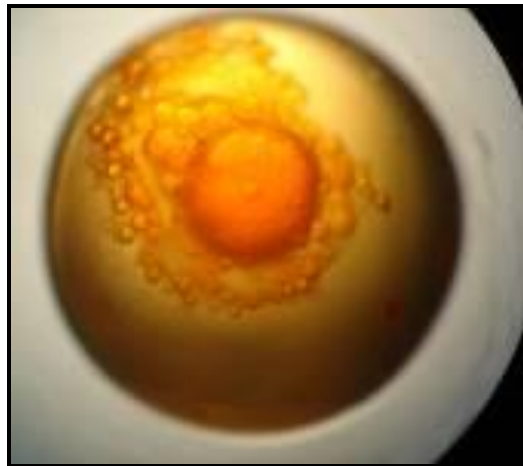


Figura 3.1 Huevo fertilizado de trucha arco iris trascurrido 6 horas

CENIAC-Papallacta, 2008

A las 24 horas se aprecia el inicio de la mórula, la segmentación es más nítida cerca del polo animal y difusa hacia el lado contrario. Se puede distinguir dos regiones una formada por una gran cantidad de células pequeñas y otra donde las células grandes se encuentran en menor número (Figura 3.2).



Figura 3.2 Huevo fertilizado de trucha arco iris en fase de mórula trascurridas 24 horas CENIAC-Papallacta, 2008

Transcurridas 48 horas se da la formación de la blástula, en donde a pesar de aumenta el número de células el tamaño del huevo fecundado sigue siendo el mismo, éstas células se empiezan a disponer de tal manera que queda en su interior una cavidad llamada blastocele. (Figura 3.3).

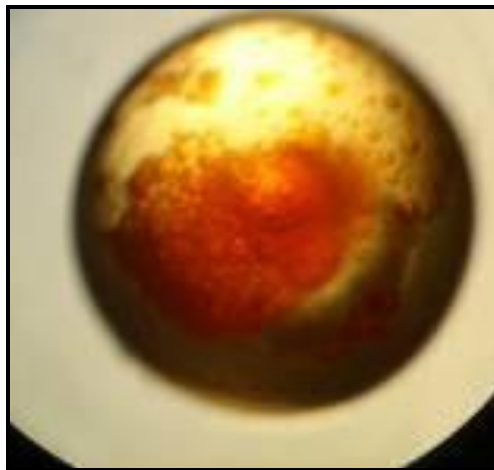


Figura 3.3 Huevo fertilizado de trucha arco iris en fase de blástula trascurridas 48 horas. CENIAC-Papallacta, 2008

La gástrula inicia a partir de los 8 días, durante este proceso se evidencia el engrosamiento del escudo embrional por lo tanto se puede apreciar un ligero aumento en el tamaño de la ova (Figura 3.4). El escudo embrional es una masa de células en forma de campana que prolifera hacia dentro desde el margen del blastodisco, formando el eje del embrión. Adicionalmente, se hace evidente una pigmentación puntiforme y uniforme sobre el vitelo (Bustos, *et al.*, 2005).

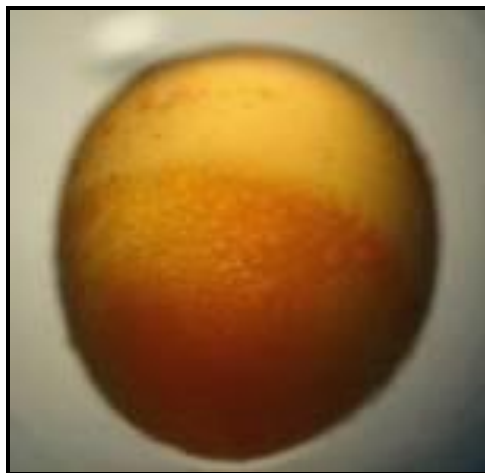


Figura 3.4 Huevo fertilizado de trucha arco iris en fase de gástrula trascurrido 8 días. CENIAC-Papallacta, 2008

Alrededor de los 15 días se inicia la formación de la neurula (Figura 3.5), esta fase se llama así debido a que se inicia la formación del sistema nervioso (Idrovo, 2008; *Com. personal*). Se aprecia un esbozo de embrión ubicado a lo largo de la ova, se nota claramente la presencia de tres partes, una cefálica, una torácica y una caudal siendo esta última la más larga.

Todo el material nutritivo se encuentra alrededor de todo el embrión, aún no se puede distinguir un vitelo definido.



Figura 3.5 Huevo fertilizado de trucha arco iris en fase de neurula trascurrido 15 días. CENIAC-Papallacta, 2008

A partir de los 20 días se aprecia la formación del embrión completo (Figura 3.6), este periodo se denomina oculación o fase de ojos visibles, tiempo en el cual se hace más resistente a los choques y vibraciones, es por esta razón que su traslado hacia los criaderos se realiza durante este estado. La región cefálica está más desarrollada y los ojos ocupan la mayor parte de su espacio.



Figura 3.6 Huevo embrionado de trucha arco iris trascurrido 20 días. CENIAC-Papallacta, 2008

La oculación completa ocurre a los 23 días a partir de la fecundación en todos los tratamientos a una temperatura media de 8°C tomada tres veces al día (08:00 a.m., 14:00 p.m., 18:00 p.m), durante este periodo se confirma claramente la presencia de dos puntos negruzcos que corresponden a los ojos del embrión (Imaki, 2003). Se observa claramente los latidos cardiacos, formación de las branquias y movimientos constantes del embrión.

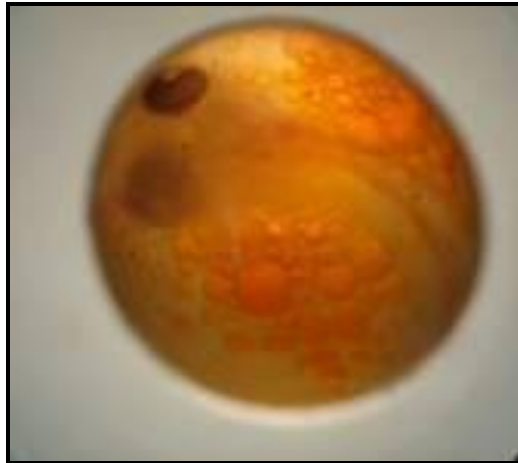


Figura 3.7 Huevo embrionado de trucha arco iris trascurrido 23 días.

CENIAC-Papallacta, 2008

A los 34 días el embrión empieza a pigmentarse iniciando por la cabeza en los primeros días hasta la región caudal, se nota un mayor desarrollo de los arcos branquiales y formación de aletas (Figura 3.8).



Figura 3.8 Huevo embrionado de trucha arco iris trascurrido 34 días.

CENIAC-Papallacta, 2008

A los 38 días el embrión ocupa todo el espacio de la ova, se observa la formación de la pupila del ojo, aumento en la pigmentación cefálica, mayor desarrollo de los vasos sanguíneos y un movimiento más resuelto de las branquias (Figura 3.9).

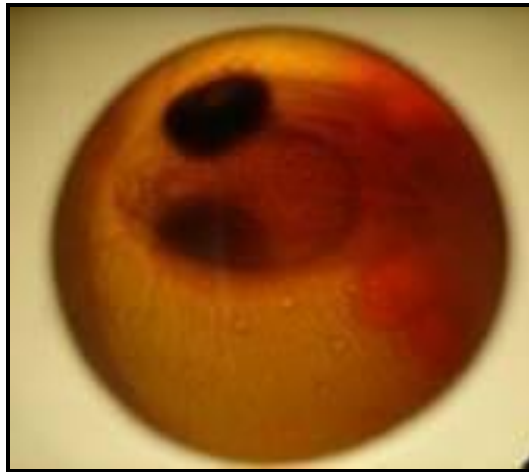


Figura 3.9 Huevo embrionado de trucha arco iris trascurrido 38 días.

CENIAC-Papallacta, 2008

Cuando el embrión tiene 40 días desde su fecundación apenas puede mantenerse rodeado por el corión, su movimiento corporal es más rápido y empieza a buscar una zona sensible de la membrana para poder salir a su nuevo entorno que es el agua (Figura 3.10).



Figura 3.10 Huevo embrionado de trucha arco iris trascurrido 40 días.

CENIAC-Papallacta, 2008

La eclosión ocurrió a los 40 días (Figura 3.11), a una temperatura media del agua de 8°C, 6.8 mg/l de oxígeno disuelto y pH 6.5, la acumulación de temperatura fue de 320 °C obtenida de la multiplicación de la temperatura media del agua por el número de días requeridos para la incubación (8°C x 40 días= 320°C). Lentamente el alevín se abre paso moviendo constantemente su cabeza hasta romper la membrana, el alevín está provisto del saco vitelino.



Figura 3.11 Alevín de trucha arco iris eclosionando de su corion trascurrido 40 días.

CENIAC-Papallacta, 2008

Los alevines inmediatamente después de su nacimiento tuvieron un peso aproximado de 0,09 g \pm 0,016 g y una longitud de 14 mm \pm 0,17 mm, poseen un saco vitelino adherido el cual contiene una especie de yema de alto valor nutricional el mismo que se reabsorberá aproximadamente en 18 días.



Figura 3.12 Alevín de trucha arco iris eclosionado y con el saco vitelino adherido a su cuerpo.

CENIAC-Papallacta, 2008

3.2 Mortalidad de las ovas luego de la aplicación del choque térmico

Se retiraron las ovas muertas a los tres días de la aplicación de los choques térmicos, esto demuestra el impacto de cada tratamiento sobre ellas, el tratamiento más fuerte correspondió al choque con 28°C, 15 minutos de duración y 20 minutos postfertilización, cuya nomenclatura es T2D3P2 o T12 (Tabla 3.1).

Tabla 3. 1 Mortalidad expresada en % de ovas fertilizadas de trucha arco iris por incubadora al evaluar el efecto de T, P y D.

CENIAC-Papallacta, 2008

TRATAMIENTO		I	II	III	PROMEDIO TRATAMIENTO
T1	T1D1P1	3,8	2,9	2,2	2,97
T2	T1D2P1	3,7	2	2,7	2,8
T3	T1D3P1	2,4	3,6	3,8	3,27
T4	T1D1P2	2,1	4,4	3,7	3,4
T5	T1D2P2	9,3	9,3	12	10,2
T6	T1D3P2	8,5	10,2	9,4	9,37
T7	T2D1P1	7,8	9,7	6,8	8,1
T8	T2D2P1	10,1	9,4	11,5	10,33
T9	T2D3P1	12,5	11,2	10,4	11,37
T10	T2D1P2	6,5	9,8	7,8	8,03
T11	T2D2P2	10,6	13	11,4	11,67
T12	T2D3P2	16,5	14,5	10,4	13,8
T13	T0D0P0	1,4	1,9	1,2	1,5
	PROMEDIO REPETICIÓN	7,3	7,8	7,2	7,4

En la Figura 3.13 se muestran los porcentajes promedios de la interacción de los factores: temperatura, tiempo de duración y tiempo de postfertilización del choque, se puede observar que a una temperatura de 26°C existe una mortalidad menor que al aplicar la temperatura de 28°C. El mejor tratamiento fue T2 con una mortalidad de 2,8%, mientras que el peor tratamiento fue T13 con el porcentaje de mortalidad más alto, 13,8%. Se nota claramente que la mortalidad en el control es menor (1,5%) debido a que su fecundación se dio en las condiciones normales.

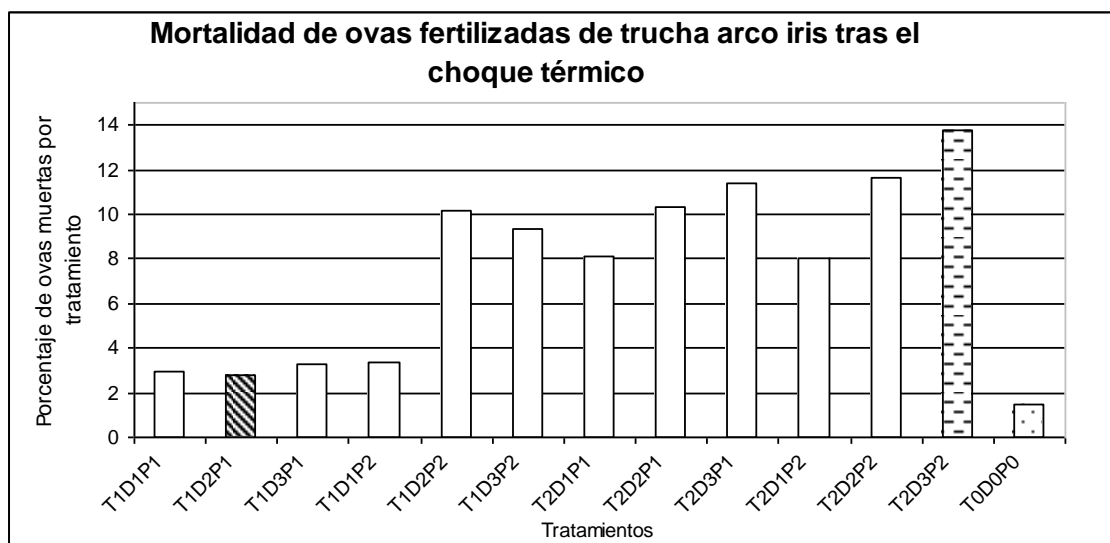


Figura 3.13 Promedio de interacción TDP al evaluar el efecto del choque térmico sobre la mortalidad de las ovas fertilizadas de trucha arco iris.

CENIAC- Papallacta, 2008

*T= Temperatura de choque

*D= Duración de choque

*P= Tiempo postfertilización

En la Tabla 3.2 se evalúa la interacción temperatura y duración del choque TD. Al analizar el factor temperatura, el porcentaje de ovas muertas para 26°C es de 5,7% mientras que para 28°C es de 10,6%. Pineda *et al.*, (2003), afirma que existe una mayor mortalidad al someter las ovas a temperaturas mayores de 28°C puesto que el choque es más fuerte, aunque tiene mayor probabilidades de inducir la triploidía.

Al analizar el factor duración del choque se observa que la mortalidad es mayor conforme aumenta el tiempo de duración del choque. A los 5 minutos el porcentaje es de 5,6%, a los 10 minutos 9,2% y a lo 15 minutos 9,5%. Esto se confirma por el trabajo de Dillon, (1988) en donde a medida que se incrementa el tiempo de duración del choque para la inducción de triploidía existe una mortalidad cada vez más alta.

Tabla 3.2 Tabla auxiliar para la interacción T y D.

CENIAC-Papallacta, 2008

		T		Σ D	PROMEDIO D
		T1	T2		
	D1	19,10	48,40	67,50	5,63
D	D2	44,90	66,00	110,90	9,24
	D3	37,90	75,50	113,40	9,45
	Σ T	101,90	189,90	291,80	
	PROMEDIO T	5,66	10,55		8,11

En la figura 3.14 se muestra el porcentaje de mortalidad de las ovas fertilizadas tomando como referencia a la temperatura del choque, a los 28°C. La mortalidad es significativamente mayor que a los 26°C, siendo aproximadamente una relación 2:1.

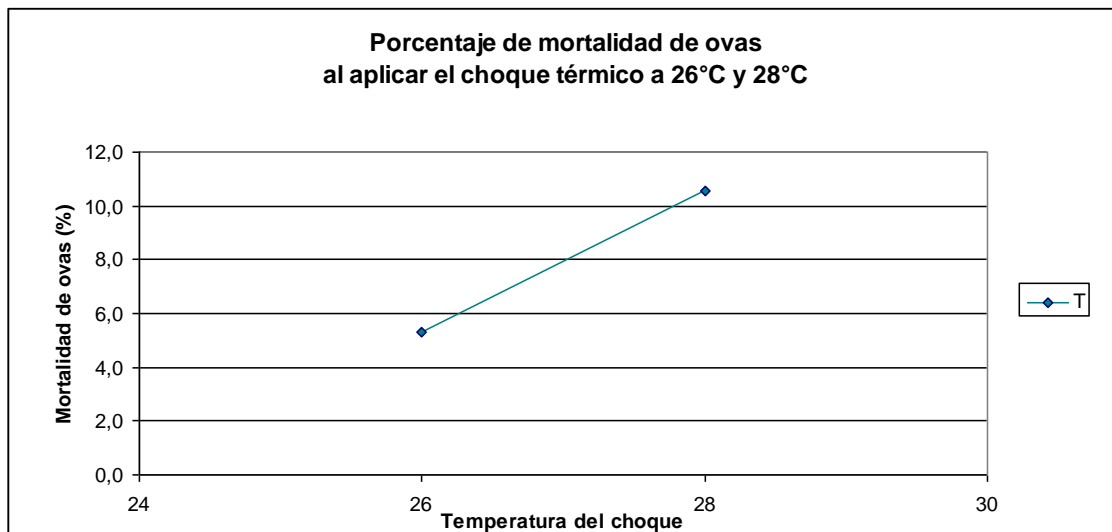


Figura 3.14 Porcentaje de mortalidad de ovas fertilizadas de trucha arco iris al aplicar los choques térmicos a 26°C y 28°C.

CENIAC-Papallacta, 2008

*T= Temperatura de choque

La Figura 3.15, indica la mortalidad de ovas fertilizadas expresadas en porcentaje, al interactuar la temperatura y duración del choque térmico. Se aprecia que tanto para los choques de 26°C como para 28°C la mortalidad es mayor conforme aumenta el tiempo de duración del choque. El tratamiento más agresivo corresponde aquel cuyo choque se efectuó por 15 minutos a 28°C, en tanto el tratamiento con menos porcentaje de mortalidad fue aquel sometido a 26°C por 5 minutos.

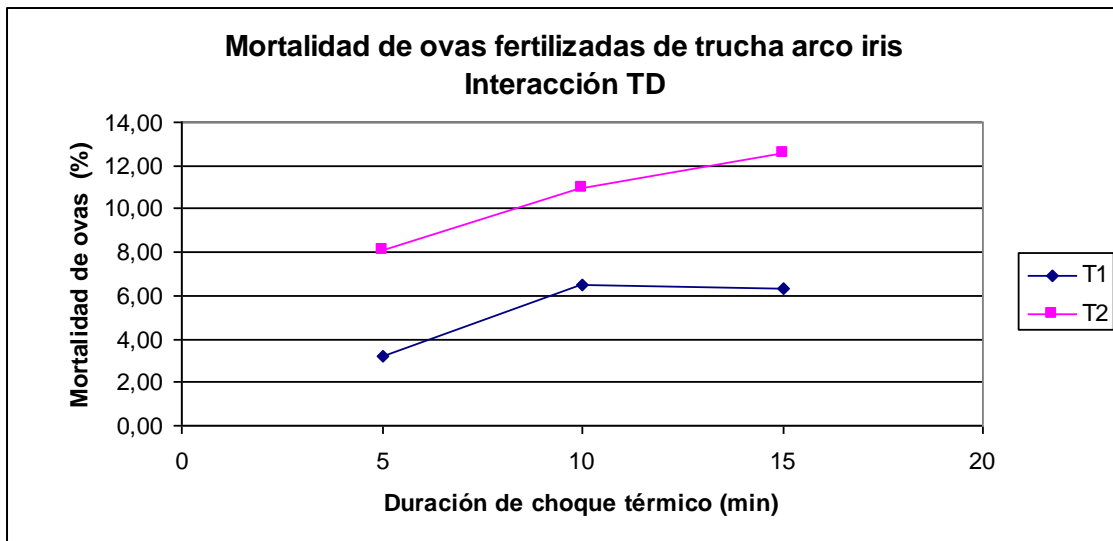


Figura 3.15 Porcentaje de mortalidad de ovas fertilizadas de trucha arco iris al interactuar los factores TD. CENIAC-Papallacta, 2008

*T= Temperatura de choque

*D= Duración de choque

La Tabla 3.3 detalla la interacción entre temperatura y tiempo de inicio de choque o postfertilización. En cuanto a este último factor, existe una mortalidad mayor de las ovas fertilizadas a los 20 minutos con un valor de 9,7% frente al 6,5% que corresponde a los 10 minutos de inicio del choque.

Tabla 3.3 Tabla auxiliar para la interacción T y P.

CENIAC-Papallacta, 2008

		T		ΣP	PROMEDIO P
		T1	T2		
	P1	27,10	89,40	116,50	6,47
P	P2	74,80	100,50	175,30	9,74
	ΣT	101,90	189,90	291,80	
	PROMEDIO T	5,66	10,55		8,11

Al analizar la interacción TP encontramos que el choque a una temperatura de 26°C presenta una diferencia de mortalidades más notoria en relación al tiempo de postfertilización. A los 10 minutos el porcentaje corresponde a 3,01% mientras que a los 20 minutos la mortalidad es de 7,66%. A los 28°C, el tiempo de postfertilización es menos relevante, así, a los 10 minutos el porcentaje es de 9,93% y a los 20 minutos la mortalidad asciende a 11,17% (Figura 3.16).

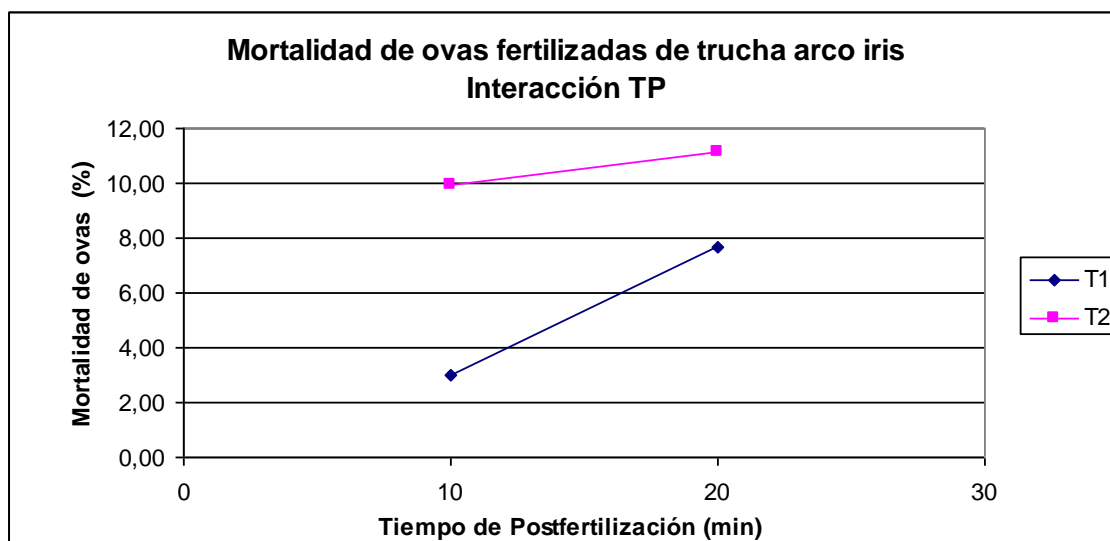


Figura 3.16 Porcentaje de mortalidad de ovas fertilizadas de trucha arco iris al interactuar los factores TP.

CENIAC-Papallacta, 2008

*T= Temperatura de choque

*P= Tiempo postfertilización

En la Tabla 3.4 podemos observar la interacción entre tiempo de duración del choque y el tiempo de postfertilización.

Tabla 3.4 Tabla auxiliar para la interacción D y P.

CENIAC-Papallacta, 2008

		P		Σ D	PROMEDIO D
		P1	P2		
D	D1	33,20	34,30	67,50	5,63
	D2	39,40	71,50	110,90	9,24
	D3	43,90	69,50	113,40	9,45
Σ P		116,50	175,30	291,80	
PROMEDIO P		6,47	9,74		8,11

En la Figura 3.17 se analiza la interacción duración de choque versus tiempo postfertilización. Los choques con una duración de 5 minutos y un tiempo de postfertilización de 10 y 20 minutos, presentan una mortalidad de ovas fertilizadas similares (5,53% y 5,72% respectivamente). A los 10 minutos de duración, el porcentaje de mortalidad para 10 y 20 minutos aumenta y corresponde a 6,57% y 10,93%. A los 15 minutos, la mortalidad para P1 y P2 es de 7,32% y 11,58%, respectivamente.

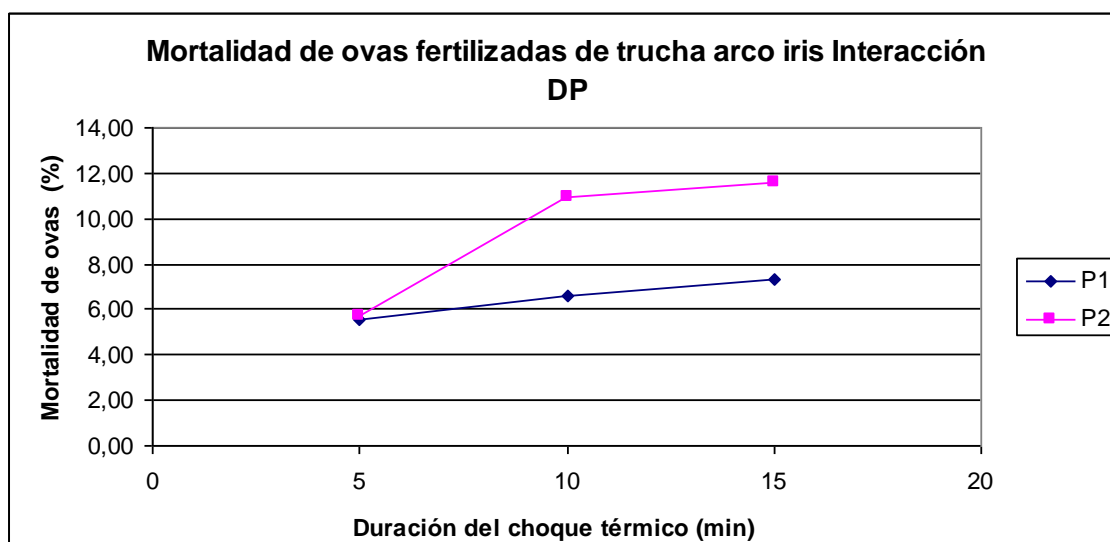


Figura 3.17 Porcentaje de mortalidad de ovas fertilizadas de trucha arco iris al interactuar los factores DP.

CENIAC-Papallacta, 2008

*D= Duración de choque

*P= Tiempo postfertilización

La Figura 3.18, nos muestra la interacción entre el tiempo de duración del choque y el tiempo de inicio postfertilización a 26°C. Se observa que a los 5 minutos de duración del shock, el porcentaje de mortalidad es notablemente menor frente a los 10 y 15 minutos.

A los 10 minutos postfertilización (P1), el porcentaje de mortalidad es menor para 5, 10 y 15 minutos de duración del shock (8,9%, 8,4% y 9,8 %, respectivamente). A los 20 minutos (P2), la mortalidad es mayor para 5, 10 y 15 minutos de duración (10,2%, 36,5% y 28,1%, respectivamente).

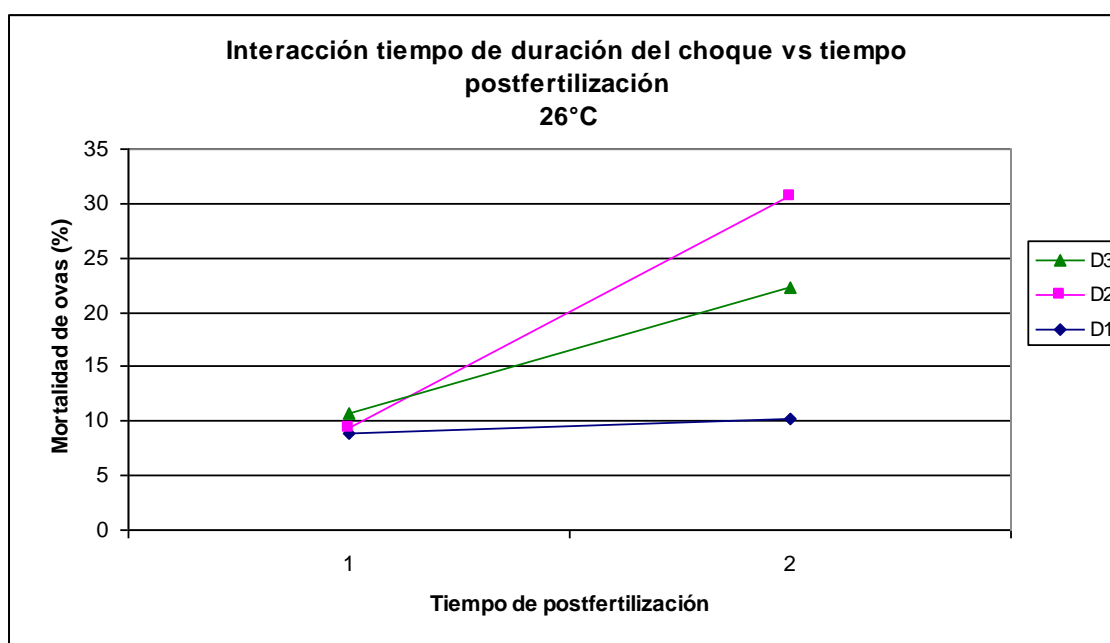


Figura 3.18 Interacción DP a 26°C evaluada sobre el porcentaje de mortalidad de las ovas fertilizadas de trucha arco iris luego del choque térmico.

CENIAC-Papallacta, 2008

*D= Duración de choque

La Figura 3.19, indica la interacción entre el tiempo de duración del choque y el tiempo de inicio postfertilización a 28°C. Se aprecia que a los 5 minutos de duración el porcentaje de mortalidad es menor frente a los 10 y 15 minutos, esto está en contraste con el análisis del tiempo postfertilización en donde no existe una diferencia mayor de mortalidad entre P1 y P2.

Para P1 (10 minutos postfertilización), el porcentaje de mortalidad es similar a los 5, 10 y 15 minutos de duración del shock y corresponde a 24,3%, 31% y 34,1 % respectivamente. Para P2 (20 minutos), la mortalidad es mayor a los 5, 10 y 15 minutos de duración (24,1%, 35% y 41,4% respectivamente).

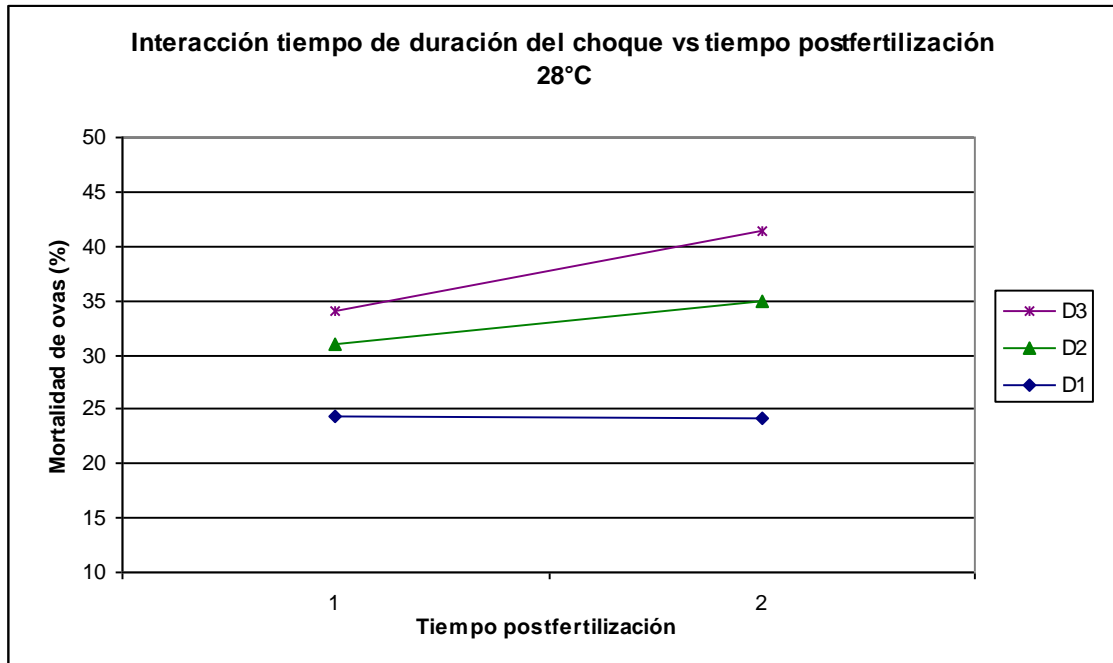


Figura 3.19 Interacción DP a 28°C evaluada sobre el porcentaje de mortalidad de las ovas fertilizadas de trucha arco iris luego del choque térmico.

CENIAC-Papallacta, 2008

*D= Duración de choque

El análisis de varianza para la mortalidad de ovas fertilizadas luego de aplicar los choques térmicos, indica que existe diferencias altamente significativas al $p < 0,01$ para todas las fuentes de variación en tratamientos e interacciones. El grupo control y las repeticiones fueron no significativas al $p > 0,05$. (Tabla 3.5).

Tabla 3.5 Análisis de Varianza para la mortalidad de ovas fertilizadas de trucha arco iris al evaluar el efecto de T, P y D. CENIAC-Papallacta, 2008

FV	GL	SC	CM	Fcal	TABLA		Significancia	
					5%	1%	5%	1%
TOTAL	38	664,32						
TRATAM	12	614,35	51,2	26,24	2,18	3,03	*	**
T	1	244,92	244,92	125,53	4,26	7,82	*	**
D	2	99,55	49,77	25,51	3,4	5,61	*	**
P	1	77,73	77,73	39,84	4,26	7,82	*	**
TD	2	5,18	2,59	1,33	3,4	5,61	*	**
TP	1	26,18	26,18	13,42	4,26	7,82	*	**
DP	2	34,18	17,09	8,76	3,4	5,61	*	**
TDP	1	126,6	126,6	64,89	4,26	7,82	*	**
ADC	1	0,26	0,26	0,13	4,26	7,82	*	**
FvsADC	1	126,34	126,34	64,75	4,26	7,82	*	**
REP	2	3,14	1,57	0,8	3,4	5,61	ns	ns
ERROREXP	24	46,83	1,95					
CV	18,38%							

* = diferencia significativa

** = altamente significativo

ns = no significativo

El coeficiente de variación para el análisis de la mortalidad de las ovas fertilizadas de trucha arco iris al interactuar tres factores TDP es de 18,38%.

3.2.1 Rangos de significancia para las fuentes de variación

Al realizar la prueba de Tukey al 5% para las fuentes de variación (tratamientos, factores T, D y P e interacciones), se formaron tres rangos de significancia, desde el mejor tratamiento hasta el más deficiente.

La Tabla 3.6 muestra al mejor tratamiento, T13 (control), ubicado en primer lugar por su baja mortalidad de las ovas, esto se debe a que no se aplicó ningún choque térmico. El tratamiento T2 (26°C), también se incluye dentro del mejor rango de significancia. El tratamiento T12 (28°C), fue el que

provocó una mayor mortalidad, por lo que se encuentra ubicado en el último rango de significancia.

Tabla 3.6 Rangos de significancia usando la prueba de Tukey al 5% para las fuentes de variación. CENIAC-Papallacta, 2008

TRATAMIENTO	xmedia	RANGOS SIGNIFICANCIA	
T13	1,5	A	
T2	2,8	A	
T1	2,97	A	
T3	3,27	A	
T4	3,4	A	
T10	8,03		B
T7	8,1		B
T6	9,37		B
T5	10,2		C
T8	10,33		C
T9	11,37		C
T11	11,67		C
T12	13,8		C

3.3 Mortalidad de las ovas hasta eclosión

La Tabla 3.7 muestra la mortalidad de las ovas de trucha arco iris durante todo el proceso de embrionamiento hasta su eclosión, los datos están expresados en porcentaje. Cabe destacar que estos resultados no reflejan la acción de los factores temperatura, duración de choque y tiempo postfertilización para la triploidización. Son de gran ayuda para conocer el porcentaje de ovas que no alcanzan la eclosión. De manera general el 48,57% del total de ovas fertilizadas murieron durante el periodo embrional.

Tabla 3.7 Mortalidad expresada en % de ovas fertilizadas de trucha arco iris hasta la eclosión por tratamiento. CENIAC-Papallacta, 2008

TRATAMIENTO		I	II	III	PROMEDIO TRATAMIENTO
T1	T1D1P1	42	46,3	49	45,77
T2	T1D2P1	50,3	53,7	61,7	55,23
T3	T1D3P1	50,4	58,2	58,9	55,83
T4	T1D1P2	65	75,6	74,5	71,70
T5	T1D2P2	65,5	76,6	86,5	76,20
T6	T1D3P2	48,5	40,7	35,4	41,53
T7	T2D1P1	16,2	15,4	18,8	16,80
T8	T2D2P1	55,3	57,7	65,4	59,47
T9	T2D3P1	46,7	54,8	49,3	50,27
T10	T2D1P2	24	20,8	19,7	21,50
T11	T2D2P2	40,7	39,9	33,8	38,13
T12	T2D3P2	30,9	41,4	38,9	37,07
T13	T0D0P0	64,8	65	56	61,93
PROMEDIO REPETICIÓN		46,18	49,70	49,84	48,57

El tratamiento T5 (T1D2P2) fue el que tuvo una mortalidad mayor correspondiente a 76,20%, mientras que el tratamiento con menos mortalidad fue T7 (T2D1P1) con 16,8%. El tratamiento control T13 contó un porcentaje de ovas muertas de 61,93% (Figura 3.20).

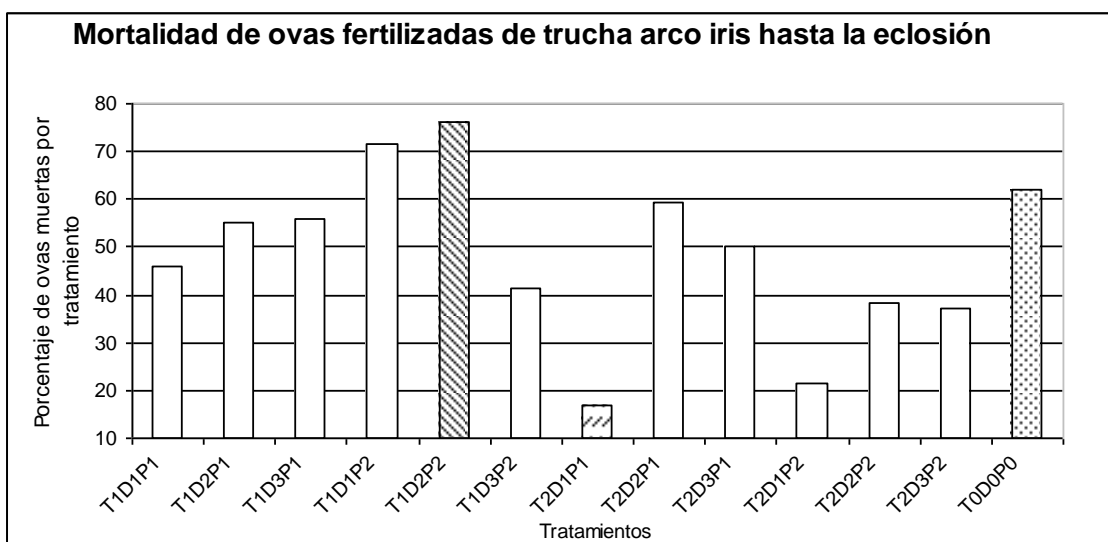


Figura 3.20 Porcentaje de mortalidad de ovas fertilizadas de trucha arco iris hasta la eclosión. CENIAC- Papallacta, 2008

El análisis de varianza para la mortalidad de ovas fertilizadas hasta la eclosión indica que entre tratamientos existe diferencias altamente significativas al $p < 0,05$ y $p < 0,01$ (Tabla 3.8).

Tabla 3.8 Análisis de Varianza para la mortalidad de ovas fertilizadas de trucha arco iris al evaluar el efecto de T, P y D. CENIAC-Papallacta, 2008

FV	GL	SC	CM	Fcal	TABLA		Significancia	
					5%	1%	5%	1%
TOTAL	38	11970,68						
TRATAM	12	11209,52	934,13	34,53	2,18	3,03	*	**
REP	2	111,97	55,98	2,07	3,4	5,61	ns	ns
ERROR EXP	24	649,19	27,05					
CV	10,71%							

* = diferencia significativa

** = altamente significativo

ns = no significativo

El coeficiente de variación para el análisis de la mortalidad de las ovas fertilizadas de trucha arco iris hasta la eclosión fue de 10,71%.

3.2.4 Rangos de significancia para los tratamientos

Al realizar la prueba de Tukey al 5% para los tratamientos, se formaron cuatro rangos de significancia, desde el mejor tratamiento hasta el más deficiente.

La Tabla 3.9 muestra el mejor tratamiento T7 con un porcentaje de mortalidad total de 16,8%, el tratamiento control T13 y el tratamiento T5 fueron los que más mortalidad tuvieron hasta la eclosión (61,93% y 76,205 respectivamente).

Tabla 3.9 Rangos de significancia usando la prueba de Tukey al 5% para cada tratamiento. CENIAC-Papallacta, 2008

TRATAMIENTO	xmedia	RANGOS SIG.	
T7	16,8	A	
T10	21,5	A	
T12	37,07		B
T11	38,13		B
T6	41,53		B
T1	45,77		C
T9	50,27		C
T2	55,23		C
T3	55,83		C
T8	59,47		D
T13	61,93		D
T4	71,7		D
T5	76,2		D

3.4 Supervivencia de alevines

La tabla 3.10 indica la supervivencia total de los alevines de trucha arco iris inducidas a triploidía. Se destaca que la supervivencia más alta la tuvo el tratamiento T7 (70,9%), mientras que la más baja correspondió al tratamiento T5 (20,07%).

Tabla 3.10 Supervivencia de alevines de trucha arco iris por cada tratamiento.

CENIAC-Papallacta, 2008

Hda. El Prado IASA- Sangolquí, 2008

TRATAMIENTO	SUPERVIVENCIA (%)	DS	CV (%)
T1	47,47	10,41	15,38
T2	35,80	10,50	11,71
T3	26,27	28,58	15,97
T4	23,40	5,29	10,80
T5	20,07	3,06	8,18
T6	52,17	7,81	12,40
T7	70,90	10,00	8,13
T8	26,07	16,62	11,49
T9	37,90	12,74	10,77
T10	61,80	16,46	9,86
T11	46,23	17,79	11,38
T12	52,37	10,69	10,12
T13	32,47	5,29	9,45

DS = Desviación estándar

CV= Coeficiente de variación

3.5 Medición del volumen del núcleo del eritrocito y porcentaje de triploidía

Para conocer el éxito de los tratamientos y comprobar la triploidización de las truchas arco iris se realizó la medición del diámetro y volumen del núcleo del eritrocito. Los núcleos de los eritrocitos de *Oncorhynchus mykiss* son de forma esferoide por lo tanto presenta un diámetro mayor y un diámetro menor. Luego de realizar la tinción del frotis sanguíneo, los núcleos se tiñen de color violeta intenso y están ubicados en el centro de cada eritrocito o glóbulo rojo. Existe una diferencia notoria de su tamaño entre individuos diploides y triploides ya que en estos últimos al tener una carga genética adicional aumenta la cantidad de ADN nuclear proporcionando una medida cualitativa para la determinación de triploidía.

Las Figuras 3.21 y 3.22 muestran los núcleos de los eritrocitos de trucha arco iris diploide, es decir con una carga genética $2n$, por lo que

alcanzaron un diámetro mayor de 5 a 6 μm , un diámetro menor de 2 a 3,25 μm y un volumen nuclear calculado de 186,28 a 255,95 μm^3 .



Figura 3.21 Núcleo del eritrocito de trucha arco iris diploide. Diámetro mayor.

Hda. El Prado IASA- Sangolquí, 2008

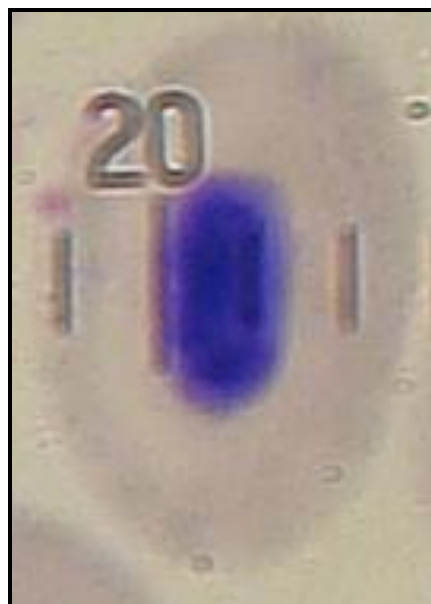


Figura 3.22 Núcleo del eritrocito de trucha arco iris diploide. Diámetro menor.

Hda. El Prado IASA- Sangolquí, 2008

Los núcleos eritrocitarios de las truchas triploides presentan un diámetro mayor de 8 a 10 μm , un diámetro menor de 3 a 3,75 μm y un volumen nuclear calculado de 370,18 a 422,24 μm^3 (Figuras 3.23, 3.24).



Figura 3.23 Núcleo del eritrocito de trucha arco iris triploide. Diámetro mayor
Hda. El Prado IASA- Sangolquí, 2008



Figura 3.24 Núcleo del eritrocito de trucha arco iris triploide. Diámetro menor
Hda. El Prado IASA- Sangolquí, 2008

La Figura 3.25 muestra un frotis sanguíneo realizado a una trucha diploide perteneciente al tratamiento control, los glóbulos rojos son pequeños y sus núcleos que llevan una carga genética $2n$ se muestran ligeramente alargados.

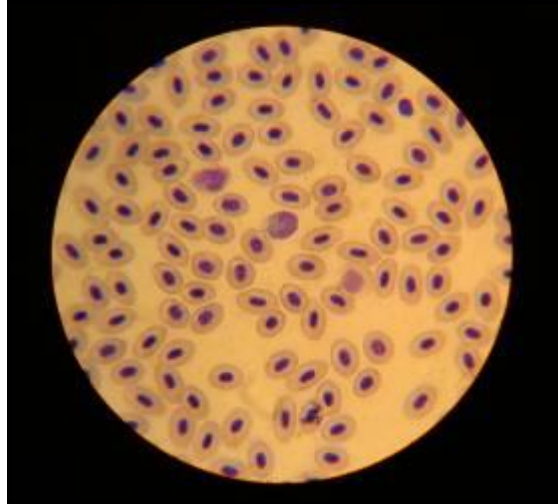


Figura 3.25 Campo ocular tomado con el lente de 100X de los eritrocitos de trucha arco iris diploide del tratamiento control T13.

Hda. El Prado IASA- Sangolquí, 2008

En la Figura 3.26 se observa el frotis sanguíneo realizado a una trucha triploide perteneciente al T8, los glóbulos rojos son grandes y de esta misma forma sus núcleos que se encuentran más elongados y fusiformes.

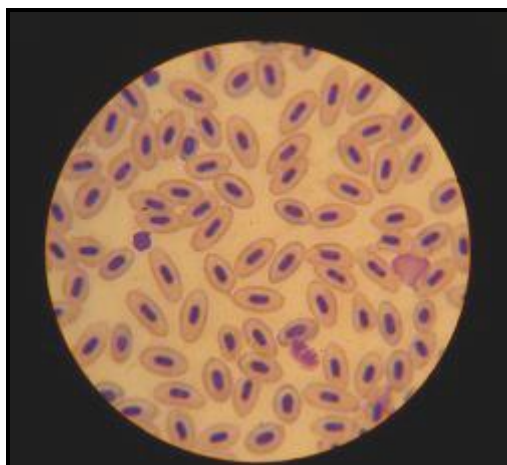


Figura 3.26 Campo ocular tomado con el lente de 100X de los eritrocitos de trucha arco iris triploide del tratamiento T8.

Hda. El Prado IASA- Sangolquí, 2008

En la Tabla 3.11 se observan las medidas del diámetro nuclear de los eritrocitos de truchas consideradas diploides en cada tratamiento, se tomó del eje mayor y del eje menor y se expresaron en micras (μm). Para el diámetro menor las mediciones estuvieron entre 2 μm hasta 3,25 μm , y para el mayor de 5 μm a 6 μm . El volumen nuclear va desde 186,28 $\mu\text{m}^3 \pm 7,69 \mu\text{m}^3$ a 255,95 $\mu\text{m}^3 \pm 24,65 \mu\text{m}^3$. En el tratamiento T8 no constan estos datos debido a que ningún espécimen fue considerado diploide.

Los coeficientes de variación se consideran aceptables (4,12% - 22,31%).

Tabla 3.11 Medición del diámetro mayor y menor de los núcleos de los eritrocitos de truchas diploides y su volumen nuclear, para cada uno de los tratamientos de triploidización.

Hda. El Prado IASA- Sangolquí, 2008

TRATAMIENTO	DIPLOIDES		VOLUMEN (μm^3)	DS	CV (%)
	DIAMETRO (μm)				
	EJE MAYOR	EJE MENOR			
T1	5,25	2,50	212,11	46,02	21,70
T2	5,00	3,25	223,71	11,06	5,00
T3	5,50	3,00	209,81	24,75	11,80
T4	5,00	2,75	205,71	28,28	13,74
T5	5,00	2,50	192,73	43,00	22,31
T6	5,00	2,75	198,26	36,38	18,34
T7	6,00	2,75	204,55	20,37	10,00
T8	-	-	-	-	-
T9	5,00	3,00	221,37	29,01	13,10
T10	4,50	3,25	255,95	24,65	9,63
T11	5,50	2,75	190,02	16,61	8,74
T12	5,50	3,00	214,63	36,68	17,09
T13	5,00	2,50	186,28	7,69	4,12

DS = Desviación estándar

CV= Coeficiente de variación

En la Tabla 3.12 constan las medidas del diámetro nuclear de los eritrocitos de truchas triploides para cada tratamiento, se tomó del eje mayor y del eje menor y se expresaron en micras (μm), para el diámetro menor las mediciones estuvieron entre $3 \mu\text{m}$ hasta $3,75 \mu\text{m}$, y para el mayor de $8 \mu\text{m}$ a $10 \mu\text{m}$. El volumen calculado va desde $370,18 \mu\text{m}^3 \pm 57,02 \mu\text{m}^3$ a $422,24 \mu\text{m}^3 \pm 66,18 \mu\text{m}^3$.

En los tratamientos T1 y T4 no constan los datos debido a que ningún espécimen fue considerado triploide. Como era de esperarse el tratamiento control no presentó ningún alevín de trucha arco iris triploide. Los coeficientes de variación se consideran aceptables (1,81% -17,72%).

Tabla 3.12 Medición del diámetro mayor y menor de los núcleos de los eritrocitos de truchas triploides y su volumen nuclear, para cada uno de los tratamientos de triploidización.

Hda. El Prado IASA- Sangolquí, 2008

TRATAMIENTO	TRIPLÓIDES		VOLUMEN (μm^3)	DS	CV (%)
	DIÁMETRO (μm)				
	EJE MAYOR	EJE MENOR			
T1	-	-	-	-	-
T2	9,25	3,75	393,71	7,14	1,81
T3	9,00	3,25	380,14	20,32	5,40
T4	-	-	-	-	-
T5	8,75	3,25	370,18	57,02	15,40
T6	9,00	3,25	379,52	43,44	11,45
T7	9,25	3,00	404,68	38,75	9,57
T8	9,75	3,75	375,42	66,53	17,72
T9	10,00	3,00	378,60	56,71	15,00
T10	8,00	3,30	384,40	-	.
T11	9,00	3,75	422,24	66,18	15,67
T12	9,25	3,50	376,16	58,31	15,50
T13	-	-	-	-	-

DS = Desviación estándar

CV= Coeficiente de variación

En las placas de frotis sanguíneos de *Oncorhynchus mykiss* triploides se encontraron algunos eritrocitos que presentaron una anormal segmentación de los núcleos (Figura 3.27), ésta división se aprecia como una constricción en la mitad del núcleo, esto concuerda con lo demostrado por Wlasow (2004) quien describió estas alteraciones en peces triploides especialmente en *Salvelinus fontinalis*.

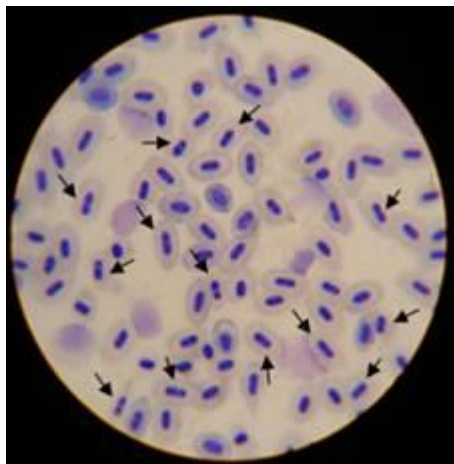


Figura 3.27 Campo ocular tomado con el lente de 100X de los eritrocitos de trucha arco iris triploide con núcleos segmentados (flechas negras).

Hda. El Prado IASA- Sangolquí, 2008

La Figura 3.28 muestra claramente la segmentación nuclear de los eritrocitos de trucha arco iris triploide, la constricción del núcleo es tal que se empieza a dividir en partes iguales.

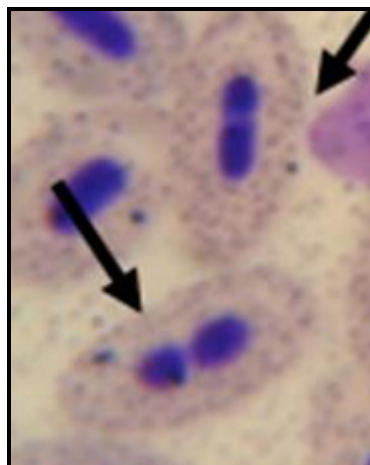


Figura 3.28 Ampliación de los eritrocitos de trucha arco iris triploide con núcleos segmentados (flechas negras)

Hda. El Prado IASA- Sangolquí, 2008

Los eritrocitos de las truchas arco iris triploides no presentan ninguna segmentación nuclear, todos sus contornos están bien definidos (Figura 3.29).

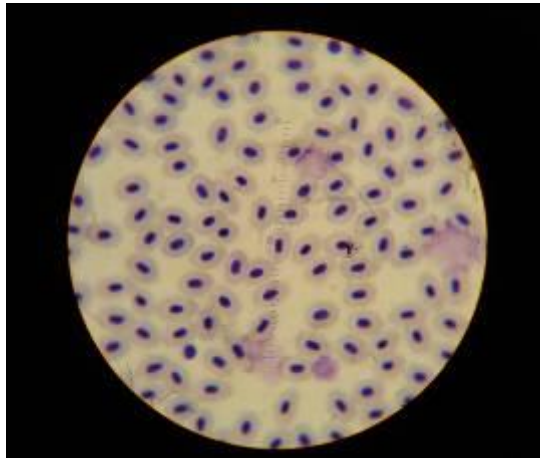


Figura 3.29 Campo ocular tomado con el lente de 100X de los eritrocitos de trucha arco iris diploide con núcleos normales.

Hda. El Prado IASA- Sangolquí, 2008

Los eritrocitos de trucha arco iris triploide con núcleos segmentados se encontraron en todas las placas de frotis sanguíneos de los tratamientos en donde se encontraron peces triploides (Figura 3.30).

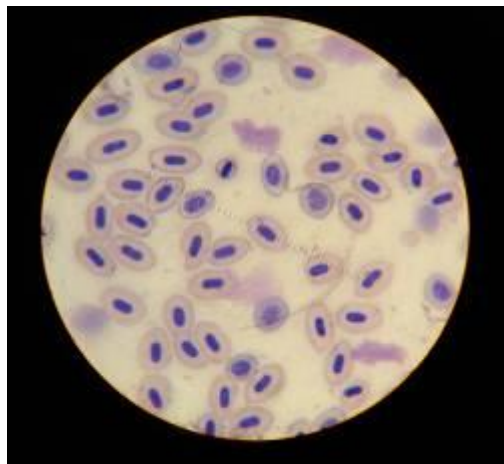


Figura 3.30 Campo ocular tomado con el lente de 100X de los eritrocitos de trucha arco iris triploide con núcleos segmentados.

Hda. El Prado IASA- Sangolquí, 2008

La Tabla 3.13 indica los porcentajes de triploidía de cada uno de los tratamientos, se observa que al aplicar choques térmicos de 26°C y 5 minutos de duración no se presentó ningún efecto puesto que no se obtuvo ningún individuo triploide (0%). A los 10 y 15 minutos de duración de choque a 26°C los porcentajes de triploidía fueron menores del 33%. El mejor tratamiento donde se obtuvo el 100% de triploidía fue el choque con 28°C durante 10 minutos y 10 minutos posfertilización. A los 10 y 15 minutos de duración de choque a 28°C los porcentajes de triploidía fueron menores del 50%(Figura 3.31).

Tabla 3.13 Número y porcentaje de individuos diploides y triploides por tratamiento obtenidos mediante la medición del volumen nuclear eritrocitario.

Hda. El Prado IASA- Sangolquí ,2008

TRATAMIENTO	NUMERO DE MUESTRA	DIPLOIDES		TRIPLOIDES	
		Número individuos	%	Número individuos	%
T1	12	12	100	0	0
T2	12	8	66,7	4	33,3
T3	12	9	75	3	25
T4	12	12	100	0	0
T5	12	10	83,3	2	16,7
T6	12	9	75	3	25
T7	12	10	83,3	2	16,7
T8	12	0	0	12	100
T9	12	3	25	9	75
T10	12	11	91,7	1	8,3
T11	12	6	50	6	50
T12	12	7	58,3	5	41,7
T13	12	12	100	0	0

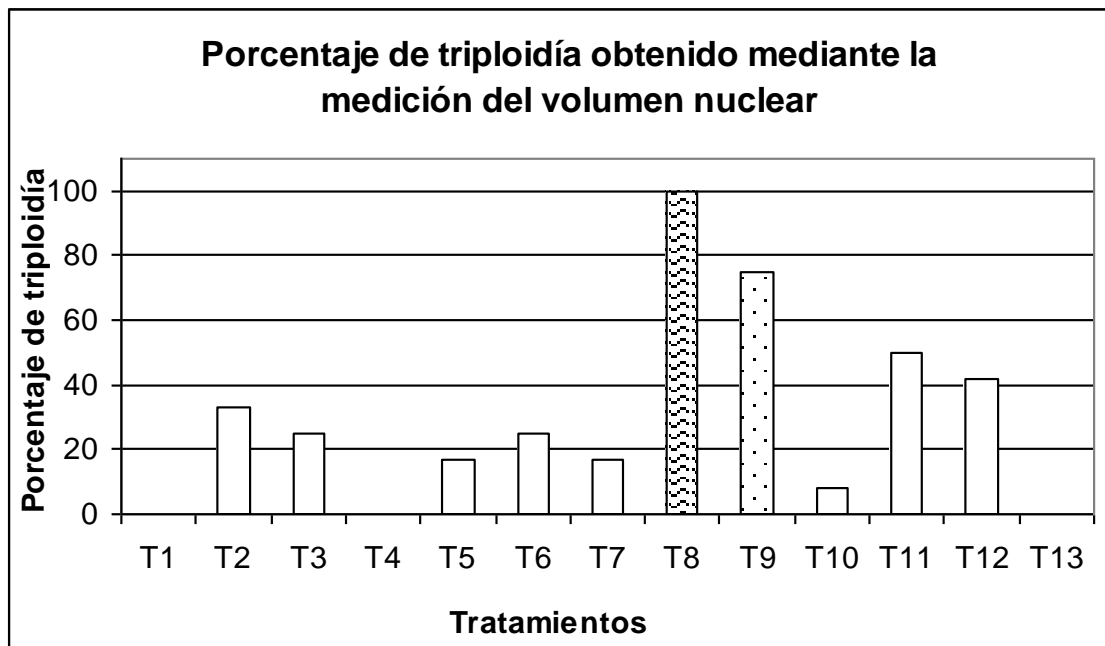


Figura 3.31 Porcentaje de triploidía para cada tratamiento.

Hda. El Prado IASA- Sangolquí, 2008

3.6 Medición de parámetros morfométricos

3.6.1 Pesaje de truchas arco iris

En la Tabla 3.14 se detallan todos los pesos expresados en gramos de las truchas arco iris inducidas a triploidía mediante choques térmicos durante 5 meses iniciando a partir de ovas fecundadas hasta cuatro meses posteclosión. Al revisar los coeficientes de variación en cada uno de los pesajes los resultados son satisfactorios para un trabajo de campo, puesto que los porcentajes se encuentran entre 9,01% hasta 18,48%, encontrándose dentro de los parámetros normales (20%). Esto demuestra que existió un buen manejo al efectuar los pesajes de las truchas.

Tabla 3.14 Pesaje (g) de las truchas arco iris inducidas a triploidía iniciando desde ovas fecundadas hasta 4 meses posteclosión.

CENIAC-Papallacta, 2008

Hda. El Prado IASA- Sangolquí ,2008

	OVAS	MES 1	MES 1	MES 2	MES 2	MES 2	MES 3	MES 3	MES 4	MES 4	MES 4	MES 5
T1	0,08	0,09	0,16	0,23	0,35	0,48	0,62	0,77	1,50	2,70	3,80	5,20
T2	0,08	0,09	0,15	0,23	0,33	0,48	0,68	0,75	1,46	2,52	3,48	5,50
T3	0,08	0,09	0,15	0,22	0,34	0,47	0,64	0,74	1,90	2,60	3,71	5,12
T4	0,07	0,05	0,09	0,17	0,22	0,26	0,39	0,46	1,02	1,40	2,50	3,50
T5	0,06	0,06	0,08	0,16	0,21	0,30	0,34	0,44	0,97	1,60	2,19	3,07
T6	0,08	0,09	0,15	0,21	0,33	0,36	0,52	0,61	1,50	2,50	4,25	5,60
T7	0,08	0,09	0,16	0,22	0,33	0,37	0,53	0,58	1,22	1,90	2,67	5,00
T8	0,08	0,09	0,16	0,23	0,35	0,45	0,54	0,77	1,32	2,50	3,90	5,68
T9	0,08	0,08	0,15	0,23	0,35	0,38	0,62	0,66	1,27	2,40	3,93	5,30
T10	0,07	0,07	0,16	0,23	0,34	0,38	0,58	0,81	1,32	2,50	3,25	4,90
T11	0,08	0,08	0,16	0,22	0,34	0,45	0,52	0,78	1,38	2,50	3,71	5,00
T12	0,08	0,09	0,15	0,23	0,34	0,47	0,58	0,77	1,40	2,40	3,33	4,40
T13	0,08	0,08	0,14	0,23	0,33	0,40	0,52	0,72	1,25	2,10	3,10	4,12
DS	0,01	0,01	0,03	0,02	0,05	0,07	0,09	0,12	0,23	0,41	0,61	0,81
CV (%)	9,01	16,54	18,48	10,81	14,76	17,55	17,38	18,10	17,30	17,79	18,22	16,81

En la Figura 3.32 se muestra la dispersión XY de los pesos de truchas pertenecientes a cada tratamiento de triploidización. Se observa que las líneas de pesajes se encuentran parejas. En las fases iniciales de crecimiento se llegan a unir en muchos puntos. A medida que van incrementando su masa muscular, las diferencias se hacen más notorias. T4 y T5 tienen los pesos más bajos de todos los tratamientos, entre los más altos tenemos a T6 y T8. El tratamiento control T13, también presenta un bajo pesaje.

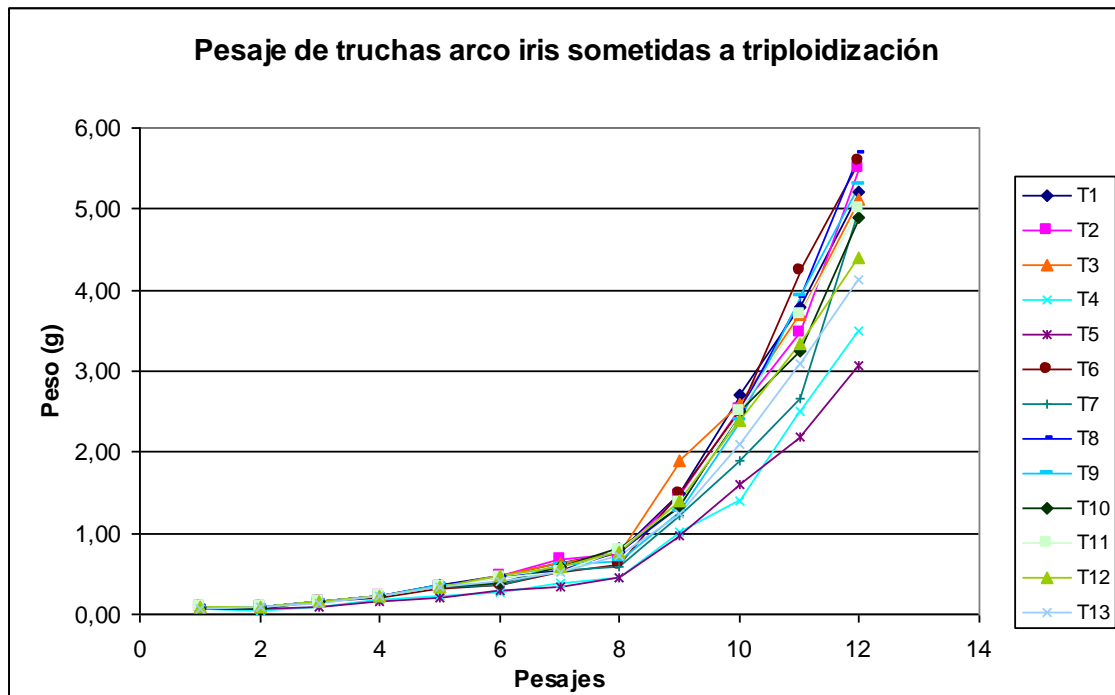


Figura 3.32 Dispersión de los datos de pesos de las truchas arco iris inducidas a triploidía iniciando desde ovas fecundadas hasta 4 meses posteclosión.

CENIAC-Papallacta, 2008

Hda. El Prado IASA- Sangolquí, 2008

Para conocer la incidencia de la condición triploide en los pesos de trucha arco iris, se analizó el mejor tratamiento donde se obtuvo el 100% de ejemplares triploides frente al control diploide T13. Se realizó la prueba de t student (0,38) siendo estadísticamente no significativo ($p > 0,05$ y $p > 0,01$) (Tabla 3.15). Esto demuestra que los pesos son similares, pero en la Figura 3.33 se observa la dispersión de los pesos de T8 y T13 y se aprecia claramente que el tratamiento T8 tiene un pesaje mucho mayor que el grupo control.

Tabla 3.15 Prueba de t student al 1% y 5%, para los pesos de las truchas arco iris de los tratamientos T8 100% triploides, y T13 que representa el control diploide.

CENIAC-Papallacta, 2008

Hda. El Prado IASA- Sangolquí ,2008

T8 TRATAMIENTO TRIPLOIDE	T13 CONTROL DIPLOIDE
0,08	0,076
0,09	0,08
0,16	0,14
0,23	0,23
0,35	0,33
0,45	0,4
0,54	0,52
0,77	0,72
1,32	1,25
2,5	2,1
3,9	3,1
5,68	4,12
t student = 0,38 ^{ns} 5% 1,71 1% 2,5	

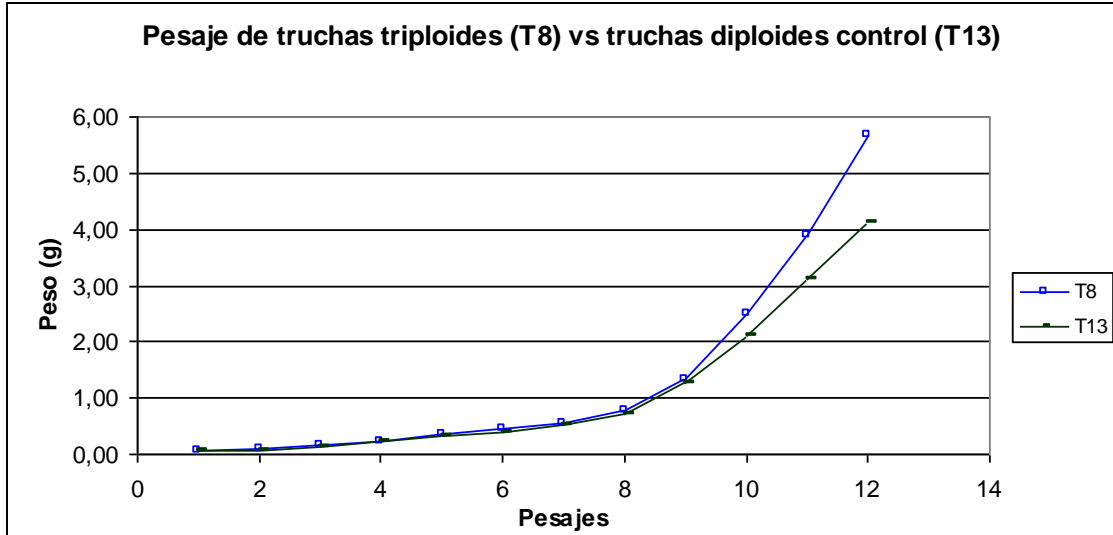


Figura 3.33 Dispersión de los datos de pesos de las truchas arco iris de los tratamientos T8 (100% triploides) frente a T13 (diploide).

CENIAC-Papallacta, 2008

Hda. El Prado IASA- Sangolquí, 2008

3.6.2 Longitud total de las truchas arco iris

En la Tabla 3.16 se detallan las longitudes totales tomadas desde la región cefálica hasta la región caudal, expresados en centímetros. El periodo de medición fue de 5 meses posteclosión. Al revisar los coeficientes de variación los resultados son satisfactorios (4,55% - 12,58%).

Tabla 3.16 Longitud total (cm.) de las truchas arco iris inducidas a triploidía iniciando desde ovas fecundadas hasta 4 meses posteclosión.

CENIAC-Papallacta, 2008

Hda. El Prado IASA- Sangolquí ,2008

	ALEVIN CON SACO VITELINO	MES 1	MES 1	MES 2	MES 3	MES 4	MES 5
T1	1,71	2,44	2,82	3,05	4,12	5,88	7,4
T2	1,62	2,37	2,84	3,1	4,33	5,75	6,8
T3	1,48	2,33	2,7	3,1	4,18	6,0	7,0
T4	1,25	1,95	2,2	2,55	3,9	5,25	6,5
T5	1,21	1,48	2,15	2,4	3,88	5,15	6,9
T6	1,49	2,45	2,68	2,9	4,15	5,5	7,0
T7	1,75	2,42	2,75	3,0	4,22	5,34	7,3
T8	1,61	2,51	2,8	3,15	4,52	6,2	7,8
T9	1,5	2,55	2,8	3,05	4,21	5,77	7,1
T10	1,47	2,5	2,73	3,0	4,18	5,75	7,8
T11	1,44	2,39	2,71	3,18	4,0	5,25	6,8
T12	1,3	2,4	2,8	3,15	4,15	5,46	7,4
T13	1,35	2,38	2,66	3,0	3,85	5,12	6,5
DS	0,17	0,29	0,22	0,24	0,19	0,35	0,42
CV(%)	11,40	12,58	8,43	7,92	4,55	6,21	5,98

En la Figura 3.34 se muestra la dispersión XY de las longitudes de las truchas de cada tratamiento de triploidización. Se observa que las líneas de longitudes se encuentran parejas y se llegan a unir en muchos puntos. T4 y T5 tienen las longitudes más bajas. Entre los valores más altos se encuentra T8. El control T13, tiene una medición de longitud promedio (Figura 3.33).

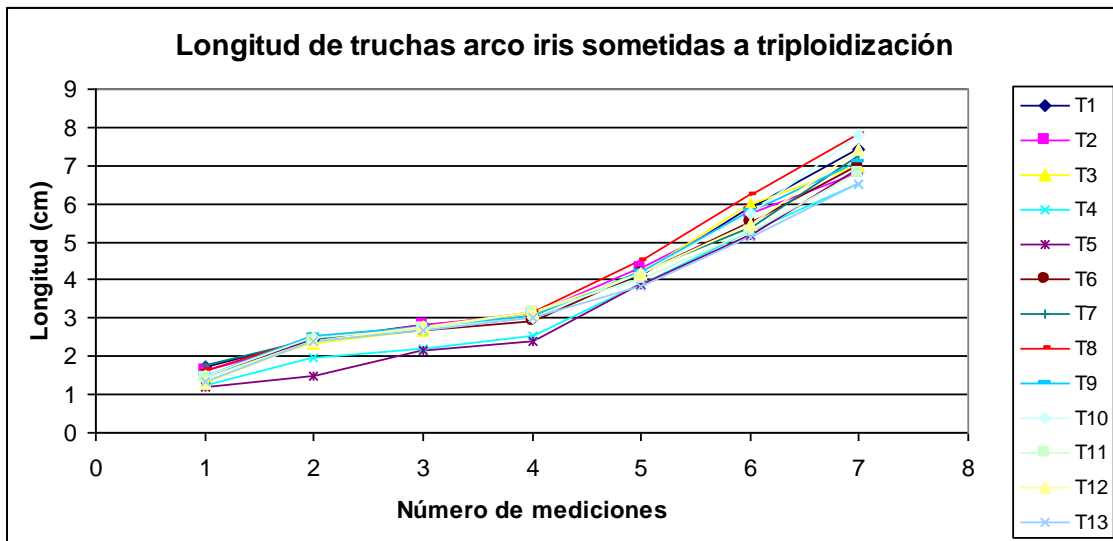


Figura 3.34 Dispersión de los datos de longitud total de las truchas arco iris inducidas a triploidía iniciando desde alevines eclosionados hasta 4 meses posteclosión.

CENIAC-Papallacta, 2008

Hda. El Prado IASA- Sangolquí, 2008

Para conocer la incidencia de la condición triploide en la longitud de trucha arco iris, se analizó el mejor tratamiento donde se obtuvo el 100% de ejemplares triploides frente al tratamiento control diploide T13. Se realizó la prueba de t student obteniéndose un valor de 0,49, siendo estadísticamente no significativo al $p > 0,05$ y $p > 0,01$ (Tabla 3.17). Esto demuestra que las longitudes no presentan mayores diferencias estadísticas, pero en la Figura 3.35 se observa la dispersión de las longitudes de T8 y T13 y se aprecia claramente que el tratamiento T8 tiene una longitud mayor que el grupo control a lo largo de todo el proceso.

Tabla 3.17 Prueba de t student al 1% y 5%, para las longitudes totales de las truchas arco iris de los tratamientos T8 100% triploides, y T13 que representa el control diploide.

CENIAC-Papallacta, 2008

Hda. El Prado IASA- Sangolquí ,2008

T8 TRATAMIENTO TRIPLOIDE	T13 CONTROL DIPLOIDE
1,61	1,35
2,51	2,38
2,8	2,66
3,15	3
4,52	3,85
6,2	5,12
7,8	6,5
t student = 0,497 ^{ns} 5% 1,78 1% 2,68	

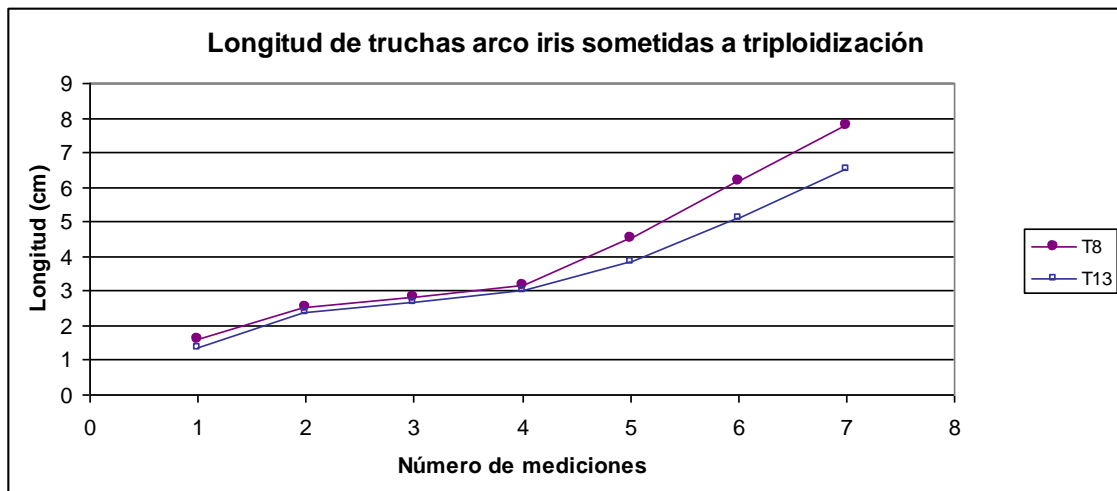


Figura 3.35 Dispersión de los datos de longitudes de las truchas arco iris de los tratamientos T8 (100% triploides) frente a T13 (diploide).

CENIAC-Papallacta, 2008

Hda. El Prado IASA- Sangolquí, 2008

3.7 Conversión alimenticia y Eficiencia del alimento

En la Tabla 3.18 constan los Factores de Conversión Alimenticia para trucha arco iris, sometidas a los tratamientos de inducción de triploidía mediante la aplicación de choques térmicos. Los tratamientos que tuvieron una mejor conversión alimenticia son T8 (28°C, durante 10 minutos y 10 minutos de postfertilización) y T9 (28°C, durante 15 minutos y 10 minutos de postfertilización) con un factor de conversión de 1,25 y 1,30 respectivamente. De manera general el promedio de la conversión alimenticia de todos los tratamientos fue de 1.48. Cabe destacar que mientras el factor de conversión esté más cercano al 1 el aprovechamiento del alimento es mejor, puesto que la eficiencia del alimento será del 100%.

Tabla 3. 18 Factor de Conversión Alimenticia al evaluar cada tratamiento de triploidización.

Hda. El Prado IASA- Sangolquí, 2008

TRATAMIENTO	I	II	III	PROMEDIO TRATAMIENTO
T1D1P1	1,12	1,54	1,65	1,44
T1D2P1	1,34	1,45	1,47	1,42
T1D3P1	1,42	1,15	1,64	1,40
T1D1P2	1,72	1,60	1,62	1,65
T1D2P2	1,63	1,66	1,68	1,66
T1D3P2	1,56	1,50	1,65	1,57
T2D1P1	1,52	1,54	1,46	1,51
T2D2P1	1,25	1,27	1,24	1,25
T2D3P1	1,28	1,35	1,26	1,30
T2D1P2	1,58	1,67	1,42	1,56
T2D2P2	1,40	1,48	1,44	1,44
T2D3P2	1,37	1,54	1,42	1,44
T0D0P0	1,60	1,54	1,58	1,57
PROMEDIO REPETICIÓN	1,44	1,48	1,50	1,48

En la Figura 3.36 se aprecia que los tratamientos donde se aplicaron temperaturas de 26°C tienen los factores de conversión más altos que van desde 1,44 hasta 1,66; mientras que los tratamientos a 28°C tienen factores ligeramente menores que van desde 1,25 hasta 1,57. El tratamiento control (T13) presentó un factor de conversión del 1,57.

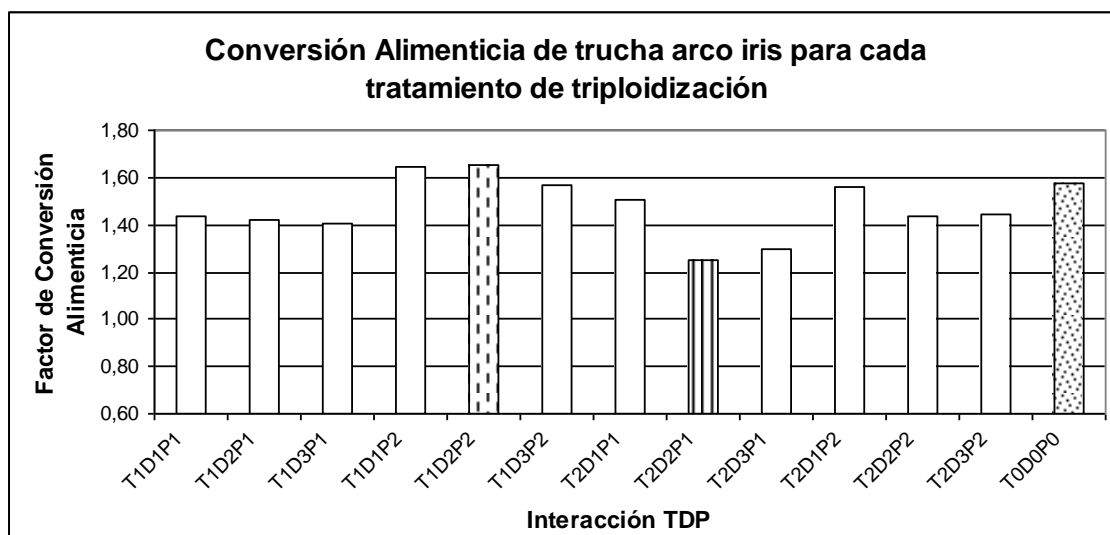


Figura 3.36 Factor de conversión alimenticia de trucha arco iris para cada tratamiento de triploidización.

Hda. El Prado IASA- Sangolquí, 2008

La eficiencia del alimento está expresada en porcentaje y es inversamente proporcional al factor de conversión alimenticia, mientras más alto sea este valor el porcentaje será menor; así tenemos que el mejor tratamiento fue T8 con 80,13%, seguido del T9 con 77,13%. La eficiencia del alimento más baja correspondió a T5 con 60,19%. El tratamiento control obtuvo un 63,53% (Tabla 3.19). De forma general, todos los porcentajes se encuentran entre los rangos establecidos de una correcta asimilación del alimento que está entre 60-80% (Imaki, 2003).

Tabla 3.19 Factor de Conversión Alimenticia y Eficiencia del alimento en trucha arco iris sometidas a tratamientos para la inducción de triploidía

Hda. El Prado IASA- Sangolquí, 2008

TRATAMIENTO	Factor de Conversión Alimenticia	Eficiencia del Alimento (%)
T1	1,44	69,28
T2	1,42	70,22
T3	1,4	71,41
T4	1,65	60,61
T5	1,66	60,19
T6	1,57	63,83
T7	1,51	66,02
T8	1,25	80,13
T9	1,3	77,13
T10	1,56	64,05
T11	1,44	69,45
T12	1,44	69,32
T13	1,57	63,53

El análisis de varianza para la conversión alimenticia de trucha arco iris fue altamente significativa al $p < 0,05$ y $p < 0,01$. (Tabla 3.20).

Tabla 3.20 Análisis de Varianza para el factor de conversión alimenticia de trucha arco iris.

Hda. El Prado IASA- Sangolquí, 2008

FV	GL	SC	CM	Fcal	TABLA		Significancia	
TOTAL	38	0,91			5%	1%	5%	1%
TRATAM	12	0,55	0,05	3,15	2,18	3,03	*	**
REP	2	0,02	0,01	0,77	3,4	5,61	ns	
ERROREXP	24	0,35	0,014					
CV	0,63%							

* = diferencia significativa

** = altamente significativo

ns = no significativo

El coeficiente de variación para la conversión alimenticia de las truchas arco iris es de 0,63%.

3.7.4 Rangos de significancia para las fuentes de variación

Al realizar la prueba de Tukey al 5% para los tratamientos, se formaron cuatro rangos de significancia, desde el mejor tratamiento hasta el más deficiente.

La Tabla 3.21 muestra al mejor tratamiento, T8 (100% triploide), ubicado en primer lugar por su mejor eficiencia del alimento. T5 se ubicó en último lugar así como también T13 (control)

Tabla 3.21 Rangos de significancia usando la prueba de Tukey al 5% para las fuentes de variación.

Hda. El Prado IASA- Sangolquí, 2008

TRATAMIENTO	xmedia	RANGOS SIGNIFICANCIA	
T8	1,25	A	
T9	1,3	A	
T3	1,4		B
T2	1,42		B
T1	1,44		B
T11	1,44		B
T12	1,44		B
T7	1,51		C
T10	1,56		C
T6	1,57		C
T13	1,57		C
T4	1,65		D
T5	1,66		D

IV. DISCUSIÓN

Las ovas o gametos femeninos de trucha arco iris utilizadas en este trabajo coinciden con las medidas morfométricas referidas por Imaki (2003), donde menciona que de manera general las ovas poseen un diámetro de 4 a 6 mm. y un peso de 0,06 a 0,07 g. Es importante destacar que las ovas de *Oncorhynchus mykiss* presentan características similares a *Merluccius australis*, en cuanto a la morfología, debido a que su forma es esférica, con un corión liso y en su interior una gota oleosa de color anaranjado (Bustos *et al.*, 2005).

El análisis embriogénico de trucha arco iris permitió determinar los diferentes estadios en su desarrollo embrional. El resultado a partir de la unión de los gametos es el huevo fertilizado que empieza a segmentarse para dar lugar a la formación de la mórula, blástula, gástrula, neurula, hasta llegar a la eclosión en 40 días. Se genera un alevín provisto de un saco vitelino que será su reserva alimenticia inicial. Esto se puede comparar con el resultado obtenido por Bustos *et al.*, (2005), donde se realizó un análisis del desarrollo de los huevos de merluza del sur, *Merluccius australis*, en donde se describió el paso por las etapas de primera, segunda, tercera y cuarta división, mórula temprana, mórula tardía, blástula, gástrula hasta la eclosión en un periodo de 7 días, considerándose este tiempo embrional sumamente rápido en relación al necesitado por trucha arco iris.

El tiempo de incubación de las ovas, es inversamente proporcional a la temperatura media del agua, en este trabajo la fase de ojos visibles o embrionamiento se llegó a los 23 días postfecundación y la eclosión a los 40 días con una temperatura del agua de 8°C. Estos resultados están en concordancia con lo descrito por Yesaki (1958), quien estableció estándares de temperatura para la oculación y eclosión. Esto se produce a los 21 días y 42 días respectivamente.

La acumulación de temperatura es conocida como la cantidad de temperatura que requiere un ser viviente para su desarrollo en un periodo determinado, las ovas utilizadas en la investigación, necesitaron una

acumulación de 320°C desde su fecundación hasta su eclosión, es decir que se requirió esa cantidad de temperatura para completar su desarrollo embrionario. Shepherd *et al.*, (1999) determinó que para especies como la trucha, la acumulación de temperatura promedio a 10°C es de 300 a 320 grados día. Aliah *et al.*, (1990), reafirma este resultado, suponiendo que se necesita 32 días desde la fecundación hasta la eclosión, con una temperatura media de 10 °C, la acumulación de temperatura en este caso es de 320 °C.

Para inducir triploidía, el método utilizado fue la aplicación del choque térmico a altas temperaturas de ovas recién fecundadas. Pineda *et al.*, (2003), cita éstos choques termostáticos como uno de los procedimientos de manipulación cromosómica con mejores resultados y de costo relativamente bajo.

De acuerdo con otras fuentes entre ellas Khan *et al.*, (2000), y Lincoln *et al.*, (1974) los tratamientos físicos de los gametos han permitido satisfactoriamente la producción de peces poliploides, convirtiéndose en una importante herramienta comercial para la industria de la acuicultura mundial.

Los choques térmicos para la inducción de triploidía varía en cada especie, así por ejemplo para la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), el rango de tolerancia va de 26°C hasta 30°C (Thorgaard, 1981); para la perca de río (*Perca fluviatilis*), los choques van desde 28°C hasta 36°C (Rougeot *et al.*, 2003); y para jundiá (*Rhamdia quelen*) la temperatura óptima es de 36°C (Shireman, 1984; Vozzi *et al.*, 2003).

El primer resultado cuantificable lo hemos expresado como la mortalidad de las ovas fecundadas luego de la aplicación de los choques térmicos a 26°C y 28°C, con una duración de 5,10 y15 minutos a los 10 y 20 minutos de haber iniciado la fecundación. La mortalidad fue significativamente mayor con la temperatura de 28°C. Esto se corrobora con lo señalado por Blanco 1995, quien afirma que a temperaturas mayores la mortalidad es alta, (supervivencia baja) y a temperaturas menores la mortalidad desciende. En un trabajo

realizado por Thorgaard, 1981, al aplicar los choques a 31°C en trucha arco iris, la mortalidad fue del 100%.

La mortalidad de las ovas hasta la eclosión, de manera general, se acercó al 50%, considerándose un valor aceptable ya que durante el periodo embrionario las ovas son extremadamente sensibles a cualquier cambio en las condiciones del agua. Sin embargo, Imaki (2003) afirma que existe un 20% de mortalidad entre el paso del estado de ovas fecundadas a eclosionadas; pero esto en la práctica es difícil obtenerlo sobre todo cuando se manejan cantidades grandes de huevos fecundados (Idrovo, *Com. personal*).

La temperatura de choque, afecta el resultado de triploidía. A temperaturas mayores, el porcentaje de triploidía aumenta, aunque también afecta el tiempo de duración y el tiempo de inicio del choque. En el presente trabajo se obtuvo el 100% de triploidía con choque de 28°C durante 10 minutos y 10 postfertilización. En 1980, Chourrout presentó un estudio sobre la inducción de triploidía en trucha arco iris por medio de la aplicación de un choque térmico de 27-30 °C por 10 minutos iniciándose este tratamiento durante la primera hora de desarrollo postfertilización, los resultados que se obtuvieron fueron satisfactorios (90-95% de peces triploides).

Una investigación similar realizada por Valdebenito *et al*, (1996) obtuvo un porcentaje de triploidización 90% del total de ovas tratadas, aplicando un choque térmico de 28°C por 10 minutos a ovas recién fecundadas. Éstos resultados difieren con los obtenidos por Pérez *et al.*, (1999), donde la triploidía fue inducida mediante la aplicación de choque térmico de 27°C por 13 minutos luego de 11 minutos después de la fertilización lográndose un 46% de triploidía.

Thorgaard (2002), logró un alto porcentaje de triploides a $28\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ con un tiempo de duración de tres minutos y un tiempo de inicio del choque de 8-10 minutos postfertilización. En un segundo ensayo, utilizó un choque de $31\pm 0.5^{\circ}\text{C}$, en este caso el porcentaje de triploidía fue del 100% a pesar que la mortalidad aumentó. Se llegó a la conclusión que la temperatura de choque es directamente proporcional al porcentaje de triploides e inversamente

proporcional a la supervivencia de los grupos tratados (Blanco, 1995), confirmándose nuestro resultado final en cuanto a la mortalidad de las ovas tratadas como el porcentaje de triploidía.

A pesar que se obtuvo un excelente resultado para la inducción de triploidía (100%), esto solo se presentó en un solo tratamiento ya que en el resto de ensayos experimentales la presencia de truchas triploides fue menor al 33% a los 26°C y a los 28°C menores al 75%. Estos resultados coinciden con otros obtenidos en publicaciones anteriores, que manifiestan que los choques térmicos resultan menos efectivos que los choques por presión para provocar la retención del segundo corpúsculo polar (Lou *et al*, 1984; Lincoln, 1989; Yamazaki *et al*, 1993).

Chourrout, 1984, recalcó que la mayor efectividad de los choques de presión en la inducción de triploidía pueda deberse a la menor duración del tratamiento y a la mayor uniformidad sobre los huevos.

La técnica utilizada para realizar el análisis de ploidía fue la medición del volumen nuclear eritrocitario, esto se fundamenta en el proceso propio de la triploidización donde existe la adición de un set extra de cromosomas por lo tanto el ADN nuclear, lógicamente, se ve aumentado generando como lo expresó Arai (2000), un crecimiento mayor del núcleo del eritrocito llamado también glóbulo rojo.

Cabe indicar que para el cálculo del diámetro y volumen nuclear se utilizó la fórmula del volumen nuclear eritrocitario estandarizada para esta especie en particular y descrita por Bunge (1993).

Se debe destacar que existe una forma más sencilla para realizar éste análisis de ploidía utilizando el mismo principio del ADN nuclear y es mediante un contador Coulter con canalizador (Coulter Instruments, Colorado, EE.UU), el cual ofrece los resultados de una manera rápida y efectiva (Wattendorf, 1986), pero debido a la limitante que el país no cuenta con este equipo la medición se realizó con un micrómetro incorporado al lente del microscopio

lográndose con éxito determinar con un método simple pero exacto la presencia de peces triploides, con la ventaja adicional ser una técnica que combina precisión y rentabilidad (Salinas, 2006).

Pérez, (1999), realizó la medición del volumen nuclear eritrocitario utilizando un contador Counter, el diámetro menor nuclear en los alevines diploides fue de $3,6 \pm 0.02 \mu\text{m}$, para nuestra experiencia el diámetro fue de 2 a $3,25 \mu\text{m}$. El valor promedio del diámetro nuclear en los alevines triploides fue de $4 \pm 0.03 \mu\text{m}$, y en este ensayo se obtuvo una medida de 3 a $3,75 \mu\text{m}$.

Para la trucha de arroyo, *Salvelinus fontinalis*, los núcleos de los eritrocitos de truchas triploides tuvieron un diámetro de $8.2-10.6 \mu\text{m}$ y para los individuos diploides $5.9-8.5 \mu\text{m}$ (Woznicki, 2002).

En los eritrocitos de *Oncorhynchus mykiss* triploide, se observó una alteración a nivel nuclear que permite hacer una comparación con un trabajo realizado por Wlasow (2004) en *Salvelinus fontinalis*, donde al igual que en nuestras placas, se observaron núcleos comprimidos en la mitad dando la apariencia de la formación de dos partes iguales, ésta inusual división, Benfey (1999), Yokote (1982), lo describen como segmentación nuclear.

En recientes investigaciones se ha llegado a establecer que el salmón coho, *Oncorhynchus kisutch*, con los núcleos divididos, presentan una deficiencia en ácido fólico debido a que su formación depende de la replicación de ADN en los núcleos de los glóbulos rojos (Smith, 1968).

Existen diferentes posiciones en cuanto a la influencia de la condición triploide en el crecimiento y peso de los animales inducidos, unos confirman una superioridad de los peces triploides sobre los diploides (Habicht *et al.*, 1994), otros en cambio demuestran que no existe diferencias (Myers *et al.*, 1991; Carter *et al.*, 1994), y en otros casos los parámetros morfométricos son inferiores en los individuos triploides (Ihssen *et al.*, 1991; Simon *et al.*, 1993; Galbreath *et al.*, 1995).

El análisis estadístico de los datos morfométricos de peso y longitud de las truchas triploides y diploides, no arrojaron diferencias significativas, pero se pudo apreciar gráficamente que los datos son mayores en los individuos triploides. Esto tiene una explicación lógica, en primer lugar debido a que las ventajas de la triploidía se acentúan durante la primera maduración sexual los resultados a esta altura no son definitivos y se debería realizar un pesaje en esta etapa (Thorgaard, 1986). Otra explicación tiene que ver con las diferencias genéticas entre las líneas utilizadas en el experimento (Guo *et al.*; 1990; Myers, 1991).

Sin embargo, la eficiencia del alimento fue mayor (80%) para el tratamiento 100% triploide en relación al grupo diploide (64%), esto quiere decir que la asimilación del alimento es mucho mejor en el primer caso. Imaki (2003), cita que la eficiencia debe estar entre el 60-85%.

V. CONCLUSIONES

- ◆ En el estudio gradual de la embriogénesis se demostró el paso de los estadios de la ova fecundada: mórula, 24 horas; blástula, 48 horas; gástrula, 8 días; neurula, 16 días; embrión oculado, 23 días y eclosión, 40 días.
- ◆ La oculación o inicio del estado embrionario ocurrió a los 23 días a partir de la fecundación. La eclosión se produjo a los 40 días que es el tiempo adecuado para una temperatura del agua de 8°C.
- ◆ Las ovas necesitaron una acumulación de temperatura de 320°C desde su fecundación hasta su eclosión, es decir que necesitó esa cantidad de temperatura para completar su desarrollo embrionario.
- ◆ El tratamiento con mayor mortalidad luego de la aplicación de los choques térmicos correspondió al tratamiento T2D3P2 o T12 con 28°C,

15 minutos de duración y 20 minutos postfertilización, su porcentaje fue de 13,8%.

- ◆ El tratamiento T1D1P1 o T1 presentó la mortalidad mas baja correspondiente a 2,97%, el choque térmico que se aplicó fue de 26°C, 5 minutos de duración y 10 minutos postfertilización.
- ◆ El tratamiento control debido a que no se aplicó ningún choque térmico presentó una mortalidad de 1,5%.
- ◆ El porcentaje de ovas muertas para 26°C es de 5,7% mientras que para 28°C es de 10,6% por lo que a mayor temperatura la mortalidad de las ovas aumenta.
- ◆ La mortalidad de las ovas fertilizadas es mayor conforme aumenta el tiempo de duración del choque. A los 5 minutos el porcentaje es de 5,6%, a los 10 minutos 9,2% y a lo 15 minutos 9,5%.
- ◆ El tiempo postfertilización afecta directamente a la mortalidad de las ovas fertilizadas. A los 20 minutos el porcentaje de mortalidad fue de 9,7% frente al 6,5% que corresponde a los 10 minutos de inicio del choque.
- ◆ Entre los factores temperatura, duración de choque y tiempo de postfertilización existieron diferencias altamente significativas ($p < 0,01$), así como también entre tratamientos, interacciones TP, DP, TDP y para la interacción factoriales versus grupo control o adicional.
- ◆ La mortalidad de las ovas fertilizadas al terminar el periodo embrional, es decir antes de la eclosión corresponde a 48,57%.
- ◆ La supervivencia total de los alevines de trucha arco iris inducidas a triploidía al final del proyecto fue del 41%, destacándose el tratamiento

T7 con un porcentaje de supervivencia del 70,9%, mientras que la más baja correspondió al tratamiento T5 con una supervivencia de 20,07%.

- ◆ El tratamiento más efectivo para la inducción de triploidía fue el choque térmico a 28°C, 10 minutos de duración y 10 minutos postfertilización con un porcentaje de triploidización del 100%.
- ◆ Los núcleos de los eritrocitos de trucha arco iris triploide tienen un diámetro y volumen mayor con medidas de 7,5 a 10,5 μm y 366,66 a 422,17 μm^3 respectivamente; frente a los individuos diploides que presentaron un diámetro y un volumen de 5 a 6,5 μm y 185,30 a 224,05 μm^3 respectivamente.
- ◆ Las placas del frotis sanguíneo de trucha arco iris triploide presentó una segmentación nuclear de los eritrocitos evidenciándose una constricción del núcleo que incluso lo divide en partes iguales, en el caso de las truchas diploides esta alteración no se observó.
- ◆ Para el análisis de laboratorio, se encontró diferencias significativas, mientras que para la fase de campo estadísticamente fue no significativo, hasta el peso de los alevines de 5 g.
- ◆ Los individuos triploides obtuvieron factores de conversión alimenticia con índices más bajos (1,25 y 1,30) y por lo tanto una mejor eficiencia del alimento (80% y 77%), esto implica que su asimilación del alimento es mejor.
- ◆ Los tratamientos que tuvieron una mejor conversión alimenticia son T8 (28°C, durante 10 minutos y 10 minutos de postfertilización) y T9 (28°C, durante 15 minutos y 10 minutos de postfertilización) con un factor de conversión de 1,25 y 1,30 respectivamente.

- ◆ Los factores de conversión más altos y por lo tanto una eficiencia del alimento menor corresponden a los tratamientos donde se aplicaron temperaturas de 26°C y van desde 1,44 hasta 1,66; mientras que los tratamientos a 28°C tienen factores ligeramente menores que van desde 1,25 hasta 1,57.

VI. RECOMENDACIONES

- ◆ Se recomienda calibrar el equipo de baño maría para aplicar los choques térmicos, esto ayuda a mantener la temperatura adecuada del agua durante todos los tratamientos.
- ◆ Se sugiere trabajar con truchas reproductoras sanas y fuertes para que soporten el estrés producido por el traslado y desove.
- ◆ Es importante mantener todas las condiciones asépticas y de bioseguridad durante todas las fases de fertilización, incubación y alevinaje para evitar algún tipo de contaminación en especial la presencia de hongos que causan enfermedades y en las etapas iniciales la muerte.
- ◆ Se recomienda, en lo posible, adaptar a los alevines de trucha arco iris a un horario de alimentación fijo, esto a más de mantener una frecuencia adecuada, evita el desperdicio del alimento que provoca la acumulación de sedimentos que se descomponen en el fondo del estanque.

- Debido a la mínima cantidad de sangre que poseen los alevines, es aconsejable que su extracción se realice mediante el corte caudal, sin embargo se pierden todos los especímenes de muestra pues mueren de inmediato.
- Para los frotis sanguíneos se recomienda utilizar placas portaobjetos nuevas, esto favorecerá a un mejor extendido de la sangre y la tinción no se altera por la presencia de otros reactivos.
- Se recomienda el seguimiento de los parámetros morfométricos hasta la etapa de madurez sexual.

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Aliah, R., Yamahoka, K., Inada, Y., Y Taniguchi, N. (1990). Effects of triploidy on tissue structure of some organs in Ayu - Nippon Suisan Gakkaishi, Okinawa – Japan.
2. Acuagen, (2005). Reproducción y selección de trucha arco iris. Boletín Informativo No 2. Aqua Gen Chile SA
3. Aquatic (1999). Revista AquaTic. N°6
<http://www.revistaaquatic.com/aquatic/html./art601/paramTAI.htm>
4. Arai K. (2000). Genetic improvement of aquaculture finfish species by chromosome manipulation techniques in Japan. Aquaculture.197, 205-228.

5. Baker, R., Hamilton, M. & Parish, A., (2003). Preparations of mammalian karyotypes under field conditions. Occasional Papers, Museum of Texas Tech University 228:8.
6. Bastardo, H. 1999. Efecto del alimento sobre algunos aspectos reproductivos de la trucha arco iris, *Oncorhynchus mykiss*, en un criadero venezolano. Archivos Latin. Nutrición, 49(4),367-372.
7. Billard, R., Fostier, A., Weil, C., & Breton, B. (1982). Endocrine control of spermatogenesis in teleost fish. Can. J. Fish. Aquatic. Sci., 39:65-79
8. Blanco, M. (1995). La trucha: cría industrial. Madrid: Mundi-Prensa Libros. (2da ed.).
9. Boyer, R., (2000). Conceptos en Bioquímica. Editorial Thomson Learning. p. 384
10. Bustos, C., & Landaeta, M., (2005). Desarrollo de huevos y larvas tempranas de la merluza del sur, *Merluccius australis*, Cultivados bajo condiciones de laboratorio. Revista Comunicaciones Breves 69(2), 402-408.
11. Bunge, M., & Cussac, V., (1993). Manipulaciones genéticas en el cultivo de trucha arco iris: posibilidades de aplicación. Aquaculture 33:329-351.

12. Carrasco, L., Doroshov, S., Penman, D., & Bromage, N. (1999). A long-term quantitative analysis of gametogenesis in autotriploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). J Rep Fert. 113:197-210.
13. Carter, C., McCarthy, I., & Houlihan, D. (1994). Food consumption, feeding behavior and growth of triploid and diploid Atlantic salmon, *Salmo salar* L. Canadian Journal of Zoology, 72: 609-617.
14. Chourrout D. (1980). Thermal induction of diploid gynogenesis and triploidy in the eggs of the rainbow trout (*S gairdneri*) after fertilization with gamma irradiated sperm. Reprod. Nutr Dev. 20, 719-726.
15. Chourrout, D. (1984). Pressure-induced retention of second polar body and suppression of first cleavage in rainbow trout: production of all-triploids, all-tetraploids, and heterozygous and homozygous diploid gynogenetics. Aquaculture, 36: 111-126
16. Chourrout, D., Chevassus, B., Quillet, E., Blanc, J., & Guyomard, R. (1988) Improvement of salmonids: selective breeding or genetic manipulations. pp.15
17. Ciereszko, A. y K. Dabrowski. 1995. Sperm quality and ascorbic acid concentration in rainbow trout semen are affected by dietary vitamin C: an across-season study. Biology of Reproduction, 52:982-988.

18. Colihueque, N., Iturra, P., Estay, F., & Díaz, N., (2001). Diploid chromosome number variation and sex chromosome polymorphism in five cultured strains of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture 198:63-77.
19. Conroy, D., & Armas, G. (1987). Manual de Métodos de Diagnóstico en Ictiopatología, con especial referencia a los Salmónidos. Programa Cooperativo Gubernamental de la FAO. Documento de campo 4.
20. Díaz, N., & Neira, R. (2005). Biotecnología Aplicada a la Acuicultura. Biotecnologías clásicas aplicadas a la reproducción de especies cultivadas. Ciencias e Investigación Agraria, 32(1), 45-59.
21. Dillon, J. (1988). Production of Triploid Rainbow Trout for Evaluation in South Dakota Waters. Dakota State University.
22. Dillon, J., & Alexander, Ch., (1997). Hatchery Trout Evaluations, Sterile Trout Investigations. Fishery Research Job Performance Report. 110 (1), 13-21
23. Estay C., Francisco J., (1996). La salmonicultura chilena y la reproducción artificial de los salmonidos. TECNO VET; Año 2. N° 1
24. http://www.tecnovet.uchile.cl/CDA/tecnovet_articulo/0,1409,SCID%253D9348%2526ISID%253D444,00.html.

25. Fernández, A., Blas, I., & Ruiz, I., (2008). El sistema inmune de los teleósteos (I): Células y órganos
26. FAO. (2002). Fisheries and Aquaculture Department.
http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oncorhynchus_mykiss/en
27. Galbreath, P., & Thorgaard, G. (1995). Saltwater performance of all-female triploid Atlantic salmon. Aquaculture, 138: 77-85.
28. Guo, X., Hershberger, W., & Myers, J. (1990). Growth and survival of intrastrain and interstrain rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) triploids. Journal of the World Aquaculture Society, 21: 250-256.
29. Habicht, C., Seeb, J., Gates, R., Brock, I., & Olito, C. (1994) Triploid coho salmon outperform diploid and triploid hybrids between coho salmon and chinook salmon during their first year. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 51: 31-37
30. Hew, C., & Fletcher, G., (2001). The role of aquatic biotechnology in aquaculture. Aquaculture, 197:191-204.
31. Idrovo, R., (2008). Estadística Productiva de la Trucha en Ecuador según Censo Piscícola año 2006. Revista ACUIESPE 2008. 6-9.

32. Ihssen, P., McKay, L., & McMillan, I. (1991). Growth and survival of triploid rainbow trout. Bulletin of the Aquaculture Association of Canada, 3: 13-15.
33. Imaki, A., (2003). Manual de Manejo y Crianza de Trucha arco iris. Quito: GD.
34. Khan, T., Bhise, M., & Lakra, W., (2000) Chromosome manipulation in fish. Indian J. Anim. Sc, 70(2):213-221.
35. Lacadena, J. R. 1981. Genética (3ª edición). Ed. AGESA. p.59
36. Le Comber, S., & Smith, C., (2004). Polyploidy in fishes: patterns and processes. Biological Journal of the Linnean Society. 82, 431–442.
37. Leitritz, E., & Lewis, R. (1980). Cultivo de trucha y salmón (Métodos de pesca), Cal. Fish bull. 164-197.
38. Lincoln, R. (1989). Triploidy induction in the rainbow trout using hydrostatic pressure. American Fishes and U.S. Trout News, 8: 8-11.
39. Lincoln, R., Aulstad, D., & Grammeltvedt, A. (1974). Attempted triploid induction in Atlantic salmon (*Salmo salar L*) using cold shocks. Aquaculture 4:287-297.

40. Lou, Y. & Purdom, C. (1984). Polyploidy induced by hidrostatic pressure in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. Journal of Fish Biology, 25: 345-351.
41. Myers, J. (1991). Triploid incubation and growth performance: a comparison of meiotic and interploid triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) inter- and intrastrain crosses. Dissertation Abstracts International, Part B, Sciences and Engineering, 51: 151.
42. Myers, J., & Hershberger, W. (1991). Early growth and survival of heat-shocked and tetraploid-derived triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture, 96: 97-107.
43. Naturenotes
http://www.naturenotes.org/notes/dbiologia/biologia_desarrollo_embriionario.htm
44. Nelson, J. (1994). Fishes of the world. Tercera edición. New York: John Wiley, Sons, Inc.
45. Neira, R. (1996). Biotecnología aplicada a la salmonicultura chilena. V Encuentro Latinoamericano y del Caribe de Biotecnología Agrícola
46. Niwa, Y., & Clavijo, R., (1997). Métodos Químicos de Análisis. Primera edición. pp 8-14, 22-31.

47. Ortiz, J., Rueda, D., Acosta, A., Garcés, J., Dávila, A., & Solís, T. (2006). Estudio morfológico y citogenética de la preñadilla (*Astroblepus ubidaï*). Revista Ciencia. 9(2), 173-182.
48. Owaga, H. & Salazar, J. (1992). Reproducción de trucha arco iris. Centro de Desarrollo Piscícola y Enseñanza Técnica del Altiplano "Tiquina-Pongo". 35 pp.
49. Pandian, T. & Sheela, S. (1995). Hormonal induction of sex reversal in fish. Aquaculture 138:1-22
50. Pérez Carrasco, L., Penman, D., & Bromage N. (1999). Parámetros Morfométricos de Interés Comercial en Trucha Arcoiris Triploide, *Oncorhynchus mykiss*. Escocia: [University of Stirling](#).
51. Pineda, H., Jaramillo, J., Echeverri, D., & Olivera, M. (2003). Triploidía en trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*): posibilidades en Colombia. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias. 17(1), 45-52.
52. Rougeot, C., Minet, L., Prignon, C., Vanderplasschen, A., Detry, B., Pastoret, P., & Mélard, Ch. (2003). Induce triploidy by heat shock in Eurasian perch, *Perca fluviatilis*. Aquatic Living Resources. 16, 90–94

53. Salinas, C. (2006). Biología de peces triploides. Manual de herramientas de genética en la acuicultura. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso.
54. Scott, A., & Baynes A. 1980. A review of the biology, handling and storage of salmonid spermatozoa, J. Fish Biol., 17:707-739.
55. Shepherd, J., & Bromage, N. (1999). Piscicultura Intensiva. Editorial Acribia. Primera edición. España.
56. Shireman, J. (1984). Control of aquatic weeds with exotic fishes. Distribution, biology, and management of exotic fishes. Johns Hopkins University Press. p. 302-312.
57. Simon, D., Scalet, C., & Dillon, J. (1993). Field performance of triploid and diploid rainbow trout in South Dakota ponds. North American Journal of Fisheries Management, 13: 134-140.
58. Smith, C. (1968). Haematological changes in coho salmon fed a folic acid deficient diet. J Fish Res Bd Can 25:151-156
59. Smith, G. & Tood, T. (1992). Morphological cladistic study of coregonine fishes. Biol. Manag. Coregonid Fishes. Univ. Agr. Tech., Olstzyn – Kortowo.

60. Thorgaard, G., (1977). Heteromorphic sex chromosomes in male rainbow trout. Science 196:900-902.
61. Thorgaard, G., (1981). Polyploidy induced by heat shock in rainbow trout. Trans. Am. Fish. Soc. 10:546-550.
62. Thorgaard, G. (1986). Ploidy manipulation and performance. Aquaculture, 57: 57-64.
63. Valdebenito, I., Vega, R., Alfaro, D., & Sobrazo, C., (1996). Inducción comercial de triploidía en trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). Revista Agro Sur. 24(2), 223-228.
64. Vozzi, P., Sánchez, S., & Permingeat, E., (2003). Inducción de triploidía en *Rhamdia quelen*. Boletín del Instituto de Pesca Sao Paulo. 29(1), 87-94.
65. Wagner, E., (2001). Utah Begins Triploid Rainbow Trout Production. The Ichthyogram Review. 12 (1), 1-3.
66. Wattendorf, R. (1986). Rapid identification of triploid grass carp with a Coulter counter and channelyzer. Progressive Fish Culturist, 48: 125-132.

67. Wlasow, T., Kuzminski, H., Woznicki, P. & Ziomek, E., (2004). Blood Cell Alteration in Triploid Brook Trout *Salvelinus fontinalis* (Mitchill). Acta Veterinaria, 73, 115-118.
68. Woznicki, P. & Kuzminski, H. (2002). Chromosome number and erythrocyte nuclei length in triploid brook trout (*Salvelinus fontinalis*). Caryologia 55: 295-298
69. Yamamoto, T., (1953). Artificially induced sex reversal in genotypic males of the medaka (*Oryzias latipes*). Journal of Experimental Zoology 123:571-594.
70. Yesaki, K. (1958). Guía de truchicultura de la Estación Experimental piscícola de Nagano. Fisheries of the World Nagano - Japón.

RESUMEN

La triploidización es una técnica de manipulación cromosómica conseguida artificialmente mediante la utilización de tratamientos físicos o químicos del óvulo recién activado por el espermatozoide. Estos choques van a ocasionar el bloqueo de la segunda división meiótica (por retención del segundo cuerpo polar), formando un cigoto triploide con tres pares de cromosomas. En este proyecto se indujo la triploidización en trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) mediante la estandarización del choque térmico. Se tomaron en cuenta tres factores para la aplicación de los tratamientos: temperatura (26°C, 28°C), tiempo de duración (5, 10, 15 min.) y tiempo de inicio postfertilización del choque térmico (10, 20 min). Las unidades experimentales estuvieron representadas por 1000 ovas fecundadas para cada tratamiento, se utilizaron aproximadamente 3088 gramos de ovas obtenidas a partir de 10 hembras y fertilizadas con el semen de 5 machos. La oculación o inicio del estado embrionario ocurrió a los 23 días a partir de la fecundación y eclosionaron a los 40 días a una temperatura media de 8°C, 6.8 mg/l de oxígeno disuelto y pH 6.5. En el estudio gradual de la embriogénesis se demostró el paso de los estadios de la ova fecundada: mórula, 24 horas; blástula, 48 horas; gástrula, 8 días; neurula, 16 días; embrión oculado, 23 días y eclosión, 40 días. El análisis de las interacciones de los factores usados para el choque térmico demostró que existe una mayor mortalidad de las ovas a una temperatura de 28°C, 10 - 15 minutos de duración del choque y 20 minutos post fertilización. Los núcleos de los eritrocitos de las trucha arco iris triploides presentaron un diámetro y volumen de 7,5 a 10 μm y 366,66 a 422,17 μm^3 respectivamente; mientras que para los individuos diploides de 5 a 6,5 μm y 185,30 a 224,05 μm^3 . El tratamiento más efectivo para la inducción de triploidía fue el choque térmico a 28°C, 10 minutos de duración y 10 minutos postfertilización con un porcentaje de triploidización del 100%.

Palabras claves: *Oncorhynchus mykiss*, triploidía, choque térmico, meiosis, cromosoma, eritrocito.

ABSTRACT

The triploidization is a technology of chromosomal manipulation obtained artificially by means of the utilization of physical or chemical treatments of the ovum newly activated by the sperm. These shocks are going to cause the blockade of the second division meiotic (for retention of the second polar body), forming a zygote triploide with three couples of chromosomes, in this project induced the triploidization in the trout rainbow (*Oncorhynchus mykiss*) by means of the standardization of the thermal shock, three factors were born in mind for the application of the treatments: temperature (26°C, 28°C), time of duration (5, 10, 15 min) and time of beginning postfertilization of the thermal shock (10, 20 min). The experimental units are represented by 1000 eggs fertilized for every treatment, approximately 3088 grams were in use of eggs obtained from 10 females and fertilized with the sperm of 5 males. The ovulation or beginning of the embryonic condition happened to 23 days from the fertilization and born to 40 days to an average temperature of 8°C, 6.8 mg/l of oxygen and pH 6.5. In the gradual study of the embryogenesis there was demonstrated the step of the cycles of the fertilized egg: morula, 24 hours; blastocyst, 48 hours; gastrula, 8 days; neurula, 16 days; embryo, 23 days and ,born 40 days. The analysis of the interactions of the factors used for the thermal shock demonstrated that a major mortality of the eggs exists to a temperature of 28°C, 10 - 15 minutes of duration of the shock and 20 minutes post fertilization.

The erythrocytes nucleuses of the rainbow trout triploids presented a diameter and volume from 7,5 to 10µm and 366,66 to 422,17 µm³ respectively; whereas for the individuals diploids from 5 to 6,5 µm and 185,30 to 224,05 µm³. The most effective treatment for the induction of triploid was the thermal shock to 28°C, 10 minutes of duration and 10 minutes postfertilization with a percentage of triploidización of 100 %.

Key words: *Oncorhynchus mykiss*, triploid, thermal shock, meiosis, chromosome, eggs

ANEXOS

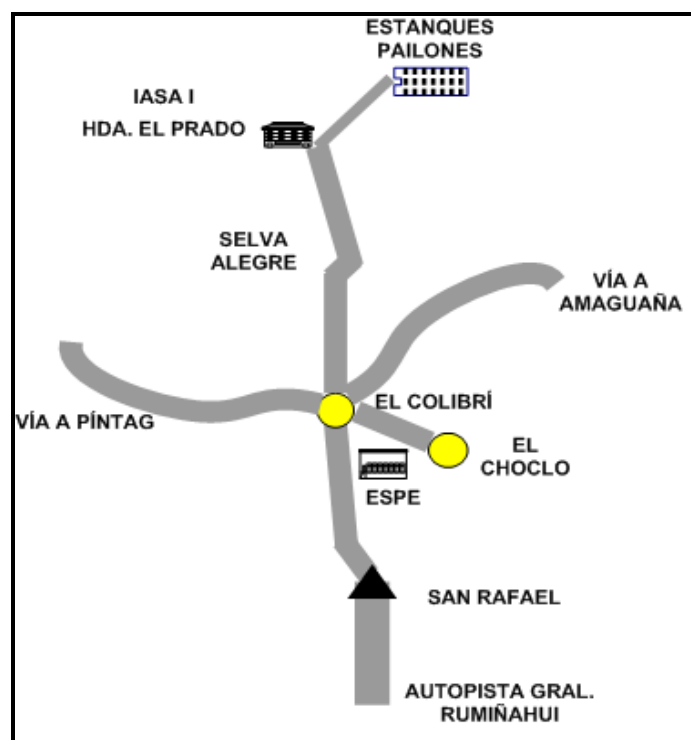
Anexo 1

Mapa de ubicación del Centro de Investigaciones Acuícolas



Anexo 2

Mapa de ubicación del IASA I Hda. El Prado.



Anexo 3

Preparación y lavado con OSVAN (cloruro de belzankoniun) de las canastillas de incubación por parte del Lic. Jaime Idrovo y la autora.



Anexo 4

Equipo de baño maría ADVANTEC LD-270 WATER BATH para la inducción de triploidía por aplicación de los choques térmicos



Anexo 5

Selección de los reproductores de trucha arco iris para comprobar la madurez sexual y ser utilizados para la tesis de grado.



Anexo 6

Desove de truchas arco iris utilizando el soporte de extracción de ovas



Anexo 7

Observación de la motilidad de los espermatozoides de las truchas para garantizar la fecundación artificial.



Anexo 8

Aplicación de los choques térmicos a las ovas fecundadas por baño termostático.



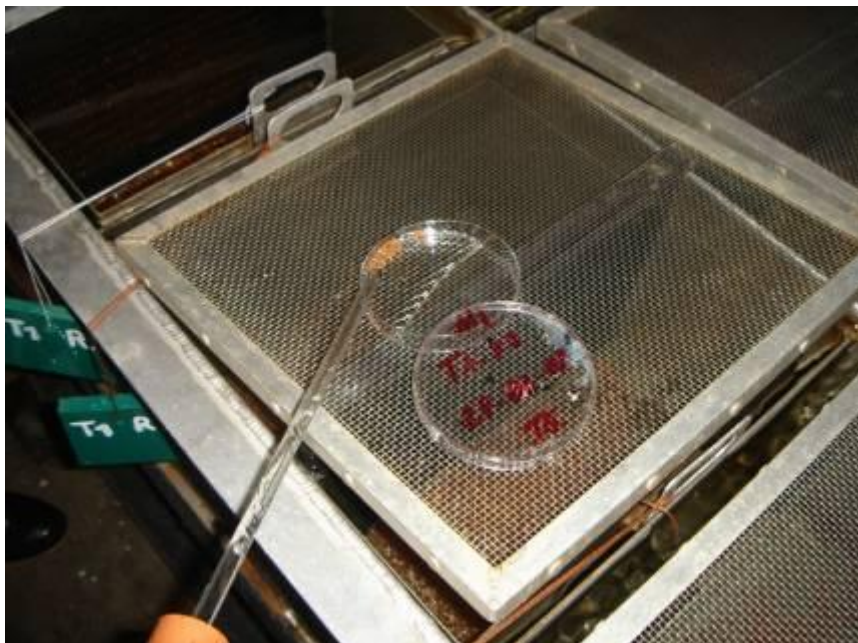
Anexo 9

Eliminación de ovas muertas en cada una de las incubadoras previamente etiquetadas para obtener la mortalidad tras los choques térmicos.



Anexo 10

Toma de muestras para estudio gradual de la embriogénesis para conocer los diferentes estadios de la ova fecundada y el tiempo en el que ocurre cada cambio



Anexo 11

Traslado de las ovas fecundadas hasta el Laboratorio de Biotecnología para su posterior eclosión.



Anexo 12

Pesaje de alevines con saco vitelino



Anexo 13

Alevines deformes debidos a la alta consaguinidad de las truchas reproductoras. Deformidades de la región caudal y ausencia de lóbulos oculares.



Anexo 14

Aparición de alevines siameses que comparten el mismo saco vitelino



Anexo 15

Eliminación de sedimentos en cada unas de las tinas de alevinaje para evitar la proliferación de hongos.



Anexo 16

Estudio del comportamiento y reflejos de los alevines para comprobar su vivacidad y energía.



Anexo 17

Traslado de los alevines desde el CENIAC-P hasta el IASA I (Pailones) para seguir con la segunda etapa de la investigación.



Anexo 18

Depósito de los alevines en cada estanque de Pailones



Anexo 19

Placas de frotis sanguíneo de las truchas arco iris sometidas a triploidización para realizar la medición del volumen nuclear eritrocitario.



Anexo 20

Alimento balanceado para truchas de la línea BIOMIX



Anexo 21

Realización de análisis bromatológico del alimento BIOMIX en el Laboratorio de Nutrición del CENIAC-P



Resultados del análisis bromatológico del alimento balanceado

Anexo 22

Información de la etiqueta del alimento balanceado

**ALIMENTO Nº 1
PELLET GRANULADO**

Proteína min. 50%

Grasa min. 10%

Fibra máx. 1%

Ingredientes: Harina de pescado, aceites marinos, harinas vegetales, premezclas vitamínicas y minerales, antioxidantes, antimicóticos.

Anexo 23

Porcentaje de humedad del alimento balanceado BIOMIX

Muestra	% Humedad
Alimento inicial 0	10%
Alimento 1	10%
Alimento 2	10,2%

Anexo 24

Porcentaje de ceniza del alimento balanceado BIOMIX

Muestra	% Ceniza
Alimento inicial 0	10,35%
Alimento 1	13,27%
Alimento 2	12,85%

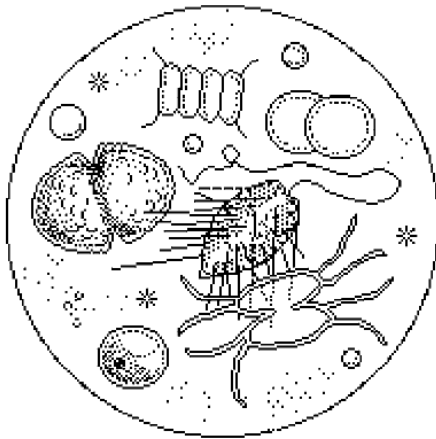
Anexo 25

Porcentaje de proteína del alimento balanceado BIOMIX

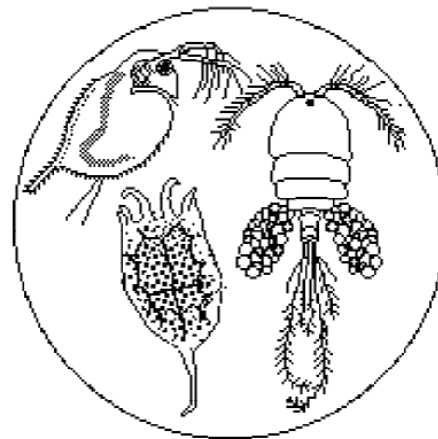
Muestra	% Proteína
Alimento inicial 0	45,8
Alimento 1	45,6
Alimento 2	46,3

Anexo 26

Alimento natural de la trucha arco iris encontrados en medios silvestres



Fitoplancton



Zooplancton

Los organismos naturales alimenticios pueden proporcionar todos los requerimientos nutricionales de los peces.

Anexo 27

Funcionamiento del crecimiento entre los diploides y los triploides de diferentes especies.

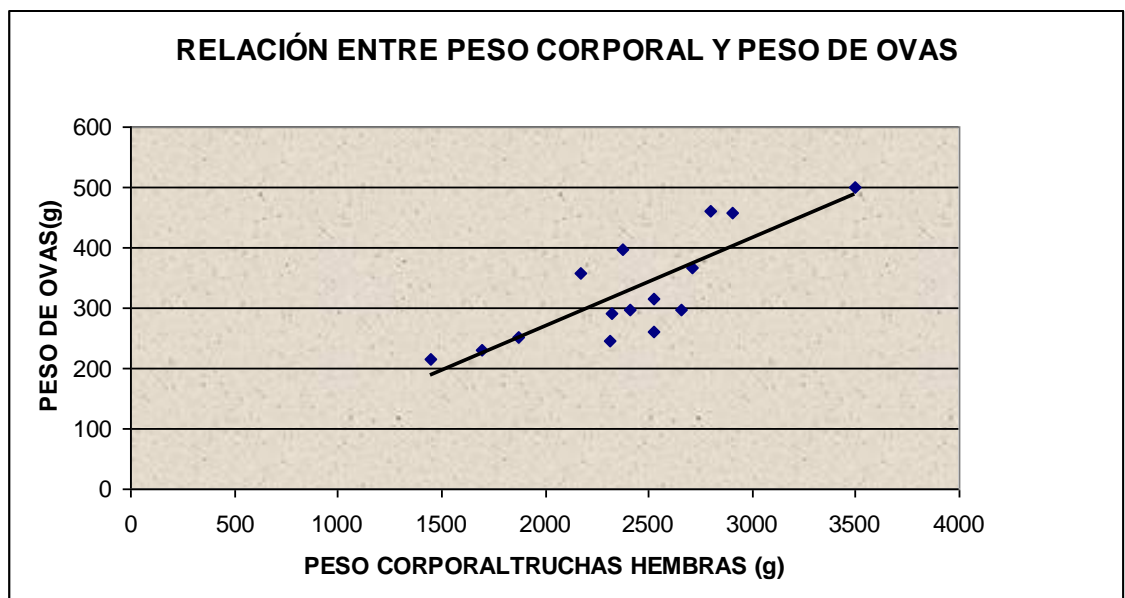
Species	Growth	References
<i>Ictalurus punctatus</i>	+	Wolters et al. (1982b)
<i>Oreochromis niloticus</i>	+	Bramick et al. (1995)
<i>Heteropneustes fossilis</i>	+	Tiwary et al. (1997)
<i>Oreochromis aureus</i>	+	Valenti (1976)
<i>Silurus glanis</i>	+	Krasznai and Marian (1986)
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	-	Solar et al. (1984)
<i>Lepomis gibbosus</i>	-	Kerby et al. (1995)
<i>Oncorhynchus kisutch</i>	-	Withler et al. (1995)
<i>Salmo salar</i>	-	Galbreath et al. (1995)
<i>Misgurnus mizolepis</i>	NC	Kim et al. (1994)
<i>Salmo salar</i>	NC	McGeachy et al. (1995)
<i>Oreochromis niloticus</i>	NC	Hussain et al. (1995)
<i>Oreochromis aureus</i>	NC	Chang et al. (1993)

(+) positive, (-) negative, (NC) no change.

Anexo 28

Relación entre el peso corporal de las truchas reproductoras hembras y las ovas recolectadas tras el desove

PESO CORPORAL (g)	PESO DE OVAS (g)
1446	216
1696	230
2314	246
1876	252
2522	260
2326	290
2410	298
2658	298
2528	314
2168	358
2714	366
2372	396
2902	458
2798	462
3494	500



Parámetros físicos del agua en el CENIAC-P tomados diariamente

LUGAR	TEMPERATURA (°C)			pH	O2 disuelto
	Mañana (7:00 a.m)	Tarde (14:00 p.m)	Noche (18:00 p.m)		
CENIAC-P	7,5	7,5	9,0	6,5	6,8
CENIAC-P	7,2	9,0	9,5	6,5	6,8
CENIAC-P	8,0	9,8	9,8	6,5	6,8
CENIAC-P	7,5	8,5	9,0	6,5	6,8
CENIAC-P	7,0	9,7	9,8	6,5	6,8
CENIAC-P	7,2	8,5	9,7	6,5	6,8
CENIAC-P	8,0	9,4	9,8	6,5	6,26
CENIAC-P	6,8	8,8	9,5	6,5	6,26
CENIAC-P	7,4	8,5	9,0	6,5	6,26
CENIAC-P	7,2	9,0	9,2	6,5	6,26
CENIAC-P	7,5	8,6	8,9	6,5	6,26
CENIAC-P	7,0	8,5	8,5	6,5	6,26
CENIAC-P	6,9	8,6	8,9	6,5	6,26
CENIAC-P	7,0	8,1	9,2	6,5	6,26
CENIAC-P	7,0	8,2	8,8	6,5	6,42
CENIAC-P	6,8	7,5	8,5	6,5	6,42
CENIAC-P	7,0	7,8	8,1	6,5	6,42
CENIAC-P	7,5	8,0	8,5	6,5	6,42
CENIAC-P	7,0	7,5	8,2	6,5	6,42
CENIAC-P	7,1	7,8	8,8	6,5	6,42
CENIAC-P	7,5	8,2	9,5	7	6,25
CENIAC-P	7,9	8,2	8,2	7	6,25
CENIAC-P	7,5	8	8	7	6,25
CENIAC-P	7	8,2	8,5	7	6,25
CENIAC-P	7	8,2	8,5	7	6,25
CENIAC-P	7,5	8	8,1	7	6,25
CENIAC-P	7	8	8,2	7	6,25
CENIAC-P	7,7	9,2	9,5	7	6,25
CENIAC-P	7,5	8,5	9	6,5	6,4
CENIAC-P	7,5	8,8	9	6,5	6,4
CENIAC-P	7,5	8,8	9	6,5	6,4
CENIAC-P	7	9	9	6,5	6,4
CENIAC-P	7	8,8	8,8	6,5	6,4
CENIAC-P	7	8	8,2	6,5	6,4
CENIAC-P	7,5	8	8,2	6,5	6,4
CENIAC-P	7,8	8	8,5	6,5	6,4
CENIAC-P	8,5	9,2	10	6,5	6,4
CENIAC-P	8	8,8	9	6,5	6,4

CENIAC-P	7,8	8,5	9	6,5	6,4
CENIAC-P	7,5	9	9	6,5	6,4
CENIAC-P	7,8	8,8	8,8	6,5	6,4
CENIAC-P	8	8,5	8,8	6,5	6,4
CENIAC-P	7,5	8,8	8,5	6,5	6,4
CENIAC-P	7,2	8	8,5	6,5	6,4
CENIAC-P	7,9	8,2	8,2	6,5	6,4
CENIAC-P	8,3	10,1	10,1	6,5	6,4
CENIAC-P	8,8	9,8	10,2	6,5	6,4
CENIAC-P	8,5	10	10,2	6,5	6,4
CENIAC-P	8,8	10	10,5	7	6,35
CENIAC-P	9	10	10,2	7	6,35
CENIAC-P	8,8	10	10,5	7	6,35
CENIAC-P	8,8	10	10,4	7	6,35
CENIAC-P	8,8	10	10,2	7	6,35
CENIAC-P	8,8	9,5	10,2	7	6,35
CENIAC-P	8,5	9,5	9,5	7	6,35
CENIAC-P	8,1	9,5	10	6,5	6,35
CENIAC-P	8	10	10	6,5	6,35
CENIAC-P	7,3	9,5	10	6,5	6,35
CENIAC-P	7,2	9	9,5	6,5	6,35
CENIAC-P	8,3	9	9	6,5	6,35
CENIAC-P	8	9	9	6,5	6,35
CENIAC-P	8,5	9,7	9,7	6,5	6,35
CENIAC-P	8,7	9,8	10,2	6,5	6,35
CENIAC-P	9	9,2	9,8	6,5	6,35
CENIAC-P	8,8	10,2	10,2	6,5	6,35
CENIAC-P	9	10,5	11	6,5	6,35
CENIAC-P	8	10	10	6,5	6,35
CENIAC-P	7,8	9,5	10	6,5	6,35
CENIAC-P	8	9	9,5	6,5	6,35
CENIAC-P	8,3	9	9	6,5	6,35
CENIAC-P	8	10	10,2	6,5	6,35
CENIAC-P	8,5	9,7	9,7	6,5	6,35
CENIAC-P	8,7	9,8	10,2	6,5	6,35
CENIAC-P	9	9,2	9,8	6,5	6,35
CENIAC-P	8,8	10,2	10,2	6,5	6,35
CENIAC-P	9	10	10,2	6,5	6,35
CENIAC-P	8,8	9,5	10,2	6,5	6,35
CENIAC-P	8,5	9,5	9,5	6,5	6,35
CENIAC-P	8,1	9,5	10	7	6,35
CENIAC-P	8	10	10	7	6,35
CENIAC-P	7,3	9,5	10	7	6,35
CENIAC-P	7,2	9	9,5	7	6,35
CENIAC-P	8,3	9	9	7	6,35

Anexo 30

Parámetros físicos del agua en el IASA I (PAILONES) tomados diariamente

LUGAR	TEMPERATURA (°C) (11:00 a.m)	pH	O2 disuelto
PAILONES	12	8,4	6,2
PAILONES	12	8,4	6,1
PAILONES	12	8,5	6,1
PAILONES	13	8,5	6,3
PAILONES	12	8,5	6,3
PAILONES	13	8,5	6,3
PAILONES	12	8,6	6,3
PAILONES	13	8,5	6,3
PAILONES	12	8,5	6,3
PAILONES	13	8,6	6,3
PAILONES	12	8,6	6,4
PAILONES	13	8,6	6,4
PAILONES	13	8,6	6,4
PAILONES	13	8,6	6,4
PAILONES	12	8,6	6,4
PAILONES	12	8,6	6,3
PAILONES	12	8,6	6,3
PAILONES	13	8,6	6,3
PAILONES	12	8,6	6,3
PAILONES	13	8,6	6,3
PAILONES	13	8,5	6,4
PAILONES	12	8,5	6,2
PAILONES	12	8,5	6,2
PAILONES	12	8,5	6,1
PAILONES	13	8,5	6,4
PAILONES	13	8,3	6,4
PAILONES	12	8,3	6,4
PAILONES	13	8,3	6,4
PAILONES	13	8,3	6,4
PAILONES	12	8,3	6,4
PAILONES	12	8,3	6,4
PAILONES	13	8,5	6,3
PAILONES	12	8,5	6,5
PAILONES	12	8,5	6,5
PAILONES	12	8,5	6,5
PAILONES	13	8,5	6,5
PAILONES	13	8,5	6,5
PAILONES	12	8,3	6,5

Mortalidad de ovas fertilizadas de trucha arco iris

Prueba de Tukey al 5% para la mortalidad de ovas fertilizadas de trucha arco iris luego de la aplicación de choques térmicos.

			TUKEY 5%							
			TRATAMIENTO	T	D	P	TP	DP	TDP	FvsADC
x	xmedia	x-xmedia	4,18	0,96	1,42	0,96	1,36	2,01	0,83	0,91
13,8	1,50	12,30	*	*	*	*	*	*	*	*
	2,80	11,00	*	*	*	*	*	*	*	*
	2,97	10,83	*	*	*	*	*	*	*	*
	3,27	10,53	*	*	*	*	*	*	*	*
	3,40	10,40	*	*	*	*	*	*	*	*
	8,03	5,77	*	*	*	*	*	*	*	*
	8,10	5,70	*	*	*	*	*	*	*	*
	9,37	4,43	*	*	*	*	*	*	*	*
	10,20	3,60	ns	*	*	*	*	*	*	*
	10,33	3,47	ns	*	*	*	*	*	*	*
	11,37	2,43	ns	*	*	*	*	*	*	*
	11,67	2,13	ns	*	*	*	*	*	*	*

			TUKEY 5%							
			TRATAMIENTO	T	D	P	TP	DP	TDP	FvsADC
x	xmedia	x-xmedia	4,18	0,96	1,42	0,96	1,36	2,01	0,83	0,91
11,67	1,50	10,17	*	*	*	*	*	*	*	*
	2,80	8,87	*	*	*	*	*	*	*	*
	2,97	8,70	*	*	*	*	*	*	*	*
	3,27	8,40	*	*	*	*	*	*	*	*
	3,40	8,27	*	*	*	*	*	*	*	*
	8,03	3,64	ns	*	*	*	*	*	*	*
	8,10	3,57	ns	*	*	*	*	*	*	*
	9,37	2,30	ns	*	*	*	*	*	*	*
	10,20	1,47	ns	*	*	*	*	ns	*	*
	10,33	1,34	ns	*	ns	*	*	ns	*	*
	11,37	0,30	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

			TUKEY 5%							
			TRATAMIENTO	T	D	P	TP	DP	TDP	FvsADC
x	xmedia	x-xmedia	4,18	0,96	1,42	0,96	1,36	2,01	0,83	0,91
11,37	1,50	9,87	*	*	*	*	*	*	*	*
	2,80	8,57	*	*	*	*	*	*	*	*
	2,97	8,40	*	*	*	*	*	*	*	*
	3,27	8,10	*	*	*	*	*	*	*	*
	3,40	7,97	*	*	*	*	*	*	*	*
	8,03	3,34	ns	*	*	*	*	*	*	*
	8,10	3,27	ns	*	*	*	*	*	*	*
	9,37	2,00	ns	*	*	*	*	ns	*	*
	10,20	1,17	ns	*	ns	*	ns	ns	*	*

	10,33	1,04	ns	*	ns	*	ns	ns	*	*
--	-------	------	----	---	----	---	----	----	---	---

			TUKEY 5%							
			TRATAMIENTO	T	D	P	TP	DP	TDP	FvsADC
			4,18	0,96	1,42	0,96	1,36	2,01	0,83	0,91
10,33	1,50	8,83	*	*	*	*	*	*	*	*
	2,80	7,53	*	*	*	*	*	*	*	*
	2,97	7,36	*	*	*	*	*	*	*	*
	3,27	7,06	*	*	*	*	*	*	*	*
	3,40	6,93	*	*	*	*	*	*	*	*
	8,03	2,30	ns	*	*	*	*	*	*	*
	8,10	2,23	ns	*	*	*	*	*	*	*
	9,37	0,96	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	*
	10,20	0,13	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

			TUKEY 5%							
			TRATAMIENTO	T	D	P	TP	DP	TDP	FvsADC
			4,18	0,96	1,42	0,96	1,36	2,01	0,83	0,91
10,20	1,50	8,70	*	*	*	*	*	*	*	*
	2,80	7,40	*	*	*	*	*	*	*	*
	2,97	7,23	*	*	*	*	*	*	*	*
	3,27	6,93	*	*	*	*	*	*	*	*
	3,40	6,80	*	*	*	*	*	*	*	*
	8,03	2,17	ns	*	*	*	*	*	*	*
	8,10	2,10	ns	*	*	*	*	*	*	*
	9,37	0,83	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

			TUKEY 5%							
			TRATAMIENTO	T	D	P	TP	DP	TDP	FvsADC
			4,18	0,96	1,42	0,96	1,36	2,01	0,83	0,91
9,37	1,50	7,87	*	*	*	*	*	*	*	*
	2,80	6,57	*	*	*	*	*	*	*	*
	2,97	6,40	*	*	*	*	*	*	*	*
	3,27	6,10	*	*	*	*	*	*	*	*
	3,40	5,97	*	*	*	*	*	*	*	*
	8,03	1,34	ns	*	ns	*	*	ns	*	*
	8,10	1,27	ns	*	ns	*	ns	ns	*	*

			TUKEY 5%							
			TRATAMIENTO	T	D	P	TP	DP	TDP	FvsADC
			4,18	0,96	1,42	0,96	1,36	2,01	0,83	0,91
8,10	1,50	6,60	*	*	*	*	*	*	*	*
	2,80	5,30	*	*	*	*	*	*	*	*
	2,97	5,13	*	*	*	*	*	*	*	*
	3,27	4,83	*	*	*	*	*	*	*	*
	3,40	4,70	*	*	*	*	*	*	*	*
	8,03	0,07	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

TUKEY 5%

			TRATAMIENTO	T	D	P	TP	DP	TDP	FvsADC
x	xmedia	x-xmedia	4,18	0,96	1,42	0,96	1,36	2,01	0,83	0,91
8,03	1,50	6,53	*	*	*	*	*	*	*	*
	2,80	5,23	*	*	*	*	*	*	*	*
	2,97	5,06	*	*	*	*	*	*	*	*
	3,27	4,76	*	*	*	*	*	*	*	*
	3,40	4,63	*	*	*	*	*	*	*	*

TUKEY 5%										
			TRATAMIENTO	T	D	P	TP	DP	TDP	FvsADC
x	xmedia	x-xmedia	4,18	0,96	1,42	0,96	1,36	2,01	0,83	0,91
3,40	1,50	1,90	ns	*	*	*	*	ns	*	*
	2,80	0,60	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	2,97	0,43	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	3,27	0,13	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

TUKEY 5%										
			TRATAMIENTO	T	D	P	TP	DP	TDP	FvsADC
x	xmedia	x-xmedia	4,18	0,96	1,42	0,96	1,36	2,01	0,83	0,91
3,27	1,50	1,77	ns	*	*	*	*	ns	*	*
	2,80	0,47	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	2,97	0,30	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

TUKEY 5%										
			TRATAMIENTO	T	D	P	TP	DP	TDP	FvsADC
x	xmedia	x-xmedia	4,18	0,96	1,42	0,96	1,36	2,01	0,83	0,91
2,97	1,50	1,47	ns	*	*	*	*	ns	*	*
	2,80	0,17	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

TUKEY 5%										
			TRATAMIENTO	T	D	P	TP	DP	TDP	FvsADC
x	xmedia	x-xmedia	4,18	0,96	1,42	0,96	1,36	2,01	0,83	0,91
2,80	1,50	1,30	ns	*	*	*	*	ns	*	*

Rangos de significancia usando la prueba de Tukey al 5% para cada tratamiento.

RATAMIENTO	xmedia	RANGOS SIGNIFICANCIA	
T13	1,50	A	
T2	2,80	A	
T1	2,97	A	
T3	3,27	A	
T4	3,40	A	
T10	8,03		B
T7	8,10		B
T6	9,37		B
T5	10,20		C
T8	10,33		C
T9	11,37		C
T11	11,67		C
T12	13,80		C

Anexo 33

Rangos de significancia usando la prueba de Tukey al 5% para el factor temperatura de choque.

TRATAMIENTO	xmedia	RANGOS SIGNIFICANCIA		
T13	1,50			
T2	2,80	A		
T1	2,97	A		
T3	3,27	A		
T4	3,40	A		
T10	8,03		B	
T7	8,10		B	
T6	9,37			C
T5	10,20			C
T8	10,33			D
T9	11,37			D
T11	11,67			D
T12	13,80			D

Anexo 34

Rangos de significancia usando la prueba de Tukey al 5% para el factor duración de choque.

TRATAMIENTO	xmedia	RANGOS SIGNIFICANCIA		
T13	1,50			
T2	2,80	A		
T1	2,97	A		
T3	3,27	A		
T4	3,40	A		
T10	8,03		B	
T7	8,10		B	
T6	9,37			C
T5	10,20			C
T8	10,33			D
T9	11,37			D
T11	11,67			D
T12	13,80			D

Anexo 35

Rangos de significancia usando la prueba de Tukey al 5% para el factor tiempo de postfertilización.

TRATAMIENTO	xmedia	RANGOS SIGNIFICANCIA		
T13	1,50			
T2	2,80	A		
T1	2,97	A		
T3	3,27	A		
T4	3,40	A		
T10	8,03		B	
T7	8,10		B	
T6	9,37			C
T5	10,20			C
T8	10,33			C
T9	11,37			D
T11	11,67			D
T12	13,80			D

Anexo 36

Rangos de significancia usando la prueba de Tukey al 5% para la interacción TP.

TRATAMIENTO	xmedia	RANGOS SIGNIFICANCIA			
T13	1,50				
T2	2,80	A			
T1	2,97	A			
T3	3,27	A			
T4	3,40	A			
T10	8,03		B		
T7	8,10		B		
T6	9,37			C	
T5	10,20			C	
T8	10,33				D
T9	11,37				D
T11	11,67				D
T12	13,80				D

Anexo 37

Rangos de significancia usando la prueba de Tukey al 5% para la interacción DP.

TRATAMIENTO	xmedia	RANGOS SIGNIFICANCIA			
T13	1,50				
T2	2,80	A			
T1	2,97	A			
T3	3,27	A			
T4	3,40	A			
T10	8,03		B		
T7	8,10		B		
T6	9,37			C	
T5	10,20			C	
T8	10,33			C	
T9	11,37				D
T11	11,67				D
T12	13,80				D

Anexo 38

Rangos de significancia usando la prueba de Tukey al 5% para la interacción TDP.

TRATAMIENTO	xmedia	RANGOS SIGNIFICANCIA		
T13	1,50			
T2	2,80	A		
T1	2,97	A		
T3	3,27	A		
T4	3,40	A		
T10	8,03		B	
T7	8,10		B	
T6	9,37			C
T5	10,20			C
T8	10,33			C
T9	11,37			D
T11	11,67			D
T12	13,80			D

Anexo 39

Rangos de significancia usando la prueba de Tukey al 5% para la interacción Factorial versus Adicional.

TRATAMIENTO	xmedia	RANGOS SIGNIFICANCIA		
T13	1,50	A		
T2	2,80		B	
T1	2,97		B	
T3	3,27		B	
T4	3,40		B	
T10	8,03			C
T7	8,10			C
T6	9,37			C
T5	10,20			D
T8	10,33			D
T9	11,37			D
T11	11,67			D
T12	13,80			D

Anexo 40

Mortalidad de ovas fertilizadas de trucha hasta la eclosión

Prueba de Tukey al 5% para la mortalidad de ovas fertilizadas de trucha arco iris hasta la eclosión.

			TUKEY 5% TRATAMIENTO
x	xmedia	x-xmedia	15,31
76,2	16,80	59,40	*
	21,50	54,70	*
	37,07	39,13	*
	38,13	38,07	*
	41,53	34,67	*
	45,77	30,43	*
	50,27	25,93	*
	55,23	20,97	*
	55,83	20,37	*
	59,47	16,73	*
	61,93	14,27	ns
	71,70	4,50	ns

			TUKEY 5%
x	xmedia	x-xmedia	15,31
71,7	16,80	54,90	*
	21,50	50,20	*
	37,07	34,63	*
	38,13	33,57	*
	41,53	30,17	*
	45,77	25,93	*
	50,27	21,43	*
	55,23	16,47	*
	55,83	15,87	*
	59,47	12,23	ns
	61,93	9,77	ns

			TUKEY 5%
x	xmedia	x-xmedia	15,31
61,93	16,80	45,13	*
	21,50	40,43	*
	37,07	24,86	*
	38,13	23,80	*
	41,53	20,40	*
	45,77	16,16	*
	50,27	11,66	ns
	55,23	6,70	ns
	55,83	6,10	ns
	59,47	2,46	ns

x	xmedia	x-xmedia	TUKEY 5%
			15,31
59,47	16,80	42,67	*
	21,50	37,97	*
	37,07	22,40	*
	38,13	21,34	*
	41,53	17,94	*
	45,77	13,70	ns
	50,27	9,20	ns
	55,23	4,24	ns
	55,83	3,64	ns

x	xmedia	x-xmedia	TUKEY 5%
			15,31
55,83	16,80	39,03	*
	21,50	34,33	*
	37,07	18,76	*
	38,13	17,70	*
	41,53	14,30	ns
	45,77	10,06	ns
	50,27	5,56	ns
	55,23	0,60	ns

x	xmedia	x-xmedia	TUKEY 5%
			15,31
55,23	16,80	38,43	*
	21,50	33,73	*
	37,07	18,16	*
	38,13	17,10	*
	41,53	13,70	ns
	45,77	9,46	ns
	50,27	4,96	ns

x	xmedia	x-xmedia	TUKEY 5%
			15,31
50,27	16,80	33,47	*
	21,50	28,77	*
	37,07	13,20	ns
	38,13	12,14	ns
	41,53	8,74	ns
	45,77	4,50	ns

x	xmedia	x-xmedia	TUKEY 5%
			15,31
45,77	16,80	28,97	*
	21,50	24,27	*
	37,07	8,70	ns
	38,13	7,64	ns
			TUKEY 5%

x	xmedia	x-xmedia	15,31
41,53	16,80	24,73	*
	21,50	20,03	*
	37,07	4,46	ns
	38,13	3,40	ns

			TUKEY 5%
x	xmedia	x-xmedia	15,31
38,13	16,80	21,33	*
	21,50	16,63	*
	37,07	1,06	ns

			TUKEY 5%
x	xmedia	x-xmedia	15,31
37,07	16,80	20,27	*
	21,50	15,10	*

			TUKEY 5%
x	xmedia	x-xmedia	15,31
21,5	16,80	4,70	ns

Anexo 41

Factor de conversión Alimenticia

Prueba de Tukey al 5% para el factor de conversión alimenticia de trucha arco iris al evaluar el efecto de T, P y D.

			TUKEY 5%		
x	xmedia	x-xmedia	TRATAMIENTO	T	P
			0,36	0,08	0,08
1,66	1,25	0,41	*	*	*
	1,30	0,36	*	*	*
	1,40	0,26	ns	*	*
	1,42	0,24	ns	*	*
	1,44	0,22	ns	*	*
	1,44	0,22	ns	*	*
	1,44	0,22	ns	*	*
	1,51	0,15	ns	*	*
	1,56	0,10	ns	*	*
	1,57	0,09	ns	*	*
	1,57	0,09	ns	*	*
	1,65	0,01	ns	ns	ns

			TUKEY 5%		
			TRATAMIENTO	T	P
x	xmedia	x-xmedia	0,36	0,08	0,08
1,65	1,25	0,40	*	*	*
	1,30	0,35	ns	*	*
	1,40	0,25	ns	*	*
	1,42	0,23	ns	*	*
	1,44	0,21	ns	*	*
	1,44	0,21	ns	*	*
	1,44	0,21	ns	*	*
	1,51	0,14	ns	*	*
	1,56	0,09	ns	*	*
	1,57	0,08	ns	ns	ns
	1,57	0,08	ns	ns	ns

			TUKEY 5%		
			TRATAMIENTO	T	P
x	xmedia	x-xmedia	0,36	0,08	0,08
1,57	1,25	0,32	ns	*	*
	1,30	0,27	ns	*	*
	1,40	0,17	ns	*	*
	1,42	0,15	ns	*	*
	1,44	0,13	ns	*	*
	1,44	0,13	ns	*	*
	1,44	0,13	ns	*	*
	1,51	0,06	ns	ns	ns
	1,56	0,01	ns	ns	ns
	1,57	0,00	ns	ns	ns

			TUKEY 5%		
			TRATAMIENTO	T	P
x	xmedia	x-xmedia	0,36	0,08	0,08
1,57	1,25	0,32	ns	*	*
	1,30	0,27	ns	*	*
	1,40	0,17	ns	*	*
	1,42	0,15	ns	*	*
	1,44	0,13	ns	*	*
	1,44	0,13	ns	*	*
	1,44	0,13	ns	*	*
	1,51	0,06	ns	ns	ns
	1,56	0,01	ns	ns	ns

			TUKEY 5%		
			TRATAMIENTO	T	P
x	xmedia	x-xmedia	0,36	0,08	0,08
1,56	1,25	0,31	ns	*	*
	1,30	0,26	ns	*	*
	1,40	0,16	ns	*	*
	1,42	0,14	ns	*	*
	1,44	0,12	ns	*	*
	1,44	0,12	ns	*	*
	1,44	0,12	ns	*	*
	1,51	0,05	ns	ns	ns

			TUKEY 5%		
			TRATAMIENTO	T	P
x	xmedia	x-xmedia	0,36	0,08	0,08
1,51	1,25	0,26	ns	*	*
	1,30	0,21	ns	*	*
	1,40	0,11	ns	*	*
	1,42	0,09	ns	*	*
	1,44	0,07	ns	ns	ns
	1,44	0,07	ns	ns	ns
	1,44	0,07	ns	ns	ns

			TUKEY 5%		
			TRATAMIENTO	T	P
x	xmedia	x-xmedia	0,36	0,08	0,08
1,44	1,25	0,19	ns	*	*
	1,30	0,14	ns	*	*
	1,40	0,04	ns	ns	ns
	1,42	0,02	ns	ns	ns
	1,44	0,00	ns	ns	ns
	1,44	0,00	ns	ns	ns

			TUKEY 5%		
			TRATAMIENTO	T	P
x	xmedia	x-xmedia	0,36	0,08	0,08
1,44	1,25	0,19	ns	*	*
	1,30	0,14	ns	*	*
	1,40	0,04	ns	ns	ns
	1,42	0,02	ns	ns	ns
	1,44	0,00	ns	ns	ns

TUKEY 5%

			TRATAMIENTO	T	P
x	xmedia	x-xmedia	0,36	0,08	0,08
1,44	1,25	0,19	ns	*	*
	1,30	0,14	ns	*	*
	1,40	0,04	ns	ns	ns
	1,42	0,02	ns	ns	ns

			TUKEY 5%		
			TRATAMIENTO	T	P
x	xmedia	x-xmedia	0,36	0,08	0,08
1,42	1,25	0,17	ns	*	*
	1,30	0,12	ns	*	*
	1,40	0,02	ns	ns	ns

			TUKEY 5%		
			TRATAMIENTO	T	P
x	xmedia	x-xmedia	0,36	0,08	0,08
1,4	1,25	0,15	ns	*	*
	1,30	0,10	ns	*	*

			TUKEY 5%		
			TRATAMIENTO	T	P
x	xmedia	x-xmedia	0,36	0,08	0,08
1,3	1,25	0,05	ns	ns	ns

Anexo 42

Rangos de significancia usando la prueba de Tukey al 5% para cada tratamiento.

TRATAMIENTO	xmedia	RANGOS SIGNIFICANCIA
T8	1,25	A
T9	1,30	A
T3	1,40	B
T2	1,42	B
T1	1,44	B
T11	1,44	B
T12	1,44	B
T7	1,51	B
T10	1,56	B
T6	1,57	B
T13	1,57	B
T4	1,65	B
T5	1,66	B

Anexo 43

Rangos de significancia usando la prueba de Tukey al 5% para el factor temperatura.

TRATAMIENTO	xmedia	RANGOS SIGNIFICANCIA	
T8	1,25	A	
T9	1,30	A	
T3	1,40		B
T2	1,42		B
T1	1,44		B
T11	1,44		B
T12	1,44		B
T7	1,51		C
T10	1,56		C
T6	1,57		C
T13	1,57		C
T4	1,65		D
T5	1,66		D

Anexo 44

Rangos de significancia usando la prueba de Tukey al 5% para el factor tiempo de postfertilización.

TRATAMIENTO	xmedia	RANGOS SIGNIFICANCIA	
T8	1,25	A	
T9	1,30	A	
T3	1,40		B
T2	1,42		B
T1	1,44		B
T11	1,44		B
T12	1,44		B
T7	1,51		C
T10	1,56		C
T6	1,57		C
T13	1,57		C
T4	1,65		D
T5	1,66		D

Anexo 45

Glosario de términos

Acuicultura: Conjunto de actividades destinadas al desarrollo de animales y al cultivo de plantas en el medio acuático.

Arquenterón: Cavidad tubular formada en el embrión durante la gastrulación.

Blastocele: Primera cavidad general del embrión de los animales.

Blastoporo: Orificio de la gástrula originado por reducción en diámetro de la invaginación formadora del arquenterón.

Cartílago: Tejido de sostén formado por células de morfología variable separadas por una sustancia fundamental sólida constituida por colágeno.

Caudal: Relativo a la cola.

Cautiverio: Situación de un animal que se encuentra fuera de su hábitat natural.

Cefálico: Relativo a la cabeza.

Cigoto: Célula resultante de la unión de dos gametos, uno masculino y otro femenino.

Citogenética: Parte de la biología que estudia los fenómenos de la herencia, atendiendo al comportamiento de los cromosomas dentro de la célula.

Citoplasma.- Parte del protoplasma de la célula que rodea el núcleo.

Código genético: Sistema de codificación, traducción y transcripción de la información genética acumulada en las moléculas de ADN de los cromosomas.

Consanguinidad: Cruzamiento entre individuos perteneciente a la misma familia o de genotipos idénticos o muy parecido.

Corión. Una de las envolturas del embrión de varias especies ovíparas.

Cromosoma: Elemento compuesto por ADN y proteínas básicas, que existe en el interior del núcleo y desempeña un papel muy importante en la división celular y en la transmisión de los caracteres hereditarios.

Dimorfismo: Carácter que presentan algunas especies animales y vegetales y según el cual individuos de una misma especie presentan rasgos morfológicos diferenciados.

Eclosión: Brote, nacimiento, aparición.

Embrión.- Primeras fases de un ser vivo después de la fecundación del óvulo.

Endócrina: Relativo a las hormonas o a las secreciones internas.

Endogamia: Fecundación mediante la unión de células de igual origen.

Filogenia.- Parte de la biología que se ocupa de las relaciones de parentesco entre los distintos grupos de seres vivos. Origen y desarrollo evolutivo de las especies, y de las estirpes de seres vivos.

Fisiológico: Ciencia que estudia el funcionamiento de los seres vivos, en los que se respecta a sus funciones vitales, ocupándose de las actividades de órganos y tejidos.

Folículo: Pequeña vesícula de la corteza de los ovarios que contiene en su interior el óvulo.

Fusiforme.- De figura de huso.

Gametos.- Cada una de las dos células, que en la reproducción sexual, se fusionan originando al cigoto.

Gónadas: Órgano del aparato reproductor de los animales en el que se forman y liberan los gametos.

Homólogo: Órganos de los animales o vegetales de especies diferentes que tienen el mismo origen embriológico, sin tener necesariamente su forma y función.

Isotónico: Soluciones que a la misma temperatura, tienen igual presión osmótica.

Lacustre: Relativo a los lagos.

Meiosis: Tipo especial de división celular que tiene lugar en las células germinales, y cuya finalidad es producir gametos maduros con un número de cromosomas reducido a la mitad del que poseen las células somáticas.

Metabolismo: Conjunto de reacciones químicas a que son sometidas las sustancias ingeridas o absorbidas por los seres vivos hasta que suministran energía o hasta que pasan a formar parte de la propia arquitectura estructural.

Micrópilo: Apertura apical en el tegumento del óvulo.

Mitosis: División celular indirecta que consta de dos procesos muy diferenciados; la división nuclear y la del resto de las estructuras citológicas.

Morfología: Ciencia que tiene por objeto el estudio y la descripción de los caracteres somáticos de las especies animales y vegetales.

Ontogenia: Conjunto de los fenómenos de desarrollo y diferenciación del individuo a partir del huevo fecundado.

Oocito: Célula germinal femenina que da lugar al óvulo.

Patología: Parte de la medicina que estudia la naturaleza de las enfermedades, especialmente los cambios estructurales y funcionales que determinan en el organismo.

pH: Potencial hidrogeno cuya escala demuestra la acidez o alcalinidad de ciertas sustancias.

Piscicultura: Arte de repoblar de peces los ríos y los estanques; de dirigir y fomentar la reproducción de peces y mariscos.

Taxonomía: Ciencia biológica que estudia la clasificación de los seres vivos según sus afinidades morfológicas, fisiológicas, genéticas y filogenéticos.

Testosterona: Hormona sexual masculina de naturaleza andrógena que se forma a partir de la progesterona en las células intersticiales de los testículos.

Vitelo.- Conjunto de sustancias de reserva del ovoplasma, formado por lecitinas, glucógeno, proteínas, colesterol, organizados en forma de glóbulos.