

[Ir a Tabla de Contenido](#)

**RENDIMIENTO DE DOS TÉCNICAS PARA LA PRODUCCIÓN DE PECES NATIVOS
COLOMBIANOS CON POTENCIAL PARA LA ACUACULTURA**

- 1. Vitalidad y Ultraestructura del Esperma de Bagre Rayado *Pseudoplatystoma fasciatum* Criopreservado con DMSO y Metanol a Diferentes Concentraciones**
- 2. Inducción Hormonal (HCG) al Desove y Larvicultura del Pargo Lunarejo *Lutjanus guttatus* como Alternativa de Diversificación para la Maricultura en el Pacífico Colombiano**

JUAN FELIPE SIERRA-DE LA ROSA

UNIVERSIDAD JORGE TADEO LOZANO
FACULTAD DE BIOLOGÍA MARINA
BOGOTÁ

2005

**RENDIMIENTO DE DOS TÉCNICAS PARA LA PRODUCCIÓN DE PECES NATIVOS
COLOMBIANOS CON POTENCIAL PARA LA ACUACULTURA**

- 1. Vitalidad y Ultraestructura del Esperma de Bagre Rayado *Pseudoplatystoma fasciatum* Criopreservado con DMSO y Metanol a Diferentes Concentraciones**
- 2. Inducción Hormonal (HCG) al Desove y Larvicultura del Pargo Lunarejo *Lutjanus guttatus* como Alternativa de Diversificación para la Maricultura en el Pacífico Colombiano**

JUAN FELIPE SIERRA-DE LA ROSA

Trabajo de grado como requisito para optar al título de Biólogo Marino

Directora:

OLGA ESPERANZA GONZÁLEZ

Bióloga Marina

Co-Director:

JULIÁN BOTERO

Biólogo Marino

M. Sc. Acuicultura

UNIVERSIDAD JORGE TADEO LOZANO

FACULTAD DE BIOLOGÍA MARINA

BOGOTÁ

2005

Nota de aceptación:

Firma del presidente del jurado

Firma del jurado

Firma del jurado

Ciudad: _____ Fecha _____

A mi familia y amigos
(que son al tiempo una cosa y otra)

Por el aliento y la hermosura.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó gracias al apoyo de la Universidad Jorge Tadeo Lozano (Centro de Investigaciones Científicas y Ambientales 'CICEAM') y el laboratorio de microscopia electrónica de CORPOICA-CEISA, los cuales brindaron toda la infraestructura y equipos necesarios para la evaluación de las muestras de semen criopreservado de bagre rayado. Los ensayos sobre reproducción inducida y larvicultura del pargo lunarejo se realizaron gracias a los aportes financieros y humanos del Instituto Colombiano de Desarrollo Rural 'INCODER', al apoyo logístico de la compañía camaronera C.I. Balboa S.A. que actuó como sede del proyecto y la gestión y participación de la Corporación Centro de Investigación de la Acuicultura de Colombia 'CENIACUA'.

De manera especial quiero agradecer a la directora del trabajo, Olga Esperanza González por compartir conmigo sus conocimientos y apoyar la evolución del trabajo en todo momento; al Dr. Tito Efraín Díaz (Subdirector de Investigación e Innovación de CORPOICA) por permitirme trabajar en las instalaciones del laboratorio y a la bacterióloga Gloria Patricia Barrera (CORPOICA) por su amabilidad y asesoría en la preparación de muestras y operación del microscopio electrónico a pesar de sus múltiples ocupaciones. A Carlos Pinzón (INPA), Carlos Lozano (Investigador programa de genética CENIACUA) y Dra. Marcela Salazar (Directora científica CENIACUA) por la colaboración en el análisis estadístico de la vitalidad.

A los directivos de CENIACUA Dr. Carlos Del Castillo Restrepo y Dra. Adriana Senior Mojica por darme la oportunidad de participar en el proyecto y a Julián Botero Arango (Director del Programa de Diversificación de CENIACUA y Co-director del presente trabajo) por sus enseñanzas e iniciarme en el complejo mundo del cultivo de peces marinos.

A los jefes de C.I. Balboa S.A, Jaime Alberto Gutiérrez (planta de proceso), Faustino Santos (finca) y William D'achiardi (laboratorio) y al auxiliar de campo Jairo Lara, por su incondicional colaboración en todas las etapas del proyecto, además de una amistad limpia.

A los biólogos del INCODER Juan Valverde (Q.E.P.D.), Hernando Gamboa y Jimmy Bonilla por sus oportunas asistencias técnicas en torno al diseño del experimento, manejo de animales e incubación y larvicultura, respectivamente. A los investigadores Jorge Boza (Universidad Nacional de Costa Rica), Araceli Áviles-Quevedo (CICEAM, México) y Luis Álvarez-Lajonchere (consultor en ictiología y piscicultura - Cuba) por sus valiosos aportes y suministro de material bibliográfico.

También deseo agradecer a todas aquellas personas que directa o indirectamente participaron de todo este proceso: a mis padres Nina y Diego y a mi hermana Laura que a pesar de la distancia iban conmigo a todas partes; a mi familia tumaqueña putativa (Manina y su sonrisa encantadora, papá Willie, tía Gabi, Dianita, Negro Milo, Vice, Mello, Eli, Ana, Leney y Monstruo-Guisell) y la mugrosoloncha por todos los buenos momentos que guardo indelebles en el alma; A Irma, Jaime y Jaimito por tan grata convivencia durante 20 imperceptibles meses.

A todo el personal de Balboa por todo lo compartido, en especial a Nando, Lice, Don Ju, Wilfrido, Cesáreo, Lara, Fredy, Víctor, Martica, Josefina, Oti, Sandra, Don Chucho, Felipe, Wilson, Toño, doña Pola y todos aquellos que su nombre se me escapa en estos momentos. Al pescador Sulio días *La fiera* por su participación clave en la captura de reproductores, al Capitán Hernando Witts por su cooperación en las faenas industriales de pesca, al Capitán Reyna (CCCP) por la red de plancton; a Fernando Quebrada y Vicky del Restaurante El Muelle, por los contactos con pescadores (además de la mejor gastronomía) y por último a la tácita Manigüa, enamorada del Manglar, del Niche y de la Noche, que hace que cada sonrisa atardecer y tumbao en ese pueblo bizarro y truculento se vuelva inolvidable.

PREFACIO

(Sobre los cambios que tuvo el documento final con respecto al anteproyecto de grado)

Este trabajo reúne dos experiencias entorno al manejo de los primeros eslabones en la producción comercial de peces nacionales promisorios. La primera de ellas corresponde a la evaluación de la vitalidad de esperma después de seis años de criopreservación en una especie de dulceacuícola, el bagre rayado, tema original del anteproyecto de grado.

La segunda experiencia se hizo inmediatamente después de finalizar las actividades de criopreservación y corresponde a la reproducción inducida y levante larval de una especie marina, el pargo lunarejo, la cual se convierte en el primer registro documentado en el país con resultados acordes a las investigaciones del momento en esta y otras especies de pargo a nivel mundial. Teniendo en cuenta los aportes generados en ésta experiencia, se planteó al comité evaluador la inclusión de dichos resultados en el trabajo de grado final, con la intención de contribuir a la exploración de nuestras especies para cultivo, obteniendo una respuesta positiva.

ABREVIATURAS COMUNMENTE EMPLEADAS

DMSO: Dimetil sulfóxido

DAH: *Days After Hatch*. Días después de la eclosión.

HCG: Gonadotropina Coriónica Humana.

CONTENIDO

PRIMERA PARTE

Vitalidad y Ultraestructura del Esperma de Bagre Rayado *Pseudoplatystoma fasciatum* Criopreservado con DMSO y Metanol a Diferentes Concentraciones

pag.

RESUMEN

ABSTRACT

INTRODUCCIÓN.....22

1. MARCO CONCEPTUAL.....25

1.1. DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE..... 25

1.2. IMPORTANCIA COMERCIAL 26

1.3. REPRODUCCIÓN 26

1.4. EL ESPERMA DE LOS PECES..... 27

1.4.1. Anormalidades de los espermatozoides..... 28

1.4.1.1. Primarias..... 28

1.4.1.2. Secundarias.....28

1.5. CRIOPRESERVACIÓN.....28

1.5.1. Congelación 28

1.5.2. Descongelación 29

1.5.3. Almacenamiento 29

1.6. CRIOPROTECCIÓN..... 30

1.6.1. Crioprotectores 30

2.6.1.1. Crioprotectores permeables 30

2.6.1.2. Crioprotectores no permeables	31
1.6.2. Vitrificación Parcial	31
2. METODOLOGÍA	32
2.1. ORIGEN DE LAS MUESTRAS DE SEMEN CRIOPRESERVADO ...	32
2.2. PRUEBA DE VITALIDAD	32
2.3. MORFOLOGÍA EN MICROSCOPIA ELECTRÓNICA	33
2.4. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO	34
2.4.1. Análisis descriptivo	34
2.4.2. Análisis preliminar de la vitalidad	34
2.4.3. Análisis por observador	34
2.4.4. Morfología en Microscopia electrónica	35
3. RESULTADOS Y ANÁLISIS	36
3.1. VITALIDAD	36
3.1.1. Análisis descriptivo	36
3.1.2. Análisis preliminar	36
3.1.3. Análisis por observador	39
3.2. MORFOLOGÍA	46
3.2.1. Microscopia óptica	46
3.2.2. Microscopia electrónica	49
3.3. ESTIMACIÓN ALTERNATIVA DE LA VITALIDAD	54
4. CONCLUSIONES	55
5. RECOMENDACIONES	56

LISTA DE TABLAS

	Pag.
<u>Tabla 1.</u> Disponibilidad de muestras para cada tratamiento.....	32
<u>Tabla 2.</u> ANOVA dos factores (e interacción).....	37
<u>Tabla 3.</u> Comparación de Rangos múltiples (LSD) para vitalidad por Observador.....	37
<u>Tabla 4.</u> Comparación de Rangos múltiples (LSD) para vitalidad por Tratamiento.....	38
<u>Tabla 5.</u> Prueba de homogeneidad de varianzas para los diferentes tratamientos de crioprotección (Observador 1).....	40
<u>Tabla 6.</u> Prueba de homogeneidad de varianzas para los diferentes tratamientos de crioprotección.....	40
<u>Tabla 7.</u> Prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para el Observador 1 empleando SPSS for Windows. (A) Rangos; (B) Estadísticos de contraste.....	40
<u>Tabla 8.</u> Prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para el Observador 2 empleando SPSS for Windows. (A) Rangos; (B) Estadísticos de contraste.....	41
<u>Tabla 9.</u> Comparaciones múltiples (prueba de Dunnett) para el Observador 1...	43
<u>Tabla 10.</u> Comparaciones múltiples (prueba de Dunnett) para el Observador 2...	44

LISTA DE FIGURAS

	Pag.
<u>Figura 1.</u> Fotografía de <i>Pseudoplatystoma fasciatum</i>	26
<u>Figura 2.</u> Medias y errores estándar de la vitalidad registrada por los dos observadores.....	36
<u>Figura 3.</u> Grafica de interacción Observador X Tratamiento.....	39
<u>Figura 4.</u> Tinción de vitalidad para espermatozoides criopreservados con metanol 8% (1:10). Células muertas vivas (V) y muertas (M).....	46
<u>Figura 5.</u> Tinción de vitalidad para espermatozoides criopreservados con DMSO 8% (1:10). Células muertas (M) y células vivas (V).....	47
<u>Figura 6.</u> Esperma criopreservado con DMSO 8% (1:10). (D), células coloreadas parcialmente; daño medio de membranas. (M) células muertas. (V) células vivas.....	47
<u>Figura 7.</u> (G) Célula parcialmente coloreada con gránulos en el citoplasma. (V) célula viva. Metanol 8% 1:10.....	48
<u>Figura 8.</u> Células muertas (M) con un menor tamaño que las vivas (V).....	48
<u>Figura 9.</u> Espermatozoides muertos del tratamiento metanol 8% (1:20) en los cuales se observan claramente los flagelos.....	49
<u>Figura 10.</u> Espermatozoides con los gránulos de cromatina (Cr) disgregados debido a la ausencia de la membrana celular. Se observa la cabeza (C), parte media (PM) y el flagelo (F).....	50

<u>Figura 11.</u> Espermatozoide de bagre rayado con mínimas alteraciones estructurales. Se observa la cabeza (C) cubierta casi completamente por la membrana celular (MC), la parte media (PM) y el flagelo (F).....	50
<u>Figura 12.</u> Detalle de la parte media (PM) de los espermatozoides y de la mitocondrias (M).....	51
<u>Figura 13.</u> A. corte transversal aislado de un flagelo (c.t.F) donde se aprecian los microtúbulos (MT). B. Detalle de los nueve microtúbulos dobles (MTdb) dispuestos a manera de anillo y de los dos microtúbulos simples (MTs) ubicados en el centro.....	52
<u>Figura 14.</u> Espermatozoides vivos (V) y muertos (M) al momento de la criopreservación.....	53

CONTENIDO

SEGUNDA PARTE

Inducción Hormonal (HCG) al Desove y Larvicultura del Pargo Lunarejo *Lutjanus guttatus* como alternativa de diversificación para la maricultura en el Pacífico colombiano

	pag.
<u>RESUMEN</u>	58
<u>ABSTRACT</u>	59
<u>INTRODUCCIÓN</u>	60
1. <u>MARCO CONCEPTUAL</u>	62
1.1. <u>REPRODUCTORES</u>	62
1.1.1. <u>Reproductores del medio natural</u>	62
1.1.2. <u>Diferenciación del sexo</u>	62
1.1.3. <u>Determinación del desarrollo sexual en hembras</u>	63
1.1.4. <u>Determinación del desarrollo sexual en machos</u>	63
1.2. <u>INDUCCIÓN AL DESOVE</u>	63
1.3. <u>CUIDADO LARVAL</u>	64
1.3.1. <u>Incubación</u>	64
1.3.2. <u>Larvicultura</u>	64
2. <u>METODOLOGÍA</u>	66
2.1. <u>PESCA DE REPRODUCTORES</u>	66
2.1.1. <u>Faenas Artesanales</u>	66
2.1.2. <u>Control del barotrauma</u>	67
2.1.3. <u>Faenas en embarcaciones industriales</u>	67

2.2.	<u>TRANSPORTE Y ACLIMATACIÓN</u>	68
2.3.	<u>CHEQUEO Y SELECCIÓN DE REPRODUCTORES</u>	68
2.4.	<u>INDUCCIÓN AL DESOVE Y RECOLECCIÓN DE HUEVOS</u>	69
2.4.1.	<u>Número de huevos y porcentaje de fertilización</u>	71
2.4.2.	<u>Efecto de la hormona (HCG) sobre la ovulación</u>	72
2.5.	<u>INCUBACIÓN, ECLOSIÓN E INCIO DE LA LARVICULTURA</u>	72
2.5.1.	<u>Desinfección del agua y aireación</u>	73
2.5.2.	<u>Recambios de agua</u>	73
2.6.	<u>LARVICULTURA Y PRODUCCIÓN DE ALEVINOS</u>	74
2.6.1.	<u>Desarrollo embrionario</u>	74
2.6.2.	<u>Alimentación de larvas y alevinos</u>	74
2.6.3.	<u>Limpieza del fondo de los estanques</u>	75
2.7.	<u>PRODUCCIÓN DE ALIMENTO VIVO</u>	75
2.7.1.	<u>Cultivo de microalgas</u>	75
2.7.2.	<u>Cultivo de rotíferos</u>	76
2.7.3.	<u>Cultivo de Artemia</u>	77
2.7.4.	<u>Captura de plancton silvestre</u>	77
3.	<u>RESULTADOS Y ANÁLISIS</u>	78
3.1.	<u>CAPTURA DE PADROTES</u>	78
3.1.1.	<u>Faenas artesanales</u>	78
3.1.1.1.	<u>Efectividad de las artes de pesca</u>	78
3.1.2.	<u>Faenas en embarcaciones industriales</u>	78
3.1.3.	<u>Rendimiento de las faenas</u>	79
3.2.	<u>INDUCCIÓN HORMONAL</u>	79
3.2.1.	<u>Efecto sobre los reproductores</u>	79
3.2.2.	<u>Fecundidad y porcentaje de fertilización</u>	82
3.2.3.	<u>Efecto de la hormona sobre el desarrollo del ovocito</u>	84

3.3. <u>INCUBACIÓN Y LARVICULTURA</u>	85
3.3.1. <u>Desove exitoso N° 1</u>	86
3.3.1.1. <u>Desarrollo embrionario</u>	86
3.3.1.2. <u>Efecto del tipo de tanque en el desarrollo larval</u> ...	87
3.3.2. <u>Desove exitoso N° 2</u>	89
3.3.2.1. <u>Modificaciones del sistema de larvicultura</u>	89
3.3.2.2. <u>Alimentación y desarrollo de larvas</u>	90
3.3.2.3. <u>Sobrevivencia larval</u>	93
3.3.3. <u>Desove exitoso N° 3</u>	95
3.4. <u>POTENCIAL DE LA ESPECIE</u>	96
4. <u>CONCLUSIONES</u>	97
5. <u>RECOMENDACIONES</u>	98
6. <u>BIBLIOGRAFÍA PRIMERA PARTE</u>	99
<u>SEGUNDA PARTE</u>	105

LISTA DE TABLAS

	pag.
<u>Tabla 1.</u> Alimentos balanceados para camarón empleados en la larvicultura del pargo unarejo <i>L. guttatus</i>	75
<u>Tabla 2.</u> Número de peces capturados e inducidos según el tipo de faena.....	79
<u>Tabla 3.</u> Aspectos relevantes de cada uno de los peces inducidos hormonalmente.....	80
<u>Tabla 4.</u> Número de huevos y % de fertilización de los desoves obtenidos durante el trabajo.....	83
<u>Tabla 5.</u> Diámetro de los ovocitos (a las 0, 24 y 36 horas) de diferentes especies de pargos que han sido inducidas hormonalmente.....	84
<u>Tabla 6.</u> Inducción hormonal con HCG y producción de huevos viables (embrionados) en dos especies de pargo de interés comercial.....	85
<u>Tabla 7.</u> Estadios del desarrollo embrionario y larval de <i>L. guttatus</i>	86
<u>Tabla 8.</u> Cantidad inicial de huevos embrionados y cantidad final de alevinos cosechados en los tanques de larvicultura a los 44 DAH.....	94
<u>Tabla 9.</u> Supervivencia larval en diferentes especies de pargos. Tomado de Boza et. al. (En prensa).....	94

LISTA DE FIGURAS

	pag.
<u>Figura 1.</u> Faena exploratoria de caladeros con un grupo de pescadores locales. (A) pesca al volatín; (B) captura de un ejemplar de pargo lunarejo con palangre.....	66
<u>Figura 2.</u> Tanque de aclimatación de reproductores.....	68
<u>Figura 3.</u> Inyección de hormona (HCG) en la base de la aleta pectoral.....	70
<u>Figura 4.</u> Conformación de tríos reproductivos (1 hembra : 2 machos) en los tanques de desove.....	70
<u>Figura 5.</u> Detalle del colector de huevos anexo al tanque de desove.....	71
<u>Figura 6.</u> (A) Botellones ‘madre’ y (B) botellones de producción.....	76
<u>Figura 7.</u> Botellones de inóculo de rotíferos y tanques para el cultivo masivo....	76
<u>Figura 8.</u> Larva eclosionada de <i>Lutjanus guttatus</i> a 1 DHA –Days After Hatching (44 horas).....	87
<u>Figura 9.</u> Tanques de larvicultura de camarón adaptados para (A) el levante larval de <i>L. guttatus</i> y (B) cultivos masivos de microalgas (<i>Nannochloropsis oculata</i>), rotíferos (<i>Brachiounus sp.</i>) y <i>Artemia salina</i>	90
<u>Figura 10.</u> Esquema de alimentación empleado para el levante larval.....	91
<u>Figura 11.</u> Muestras de ejemplares de 42 DAH tomadas de un estanque de Larvicultura.....	92
<u>Figura 12.</u> Diferencia de tallas en individuos (44 DAH) de <i>L. guttatus</i> en un mismo estanque de larvicultura.....	93

PRIMERA PARTE

Vitalidad y Ultraestructura del Esperma de Bagre Rayado (*Pseudoplatystoma fasciatum*) Criopreservado con DMSO y Metanol a Diferentes Concentraciones

RESUMEN

El bagre rayado es una especie que a pesar de presentar buena demanda en el mercado y tener buen potencial acuícola, se encuentra entre los peces nacionales en peligro de extinción. Con el fin de contribuir al desarrollo de un paquete tecnológico que permita reproducir en cautiverio a ésta especie, se evaluó el rendimiento de dos crioprotectores (DMSO y metanol, cada uno a cuatro concentraciones diferentes) para esperma criopreservado de bagre rayado mediante la estimación del porcentaje de vitalidad y la evaluación de la ultra estructura (microscopía electrónica) de los espermatozoides seis años después de la criopreservación. Las muestras para vitalidad fueron evaluadas por dos observadores diferentes. El porcentaje de vitalidad en todos los tratamientos fue superior al 50%. No obstante, los análisis estadísticos demostraron diferencias significativas entre observadores y tratamientos así como una interacción que indica que el desempeño de los tratamientos varió según los observadores. Este desempeño relativo se atribuye a daños de menor intensidad en la membrana que generaron leves coloraciones al interior del citoplasma pudiendo ser interpretadas de forma subjetiva por los observadores al catalogar la célula como viva o muerta. Al realizar el análisis de forma independiente para cada observador (Kruskall-Wallis y comparaciones múltiples de Dunnett) se encontró que aunque existen diferencias significativas, la gran mayoría de tratamientos presentó desempeños similares. El elemento común entre los dos observadores fue que se obtuvo un menor desempeño en los tratamientos de DMSO al 11% en cuanto a mantener la sobrevivencia de los espermatozoides, por lo cual no se recomienda el uso de dicho crioprotector en ensayos de criopreservación para semen de bagre rayado. Aunque no fue posible determinar el efecto de los crioprotectores sobre la ultra estructura de los espermatozoides debido a falencias metodológicas en el procesamiento de las muestras que impidieron la conservación de la membrana celular, se generaron diferentes protocolos de procesamiento de muestras de semen de bagre que sirven de base para que en futuros estudios se afine y estandarice dicha técnica. Con excepción de la membrana celular, se describen las demás estructuras del espermatozoide (gránulos de cromatina, parte media, flagelo y mitocondrias) observadas en microscopía electrónica de transmisión (TEM).

Palabras clave: *Pseudoplatystoma fasciatum*, esperma criopreservado, DMSO, Metanol, morfología subcelular, microscopia electrónica de transmisión (TEM).

ABSTRACT

In Colombia the striped Cat fish (*Pseudoplatystoma fasciatum*) has a good market demand but is an endangered species despite its great aquaculture potential. In order to develop techniques that contribute to its culture, two cryoprotectants (DMSO and Methanol, each one at four different concentrations) were evaluated for *P. fasciatum* spermatozoa measuring the vitality percentage and evaluating its ultra-structural morphology by transmission electron microscopy (TEM) six years after cryopreservation. The semen samples were evaluated by two different observers. The vitality percentage in all treatments was >50%. However, the statistical analysis demonstrated significant differences between observers and treatments and also an interaction which indicates a relative performance of the treatments depending of the observer. This could be due at minor membrane damages that generated slight stains into the cytoplasm, being inferred subjectively by observers when defining the cell as live or death.

The independent analysis for observer (Kruskall-Wallis and Dunett's multiple comparisons) showed statistical differences between treatments. However, most of the treatments had similar performances. The common element between observers was that DMSO 11% showed the lowest performance in sperm survival. Consequently this cryoprotectan in not recommended for cryopreservation assays with striped cat fish spermatozoa.

It was not possible to obtain information of the effects of the cryoprotectans at a sub cellular level due to the lack of cellular membrane in all of the samples observed with transmission electron microscope (TEM). This cell membrane deterioration probably took place during the processing of samples. However, different techniques to process TEM samples are described in order to standardize a technique that allows proper processing of cryopreserved fish sperm in further studies. With exception of the cell's membrane, the structures of the spermatozoa (chromatin, middle part, flagella and mitochondria) are described.

Key words: *Pseudoplatystoma fasciatum*, cryopreserved sperm, DMSO, Methanol, subcelular morphology, transmisión electronic microscopy (MET).

INTRODUCCIÓN

Por alcanzar grandes tallas y poseer una carne de excelente calidad, el Bagre Rayado (*Pseudoplatystoma fasciatum*) ha sido una de las especies de mayor importancia comercial en las cuencas de los ríos Magdalena, Orinoco y Amazonas. No obstante, la constante sobre pesca de ejemplares por debajo de la talla media de madurez ha situado a la especie en un punto de riesgo para la renovación natural (Valderrama *et al.*, 1988; Ramírez y Ajiaco, 1995; Mojica *et al.*, 2002) que sólo puede ser contrarrestado mediante el desarrollo de técnicas de cultivo y una adecuada reglamentación pesquera (Contreras y Contreras, 1990; Agudelo *et al.*, 2000; Díaz-Sarmiento & Alvarez-León, 1998).

Algunas investigaciones sobre inducción hormonal, levante de larvas y requerimientos preliminares de cultivo han evidenciado el buen potencial que tiene el bagre rayado para la acuicultura (Miranda, 1993 En: Pinheiro-Tavares, 1997; Contreras y Contreras, 1989a; Rodríguez y Nielsen, 1990, 1992; Cancino, 1990; Kossowski y Madrid, 1985; Kossowski, 1991; Sato *et al.*, 1997), despertando a su vez el interés en otras áreas del campo como la criopreservación (conservación) de espermatozoides en nitrógeno líquido por tiempo indefinido para su posterior empleo.

Esta técnica permite importantes ventajas para el control de la reproducción como el manejo de la sincronía reproductiva, retención de líneas genéticas específicas, mejoramiento del stock, conservación de poblaciones silvestres en peligro de extinción o disponer de una fuente secundaria en caso de pérdida de padrotes (Schemehl & Graham, 1986 En: Jamienson, 1991; Rodríguez-Gutiérrez, 1992; Bart, 2000; González & Díaz, 2001; Wayman *et al.*, 1996).

Debido a que el proceso de criopreservación involucra temperaturas en extremo bajas, deben emplearse algunas sustancias –conocidas como crioprotectores- que reduzcan los fatales riesgos de formación de hielo intracelular y daño de membranas; dichas sustancias son el objeto de muchas investigaciones que se enfocan hacia la selección del crioprotector más adecuado en cuanto a supervivencia y calidad del espermatozoide criopreservado, puesto que los rendimientos de uno u otro crioprotector se comportan de maneras diferentes dependiendo de la especie.

Los mayores logros de la criopreservación de esperma en peces se han obtenido en salmónidos (los ensayos con éste grupo comenzaron desde principios del siglo XX), obteniendo en la actualidad cultivos con altos rendimientos de fertilización (mayores del 90%) y facilitando la creación de bancos de esperma para programas de manejo de la diversidad (Piñeros, 1990; González, 1994; González & Fresneda, 2000).

Las investigaciones en especies de climas tropicales son menos representativas y datan apenas de comienzos de la década de 1980. Algunos ejemplos son los ensayos con diferentes crioprotectores para semen de tilapias (*Sarotherodon mossambicus* y *Oreochromis mossambicus*), bagres (*Pseudoplatystoma fascitum*, *Leiarius marmoratus*, *Pimelodus blochii*, *P. grosskopfii*, *Ageneiosus caucanus*), bocachico (*Prochilodus scrofa*), cachamas y capitán de la sabana (*Eremophilus mutisii*), entre otros (Harvey, 1983; Harvey y Kelley, 1984, 1998; Brand, 1996; Neira, 1991; Caleño, 1995; González, 2003; González, 2002).

En Colombia se han desarrollado pocas investigaciones sobre el tema, básicamente en evaluaciones seminales y algunas pruebas de fertilización post-descongelamiento. En 1997 el Centro de Investigaciones Científicas y Ambientales de la Universidad Jorge Tadeo Lozano y el Instituto Nacional de Pesca y Acuicultura (INPA) iniciaron trabajos para criopreservar esperma de cachama blanca *Piaractus brachypomus* (González, Díaz & Lara, 1998) y de bagre rayado empleando diferentes concentraciones de crioprotectores (González y Fresneda, 2000).

El objeto del presente estudio fue evaluar la vitalidad (% de espermatozoides vivos) de esas muestras de semen de bagre rayado y los posibles efectos de los crioprotectores a diferente concentración sobre la estructura subcelular (microscopía electrónica) de los espermatozoides con el fin de contribuir a la selección del crioprotector más adecuado para la especie.

La evaluación del porcentaje de vitalidad se desarrolló en los laboratorios de la Universidad Jorge Tadeo Lozano y el procesamiento y observación de las muestras para microscopía electrónica en los laboratorios de Corpoica-Ceisa (Bogotá D.C.).

El gradual desarrollo de la técnica de criopreservación de esperma para el bagre rayado y otras especies de importancia comercial y ecológica permitirá disponer en un futuro cercano de una herramienta importante en los campos de la conservación (re poblamiento de cuencas) y de la producción (acuacultura).

Entre los limitantes de la investigación se destaca el alto costo de la microscopía electrónica y la consecuente evaluación limitada de muestras para la apreciación de estructuras a nivel subcelular en los espermatozoides.

1. MARCO CONCEPTUAL

1.1. DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE

El bagre rayado pertenece al orden Siluriformes, el cual se caracteriza por la ausencia de escamas sobre el cuerpo, encontrándose revestido apenas de piel espesa o cubierto parcial o totalmente con placas óseas. Su familia, la Pimelodidae, comprende formas muy diversificadas que van desde algunas diminutas con pocos centímetros hasta otras gigantes con más de dos metros de longitud, presentando como característica distintiva tres pares de barbillones próximos a la boca; todos sus representantes son especies dulceacuícolas de hábitos nocturnos de dieta variada (Dias, 1987 En: Pinheiro-Tavares, 1997).

El género *Pseudoplatystoma* comprende los mayores peces de la familia y puede ser encontrado en las principales cuencas suramericanas. Las especies de este género presentan un cuerpo alargado y rollizo, con la cabeza deprimida. En *P. fasciatum* la aleta dorsal posee una espina y 6 radios; la aleta anal de 11-14 sin la espina; los barbillones mentonianos más largos que la longitud de la cabeza, la mandíbula superior se proyecta levemente sobre la inferior. La fontanela no alcanza a llegar a la base del proceso occipital; aleta caudal con los lóbulos redondeados. Alcanza hasta 1.2 m de longitud (Castro, 1986; Brand, 1996; Pinheiro-Tavares, 1997).

Existen diferentes coloraciones pero por lo general son grises dorsalmente y blancos ventralmente; cuerpo con franjas verticales negras (frecuentemente 16) a ligeramente oblicuas, a menudo con manchas o puntos los cuales son más marcadas en el lado ventral ([Figura 1](#)), aunque se presenta una amplia variación en los patrones de las franjas y puntos (Castro, 1986; Barthem & Goulding, 1997). Habitan canales ribereños, planos inundables, grandes arroyos de la selva, en aguas quietas o lóxicas (Barthem & Goulding, 1997).



Figura 1. Fotografía de *Pseudoplatystoma fasciatum*. Tomado de www.fishbase.org

1.2. IMPORTANCIA COMERCIAL

En América del Sur los bagres del género *Pseudoplatystoma* están entre las especies más representativas en la producción pesquera de aguas interiores debido a sus grandes proporciones y a la calidad de su carne.

En la Amazonía colombiana, se registran por lo menos 59 especies de peces aprovechados para el consumo. Entre estos los que mayor participación tienen en número y representatividad, son los bagres de la familia Pimelodidae con el 34%, soportando la mayor presión pesquera para fines de consumo a escala nacional debido a la exquisitez de su carne, la poca presencia de espinas y por el tamaño que logran alcanzar (desde 25 cm hasta 2.8 m) permitiendo ser procesados fácilmente en filete o postas, siendo los *P. tigrinum* y el *P. fasciatum* son las especies comerciales más importantes (Agudelo-Córdoba *et al.*, 2000; Barthem & Goulding, 1997)

1.3. REPRODUCCIÓN

El aumento gradual de las aguas como consecuencia de las lluvias desencadena el proceso reproductivo. La reproducción se desarrolla en medio lóxico después de las lluvias (migración ascendente, el desove es parcial y la fecundación es externa.

Al terminar el periodo de lluvias, el agua de los ríos comienza a descender en nivel y caudal. En este momento las ciénagas y lagunas que tienen relación con el río también experimentan un descenso a causa del desagüe a través de los caños o canales que llegan al río por diferencia de niveles. Este movimiento despierta el instinto de migración de ésta y otras especies habitantes del sistema léntico y son

motivadas a ocupar el sistema lóxico, donde se agrupan en cardúmenes para emprender la migración ascendente; al llegar a las partes más altas de su recorrido ya están listos para reproducirse. Las hembras realizan el desove en medio de fuertes chapoteos causados por el cortejo de numerosos machos que vierten su producto sexual al exterior para fecundar los huevos expelidos. Después de reproducirse continúan su migración descendente siendo posible su regreso a las ciénagas.

Los huevos fecundados son transportados también por las corrientes hasta su eclosión; luego las larvas se orientan hacia las orillas mientras continúan su descenso hasta llegar a las ciénagas o planos inundables donde encuentran alimento y protección contra depredadores (Beltrán & Lamus, 1975).

La fecundidad relativa para esta especie está estimada en 66.000 huevos por Kg. de peso (Ramírez y Ajiaco, 1995) y en cuanto al esperma, el bagre rayado se caracteriza por una alta producción espermática en comparación con otras especies como el bocachico *Prochilodus reticulatus* (Bernal & Uribe, 1993). Brand (1996) reporta para el bagre volúmenes máximos hasta de 56 ml, lo que indica que la gran producción de esperma facilita la extrusión y asegura un volumen suficiente para cualquier prueba de preservación.

1.4. EL ESPERMA DE PECES

El esperma en los peces es altamente diverso. Cuando es liberado en el agua y presenta una fase de natación libre se denomina *aquasperm*; cuando son implantados en el interior de la hembra y se produce una fertilización interna se denominan *intrasperm*. Morfológicamente el espermatozoide de los peces está conformado por tres partes principales: la cabeza, conformada por el núcleo en el cual se encuentra el DNA pudiendo o no presentar una región acrosomal dependiendo de la especie; la parte media articulada a la cabeza donde se encuentran las mitocondrias que aportan la energía para el movimiento y el flagelo, encargado de impulsar el espermatozoide (Jamieson, 1991).

Los tipos de espermatozoides en los silúridos son aquaspermias anacrosomales uniflagelados o biflagelados (Jamieson, 1991). En el caso del *Pseudoplatystoma fasciatum* los espermatozoides son uniflagelados.

El examen morfológico de los espermatozoides es importante debido a que las muestras que presentan un porcentaje elevado de formas anormales tienden a ser de baja fertilidad.

1.4.1. Anormalidades de los espermatozoides de acuerdo con Cruea (1969) En: Rodríguez-Gutiérrez (1992) pueden ser:

1.4.1.1. Primarias: todas las anormalidades de la cabeza, incluyendo células inmaduras. Dobles flagelos y gotas de citoplasma en el flagelo próximas a la cabeza. Estas malformaciones *no* afectan significativamente la fertilidad.

1.4.1.2. Secundarias: gotas libres o distales de protoplasma en el flagelo; flagelos curvados o doblados y cabezas sin flagelos. Estas malformaciones *si* afectan significativamente el poder fecundante del espermatozoide.

1.5. CRIOPRESERVACIÓN

La criopreservación es la rama de la criobiología que busca prolongar indefinidamente el potencial total de vitalidad y las funciones metabólicas normales de las células, a temperaturas en extremo bajas (Lucena *et al*, 1990).

El material biológico puede dañarse durante la crioconservación, el descongelamiento o ambos, ya sea por la formación de grandes cristales de hielo intracelulares o por el aumento en la concentración intracelular de solutos y los cambios que la acompañan y que dan por resultado la deshidratación de las células durante la crioconservación.

Según Jamieson (1991) El proceso de criopreservación comprende tres pasos fundamentales, la congelación, la descongelación y el almacenamiento.

1.5.1. Congelación: cuando las células son enfriadas en una solución acuosa, tanto las células como la solución, se sobre enfrían hasta cierto punto; luego tiene lugar la

nucleación heterogénea (agregación catalizada de moléculas), usualmente en la solución extracelular. A medida que el agua se congela la solución extracelular se vuelve progresivamente más concentrada.

Si la tasa de enfriamiento es baja, hay suficiente tiempo para que las células pierdan el agua necesaria para permanecer en equilibrio osmótico con la solución extracelular concentrada. Sin embargo, una exposición prolongada a la solución concentrada es generalmente letal; por otra parte, si la tasa de enfriamiento es alta, no hay tiempo suficiente para que el agua se difunda fuera de las células hacia el cristal de hielo. Las células se equilibrarán por congelamiento intracelular iniciado sea por nucleación homogénea o heterogénea. El congelamiento intracelular se considera fatal.

Una situación balanceada que permita la supervivencia puede darse cuando la tasa de enfriamiento sea lo suficientemente alta como para minimizar el tiempo de exposición a la solución concentrada y sea a la vez lo suficientemente baja como para minimizar la cantidad de hielo intracelular por debajo del nivel dañino. Ciertos químicos pueden incrementar la dimensión de este balance entre los efectos del hielo intracelular y la solución concentrada, mejorando así la sobrevivencia. Estos químicos son denominados crioprotectores.

1.5.2. Descongelación: Durante la descongelación, los mismos procesos fisicoquímicos tienen lugar en orden inverso. Teóricamente, la tasa de descongelación debe ser igual a la tasa de enfriamiento. Sin embargo, usualmente hay una mínima cantidad de pequeño hielo intracelular presente aun cuando se emplea una óptima tasa de congelamiento. La recristalización ocurre invariablemente durante la descongelación, formando hielo intracelular letal. Una alta tasa de calentamiento es usualmente empleada para minimizar el grado de recristalización. Cuando el descongelamiento es rápido, no hay tiempo suficiente para que la célula deshidratada absorba el agua perdida durante la congelación.

1.5.3. Almacenamiento: Las temperaturas de almacenamiento deben ser de -130°C o menores debido a la Vitrificación parcial (solidificación no cristalina). Una temperatura comúnmente empleada es la del nitrógeno líquido (-196°C). A ésta temperatura, todas las moléculas biológicas se vuelven inmóviles y por lo tanto, no

pueden participar en ninguna reacción bioquímica. Teóricamente el material biológico puede mantenerse indefinidamente en este estadio de congelación.

1.6. CRIOPROTECCIÓN

La supervivencia de los espermatozoides se limita a unas pocas horas. Para mantener los espermatozoides durante largo periodo de tiempo es necesaria su dilución con una solución protectora que contiene generalmente crioprotectores, antibióticos, sales y compuestos orgánicos. Estos agentes abastecen nutrientes como fuente de energía, protegen contra el efecto dañino del enfriamiento rápido, proporcionan un amortiguador para prevenir los cambios en el pH, mantienen la presión osmótica adecuada y el equilibrio electrolítico correcto, inhiben el crecimiento bacteriano, aumentan el volumen del semen de tal manera que pueda usarse para múltiples inseminaciones y protegen a las células espermáticas durante la congelación (Hafez, 1986).

La adición de algunos crioprotectores puede minimizar el daño celular asociado a la formación de hielo o suprimir cualquier formación de hielo si se usan a altas concentraciones. Dicho proceso es denominado crioprotección (Jamieson, 1991).

1.6.1. Crioprotectores: Entre las propiedades químicas y físicas más importantes están la solubilidad al agua y la baja toxicidad. Los crioprotectores deben ser altamente solubles en agua para alterar las propiedades fisicoquímicas del agua durante el congelamiento. Su toxicidad si la hay, debe ser menor que su habilidad protectora, de otro modo ofrecerían más daño que protección. Los crioprotectores pueden dividirse en aquellos que son permeables a las membranas y los que no lo son (Jamieson, 1991).

1.6.1.1. Crioprotectores permeables: Sirven (1) para reducir la tasa de difusión del agua desde la célula al cristal de hielo; (2) reducir la cantidad del cambio del volumen celular / concentración de sal; (3) disminuir la temperatura de nucleación; (4) para reducir la tasa de crecimiento del cristal de hielo; y (5) para elevar la temperatura de *formación de vidrio*. La selección del crioprotector se fundamenta sobre la base de toxicidad y permeabilidad a las células y la solubilidad en el agua durante el

congelamiento. Los crioprotectores más comúnmente empleados son DMSO, glicerol, metanol y 1,2-propaneitol (Jamieson, 1991).

1.6.1.2. Crioprotectores no permeables: Incluyen azúcares (sucrosa, glucosa), polímeros (dextran, polivinilpirrolidona, PVP) y proteínas (yema de huevo, leche en polvo y las proteínas anticongelantes encontradas en los peces polares e insectos tolerantes a la congelación). Su capacidad crioprotectora, usualmente en conjunto con un crioprotector permeable, está relacionada con su capacidad de deprimir el punto de congelación y de elevar la temperatura de transformación de vidrio de la solución extracelular. (Jamieson, 1991).

1.6.2. Vitrificación Parcial: Es el proceso por el cual las moléculas de agua en la remanente solución intracelular, al ser privadas de cristalizarse, se solidifican como una estructura no cristalina. Ésta fracción de agua no cristalina determina la extensión de la deshidratación y por tanto la supervivencia de las células. Las temperaturas de almacenamiento deben ser o estar por debajo de la correspondiente temperatura de formación de vidrio, tomada como $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$ para el agua pura. Bajo estas condiciones, debe emplearse un descongelamiento rápido para evitar la recristalización del hielo intracelular y una deshidratación celular adicional por hielo extracelular (Jamieson, 1991).

2. METODOLOGÍA

2.1. ORIGEN DE LAS MUESTRAS DE SEMEN CRIOPRESERVADO

Las muestras aquí evaluadas proceden de semen criopreservado de bagre rayado durante 1997 por el proyecto '*Criopreservación de Semen en Algunas Especies de Peces Tropicales de Importancia Económica y Comercial de la Orinoquía Colombiana*' Universidad Jorge Tadeo Lozano – INPA (González y Fresneda, 1999 y 2000)

Estas muestras fueron tratadas con los diluyentes DMSO-yema de huevo y metanol-leche en polvo a diferentes concentraciones (8% y 11%) y diluciones semen:crioprotector ([Tabla 1](#)) y fueron mantenidas hasta el 2003 en termos de nitrógeno líquido (34 litros) en la estación INPA-La Terraza (Villavicencio), año en que se desarrolló la presente investigación.

Tabla 1. Disponibilidad de muestras para cada tratamiento.

CRIOPROTECTOR	CONCENTRACIÓN	DILUCIÓN (Semen: Crioprotector)	Nº MUESTRAS
DMSO	8%	1:10	17
Metanol	8%	1:10	13
DMSO	8%	1:20	29
Metanol	8%	1:20	33
DMSO	11%	1:10	6
Metanol	11%	1:10	28
DMSO	11%	1:20	20
Metanol	11%	1:20	32

2.2. PRUEBA DE VITALIDAD

Debido a que el tratamiento que presentó menor número de pajillas fue el DMSO 11% dilución 1:10 con 6 muestras ([Tabla 1](#)), éste número de pajillas se tomó como base para el análisis de cada tratamiento. Con excepción de dicho tratamiento, las seis pajillas se seleccionaron azarosamente y fueron evaluadas por dos observadores diferentes (Observador 1 y Observador 2).

Para calcular la vitalidad se aplicó el método de CENSA con la coloración selectiva ***Nigrosina – Eosina***, la cual permite la identificación de las células vivas y muertas en virtud de la absorción de los colorantes. Los espermatozoides vivos conservan su forma y resisten los colorantes supravitales (no se tiñen), mientras que los espermatozoides muertos aumentan su tamaño al absorber el colorante (Sorensen, 1982; González & Fresneda, 2000; Brand, 1996;). La preparación de la solución ***Nigrosina – Eosina*** se realizó de la siguiente manera (CENSA, SIN AÑO):

- Solución de eosina soluble en agua:
1 g de eosina disuelta en 100 ml de solución de citrato-trisódico.

- Solución de nigrosina soluble en agua:
5 g de nigrosina en 100 ml de citrato-trisódico (calentar solución entre 70-80° C).

Para la evaluación de cada muestra (seis muestras por tratamiento, cada una de pajillas diferentes) se mezcló en una placa portaobjetos una microgota de semen y una microgota de cada solución, elaborándose un frotis delgado que una vez seco, fue montado con dos cubreobjetos y resina sintética (entellán) para su observación al microscopio. El conteo de las células vivas y muertas se realizó en cinco conteos al azar por cada cubreobjeto para un total de diez conteos por placa. El conteo se realizó con una cuadrícula ubicada en un ocular del microscopio en un aumento de 100 X con aceite de inmersión contando todas las células que se encontraban dentro de la cuadrícula. Como se mencionó anteriormente, se tomaron datos de dos observadores diferentes.

2.3. MORFOLOGÍA EN MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

Se tomaron aleatoriamente dos pajillas de cada tratamiento para toma y procesamiento de muestras en microscopía electrónica de transmisión (TEM) según los lineamientos propuestos por Dykstra (1992). Las observaciones fueron registradas mediante fotografías en blanco y negro empleando como base de comparación las características de espermatozoides sanos reportadas por Rodríguez-Gutiérrez (1992), Jamieson (1991) y González y Fresneda (2000).

2.4. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

2.4.1. Análisis descriptivo Se realizó el análisis descriptivo de los datos (media y error estándar) para observar la tendencia de la vitalidad de los tratamientos según los observadores.

2.4.2. Análisis preliminar de la vitalidad. Con el fin de decidir cual era el análisis más adecuado para evaluar la información se realizó de forma preliminar una ANOVA de dos vías (o factores) con todos los datos de vitalidad, tomando como factores Observador y Tratamiento para establecer si existían diferencias estadísticas en la vitalidad de cada factor. Adicionalmente se evaluó la interacción entre Observador / Tratamiento, para determinar si el promedio de vitalidad difería según los observadores.

El factor observador tiene dos niveles (observador 1 y observador 2), y por medio de este análisis se establece si hay diferencias en la vitalidad obtenida por cada observador. El factor tratamiento tiene ocho niveles (1-8), y por medio de este análisis se establece si hay por lo menos un tratamiento con vitalidades estadísticamente diferentes al resto de los tratamientos.

2.4.3. Análisis por observador Debido a los resultados obtenidos en el análisis preliminar (ver numeral 5.1.1), se optó por trabajar los observadores por separado. Para determinar si la estadística a emplear era paramétrica (ANOVA) o no-paramétrica (Kruskall-Wallis), se realizó la prueba de homogeneidad de varianza (prueba de Levene) para cada observador sobre la base de que la heterogeneidad de las varianzas de los errores es más crítica que el de la *no* normalidad de los mismos (Martínez-Becerra & Martínez-Rueda, 1997).

Dichas pruebas (sean paramétricas o no-paramétricas) establecen si existen o no diferencias significativas entre los datos de vitalidad obtenidos con los diferentes tratamientos. Para conocer cuáles tratamientos que difieren entre sí y determinar cuáles presentan mejores o peores rendimientos se realizan análisis de comparaciones múltiples (p. ej. Test de Tukey o Test de Dunnett, en caso de que las pruebas sean paramétricas o no-paramétricas, respectivamente).

2.4.4. Morfología en microscopía electrónica. Debido a que se procesaron sólo dos muestras por tratamiento y a que dicha técnica es en esencia descriptiva, no se consideró el análisis estadístico para el componente morfológico. Las observaciones estructurales se emplean para describir posibles anomalías que presentan los espermatozoides bajo los diferentes tratamientos y ser posteriormente relacionados con los resultados de la vitalidad.

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

3.1. VITALIDAD

3.1.1. Análisis descriptivo

Después de seis años de criopreservación el porcentaje de vitalidad fue superior al 50% en todas las muestras y aunque el mayor porcentaje de vitalidad se obtuvo para ambos observadores con DMSO 8% y el menor porcentaje con DMSO 11%, las respectivas diluciones semen:crioprotector varían entre ellos.

En términos generales el porcentaje de vitalidad fue mayor para el observador 2 (66,8%) que para el observador 1 (58,5%), con un rango entre 50,62% - 76,58% y 51,13% - 70,71%, respectivamente ([Figura 2](#)). No se observan patrones comunes entre los observadores, lo que sugiere que existen diferencias entre ellos.

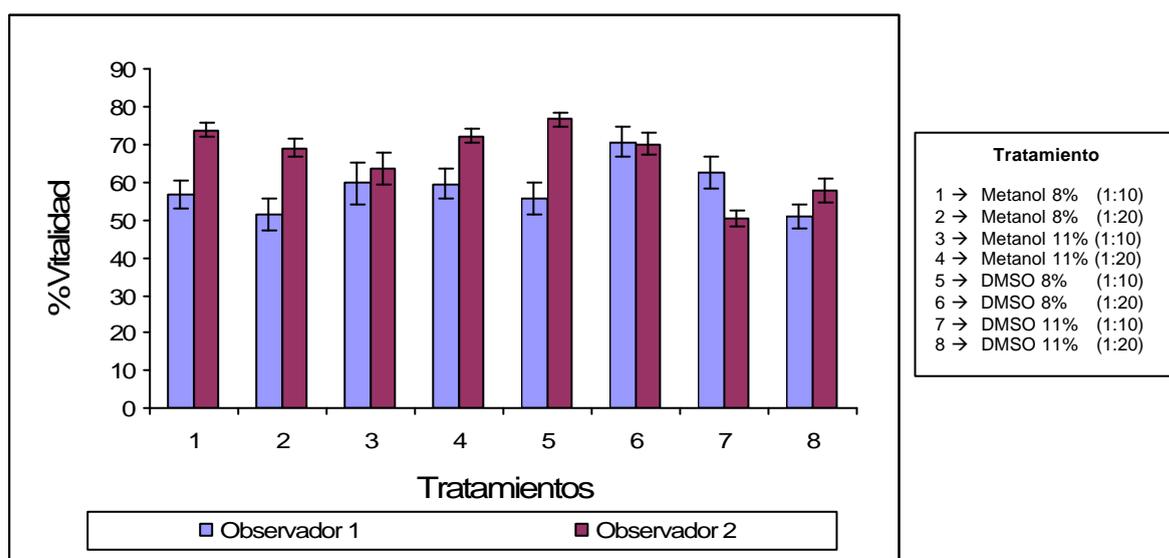


Figura 2. Medias y errores estándar de la vitalidad registrada por los dos observadores .

3.1.2. Análisis Preliminar: El análisis preliminar de dos factores reveló diferencias significativas ($p < 0.05$) para los factores observador y tratamiento ([Tabla 2](#)), encontrándose que las muestras analizadas por el observador 2 presentaron vitalidades mayores ($p < 0.05$) que las del observador 1 ([Tabla 3](#)).

Así mismo, se encontraron diferencias de vitalidad entre los tratamientos ([Tabla 4](#)), lo que concuerda con lo observado en la [Figura 3](#).

Tabla 2. ANOVA dos factores (e interacción)

Analysis of Variance for Vitalidad - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:Observador	14914,8	1	14914,8	26,10	0,0000
B:Tratamient	22542,7	7	3220,39	5,63	0,0000
INTERACTIONS					
AB	25002,0	7	3571,71	6,25	0,0000
RESIDUAL	505252,0	884	571,553		
TOTAL (CORRECTED)	571291,0	899			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

Tabla 3. Comparación de Rangos múltiples (LSD) para vitalidad por Observador

Multiple Range Tests for Vitalidad by Observador

Method: 95,0 percent LSD

Observador	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
1	450	58,4944	X
2	450	66,8125	X

Contrast		Difference	+/- Limits
1 - 2		*-8,31816	3,1281

* denotes a statistically significant difference.

Tabla 4. Comparación de Rangos múltiples (LSD) para vitalidad por tratamiento

Multiple Range Tests for Vitalidad by Tratamiento

Method: 95,0 percent Tukey HSD

Tratamiento	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
8	110	54,5157	X
7	120	56,6462	XX
2	130	60,3147	XX
3	70	61,8544	XXX
1	130	65,3605	XX
4	120	65,9741	XX
5	110	66,0797	XX
6	110	70,4824	X

Contrast	Difference	+/- Limits
1 - 2	5,04586	9,00821
1 - 3	3,50615	10,7669
1 - 4	-0,613563	9,19396
1 - 5	-0,719188	9,40876
1 - 6	-5,12188	9,40876
1 - 7	8,71435	9,19396
1 - 8	*10,8449	9,40876
2 - 3	-1,53971	10,7669
2 - 4	-5,65942	9,19396
2 - 5	-5,76505	9,40876
2 - 6	*-10,1677	9,40876
2 - 7	3,66849	9,19396
2 - 8	5,799	9,40876
3 - 4	-4,11971	10,9228
3 - 5	-4,22533	11,1042
3 - 6	-8,62803	11,1042
3 - 7	5,2082	10,9228
3 - 8	7,33872	11,1042
4 - 5	-0,105625	9,58676
4 - 6	-4,50832	9,58676
4 - 7	9,32791	9,37604
4 - 8	*11,4584	9,58676
5 - 6	-4,40269	9,79295
5 - 7	9,43353	9,58676
5 - 8	*11,5641	9,79295
6 - 7	*13,8362	9,58676
6 - 8	*15,9667	9,79295
7 - 8	2,13052	9,58676

* denotes a statistically significant difference.

Adicionalmente, en la ANOVA de dos vías se encontró que existe una interacción ($P < 0.05$) entre el Observador y el Tratamiento (Interaction AB, [Tabla 2](#)) la cual indica que el desempeño relativo de vitalidad en los tratamientos difiere según los observadores.

Para ilustrar este concepto se observa que el DMSO 8% 1:20 (tratamiento 5) tuvo la mejor vitalidad (77%) con el observador 2, pero el mismo tratamiento obtuvo la tercera peor (vitalidad de 56%) en el observador 1 ([Figura 3](#)).

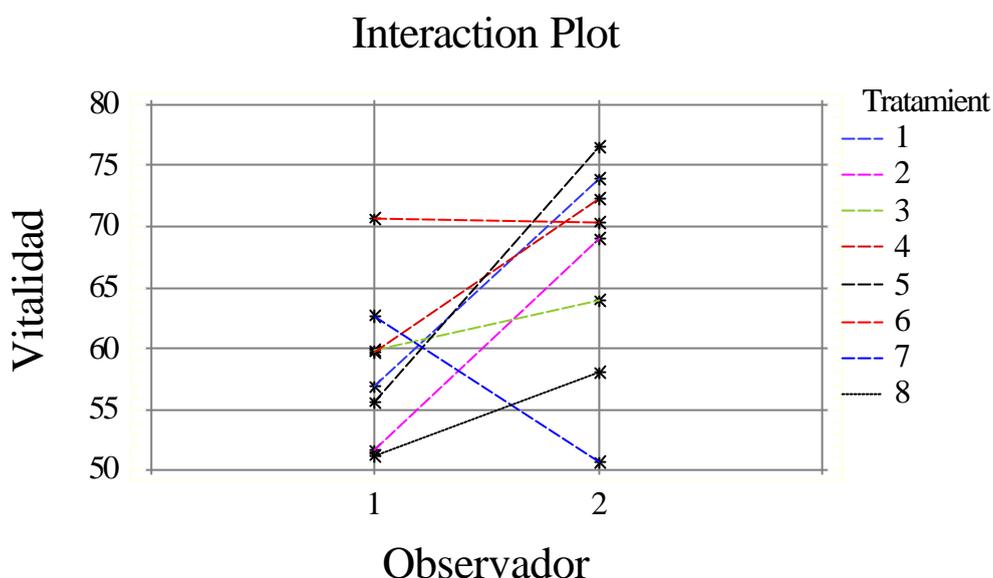


Figura 3. Grafica de interacción Observador X Tratamiento.

Esto dificulta la toma de decisiones en cuanto a cual es el mejor o peor tratamiento. Por esta razón, se realizó un análisis separado para cada observador con el fin de obtener mayor información acerca del desempeño de los tratamientos.

Como las interacciones observador X tratamiento ocurren cuando la diferencia en el rendimiento entre dos o mas tratamientos cambian de observador a observador, se hace necesario establecer protocolos de conteos de vitalidad, con el fin de evitar este tipo de problemas y poder evaluar de manera confiable los resultados de vitalidad.

3.1.3. Análisis por Observador El valor de probabilidad obtenido en la prueba de Levene ($p < 0.05$) para los porcentajes de vitalidad indicó que las varianzas de los tratamientos no son iguales ([Tablas 5 y 6](#)) y que para determinar si existían o no, diferencias entre los porcentajes de vitalidad obtenidos con cada uno de los tratamientos era necesario emplear estadística no paramétrica (Kruskall-Wallis).

Tabla 5. Prueba de homogeneidad de varianzas para los diferentes tratamientos de crioprotección (Observador 1)

Contraste de Levene sobre la igualdad de las varianzas error ^a

Variable dependiente: V2

F	gl1	gl2	Significación
5.333	7	441	.000

Contrasta la hipótesis nula de que la varianza error de la variable dependiente es igual a lo largo de todos los grupos.

a. Diseño: Intercept+V1

Tabla 6. Prueba de homogeneidad de varianzas para los diferentes tratamientos de crioprotección (Observador 2)

Contraste de Levene sobre la igualdad de las varianzas error ^a

Variable dependiente: V2

F	gl1	gl2	Significación
5.573	7	441	.000

Contrasta la hipótesis nula de que la varianza error de la variable dependiente es igual a lo largo de todos los grupos.

a. Diseño: Intercept+V1

La prueba de Kruskal-Wallis (equivalente al ANOVA no paramétrica) indicó, con un nivel del 95% de confiabilidad, que existen diferencias significativas entre los tratamientos, tanto para el observador 1 como para el observador 2. Los valores de la Significancia asintótica fueron de 0.002 ([Tabla 7B](#)) y de 0.000 ([Tabla 8B](#)), respectivamente, frente a un α de 0.05.

Tabla 7. Prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para el Observador 1 empleando SPSS for Windows. (A) Rangos; (B) Estadísticos de contraste

(A)

Rangos

	V1	N	Rango promedio
V2	1	69	218.29
	2	70	203.80
	3	30	238.80
	4	60	234.24
	5	50	214.27
	6	50	293.37
	7	60	233.29
	8	60	184.98
	Total	449	

1 → Metanol 8% (1:10)
2 → Metanol 8% (1:20)
3 → Metanol 11% (1:10)
4 → Metanol 11% (1:20)
5 → DMSO 8% (1:10)
6 → DMSO 8% (1:20)
7 → DMSO 11% (1:10)
8 → DMSO 11% (1:20)

(B)

Estadísticos de contraste ^{a,b}

	V2
Chi-cuadrado	22.872
gl	7
Sig. asintót.	.002

- a. Prueba de Kruskal-Wallis
- b. Variable de agrupación: V1

Tabla 8. Prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para el Observador 2 empleando SPSS for Windows. (A) Rangos; (B) Estadísticos de contraste

(A)

Rangos

	V1	N	Rango promedio
V2	1	59	264.77
	2	60	234.04
	3	40	222.13
	4	60	249.63
	5	60	287.95
	6	60	251.82
	7	60	111.69
	8	50	168.22
	Total	449	

1 → Metanol 8% (1:10)
2 → Metanol 8% (1:20)
3 → Metanol 11% (1:10)
4 → Metanol 11% (1:20)
5 → DMSO 8% (1:10)
6 → DMSO 8% (1:20)
7 → DMSO 11% (1:10)
8 → DMSO 11% (1:20)

(B)

Estadísticos de contraste ^{a,b}

	V2
Chi-cuadrado	80.024
gl	7
Sig. asintót.	.000

- a. Prueba de Kruskal-Wallis
- b. Variable de agrupación: V1

Posteriormente se realizó la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett con el fin de determinar cuáles tratamientos presentaban diferencias significativas ([Tablas 9 y 10](#)). En el conteo del observador 1, el DMSO 8% 1:20 (tratamiento 6) fue superior a metanol 8% 1:20 (tratamiento 2) y al DMSO 11% 1:20 (tratamientos 8).

El resto de los tratamientos no presentaron diferencias estadísticas entre sí, es decir, que no se presentaron diferencias entre el DMSO 8% 1:20 (tratamiento 6) y metanol 8% 1:10, metanol 11% 1:10, metanol 11% 1:20, DMSO 8% 1:10 y DMSO 11% 1:10 (tratamientos 1, 3, 4, 5 y 7, respectivamente) ([Tabla 9](#)), lo que indica que tienen un desempeño estadísticamente similar.

En el conteo del observador 2, el DMSO 11% 1:10 (tratamiento 7) presentó un menor porcentaje de vitalidad que los demás tratamientos con excepción del metanol 11% 1:10 (tratamiento 3) y el DMSO 11% 1:20 (tratamiento 8). Éste último a su vez presentó un menor porcentaje de vitalidad que el metanol 8% 1:10, metanol 11% 1:20 (Tto 4) y DMSO 8% 1:10 (tratamiento 1, 4 y 5, respectivamente). El resto de los tratamientos no presentaron diferencias estadísticas entre sí ([Tabla 10](#)).

Tabla 9. Comparaciones múltiples (prueba de Dunnett) para el Observador 1

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: V2
C de Dunnett

(I) V1	(J) V1	Diferencia entre medias (I-J)	Error típ.	Intervalo de confianza al 95%.	
				Límite inferior	Límite superior
1	2	4.87033	4.80100	-11.75636	21.49703
	3	-3.33489	6.18914	-24.70732	18.03753
	4	-3.18344	4.99566	-19.27761	12.91072
	5	.88695	5.25608	-16.23081	18.00470
	6	-14.25182	5.25608	-31.02873	2.52508
	7	-6.20933	4.99566	-19.71900	7.30033
	8	5.32605	4.99566	-9.29265	19.94474
2	1	-4.87033	4.80100	-21.49703	11.75636
	3	-8.20523	6.17573	-30.49713	14.08667
	4	-8.05378	4.97903	-25.35145	9.24390
	5	-3.98338	5.24028	-22.23723	14.27046
	6	-19.12216*	5.24028	-37.05676	-1.18756
	7	-11.07967	4.97903	-26.00276	3.84343
	8	.45571	4.97903	-15.47833	16.38976
3	1	3.33489	6.18914	-18.03753	24.70732
	2	8.20523	6.17573	-14.08667	30.49713
	4	.15145	6.32824	-21.74748	22.05038
	5	4.22184	6.53578	-18.44098	26.88466
	6	-10.91693	6.53578	-33.32351	11.48965
	7	-2.87444	6.32824	-22.95215	17.20328
	8	8.66094	6.32824	-12.17848	29.50036
4	1	3.18344	4.99566	-12.91072	19.27761
	2	8.05378	4.97903	-9.24390	25.35145
	3	-.15145	6.32824	-22.05038	21.74748
	5	4.07039	5.41918	-13.70004	21.84083
	6	-11.06838	5.41918	-28.51072	6.37396
	7	-3.02589	5.16699	-17.35336	11.30159
	8	8.50949	5.16699	-6.86816	23.88714
5	1	-.88695	5.25608	-18.00470	16.23081
	2	3.98338	5.24028	-14.27046	22.23723
	3	-4.22184	6.53578	-26.88466	18.44098
	4	-4.07039	5.41918	-21.84083	13.70004
	6	-15.13877	5.66015	-33.53017	3.25263
	7	-7.09628	5.41918	-22.56491	8.37234
	8	4.43910	5.41918	-12.00697	20.88516
6	1	14.25182	5.25608	-2.52508	31.02873
	2	19.12216*	5.24028	1.18756	37.05676
	3	10.91693	6.53578	-11.48965	33.32351
	4	11.06838	5.41918	-6.37396	28.51072
	5	15.13877	5.66015	-3.25263	33.53017
	7	8.04249	5.41918	-7.04807	23.13306
	8	19.57787*	5.41918	3.48689	35.66885
7	1	6.20933	4.99566	-7.30033	19.71900
	2	11.07967	4.97903	-3.84343	26.00276
	3	2.87444	6.32824	-17.20328	22.95215
	4	3.02589	5.16699	-11.30159	17.35336
	5	7.09628	5.41918	-8.37234	22.56491
	6	-8.04249	5.41918	-23.13306	7.04807
	8	11.53538	5.16699	-1.11217	24.18292
8	1	-5.32605	4.99566	-19.94474	9.29265
	2	-.45571	4.97903	-16.38976	15.47833
	3	-8.66094	6.32824	-29.50036	12.17848
	4	-8.50949	5.16699	-23.88714	6.86816
	5	-4.43910	5.41918	-20.88516	12.00697
	6	-19.57787*	5.41918	-35.66885	-3.48689
	7	-11.53538	5.16699	-24.18292	1.11217

Basado en las medias observadas.

*. La diferencia de medias es significativa al nivel .05.

Tabla 10. Comparaciones múltiples (prueba de Dunnett) para el Observador 2

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: V2
C de Dunnett

(I) V1	(J) V1	Diferencia entre medias (I-J)	Error típ.	Intervalo de confianza al 95%.	
				Límite inferior	Límite superior
1	2	4.640	3.395	-4.952	14.231
	3	9.765	3.793	-5.036	24.567
	4	1.375	3.395	-7.075	9.824
	5	-2.907	3.395	-11.745	5.931
	6	3.426	3.395	-7.337	14.190
	7	23.056*	3.395	14.154	31.959
	8	15.782*	3.560	4.287	27.277
2	1	-4.640	3.395	-14.231	4.952
	3	5.126	3.780	-10.174	20.425
	4	-3.265	3.381	-12.559	6.029
	5	-7.547	3.381	-17.195	2.102
	6	-1.213	3.381	-12.652	10.225
	7	18.417*	3.381	8.709	28.124
	8	11.142	3.546	-9.987	23.271
3	1	-9.765	3.793	-24.567	5.036
	2	-5.126	3.780	-20.425	10.174
	4	-8.391	3.780	-23.002	6.220
	5	-12.673	3.780	-27.511	2.166
	6	-6.339	3.780	-22.399	9.721
	7	13.291	3.780	-1.586	28.168
	8	6.016	3.928	-10.543	22.576
4	1	-1.375	3.395	-9.824	7.075
	2	3.265	3.381	-6.029	12.559
	3	8.391	3.780	-6.220	23.002
	5	-4.282	3.381	-12.795	4.232
	6	2.052	3.381	-8.448	12.551
	7	21.682*	3.381	13.101	30.262
	8	14.407*	3.546	3.160	25.655
5	1	2.907	3.395	-5.931	11.745
	2	7.547	3.381	-2.102	17.195
	3	12.673	3.780	-2.166	27.511
	4	4.282	3.381	-4.232	12.795
	6	6.333	3.381	-4.481	17.148
	7	25.963*	3.381	17.000	34.927
	8	18.689*	3.546	7.147	30.231
6	1	-3.426	3.395	-14.190	7.337
	2	1.213	3.381	-10.225	12.652
	3	6.339	3.780	-9.721	22.399
	4	-2.052	3.381	-12.551	8.448
	5	-6.333	3.381	-17.148	4.481
	7	19.630*	3.381	8.763	30.497
	8	12.356	3.546	-7.200	25.431
7	1	-23.056*	3.395	-31.959	-14.154
	2	-18.417*	3.381	-28.124	-8.709
	3	-13.291	3.780	-28.168	1.586
	4	-21.682*	3.381	-30.262	-13.101
	5	-25.963*	3.381	-34.927	-17.000
	6	-19.630*	3.381	-30.497	-8.763
	8	-7.274	3.546	-18.866	4.317
8	1	-15.782*	3.560	-27.277	-4.287
	2	-11.142	3.546	-23.271	.987
	3	-6.016	3.928	-22.576	10.543
	4	-14.407*	3.546	-25.655	-3.160
	5	-18.689*	3.546	-30.231	-7.147
	6	-12.356	3.546	-25.431	.720
	7	7.274	3.546	-4.317	18.866

Basado en las medias observadas.

*. La diferencia de medias es significativa al nivel .05.

Se observa que el DMSO 11% 1:20 (tratamiento 8) presentó bajos porcentajes de vitalidad en ambos conteos (para el Observador 1 fue el que presentó el desempeño más bajo y para el conteo dos fue el segundo más bajo; Tablas 7A y 8A, respectivamente).

El mismo crioprotector (DMSO 11%) a una dilución semen:crioprotector de 1:10 (tratamiento 7) fue el peor para el Observador 2, aunque este resultado no aplica para el Observador 1. Teniendo en cuenta estos resultados, no se recomienda emplear el DMSO al 11% en experimentos de criopreservación de esperma de bagre rayado.

Debido a que ambos tratamientos (N°s 7 y 8) corresponden a DMSO al 11%, no se recomienda emplear dicha concentración en experimentos de criopreservación de bagre rayado. En cuanto a los demás seis tratamientos, con base en los resultados obtenidos no es posible establecer cuál es el más adecuado para el esperma de bagre rayado debido a que muchos presentan desempeños similares que además, difieren según el observador ([figura 4](#)). Es recomendable realizar más de dos observaciones y tener un protocolo de conteo estandarizado.

El similar rendimiento de los crioprotectores DMSO y metanol aquí registrados en torno a la vitalidad puede observarse también en los ensayos realizados por Brand (1996), en los cuales la vitalidad disminuyó de 93,5% (semén fresco) a 63,32% después de la criopreservación con DMSO y de 93,5 a 61,9% con metanol, teniendo en cuenta que las muestras de semen evaluadas en el presente estudio arrojaron porcentajes superiores al 90% cuando se realizó su evaluación en fresco, es decir, antes de la criopreservación (González y Fresneda, 2000).

Aunque estos diluyentes son efectivos para la conservación de esperma (Brand, 1996), las investigaciones sobre el tipo, concentración y proporción semen:crioprotector deben continuar con miras a mejorar los porcentajes de vitalidad post-descongelación.

González & Fresneda (2000), obtuvieron con el DMSO 8% a una dilución semen:crioprotector de 1:7 los mayores porcentajes de fertilización (46,4%) y eclosión (16,6%). Este último porcentaje fue similar al obtenido a partir de desoves artificiales empleando semen fresco.

Posteriormente González (2003), obtuvo con el crioprotector que arrojó mayores porcentajes de vitalidad (DMSO al 8%), en dos fertilizaciones de hembras inducidas al desove hormonalmente un promedio del 5,29% y 15,37% de fertilización con un 100% de eclosión y desarrollo larvario normal.

3.2. MORFOLOGÍA

3.2.1. Microscopia óptica. La tinción para vitalidad muestra claramente cómo en la mayoría de los casos las células muertas absorben el colorante, tomando una coloración rojiza y aumentando de tamaño mientras que las células vivas permanecen blancas y son de menor tamaño ([Figuras 4 y 5](#)).

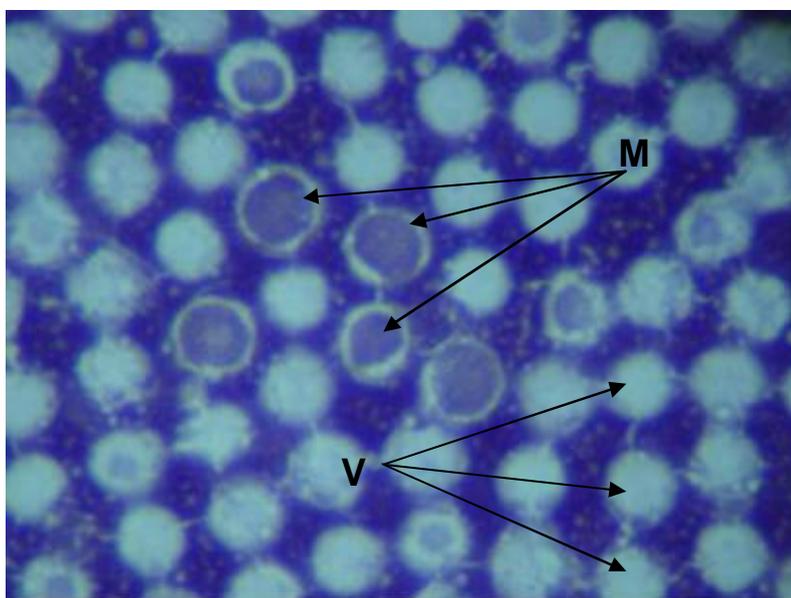


Figura 4. Micrografía en microscopia óptica (100 X) de la tinción de vitalidad para espermatozoides criopreservados con metanol 8% (1:10). Se distinguen claramente las células muertas (M) de las vivas (V).

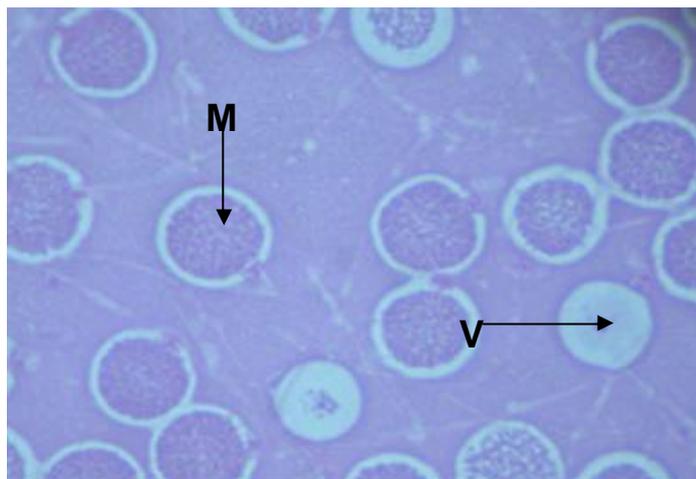


Figura 5. Micrografía en microscopía óptica (100X) de Tinción de vitalidad para espermatozoides criopreservados con DMSO 8% (1:10). Células muertas (M) y células vivas (V).

No obstante, se observaron diferencias en el tamaño y coloración de los espermatozoides, encontrándose células parcialmente coloreadas de igual o mayor tamaño que las vivas ([Figuras 6](#) y [7](#), respectivamente) que pueden estar o no, acompañadas de gránulos en el citoplasma.

Estos cambios en volumen y coloración se deben a daños de diferente intensidad a nivel de la membrana celular. A medida que la célula sufre daños, las cabezas empiezan a absorber el colorante vital y toman color, por lo tanto, las células con menos daños a nivel de membrana serán las menos coloreadas y las que sufren mayor daño serán las más coloreadas (González, 2003).

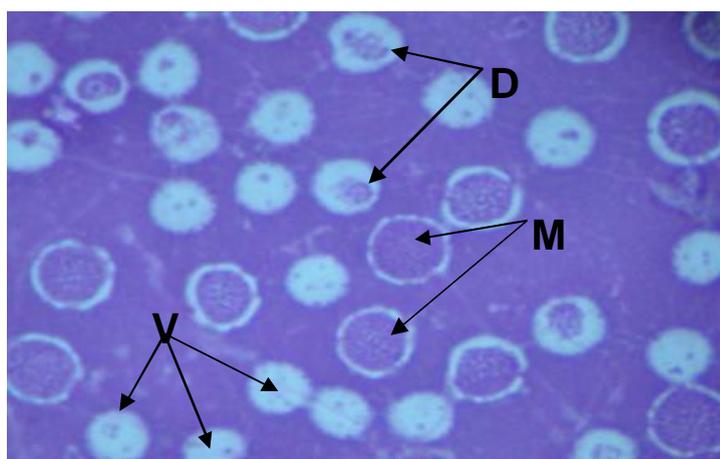


Figura 6. Micrografía en microscopía óptica (100X) de espermatozoides criopreservados con DMSO 8% (1:10). (D), células coloreadas parcialmente; daño medio de membranas. (M) células muertas. (V) células vivas.

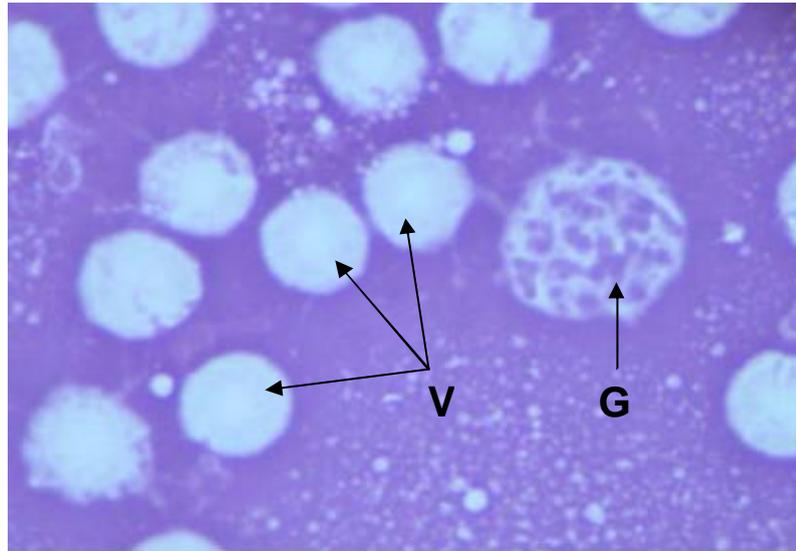


Figura 7. Micrografía en microscopia óptica (100X). (G) Célula parcialmente coloreada con gránulos en el citoplasma. (V) célula viva. Metanol 8% 1:10

Los daños de menor intensidad en la membrana que generan leves coloraciones al interior del citoplasma fueron en parte responsables de las diferencias significativas encontradas entre observadores y tratamientos entorno a la vitalidad de las muestras. Ya que la presencia de coloración leve no fue definida explícitamente como muerte celular al comienzo de los conteos, su presencia pudo ser interpretada de forma subjetiva por los observadores al momento de definir si la célula se catalogaba como viva o como muerta. También hubo casos en que las células muertas presentaron menor tamaño que las vivas ([Figura 8](#)) diferencia

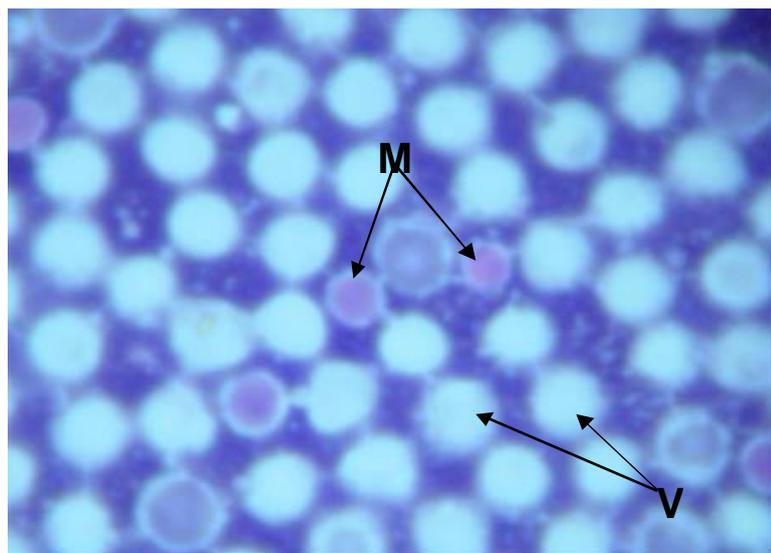


Figura 8. Micrografía en microscopia óptica (100X). Células muertas (M) con un menor tamaño que las vivas (V)

No es mucho lo que puede detallarse en cuanto a la estructura morfológica empleando microscopio óptico. En la gran mayoría de los casos sólo se observaron las cabezas como masas redondeadas sin ninguna estructura visible y en contadas excepciones pudieron apreciarse los flagelos ([Figura 9](#)).

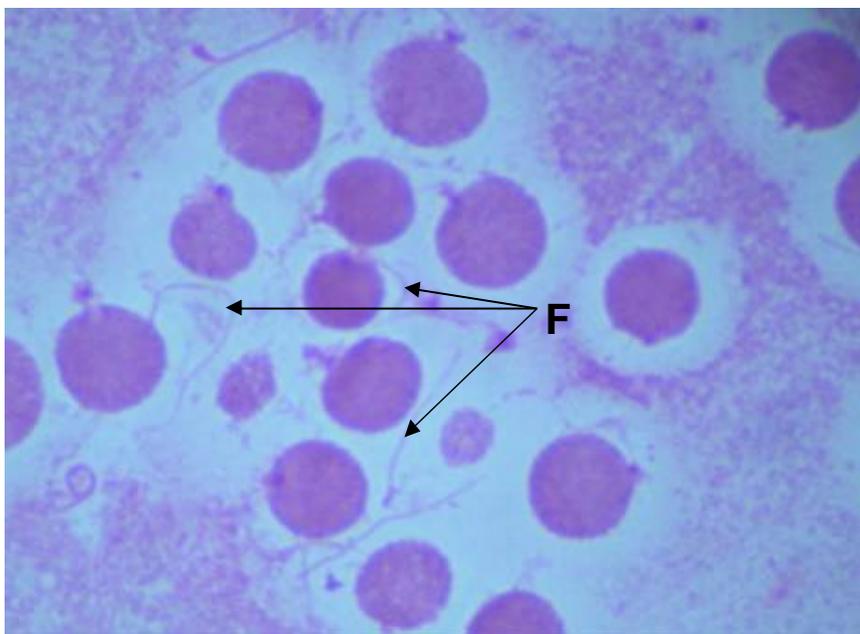


Figura 9. Micrografía en microscopía óptica (100X). Espermatozoides muertos del tratamiento metanol 8% (1:20) en los cuales se observan claramente los flagelos (F).

3.2.2. Microscopía electrónica. En todas las muestras observadas las células presentaron daños severos a nivel de la membrana celular lo cual impide describir el estado estructural real de los espermatozoides después de los tratamientos de crioprotección y por lo tanto realizar comparaciones sobre su desempeño.

La ruptura de la membrana hace que los gránulos de cromatina se expandan y por ende la cabeza aumente su tamaño; las cabezas de todos los espermatozoides sin membrana celular registrados en las fotografías presentaron un diámetro entre 1,8 y 3,0 μm , dependiendo del grado de lesión ([Figura 10 A y B](#)) mientras que en los pocos espermatozoides donde permanece la membrana (aunque fragmentada) el diámetro promedio fue de 1,66 μm encontrándose su coloración mucho más oscura debido a la mayor aglomeración de los gránulos de cromatina ([Figura 11](#)). El diámetro de estas células concuerda con el valor de 1,5 μm registrado para la misma especie por González & Fresneda (2002).

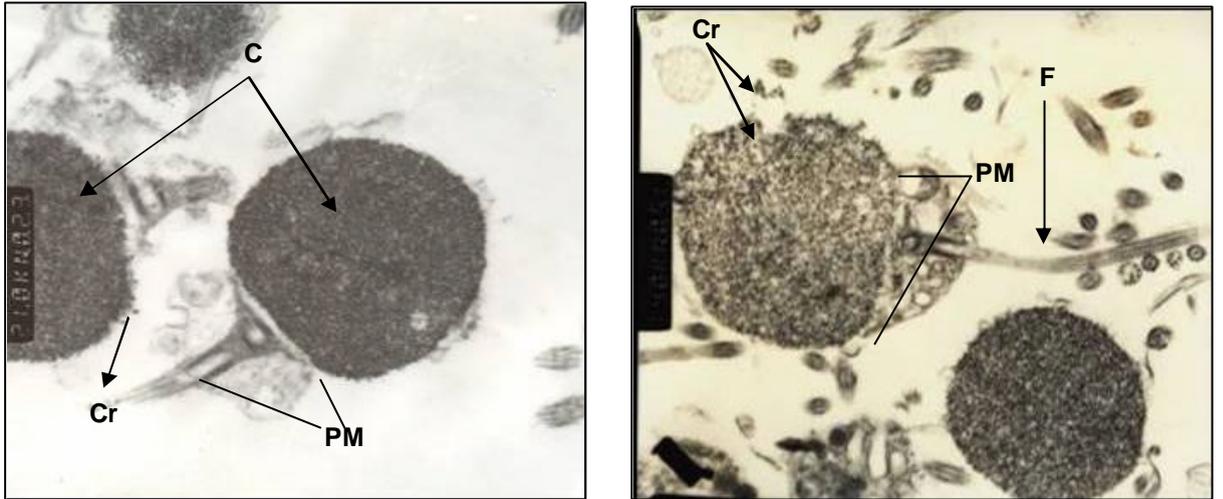


Figura 10. Microfotografía en microscopía electrónica de transmisión. Espermatozoides con los gránulos de cromatina (Cr) disgregados debido a la ausencia de la membrana celular. Se observa la cabeza (C), parte media (PM) y el flagelo (F).



Figura 11. Microfotografía en microscopía electrónica de transmisión Espermatozoide de bagre rayado con mínimas alteraciones estructurales. Se observa la cabeza (C) cubierta casi completamente por la membrana celular (MC), la parte media (PM) y el flagelo (F).

A pesar de la falta de membrana en la gran mayoría de células, pueden apreciarse claramente los demás componentes estructurales del espermatozoide como los gránulos de cromatina dispuestos por toda la cabeza (de forma redondeada), la región media conteniendo las mitocondrias y la estructuras subcelulares del flagelo, los microtúbulos. La parte media del espermatozoide es de forma triangular, la base midió entre 0,95 y 1,9 μm y la altura entre 0,8 y 0,85 μm . Se observaron generalmente de tres a cinco mitocondrias que presentaron un diámetro entre 0,21 y 0,42 ([Figura 12 A, B y C](#))

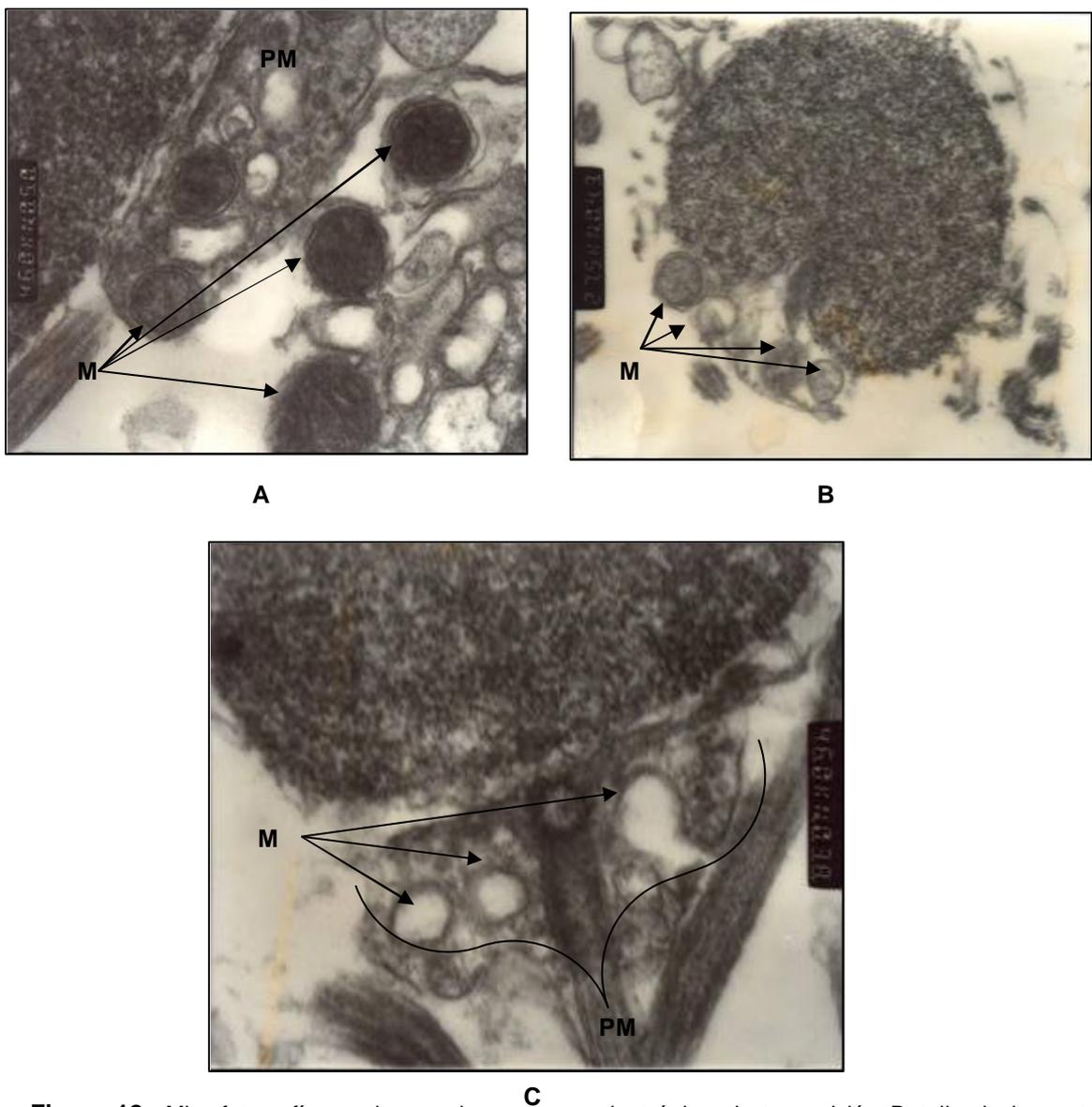
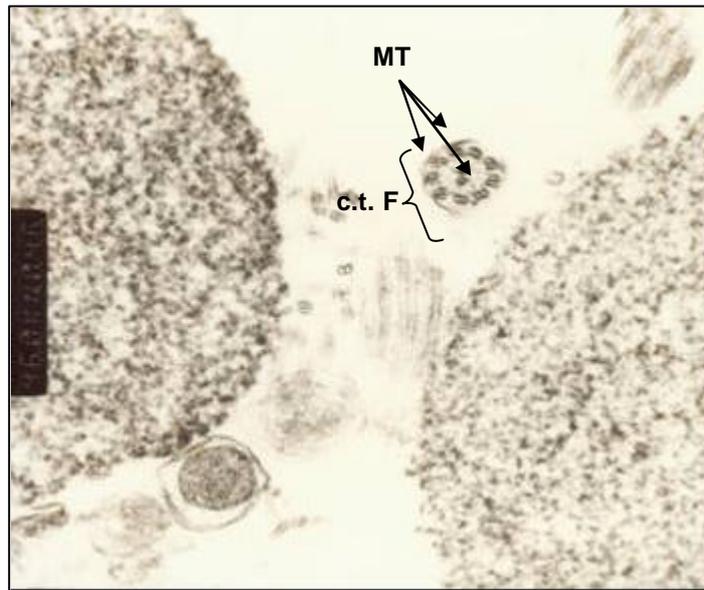
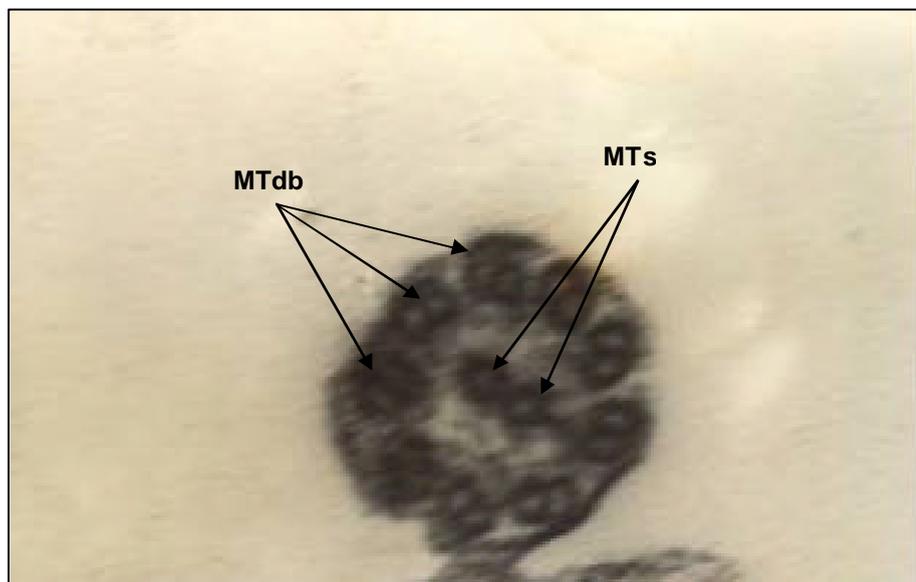


Figura 12. Microfotografía en microscopía **C** electrónica de transmisión Detalle de la parte media (PM) de los espermatozoides y de la mitocondrias (M).

No se observaron flagelos completos sino fragmentos longitudinales y cortes transversales aislados ([Figura 13 A](#)) donde se aprecian claramente los nueve (9) microtúbulos dobles dispuestos a manera de anillo y los dos (2) microtúbulos simples ubicados en el centro ([Figura 13 B](#)).



A



B

Figura 13. Microfotografía en microscopía electrónica de transmisión. A. corte transversal aislado de un flagelo (c.t.F) donde se aprecian los microtúbulos (MT). B. Detalle de los nueve microtúbulos dobles (MTdb) dispuestos a manera de anillo y de los dos microtúbulos simples (MTs) ubicados en el centro.

De igual forma que en las fotografías de microscopía óptica, en algunas microfotografías se observaron células de mayor talla y forma irregular que corresponden a los espermatozoides que habían muerto antes de la criopreservación y del procesamiento de las muestras en microscopía electrónica. Las demás, de tamaños uniformes y coloración más oscura corresponden a las células que estaban vivas pues se observan los gránulos de cromatina mucho más concentrados a pesar de haber perdido su membrana durante el procesamiento para microscopía electrónica (Figura 14)

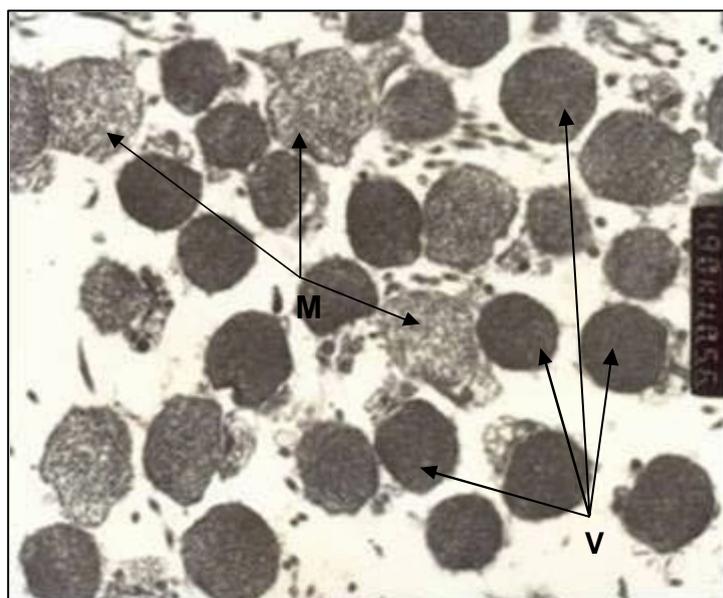


Figura 14. Microfotografía en microscopía electrónica de transmisión. Espermatozoides vivos (V) y muertos (M) al momento de la criopreservación.

Como todos los espermatozoides (independientemente del tratamiento de crioprotector al que fueron sometidos) aparecían sin membrana al momento de su observación, se ensayaron diferentes modificaciones al protocolo general para el procesamiento de muestras en MET (Anexo 1, 2, 3 y 4) para establecer si los daños en la membrana celular estaban debidos o no a alguna etapa del proceso (fijación, deshidratación e inclusión).

La ausencia de la membrana celular fue constante al emplear diferentes técnicas de fijación y deshidratación, de manera que el problema tuvo su origen posiblemente en i) la velocidad de centrifugación empleada fue superior a la requerida ocasionando la lisis de las células (Salazar, com. pers.) y a ii) la descongelación a temperatura ambiente de las muestras para su procesamiento.

Ya que las muestras debían ser trabajadas por dos observadores y además dejar una porción para otras evaluaciones, no fue posible realizar la descongelación de un solo fragmento de la pajilla al baño maría debido a que el semen se diluiría en el agua de dicho baño.

El grado de las lesiones ocurre en proporción con el tamaño de los cristales de hielo; los cristales pequeños producidos durante una congelación rápida pueden no ser dañinos, pero su recristalización a una tasa de descongelamiento lenta, sea dentro o fuera de la célula, resulta en un hielo más grande que causa destrucción mecánica de la estructura de la membrana (Jamieson, 1991).

3.3. ESTIMACIÓN ALTERNATIVA DE LA VITALIDAD

Teniendo en cuenta las diferencias encontradas tanto entre observadores como entre tratamientos y las limitadas observaciones que supone la microscopía electrónica (por su elevado costo) para la evaluación estructural de los espermatozoides, se recomienda emplear en futuros estudios la **Citometría de flujo** como método alternativo para medir la integridad de membranas.

Dicha técnica es atractiva porque permite la caracterización de cada espermatozoide en términos de función celular e integridad de sus diferentes compartimientos, así como la identificación de subgrupos sobre un gran número de células. Adicionalmente permite evaluaciones mucho más sensibles que las obtenidas por microscopía óptica (Ogier de Baulny, B., et al., 1997; Lezcano, Granja y Salazar, 2004).

4. CONCLUSIONES

- 4.1. Después de un periodo de criopreservación de seis años el porcentaje promedio de vitalidad en todos los tratamientos fue superior al 50%. No obstante, las diferencias significativas de vitalidad encontradas entre observadores y tratamientos y su marcada interacción, indicaron que el desempeño de los tratamientos variaron según los observadores.
- 4.2. Los daños de menor intensidad en la membrana que generaron leves coloraciones al interior del citoplasma fueron en parte responsables de las diferencias significativas encontradas ya que su presencia pudo ser interpretada de forma subjetiva por los observadores al catalogar la célula como viva o muerta.
- 4.3. El análisis independiente de la vitalidad obtenida por cada observador condujo a que no es posible establecer un solo tratamiento como el más adecuado para la especie debido a que la gran mayoría presentó desempeños similares (sin diferencias significativas)
- 4.4. No se recomienda el empleo del DMSO 11% para la criopreservación de esperma de bagre rayado puesto que fue el tratamiento que presentó los peores porcentajes de vitalidad en ambos observadores.
- 4.5. No fue posible determinar el efecto de los crioprotectores sobre la estructura de los espermatozoides debido a falencias metodológicas en el procesamiento de las muestras que impidieron la conservación de la membrana celular.
- 4.6. Se generaron diferentes protocolos de procesamiento de muestras de semen de bagre que sirven de base para que en futuros estudios se afine y estandarice dicha técnica.

5. RECOMENDACIONES

- 5.1. Es necesario estandarizar protocolos de conteo y realizar más de dos observaciones para contar con estimaciones confiables sobre la vitalidad de las muestras.

- 5.2. La citometría de flujo es una técnica alternativa que puede emplearse en este tipo de estudios para obtener resultados más confiables sobre la vitalidad del esperma. Dicha técnica permite evaluar de forma concreta la integridad celular, siendo más sensible que la microscopia óptica y mucho más económica que la microscopia electrónica.

SEGUNDA PARTE

Inducción Hormonal (HCG) al Desove y Larvicultura del Pargo Lunarejo *Lutjanus guttatus*) como alternativa de diversificación para la maricultura en el Pacífico colombiano

RESUMEN

Ejemplares maduros de pargo lunarejo (*Lutjanus guttatus*) capturados en zonas aledañas a la bahía de Tumaco fueron transportados al laboratorio de C.I. Balboa S.A para inducir su reproducción mediante métodos hormonales agudos (HCG) y realizar la larvicultura de la progenie. La madurez sexual fue estimada en relación con la abundancia de espermatozoides para machos y el diámetro medio de los ovocitos para hembras. Las hembras seleccionadas (ovocitos con $\varnothing = 350$ micras) fueron inducidas con 1600 UI/Kg de HCG en dos dosis (50% y 50%) con un intervalo de 24 horas y los machos con una única dosis de 500 UI/Kg en el momento de la segunda inyección de las hembras, cantidades que demostraron ser efectivas para la obtención de desoves con esta especie. En la mayoría de los casos se mantuvo una proporción sexual de 2 machos por hembra en los grupos de reproductores. Los desoves ocurrieron entre 36 y 40 horas después de la primera inyección hormonal. Se obtuvieron desoves de seis hembras, de los cuales cuatro fueron exitosos (fertilizados) produciendo entre 10,000 y 75,000 huevos viables / hembra. Los huevos eclosionaron alrededor a las 18 horas post-desove y la apertura de la boca se presentó aproximadamente a los 2 ½ días después de la eclosión (2 ½ DAH –*Days Alter Hatch*).

La alimentación de las larvas estuvo compuesta por microalgas cultivadas (*Nannochloropsis oculata*), rotíferos y *Artemia* enriquecidos con PUFA'S, zooplancton silvestre y diferentes alimentos comerciales para camarón marino. Tanto el alimento vivo como el artificial fueron suministrados desde el 3 DAH suministrando alimentos de diferente talla a medida que el tamaño de la boca de las larvas iba aumentando; el alimento vivo fue suspendido en el 42 DAH. La combinación de ambos tipos de alimento (vivo y balanceado) desde el principio condujo a una transición exitosa a la alimentación por completo artificial al final del experimento. Los peces fueron colectados a los 44 DAH, obteniendo una supervivencia del 1.8%. Durante los últimos días de larvicultura se observó un fuerte canibalismo que disminuyó notablemente la densidad por lo que se recomienda la selección de tallas a partir del 30 DAH para obtener un porcentaje de sobrevivencia superior.

Palabras clave: *Lutjanus guttatus*, reproducción inducida (HCG), larvicultura, alimento vivo, alimento comercial.

ABSTRACT

Mature spotted rose snapper broodstock were captured near Tumaco Bay and transported to C.I. Balboa S.A. laboratory in order to induce reproduction by hormonal methods (HCG) and perform the larviculture of the offspring. Sexual maturity was measured in relation with the abundance of sperm for males and mean oocyte diameter for females. Selected females (mean oocyte diameter = 350 microns) were induced with 1600 U.I./Kg of HCG given in two dosages (50% y 50%) with an interval of 24 hours and males with a single dose of 500 U.I./Kg provided at the same time females were given the second dose. This technique was effective for obtaining spawnings in *L. guttatus*. A sex ratio of two males per female was maintained in most of the breeding groups. Spawning occurred between 36-40 hours after the first hormonal injection. Six females spawned but only four of these spawnings were successfully fertilized producing 10.000-75.000 viable eggs / female. Larvae hatched approximately 18 hours after spawning and the mouth opened three days after hatching (3 DAH).

Larvae were fed with cultured micro algae, HUFA enriched zooplankton, wild phytoplankton and zooplankton, and different types of commercial feeds available for shrimp larvae. Both artificial and live feed were given from 3rd DAH, however live feed was suspended in day 42. Combining both types of feed from the beginning led to a successful transition to artificial food during the end of the assay. At 44 DAH the fish were collected obtaining 1,8 % survival. Strong cannibalism was observed during the last days of larviculture decreasing considerably the density; splitting the animals by size from 30 DAH is recommended to increase larviculture survival.

Key words: *Lutjanus guttatus*, induced reproduction (HCG), larviculture, live food, commercial feeds.

INTRODUCCIÓN

Las tecnologías emergentes para la reproducción artificial de peces marinos han generado que el establecimiento de la industria acuícola de dichos recursos esté a punto de ser una realidad (Benetti *et al.*, 2003; Áviles-Quevedo y Mazón-Suástegui, 1996; Lee y Otrowski, 2001.). La difícil situación que atraviesan los camaronicultores de la Costa Pacífica colombiana por el efecto del “virus de la mancha blanca” (WSSV) hace que sea prioritario buscar una alternativa de producción diferente al camarón, que sea viable y que pueda ser implantada en la zona en lo posible en el corto plazo.

Desde hace algún tiempo y en diferentes reuniones gremiales e interinstitucionales se ha venido haciendo énfasis en esta necesidad, pero hasta la fecha no ha habido claridad sobre cual puede ser la especie que ofrezca esta posibilidad, debido a la inexistencia de paquetes tecnológicos que permitan cultivar otras especies marinas en la infraestructura existente, construida específicamente para el camarón.

En el año de 1999, con ocasión de la “Primera Reunión del Grupo de Trabajo sobre Cultivo de Peces Marinos” realizada por CENIACUA en Punta Canoa, el INPA en cabeza del Biólogo Juan Valverde formuló un proyecto para investigar la factibilidad de la reproducción en cautiverio del pargo lunarejo *Lutjanus guttatus* en Buenaventura, especie nativa del Pacífico que tiene gran importancia comercial.

Dicho proyecto arrojó resultados alentadores entre los que se destacan la identificación de caladeros para la captura rutinaria de reproductores maduros, la obtención de varios desoves en cautiverio y la producción de los primeros alevinos de la especie. Sin embargo, se llegó a la conclusión que la alimentación que se les proporcionaba a las larvas era uno de los principales obstáculos para la lograr la producción sostenida de alevinos de pargo palmero.

Teniendo en cuenta los antecedentes anteriormente mencionados, CENIACUA y la compañía camaronera C.I. BALBOA S.A. pusieron a consideración del INCODER la presente propuesta, para adelantar conjuntamente las investigaciones requeridas para verificar el verdadero potencial del pargo lunarejo como especie candidata para la diversificación de la maricultura en el Pacífico colombiano.

Los experimentos de reproducción y larvicultura de la especie se realizaron en el laboratorio de la compañía camaronera C.I. BALBOA S.A., ubicado en la isla de “El Morro” (Tumaco), partiendo de reproductores maduros capturados en el medio natural e inducidos hormonalmente mediante métodos agudos tradicionales (HCG) con el fin de obtener en forma sostenida alevinos de la especie en cautiverio

Para Lograr niveles aceptables de supervivencia en el proceso de larvicultura se implementó un sistema de producción de alimento vivo compuesto de microalgas, rotíferos y *Atemia* que fue complementado con enriquecedores con alto contenido de ácidos grasos poli insaturados (PUFA'S) y concentrados comerciales de alto contenido proteico empleados habitualmente en el laboratorio para etapas larvales de camarón.

1. MARCO CONCEPTUAL

1.1. REPRODUCTORES

Presentan dos orígenes posibles: los procedentes de un banco en cautiverio, criados para tal efecto y/o los capturados directamente en el medio natural, que es el caso de la presente investigación.

1.1.1. Reproductores del medio natural (salvajes): lo habitual en el trabajo con reproductores salvajes es la captura de éstos en el medio natural durante la época reproductiva y su traslado al laboratorio para inducirles la maduración final y el desove por métodos agudos y generalmente invasivos o fuertes. Esta modalidad presenta algunas dificultades como los gastos relativamente importantes para captura y traslado, incertidumbre e inestabilidad de captura y estrés con consecuencias negativas para la reproducción, tales como afectaciones por atresia, calidad de huevos, etc (Álvarez-Lajonchere y Hernández-Molejón, 2001).

1.1.2. Diferenciación del sexo: ya que el dimorfismo sexual (estructuras externas bien marcadas que diferencien los sexos) no es común en los teleósteos, el sexo puede diferenciarse mediante la observación de los caracteres anatómicos de la región anal en relación con las aberturas: en los machos se presentan dos aberturas, la anterior es la anal y la posterior la urogenital que se abre en el extremo de la papila urogenital. Las hembras presentan tres aberturas, la situada en la posición más anterior es el ano, seguida del poro genital y la abertura urinaria es la posterior, situada en el extremo de la papila urinaria.

Estas observaciones deben ir acompañadas, especialmente durante la época de reproducción, de la evaluación del estado del abdomen (redondeado, lleno y blando hasta la abertura genita) y de la papila genital turgente y rojiza; adicionalmente se puede ejercer cierta presión antero-posterior en el abdomen para confirmar la naturaleza de los productos sexuales, aunque es mucho más recomendable el uso de un catéter (cánula) para biopsias (Álvarez-Lajonchere y Hernández-Molejón, 2001).

1.1.3. Determinación del desarrollo sexual en hembras: la biopsia ovárica es el mejor método para ser aplicado en las hembras. Dicho método consiste en introducir una determinada longitud de un catéter o cánula sintética por el oviducto de la hembra viva para alcanzar el centro de la gónada y posteriormente coleccionar los ovocitos intraováricos por succión mientras se extrae lentamente la cánula.

Las hembras de menor desarrollo gonadal que pueden aceptarse para inducir su desove generalmente son aquellas que presentan ovocitos post-vitelogénicos con los glóbulos de vitelo sin fusionar, núcleo central bien visible, sin que se observe la presencia de gotas de aceite o con un grado muy incipiente de agregación; para el pargo lunarejo y para otros lutjánidos en general, se ha establecido un diámetro promedio del ovocito =350 μm (Álvarez-Lajonchere y Hernández-Molejón, 2001; Boza *et al.*, En prensa).

1.1.4. Determinación del desarrollo sexual en machos: se emplean el color del semen, volumen del semen en relación con la talla, fluidez, hidratación, espermátocrito, densidad celular, motilidad, vitalidad y diversas determinaciones cuantitativas del plasma.

1.2. INDUCCIÓN AL DESOVE

Los reproductores bien son condicionados al desove natural mediante manipulación de parámetros ambientales como foto-periodo y temperatura, incluyendo la alimentación (métodos no invasivos) o bien son inducidos a la ovulación mediante métodos hormonales (invasivos), seguidos de desoves voluntarios o de la extrusión manual (Benetti *et al.*, 2003; Castaño y Botero, 2003).

Los métodos empleados para la inducción hormonal incluyen inyecciones de HCG (Gonadotropina Coriónica Humana) a 500-1600 UI/Kg de peso corporal, LHRH-a (Hormona Liberadora de Hormona Leutilizante análoga) a 50-100 $\mu\text{g/Kg}$ y/o otras hormonas naturales o sintéticas. Otras técnicas incluyen la implantación de polímeros sintéticos y piensos (pellets) de colesterol, los cuales sirven como matrices inertes para LHRH-a y GnRH (Hormona Liberadora de Gonadotropina) en los tejidos musculares de los reproductores (Benetti *et al.*, 2003; Valverde y Boza, 1999.).

1.3. CUIDADO LARVAL

1.3.1. Incubación: Los desoves son colectados mediante un *skimmer* o limpiador de superficie instalado en cada tanque de maduración; los huevos son enjuagados con agua salada estéril y luego son puestos en tanques de incubación y/o larvicultura donde se obtienen los valores de cantidad y fertilidad.

Un baño con solución de formaldehído (10 ppm) es generalmente empleado para reducir la presencia bacteriana en los huevos recién eclosionados. A 26° C, los huevos de las especies tropicales generalmente eclosionan a las 24 horas y las larvas comienzan a alimentarse de los dos a tres días después de la eclosión (2–3 DAH – *days after hatch*) (Benetti *et. al.*, 2003).

1.3.2. Larvicultura: las técnicas intensivas y semi-intensivas (mesocosmos) de levante larval han sido empleadas para demostrar la factibilidad de la producción de alevinos de numerosas especies de peces marinos de alto valor comercial. No obstante, la alimentación larval es uno de los puntos más críticos del cultivo de estos organismos ya que si se realiza de forma inadecuada es la responsable de altas mortalidades y crecimientos inconvenientes (Yúfera y Pascual, 1984; Eda *et al.*, 1990 y James, 1996 En: Álvarez-Lajonchere y Hernández-Molejón, 2001; Liao *et al.*, 2001.).

La alimentación de las larvas de peces marinos es la más compleja entre los organismos cultivados debido a que durante las primeras etapas presentan un tamaño de boca muy pequeño que requiere presas entre 50-100 µm. Dichas presas además deben estar conformadas por diferentes grupos de especies y estadios de organismos en la red trófica que hasta el momento no han podido sustituirse por alimentos artificiales (Álvarez-Lajonchere y Hernández-Molejón, 2001; Takeuchi, 2001.).

Las larvas con saco vitelino son sembradas a una densidad de >100 / litro en sistemas intensivos y a 20/l en sistemas semi-intensivos. Los alimentos larvales consisten principalmente de microalgas, rotíferos enriquecidos, plancton silvestre (particularmente copépodos), nauplios de *Artemia*, metanauplios y adultos enriquecidos, los cuales aseguran una incorporación adecuada de ácidos grasos poli-insaturados – PUFA'S. Se han señalado correlaciones positivas entre la

concentración de los PUFA'S con la menor incidencia de malformaciones, el crecimiento y supervivencia en las larvas de diversas especies de peces marinos y estuarinos, generalmente relacionados con los periodos de metamorfosis, destacándose su participación en el desarrollo de tejidos neurales y de la retina y su importancia para la resistencia al estrés (Rimmer y Reed, 1990; Dhert *et al.*, 1990; Kanazawa, 1993; Rimmer *et al.*, 1994; Mourente *et al.*, 1991; Bell *et al.*, 1995; Ako *et al.*, 1991; Watanabe, 1993; Grau *et al.*, 1993; Watanabe y Kiron, 1994; Fuguita *et al.*, 1996, 1999 En: Álvarez-Lajonchere y Hernández-Molejón, 2001).

Los tipos de alimento deben suministrarse de forma sobrepuesta y la tasa de crecimiento de una especie particular determina el tiempo al cual los ítems alimentarios son introducidos a tallas progresivamente mayores. El destete del alimento vivo al alimento artificial puede tomar un poco más de 40 DAH. Las larvas son extremadamente susceptibles al estrés y no tolerarán una manipulación antes de los 30 DAH (Benetti *et al.*, 2003).

2. METODOLOGÍA

2.1. PESCA DE REPRODUCTORES

Para la consecución de los reproductores del pargo lunarejo se llevaron a cabo dos metodologías de captura para evaluar su funcionalidad y efectividad en términos de número de especímenes capturados y estado general de los mismos (barotrauma, lesiones superficiales y vitalidad).

2.1.1. Faenas artesanales: para ésta investigación se destinó una lancha en fibra de vidrio de 9,5 m de eslora dotada con motor fuera de borda (50 HP/cuatro tiempos), dos tanques de 500 litros para transporte de reproductores y un dispositivo de aireación portátil conformado por un soplador (blower) a batería de 12 voltios, mangueras de aireación y piedras difusoras.

Las faenas de pesca se efectuaron semanalmente en diferentes zonas aledañas a la bahía de Tumaco contando con la participación de pescadores locales para la ubicación de los caladeros (sitios con buena producción pesquera) y su respectivo registro mediante un geoposicionador satelital –GPS ([Figura 1 A y B](#)).



A



B

Figura 1. Faena exploratoria de caladeros con un grupo de pescadores locales. (A) pesca al volantín; (B) captura de un ejemplar de pargo lunarejo con palangre.

Cada faena comenzaba alrededor de las 16:00 Hrs. y finalizaba alrededor de las 8:00 Hrs. ya que en las horas cercanas al crepúsculo (17:30-19:00 y 5:00-6:30 horas) se acentúa la actividad alimentaria del pargo lunarejo y se puede capturar con mayor facilidad.

Se emplearon de manera individual y combinada los artes volantín (línea de mano con 2-3 anzuelos y lastre) y palangre (600 anzuelos) en sitios cuya profundidad no superara las 18 brazas con el fin de evitar el barotrauma severo de los peces (hinchamiento de la vejiga gaseosa de los peces debido al cambio de presión) al momento de su extracción. Los peces con barotrauma fueron identificados por el notable hinchamiento abdominal y su posición de costado o boca arriba en la superficie del agua (flotabilidad excesiva) que impedía el normal control de la natación.

2.1.2. Control del barotrauma: los peces capturados fueron puestos en los tanques de 500 litros, donde se les retiró el anzuelo y se les practicó –cada vez que fue necesario- la punción de la vejiga gaseosa con una aguja hipodérmica para retirar el exceso de gas y permitir que el pez nivelara las presiones para descender en la columna de agua y estabilizarse (Benetti & Feeley, 1999).

2.1.3. Faenas en embarcaciones industriales: de forma paralela a las faenas de pesca artesanal, se colectaron reproductores de pargo lunarejo provenientes de las capturas de dos barcos pesqueros de arrastre que cubren permanentemente la ruta Tumaco – Buena Ventura. Para tal fin se adelantaron conversaciones con el administrador de las embarcaciones y se llegó al acuerdo de que una vez los barcos estuvieran realizando arrastres cerca de Tumaco, notificaran su posición telefónicamente para ir a su encuentro en la embarcación del proyecto, abordarlos junto con los tanques y el dispositivo de aireación portátil, esperar que izaran las redes, seleccionar los peces maduros en mejor estado (previo control del barotrauma), trasladarlos a la lancha y partir hacia las instalaciones del laboratorio.

En las embarcaciones (lancha del proyecto y barcos pesqueros) el agua fue recambiada constantemente para mantener junto con la aireación una buena calidad de agua durante las faenas y el transporte.

2.2. TRANSPORTE Y ACLIMATACIÓN

Finalizadas las faenas, los animales fueron transportados hasta el muelle de la planta de proceso de la compañía camaronera C.I. Balboa S.A. y luego transferidos a tanques de 0,5 y 1 m³ con aireación constante dispuestos en un camión o camioneta para ser finalmente trasladados por tierra (15-20 minutos) hasta el laboratorio de maduración y larvicultura de la misma compañía, ubicado en la Isla del Morro.

El periodo de aclimatación de los peces capturados se realizó en tanques de 0,5, 1 y 2 m³ suministrando aireación y recambio de agua permanente durante 4-6 horas para luego proceder a chequearlos y conformar las parejas o tríos para la inducción del desove ([Figura 2](#)).



Figura 2. Tanque de aclimatación de reproductores

2.3. CHEQUEO Y SELECCIÓN DE REPRODUCTORES

Una vez cumplido el periodo de aclimatación los peces fueron puestos uno a uno en tinas plásticas de 40 litros que contenían 2-Fenoxi-etanol (anestésico) a una concentración de 200-250 ppm por un tiempo aproximado de cinco minutos; dicho anestésico además de ser muy eficiente, posee propiedades profilácticas que ayudan a la desinfección de la superficie corporal del pez (Álvarez-Lajonchere, 2003).

El momento idóneo de sedación para manipular los animales con facilidad se identificó al presentarse la pérdida de equilibrio, en la cual los peces no controlan su natación y quedan flotando de costado o boca arriba. Posteriormente se cubrió la cabeza de los peces con una tela suave para minimizar el estrés, se identificó el sexo según lo anotado en el numeral 1.1.2.

La valoración del estadio de madurez gonadal se realizó de la siguiente forma: los machos se consideraron maduros si expulsaban semen al hacerles un masaje antero-posterior por la parte baja de los flancos. Para saber si las hembras estaban maduras se les introdujo una cánula (1.25 mm Ø interno) 5 - 8 cm por el oviducto, y se succionó con la boca para extraer una muestra de ovocitos, manipulando los peces siempre dentro del agua para evitar un estrés adicional (Álvarez-Lajonchere y Hernández-Molejón, 2001).

Las muestras de ovocitos se pusieron en cajas de petri y se agregaron gotas de solución de Serra (etanol 60%, formol 30% y ácido acético 10%) para aclarar los ovocitos y facilitar su separación; la masa ovígera fue observada al estereoscopio con el fin de valorar de forma preliminar el estado de madurez y la composición por tallas de los ovocitos.

Posteriormente, una submuestra fue observada en el microscopio para medir con un micrómetro de ocular los diámetros de los lotes de ovocitos de vitelogénicos opacos (Álvarez-Lajonchere y Hernández-Molejón, 2001). Las hembras seleccionadas para la inducción fueron aquellas que presentaron lotes de ovocitos bien vitelados, iguales o mayores a 350 µm de diámetro, con el núcleo ubicado en la periferia del huevo o al menos migando del centro hacia ésta.

2.4. INDUCCIÓN DEL DESOVE Y RECOLECCIÓN DE LOS HUEVOS

Debido a que algunos aspectos metodológicos variaron con los desoves obtenidos a lo largo de la experiencia, de aquí en adelante se hará precisión sobre los cambios puntuales realizados para cada caso, particularmente con los desoves que fueron fertilizados, los cuales se nombrarán de ahora en adelante ***Desove exitoso N° 1***, ***Desove exitoso N° 2*** y ***Desove exitoso N° 3***.

Las hembras seleccionadas fueron inyectadas en los muñones de las aletas pectorales con dos dosis de Primogonyl® (gonadotropina coriónica humana - HCG) cada una de 800 UI/Kg (peso pez) con un intervalo de 24 horas ([Figura 3](#)). A los machos sólo se les suministró una dosis de 500 UI en el momento de poner la segunda dosis a la hembra (Álvarez-Lajonchere, 2003; Boza *et al.*, en prensa).



Figura 3. Inyección de hormona (HCG) en la base de la aleta pectoral.

Una vez seleccionados e inyectados, los reproductores fueron introducidos en tríos en los tanques de desove (2000 l.) a razón de una hembra por dos machos ([Figura 4](#)). El comportamiento reproductivo se caracteriza por el seguimiento constante de la hembra por parte de los machos, los cuales la estimulan a desovar y liberan su esperma inmediatamente salen los huevos para lograr la fertilización.

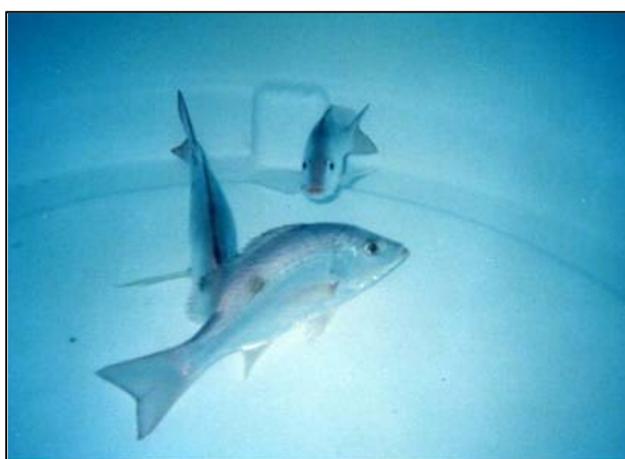


Figura 4. Conformación de tríos reproductivos (1 hembra : 2 machos) en los tanques de desove

Estos tanques fueron constantemente revisados entre las 24-38 horas después de la última inyección para la confirmación del desove ya que el tiempo puede variar según el estado de avance de la madurez sexual de la hembra (Botero, com. pers).

Después de confirmado el desove, se abrió el recambio ascendente de agua (ubicado en el fondo del tanque) y se colectaron los huevos dejando que el tanque de desove rebosara a un concentrador con malla suave de 400-500 μm dispuesto dentro de otro recipiente más grande para crear un colchón de agua y evitar el maltrato de los huevos (Figura 5).



Figura 5. Detalle del colector de huevos anexo al tanque de desove.

2.4.1. Número de huevos y porcentaje de fertilización: finalizada la recolección, los huevos se lavaron dentro del mismo concentrador con agua de mar limpia y se estimó su número por volumetría empleando una modificación de la metodología propuesta por Álvarez-Lajonchere (2003), la cual se describe a continuación:

Los huevos concentrados fueron puestos en un volumen conocido (10 litros), se homogenizó la columna de agua con aireación y piedras difusoras y se tomaron cinco (5) muestras con una pipeta Bogorov (8 ml) las cuales se depositaron una a su vez en cajas de Petri para contar en el estereoscopio los huevos viables (fertilizados) caracterizados por ser transparentes, tener embrión bien definido y gota de aceite y los huevos no viables, caracterizados por presentar color blanquecino.

Se obtuvo el promedio de los huevos viables y de los no-viables en las alícuotas de 8 ml y se extrapolaron dichos valores al volumen total (10 l). Luego se calculó el porcentaje de fertilización mediante la fórmula:

$$\% F = \frac{V}{T} \times 100$$

Donde %F = porcentaje de fertilización; T = número total de huevos (viables + no-viables); V = número total de huevos viables.

2.4.2. Efecto de la hormona (HCG) sobre la ovulación: con el fin de establecer el efecto de la hormona sobre el desarrollo de los ovocitos, los diámetros de los huevos del Desove exitoso N° 1 fueron medidos antes de la primera inyección de HCG (0 hrs.), antes de la segunda inyección de HCG (24 hrs.) y al momento del desove (36 hrs.).

2.5. INCUBACIÓN, ECLOSIÓN Y COMIENZO DE LA LARVICULTURA

Se le dio un suave movimiento circular al agua que contenía los huevos concentrados (balde de 10 l) para permitir que los huevos no-viables se decantaran después de algunos minutos. Los huevos viables, de naturaleza flotante, fueron colectados y puestos en las incubadoras de forma inmediata en el caso del *Desove exitoso N° 1* y poco antes de la eclosión (16 horas después del desove) en los desoves exitosos N° 2 y 3 con base en que los huevos embrionados (con la cabeza y cola separándose del vitelo) tienen una alta tolerancia a estímulos mecánicos (Álvarez-Lajonchere y Hernández-Molejón, 2001).

El término DAH – *'Days Alter Hatch'* que traduce *días después de la eclosión*, será empleado de aquí en adelante, definiendo el 0 DAH como el día cero después de la eclosión, la cual se presenta generalmente alrededor de las 18 horas después de ocurrido el desove a una temperatura de 28° C (Boza y Botero, com. pers.).

A lo largo de los ensayos de reproducción se emplearon tres tipos de tanques para la incubación y larvicultura: (i) tanques cónicos de fibra de vidrio (400 l.), (ii) tanques cúbicos de concreto con los bordes redondeados (1 m³.) y tanques en 'U' de concreto empleados para larvicultura comercial de camarón (10 m³).

Los dos primeros tipos fueron empleados para el Desove exitoso N° 1, en los que el cada uno fue inoculado con la mitad de los huevos fertilizados con el fin de determinar la incidencia de la forma del tanque en el desarrollo larvario.

Los del último tipo, que conformaban un módulo de larvicultura para camarón marino, se emplearon para los desoves restantes (*Desoves exitosos N° 1 y 2*). Dicho módulo contaba con ocho tanques, de los cuales 3 fueron empleados para el levante de larvas, 2 para el cultivo de microalgas y los 3 restantes para el cultivo de rotíferos y *Artemia salina*.

2.5.1. Desinfección del agua y aireación: el agua de los tanques de incubación y larvicultura fue previamente filtrada (1-5 μm), tratada con cloro (15 ppm) y declorinada con tiosulfato. En el caso del Desove exitoso N° 1 también se añadió EDTA a 5 ppm y se empleó una aireación suave para mantener los huevos en movimiento sin estropearlos; cuando ocurrió la eclosión la aireación se redujo al mínimo dado el reducido tamaño de los tanques.

En el Desove exitoso N° 2 y 3 se empleó una aireación muy tenue durante los días 0-20 DAH empleando 6 piedras difusoras ubicadas simétricamente a media agua en el tanque; a partir del día 21 DAH la aireación se fue aumentando paulatinamente.

2.5.2. Recambios de agua: en el caso del Desove exitoso N° 1, durante el 0 DAH se recambió 50% del agua en las incubadoras al cabo de las primeras 6 horas y otro 50% a las 6 horas siguientes; en los días siguientes se realizó un recambio diario del 20% empleando agua verde (*Nanncholropsis oculata*).

En los desoves restantes no se empleó recambio inicial de agua sino adición de microalgas hasta el día 10 DAH. Del día 11 al 18 DAH se aplicó un recambio diario de alrededor del 40% con el fin de mantener una buena calidad de agua, empleando una mezcla de agua de mar tratada (clorinada, declorinada y filtrada a 1 μm) y microalgas para mantener la coloración verde clara del agua. Del 19 DAH hasta el 45 DAH se empleó para recambio sólo agua de mar tratada.

2.6. LARVICULTURA Y PRODUCCIÓN DE ALEVINOS

2.6.1. Desarrollo embrionario: en vasos de precipitado de 1 litro se tomaron varias muestras de huevos del Desove exitoso N° 1 para seguir de cerca el desarrollo embrionario hasta la eclosión, tomando como referencia el trabajo realizados por Boza *et al.* (En prensa) con esta especie (*L. guttatus*) y el realizado por Kimmel *et al.* (1995) con el pez zebra (*Brachydanio rerio*), especie considerada como modelo general de la embriogénesis en peces.

2.6.2. Alimentación de larvas y alevinos: como durante el 1 y 2 DAH las larvas se alimentan de su saco vitelino y gota de aceite, en esas 48 horas sólo se añadieron microalgas (*Nannochloropsis oculata*) como medida preventiva ya que éstas son el primer alimento que consumen las larvas una vez abren la boca. A partir del 2 ½ - 3 DAH (momento en que generalmente ocurre la abertura de la boca) además de las microalgas, comenzó la adición de rotíferos (*Brachionus rotundiformis*) sin enriquecer (10-15/ml) en el caso del Desove exitoso N° 1.

Para los Desoves exitosos N° 2 y 3, el protocolo de alimentación de las larvas recién eclosionadas comenzó a partir del 2 DAH suministrando de 0,5-1,0 m³ de agua verde (cultivo masivo de *Nannochloropsis oculata*), solución nutritiva, rotíferos (10-15/ml) enriquecidos con SELCO[®], zooplancton silvestre, diferentes alimentos balanceados para el camarón marino *Penaeus vannamei* ([Tabla 1](#)) y *Artemia salina* (5/ml) también enriquecida con SELCO[®].

El alimento vivo y artificial fue suministrado de forma conjunta desde el comienzo de la larvicultura procurando que el tamaño de la presa (zooplancton) y partícula alimento artificial estuvieran acordes al desarrollo del tamaño de la boca de las larvas de los peces.

Teniendo en cuenta que unas larvas se desarrollan antes que otras y que por lo tanto deben estar presentes alimentos de diferentes dimensiones, los ítem alimentarios fueren vivos o artificiales, se suministraron de modo tal que al añadir un nuevo tipo de alimento se conservaran por varios días los ítem anteriores (de menor tamaño), previendo una transición gradual hasta suministrar únicamente alimento artificial.

Tabla 1. Alimentos balanceados para camarón empleados en la larvicultura del pargo lunarejo *L. guttatus*.

TIPO ALIMENTO	CARACTERISTICAS
SOLUCIÓN NUTRITIVA INICIAL	AGUA DULCE + EMULSION DE SCOTT® + EPAC (INVE®) TAMIZADO POR MALLA DE 100 µm. <i>Se mezclan los ingredientes y se espera que decante la solución. Con una cuchara se suministra el infusorio en las zonas de mayor concentración de larvas</i>
ALIMENTO MICROPARTICULADO	EPAC (INVE®) TAMIZADO POR MALLA DE 100 µM. <i>Composición → Proteína 45%, lípidos 7%, fibra 3% y humedad 10%.</i>
ALIMENTO PARTICULADO 1	EPAC (INVE®) SIN TAMIZAR POR 100 µM.
ALIMENTO PARTICULADO 2	MEZCLA DE EPAC (INVE®) SIN TAMIZAR POR 100 µM. + MOLINO 50 (MOLIDO) <i>Composición Molino 50 → Proteína 55%, grasa 68%, fibra 2%, cenizas 12% y humedad 10.5%</i>
ALIMENTO PARTICULADO 3	MEZCLA DE MOLINO 50 (MOLIDO) + ALIMENTO PARA REPRODUCTORES C.I. BALBOA. <i>Composición de 1 kg de alimento para reproductores C.I. Balboa S.A. → 750 g de alimento pulverizado (Economac o Molino 50); 47 gramos de Spirulina sp.; 40 gramos de pprika; 15 gramos de vitamina C; 50 ml. de emulsión de Scott; 100 gramos de harina de trigo; 30 gramos de gelatina sin sabor; 1600 UI. de vitamina E; 300 ml. de agua; 1 ml de lecitina de soya.</i>

2.6.3. Limpieza del fondo de los estanques: los tanques se limpiaron mediante sifoneo adaptando un tubo de 1 pulgada al extremo de una manguera. A partir del 8 DAH se empleó un pequeño tambor con malla de 400 µm en el extremo inicial del tubo de sifoneo ya que las larvas (después de haber inflado su vejiga gaseosa y hacer uso de ella) se ubicaban más al fondo de la columna de agua.

2.7. PRODUCCIÓN DE ALIMENTO VIVO

2.7.1. Cultivo de microalgas: para el cultivo de la microalga *Nannochloropsis oculata* se siguió el protocolo empleado por la sala de microalgas del laboratorio de C.I. Balboa S.A., partiendo de cepas puras a baja concentración en tubos de ensayo. Se realizaron réplicas de cada etapa de producción cada tres días. Los tubos de cepas puras se replicaron en 10 tubos de ensayo, los cuales se inocularon en dos matraces

(*erlenmeyers*) de 250 ml. Con cada matraz se inoculó un botellón 'madre' a partir del cual se sembraron 10 botellones de producción. Con dichos botellones de producción bien se alimentaron los rotíferos, la *Artemia* y las larvas directamente o se emplearon para la siembra de cultivos masivos (4 m³) según las necesidades ([Figura 6](#)).



Figura 6. (A) Botellones 'madre' y (B) botellones de producción

2.7.2. Cultivo de rotíferos: en el laboratorio se adecuó un entable para la producción del rotífero *Brachiounus sp.* empleando ocho (8) botellones de 25 l c/u como inóculos base y cinco (5) tanques de 400 litros para el cultivo masivo. Se estableció un sistema escalonado que permitió la cosecha diaria de un tanque de cultivo masivo que arrojaba una producción de 30-70 millones de rotíferos/día ([Figura 7](#)). Los rotíferos se alimentaron con microalgas (*Nannochloropsis oculata*) durante su permanencia en los botellones y con microalgas y levadura seca (0.5 g / millón de rotíferos repartidos en 4 dosis) en los tanques de cultivo masivo. Se empleó dicha microalga porque es la que más aportes nutricionales suministra a los rotíferos (Lavens & Sorgeloos, 2003).



Figura 7. Botellones de inóculo de rotíferos y tanques para el cultivo masivo.

Para determinar diariamente el número de rotíferos presentes en los tanques, se tomó una muestra de agua con un vaso de precipitado (250 o 500 ml), se homogenizó y se extrajeron dos alícuotas de 2 ml c/u con una pipeta. Cada alícuota fue puesta en una placa Sedgewick Rafter (SR), los rotíferos se fijaron con gotas de yodo y la cantidad de rotíferos obtenida en ambas alícuotas (2 ml c/u) fue promediada y extrapolada al volumen total del tanque. En una planilla de control diario se registró el número total de individuos, la fecundidad (número de rotíferos con huevo(s)) y la cantidad de levadura a suministrar para conocer el estado y evolución de cada tanque hasta su cosecha.

Al momento de la cosecha de los masivos, los rotíferos se lavaron con agua limpia en el mismo concentrador para retirar mugre y protozoos no deseados. En el caso de los Desoves exitosos N° 2 y 3 fueron transferidos a un tanque de enriquecimiento de 400 l por un periodo de seis horas con el fin de aumentar su calidad nutricional (incorporar una alta concentración ácidos grasos altamente insaturados-HUFA'S) para ser posteriormente suministrados a las larvas. Dicho enriquecimiento fue realizado con DHA Protein SELCO® (INVE Aquaculture) empleando una dosis de 550 mg/l para una densidad de 2000 rotíferos/ml. Se adicionó inicialmente la mitad de la emulsión y la mitad restante después de transcurridas las tres primeras horas de enriquecimiento (Álvarez-Lajonchere y Hernández-Molejón, 2001).

2.7.3. Cultivo de Artemia: en tanques cónicos de 400 l de capacidad se eclosionaron entre 10 a 40 g de Artemia (según la necesidad) que fueron sembrados en tanques masivos (2-4 m³) para suministrar a las larvas tanto nauplios como estadios más avanzados, dependiendo del grado de desarrollo de los peces. El enriquecimiento se realizó de forma similar al numeral anterior pero adicionando la emulsión de DHA Protein SELCO® a razón de 200-300 mg/l para densidades de alrededor de 150 nauplios/ml (Álvarez-Lajonchere y Hernández-Molejón, 2001).

2.7.4. Captura de plancton silvestre: con el fin de complementar la alimentación de las larvas se realizaron arrastres de zooplancton en diferentes esteros donde es reconocida la presencia de juveniles de la especie *L. guttatus*. Inicialmente se empleó la red de arrastre de zooplancton del Centro Control de Contaminación del Pacífico (CCCP) de la Capitanía de Puerto de Tumaco y luego tomando ésta como modelo se construyó una de fabricación artesanal. .

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

3.1. CAPTURA DE PADROTES

3.1.1. Faenas artesanales: Los buenos caladeros de pesca resultaron ser sitios muy puntuales debido a que los sustratos rocosos, propios de los peces demersales, no eran homogéneos a lo largo y ancho de las zonas exploradas. El uso del navegador satelital (GPS) empleado en las faenas, al tener un margen de error de 7-15 metros sólo sirvió para tener una idea general de la ubicación de los sitios siendo indispensable el peritazgo e intuición de los pescadores locales para lograr faenas exitosas.

3.1.1.1. Efectividad de las artes de pesca: los dos artes de pesca empleados presentaron ventajas y desventajas que hacen relativa su efectividad, siendo por lo tanto complementarios. Si bien la captura con volantín generó menor estrés en los animales por ser extraídos inmediatamente del agua una vez mordían el anzuelo, las probabilidades de obtener suficientes animales por faena fueron menores que al emplear el palangre, a menos que se lograra ubicar un caladero en el punto exacto.

Por otra parte, el palangre (600 anzuelos; ~ 2000 m) incrementó las probabilidad de captura aunque el tiempo que demandaba su operación desde el lance hasta la recogida (3-5 horas) generó un maltrato considerable a los animales que salían exhaustos de luchar durante horas para liberarse del anzuelo. Por tal motivo, después de las primeras faenas se emplearon los dos artes simultáneamente (Mientras se esperaba la recogida del palangre se pescaba al volantín) o se pescaba únicamente al volantín si se lograba ubicar un buen caladero.

3.1.2. Faenas en embarcaciones industriales: la estrategia de aprovechar la captura de los barcos pesqueros de arrastre resultó mucho más práctica que las faenas nocturnas de 14-16 horas de duración ya que los peces podían capturarse a cualquier hora del día sin depender de la actividad de alimentación de la especie y de la disponibilidad de carnada.

Adicionalmente, por condiciones de espacio y estabilidad de la embarcación, se pudo determinar el estado de madurez de los animales *in situ* (previa anestesia se canularon las hembras y la muestra de ovocitos fue valorada a nivel macroscópico) y seleccionar con certeza los peces a ser inducidos hormonalmente.

Una importante desventaja que se encontró al emplear esta modalidad de captura fue que al obtener un gran volumen de captura por arrastre, los animales salieron bastante estropeados, condición que redujo ampliamente su desempeño al momento de la inducción y sus posibilidades de sobrevivencia, como se verá más adelante.

3.1.3. Rendimiento de las faenas: sin mencionar las faenas en las que no se capturó ni un solo pargo, se realizaron 16 salidas de pesca que arrojaron un total de 122 ejemplares de pargo lunarejo (*Lutjanus guttatus*), de los cuales sólo 20 hembras y 33 machos fueron susceptibles de inducción, representando el 16,4% y el 27% de la captura, respectivamente ([Tabla 2](#)).

Tabla 2. Número de peces capturados e inducidos según el tipo de faena

Tipo de faena	N° salidas	N° Total peces	N° peces inducidos	
			Machos	Hembras
Artisanal	13	98	19	10
Industrial	3	24	14	10
TOTAL	16	122	33	20

Cuando la captura resultó únicamente en machos maduros, éstos fueron mantenidos como animales de reserva en un tanque circular de concreto de 10 m³, para ser empleados en caso de que en las próximas faenas hubiese deficiencia en el número de machos.

3.2. INDUCCIÓN HORMONAL

3.2.1. Efecto sobre los reproductores: La reproducción en los pargos es generalmente asincrónica y de desoves múltiples y a menudo está íntimamente relacionada con las fases lunares y con las fluctuaciones de temperatura y salinidad del agua (Áviles-Quevedo *et al.*, 1996a; Álvarez-Lajonchere, 2003; Boza *et al.*, in press).

El pargo lunarejo en particular es una especie que se reproduce durante todo el año aunque presenta por lo general uno o dos picos reproductivos anuales que coinciden con los periodos de lluvias (Boza *et al*, en prensa; Suárez & Rubio, 1992).

Lo anterior pudo constatarse empíricamente en este estudio puesto que en todas las muestras de biopsias ováricas de hembras maduras se encontraron, en mayor o menor proporción, lotes de ovocitos de diferentes tamaño y estado de madurez, típicos del tipo asincrónico.

De las 20 hembras que fueron inducidas sólo seis (6) desovaron representando el 30%. De esos seis desoves, cuatro (4) fueron exitosamente fertilizados por el semen de los machos y dos quedaron sin fertilizar puesto que los machos (N° 1, 2, 3 y 4) presentaron poca abundancia de semen al momento de su valoración ([Tabla 3](#)).

Tabla 3. Aspectos relevantes de cada uno de los peces inducidos hormonalmente.

Tipo Faena	MACHOS			HEMBRAS					Fecundación	
	Individuo N°	Peso (g)	HCG (U.I.)	Individuo N°	Ø Ovocito (µm)	Peso (g)	HCG (Total U.I.)	Desove		N° Huevos
Artesanal	1 [±]	300,2	150,0	1	390	798,0	1.276,8	SI	12.218,0	NEGATIVA
	2 [±]	265,0	132,5							
	3 [±]	357,2	178,6							
	4 [±]	280,0	140,0							
	5 [±]	600,0	300,0	3*	433	1.270,0	2.032,0	NO	N.A.	N.A.
	6 [±]	567,0	283,5	4*	430	1.626,0	2.601,6	NO	N.A.	N.A.
	7	659,0	329,5	5	510	837,7	1.340,3	SI	17.500,0	POSITIVA
	8 [±]	260,0	130,0	6*	414	342,0	547,2	NO	N.A.	N.A.
	9	600,0	300,0	7	700	635,0	1.016,0	NO	N.A.	N.A.
	10	428,0	214,0							
	11	405,0	202,5							
	12	503,0	251,5	8	450	980,0	1.568,0	SI	75.000,0**	POSITIVA
	13	570,0	285,0	9*	666	980,0	1.568,0	NO	N.A.	N.A.
	14	261,0	130,5							
	15	457,0	228,5							
	16	500,0	250,0							
	17	508,0	254,0							
	18	500,0	250,0							
	19	580,0	290,0							
Industrial	20*	350,0	175,0	11*	360,5	600,0	960,0	NO	N.A.	N.A.
	21*	426,0	213,0	12*	355,8	400,0	640,0	NO	N.A.	N.A.
	22*	589,0	294,5	13*	500	636,0	1.017,6	NO	N.A.	N.A.
	23*	345,0	172,5							
	24*	287,0	143,5	14*	480	453,0	724,8	NO	N.A.	N.A.
	25	467,0	233,5							
	26	234,0	117,0	15*	450	900,0	1.440,5	NO	N.A.	N.A.
	27*	465,0	232,5							
	28	409,0	204,5							
	29*	279,0	139,5	16*	430	500,6	801,0	NO	N.A.	N.A.
	30	325,0	162,5	17*	400	549,7	879,5	NO	N.A.	N.A.
	31	710,0	355,0	18	380	1.000,0	1.600,0	SI	49.500,0**	POSITIVA
	32	308,0	154,0	19	390	1.015,0	1.624,0	SI	49.500,0**	POSITIVA
	33	316,0	158,0	20	400	403,0	644,8	NO	N.A.	N.A.

[±] Machos que si bien están maduros presentan poca abundancia de esperma.

* Animales en mal estado debido a las condiciones de captura

** Número de huevos basado sólo en los huevos viabiles (fertilizados)

La ausencia de resultados con las demás 14 hembras que fueron inducidas se debió principalmente a que:

- Siete de ellas (hembras N°s 11 – 17) fueron capturadas en las faenas industriales en los cuales la red extrajo grandes volúmenes de pescado (cerca de 2.5 m³). La duración de los arrastres (2-3 hrs) y la presión ejercida por el volumen de la captura en el momento del izado de la red generaron graves traumas que deterioraron la condición fisiológica de los animales ([Tabla 3](#)), bloqueando de paso la respuesta a la inducción hormonal. Todos estos animales murieron a las 24-48 horas después de realizada la inducción.
- Las hembras N° 3, 4 y 6 presentaron evidentes signos de fatiga debidos a la prolongada permanencia en el palangre. Esto fue comprobado posteriormente por su estado letárgico en los tanques de aclimatación, en los que permanecieron inmóviles en el fondo o nadando brevemente de costado. La fatiga, sumada al posterior estrés de la manipulación, biopsia intra-ovárica e inyección hormonal generó una disminución paulatina de su condición, acompañada de pérdida de apetito (inclusive frente a camarones vivos) que terminó en la muerte de los ejemplares al sexto día.
- Dos hembras inducidas (N°s 9 y 10), capturadas en dos faenas por un grupo de pescadores que en teoría estaba entrenado para manejar el barotrauma, tampoco desovarón porque llegaron con heridas en la región abdominal y aparato digestivo ocasionados por punciones incorrectas en la vejiga gaseosa y fallecieron al día siguiente (Tabla 13).
- En las dos hembras restantes (N° 7 y 20), que aparentemente no presentaron ningún tipo de desgaste físico, la ausencia de desove pudo estar relacionada con el estrés de la captura y la manipulación, el cual afecta los parámetros sanguíneos (concentraciones hormonales y disminución de vitelogenina), el hipotálamo y la pituitaria con las correspondientes afectaciones endocrinas (gonadotropina, esteroides y cortisol) y alteraciones de conducta.

Los efectos del estrés (pérdida de apetito, pérdidas en la calidad y/o atresia en los ovocitos) afectan los tratamientos hormonales de tal manera, que a pesar de ser los adecuados pueden dar los peores resultados (Álvarez-Lajonchere y

Hernández-Molejón, 2001). Para ilustrar este ejemplo, se tuvo que una de estas hembras inducidas (hembra N° 7) presentó ovocitos bastante hidratados (700 μm) que indicaban que estaban en el punto óptimo de desove y degeneraron en atresia a pesar de la inducción (Tabla 13).

Se tuvo entonces que de **ocho** (8) hembras aparentemente en buen estado, sin signos de fatiga ni maltrato físico y diámetro de ovocitos superiores a 350 micras, **seis** respondieron de forma satisfactoria frente a la inducción, representando un 75% del total. Esto permite asegurar que el tipo y dosis de hormona empleada (1600 UI/Kg para hembras y 500 UI/Kg para machos) fueron efectivas para obtener desoves de calidad en *L. guttatus*, siempre y cuando los animales que sean inducidos se encuentren en buenas condiciones. Dosis similares a estas (1600 U.I. para hembras y 300 U.I. para machos) fueron también empleadas con éxito por Boza y colaboradores (En prensa) para la misma especie partiendo de animales criados en jaulas flotantes.

Por lo tanto, hay que resaltar que es indispensable brindar buenas condiciones durante las actividades de captura y traslado (buena calidad de agua, manipulación cuidadosa, aireación, etc.) de los animales con el fin de no generar un estrés demasiado fuerte ni disminuir su condición fisiológica mediante métodos de captura inadecuados para obtener las respuestas esperadas frente a los tratamientos agudos de inducción hormonal.

3.2.2. Fecundidad y porcentaje de fertilización: la cantidad de huevos desovados por las hembras, tanto en los desoves no-fertilizados como en los fertilizados estuvo entre un rango de 10.096 a 75.000 huevos ([Tabla 4](#)). Para la misma especie han sido reportados valores similares, aunque algo menores, de 8.600 a 47.000 huevos (Boza *et al.*, En prensa).

Sólo fue posible calcular el porcentaje de fertilización de Desove exitoso N° 1 (hembra N° 5) con base en la metodología planteada debido a que en los desoves siguientes no se contó con el flujo de agua ascendente (recambio) desde la base de los tanques para coleccionar los huevos infértiles que se precipitan al fondo.

El porcentaje de fertilización obtenido (58,6%) en este primer desove exitoso (Tabla 14) estuvo entre el rango de 30 y 90% reportado por Boza *et. al.*, (En prensa) aunque el número de huevos (17.500) se encontró por debajo de los valores medios (27.800) reportados por estos mismos investigadores.

Tabla 4. Número de huevos y % de fertilización de los desoves obtenidos durante el trabajo.

Fecha	Hembra N°	Peso (g)	N° total de huevos	N° huevos viables	% fertilización
16-jul	1	798,0	12.218,0	0,0	0,0
24-jul	2	650,0	10.096,0	0,0	0,0
10-sep	5	837,7	17.500,0	10.248,0	59,0
30-oct	8	980,0	N.D.	75.000,0	N.D
11-nov	18	1.000,0	N.D.	49.500,0	N.D
	19	1.015,0	N.D.	49.500,0	N.D

*Número estimado de huevos viables de 2 hembras que desovaron simultáneamente en el mismo tanque. La cantidad total de huevos viables (99000) fue dividida entre dos.

Cabe anotar que cuando existe estimulación hormonal los valores de fecundidad están directamente influenciados por el estado de madurez, época reproductiva y peso de las hembras y que el porcentaje de fertilización puede ser aumentado mediante la inclusión de uno o dos machos más en el tanque de desove (Álvarez-Lajonchere, com. pers.).

Como en los Desoves exitosos N° 2 y 3 no se pudo colectar la masa de huevos infértiles (Hembras N° 8, 18 y 19), se realizó únicamente la valoración volumétrica de los huevos viables -de naturaleza flotante- los cuales fueron colectados con baldes y mallas de 500 micras (Tabla 14).

En el caso del Desove exitoso N° 3, dos hembras (N° 18 y 19) fueron puestas en un mismo tanque con cuatro machos, obteniéndose el desove simultáneo de ambas. Dada la gran similitud entre las dos hembras (peso y diámetro de ovocitos) y con el fin de tener un valor estimado de número de huevos / hembra, el valor total de los huevos colectados fue dividido entre dos ([Tabla 4](#)).

3.2.3. Efecto de la hormona sobre el desarrollo del ovocito: el diámetro inicial de los ovocitos vitelogénicos opacos (350 μm) aumentó cerca de un 45% después de la primera inyección (510 μm) y cerca de un 65% después de la segunda inyección (840 μm), encontrando que los efectos de la hormona en el desarrollo de los ovocitos es bastante similar en otras especies del género ([Tabla 5](#)).

Tabla 5. Diámetro de los ovocitos (a las 0, 24 y 36 horas) de diferentes especies de pargos que han sido inducidas hormonalmente

ESPECIE	DIÁMETRO DEL OVOCITO (μm) A: (tiempo de inducción)		
	0 hrs.	24 hrs.	Después del desove 36 hrs.
<i>Lutjanus guttatus</i> **	350	510	840
<i>L. analis</i> *	382	511	783
<i>L. campechanus</i> *	354-365	ND	800
<i>L. Johnii</i> *	400	ND	800
<i>L. argentimaculatus</i> *	400	ND	740
<i>L. peru</i> *	ND	ND	ND
<i>L. griseus</i> *	ND	ND	740-760
<i>L. argentiventris</i> *	ND	ND	758

* Datos tomados de Pintos-Terán *et al.*, 2004; Áviles-Quevedo *et al.*, 1996b; Boza *et. al.*, En prensa.

**Datos del presente estudio.

De igual manera, los resultados obtenidos en cuanto a tiempo de obtención del desove, cantidad de hormona (HCG) empleada y número de huevos viables se encuentran dentro de los rangos obtenidos por otros investigadores, aunque la producción de huevos viables fue mayor en el presente estudio ([Tabla 6](#)).

Como sólo se obtuvo el porcentaje de fertilización en el primer desove, el cual fue fertilizado por un solo macho, para poder realizar comparaciones con otros trabajos se tomaron los datos de fecundidad reportados en la literatura y se calculó la fecundidad relativa en términos de huevos viables/Kg, aplicándole a los datos de fecundidad los respectivos porcentajes de fertilización ([Tabla 6](#)).

Tabla 6. Inducción hormonal con HCG y producción de huevos viables (embrionados) en dos especies de pargo de interés comercial.

Ref.	Especie	Dosis Total HCG (UI/Kg)	Tiempo entre inyecciones	Tiempo entre la 1 ^{ra} inyección y el desove	% de dosis 1 ^{ra} y 2 ^{da} inyección	% de fertilización	N° huevos viables / Kg
Presente estudio	<i>Lutjanus guttatus</i>	1600	24	36-40	50% y 50%	0,59-¿?	12200 - 75000
Boza <i>et al.</i> (en prensa)	<i>Lutjanus guttatus</i>	1600	28	37-43	56% y 44%	65-90%	4400 - 42300
Pintos - Terán <i>et al.</i> (2004)	<i>L. peru</i>	1500	24	50	33,3% y 66,6%	>90%	14960 - 39591

De esta manera se consideró que en los dos últimos desoves el porcentaje de fertilización fue alto (>80%) y que la baja fertilización obtenida en el primer desove (59%) estuvo relacionada con la utilización de un único macho por motivos de disponibilidad.

La fecundidad en los peces teleósteos es por lo general directamente proporcional al tamaño de los individuos y aunque el pargo lunarejo parece ser una especie pequeña, esto se convierte en una ventaja cuando se desea emplear protocolos de inducción ya que no es necesario esperar mucho tiempo para una producción de huevos de calidad; se ha establecido que en el medio natural comienza su migración hacia mar adentro para madurar a partir de unos 250-300 g (Suárez & Rubio, 1992) y que en cautiverio (cultivo en jaulas) alcanza la madurez a unos 600-800 g (Boza *et al.*, En prensa).

3.3. INCUBACIÓN Y LARVICULTURA

A una temperatura media de 28°C, los eventos comunes a todos los desoves exitosos fueron los siguientes:

- La eclosión de las larvas ocurrió aproximadamente a las 18 horas después del desove.
- Al cabo de los 2 ½ DAH se comenzó a ver la boca de las larvas (aún no abierta en algunos individuos) y los ojos empezaron su pigmentación.

- A partir del día 3 DAH, con un tamaño de boca estimado entre 120-150 micras, las larvas comenzaron a ingerir alimentos, lo cual fue comprobado mediante la observación al microscopio de microalgas (color verde del tubo digestivo), partículas de alimento y restos de rotíferos de pequeña talla al interior del aparato digestivo de la larva.

No obstante, la evolución de cada desove amerita una descripción por separado debido a que las larvas obtenidas en cada uno de ellos se desarrollaron bajo circunstancias diferentes, como se verá a continuación.

3.3.1. Desove exitoso N° 1

3.3.1.1. Desarrollo embrionario: mediante la observación de las muestras de ovocitos fertilizados se siguió de cerca el desarrollo embrionario (aparición de los primeros blastómeros, blástula, gástrula, etc) y el desarrollo de la larva hasta el comienzo de la alimentación exógena.

Tabla 7. Estadios del desarrollo embrionario y larval de *L. guttatus*.

Tiempo (hrs.)	Estadio
1	Blastómeros en arreglo de 2 x 2
1.5	Blástula 16 cel
2	Blástula 64 cel
3	Numerosas cel. >1000
6	Gástrula. Anillo germinal visible en el polo animal
8 – 10	Embrión en forma 'C'
14	Aparición del 14 somite
18	Eclosión
24	Temprana pigmentación en la retina y piel. Primeros latidos cardiacos
66-72	Apertura de la boca

Como aspectos relevantes, se lograron establecer los siguientes eventos: i) la formación del embrión temprano ocurre entre las 7 y las 10 horas, ii) la eclosión se presenta alrededor de las 18 horas y iii) la apertura de la boca a las 66 horas ([Tabla 7](#); [Figura 8](#)). Dichos eventos ocurrieron en periodos similares a los reportados para *L. guttatus* (Boza et al., En prensa), *L. argentiventris* (Áviles-Quevedo et. al., 1996b) y para el pez zebra (Kimmel et. al., 2003).



Figura 8. Larva eclosionada de *Lutjanus guttatus* a 1 DHA –Days After Hatching (44 horas)

3.3.1.2. Efecto del tipo de tanque en el desarrollo larval: El porcentaje de supervivencia en la larvicultura de lutjánidos es por lo general muy bajo y las mayores mortalidades ocurren durante los primeros días después de la eclosión. En los tanques empleados para esta prueba (tanque cilindro cónico de 500 l y tanque cúbico de 1 m³.) las larvas permanecieron vivas hasta el 7 DAH, notándose una considerable reducción diaria de la densidad y de la actividad, particularmente relacionada con la captura de alimento. El 8 DAH sólo se encontraron 5 larvas vivas al cosechar el tanque cilindro cónico (supervivencia del 0,097 %) y ninguna en el tanque cúbico de concreto.

Este decline paulatino se explica en que los rotíferos suministrados (170 µm talla promedio) sólo fueron accesibles a las larvas más desarrolladas que contaban con un tamaño de boca superior al observado al momento de la apertura de ésta (120-150 µm). Las demás larvas murieron técnicamente de inanición al no disponer de otras fuentes de alimento vivo de menor tamaño.

Además de esta insuficiencia en la oferta de alimento, la manutención de los rotíferos estuvo compuesta por una mezcla de microalgas y levadura la cual no satisfizo los requerimientos de ácidos grasos poli insaturados (PUFA'S) de las larvas en esta etapa, que ha sido catalogada como la más crítica dentro del proceso de larvicultura (Álvarez-Lajonchere y Hernández-Molejón, 2001).

Así, la malnutrición en un periodo donde ocurren rápidamente los eventos de reabsorción del saco vitelino, apertura de la boca y comienzo de la alimentación exógena, provoca deficiencias en el desarrollo larval y altas mortalidades que impiden por lo tanto, realizar juicios sobre qué tipo de tanque arrojó mejores resultados durante la cría.

No obstante, ninguno de los dos tanques parece ser el adecuado para la larvicultura debido a que el tanque cilindro cónico a pesar de su forma ideal para la dinámica del agua presenta un bajo volumen de agua en donde las condiciones pueden variar fácilmente (temperatura, concentración de compuestos metabólicos tóxicos, bajas de oxígeno, etc.). El tanque cúbico por su parte, a pesar de tener un mayor volumen de agua mayor presenta puntos muertos en las esquinas que no son ideales.

Álvarez-Lajonchere y Hernández-Molejón (2003) recomiendan para la larvicultura de peces marinos tanques cilindro-cónicos en fibra de vidrio de 3 m³ con apoyos para que el extremo del cono quede a 40 cm del suelo, paredes pulidas de color negro mate en la porción cilíndrica y blanco mate en el cono.

Resultados similares a los obtenidos en este primer desove exitoso fueron reportados para *Lutjanus peru* al emplear el mismo tipo de alimentación (rotíferos sin enriquecer), la cual condujo a una mortalidad masiva al 9 DAH a pesar de la excelente respuesta en el porcentaje de fertilización (>90%) y eclosión (>85%) (Pintos–Terán *et al.*, 2004).

Es evidente que una dieta basada sólo en el suministro de rotíferos resulta en una baja sobrevivencia y por lo general en una mortalidad masiva antes de los 30 DAH, por lo cual es indispensable disponer de una variada gama de alimentos tanto vivos como comerciales para optimizar dicho porcentaje.

Para hacer frente a estos problemas nutricionales durante los primeros días de alimentación exógena se pueden adicionar larvas trocóforas de ostra como alimento inicial y emplear métodos de enriquecimiento para los rotíferos antes de ser suministrados a las larvas (Boza *et al.*, en prensa; Álvarez-Lajonchere y Hernández-Molejón, 2001).

3.3.2. Desove exitoso N° 2

3.3.2.1. Modificaciones del sistema de larvicultura: este desove se obtuvo casi dos meses después del primero, de manera que durante este tiempo se realizaron diferentes adaptaciones para mejorar las condiciones de larvicultura mediante otras estrategias nutricionales y de infraestructura.

Los principales cambios realizados fueron:

1. Emplear para la incubación de huevos y larvicultura de *L. guttatus* un módulo de tanques en 'U' de 10 m³ de capacidad diseñados para larvicultura de camarón en vez de los tanques pequeños (400 l y 1 m³.) utilizados para los huevos y larvas del *Desove exitoso N° 1*. En este mismo módulo también se realizó el cultivo masivo de microalgas, rotíferos y Artemia con el fin de disponer de mayores volúmenes de alimento vivo ([Figura 9 A y B](#)).
2. En vez de realizar recambios de agua durante los primeros 10 días, diariamente se añadió entre 0.25-0.5 m³ de agua verde a partir del día 3, según lo recomendado por Álvarez-Lajonchere y Hernández-Molejón (2001).
3. Emplear soluciones nutritivas conformadas por emulsiones ricas en PUFA'S (emulsión de Scott®) y alimentos microparticulados de post-larvas de camarón (Epac-Inve®) durante los primeros días después de la apertura de la boca (3-7 DHA).
4. Emplear enriquecedores comerciales para el alimento vivo producido en el laboratorio (SELCO®).
5. Suministrar Artemia en sus diferentes estadios y zooplancton silvestre.

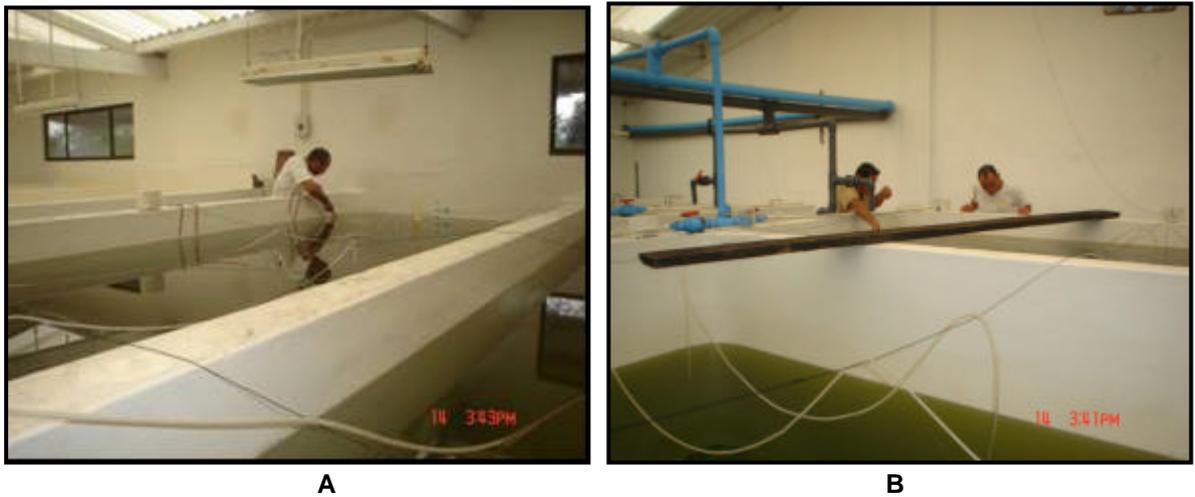


Figura 9. Tanques de larvicultura de camarón adaptados para **(A)** el levante larval de *L. guttatus* y **(B)** cultivos masivos de microalgas (*Nannochloropsis oculata*), rotíferos (*Brachiouneus sp.*) y *Artemia salina*.

3.3.2.2. Alimentación y desarrollo de larvas: En este lote de larvas además del alimento vivo, se suministró alimento artificial en diferentes modalidades desde el inicio mismo de la larvicultura. Dichos alimentos balanceados cambiaron a lo largo del tiempo debido a que el aumento en la longitud de la boca, requería un mayor diámetro de partícula ([Tabla 7](#); [Figura 10](#)).

Entre los 8 y 9 DAH las larvas inflaron su vejiga natatoria y comenzaron a desplazarse cada vez más hacia el fondo de la columna de agua, agudizando sus reflejos frente a diferentes estímulos externos. Hacia el 38-40 DAH los alevinos estuvieron completamente formados y listos para ser alimentados únicamente a base de piensos comerciales.

De igual manera que en el Desove exitoso N° 1, los rotíferos cultivados fueron muy grandes para ser ingeridos por la mayoría de las larvas por lo que fue necesario tamizarlos por una malla de 100 μm . No obstante, las cantidades obtenidas fueron insuficientes para mantener la densidad de 10 rotíferos/ml en los tanques de larvicultura por lo que se recurrió a la utilización temprana de una solución nutritiva a manera de infusorio (preparada a base de alimento balanceado para post larvas de camarón Epac® tamizado por 100 μm , emulsión de scott® y agua dulce) que aportara los ácidos grasos requeridos para esta crítica etapa ([Figura 10](#)).

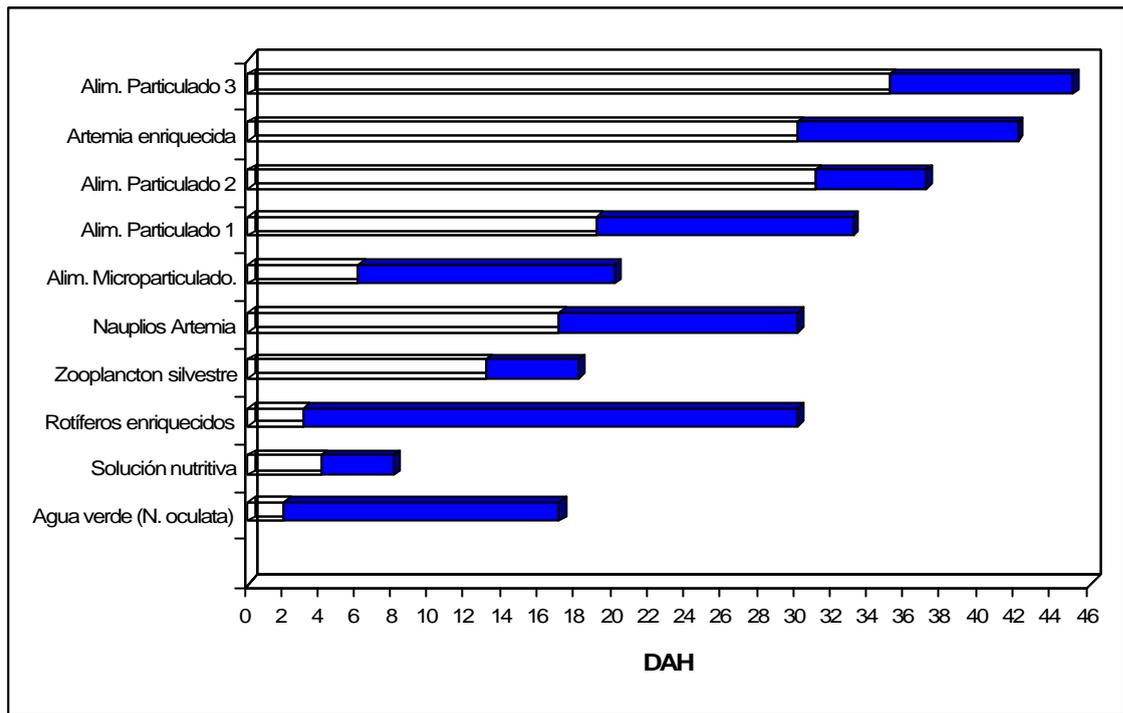


Figura 10. Esquema de alimentación empleado para el levante larval.

Se observó que las larvas ingirieron con facilidad dicho alimento desde el comienzo y por lo tanto se continuó suministrándolo a saciedad hasta el 8 DAH; esta solución nutritiva permitió que las larvas alcanzaran la talla necesaria (y con ella el tamaño de la boca) para capturar los rotíferos enriquecidos, los cuales se suministraron desde el 3 DAH hasta el 31 DAH ([Figura 10](#)).

A partir del 6 DAH hasta el 20 DAH se suministró uno de los componentes de la solución nutritiva sin diluir, el Epac® tamizado por 100 µm (alimento micro particulado) y a partir del 19 DAH hasta el 33 DAH, en su tamaño original (~ 500 µm – alimento particulado).

Para favorecer este cambio en la alimentación, dicho alimento fue suministrado conjuntamente con zooplancton silvestre y nauplios de Artemia; posteriormente se emplearon los demás alimentos balanceados (alimento particulado 2 y 3) acompañados de juveniles y adultos de *Artemia salina* enriquecidos con SELCO®. El alimento vivo fue suspendido en el 42 DAH ([Figura 10](#)).

El hecho de suministrar alimentos comerciales junto con alimento vivo desde los estadios tempranos permitió que la transición hacia la alimentación totalmente basada en piensos comerciales o de fabricación artesanal fuera mucho más fácil, obteniendo además alevinos bien desarrollados, con buenos reflejos y enérgica actividad natatoria ([figura 11](#)).

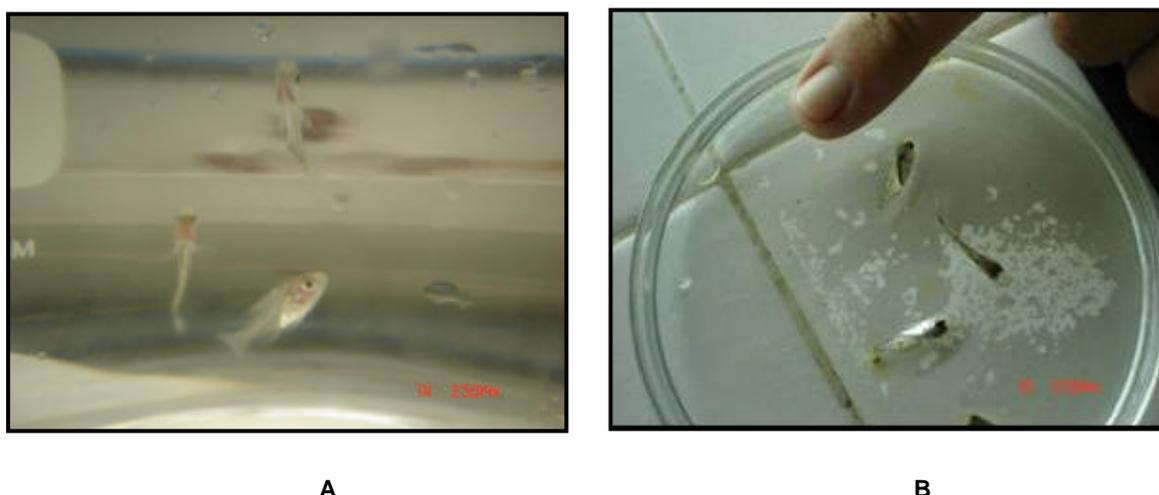


Figura 11 (A Y B). Muestras de ejemplares de 42 DAH tomadas de un estanque de larvicultura.

Durante las últimas dos semanas de larvicultura se observó un acentuado canibalismo debido a la diferencia en talla de algunos individuos ([Figura 12](#)) el cual lógicamente, generó un aumento en la mortalidad. Se observaron grupos de dos a cuatro individuos grandes persiguiendo y mordisqueando de forma intermitente a los más pequeños hasta matarles, a pesar de que en todos los tanques de larvicultura se suministró suficiente alimento tanto vivo como artificial.

La dispersión en tallas se incrementa con la edad y está debida principalmente a (1) diferencias genéticas en el potencial de crecimiento entre los individuos, (2) éxito desigual en la primera alimentación (mayor desarrollo desde el inicio en algunas larvas con el consecuente incremento en la tasa de crecimiento), (3) interacciones competitivas entre individuos en el tanque de cría, (4) ausencia de un nivel uniforme y óptimo de alimentación y (5) falta de un tamaño de partícula alimenticia uniforme y óptimo (Álvarez-Lajonchre y Hernández-Molejón, 2001).



Figura 12. Diferencia de tallas en individuos (44 DAH) de *L. guttatus* en un mismo estanque de larvicultura.

Si bien el empleo de la solución nutritiva al comienzo de la alimentación exógena como medida de contingencia frente a la incapacidad de muchas larvas de ingerir rotíferos permitió que las larvas lograran pasar la etapa más crítica, también fue la responsable de la ulterior diferencia en tallas que propició el canibalismo.

Como dicha solución fue suministrada sólo en las zonas de mayor densidad de larvas dado el gran volumen de los tanques, muchas de ellas no lograron ingerir el alimento en igual frecuencia y cantidad, produciéndose individuos más desarrollados que más adelante comenzaron a depredar las más débiles.

Para prevenir esta reducción en la densidad de animales lo más recomendable es realizar una separación por tallas, aunque ésta debe hacerse a partir del 30 DAH ya que en este tiempo los animales son más tolerantes a la manipulación (Álvarez-Lajonchere y Hernández-Molejón, 2001).

3.3.2.3. Sobrevivencia larval: A los 44 DAH los alevinos (48.6 mm de longitud total y 0.58 g. de peso) de los tres estanques de larvicultura fueron cosechados por gravedad y trasladados de estanque para su conteo y estimación de sobrevivencia ([Tabla 8](#)).

Tabla 8. Cantidad inicial de huevos embrionados y cantidad final de alevinos cosechados en los tanques de larvicultura a los 44 DAH.

Tanque N°	N° inicial huevos viables	N° final de alevinos
26	25000	491
27	25000	450
32	25000	381
TOTAL	75000	1322

$$\% \text{ Supervivencia} = (1322 * 100) / 75000$$

1.8

Esta supervivencia (1.8%) se considera un resultado satisfactorio para la especie en cuestión y se ubica dentro de los rangos reportados para otras especies del género ([Tabla 9](#))

Tabla 9. Supervivencia larval en diferentes especies de pargos. Tomado de Boza et. al. (En prensa).

Especie	DHA	% de Supervivencia	Referencia
<i>Lutjanus guttatus</i>	3	20	Boza et. al., (En prensa)
<i>Lutjanus guttatus</i>	5	12	Boza et. al., (En prensa)
<i>Lutjanus guttatus</i>	45	1,5	Boza et. al., (En prensa)
<i>Lutjanus guttatus</i>	44	1,8	Presente estudio
<i>Lutjanus peru</i>	15	0	Pintos-Terán et. al.(2004)
<i>Lutjanus argentimaculatus</i>	8	3,4	Shingagraiwan y Doi (1993)
<i>Lutjanus argentimaculatus</i>	12	1,6	Shingagraiwan y Doi (1993)
<i>Lutjanus argentimaculatus</i>	20	0	Emata et. al. (1994)
<i>Lutjanus griseus</i>	4	3,7	Cabrera et. al (1998)
<i>Lutjanus analis</i>	38	14,3	Watanabe et. al. (1998)
<i>Lutjanus analis</i>	45	2,8	Turano et. al. (2000)

Boza et al. (En prensa) empleando también una combinación de alimento vivo e inerte (microalgas, huevos de ostras, rotíferos, zooplancton, Artemia, pescado troceado y alimento semi-seco) obtuvieron en *L. guttatus* una supervivencia larval general < 1% a los 30 DAH en desoves obtenidos espontáneamente y de 1.5% en los desoves

obtenidos mediante inducción después de los 45 DAH, resaltando que después de este tiempo fueron pocos los individuos que murieron. Como días críticos se identificaron el 3 DAH con una mortalidad del 80% y el 5 DAH con una mortalidad del 85% del resto ([Tabla 9](#)).

Resultados más alentadores fueron reportados para *Lutjanus analis* por Turano *et al.* (2000) (En: Boza *et al.*, En prensa) con 2.8% a los 45 DAH y por Watanabe *et al.* (1998) quienes obtuvieron el admirable porcentaje de sobrevivencia de 14.3% a los 38 DAH ([Tabla 9](#)).

No obstante, la gran mayoría de supervivencias aun permanecen bajas indicando que se requieren más investigaciones entorno a la alimentación durante el periodo de larvicultura hasta lograr obtener porcentajes satisfactorios mayores al 20%.

3.3.3. Desove exitoso N° 3

El tercer desove exitoso arrojó una cantidad notable de huevos embrionados (99.000) y se obtuvo a los 14 días después del Desove exitoso N° 1. Se aplicaron las mismas técnicas de larvicultura que en el desove anterior pero desafortunadamente a los 8 DAH ocurrió el incendio del polígono de entrenamiento del batallón de Infantería de Marina colindante con el laboratorio, que tuvo más de cinco horas de duración y produjo una nube constante de hollín de llanta que saturó todas las instalaciones del laboratorio por más de dos semanas.

A pesar de apagar los blowers y cerrar puertas y ventanas en el momento inicial del incendio, el hollín se coló por todos los intersticios de los módulos y se depositó sobre la superficie del agua en todos los tanques de cultivo.

En ese momento las larvas obtenidas en el Desove exitoso N° 2 contaban con 22 días de nacidas y se distribuían varios centímetros por debajo de la superficie del agua, lo que permitió la recolección de la capa oleosa producida por el hollín durante varios días hasta limpiarla totalmente. Las nuevas larvas (Desove exitoso N° 3) por el contrario, estaban aun distribuidas en la capa más superficial de la columna de agua, lo que impidió su limpieza y obstruyó considerablemente la alimentación exógena. Durante los cinco días posteriores al incendio ocurrió una mortalidad masiva, presentándose la mortalidad total a los 15 DAH.

3.4. POTENCIAL DE LA ESPECIE

El pargo lunarejo es una de las especies candidatas para la diversificación de la maricultura en el Pacífico colombiano, particularmente en el municipio de Tumaco debido a que tiene una gran demanda en el mercado y cuenta con los mejores precios de venta entre las especies del género.

En la presente experiencia se ha demostrado que puede reproducirse en cautiverio con un tratamiento hormonal simple y que las larvas aceptan alimentos balanceados inclusive desde el comienzo mismo de la alimentación exógena, siempre y cuando se suministre conjuntamente alimento vivo de calidad conformado por presas de diferente tipo y talla que además aporten los PUFA'S requeridos por las larvas durante los periodos críticos de la larvicultura.

Al igual que en otras especies de pargo, las bajas tasas de sobrevivencia se consideran como las principales desventajas, pero las innovaciones de la comunidad científica sobre alimentos balanceados específicos y las técnicas que incrementan la supervivencia se están desarrollando de forma cada vez más rápida (Benetti *et al.*, 1999).

Por tal motivo, es indispensable promover y continuar las investigaciones sobre inducción al desove (sea por tratamientos no invasivos como invasivos), levante larval y ensayos de engorde para crear en el mediano y largo plazo técnicas de producción que puedan aplicarse primero a nivel piloto y luego a escala comercial.

Los laboratorios de compañías camaroneras que han cerrado o que funcionan a media marcha por causa del virus de la mancha blanca (WSSV) cuentan con toda la infraestructura necesaria para llevar a cabo los procesos de reproducción y larvicultura larvicultura de peces marinos y podrían reactivarse con esta actividad una vez se hayan calibrado las técnicas y estén listos para probarse alimentos balanceados diseñados para peces marinos.

4. CONCLUSIONES

- Se obtuvieron de forma sostenida alevinos de pargo lunarejo (*Lutjanus guttatus*) en cautiverio a partir de la captura de reproductores silvestres maduros y de su inmediata inducción hormonal.
- Los animales seleccionados para la inducción deben estar en buen estado y en lo posible no haber pasado por situaciones en extremo estresantes durante la captura y el transporte para obtener una respuesta satisfactoria a la inducción. Las buenas condiciones de calidad de agua y el trato con gentileza son indispensables.
- El tipo y dosis de hormona empleada (1600 U.I. HCG / Kg. para hembras y 500 U.I. HCG / Kg. para machos) resultó efectiva para obtener desoves de calidad en *L. guttatus*.
- Para asegurar que las larvas superen la etapa crítica del comienzo de la alimentación exógena es indispensable que el alimento vivo sea diverso en cuanto a tipo y talla y sea enriquecido con PUFA'S.
- La inclusión de alimentos balanceados en la dieta es posible desde el momento mismo de la apertura de la boca, pero deben ser alternados con alimentos vivos para que las larvas aprendan a comerlos.
- El esquema de alimentación empleado permitió obtener un porcentaje de supervivencia satisfactorio en comparación con otros reportes para el género, además de facilitar la transición a la alimentación por completo artificial.
- Como aportes científicos se tiene que la presente investigación es el primer reporte documentado en Colombia sobre reproducción inducida y larvicultura exitosa de una especie de pargo y que por primera vez se reporta la ingestión de alimento balanceado desde el inicio mismo de la alimentación exógena.

6. RECOMENDACIONES

- La creación de un banco de reproductores a partir de juveniles silvestres mantenidos con una buena alimentación (pescado troceado, calamar, piangua - *Anadara tuberculosa*, etc) y un monitoreo periódico de su madurez sería lo ideal para llevar a cabo los procedimientos de inducción hormonal agudos. Se evitaría el estrés generado por el impacto del cautiverio y se dispondría de un buen lote para afinar las técnicas de reproducción y larvicultura.
- De no ser posible lo anterior, deben emplearse para la captura artes que no ejerzan un maltrato físico-metabólico excesivo de los individuos, todo esto acompañado de las mejores condiciones posibles. La pesca al volantín es la más recomendada.
- Los tanques para larvicultura deben tener un volumen intermedio a los aquí empleados para tener un control más eficiente en la alimentación (menor requerimiento de alimento vivo y . Los tanques circulares de 5 toneladas mayor al empleado
- Es recomendable la inclusión de los copépodos en la dieta debido a que presentan el mayor contenido de ácidos grasos de los tipos de aliemento vivo.
- Se recomienda realizar la selección de tallas a partir del 30 DAH para evitar el canibalismo y mejorar el porcentaje de supervivencia mayor.

BIBLIOGRAFÍA

PRIMERA PARTE

AGUDELO-CÓRDOBA, E., Y. SALINAS-COY, C.L. SÁNCHEZ-PÁEZ, D.L. MUÑOZ-SOSA, J.C. ALONSO-GONZÁLEZ, M.E. ARTEAGA-DÍAZ, O.J. RODRÍGUEZ-PRIETO, N.R. ANZOLA-POTES, L.E. ACOSTA-MUÑOZ, M. NÚÑEZ-AVELLANEDA & H. VALDÉS-CARRILLO. 2000. Bagres de la Amazonía Colombiana: Un Recurso sin Fronteras. Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas (SINCHI). Ministerio del Medio Ambiente. Bogotá, D.C. Colombia. 253 p.

BART, A.N. 2000. New Approaches in Cryopreservation of Fish Embryos. En: Cryopreservation in Aquatic Species. Tiersch, T.R. and P.M. Mazik, Editors. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana. 179-187 pp.

BARTHEM, R. & M. GOULDING. 1997. The Catfish Connection. Ecology, Migration and Conservation of Amazon Predators. Columbia University Press. New York. 144 p.

BELTRÁN, C. & E., LAMUS. 1975. Contribución al Conocimiento de la Biología del Bagre Pintado *Pseudoplatystoma fasciatum* (Linnaeus, 1766) e Importancia Pesquera. Tesis de Grado. Universidad Jorge Tadeo Lozano. Facultad de Ciencias del Mar. Bogotá.

BERNAL, W. y M. URIBE. 1993. Caracterización del Semen de Bocachico (*Prochilodus reticulatus* STEINDACHNER, 1878) y Evaluación de la Motilidad después de la Conservación en Frío. Tesis Facultad de Biología Marina, Universidad Jorge Tadeo Lozano, Bogotá. 131 p.

BRAND, O. 1996. Caracterización y Preservación del Semen del Bagre Rayado (*Pseudoplatystoma fasciatum* LINNAEUS, 1766). Tesis facultad de Biología Marina Universidad Jorge Tadeo Lozano, Bogotá. 131 p.

CALEÑO, O. 1995. Pruebas de Fertilidad con Semen de Cachama Blanca (*Piaractus branchipomus*) Criopreservado Mediante dos Extendidos Diferentes. Tesis Facultad de Biología Marina Universidad Jorge Tadeo Lozano, Bogotá. 131 p.

CANCINO, L. 1990. Efecto del Extracto de Pituitaria de Carpa y de la Hormona Liberadora de Gonadotropinas (LH-RHa) Sobre la Maduración gonadal del Bagre Rayado, *Pseudoplatystoma fasciatum* LINNAEUS, 1766 (PISES, SILURIFORMES). Tesis Facultad de Biología Marina, Universidad Jorge Tadeo Lozano. 105 p.

CASTRO, D.M. 1986. Los Bagres de la Subfamilia Sorubiminae de la Orinoquía y Amazonía Colombiana (Siluriformes-Pimelodidae). Boletín Ecotrópica. N° 13. Universidad Jorge Tadeo Lozano. Bogotá. 1-41 pp.

CENSA -Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria-. División de ciencias animales. SIN AÑO. Pruebas de vitalidad o supervivencia espermática y reacción del acrosoma 'in vitro' en semen bovino.

CONTRERAS, P.J. & J. CONTRERAS. 1990. Resultados Preliminares de la Reproducción Inducida del Bagre Rayado (*Pseudoplatystoma fasciatum*) (LINNAEUS, 1766) – (PISES : Pimelodidae). En: 2^{do} Seminario Nacional. Presente y Futuro de la Acuicultura en Colombia. Memorias agosto 21-24 de 1990 (CORNARE – INDERENA-Reg. Antioquia). Medellín. Pp. 21-27.

DÍAZ-SARMIENTO, J.A & R. ALVAREZ-LEÓN. 1998. Fish Biodiversity Conservation in Colombia. En: Action Before Extinction. An International Conference on Conservation of Fish Genetic Diversity. Proceedings of a conference held Feb. 16-18, 1998. Vancouver, B.C. World Fisheries Trust. 215-222 pp.

DYKSTRA, M.J. 1992. Biological Electron Mycroscopy. Theory, Techniques, and Troubleshooting. Plenum Press. New York. USA. 360 p.

GONZÁLEZ, O.E. 2003. Algunos aspectos reproductivos y oncogénicos de cuatro especies de silúridos (*Leiaruis marmoratus*, *Pimelodus blochii*, *Pimelodus grosskopsi* y *Ageneiosus caucanus*). Peces nativos de las cuencas de los ríos Meta y Magdalena. CORPMAPA - Min. Agricultura. En: Seminario taller muestra industrial y tecnológica. Acuicultura 2003. alternativa alimenaria. Octubre 27-31. Bogotá.

_____ 2002. Criopreservación de Semen de Capitán de la Sabana (*Eremophilus mutissi*) de la Laguna de Fúquene. Informe Final / Pruebas de Motilidad

Post-descongelación de Semen de Cachama Blanca con Diferentes Activadores. Universidad Jorge Tadeo Lozano. Centro de Investigaciones Científicas y Estudios Ambientales. Bogotá.

_____ 1994. Refrigeración y Criopreservación de Esperma de Trucha Arco Iris (*Oncorhynchus mikiss*) a Corto y Largo Plazo. Tesis de grado. Facultad de Biología Marina Universidad Jorge Tadeo Lozano, Bogotá.

GONZÁLEZ O.E., J.A. DÍAZ & R. LARA. 1998. Criopreservación de semen de Cachama Blanca (*Piaractus branchipomus*) en el río Meta (Orinoquía colombiana) I Fase. Proyecto CIC – UJTL – INPA.

GONZÁLEZ, O.E. & J. DÍAZ-SARMIENTO. 2001. Principios Básicos de la Criopreservación de Esperma de Peces. En: Fundamentos de Acuicultura Continental. Rodríguez, H., P. Victoria y M. Carrillo (Editores). Instituto Nacional de pesca y Acuicultura INPA. Bogotá. 253-264 pp.

GONZÁLEZ, O.E. & A. FRESNEDA. 1999. Criopreservación de semen de Bagre Rayado (*Pseudoplatystoma fasciatum*) y pruebas de fertilización con semen criopreservado de Cachama (*Piaractus branchipomus*). II Fase. Proyecto CIC – UJTL – INPA.

_____ 2000. Criopreservación de Semen en Algunas Especies de Peces Tropicales (*Piaractus brachypomus*, *Pseudoplatystoma fasciatum*) de Importancia Económica y Comercial de la Orinoquía Colombiana. Informe Final Segunda Fase. Universidad Jorge Tadeo Lozano. Centro de Investigaciones Científicas. Bogotá.

HAFEZ, E.S.E. 1986. Reproducción e inseminación artificial en animales. Cuarta Edición. Editorial Interamericana S.A. México. 253 p.

HARVEY, B.J. 1983. Cryopreservation of *Sarotherodom mossambicus* Spermatozoa. En: Aquaculture. 32: 313-320 pp.

HARVEY, B.J. & R.N. KELLEY. 1984. Chilled Storage of *Sarotherodon mossambicus*. *Aquaculture*. 36: 85-95 pp.

_____ 1988. Practical Methods for Chilled and Frozen Storage of Tilapia Spermatozoa. En: Second Symposium on Tilapia Aquaculture. Cent. Liv. Aquat. Resour. Manila, Philippines. 187-189 pp.

JAMIESON, B.G.M. 1991. Fish Evolution and Systematics: Evidence from Spermatozoa. Cambridge University Press. Cambridge. 56-72; 195-214; 231-269 pp.

KOSSOWSKI, L.C. & D. F. MADRID. 1985. Ensayo de la reproducción inducida en bagre rayado cabezón *Pseudoplatystoma fasciatum* (Linnaeus, 1766) (Pises, siluriformes). *Acta Científica Venezolana*, Barquisimeto, Venezuela. V 36, n 3-4. 284-285 pp.

KOSSOWSKI, L.C. 1991. Experiencias iniciales sobre la hibridización de *Leiarius marmoratus* (Gill 1871) por *Pseudoplatystoma fasciatum* (Linnaeus, 1766) (Pises: siluriformes, Pimelodidae). *Acta Científica Venezolana*. Barquisimeto, Venezuela. V 42. 48-50 pp.

LEZCANO, M., C. GRANJA Y M. SALAZAR. 2004. The use of flow cytometry in the evaluation of cell viability of cryopreserved sperm of the marine shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Cryobiology* 48 (2004). 349-356 pp.

LUCENA, E., C. LUCENA, J.A. ORTIZ, M. GÓMEZ, J.A. RUIZ, A. ARANGO, J.C. MENDOZA. 1990. Técnicas de Congelación de Semen Humano. En: Revista Iberoamericana de Fertilidad. Vol. III – n° 2 – marzo-abril 1990.

MARTÍNEZ-BECERRA, R. & N. MARTÍNEZ-RUEDA. 1997. Diseño de Experimentos. Análisis de datos estándar y no estándar. Fondo Nacional Universitario. Santafé de Bogotá, D.C.

MOJICA, J.I., C. CASTELLANOS, J.S. USMA & R. ALVAREZ. 2002. Libro Rojo de los Peces Dulceacuícolas de Colombia. La Serie Libros Rojos de Especies

Amenazadas de Colombia. Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia, Ministerio del Medio Ambiente. Bogotá, Colombia. 285 p.

NEIRA, J. 1991. Caracterización y congelación de semen de Cachama Blanca (*Piaractus branchipomus*). Tesis Universidad Tecnológica de los Llanos, Villavicencio, 110 p.

OIGER DE BAULNY, B., Y. LE VERN, D. KERBOEUF y G. MAISSE. 1997. Flow cytometric evaluation of mitochondrial activity and membrane integrity in fresh and cryopreserved rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. *Cryobiology* 34 (1997) 141-149 pp.

PINHEIRO-TAVARES, M. 1997. O Surubim (The surubim catfish). En: Surubim. Série Estudos Pesca N° 19. Ministério do Meio Ambiente, dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA). Belo Horizonte. 1-25 pp.

PIÑEROS, P.R. 1990. Evaluación de esperma de trucha Arco Iris *Oncorhynchus mikiss* en la selección de machos reproductores. Tesis Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia. 63 p.

RAMÍREZ-GIL, H & R.H. AJIACO-MARTÍNEZ. 1995. El Bagre Rayado *Pseudoplatystoma fasciatum* (LINNAEUS) y *Pseudoplatystoma tigrinum* (VALENCIENNES). Aspectos Biológico Pesqueros en el Alto Río Meta. Boletín Científico INPA. N° 3. 157-167 pp.

RODRÍGUEZ-GUTIERRÉZ, M. Técnicas de evaluación cuantitativa de la madurez gonádica en peces. AGT Editor, S.A. 1992. México, D.F. 79 pp.

RODRÍGUEZ, J.A. & G.J. NIELSEN. 1990. Algunas observaciones sobre reproducción y alevinaje del bagre rayado *Pseudoplatystoma fasciatum* (Linnaeus, 1766). En: 2^{do} Seminario Nacional. Presente y futuro de la acuicultura en Colombia. Memorias agosto 21-24 de 1990 (CORNARE – INDERENA-Reg. Antioquia). Medellín. 31-35 pp.

SATO, Y., E.L. CARDOSO, W.B. SALLUM & H.P. GODINHO. 1997. Indução experimental da desova do Surubim *Pseudoplatystoma coruscans*. En: Surubim. Série Estudos Pesca N° 19. Ministério do Medio Ambiente, dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal. Instituto Brasileiro do Medio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA). Belo Horizonte. 69-79 pp.

SORENSEN, A.M. 1982. Reproducción Animal. Editorial Mac Graw Hill. México. 526 p.

VALDERRAMA, M., M. ZÁRATE, G. VERA, C. MORENO & J. MARTÍNEZ. 1989. Determinación de la Talla Media de Madurez y Análisis de la Problemática con Referencia a las Tallas Medias de Captura del Bagre Rayado *Pseudoplatystoma fasciatum* (LINNAEUS, 1766) (PISES : PIMELODIDAE) en la Cuenca del Río Magdalena. Trianea (Act. Cient. Tecn. INDERENA), 2:537-549 pp.

WAYMAN, W.R., R.G. THOMAS & T.R. TIERSCH. 1996. Cryopreservation of Sperm of Spotted Seatrout (*Cynoscion nebulosus*). En: Gulf Research Reports. Vol. 9, No. 3, 183-188 pp.

BIBLIOGRAFÍA

SEGUNDA PARTE

ÁLVAREZ-LAJONCHERE, L. y O.G. HERNÁNDEZ-MOLEJÓN. 2001. Producción de juveniles de peces estuarinos para un centro en América Latina y el Caribe: diseño, operación y tecnologías. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, 424 pp.

ÁLVAREZ-LAJONCHERE, L. 2003. Apuntes Para un Curso de Reproducción de Peces Marinos. IV Seminario Internacional de Acuicultura. Universidad nacional de Colombia. Bogotá, septiembre de 2003.

ÁVILES-QUEVEDO, A., L. REYES-JUÁREZ, S. VALDÉZ-MURILLO, O. HIRALES-COSIO, R. RODRÍGUEZ-RAMOS, U. MCGREGOR-PARDO & M. LIZAWA. 1996a. Manejo de Reproductores y Producción de Huevos de Pargo Amarillo *Lutjanus argentiventris* (Peters, 1869) Bajo Condiciones de Cultivo. Acuicultura en Latinoamérica. IX Congreso Latinoamericano de Acuicultura. A. Silva & G. Merino (Eds.). Universidad Católica del Norte. Asociación Latinoamericana de Acuicultura. Chile. 1996. 244-247 pp.

_____ 1996b. Descripción del Huevo y Larva Temprana del Pargo Amarillo *Lutjanus argentiventris* (Peters, 1869). Acuicultura en Latinoamérica. IX Congreso Latinoamericano de Acuicultura. A. Silva & G. Merino (Eds.). Universidad Católica del Norte. Asociación Latinoamericana de Acuicultura. Chile. 1996. 373 p.

ÁVILES-QUEVEDO, A & J.M. MAZÓN-SUÁSTEGUI. 1996. Estado Actual y Perspectivas del Cultivo de Peces Marinos en México. Acuicultura en Latinoamérica. IX Congreso Latinoamericano de Acuicultura. A. Silva & G. Merino (Eds.). Universidad Católica del Norte. Asociación Latinoamericana de Acuicultura. Chile. 1996. 373 p.

BENETTI, D. y M. FEELEY. 1999. The capture, transport, handling, prophylaxis, quarantine and sampling of broodstock marine fish. *World aquaculture*. 30 (3): 54-57 pp.

BENETTI, D., M. FEELEY, D.E. JORY & T.R. CABRERA. 1999. La Acuicultura de Peces Marinos en América Latina: Avances Recientes y Prospectos. *Acuicultura 99* (II Congreso Sur Americano de Acuicultura; III Congreso WAS/LAC; II Feria Internacional de Acuicultura; I Congreso Nacional de Camaricultura; VIII Encuentro Nacional de Acuicultura; I Encuentro de Genética). *Memorias, Tomo II*. Noviembre 17-20. Puerto La Cruz, Venezuela. 32-47 pp.

BOZA, J.A., N. SOLIS, E. CALVO, J. ALFARO & J. KOMEN. (In press). Induced Spawning and larval Rearing of Red Snapper, *Lutjanus guttatus*, in Estación de Biología Marina. Puntarenas, Costa Rica.

BOZA, J.A., S. VALVERDE, J. ALFARO & J. KOMEN. (In press). Induced Spawning of Red Snapper *Lutjanus guttatus* by Hormone Injection.

CASTAÑO, F. & J. BOTERO. 2003. Seguimiento y Evaluación de la Madurez Gonadal de Reproductores Cautivos de Pargo Palmero *Lutjanus analis* Mediante la Medición de Calcio y Esteroides sexuales en Plasma Sanguíneo Durante dos Termos periodos de Acondicionamiento. *Memorias X COLACMAR. Las Ciencias del Mar al Servicio de las Comunidades*. 22-26 de Septiembre de 2003. San José, Costa Rica. 380 p.

KIMMEL, C., W. BALLARD, S. KIMMEL, B. ULLMANN & T. SCHILLING. 1995. Stages of Embryonic Development of the Zebra Fish. *Developmental Dynamics* Vol. 203, Number 3. July 1995. 310 p.

LAVENS, P. & P. SORGELOOS. 1996. Manual on the production and Use of Live Food for Aquaculture. *FAO Technical Paper*, 1996. 375 p.

LEE, C.S. & A.C. OTROWSKI. 2001. Current Status of Marine Finfish larviculture in The United States. *Aquaculture* 200 (2001). 89-109 pp.

LIAO, I.C., H.M. SU & E.Y. CHANG. 2001. Techniques in Finfish Larviculture in Taiwan. *Aquaculture* 200 (2001). 1-31 pp.

PINTOS, P., M. ROSALES, S. DUMAS, H. CORTÉS & J.P. ALCÁNTAR. 2004. Características Reproductivas del Huachinango del Pacífico (*Lutjanus peru*) en Cautiverio. *Panorama Acuícola Magazine*. Mar/abr. 2004.

TAKEUCHI, T. 2001. A Review of Feed Developmental for Early Life Stages of Marine Finfish in Japan. *Aquaculture* 200 (2001). 203-222 pp.

VALVERDE, S. & J. BOZA. 1999. Inducción al Desove en Hembras del pargo Mancha, *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869). *Uniciencia* 15-16. Costa Rica. 65-69 pp.

WATANABE, W., E. ELLIS, S. ELLIS, J. CHAVEZ, C. MANFREDI, R. HAGOOD, M. SPARSIS & S. ARNESON. 1998. Artificial Propagation of Mutton Snapper *Lutjanus analis*, a New Candidate Marine Fish Species for Aquaculture. *Journal of the World Aquaculture Society*. 29 (2): 176-187.

ANEXOS

ANEXO A. Procedimiento casi Universal para la fijación, deshidratación y embebido exitosamente empleado para organismos de los cinco reinos de la vida. *Rutina para fijación con TEM* (Tomado de Dykkstra, 1992)

Paso	Descripción Rutina de Fijación para TEM
1	De 1 hr. a meses en fijador McDowell's & Trump's (1976) 4F:1G. La fijación inicial puede hacerse a temperatura ambiente pero para un almacenamiento más prolongado deberá hacerse a 4° C .
2	Lavado de tejido por 15 min. por dos veces en buffer fosfato de pH 7.2 – 7.4.
3	Post fijación del tejido en tetróxido de osmio al 1% / 0.1 M buffer fosfato pH 7.2 – 7.4 durante 1 hr. a temperatura ambiente.
4	Lavado de tejido en agua destilada por dos veces (5 min. cada una).
5	Deshidratación del tejido: Etanol 50%, 15 min. Etanol 75%, 15 min. (pueden dejarse los tejidos en este paso durante toda la noche a 4° C). Etanol 95%, 15 min. , dos veces. Etanol 100%, 30 min., dos veces. Acetona 100%, 10 min., dos veces.
6	Infiltración con resina Spurr (1969) Resina Spurr 50% en acetona 100%, 30 min. Resina Spurr 100%, 60 min. Resina Spurr 100%, 60 min. Resina Spurr 100% NUEVA; poner en los moldes apropiados.
7	Polimerizar en horno a 70° C durante la noche a tres días.

ANEXO B. Procedimiento modificado (1) de Dykstra (1992) para el procesamiento en MET del semen criopreservado.

Paso	Descripción
1	Descongelar un fragmento de la pajilla. Tomar alrededor de 250 µl de muestra y depositar en tubo eppendorf. Centrifugar por 5-10 min. Desechar sobrenadante.
2	Lavar pellet con 250 µl de buffer fosfato, pH 7.4 y centrifugar por 5-10 min, dos veces.
3	Desechar sobrenadante. Resuspender pellet en 500 µl de glutaraldehído por 2 hr. a 4° C.
4	Centrifugar por 5 min., botar sobrenadante. Lavar con buffer fosfato, pH 7.4 dos veces. Desechar sobrenadante.
5	Resuspender en tetróxido de osmio por 1 hr.
6	Lavar con buffer fosfato y centrifugar por 5 min., dos veces. Botar sobrenadante.
7	Deshidratación: Resuspender en 250 µl de etanol 50% por 10 min. Resuspender en 250 µl de etanol 70% por 10 min. Resuspender en 250 µl de etanol 80% por 10 min. Resuspender en 250 µl de etanol 90% por 10 min. Resuspender en 250 µl de etanol 100% por 10 min. Resuspender en 250 µl de etanol 100% por 10 min.
8	Infiltración con resina Spurr (1969) 250 µl Resina Spurr: 250 µl alcohol absoluto (1:1), 60 min. Resina Spurr 100%, 60 min. Resina Spurr 100%, 60 min. Esperar hasta que aparezca precipitado. Resina Spurr 100% NUEVA; poner en en cápsulas Beem.
9	Polimerizar a 55° C por 8 hrs. mínimo.
10	Sacar la resina por presión. Realizar cortes en ultra micrótomo.
11	Coloración de muestras: Acetato de uranilo, por 25 min. Citrato de uranilo, por 25 min.

ANEXO C. Procedimiento modificado (2) de Dykstra (1992) para el procesamiento en MET del semen criopreservado (el único cambio con respecto al anterior es que no se lava con buffer al comienzo).

Paso	Descripción
1	Descongelar un fragmento de la pajilla. Tomar alrededor de 250 µl de muestra y depositar en tubo eppendorf. Centrifugar por 5-10 min. Desechar sobrenadante.
2	Desechar sobrenadante. Resuspender pellet en 500 µl de glutaraldehído por 2 hr. a 4° C.
3	Centrifugar por 5 min., botar sobrenadante. Lavar con buffer fosfato, pH 7.4 dos veces. Desechar sobrenadante.
4	Resuspender en tetróxido de osmio por 1 hr.
5	Lavar con buffer fosfato y centrifugar por 5 min., dos veces. Botar sobrenadante.
6	Deshidratación: Resuspender en 250 µl de etanol 50% por 10 min. Resuspender en 250 µl de etanol 70% por 10 min. Resuspender en 250 µl de etanol 80% por 10 min. Resuspender en 250 µl de etanol 90% por 10 min. Resuspender en 250 µl de etanol 100% por 10 min. Resuspender en 250 µl de etanol 100% por 10 min.
7	Infiltración con resina Spurr (1969) 250 µl Resina Spurr: 250 µl alcohol absoluto (1:1), 60 min. Resina Spurr 100%, 60 min. Resina Spurr 100%, 60 min. Esperar hasta que aparezca precipitado. Resina Spurr 100% NUEVA; poner en en cápsulas Beem.
8	Polimerizar a 55° C por 8 hrs. mínimo.
9	Sacar la resina por presión. Realizar cortes en ultra micrótomo.
10	Coloración de muestras: Acetato de uranilo, por 25 min. Citrato de uranilo, por 25 min.

ANEXO D. Procedimiento modificado (2) de Dykstra (1992) para el procesamiento en MET del semen criopreservado.

Paso	Descripción
1	Descongelar pajilla y añadir su contenido en tubos falcon que contienen 5 ml glutaraldehído 3%, por dos horas.
2	Lavar pellet con 250 µl de buffer fosfato, pH 7.4 y centrifugar por 5-10 min, dos veces.
3	Desechar sobrenadante. Resuspender pellet en 500 µl de glutaraldehído por 2 hr. a 4° C.
4	Centrifugar por 5 min., botar sobrenadante. Lavar con buffer fosfato, pH 7.4 dos veces. Desechar sobrenadante.
5	Resuspender en 300 µl de tetróxido de osmio por 1 hr.
6	Lavar con buffer fosfato y centrifugar por 5 min., dos veces. Botar la mayoría del sobrenadante.
7	Pipetear los espermatozoides y sembrarlos en un gel de agarosa (preparado con 0.05 g en 10 ml agua) Esperar a que solidifique y cortar en pequeños trozos de alrededor de 5 mm cuadrados
7	Deshidratación: Resuspender los trozos en 250 µl de etanol 50% por 10 min. Resuspender los trozos en 250 µl de etanol 70% por 10 min. Resuspender los trozos en 250 µl de etanol 80% por 10 min. Resuspender los trozos en 250 µl de etanol 90% por 10 min. Resuspender los trozos en 250 µl de etanol 100% por 10 min. Resuspender los trozos en 250 µl de etanol 100% por 10 min.
8	Infiltración con resina Spurr (1969) 250 µl Resina Spurr: 250 µl alcohol absoluto (1:1), 60 min. Resina Spurr 100%, 60 min. Resina Spurr 100%, 60 min. Esperar hasta que aparezca precipitado. Resina Spurr 100% NUEVA; poner en los moldes apropiados.
9	Polimerizar a 55° C por 8 hrs. mínimo.
10	Sacar la resina por presión. Realizar cortes en ultra micrótomo.
11	Coloración de muestras: Acetato de uranilo, por 25 min. Citrato de uranilo, por 25 min.