



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Inducción hormonal en ajolote (*Ambystoma
mexicanum*) como estrategia de reproducción en
condiciones de laboratorio**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

José Juan Torres Anguiano



**DIRECTOR DE TESIS:
Dr. José Román Latournerié Cervera**

2018

Ciudad Universitaria, CD. MX.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Hoja de datos del jurado

1. Datos del alumno

Torres

Anguiano

José

Juan

5537271834

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

310327325

2. Datos del tutor

Dr.

Latournerié

Cervera

José Román

3. Datos del sinodal 1

Dra.

Gómez

Álvarez

Graciela

4. Datos del sinodal 2

Dr.

Reynoso

Rosales

Víctor Hugo

5. Datos del sinodal 3

Dr.

Morales

Guillaumin

Eduardo

6. Datos del sinodal 4

Dr.

Cárdenas

Vázquez

René de Jesús

7. Datos del trabajo escrito

Inducción hormonal en ajolote (*Ambystoma mexicanum*) como estrategia de reproducción en condiciones de laboratorio.

50 p

2018

8. Palabras clave

Ambystoma mexicanum, reproducción, inducción hormonal, hCG

Agradecimientos

Quiero agradecer principalmente a la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), que me acogió desde mi adolescencia en el Colegio de Ciencias y Humanidades plantel Sur (CCH Sur), y hasta mi formación profesional en mi Alma Máter, la Facultad de Ciencias, mi segundo hogar.

Le doy mi más sincero agradecimiento a mi asesor, Dr. José Román Latournerié, quien me brindó los conocimientos teóricos y prácticos que hicieron posible la presente investigación y siempre me ha apoyado en mis actividades académicas. Gracias por sus consejos, su entrega y por ser un excelente profesor y amigo. Estoy muy orgulloso de poder compartir con usted todo ese conocimiento que nutre la ciencia y nos retroalimenta en cada momento.

A la M. en C. Alma Rosa Estrada, con quien he formado un equipo de trabajo muy especial y siempre me ha alentado para luchar por mis metas. Agradezco tu forma de ser y el apoyo que siempre me has dado, eres una persona admirable y espero nunca cambies esa forma tan particular de dar clases porque realmente es un privilegio compartir las aulas contigo. Gracias por brindarme esa visión transdisciplinaria para luchar por los recursos naturales de nuestro hogar, la Tierra.

A la M. en D. Dafne Bonilla Cerquedo, sin ti, éste escrito no se hubiera llevado a cabo. Gracias por estar ahí siempre que te necesité y ayudarme en todo momento para llevar a cabo lo que ahora, es nuestro trabajo. Siempre estuviste conmigo cuando te necesité y espero que nunca dejes de ser tan apasionante y solidaria. Te mereces todos los elogios que un maestro pueda recibir.

A mis sinodales: Dr. Eduardo Morales, Dra. Graciela Gómez, Dr. René Cárdenas y Dr. Víctor Reynoso, les agradezco enormemente su tiempo, sus comentarios y las observaciones que enriquecieron desde la visión muy particular de cada uno, la presente tesis. Me dieron sabios consejos que jamás voy a olvidar y espero siempre tener presente de ahora en adelante.

Al M. en C. Fernando Arana y al laboratorio de Limnobiología de la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM- Xochimilco), por brindarme la oportunidad de trabajar con el axolotl, que es mi pasión. Espero contribuir de alguna u otra forma a su conservación y seguir luchando por la preservación de ésta magnífica especie. Muchas gracias por su contribución y asesoramiento.

Al M. en C. Alejandro Mena y su excelente equipo de trabajo del laboratorio de Microcine de la Facultad de Ciencias, por haberme abierto las puertas y ayudarme a hacer unas tomas fotográficas excelentes. Muchas gracias por sus enseñanzas y practicidad.

A los integrantes y ex integrantes del laboratorio de Acuicultura y Producción Acuática, por su ayuda y consejos, quienes durante la realización del presente trabajo me apoyaron e hicieron que fuera una labor más divertida. Desde los talleres, el servicio social y hasta la culminación de una meta más.

Dedicatorias

A mi mamá Yolanda, no tengo palabras para poder escribir el inmenso amor que te tengo y el profundo cariño y respeto que te mereces. Eres una persona increíble que me ha dado todo en la vida para poder llegar hasta donde estoy. Admiro tu valor y lucha y sin ti, yo no hubiera podido cumplir mis metas, te agradezco profundamente todo lo que me has brindado a través de mis 24 años de vida. Eres la mejor del mundo, y habértela jugado de mamá y papá al mismo tiempo tiene un valor que no se puede comparar con nada del mundo. Definitivamente este trabajo es tuyo y te lo dedico con todo mi corazón. Te amo.

A mi hermana Sinaí (Loser), tampoco tengo palabras para expresar todo el amor que te tengo y lo agradecido que estoy con la vida por tenerte a ti en nuestro pequeño núcleo familiar, pues también representas gran parte de lo que soy y lo que seré en un futuro. Agradezco todo tu apoyo incondicional y haberme cuidado por tantos años, sé que fue un gran sacrificio para ti, y espero tenerte para toda mi vida. Este trabajo también es tuyo. Te amo.

A mi papá Juanjo, que, a pesar de ya no tenerte presente físicamente, viste por mi bienestar cada minuto que te tuve a mi lado y a pesar de todas las circunstancias, me adoptaste con más del amor que un padre pueda dar, y eso implicó tu cuidado y tu amor siempre tan sincero. Como persona eres un ejemplo a seguir. Jamás voy a olvidar todo lo que diste por mí y no tienes idea de lo tanto que te extraño, algún día estaremos juntos de nuevo. Gracias.

A mis Titos, quienes formaron una familia hermosa y jamás nos han dado la espalda. Tito, donde quiera que estés, te dedico mi trabajo y quiero que sepas que eres junto con mi Tita, los pilares principales de la familia. Te extraño. Tita, sigue luchando, siempre nos has demostrado con tu alegría y enorme corazón a vivir cada día con una sonrisa.

A mi baby, porque has aguantado cada una de mis facetas y me has aceptado con mis defectos y mis virtudes. Te doy mil gracias por compartir tu vida conmigo, creer en mí y por seguir escribiendo esta historia juntos. Y recuerda, todo lo que necesitamos es un poco de paciencia. Te amo.

Desafortunadamente no puedo escribir por cada uno de los integrantes de mi gran familia porque nunca terminaría, pero en general quiero agradecerles a ellos (La Familia Toc's y otros) por quererme tanto y siempre ver por mí, cada uno se merece una parte de este trabajo, son lo mejor que tengo en la vida y cada uno guarda un lugar muy especial en mí. Gracias totales.

A mis amigos, que por orden de aparición...

A los de la 80 (Abril, Ana, Berenice, Cabezón, Enriqueta Frideishion, Fanny 1, Fanny 2, Romo, Robert, y Vilchis) ustedes fueron los principales amigos que tuve en esa etapa de mi vida y no quería dejarlos de mencionar, porque sin ustedes esa etapa en mi vida hubiera sido un cero a la izquierda.

A La Bandita (Ali, Freto, Gorda, Beatriz y Mikel), porque con ustedes pasé los mejores momentos en el CCH y las mejores aventuras las viví a su lado, y que a pesar de ya no vernos como antes, siempre que volvemos a encontrarnos pasamos momentos inolvidables, gracias por ser parte de mí y demostrarme que en la vida se puede seguir estudiando y echando relajo al mismo tiempo. Los quiero mucho. En este párrafo también quisiera añadir a mi amigo Baldomero, tú fuiste mi primera amistad en esa etapa tan genial. Gracias.

A los We are the Punks (Fa y Jav), sin ustedes, mis primeros años en la Facultad no hubieran valido la pena, siempre los voy a tener presentes y espero nunca se pierda ese lazo de amistad que formamos, gracias por compartir la universidad conmigo, nuestra forma de ser tan peculiar siempre estuvo por encima de cualquier estereotipo. Aquí quisiera agregar a los Darks Relajados (El Lord y Crispi), por todas esas risas que compartimos y esos momentos que siempre acababan con nuestro estrés. Gracias.

Al Acuateam (Ana, Dulce, Itza y Yisus), porque de algún modo cada uno aportó un granito de arena para que se pudiera llevar a cabo mi meta, pues el trabajo en el laboratorio, en el campo y más allá siempre fue más enriquecedor y relajante con ustedes a mi lado, especialmente a Yisus porque tú fuiste el último en abandonar la embarcación y a pesar de eso siempre conté contigo, en las malas y en las buenas.

Al Círculo de la Amistad (Alfred, Ale, Brisa, Cabral, Dani, Cyn, Ferchuchy, Fri, Gaby y Yayo), literalmente me adoptaron en su generación y estoy más que agradecido con la vida por habérmelos encontrado, mis últimos años en la universidad junto a ustedes fueron los más intrépidos y atípicos, gracias por siempre apoyarme, aguantarme, controlarme, abrazarme, y más. Cada uno de ustedes siempre va a estar en mi mente y espero nunca perderlos. Nuestra amistad siempre va a estar marcada por ese compañerismo y apoyo mutuo que cada vez que nos caemos nos ayudamos a levantarnos y aprendemos cosas nuevas. Los quiero.

A mis profesores universitarios (Alicia, Alejandra, Amadeo, Amaranta, Elia, Cesar, Gabino, Georgina, Lalo, Lalo el malo, Michele, Nachito, Roberto, Silvia, Zahir), ustedes son parte de mi formación y no sólo destacaron en mi vida por eso, sino también porque tuve la fortuna de conocerlos más allá de las aulas y los laboratorios, y con cada uno tuve charlas y momentos que agradezco de todo corazón. Cada uno fue un excelente profesor a su modo y un excelente amigo. Gracias por sus conocimientos y sus experiencias. En este párrafo quisiera anexar a tres profesores del CCH que también me permitieron formar lazos más allá de lo puramente académico y de igual forma aprecio su compromiso y sabiduría, Arturo (Historia), Dante (Filosofía) y María Eugenia (Biología), ustedes son profesores destacables que tienen una gran virtud para con sus alumnos, gracias por su formación y compañerismo. Su esfuerzo se ve reflejado con la culminación de esta parte de mi vida.

“La mutación es la clave de nuestra evolución, la forma en la que evolucionamos de un organismo unicelular a la especie dominante del planeta. Este proceso es lento, por lo general, toma miles y miles de años, pero cada dos o tres milenios, la evolución da un salto hacia adelante” ...

Jean Grey, 2003

“Recuerda, recuerda, el 5 de noviembre. Conspiración, pólvora y traición. No conozco ninguna razón por qué la traición de la pólvora debería ser olvidada” ...

V de Vendetta, 2006

No te preocupes por mí, lo voy a hacer bien.
Tengo a mis enemigos con los ojos cruzados y en mi vista.
Tomo una mala situación, la hago correcta.
En las sombras de la oscuridad me paro en la luz.
Mira, es nuestro estilo y lo mantendré fiel.
Tuve un mal año, pero ya lo superé.
He sido noqueado, golpeado, negro y azul...

Si me voy para atrás, Rancid.

La otra candidata excelente es la superpoblación. Y aquí el argumento pasa sin dificultad, sin oposiciones: el hábitat está dañado por tantos habitantes. Punto. Se puede discutir acerca de cuántos se convierten en demasiados. También se puede advertir que el problema no es cuántos sean, sino cuánto consumen. Sí, pero llegados a un cierto punto queda claro que demasiados son demasiados.

Giovanni Sartori, 2003. La Tierra explota.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE CUADROS

LISTA DE TABLAS

RESUMEN

ABSTRACT

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Sistemática y morfología

1.2 Distribución y hábitat

1.3 Aspectos reproductivos

1.4 Desarrollo embrionario

1.5 El eje hipotálamo-hipófisis-gonadal y las hormonas relacionadas a la reproducción.

1.6 Hormona Gonadotropina Coriónica Humana (hCG)

2. Antecedentes

3. Justificación

4. Objetivos

4.1 General

4.2 Particulares

5. Hipótesis

6. MATERIALES Y MÉTODO

6.1 Periodo de aclimatación y calidad de agua

6.2 Inducción hormonal y morfometrías

6.3 Seguimiento del desarrollo embrionario

6.4 Preferencia de alimento y contenido calórico

6.5 Procesamiento y análisis de datos

7. RESULTADOS

7.1 Análisis de calidad del agua

7.2 Morfometrías

7.3 Respuesta a la inducción hormonal

7.4 Seguimiento del desarrollo embrionario

7.5 Preferencia de alimento

7.6 Análisis de calóricos

8. DISCUSIÓN

8.1 Calidad del agua

8.2 Morfometrías

8.3 Inducción hormonal

8.4 Desarrollo embrionario

8.5 Contenido calórico y ración de alimento

9. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

10. LITERATURA CITADA

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Adulto de <i>Ambystoma mexicanum</i> en laboratorio de Acuicultura y Producción Acuática.	2
2	Distribución conocida de <i>Ambystoma mexicanum</i> .	3
3	Ensanchamiento a nivel de la cloaca en macho de <i>Ambystoma mexicanum</i> .	4
4	Se observa a la izquierda, espermátforo depositado por hembra de <i>Ambystoma mexicanum</i> posterior al protocolo de inducción hormonal y adherido a un sustrato artificial y a la derecha espermatozoides teñidos con una solución de lugol y observados al microscopio óptico (100X).	5
5	Traslado de los ajolotes del laboratorio de Limnobiología (UAM-Xochimilco) al laboratorio de Acuicultura y Producción Acuática de la Facultad de Ciencias (UNAM).	16
6	Aclimatación de individuos de <i>Ambystoma mexicanum</i> . Se observan tres machos en la pecera superior y dos en la inferior.	17
7	Morfometrías de las parejas de <i>Ambystoma mexicanum</i> previas a la inducción hormonal	18
8	Administración de la hormona (hCG) en la región dorsal de un ajolote.	19
9	Pareja de <i>Ambystoma mexicanum</i> posterior a la administración de la hormona.	19
10	Desove depositado sobre el sustrato artificial y obtenidos de las parejas de <i>Ambystoma mexicanum</i> inducidas con la hormona hCG.	20
11	“Baño María” para elevar la temperatura de los tratamientos a $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$.	21
12	Toma de fotografías digitales en el laboratorio de Microcine.	22
13	Aislamiento de las crías de <i>Ambystoma mexicanum</i> en cámaras de 10 ml.	23
14	Comparación del porcentaje de eclosión de huevos de <i>Ambystoma mexicanum</i> empleando diversas concentraciones de hCG a dos temperaturas.	29
15	Diagramas de caja de preferencia alimenticia de crías de <i>Ambystoma mexicanum</i> alimentadas con <i>Artemia</i> sp. y <i>Daphnia</i> sp.	32
16	Análisis discriminante por tratamiento señalando la ingesta de dos fuentes de alimento por crías de <i>Ambystoma mexicanum</i> .	33

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Cuadro taxonómico de <i>Ambystoma mexicanum</i> .	1
2	Estadios del desarrollo embrionario de <i>Ambystoma mexicanum</i> (incubado a 20 °C).	6
3	Parámetros físico-químicos del medio recomendados para <i>Ambystoma mexicanum</i> .	13
4	Resultados del análisis de varianza de los parámetros físico-químicos de la calidad del agua medidos durante la fase de inducción hormonal en <i>Ambystoma mexicanum</i> .	25
5	Indicadores morfométricos de <i>Ambystoma mexicanum</i> previo a la inducción hormonal.	25
6	Número total de huevos ovopositados por las parejas de <i>Ambystoma mexicanum</i> en respuesta a la reproducción.	26
7	Resultados de la inducción hormonal en <i>Ambystoma mexicanum</i> , empleando hCG. Conteo acumulativo del número de huevos eclosionados a temperatura ambiente (15.4 °C) a través del tiempo.	27
8	Producción de huevos por <i>Ambystoma mexicanum</i> en los tratamientos control y con hormona a 20 °C.	28
9	Comparativo del desarrollo embrionario del presente estudio (últimas 96 horas a 20 °C) y su relación con los °C/día acumulados.	30
10	Comparativo del desarrollo embrionario del presente estudio (últimas 96 horas a 20 °C) y su relación con los °C/día acumulados.	31
11	Consumo de alimento por crías de <i>Ambystoma mexicanum</i> .	32
12	Contenido calórico de diversos alimentos y el tejido de crías de <i>Ambystoma mexicanum</i> expresadas en calorías por gramo de peso seco (Cal/g PS).	34
13	Composición corporal, valor calórico y requerimientos de energía de crías de <i>Ambystoma mexicanum</i> a dos temperaturas.	34

RESUMEN

Las diversas especies de anfibios se encuentran amenazadas y están desapareciendo a nivel mundial a causa de la urbanización, perturbación de su hábitat, introducción de especies exóticas, contaminación de los cuerpos de agua, entre otros, y México no es la excepción. La zona lacustre del Valle de México alberga a una de las cinco especies de urodelos neoténicos que hay en el mundo, el ajolote o axolotl (*Ambystoma mexicanum*) el cual se encuentra en grave peligro de extinción y por lo cual es urgente realizar acciones de conservación que aseguren su preservación. Por consiguiente, este estudio se planteó el objetivo de reproducir a la especie en condiciones de laboratorio mediante la aplicación de un protocolo hormonal a través del uso de la hormona Gonadotropina Coriónica Humana (hCG), aplicada en dos tratamientos con una réplica cada uno y un grupo control, las dosis utilizadas fueron de 200 UI y 400 UI con un refuerzo del 50% 24 horas después de la primera administración. Los resultados obtenidos indican que hubo un efecto positivo de la inducción hormonal sobre la reproducción de los organismos, obteniendo puestas de huevecillos 48 horas después de la inducción. El conteo total del número de huevos por puesta varió por tratamiento siendo estos de 472 huevos para el tratamiento de 200 UI, 338 para el de 400 UI y para el control 321, el contraste de los tratamientos sobre una hipótesis de no diferencia en el desove fue estadísticamente significativa ($X^2_c = 36.28$, $p < 0.001$), indicando que el tratamiento con 200 UI obtuvo los mejores resultados, con un 25.2% más de eficiencia que el control. Se llevó a cabo una comparación del desarrollo embrionario de los tratamientos con hormona, tomando sub-muestras de forma aleatoria de las puestas a intervalos de tiempos constantes, se tomaron fotografías digitales de los huevos para describir las diversas etapas del proceso de desarrollo, efectuándose una comparación con investigaciones previas. Se obtuvo una aceleración positiva del tiempo de desarrollo al incrementar la temperatura del agua a 20 °C, por lo que se acortó el proceso de desarrollo hasta la liberación de la cría en un 30% ($Q_{10} = 1.71$), siendo este de 344 horas y 288 °C/día acumulados. Por último, se llevó a cabo una cuantificación del contenido de energía del alimento y de las crías. Con estos datos se calculó un nivel de ración de mantenimiento para éstas, considerando que éste es del 10% del contenido de energía de la cría, el resultado obtenido fue de 132.5 cal/ejemplar/día a una temperatura promedio de 15 °C, y al calcular el Q_{10} (1.71) se

extrapoló la ración para organismos mantenidos a 20 °C, la cual fue de 226.6 cal/ejemplar/día. Con ésta información se proponen estrategias para el manejo del ajolote a tomarse en cuenta para su conservación y posible reintroducción, además se recomienda realizar más investigaciones para mejorar las condiciones de cultivo en cautiverio.

**Contribución No. 200. Laboratorio de Acuicultura y Producción Acuática.
Departamento de Biología Comparada. Facultad de Ciencias, UNAM.**

ABSTRACT

Many species of amphibians are endangered and are disappearing worldwide due to urbanization, disturbance of their habitat, introduction of exotic species, contamination of water bodies, among others, Mexico is no exception. The lacustrine zone of the Valley of Mexico is home to one of the five species of neotenic urodels in the world, the axolotl (*Ambystoma mexicanum*), which is in serious danger of extinction and for which it is urgent to carry out conservation actions that ensure their preservation. Therefore, this study was raised the application of a hormonal protocol in order to induce spawning of *A. mexicanum* under laboratory conditions, using human chorionic gonadotropin (hCG), applied in two treatments with a replicate each and a control group, the doses used were 200 IU and 400 IU with a 50% booster 24 hours after the first administration. The obtained results showed that there was a positive effect of the hormonal induction on the reproduction of the organisms, obtaining egg laying 48 hours after the induction. The total count of the number of eggs per lay varied between treatments, being 472 eggs for the treatment with 200 IU hCG, 338 for the 400 IU and 321 for the control, being the best result the one obtained 200 IU hCG ($X^2_c = 36.28$, $p < 0.001$), with a 25.2% higher efficiency than control. A comparison of the embryonic development in the treatments was carried out by randomly taking sub-samples at constant time intervals, digital photographs of eggs were taken to describe the various stages of the development process, doing a comparison with previous research. A positive acceleration of development was obtained by increasing temperature to 20 °C, so the period of development, until the release of the last stage was shortened by 30% ($Q_{10} = 1.71$), being 344 hours and 288 °C/day accumulated. Finally, a quantification of the energy input by the feed to the offspring was carried out. With these data, a maintenance ration level was calculated, considering that this is 10% of the energy content of the breeding, the result obtained was 132.5 cal/organism/day at an average temperature of 15 °C, and the ration was extrapolated for organisms maintained at 20 °C, being 226.6 cal/organism/day. With this information, strategies are proposed for the management of the axolotl to be taken into account for its conservation and possible reintroduction. Further research is recommended to improve the conditions of culture in captivity.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Sistemática y morfología

El ajolote (*Ambystoma mexicanum*) es un anfibio perteneciente a la familia *Ambystomatidae* (Cuadro 1) con apariencia de un renacuajo gigante, su piel es lisa en casi todo el cuerpo, aunque puede ser ligeramente rugosa y con pequeños poros que solo se aprecian de cerca. Su cabeza es robusta, ancha y plana, contrastando con el resto del cuerpo que es más alargado y comprimido lateralmente. Sus ojos son pequeños y sin párpados. El cuerpo tiene 12 pliegues de cada lado. Mide en promedio 25.7 cm de largo de la cabeza hasta la cola, con un peso que va de 60 a 110 g. Su cabeza es más ancha que larga y mide de 3.3 a 3.7 cm; con una boca grande que tiene alrededor de 126 pequeños dientes maxilares y premaxilares y de 18 a 20 dientes vomero-palatinos que están ubicados dentro de la cavidad de la boca, su lengua es retráctil (CONABIO, 2011).

Cuadro 1. Cuadro taxonómico de *Ambystoma mexicanum*. (Modificado de Biasutti, 2006).

Taxón	Nombre
Reino	<i>Animalia</i> Linnaeus, 1758
Phylum	<i>Chordata</i> Bateson, 1885
Clase	<i>Amphibia</i> Linnaeus, 1758
Subclase	<i>Lissamphibia</i> Haeckel, 1886
Orden	<i>Urodela</i> Dumeril, 1806
Familia	<i>Ambystomatidae</i> Gray, 1850
Género	<i>Ambystoma</i> Tschudi, 1838
Nombre científico	<i>Ambystoma mexicanum</i> , Shaw y Nodder, 1798
Nombre común	Ajolote, Axolote o Axolotl

Las características físicas más llamativas del ajolote son sus estructuras branquiales externas (Fig. 1). Tres proyecciones en forma de rama se extienden desde la región del cuello a cada lado de la cabeza. Cada rama está cubierta por filamentos con plumas utilizados para el intercambio de gases. También tienen pulmones y ocasionalmente nadan a la superficie para tomar aire, pero pasan la mayor parte del tiempo bajo el agua con las ramas abiertas para aumentar la exposición de los filamentos al agua (Gresens, 2004). En las extremidades torácicas tiene cuatro dedos y cinco en las abdominales. Posee en el lomo una especie de peine (aleta) que llega hasta la cola; es de color parduzco oscuro con pequeñas manchas blanquecinas (Ortega, 2000).



Fig. 1. Adulto de *Ambystoma mexicanum* en el laboratorio de Acuicultura y Producción Acuática. Fotografía de José Torres

1.2 Distribución y hábitat

La familia Ambystomatidae se encuentra conformada por 30 especies y su distribución natural se circunscribe únicamente al continente americano (centro y norte), desde el sur de Alaska, este de Canadá, gran parte de Estados Unidos y ocho estados de la República Mexicana, hasta la meseta central. Hoy en día *Ambystoma mexicanum* se encuentra restringido a la zona lacustre de Xochimilco y Chalco-Tláhuac en Ciudad de México (Fig. 2; Molina-Vázquez, 2010).

Su hábitat es acuático, vive en lagos, pozas y canales. Requiere condiciones particulares de turbidez, niveles de oxígeno disuelto en el agua, y condiciones

estables de las corrientes. La temperatura ideal del agua es de 16 a 18 ° C y no debe de exceder los 20 a 22 °C. El clima donde vive varía por su altura y su geografía, pudiendo ser de templado a frío húmedo. En la región de los canales de Xochimilco, el clima es templado sub-húmedo con lluvias en verano (Cw). La altitud promedio de la región es de 2,250 m s.n.m. y las lluvias son de mayo a octubre, con una precipitación anual de 600 mm (CONABIO, 2011).

Sin embargo, fuertes presiones ambientales y factores de estrés biológicos, físicos y químicos han alterado cuantitativa y cualitativamente la calidad del agua de su hábitat, lo que ha contribuido a la reducción y extinción de algunas especies tal como el ajolote (Zambrano *et al.*, 2007; Contreras *et al.*, 2009). Durante 2002 y 2003 se cubrieron alrededor de 39,173 m² de canales, colectando en total 42 ajolotes, por lo que se puede considerar que en cinco años las poblaciones de ajolotes se han reducido en seis veces (Zambrano *et al.*, 2004).

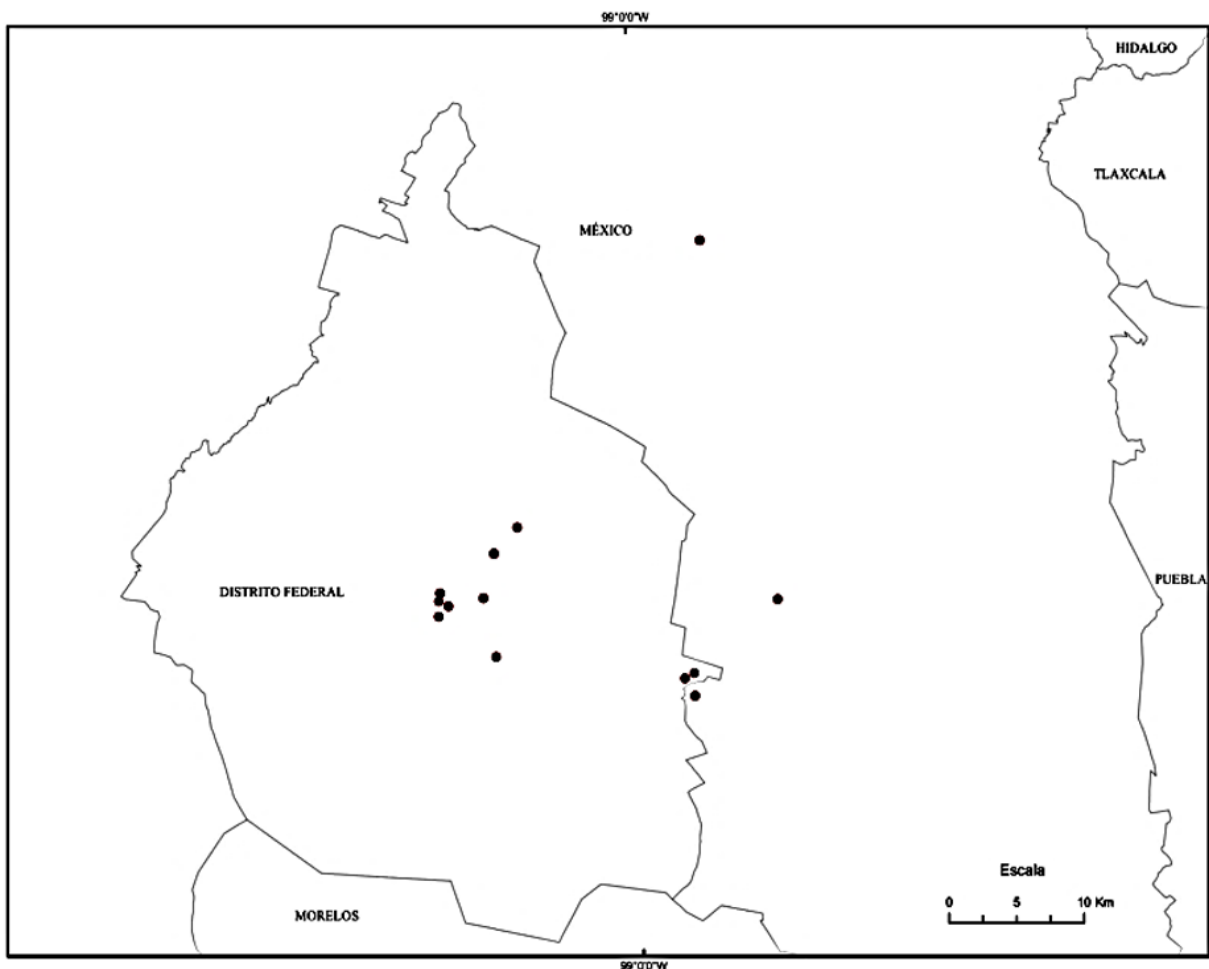


Fig. 2. Distribución conocida de *Ambystoma mexicanum* (CONABIO, 2010).

1.3 Aspectos reproductivos

En general, la reproducción de los anfibios depende tanto de factores extrínsecos como intrínsecos de la especie, dentro de estos, el sistema endocrino desempeña un papel importante. En los Ambistomátidos la actividad reproductiva es estacional, por lo tanto, los períodos húmedos o secos afectan los patrones conductuales y reproductivos (Dorantes *et al.*, 2012). En el caso del ajolote, como en todos los vertebrados, la madurez sexual está controlado por el eje Hipotálamo-Hipófisis-Gonadal (Jorgensen, 1992).

La edad de reproducción en condiciones óptimas es a partir del primer año. Sin embargo, es común que se tarden año y medio en madurar sexualmente. La cantidad de huevos que puede poner una hembra adulta es de alrededor de 660 por puesta. En condiciones ideales las hembras en cautiverio son capaces de tener puestas cada dos meses, sin reducir la cantidad de huevos en las puestas. Sin embargo, estas cantidades de huevos únicamente se mantiene durante cinco o seis años, y después el número de huevos decrece y las puestas cuentan con bajos valores de sobrevivencia (Armstrong *et al.*, 1989).

La diferenciación sexual en el ajolote para el caso de los machos se evidencia observando alrededor de la cloaca, un abultamiento que se debe a la presencia de una glándula agrandada que produce gelatina para empaquetar y proteger su esperma (Fig. 3). Las hembras poseen esta glándula, pero carecen de este ensanchamiento (Gresens, 2004).



Fig. 3. Ensanchamiento a nivel de la cloaca en macho de *Ambystoma mexicanum*.

Fotografía de José Torres

Los adultos se aparean cuando se presenta una hembra con el macho y ocurre la rutina de cortejo entre ambos, esta tiene lugar al entrar en contacto físico mientras realizan una danza de apareamiento, este patrón de cortejo no es diferente de los cortejos mostrados por otros urodelos (Salthe, 1969). Posterior a esto, el macho deposita su esperma, que se empaqueta en espermátóforos, cuya forma es cónica. La punta del espermátóforo es blanca, y el extremo ancho del cono es claro (Fig. 4). Estos paquetes son adhesivos y el macho los une a las rocas y las plantas en su entorno, la hembra recoge los espermátóforos con su cloaca y almacena el esperma internamente hasta que está lista para arrojar sus huevos, aproximadamente 24h después de ser fertilizado el huevo es liberado al medio (Gresens, 2004).



Fig. 4. Se observa a la izquierda, espermátóforo depositado por hembra de *Ambystoma mexicanum* posterior al protocolo de inducción hormonal y adherido a un sustrato artificial y a la derecha espermatozoides teñidos con una solución de lugol y observados al microscopio óptico (100 X). Fotografía de José Torres

1.4 Desarrollo embrionario

Los huevos del ajolote son considerados relativamente grandes en comparación con los huevos de otros anfibios comunes de laboratorio, incluidos *Xenopus* y *Rana*. La tasa de desarrollo de los huevos es dependiente de la temperatura y puede ser relativamente lenta, una situación que facilita la microinyección o manipulaciones microquirúrgicas (Malacinski y Chung, 1977). Los huevos requieren alrededor de dos semanas para eclosionar cuando se mantienen a 20 °C. Su desarrollo se puede

prolongar un mes o más si se mantienen refrigerados a aproximadamente 7 °C (Bordzilovskaya *et al.*, 1979).

Los huevos de ajolote son más saludables cuando se les permite descansar en una sola capa. Esto les permite recibir oxígeno adecuado durante esta delicada fase de vida. Los embriones muertos o defectuosos, los desechos y el exceso de gelatina son especialmente dañinos para los huevos en el laboratorio, ya que los huevos supervivientes no tienen corrientes de agua naturales para oxigenarlos (Gresens, 2004). El ciclo empieza con el embrión que se desarrolla dentro de un huevo transparente formado por tres capas, por lo que es posible observar el desarrollo embrionario. Una vez eclosionado, la cría solo posee cabeza, cuerpo y branquias, posteriormente se desarrollan los miembros, tanto anteriores como posteriores (Servín-Zamora, 2011). En el Cuadro 2 se resume los estadios de desarrollo embrionario de acuerdo con Bordzilovskaya *et al.* (1979).

Cuadro 2. Estadios del desarrollo embrionario de *Ambystoma mexicanum* (incubado a 20 °C). Modificado de Bordzilovskaya *et al.* (1979).

Estadio	Tiempo (horas)	Descripción
1	0	Huevo recién puesto.
2	0.65	2 células.
3	2.4	4 células.
4	4	8 células.
5-6	5.5	16 células.
6	6.5-7	32 células.
7	8-9	64 células.
8	16	Blástula temprana.
9	21	Blástula tardía.
10	26	Gástrula temprana, primer signo del labio blastoporal dorsal.
11	38	Gástrula media, blastoporo cubre tres cuadrantes. Labios laterales formados, labio lateral marcado por pigmentación y el tapón de la yema alcanza su máximo diámetro.

Cuadro 2. Continuación.

Estadio	Tiempo (horas)	Descripción
12	47	Gástrula final, blastoporo tiene una forma ovalada o circular.
14	58	Neurula temprana, la placa neural es amplia. Los pliegues neurales se delinear y comienzan a elevarse por encima de la superficie de la cabeza. El embrión es ligeramente alargado.
15-16	59-63	Neurula media temprana. La placa neural tiene forma de escudo y se hunde; los pliegues neurales se elevan y se unen a todas las regiones de la placa neural.
17	64	Neurula tardía I. Los pliegues neurales son más altos; especialmente en la región de la cabeza. El estrechamiento y la profundización de la placa neural se producen tanto en la cabeza como en las regiones espinales. El surco que limita el arco mandibular es levemente delineado. La segmentación del material mesodérmico comienza. Hay dos pares de somitas.
18	66	Neurula tardía II. La placa neural está profundamente hundida. Los pliegues neurales se están cerrando y son especialmente altos en la región de la cabeza donde se delinear tres bultos leves correspondientes a las vesículas del cerebro anterior, medio y posterior. Los pliegues neuronales de la región espinal están casi en contacto.
19	69	Neurula tardía III. Los pliegues neurales están en contacto en todo momento, pero aún no están fusionados. La curvatura del cerebro es bastante distinta en el perfil; las vesículas del cerebro anterior, medio y posterior son también distintas. La hinchazón de las vesículas ópticas está delineada. Hay tres pares de somitas.
20	70	Neurula tardía IV. Los pliegues neurales se fusionan en la región espinal; en la región del cerebro, solo están en contacto. Las vesículas ópticas están destinadas a ser más grandes. Los surcos en ectodermo aparecen en el nivel del rombencéfalo. Una hinchazón muy leve marca la futura región branquial.

Cuadro 2. Continuación.

Estadio	Tiempo (Horas)	Descripción
22-23	73-74	Los pliegues neurales están completamente fusionados. La región branquial y los pronefros son distintos. Hay de cinco a seis pares de somitas presentes. El primordio de la oreja se describe como una depresión superficial en el ectodermo en la región sobre el futuro arco hioideo. El surco branquial aparece, delineando el límite entre el arco hioideo y el primer arco branquial.
24	80	El orificio auditivo está delineado y se vuelve más distintivo. El surco branquial se alarga ventralmente. Ocho o nueve pares de somitas son visibles.
29		La región branquial está claramente delineada. El primordio del órgano olfativo aparece como un tubérculo en la parte anterior de la cabeza. Hasta 16 pares de somitas están presentes.
30-31	110	El cuerpo del embrión continúa enderezando. La aleta dorsal comienza a observarse. Aparece un surco en la región del primordio de los ojos). El tercer surco branquial se hace evidente en la parte dorsal de la región branquial.
32-34	115	La aleta dorsal se desarrolla.
35	122	A partir de esta etapa, el eje del cuerpo desde el rombencéfalo hasta la base de la cola es bastante recto. Tres branquias externas muestran nódulos en la superficie de la hinchazón branquial. Aparecen los primeros cromatóforos; la pulsación del corazón comienza.
36-37	177	Las branquias se alargan y se empujan. Todavía no se ven brotes de extremidades.
38		Los brotes de los filamentos aparecen como dos nódulos en cada branquia. El primordio del opérculo es visible como un pliegue. Los brotes de las extremidades están ligeramente delineados.

Cuadro 2. Continuación.

Estadio	Tiempo (horas)	Descripción
39	220	Las primeras branquias tienen dos pares de brotes de filamentos; el segundo y el tercero tienen tres pares cada uno. Las branquias cubren los brotes de las extremidades. Ambos rudimentos del opérculo se acercan a la línea media. El ángulo de la boca comienza a mostrarse.
40	240	Las branquias son más largas y la cantidad de filamentos aumenta (cuatro pares en las primeras branquias, seis o siete pares en la segunda o tercera). Los rudimentos del opérculo se unen en la línea media. Los ángulos de la boca están marcados más claramente y los brotes de las extremidades sobresalen ligeramente.
41	265	Las branquias continúan alargándose, la cantidad de filamentos aumenta y se hacen más largos. La boca está claramente delineada. La segunda línea lateral corre a lo largo. La eclosión comienza.
42	296	Las branquias se extienden mucho más allá de los brotes de las extremidades anteriores. La boca está completamente delineada.
43		Con movimientos convulsivos, la larva se libera de la capa de gelatina. La boca ya está abierta o se abrirá dentro de las próximas 24 a 72 h.

1.5 El eje hipotálamo-hipófisis-gonadal y las hormonas relacionadas con la reproducción

Se denomina eje hipotálamo-hipófisis-gonadal (HHG) a la interacción entre un componente del sistema nervioso central (hipotálamo) y el sistema endocrino relacionado con la reproducción, integrado por una glándula principal (hipófisis) y glándulas periféricas (ovario o testículo). El sistema nervioso central capta señales provenientes de los medios interno y externo, éstas son integradas en el hipotálamo cuyas neuronas neurosecretoras liberan factores liberadores o inhibidores que regulan la función hipofisaria (Volonteri, 2014).

Las hormonas hipofisarias involucradas directamente en el eje HHG son las gonadotropinas LH y FSH que, estimuladas por la hormona liberadora de gonadotropinas hipotalámica (GnRH), son transportadas por circulación sistémica hasta alcanzar su órgano blanco, las gónadas. Allí regulan el funcionamiento gonadal y entre sus funciones se pueden señalar que: estimulan el crecimiento y desarrollo, la síntesis de hormonas sexuales (andrógenos, estrógenos, progestágenos), la síntesis y secreción de inhibina y activina, y la producción de gametas. Finalmente, las hormonas producidas por las gónadas y liberadas a circulación regulan su propia estimulación a través de mecanismos de retroalimentación negativa ejercidos sobre la hipófisis, el hipotálamo y también sobre áreas extra hipotalámicas (Volonteri, 2014).

La hormona estimulante del folículo (FSH) y la hormona luteinizante (LH) induce la ovulación en la hembra, y en el macho el desarrollo del tejido intersticial de los testículos y de glándulas anexas. La hormona estimulante del folículo (FSH) promueve folículos maduros, que producen progesterona, la cual madura los ovocitos, seguido del desove. El desarrollo de los folículos se produce en fases: existe la fase de crecimiento primaria de los ovocitos; después con un adecuado estímulo ambiental se produce, la segunda fase de crecimiento en la cual los ovarios secretan estradiol que inhibe el desove, hasta llegar a la maduración final de los ovocitos que produce una disminución de estradiol y el aumento de testosterona en el macho y progesterona en la hembra, produciendo así la espermiación y la ovulación respectivamente (Browne *et al.*, 2006).

Las hormonas FSH y LH se denominan gonadotropinas hipofisarias y junto con la hormona estimuladora de la tiroides (TSH) pertenecen a la familia de las hormonas glicoproteicas. A este grupo pertenece también la hormona placentaria, gonadotropina coriónica humana (hCG). Los miembros de esta familia son hormonas compuestas por dos subunidades, α y β N-glicosiladas, codificadas por genes distintos. La subunidad α es común a todos los integrantes de la familia mientras que la subunidad β es distinta para cada hormona y es la que le confiere especificidad a la actividad biológica (Pierce y Parsons, 1981). En cuanto a su función, al igual que en mamíferos las gonadotropinas de los anfibios regulan el

funcionamiento de las gónadas y el comportamiento reproductivo (Volonteri, 2014).

1.6 Hormona Gonadotropina Coriónica Humana (hCG)

Es una hormona glicoproteica producida durante el embarazo por el embrión humano en desarrollo después de la concepción y posteriormente por el sincitiotrofoblasto (parte de la placenta). Contiene aproximadamente 30% de carbohidratos; formada por dos cadenas alfa y beta con un peso molecular de 36,700 daltons, su punto isoeléctrico es de 4.5, la subunidad o cadena alfa (14,500 daltons y 92 aminoácidos) es igual a la de otras hormonas del mismo género de origen glicoproteico como son la LH, FSH y TSH, por lo contrario su subunidad o cadena beta (22,200 daltons y 145 aminoácidos) es específica de esta hormona ya que contiene 30 aminoácidos adicionales en la secuencia de su carbono terminal, ricos en prolina (Plumb, 2006).

De acuerdo a información previa, existe una dosis general para anfibios de 50 - 300 UI para liberación de esperma y de 250 a 400 UI para inducción de la ovulación para organismos en cautiverio, (Crawshaw, 1993). Se puede aplicar por varias vías como: subcutánea en el saco linfático dorsal, por vía intramuscular en los miembros posteriores y por vía intracelómica (cavidad celómica) (Browne, 2007).

La comercialización en México de la Hormona Gonadotropina Coriónica Humana es común para múltiples fines, y se puede obtener bajo el nombre de Choragon® en presentación de una ampolleta con liofilizado que contiene 5000 UI de hCG, y un diluyente que contiene 1 ml de solución tampón estéril.

2. Antecedentes

A nivel global, la Unión Internacional Para la Conservación de la Naturaleza (IUCN) ubica esta especie en la categoría de “peligro crítico (CR)” (IUCN, 2010). La Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES) tiene incluido al ajolote dentro del “Apéndice II”, donde las especies dentro de este apartado, no se encuentran necesariamente en peligro de extinción y su comercio se encuentra estrictamente regulado y para lo cual se requieren permisos para el intercambio internacional (CITES, 2013). En nuestro país la NOM-059 - SEMARNAT- 2010 la incluye como una “especie en peligro de extinción (P; SEMARNAT, 2010).

El Plan de Acción para la Conservación de Anfibios, publicado por la UICN, recomienda combinar investigación básica, para conocer aspectos de biología de la reproducción y aplicaciones como la inducción hormonal para propagar especies tanto para fines de investigación como para su posible reintroducción en su hábitat natural (Gascon *et al.*, 2007).

En la literatura se han descrito varios procedimientos para inducir el desove fuera de temporada siendo estos: estimulación de los animales maduros por un choque a temperatura fría para liberar espermatozoides por el macho, seguido de inseminación de la hembra (Sloof y Baerselman, 1980); inyección de la hembra por vía intraperitoneal con LH y posteriormente su exposición con un macho a una temperatura ligeramente fría; inyección de la hembra con FSH (Newrock y Brothers, 1973); y el método en los que espermatozoides y huevos se obtienen por estimulación hormonal para ambos sexos, seguido de fertilización artificial (Trottier y Armstrong, 1975).

Por último, respecto a la calidad del agua, Servín-Zamora (2011) realizó una compilación de la literatura referente a los parámetros físico-químicos reportados para *A. mexicanum* en edad juvenil y reproductiva en cautiverio que a continuación se presentan en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Parámetros físico-químicos del medio recomendados para *Ambystoma mexicanum*. Modificado de: Servín-Zamora, (2011).

Parámetro	Valor ideal
pH	6.5 – 8.5
Cloro	0 mg/l
Dureza general (GH)	107.4 – 286.4 mg/l
Dureza carbono (KH)	53.7 -179 mg/l
Amoniaco	0 mg/l
Densidad	1.000
Concentración CO ₂	< 5 mg/l
O ₂ disuelto	>6.6 mg/l
Temperatura	15 -18 °C

3. Justificación

Los anfibios se encuentran en peligro de extinción a nivel mundial. De las especies que están amenazadas, varias no se pueden proteger en su medio natural, por lo que es urgente realizar acciones de conservación *ex situ* que aseguren su preservación (Aguilar *et al.*, 2009). En virtud de lo anterior, los aspectos reproductivos, vinculados con un enfoque ecofisiológico y el manejo acuacultural de este anfibio, son de gran importancia para la conservación del ajolote dado su estado crítico en su hábitat natural. Esta especie es de gran importancia biológica, ecológica, biomédica y social. Por lo que el control de su reproducción en cautiverio por medio de la estimulación hormonal con Gonadotropina Coriónica Humana (hCG), permitiría controlar la producción de crías para su posterior liberación en su hábitat natural y conocer tasas de sobrevivencia, coadyuvando así a la conservación de la especie con métodos desarrollados en el laboratorio.

4. Objetivo

4.1 General

- Determinar el efecto de la hormona gonadotropina coriónica humana (hCG) como inductor de la reproducción *ex situ* en *Ambystoma mexicanum*.

4.2 Particulares

- Comparar la acción de la administración hormonal de hCG a dos dosificaciones (200 y 400 UI) sobre la reproducción del ajolote.

- Determinar si la temperatura acelera el desarrollo embrionario de las puestas del ajolote, y comparar la aceleración en dos diferentes regímenes de temperatura (15 °C y 20 °C).

5. Hipótesis

Dado que las gonadotropinas regulan el funcionamiento gonadal y el comportamiento reproductivo en anfibios en particular la hormona luteinizante (LH) y la foliculo estimulante (FSH), y considerando que la hormona Gonadotropina Coriónica Humana (hCG) pertenece a la misma familia de éste grupo, se propone que la administración de dicha hormona generará una serie de reacciones fisiológicas que en respuesta llevarán a la reproducción sexual del ajolote, y se espera que la menor dosificación sea más eficaz ya que 400 UI puede encontrarse en el límite de aceptación para los organismos. Así mismo, se espera que el tiempo de desarrollo embrionario ocurra en menor tiempo a una temperatura mayor ya que a mayor temperatura, mayor aceleración en las reacciones fisiológicas.

6. MATERIALES Y MÉTODO

6.1 Periodo de aclimatación y calidad de agua

Las cinco parejas de reproductores de *A. mexicanum* (Fig. 5) que fueron sometidas al tratamiento hormonal, fueron donadas por el laboratorio de Limnobiología de la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM) - Xochimilco. Antes de iniciar la fase experimental fueron puestos en cuarentena de forma individual en las instalaciones del área de acuarios del laboratorio de Acuicultura de la Facultad de Ciencias, UNAM, donde previamente se tenían cuatro peceras de 40 L lavadas, desinfectadas y con agua desclorada a una temperatura de $15\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, en las cuales fueron colocados los organismos divididos por sexo: dos machos en una pecera y tres en otra y para el caso de las hembras de la misma forma.



Fig. 5. Traslado de los ajolotes del laboratorio de Limnobiología (UAM-Xochimilco) al laboratorio de Acuicultura y Producción Acuática de la Facultad de Ciencias (UNAM).

Fotografía de José Torres

Se midieron los parámetros físicos y químicos de la calidad del agua (temperatura, pH, conductividad, sólidos totales y oxígeno disuelto) de la que provenían los ajolotes y del agua de las peceras. Posteriormente se realizó una mezcla del agua de procedencia con el agua de las peceras (1:1), cubriendo la mitad de la totalidad de las peceras, después se introdujeron a los ajolotes en sus respectivos acuarios evitando algún tipo de perturbación en ellos (Fig. 6).



Fig. 6. Aclimatación de individuos de *Ambystoma mexicanum*. Se observan tres machos en la pecera superior y dos en la inferior. Fotografía de José Torres

Durante esta etapa, la cual se llevó a cabo de octubre del 2017 a enero del 2018 se les alimentó tres veces por semana con charal y acocil a saciedad y se realizó un monitoreo continuo de la calidad del agua de los acuarios de confinamiento tres veces por semana, midiendo las variables: temperatura, oxígeno disuelto, pH, conductividad y sólidos disueltos utilizando un multianalizador marca OAKTON modelo PCSTestr 35 (± 0.01) y un oxímetro marca EcoSense modelo ODO-200 ($\pm 2\%$.) La calidad del agua fue monitoreada durante toda la fase de aclimatación, experimental y posterior a la inducción hormonal.

6.2 Inducción hormonal y morfometrías

Se realizaron las morfometrías de cada organismo (Fig. 7) cinco días previos a la inducción hormonal, se tomaron en cuenta la longitud total (LT), longitud hocico-cloaca (LHC) y el peso húmedo (PH), para lo cual se extrajo a cada organismo de su acuario manualmente con una red de acuario, para el peso se utilizó una balanza digital marca OHAUS modelo PA2202 (± 0.01 g) y para obtener los valores de longitud se utilizó un ictiómetro hecho con tubo PVC cortado a la mitad por lo largo y con una cinta métrica adherida a lo largo en el centro (± 0.05 cm).



Fig. 7. Morfometrías de las parejas de *Ambystoma mexicanum* previas a la inducción hormonal. Fotografía de José Torres

Durante la etapa que comprendió la fase experimental, se monitorearon cada tercer día en todos los acuarios los parámetros fisicoquímicos de la calidad del agua: temperatura ($^{\circ}\text{C}$), potencial de hidrógeno (pH), conductividad (μS), sólidos totales (ppm) y oxígeno disuelto ($\text{mg O}_2/\text{l}$).

Con base en el estudio previo de Trottier y Armstrong (1975), se planteó el diseño experimental, el cual consistió en suministrar dos diferentes dosis de hormona gonadotropina coriónica humana (hCG) (200 y 400 UI), como agente inductor de la reproducción *ex situ*. La hormona utilizada fue en su presentación comercial de 5000 UI/ml.

Previo a la inducción hormonal, se mantuvieron a los organismos en ayuno de 24 h y se reanudó la alimentación 48 horas después. Las mesas de trabajo fueron desinfectadas y todo el personal utilizó batas limpias y guantes de nitrilo, todo el material utilizado fue estéril y no tóxico. Las dosis suministradas fueron: 200 y 400 UI por ejemplar y sexo, con un refuerzo del 50% a las 24 h posteriores de la primera dosificación, el protocolo fue planteado para una réplica por tratamiento y una pareja control.

La hormona se suministró en volúmenes de 1 ml aplicándose en la región dorsal del organismo, vía intramuscular con una jeringa de insulina (Fig. 8), para lo cual se preparó una solución madre de la hormona en su concentración total y fue diluida en la ampolleta comercial de 1 ml, de la cual se realizaron las diluciones apropiadas,

para obtener las dosis a ensayar (200 y 400 UI). En el caso del grupo control se siguió el mismo procedimiento, pero los organismos fueron inyectados únicamente con solución inyectable.



Fig. 8. Administración de la hormona (hCG) en la región dorsal de un ajolote. Fotografía de José Torres

El refuerzo fue aplicado siguiendo el procedimiento ya descrito. Posteriormente al suministro de la hormona, los organismos fueron colocados en parejas de ambos sexos para promover el cortejo y apareamiento (Fig. 9).

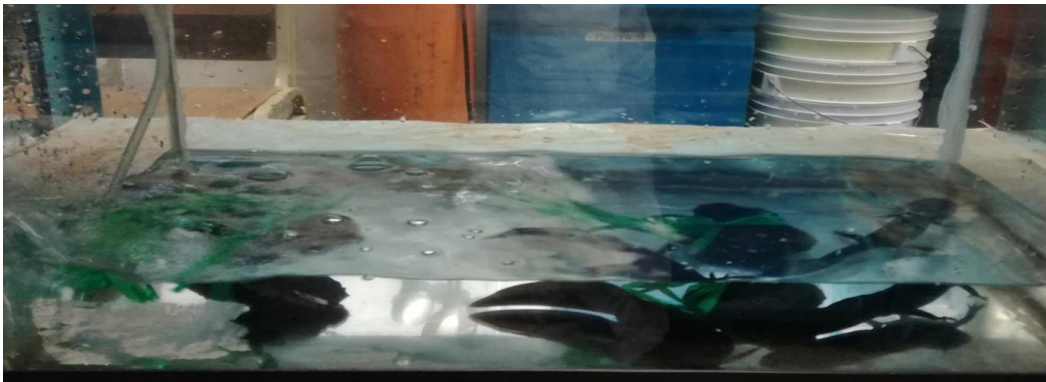


Fig. 9. Pareja de *Ambystoma mexicanum* posterior a la administración de la hormona. Fotografía de José Torres

6.3 Seguimiento del desarrollo embrionario

A partir del suministro de la hormona, las cinco parejas de organismos fueron monitoreados diariamente para observar la posible aparición de puestas. Las parejas se colocaron en acuarios de 40 L, a una temperatura de $15\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ con

aireación constante y como sustrato se agregaron rocas de río y rafia plástica, en la cual se pudieran adherir los huevos. Los parámetros de la calidad del agua (temperatura, pH, conductividad, sólidos totales y oxígeno disuelto) se midieron tres veces por semana.

Al obtenerse los desoves (Fig. 10), se llevó un registro de la fecha y hora del desove, así como el registro de los factores de calidad del agua ya referidos, una fracción de estos fue empleada en el experimento de temperatura a 20 °C.

Se realizó el conteo del número de huevos de cada puesta, tomando en cuenta el tratamiento del cual provenían. Para calcular la eficiencia del desove se contabilizó el número de huevos que llegaron a la etapa de eclosión de cada puesta. Pasadas 24 h, los ejemplares y los desoves fueron separados de forma individual en peceras de 10 L, tratando de manipularlos lo menos posible.

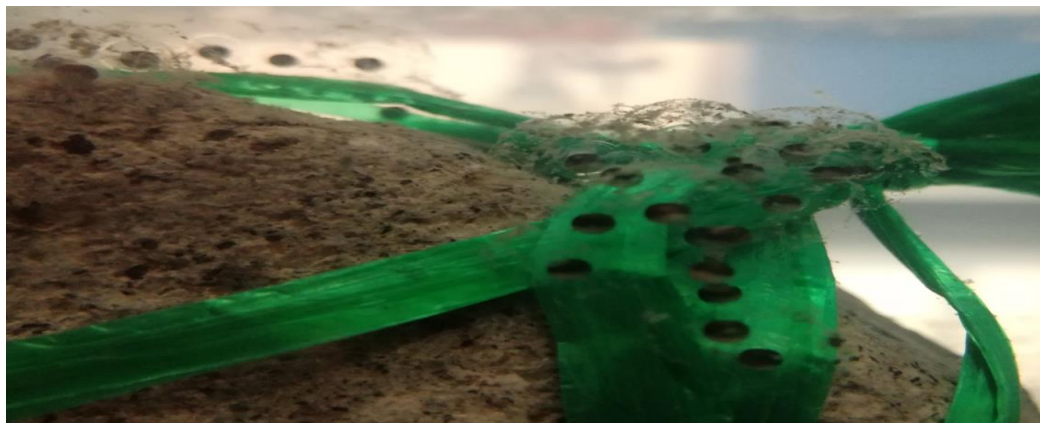


Fig. 10. Desove depositado sobre el sustrato artificial y obtenidos de las parejas de *Ambystoma mexicanum* inducidas con la hormona hCG. Fotografía de José Torres

Respecto al seguimiento del desarrollo embrionario, los desoves se monitorearon diariamente para observar la aparición de las diversas etapas del desarrollo hasta emerger las crías de manera independiente, para el cual solo se tomó en cuenta un sólo tratamiento a una temperatura de 20 °C \pm 1 °C con tres réplicas de las mismas condiciones, se retiraron de cada desove un total de 80 huevos, los cuales fueron colocados en peceras independientes y la temperatura del agua fue aumentada en 1 °C por hora dentro de un baño María (Fig. 11) hasta elevar la temperatura

ambiente a 20 °C previamente se tenían tres peceras de 10 L a la temperatura requerida.



Fig. 11. “Baño María” para elevar la temperatura de los tratamientos a 20 °C ± 1 °C.

Fotografía de José Torres

Se fijaron diariamente tres muestras de huevecillos por cada tratamiento, en una solución de formol al 4% amortiguado con buffer fosfato (pH 7.2), se anotó la fecha y la hora en que fueron fijados para conocer el tiempo posterior a la ovoposición. La temperatura en cada condición fue controlada por medio de un calentador con termostato marca Thermojet, al cual se le ajustó la temperatura requerida y esta fue medida todos los días.

Al obtenerse todas las muestras de desarrollo embrionario, estas fueron clasificadas y organizadas de acuerdo al tiempo posterior del desove. Se trasladaron las muestras al laboratorio de Microcine de la Facultad de Ciencias, UNAM, donde se acondicionó un recipiente de vidrio dividido en sub cámaras, dentro de éste, cada huevecillo fue lavado con agua destilada para retirar la solución de formol. Posteriormente fueron observadas en un microscopio estereoscópico (Stemi SV 6), el recipiente fue colocado sobre 4 tapones para evitar el movimiento y se utilizó un fondo azul para la toma de fotografías digitales con una cámara marca Canon modelo Rebel T6 (Fig. 12) con el objetivo de reconocer y describir las características de cada etapa de desarrollo y compararlas con trabajos previos.

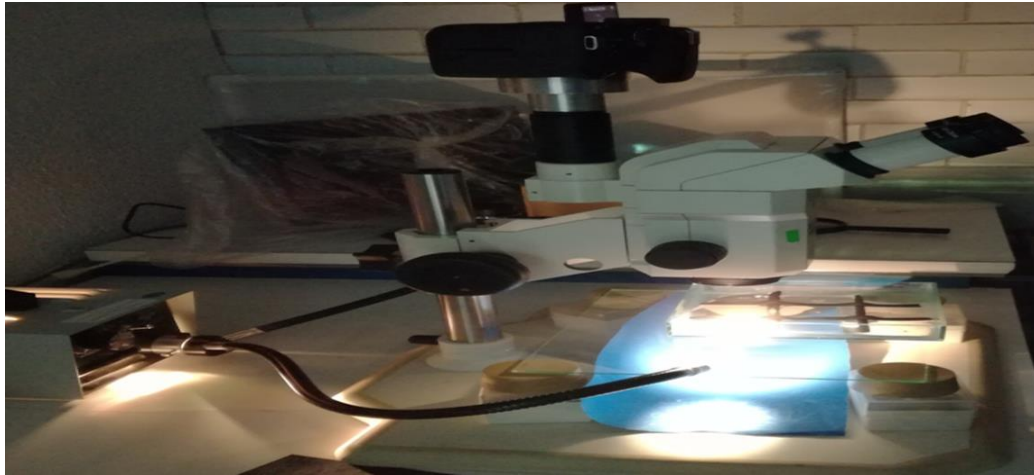


Fig. 12. Toma de fotografías digitales en el laboratorio de Microcine. Fotografía de José Torres

Con el objetivo de determinar el efecto de la temperatura sobre el desarrollo embrionario, se calculó el Q_{10} por medio de la siguiente ecuación (Lampert, 1984).

$$Q_{10} = (R_2/R_1)^{(10/T_2 - T_1)}$$

Dónde:

Q_{10} = Efecto del cambio de la temperatura sobre el tiempo del avivamiento de la cría en un intervalo de temperatura dado.

R_1 = Tiempo en alcanzar avivamiento de la cría a la temperatura menor.

R_2 = Tiempo en alcanzar avivamiento de la cría a la temperatura mayor.

T_1 = Temperatura baja (13.7 °C).

T_2 = Temperatura alta (20 °C).

6.4 Preferencia de alimento y contenido calórico

Todas las crías fueron puestas en ayunas durante un periodo de 24 horas, y se puso a eclosionar quiste de artemia (*Artemia* sp.) durante 48 horas, la pulga de agua (*Daphnia* sp.) se obtuvo de forma comercial y se lavó antes de realizar el experimento.

En cámaras de 10 ml se aislaron de manera individual y de forma aleatoria 25 crías repartidas en 4 tratamientos con tres réplicas cada uno (Fig.13). Al primer

tratamiento (A:P, 10:0) se le agregó 10 nauplios de *Artemia*, al segundo tratamiento (A:P, 0:10) se agregó 10 pulgas, el tercer tratamiento (A:P, 5:5) se le agregó 5 nauplios de *Artemia* y 5 pulgas y por último al cuarto tratamiento (A:P, 10:10) se le agregó 10 nauplios de *Artemia* y 10 pulgas. Pasada una hora en la cuales se alimentaron las crías, fueron retiradas de sus respectivas cámaras y se hizo un conteo del alimento restante.



Fig. 13. Aislamiento de las crías de *Ambystoma mexicanum* en cámaras de 10ml. Fotografía de José Torres

Respecto a la determinación de calorías contenidas en el alimento y las crías, se tomaron de forma aleatoria dos muestras del alimento consumido por las crías; para el caso de *Daphnia* sp. se pusieron a secar 10 g en peso húmedo en una estufa a 60 °C hasta alcanzar un peso constante, al obtener dicho peso las muestras fueron trasladadas a un desecador por 24 h, se molieron y se obtuvieron sub-muestras de 50 mg para ser empleadas en los análisis calóricos.

El contenido de energía tanto de las muestras de alimento como el de las crías fue determinado a partir de calorimetría directa realizando un excavado en pastillas de ácido benzoico grado calorífico y colocando las sub-muestras dentro de la pastilla para realizar la combustión en una bomba calorimétrica *Parr*, la cual fue calibrada previamente (Latournerie, 2007).

6.5 Procesamiento y análisis de datos

Para el análisis de los parámetros fisicoquímicos de la calidad del agua del periodo de aclimatación de los organismos, la fase experimental de inducción hormonal y el efecto de la temperatura en el desarrollo embrionario, se realizaron ANOVAS univariados y multivariados para conocer si existían diferencias significativas entre los distintos tratamientos experimentales y a lo largo del tiempo.

Para determinar si existían diferencias significativas entre las variables biométricas de los organismos, se empleó la prueba de T *Student*, a un nivel de $\alpha = 0.05$, de tal forma que permitiera comparar dichos datos entre ambos sexos.

Se empleó análisis discriminante para la comparación entre tratamientos en el ensayo de selección de alimento y una prueba post hoc de Tukey para establecer si existían diferencias estadísticamente significativas. De igual forma, se llevó a cabo un análisis discriminante que permitiera distinguir grupos entre los diversos tratamientos

El procesamiento de datos fue llevado a cabo empleando los paquetes estadísticos SPSS v.20 y JMP v.10

7. RESULTADOS

7.1 Análisis de calidad del agua

En el Cuadro 4 se muestran los promedios de los datos de la calidad del agua.

Cuadro 4. Resultados del análisis de varianza de los parámetros físico-químicos del agua medidos durante la fase de inducción hormonal en *Ambystoma mexicanum*.

Factor	N	Media ± D. E	F	gl	p
Temperatura (°C)	67	15.5 ± 1.5	0.133	16	1.0
pH	67	8.35 ± 0.11	0.891	16	0.584
Conductividad (µS)	67	517.1 ± 40.5	1.428	16	0.176
Sólidos Totales (ppm)	67	369.6 ± 11.4	1.057	16	0.423
Oxígeno (mg/l)	67	7.1 ± 0.6	1.719	16	0.081

El análisis de varianza multifactorial (ANOVA) mostró que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ni en la interacción tratamiento-semana para todos los factores medidos ($p > 0.05$).

7.2 Morfometrías

La proporción de sexos fue 1:1 para hembras y machos siendo un total de 10 organismos, (5 parejas) se muestran los promedios de cada variable biométrica en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Indicadores morfométricos de *Ambystoma mexicanum* previo a la inducción hormonal.

Sexo	N	LT (cm)	LHC (cm)	PH (g)
Macho	5	18.64 ± 1.19	10.28 ± 0.89	43.36 ± 3.41
Hembra	5	17.54 ± 0.93	10.12 ± 0.66	44.27 ± 8.27

El ANOVA de una vía para evaluar las medidas morfométricas entre machos y hembras no mostró diferencias significativas para ningún factor, ($F = 2.088$, $gl = 1$, $p = 0.052$) de tal forma que todos los organismos presentaban homogeneidad respecto a su talla y peso, aunque cabe mencionar que los machos fueron ligeramente más largos con una longitud promedio de 18.64 cm respecto a las hembras que midieron 17.54 cm, pero respecto al peso, las hembras presentaron un promedio de 44.27 g, valor ligeramente superior al de los machos que pesaron en promedio 43.36 g. Esto permitió la asignación aleatoria de los organismos a los tratamientos durante la fase experimental.

7.3 Respuesta a la inducción hormonal

A continuación, se presenta en el Cuadro 6, el número total de huevos producidos por pareja como parte de la respuesta de los organismos a la inducción hormonal. Se presenta una pareja por tratamiento de 200 UI (H-D1), 400 UI (H-D2) y por último el control (Ctrl), debido a que hubo el deceso de dos parejas, una correspondiente al tratamiento de 200 UI y otra de 400 UI.

Se llevó a cabo un contraste entre los tratamientos sobre una hipótesis de no diferencia en el desove, el cual indicó que fue estadísticamente significativa ($X^2_c = 36.28$, $p < 0.001$), indicando que el tratamiento con 200 UI obtuvo los mejores resultados, con un 25.2% más de eficiencia que el control.

Cuadro 6. Número total de huevos ovopositados por las parejas de *Ambystoma mexicanum* en respuesta a la inducción de la reproducción, empleando hCG.

Tratamiento	Número total de huevos
H-D1	472
H-D2	338
Ctrl	321

Se hizo un conteo del número de huevos eclosionados a través del tiempo para cada tratamiento (200 UI, 400 UI y control), los cuales están reportados en el Cuadro 7. A temperatura ambiente de 15.4 °C, no se obtuvieron huevos

eclosionados los primeros 5 días, finalizando el conteo de las puestas al día 11, obteniéndose en total 104 huevos eclosionados para el tratamiento de 200 UI, 98 para el de 400 UI y 313 para el control.

Cuadro 7. Resultados de la inducción hormonal en *Ambystoma mexicanum*, empleando hCG. Conteo acumulativo del número de huevos eclosionados a temperatura ambiente (15.4 °C) a través del tiempo. hCG = gonadotropina coriónica humana. UI = unidades internacionales de hormona. HE = número de huevos eclosionados. HT = número de huevos totales por tratamiento – día.

TRATAMIENTO Tiempo (días)	Control		hCG – 200 UI		hCG – 400 UI	
	HE	HT	HE	HT	HE	HT
5	0	0	0	0	0	0
6	3	3	0	0	5	5
7	6	9	3	3	7	12
8	13	22	9	12	8	20
9	29	51	18	30	30	50
10	262	313	74	104	48	98
11	0	313	0	104	0	98

En el caso de la sub-muestra tomada del stock total de huevos ovopositados, y expuestos a 20 °C, se puede observar en el Cuadro 8 el número de huevos eclosionados desde el día 1 y el conteo final al día 6, alcanzándose un total de 48 huevos eclosionados para el tratamiento de 200 UI, 49 para el de 400 UI y 3 para el control.

Cuadro 8. Producción de huevos por *Ambystoma mexicanum* en los tratamientos control y con hormona a 20 °C. hCG = gonadotropina coriónica humana. UI = unidades internacionales de hormona. HE = número de huevos eclosionados. HT = número de huevos totales por tratamiento – día.

TRATAMIENTO Tiempo (días)	Control		hCG – 200 UI		hCG – 400 UI	
	HE	HT	HE	HT	HE	HT
1	0	0	0	0	5	5
2	0	0	7	12	12	12
3	0	0	10	22	7	19
4	0	0	8	30	5	24
5	0	0	2	32	6	30
6	3	3	16	48	19	49

A continuación, se presenta un gráfico comparativo del porcentaje de eclosión de huevos de los diversos tratamientos de inducción hormonal (Fig. 14). Los resultados muestran un porcentaje mayor del número de huevos eclosionados respecto al tiempo a una temperatura de 20 °C (B) en comparación del tiempo de eclosión a una temperatura ambiente de 15.4 °C (A).

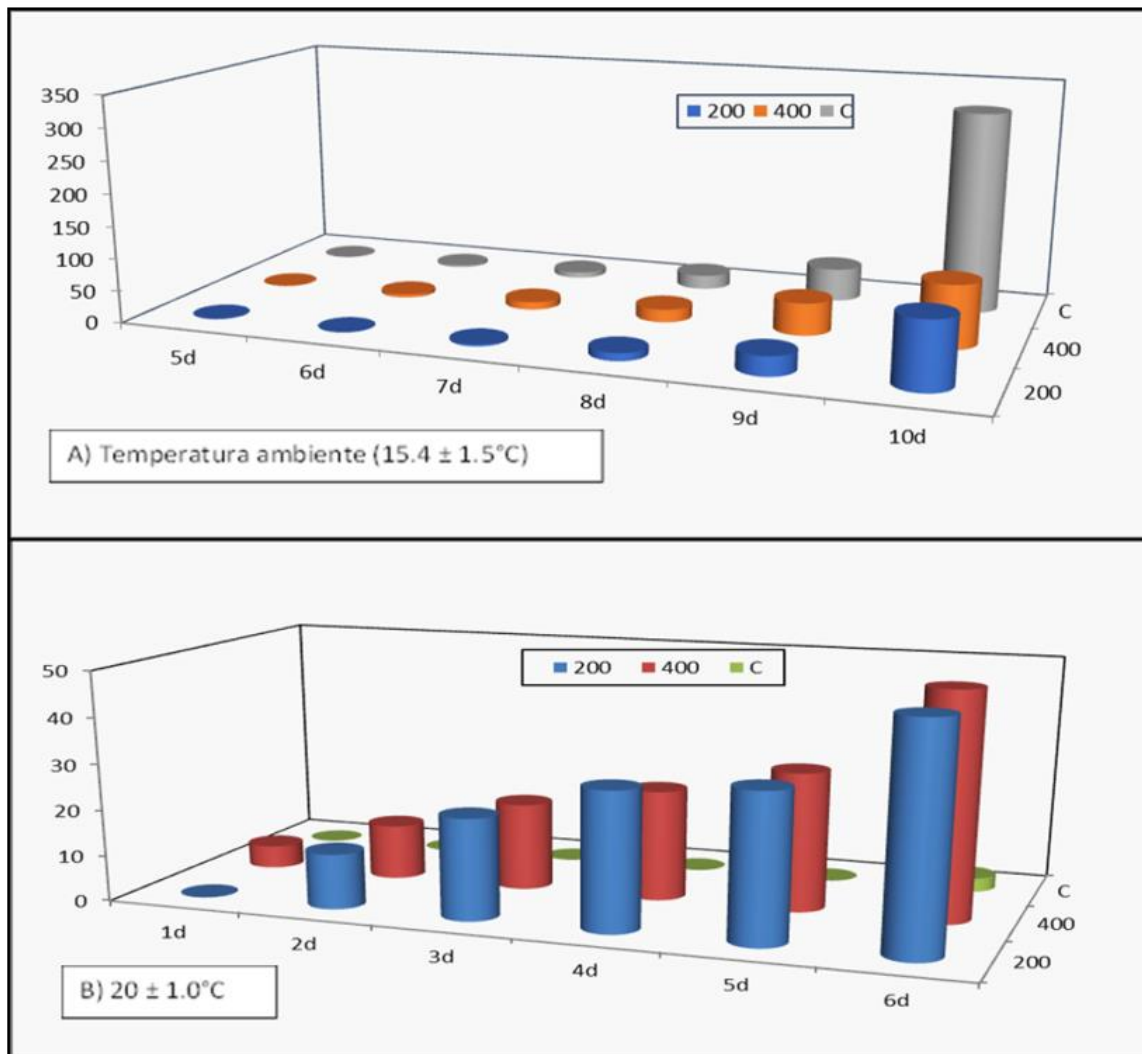
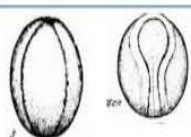
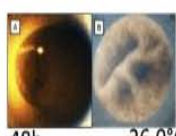



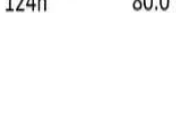


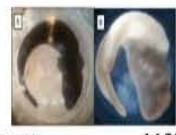
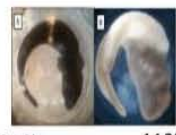


Fig. 14. Comparación del porcentaje de eclosión de huevos de *Ambystoma mexicanum* empleando diversas concentraciones de hCG a dos temperaturas.






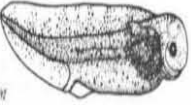








7.4 Seguimiento del desarrollo embrionario

La temperatura durante el desarrollo embrionario dentro de las primeras 48 horas se inició a 15.5 °C y posteriormente fue constante a 20 °C hasta el final del ensayo debido al aumento progresivo de la temperatura (Baño María) para poder llevar a cabo el experimento. Como parte del mismo, se evaluó la influencia de la temperatura sobre el desarrollo embrionario a través del Q₁₀ el cual, en este caso nos permitió conocer si la temperatura tiene un efecto directo sobre la aceleración del desarrollo, (Cuadros 9 y 10) obteniéndose un valor de 1.71 indicando un aumento positivo sobre dicho proceso y acortando el tiempo desde la puesta hasta la eclosión de la cría en casi un 30%.

Cuadro 9. Comparativo del desarrollo embrionario del presente estudio (primeras 214 horas a 20°C) y su relación con los °C/día acumulados. Asimismo, se muestran los resultados obtenidos por Bordzilovskaya (1979) y Morales-Cervantes (2017). H-D1= Dosis 1 (200 UI). H-D2= Dosis 2 (400 UI).

PRESENTE ESTUDIO				Morales-Cervantes, 2017	Bordzilovska, 1979	OBSERVACIONES	
H-D1		20°C	H-D2		13.7±0.9°C		20°C
Tiempo h	°C Acum.	Tiempo h	°C Acum.				
24h	12.8°C	24h	13.1°C			<ol style="list-style-type: none"> 8 células. La placa neural tiene forma de escudo y se hunde. 	
48h	25.7°C	48h	25.7°C			<ol style="list-style-type: none"> Blástula temprana. Abortivo 	
117h	66.1°C					<ol style="list-style-type: none"> Se distinguen vesículas oculares. Sin muestra 	
141h	87.4°C	141h	89.6°C	124h	80.0°C		<ol style="list-style-type: none"> La aleta dorsal comienza a observarse. La región branquial está claramente delineada.
165h	108.4°C	165h	109.5°C				<ol style="list-style-type: none"> En la región cefálica se presentan tres nódulos branquiales. Aparece un surco en la región del primordio de los ojos.
189h	129.4°C	189h	129.4°C				<ol style="list-style-type: none"> Abortiva Aparecen los primeros cromatóforos.
214h	149.7°C	214h	149.3°C		118°C		<ol style="list-style-type: none"> Las branquias se alargan y se empujan. Todavía no se ven brotes de extremidades.

Cuadro 10. Comparativo del desarrollo embrionario del presente estudio (últimas 96 horas a 20°C) y su relación con los °C/día acumulados. Asimismo, se muestran los resultados obtenidos por Bordzilovskaya (1979) y Morales-Cervantes (2017). H-D1= Dosis 1 (200 UI). H-D2= Dosis 2 (400 UI).

PRESENTE ESTUDIO				Morales-Cervantes, 2017	Bordzilovska, 1979	OBSERVACIONES	
H - D1		20°C	H - D2				
Tiempo h	°C Acum.		Tiempo h	°C Acum.	13.7±0.9°C	20°C	
248h	211.3°C		248h	209.1°C			<ol style="list-style-type: none"> Las primeras branquias tienen brotes de filamentos. Abortiva.
272h	232.3°C		272h	229.1°C			<ol style="list-style-type: none"> Las branquias son más largas. La cantidad de filamentos aumenta.
296h	252.7°C						<ol style="list-style-type: none"> La boca está claramente delineada. La eclosión comienza. Sin muestra.
320h	273.1°C						<ol style="list-style-type: none"> Abortiva Sin muestra.
344h	293.1°C		344h	288.4°C			<ol style="list-style-type: none"> Las branquias se extienden mucho más allá de los brotes de las extremidades anteriores. Alevín después de la eclosión.
							<p>Rango térmico: 13.7-20°C</p> <p>Q10: 1.71</p> <p>Tiempo de desarrollo: 71.5%</p>

7.6 Preferencia de alimento

Se llevó a cabo un ensayo de preferencia de alimento en crías de *A. mexicanum*, con cuatro tratamientos y tres réplicas cada uno; el cuadro 11 señala las proporciones de *Artemia* (A) y *Daphnia* (P) empleadas en los ensayos. En la figura 15 se puede observar que hay una mayor ingesta en el tratamiento basado en *Artemia* sp. (10:10) aunque también se sabe que conforme los organismos crecen, estos aceptan alimento de mayor tamaño.

Cuadro 11. Consumo de alimento por crías de *Ambystoma mexicanum*. A = *Artemia* sp. P = *Daphnia* sp. Letras distintas como superíndices, indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos, post hoc de Tukey).

Tratamiento	N	Número de artemias o pulgas consumidas
		Media \pm DE
A:P (10:0)	3	9.0 ^a \pm 1.0
A:P (0:10)	3	3.3 ^b \pm 1.52
A:P (5:5)	3	6.0 ^b \pm 2.64
A:P (10:10)	3	10.0 ^a \pm 1.73

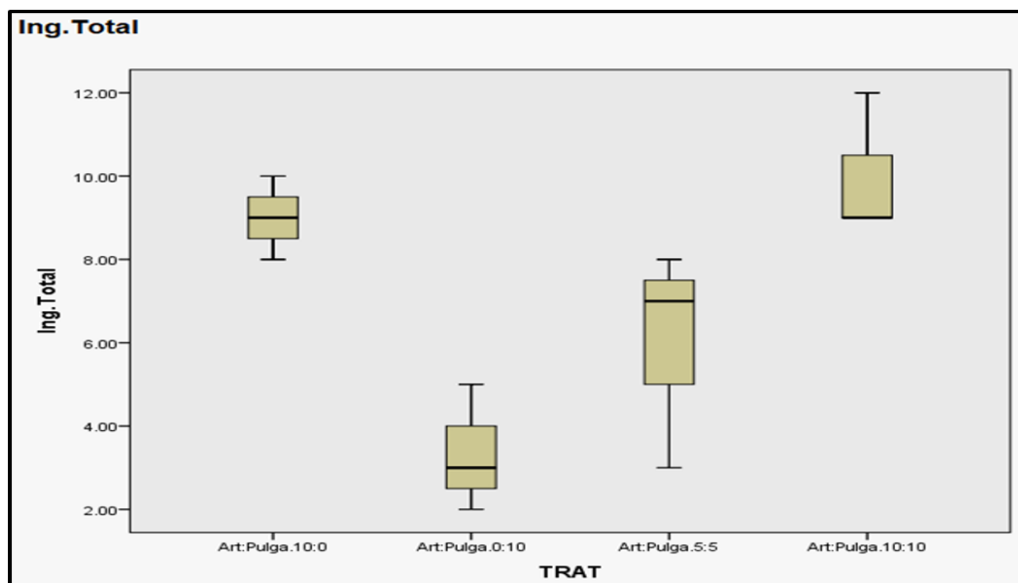


Fig. 15. Diagramas de caja de preferencia alimenticia de crías de *Ambystoma mexicanum* alimentadas con *Artemia* sp. y *Daphnia* sp. Notación: Ing. Total= Ingesta total y Trat= tratamientos.

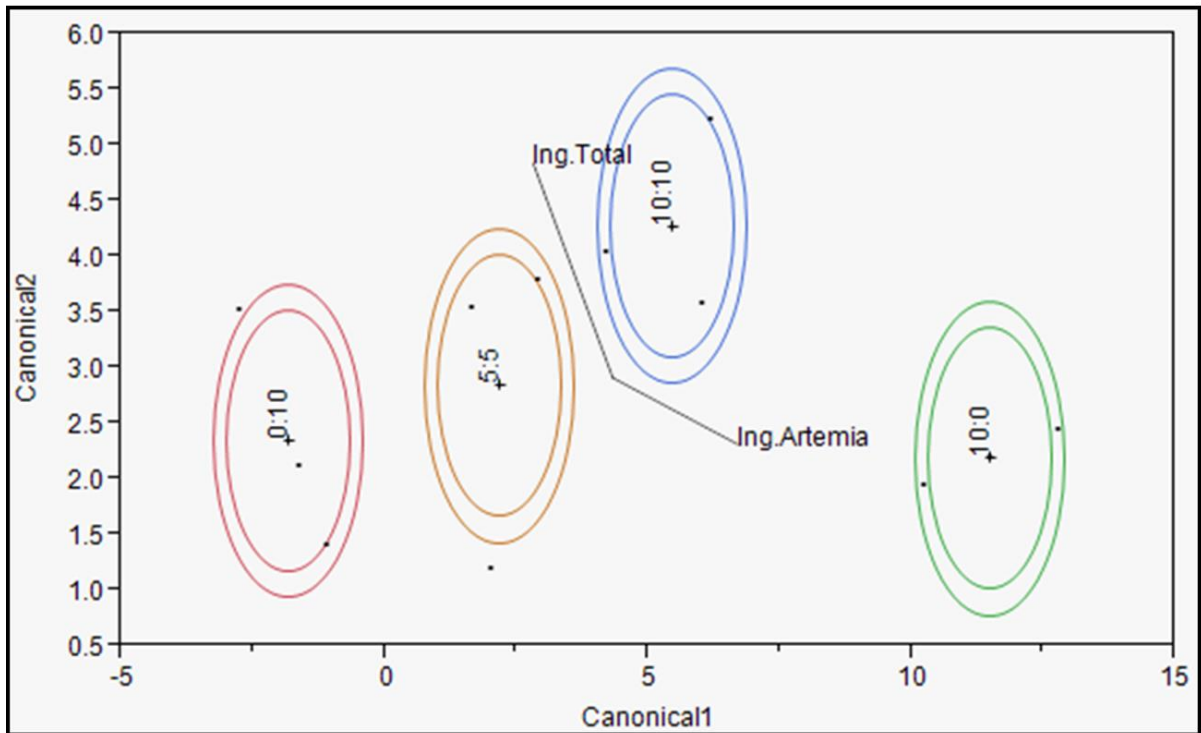


Fig. 16. Análisis discriminante por tratamiento señalando la ingesta de dos fuentes de alimento por crías de *Ambystoma mexicanum*.

El análisis discriminante (Fig. 16) muestra diferencias estadísticamente significativas para todos los tratamientos ($p < 0.05$), la ingesta de *Artemia* fue el factor con mayor influencia para la discriminación de todos los ensayos efectuados ($p < 0.0001$).

8.6 Análisis calóricos

Tomando en cuenta que un elemento central para el mantenimiento en cautiverio de crías de *A. mexicanum* es la alimentación en sus primeras etapas de vida, se realizó un análisis calórico de los alimentos ofrecidos en cautiverio con la finalidad de evaluar su aporte energético en la dieta, los datos se reportan en el Cuadro 12.

Cuadro 12. Contenido calórico de diversos alimentos y el tejido de crías de *Ambystoma mexicanum* expresadas en calorías por gramo de peso seco (Cal/g PS).

Tipo de tejido	N	(Media ± D.E) Cal/g PS
<i>Artemia</i> sp.	-	6,737 ± 863*
<i>Daphnia</i> sp.	3	7,372 ± 1619
Cría <i>A. mexicanum</i>	2	12,200 ± 40.6

*Tomado de Cummings (1967).

A partir de los ensayos de preferencia alimentaria, el peso corporal de las crías empleadas, así como la composición del tejido de *A. mexicanum* y su contenido de energía, es posible estimar sus requerimientos calóricos/día en la dieta para esta etapa de desarrollo, los datos se presentan en el Cuadro 13.

Cuadro 13. Composición corporal, valor calórico y requerimientos de energía de crías de *A. mexicanum* a dos temperaturas. CE (contenido de energía), NR (nivel de ración), calculado como 10% del peso corporal/ejemplar/día (Fioranelli *et al.*, 2005), el valor de NR a 20 °C se calculó empleando un $Q_{10}=1.71$, obtenido en esta investigación.

Índice	Valor del índice
Peso húmedo, mg	16.9
Peso seco, mg	0.11
CE/ejemplar promedio, cal	1,324.9
NR Cal/ejemplar/día (15°C)	132.5
NR Cal/ejemplar/día (20°C)	226.6

8. DISCUSIÓN

8.1 Calidad del agua

La calidad del agua puede ser un factor que genere enfermedades en las especies de ajolotes (Duhon, 1989) e influir directamente en procesos físico, químicos y biológicos tanto extrínsecos como intrínsecos de las especies acuáticas, por lo que monitorear los parámetros físico-químicos del agua es de gran importancia, pues en el caso particular de *A. mexicanum*, éste se considera una especie 100% acuática.

Ahora bien, debido a la escasez de datos, muchas de las instituciones que mantienen a esta especie en cautiverio se han basado en características similares a las que requieren los peces de acuario de agua dulce, haciendo algunas modificaciones a temperatura, salinidad y algunos otros factores (Scott, 1995). Hasta la fecha no existe un estudio que realmente refleje las características óptimas respecto a la calidad del agua para el mantenimiento en cautiverio del ajolote.

Los parámetros físico-químicos medidos durante la etapa experimental y sus valores promedio en este estudio fueron: temperatura (15.5 °C), pH (8.35), conductividad (517.1 µS), sólidos totales (369.6 ppm) y oxígeno disuelto (7.1 mg O₂/L), los cuales indican que la calidad del agua se puede considerar adecuada para el mantenimiento de los organismos en la presente investigación.

Respecto a las pruebas estadísticas, estas señalaron que no hubo diferencias significativas entre los factores medidos durante la fase experimental ($p > 0.05$) por lo que podemos asegurar que los diversos tratamientos ensayados, mantuvieron condiciones similares en la calidad del agua.

8.2 Morfometrías

El ANOVA para los valores morfométricos no mostró diferencias significativas para LT y LHC de los machos con respecto a las hembras, pero a pesar de que la prueba estadística no muestra diferencias, se puede observar en los datos una ligera

tendencia hacia el mayor tamaño de los machos, siendo ésta de 18.64 cm (LT) y de 17.54cm (LT) para hembras. Ésta característica se puede deber a que los machos deben tener mayor capacidad para agredir otros machos y competir por la adquisición de pareja, debido a que las hembras invierten más recursos que los machos en cada cría y el cortejo, y el comportamiento copulador del macho está dirigido en gran medida a la competencia por la hembra (Davies *et al.*, 2012). En especies como *A. granulorum* y *A. lermaense* se ha observado también esta tendencia (Aguilar-Miguel *et al.*, 2009).

Respecto al peso húmedo (PH), las hembras presentaron una ligera tendencia a un mayor peso, siendo este de 44.27 g respecto a los machos de 43.36 g en promedio, muy probablemente lo anterior se deba a la acumulación de ovocitos vitelogénicos (Aguilar-Miguel *et al.*, 2009) aunque también se podría considerar que se encuentra influenciada por la ingesta de alimento, pero esta fue constante y las raciones fueron las mismas tanto para hembras como para machos durante todo el tiempo de aclimatación y fase experimental por lo que este último factor no pudo haber influido en el peso. A pesar de lo anterior, el ANOVA no mostró diferencias significativas para esta característica ($F = 2.088$, $gl = 1$, $p = 0.052$) para PH, en el contraste entre sexos.

Las biometrías y la descripción morfológica permitieron identificar y diferenciar a hembras de machos, siendo estos últimos los que presentaban un ensanchamiento a nivel de la cloaca que se debe a la presencia de una glándula agrandada que produce gelatina para empaquetar y proteger su esperma. Las hembras poseen esta glándula, pero carecen de la hinchazón (Gresens, 2004), estas características también permitieron apreciar que los organismos se encontraban sexualmente maduros.

Mena-González y Montes de Oca (2014), en su manual de procedimientos para el manejo y mantenimiento de ajolotes recomiendan que al realizar la selección de reproductores es importante considerar la utilización de hembras de un año de edad con una talla a partir de los 21 cm, de preferencia que no hayan ovopositado y que presenten el abdomen abultado. Para los machos mencionan que estos deberán tener una talla de 23 cm y un año de edad. Los organismos utilizados para el

procedimiento hormonal evidentemente se encuentran por debajo de las tallas mencionadas, debido a las condiciones previas de confinamiento: limitación de alimento y densidad alta, condiciones de la colonia de donde provenían. No obstante, al momento de la fase experimental, ya tenían un año de edad, y a pesar de la limitación en talla y peso, se obtuvo una respuesta positiva tanto para la inducción como para la reproducción y obtención de crías.

8.3 Inducción hormonal

A pesar de que los reportes en anfibios son escasos, en particular para *A. mexicanum*, y debido a la casi inexistencia de trabajos con respecto a la utilización de hCG (Hormona Gonadotrofina Coriónica Humana) como agente inductor, este estudio se basó en el trabajo previo de Trottier y Armstrong (1975), para la inducción hormonal como estrategia de reproducción en cautiverio. Existe una controversia sobre el tratamiento a los machos, algunos autores mencionan que no se les debe estimular con hormona, otros que sólo deben colocarse en agua fría y en otras investigaciones proponen el usar la misma dosis que la aplicada en hembras (Duhon, 1994), este último criterio fue el que se tomó para el experimento.

La respuesta a la inducción hormonal con hCG en los ajolotes fue positiva para los dos tratamientos (400 y 200 UI) ya que la reproducción se llevó a cabo en los dos tratamientos incluyendo el grupo control. Además, se observó la producción de espermátóforos en todas las parejas y conductas de cortejo, aunque estos últimos dos aspectos no se tuvieron bajo observación continua. Se logró la obtención de tres puestas (200 UI, 400UI y control) para el caso de los tratamientos con inducción hormonal, la puesta se observó dos días después de la inducción y para el grupo control se observó hasta el quinto día. Con respecto al número de huevecillos, el conteo varió entre tratamiento, comenzando el conteo los primeros 5 días y finalizando el conteo de las puestas al día 11, obteniéndose en total 472 huevos para el tratamiento de 200 UI, 338 para el de 400 UI y para el control 321 de los cuales se tomaron sub-muestras para el experimento de eclosión a dos diferentes regímenes de temperatura. La estimulación hormonal con hCG y la respuesta a la reproducción corresponden a la activación del ciclo hormonal conocido en anuros (McCreery y Linch, 1982).

La función de las gonadotropinas hipofisarias (LH y FSH) ha sido estudiada en la mayoría de los vertebrados, permitiendo señalar que los principales procesos están involucrados en el control de la gametogénesis, así como en numerosas funciones endócrinas relacionadas con las gónadas y el comportamiento sexual, tanto en machos como hembras (Volonteri, 2014). Asimismo, la hCG también actúa en la gametogénesis; ovogénesis y espermatogénesis (Norris y López, 2011). Además, en estudios realizados en *R. arenarum* se observó que la reproducción puede ser desencadenada en mayor o menor medida por cualquiera de las dos gonadotropinas e incluso por hCG (Volonteri y Ceballos, 2010), proceso vinculado a la activación del mecanismo de acción hormonal y siguiendo el eje HHG (Hipotálamo-hipófisis-gonadal), por lo tanto la administración de la Hormona Gonadotropina Coriónica Humana desencadena una serie de reacciones que llevaron a la producción de gonadotrofinas que a su vez estimulan la reproducción (Del Pino, 1983).

8.4 Desarrollo embrionario

En relación al desarrollo embrionario, los anfibios son organismos particularmente útiles para análisis embriológicos porque los huevecillos y los embriones tempranos pueden tolerar una amplia variedad de manipulaciones (Malacinski y Chung, 1977). Además, una de las características más sorprendentes de dichos organismos incluyendo el ajolote de Xochimilco, es el hecho de que los huevos son transparentes y es posible observar el desarrollo embrionario. Los huevos constan de tres capas y son permeables, por lo que son sensibles a las sustancias disueltas en el agua (Servín, 2011).

Con la finalidad de contrastar los resultados del presente estudio, con otros de la literatura en relación a los estadios de desarrollo de *A. mexicanum* desde la puesta hasta el avivamiento de la cría, se presentan los cuadros comparativos (Cuadros 9 y 10). Ahora bien, con respecto al tiempo de duración del desarrollo embrionario, en el presente trabajo se compararon los datos registrados por Bordzilovskaya *et al.* (1979) la cual obtuvo, a una temperatura de 20 °C, un desarrollo embrionario hasta la eclosión de la cría (estadio 43) en 342 horas, el cual es muy similar a las 344

horas y 288 °C/día acumulados que se obtuvieron en este proyecto para llegar a la etapa de eclosión, aunque los huevos se mantuvieron a una temperatura de 20 °C, cabe resaltar que en las primeras 48 horas después de la ovoposición, los huevecillos se mantuvieron a temperatura ambiente y posteriormente ésta se elevó hasta mantenerla constante a la temperatura de 20 °C. Para el caso de Morales-Cervantes (2017) los organismos requirieron un periodo de 528 horas y 302 °C/día acumulados para llegar a la etapa de eclosión, debido a que los huevecillos estuvieron sometidos a una temperatura ambiente promedio de 13.7 °C, evidenciando la aceleración de la fase embrionaria a mayor temperatura.

La duración del desarrollo embrionario y larvario es específica de cada especie y está modificada por factores ambientales como la incidencia de luz, temperatura del agua, alimento, grosor de las larvas, química del agua, entre otros (Cruz-Rodríguez, 2015). Además, Voss (1993) menciona que la temperatura influye también en el tamaño corporal, a temperaturas altas las crías emergen con menor tamaño en comparación con las que emergen a menor temperatura, del mismo modo el tiempo de eclosión se afecta pues en dicho momento los embriones liberan enzimas para liberarse de su cubierta y a altas temperaturas, la actividad enzimática es mayor y la eclosión se acelera, lo cual concuerda con los objetivos planteados ya que hubo un acortamiento en el tiempo de desarrollo de casi el 30% ($Q_{10} = 1.71$) a una temperatura de 20 °C con respecto a la temperatura ambiente encontrado en trabajos previos. La actividad biológica aproximadamente se duplica cada 10°C (Ley del Q_{10}) y, por lo tanto, aumentará con el incremento de la temperatura hasta un cierto límite, después del cual se reducirá.

El tiempo de incubación de los huevos de *A. mexicanum* normalmente oscila entre los 12 y los 18 días (Mena-González y Montes de Oca, 2014). Estrada-Romero (2015) obtuvo crías en 15 días con una temperatura entre 17°C y 19°C. Servín (2011) reportó un promedio de 12 días a 22 °C y de 16 días a una temperatura de 15 °C, siendo este el menor de los estudios revisados. Morales-Cervantes (2017) registró el tiempo de eclosión en un periodo de 22 días a 14 °C, mientras que Bordzilovskaya *et al.* (1979) y en el presente estudio se registró la presencia de crías a los 14 días, en huevos mantenidos a una temperatura constante de 20 °C. En el manejo acuícola de las especies, la obtención de crías es importante para

cualquier proyecto y es preferible que sea en corto tiempo. En éste trabajo se confirmó el efecto de la temperatura sobre la velocidad de desarrollo embrionario. Hacen falta más estudios para determinar si las crías que se desarrollan a diferentes temperaturas tienen la misma capacidad para sobrevivir y reproducirse, ya que ha menor temperatura nacen crías más grandes (Voss, 1993).

8.5 Contenido calórico y ración de mantenimiento

La bioenergética es el estudio del balance entre el aporte de energía dietario, su inversión en costos de mantenimiento corporal y su canalización hacia crecimiento y reproducción entre otros procesos, y requiere de un examen de los procesos fisiológicos por los cuales la energía es transformada en organismos vivos (Young y Bureau, 1996). Sin embargo, en la literatura, estudios sobre este campo y en particular, la determinación de contenido energético para *A. mexicanum* no han sido realizados con anterioridad, por lo que los resultados obtenidos en el presente estudio no pudieron compararse con trabajos previos y pueden considerarse como información de línea base para estudios posteriores.

Se cuantificó el contenido energético promedio de crías de ajolote. Una cría con un peso seco de 0.1086 g, contiene 1325 calorías. Se conoce que el contenido calórico puede variar intra-específicamente con la etapa de la historia de vida, el sexo y el régimen de alimentación (Griffiths, 1977). Asumiendo que para especies de anfibios la ración debe ser alrededor del 10% del peso corporal/ejemplar/día en su primera etapa de crecimiento (Fioranelli *et al.*, 2005), el requerimiento energético de crías de 0.1086 g debe ser de 132.5 cal/ejemplar/día a una temperatura de 15 °C y se extrapoló para una temperatura de 20 °C empleando un Q_{10} de 1.71, siendo ésta 226.6 cal/ejemplar/día.

Latournerié-Cervera *et al.* (2008) mencionan que las raciones de manutención representan la cantidad de energía mínima que el organismo deberá ingerir para mantener su biomasa corporal y valores superiores a ésta promoverán el crecimiento de los organismos, por lo que el cálculo de la ración de mantenimiento se realizó con el objetivo de establecer una dieta mixta conociendo el aporte energético del alimento aportado por *Daphnia* y *Artemia* (véase Cuadro 13). Cabe

señalar, que es necesario el entendimiento y el estudio de la bioenergética de cualquier animal, como base para proveer un régimen dietario definido y adecuadamente balanceado bajo cualquier ambiente físico particular (Young y Bureau, 1995).

9. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Conclusiones

- La Hormona Gonadotropina Coriónica Humana y su administración a dosis de 200 y 400 UI con un refuerzo del 50% en 48 horas fue eficaz para la inducción de la reproducción en condiciones de laboratorio de *A. mexicanum*. Los resultados que se presentan, corresponden a un estudio preliminar.
- Asimismo, en presencia de estimulación hormonal, los datos indican que una dosificación de 200 UI con su respectivo refuerzo, resultó más eficaz en el éxito reproductivo en comparación a 400 UI ($p < 0.001$) de acuerdo al número de huevos obtenidos por cada pareja.
- El incremento de la temperatura de 15.4 °C a 20 °C acelera el desarrollo embrionario, induciendo la eclosión en un lapso más breve.
- La comparación de las distintas etapas de desarrollo embrionario, así como la descripción de cada estadio obtenidas en el presente estudio fueron muy similares a las registradas por Bordzilovskaya et al. en 1989.
- Las crías de ajolote requieren un nivel de ración de mantenimiento de 132.5 cal/ejemplar/día a una temperatura promedio de 15 °C, mientras que a 20 °C se recomienda una ración de 226.6 cal/ejemplar/día pues a mayor temperatura, mayor gasto energético.
- Para mantener sus funciones básicas se puede formular una dieta aportada por *Daphnia*, y nauplios de *Artemia* a una ración del 10% de su biomasa corporal durante las primeras etapas de vida.

Perspectivas

- Se sugiere replicar el protocolo hormonal con un mayor número de parejas y en distintas épocas del año para corroborar los resultados de la inducción en distintos meses y con otras dosificaciones, por ejemplo, 300 UI.
- Para mejorar el éxito reproductivo de *A. mexicanum*, se podría utilizar organismos de tallas y pesos mayores a los utilizados en este trabajo ya que los organismos de la presente investigación se encontraban por debajo de las tallas y el peso que se recomienda para llevar a cabo la reproducción.
- Es de suma importancia realizar estudios con un enfoque ecofisiológico y en particular sobre la bioenergética del ajolote para generar información que contribuya a la optimización de su cultivo como protocolos específicos sobre la nutrición y determinar raciones óptimas de alimento en diferentes estadios de vida.
- Realizar estudios concretos que conduzcan a establecer datos de calidad de agua óptimos para el manejo en condiciones de laboratorio de *Ambystoma mexicanum* que influyan en la optimización de un cultivo controlado, siguiendo los lineamientos de manejo en cautiverio.

10. Literatura citada.

- Aguilar-Miguel, X., Legorreta, B. G. y Casas-Andreu, G. 2009. Reproducción *ex situ* en *Ambystoma granulosum* y *Ambystoma lermaense* (Amphibia: *Ambystomatidae*). *Acta Zoológica Mexicana (Nueva Serie)*, 25: 443-454.
- Biasutti, A. 2006. *Ambystoma mexicanum* (Shaw, 1789) - Parte I. Disponible en línea en: [http://www.sadelplata.org/articulos/biasutti_070901.pdf]. Fecha de consulta: 18 de mayo del 2018.
- Bordzilovskaya, N. P., Dettlaf, T. A., Duhan, S. T., y Malacinski, G. M. 1989. Developmental-stage series of axolotl embryos. Pp. 201-219. En (Armstrong, J. B. y Malacinski, G. M., eds) *Developmental Biology of the Axolotl*. Oxford University Press, Oxford, New York.
- Browne, K. 2007. Reproduction and Larval Rearing of Amphibians. *The Institute for Laboratory Animal Research Journal*, 48: 34-214
- Browne, K., Seratt, J. y Kouba, A. 2006. Hormonal priming, induction of ovulation and in-vitro fertilization of the endangered Wyoming toad (*Bufo baxteri*). *Reproductive Biology Endocrinology*, 4: 10-34.
- CITES (Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres). 2013. Secretaria CITES, Ginebra, Suiza. Disponible en línea: [<https://www.cites.org>]. Fecha de consulta: 15 de enero del 2018.
- CONABIO (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad). 2010. *Ambystoma mexicanum* (ajolote). Distribución conocida.
- CONABIO (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad). 2011. Fichas de especies prioritarias. Ajolote Mexicano (*Ambystoma mexicanum*) Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México D.F.

- Contreras, V., Martínez-Meyer, E., Valiente, E., y Zambrano, L. 2009. Recent decline and potential distribution in the last remnant area of the microendemic mexican axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *Biological Conservation*, 142: 2881-2885.
- Crawshaw, G. 1993. Amphibian medicine. Págs: 131-139. En: Cadena, M., y García, M. 2012. Fertilización asistida en rana marsupial andina (*Gastrotheca riobambae*) en el Centro de Investigación y Conservación de Anfibios. Tesis de Licenciatura, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Central del Ecuador. Ecuador, Quito.
- Cruz, S. y Rodríguez, E. 2015. Anfibios y cambio global. Disponible en línea en: <https://www.bioscripts.net/zoowiki/temas/39B.html>. Fecha de consulta: 26 de octubre del 2018.
- Cummings, D. W. 1967. Calorific equivalents for studies in ecological energetics. Pymatuning Laboratory of Ecology. University of Pittsburgh, Pittsburgh, Pennsylvania. Pág. 52.
- Davis, N. B., Krebs, J. y West, S. A. 2012. *An Introduction to Behavioral Ecology*. Wiley-Blackwell Scientific Publications. United States of America, New York. 250 pp.
- Del Pino, E. 1983. Progesterone induces incubatory changes in the brooding pouch of the frog *Gastrotheca riobambae* (Fowler). *Journal of Experimental Zoology*, 227: 159-163.
- Dorantes, A., Martínez, C., y Guzmán, A. 2012. *Endocrinología clínica. Manual Moderno*, México, D.F. 900 pp.
- Duhon, S. T. 1989. Diseases of Axolotls. Pp: 320 En (Armstrong J. B. y Malacinski, G. M., eds) *Developmental Biology of the Axolotl*. Oxford University Press, Oxford, New York.
- Duhon, S. T. 1994. *Short guide to axolotl husbandry*. Indiana University Axolotl Colony Press. USA.

- Estrada-Romero, R. 2015. El ajolote *Ambystoma mexicanum*: su manejo y reproducción en cautiverio. Tesis de Licenciatura, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.
- Fioranelli, S. A., Barboza, N. N., Koza, G. A., Mussart, N. B., y Coppo, J. A. 2005. Influencia de distintos tipos de alimentos sobre los indicadores nutricionales y metabólicos en sangre de rana toro, *Rana catesbiana*. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas, 003: 1-4.
- Gascon, C., Collins, J. P., Moore, R. D., Church, D. R., Mackay, J. E. y Mendelson, J. R. III. 2007. Amphibian Conservation Action Plan. IUCN/SSC Amphibian Specialist Group. Gland, Switzerland and Cambridge, United Kingdom.
- Gresens, J. 2004. An introduction to the Mexican Axolotl (*Ambystoma mexicanum*). Journal of LabAnimal (NY), 33: 41-47.
- Griffiths, D. 1977. Caloric variation in Crustacea and other animals. Journal of Animal Ecology, 46: 593-605.
- IUCN (Unión Internacional para la conservación de la naturaleza). 2010. IUCN red list of threatened species. Version 2010.1. Disponible en línea en: [<http://www.iucnredlist.org>]. Fecha de consulta: 18 de enero del 2018]. Fecha de consulta: 18 de mayo del 2018.
- Jorgensen, C. B. 1992. Development and Reproduction. Pp. 439-466. En: Growth and reproduction in Environmental Physiology of the Amphibians. M. Feder y Burggren, W., (Eds.). University of Chicago Press. United States of America, Chicago.
- Lampert, W. 1984 The measurement of respiration. Pp. 413-468. En: (J. A. Downing y F. H. Rigler, eds.). A manual on methods for energy of secondary productivity in fresh waters. IBP 17. Blackwell Scientific Publications. United Kingdom, Oxford.

- Latournerié-Cervera, J. R. 2007. Estudios ecofisiológicos sobre el camarón café *Penaeus aztecus* (Ives) de la Laguna de Tamiahua, Veracruz. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.
- Latournerié-Cervera, J. R., Cano, R., y Estrada, A. R. 2008. Influencia del manejo sobre la regulación del medio interno y canalización de energía del camarón azul *Lytopenaeus stylirostris* en sistemas de cultivo. Revista Electrónica de Veterinaria, 9: 63-79.
- Malacinski, G. M. y Chung, H. M. 1977. The Mexican Axolotl (*Ambystoma mexicanum*) as an experimental material for studies in embryology. Korean Journal of Zoology, 2: 149-157.
- McCreery, R. y Linch, P. 1982. The role of androgen in the development of sexual differences in pituitary responsiveness to gonadotropin releasing hormone (GnRH) agonist in the Bullfrog, *Rana catesbiana*. General and Comparative Endocrinology, 54: 350-359.
- Mena-González, H. y Montes de Oca, K. 2014. Manual de procedimientos para el manejo y mantenimiento de la colonia de axolotes del laboratorio de restauración ecológica. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.
- Molina-Vázquez, A. 2010. El ajolote de Xochimilco. Revista Ciencias. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, 98: 54-59.
- Morales Cervantes, V. 2017. Aspectos reproductivos, producción de crías y crecimiento de *Ambystoma mexicanum* en estanques circulares exteriores. Tesis de Licenciatura Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.
- Newrock, K. M. y Brothers, A. J. 1973. The artificial induction of out of season breeding in the Mexican axolotl *Ambystoma mexicanum*. En: Malacinski, G. M. y Chung, H. M. 1977. The Mexican Axolotl (*Ambystoma mexicanum*) as an experimental material for studies in embryology. Korean Journal of Zoology, 2: 149-157.

Norris, D. y López, K. H. 2011. *Hormones and Reproduction of Vertebrates*. University of Colorado Academic Press. United States of America, Colorado. 1600 pp.

Ortega, C. A. 2000. El ajolote. *Revista de Ciencia y Cultura Elementos*. 6: 55-56

Pierce, J. G. y Parsons, T. F. 1981. Glycoprotein hormones: structure and function. *Annual Review of Biochemistry*, 50: 465-95.

Plumb, D. 2006. Manual de farmacología veterinaria. En: Cadena, M., y García, M. 2012. Fertilización asistida en rana marsupial andina (*Gastrotheca riobambae*) en el Centro de Investigación y Conservación de Anfibios. Tesis de licenciatura, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Central del Ecuador. Ecuador, Quito.

Salthe, S. N. 1969. Reproductive modes and the number and size of ova in the urodels. *The American Midland Naturalist*, 81: 467-490.

Scott, P. W. 1994. Axolotls, care and breeding in captivity. En: Servín-Zamora, E. 2011. Manual de mantenimiento en cautiverio y medicina veterinaria aplicada al ajolote de Xochimilco (*Ambystoma mexicanum*) en el zoológico de Chapultepec. Tesis de licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.

SEMARNAT (Secretaría de Medio Ambiente y Recurso Naturales). 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010. Protección ambiental de especies nativas de México de flora y fauna silvestre. Categoría de riesgo y sus especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio. Lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación. Disponible en línea: [https://agua.org.mx/wp-content/uploads/2013/06/nom_059_semarnat_2010.pdf]. Fecha de consulta: 15 de enero del 2018.

Servín-Zamora, E. 2011. Manual de mantenimiento en cautiverio y medicina veterinaria aplicada al ajolote de Xochimilco (*Ambystoma mexicanum*) en el zoológico de

Chapultepec. Tesis de Licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.

Sloof, W. y Baerselman, R. 1980. Comparison of the usefulness of the Mexican Axolotl (*Ambystoma mexicanum*) and the Clawed Toad (*Xenopus laevis*) in toxicological bioassays. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 24: 439-443.

Trottier, T. M. y Armstrong, J. B. 1975. Hormonal stimulation as an aid to artificial insemination in *Ambystoma mexicanum*. *Canadian Journal of Zoology*, 56: 171–173.

Volonteri, M. C. 2014. Efecto de los esteroides testiculares y del órgano de Bidder sobre la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal en el sapo macho *Rhinella arenarum* (Amphibia, Anura). Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. Argentina, Buenos Aires.

Volonteri, M. C. y Ceballos, N. R. 2010. Mechanism of hCG-induced spermiation in the toad *Rhinella arenarum* (Amphibia, Anura), *General and Comparative Endocrinology*. 169: 197-202.

Voss, S. R. 1993. Effect of temperature on body size, developmental stage, and timing of hatching in *Ambystoma maculatum*. *Journal of Herpetology*, 27: 329-333.

Young, C. y Bureau, D. 1996. Bioenergética en la formulación de dietas y estándares de alimentación para la acuicultura del salmón: principios, métodos y aplicaciones. *Avances en Nutrición Acuícola. Memorias del Tercer Simposio Internacional de Nutrición Acuícola*, Nuevo León, México, Universidad Autónoma de Nuevo León. Págs. 33-64.

Zambrano, L., Reynoso, V. H. y Herrera, G. 2004. Abundancia y estructura poblacional del axolotl (*Ambystoma mexicanum*) en los sistemas dulceacuícolas de Xochimilco y Chalco. Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Biología. Informe final. SNIBCONABIO Proyecto No. AS004. México D.F. Pp 4.

Zambrano, L., Vega, E., Herrera, L. G., Prado, E., y Reynoso, V. H. 2007. A population matrix model and population viability analysis to predict the fate of endangered species in highly managed water systems. *Animal Conservation*. 10: 297-303.