



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

Escuela Nacional de Estudios
Profesionales
IZTACALA

CRIOPRESERVACION DE SEMEN
DE TRUCHA ARCOIRIS

T E S I S

Que para obtener el título de

B I O L O G O

p r e s e n t a

JULIETA RODRIGUEZ TENORIO



1990



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

CRIOPRESERVACION DE SEMEN DE TRUCHA ARCOIRIS

Tesis presentada ante la Jefatura de
Biología de la
Escuela Nacional de Estudios Profesionales-Iztacala
de la

Universidad Nacional Autónoma de México
para obtener el título de:

BIOLOGO

por

JULIETA RODRIGUEZ TENORIO

Enero de 1990

APROBADO POR

Asesor principal: Biól. M.F.A. Fermín Jiménez Krassel

Coasesor: Biól. M. en B. R. Armando Ferreira Nuño

DEDICATORIA

A MIS PAFAS

LUIS Y CATALINA

Y A MIS HERMANOS

MARIA
BLANCA,
GUILLERMINA,
SERGIO,
JORGE,
FAULA Y
JAVIER.

AGRADECIMIENTOS

A mi Director de Tesis Biólogo M. en P.A. Fermín Jiménez Krassel, ya que gracias a su colaboración, enseñanza y paciencia fue posible la realización y finalización del presente trabajo.

Al Biólogo M. en B.R. Armando Ferreira Nuño, el cual participó en la elaboración del anteproyecto de tesis, así como en el enlace con la Delegación de Pesca en el Estado de México.

A los doctores José Jesús Álvarez Ierena, Javier Arreola Bueno, Everardo González Padilla, Marco Antonio Asprón, por la orientación que me dieron para establecer los contactos con las personas relacionadas con la criopreservación.

Gracias a la Delegación de Pesca en el Estado de México por las facilidades otorgadas para la realización del presente trabajo.

Al personal del Centro Piscícola "El Zarco", especialmente al Biólogo Juan Antonio Pérez Hernández por el apoyo prestado para el avance de la presente investigación.

Al Sr. Regino Peña Victoria, dueño del Criadero "El Paraíso" por haber prestado sus instalaciones para la incubación de los huevos de trucha.

A los M.V.Z. Francisco Javier Padilla Ramírez, Mario Acuña, Gabriela Mapes Sánchez, Clara Murcia Mejía y al Biólogo Rubén Montes por su participación desinteresada en la elaboración del presente trabajo.

Gracias a mis maestros, especialmente al Biól. Abel Mendoza Nuñez y a la memoria del M.V.Z. Jorge Tolosa Sánchez.

A la Bióloga María Teresa Islas Alcocer, por su orientación en el tema de tesis a elegir.

INDICE

	Página
1. Resumen.	1
2. Introducción.	3
3. Objetivos.	6
4. Antecedentes.	7
5. Material y Método.	10
6. Resultados.	18
7. Discusión.	30
8. Conclusiones.	35
9. Bibliografía.	36

INDICE DE CUADROS

	Página
CUADRO 1. Procedimiento para evaluar la congelación de semen de trucha arcoiris (<i>Salmo gairdneri</i>).	22
CUADRO 2. Diluyente utilizado para la congelación de semen de trucha arcoiris.	23
CUADRO 3. Porcentajes de fertilidad y eclosión en la inseminación artificial de trucha arcoiris utilizando semen fresco, diluido y congelado con diferentes concentraciones de DMSO.	24
CUADRO 4. Porcentajes de fertilización y eclosión utilizando semen congelado con diferentes porcentajes de dimetil sulfoxido (DMSO) y a diferentes intervalos de almacenamiento.	25
CUADRO 5. Porcentajes de fertilización y eclosión después de la inseminación artificial con semen congelado utilizando diferentes concentraciones de DMSO dependiendo del animal.	26

INDICE DE FIGURAS

Página

- FIGURA 1. Porcentajes de fertilidad y eclosión en trucha arcoiris después de la inseminación artificial con semen fresco, diluido y congelado con diferentes concentraciones de dimetilsulfóxido (DMSO). 27
- FIGURA 2. Porcentajes de fertilidad y eclosión en trucha arcoiris después de la inseminación artificial con semen congelado utilizando diferentes porcentajes de DMSO y dependiendo del animal. 28
- FIGURA 3. Porcentajes de fertilización y eclosión utilizando semen congelado y DMSO como crioprotector y a diferentes intervalos de descongelación en trucha arcoiris. 29

RESUMEN

CRIOPRESERVACION DE SEMEN DE TRUCHA ARCOIRIS. 1990. Julieta Rodríguez Tenorio. (Bajo la dirección del Biól. M.P.A. Fermín Jiménez Krassel).

El presente trabajo se realizó en tres lugares: En el Centro Trutícola "El Zarco", donde se realizó la colección de las muestras de semen; el proceso de congelación en el laboratorio de Reproducción Animal del CENID-Microbiología del INIFAP; y la incubación de los óvulos fertilizados en el Criadero "El Paraíso", Ocoyoacac, Edo. de México. La fase experimental se realizó durante los meses de noviembre de 1986 a febrero de 1987. Para evaluar el efecto de la criopreservación de semen en el proceso de la fertilización, se utilizaron 6 machos adultos de trucha arcoiris (*Salmo gairdneri*) y los desoves de 5 hembras fértiles. La colección de las muestras se realizó en forma manual, sin anestesia, y una vez realizada, éstas se colocaron en agua a 4° C. En cada una de las muestras colectadas se determinó el volumen, concentración, motilidad y porcentaje de espermatozoides vivos. Cada muestra se dividió en 0.5 ml de semen para la fertilización inmediata (control), y el resto se diluyó (v:v) en una proporción 1:3 y se probaron diferentes porcentajes de DMSO (6.6, 7, 10 y 14%). La congelación de las pajillas se realizó en vapor de nitrógeno líquido durante 2 min y posteriormente se almacenaron a -196° C. Diferentes pajillas fueron descongeladas a 1 h, 1, 8 y 21 días después de la congelación, con ellas se fertilizaron un total de 9302 óvulos y los resultados se analizaron por Chi cuadrada. Los mejores porcentajes de fertilidad se obtuvieron con el semen fresco y diluido (79.1 y 81.35%) y fueron significativamente mayores ($P < .01$) que después de la congelación.

El mejor porcentaje de fertilidad se obtuvo cuando se congeló utilizando 14 y 7% de DMSO (67.6 y 63.2% respectivamente). Cuando las muestras se descongelaron a diferentes intervalos de tiempo se observó que los porcentajes de fertilidad fueron constantes, sin que la concentración de DMSO influyera. El posible efecto en la fertilidad debido a variaciones individuales fue limitada a un macho, con un 35.4% de fertilización. En general los porcentajes de eclosión fueron bajos, y menores a los observados en los grupos control (84.7 vs 25.8% en el grupo control y congelado con 6.6% de DMSO respectivamente) posiblemente debido a la calidad del agua durante la incubación, ya que el porcentaje más alto fue de 25.8%. Se concluye que es factible la criopreservación de semen de trucha arcoiris, aunque son necesarias más repeticiones para estandarizar la técnica.

CRIOPRESERVACION DE SEMEN DE TRUCHA ARCOIRIS

INTRODUCCION

En la acuicultura de México, la trucha arcoiris (*Salmo gairdneri*, Richardson, 1836) ocupa cada vez un lugar más preponderante. En el país existen ocho centros trutícolas y varias granjas particulares (Zarza, 1982). En 1985, el volumen de captura en peso vivo de esta especie fue de 393 toneladas (Anuario Estadístico de Pesca, 1986) mientras que la producción de crías en el centro trutícola "El Zarco" para el año de 1985 fue de 5.5 millones (Pérez, 1986 com. personal).

El cultivo de la trucha arcoiris es importante debido a su demanda en el mercado como producto de primera calidad, a su popularidad entre los pescadores deportivos y a que la mayoría de los cuerpos de agua de las zonas frías del país ofrecen condiciones favorables para su explotación (Ruiz, 1982).

La época de reproducción de la trucha en México se extiende de septiembre a febrero, cuando la temperatura del agua fluctúa entre 10 y 14° C. En la reproducción de esta especie se practica la inseminación artificial en seco, después de haber ejercido presión en el abdomen de los reproductores para obtener los gametos. Estos son colectados en vasijas y se homogenizan para lograr una mejor fertilización (Cuaderno de Trabajo sobre Piscicultura No. 9, 1982).

Al igual que en otras especies de peces, en la trucha arcoiris los machos alcanzan la madurez sexual antes que las hembras y en algunos centros, es común un desfase en la maduración gonadal en los individuos del mismo y/o de diferente sexo. Por ejemplo, en el Centro de "El Zarco", a mediados de junio se inicia la madurez sexual de algunas hembras de la población; más tarde, en octubre la mayoría lo ha logrado y finaliza en febrero (Rodríguez, 1987).

En el caso de los machos, la maduración gonadal está desfasada, ya que pocos casos se presentan en septiembre, el pico de la madurez ocurre en noviembre y termina en marzo (Rodríguez, 1987). Este desfase en la madurez gonadal trae como consecuencia que no exista suficiente cantidad de óvulos o espermatozoides al inicio y final de la época reproductiva respectivamente, si se quiere realizar la fertilización artificial.

Para resolver este problema de desfase. Harvey y Hoar (1979), propusieron tres posibles soluciones:

a) Sincronización sexual con hormonas.

Se ha demostrado que con la inyección de extractos hipofisarios o de hormonas esteroides se logra la maduración de los gametos y con ello la sincronización sexual (Harvey y Hoar, 1979). Sin embargo, el estrés provocado por el manejo puede interferir con la reproducción.

b) Modificación de los factores ambientales.

La manipulación de los factores ambientales puede dar como resultado maduración de la gónada (maduración, acumulación de vitelo en los oocitos) pasando por todos y cada uno de los pasos anteriores; es un camino largo y muy poco utilizado en las explotaciones trutícolas.

El tipo de manejo de factores ambientales y como aplicarlos para obtener buenos resultados comerciales, es labor de equipo y depende de multitud de detalles inherentes a la especie, la época del año y la localización geográfica.

c) Criopreservación de semen.

Podría ser el método de elección, ya que permite realizar la fertilización cuando se requiera, además de poder usarlo en programas de mejoramiento genético.

En el presente trabajo se pretende montar la técnica de criopreservación de semen de trucha arcoiris tomando como base los estudios mas recientes.

Objetivo general:

Evaluar la técnica de criopreservación de semen de trucha arcoiris (*Salmo gairdneri*, Richardson, 1836).

Objetivos particulares:

a) Evaluar la calidad y la capacidad fertilizante del semen fresco de trucha arcoiris del Centro Trutícola "El Zarco".

b) Evaluar el efecto del diluyente, la congelación y el almacenamiento sobre la calidad y la capacidad fertilizante del semen de trucha arcoiris.

ANTECEDENTES.

Existen varias revisiones sobre la técnica de criopreservación de semen de peces (Horton y Ott, 1976; Stoss, 1983; Munkittrick y Moccia, 1984) en las que se puede observar que esta técnica se ha aplicado en un considerable número de especies marinas. El grupo de los salmónidos ha sido el más estudiado debido a las siguientes razones: a) su biología y fisiología se ha estudiado más extensamente, b) existen especies que maduran en diferentes épocas del año, c) tienen importancia en la acuicultura comercial y d) se puede disponer de ellas en piscifactorías privadas y/o gubernamentales (Horton y Ott, 1976).

La técnica de criopreservación es sencilla y consta de los siguientes pasos: Primero es necesaria la obtención y evaluación del semen, tomando en cuenta la concentración, morfología, motilidad y capacidad fertilizante de los espermatozoides. Segundo, un medio que permita la dilución y protección durante el proceso de congelación además del suministro de nutrientes. Tercero, recipientes que permitan su almacenamiento y resistan la congelación. Por último, un método adecuado de congelación, que podría ser realizado con hielo seco o nitrógeno líquido. Con el primero se congela rápidamente a -76° C y con el segundo en forma más lenta a -196° C. En estas condiciones el semen puede ser almacenado por períodos variables de tiempo, transcurrido el cual es descongelado, evaluada la motilidad y la capacidad fertilizante de los espermatozoides.

Hace más de un siglo (1853), De Quatrefages intentó preservar viable el semen de peces en estado no congelado; sin embargo, fue hasta 1953 cuando Blaxter aplicó con éxito por primera vez la criopreservación de semen de arenque después de que se demostró que era exitosa con el semen de mamíferos (Horton y Ott, 1976).

En los primeros estudios de criopreservación realizados en peces se utilizó como diluyente Ringer de peces, como crioprotector glicerol y como medio de congelación el hielo seco, obteniéndose una motilidad del 20% después de la descongelación, sin embargo, no se evaluó la capacidad fertilizante. A partir de entonces, los avances en la criopreservación de semen de peces han dependido de las modificaciones hechas en los diluyentes, del crioprotector utilizado, de las formas de almacenamiento, así como de los métodos de congelación y descongelación. Así tenemos que fue hasta 1967 cuando se obtuvo la primera fertilización exitosa de óvulos frescos de salmónidos (incluyendo a la trucha arcoiris) utilizando semen congelado. En éste estudio el semen se diluyó con solución de Cortland y el crioprotector fue dimetilsulfóxido (DMSO) obteniéndose una fertilización máxima de 18% (Graybill y Horton, 1969).

En 1978, Büyükhhatipoglu y Holtz depuraron ésta técnica, empleando un diluyente basado en la composición del líquido seminal de la trucha arcoiris y utilizando pastillas como formas de almacenamiento, obteniéndose un porcentaje máximo de eclosión de 80.3%.

A pesar de que se ha continuado con los estudios de criopreservación de semen de la trucha arcoiris (Erdahl y Graham, 1980; Kurokura e Hirano, 1980; Stoss y Holtz, 1981a, 1983; Erdahl, y col., 1984) no se han obtenido mejoras sustanciales en el porcentaje de eclosión en relación al estudio de Büyükhatispoglu y Holtz (1980) ,aunque se han perfeccionado algunos procedimientos.

MATERIAL Y METODO.

a) Localización.

El trabajo se realizó en tres lugares. Primero fue el Centro Trutícola "El Zarco", ubicado en el Distrito Federal a 3400 metros sobre el nivel del mar y a 19° 17' Latitud Norte y 99° 21' Longitud Oeste. Su clima es templado subhúmedo con lluvias en verano (c(w2)w(ci)) y la temperatura promedio es de 9°C (García, 1973). En el centro se seleccionaron los animales y se colectó el semen. En el laboratorio de Reproducción Animal del CENID-Microbiología del INIFAP, se realizó el manejo del semen hasta el proceso de congelación. El tercer lugar fue el criadero "El Paraíso", localizado en el Municipio de Ocoyoacac, Estado de México, a 2674 msnm y a 19° 17' Latitud Norte y 99°28' Longitud Oeste. El clima es templado subhúmedo con lluvias en verano (c(w2)(w)b(i')g), la temperatura promedio es de 13.2°C (García, 1973). En este lugar se incubaron los huevos hasta la etapa de eclosión.

b) Organismos experimentales.

Los organismos utilizados fueron machos de trucha arcoiris (*Salmo gairdneri*) del Centro Trutícola "El Zarco". Se seleccionaron seis machos (de 3 años) sexualmente maduros (éstos expulsan semen al ejercer una ligera presión en el abdomen), se registró su peso, la longitud patrón y total y el diámetro. Se marcaron en la aleta dorsal con hilo cañamo de diferente color. Se aplicó una solución antiséptica para evitar cualquier infección y

se les mantuvo en un estanque.

c) Diseño experimental.

La colección y evaluación del semen se realizó a partir del mes de noviembre de 1986 hasta febrero de 1987. Las primeras muestras fueron para adquirir práctica en la evaluación de la motilidad, porcentaje de vivos, concentración y en el proceso de congelación. Durante el periodo de estudio se realizaron 12 muestreos en los seis animales, los cuales se colectaron en dos ocasiones.

Un día antes de la colección de semen, a los animales se les mantuvo en ayunas con el fin de evitar que el semen secontaminara. El poro genital se lavó con una solución Ringer de peces y se secó con una toalla de papel. El semen fue extraído por medio de un masaje en la región anteroposterior y se depositó en tubos de centrifuga graduados y estériles; todo el material que se utilizó en la colección y congelación fue previamente enfriado con hielo para mantener una temperatura de 5° C (Erdahl y col., 1984).

El procedimiento para la evaluación de la calidad seminal y la criopreservación de semen de la trucha arcoiris se presenta en el Cuadro 1.

El semen se dividió en dos porciones: la fracción A (<1.0 ml) fue utilizada para evaluar motilidad, porcentaje de vivos, concentración y fertilidad en el grupo control. La fracción B se diluyó en una proporción 1:3 con el diluyente y empleando como

crioprotector diferentes porcentajes de dimetilsulfóxido (DMSO; Cuadro 2).

La fertilidad del semen fresco, diluido y congelado se evaluó en cada uno de los animales utilizados y a diferentes intervalos de tiempo después de la congelación: 1 hora, 1, 8, y 21 días.

d) Evaluación de semen.

Una vez colectado el semen, se registraron las características macroscópicas (volumen, color), se mantuvo a 5° C y se procedió a su evaluación para determinar la concentración, motilidad y porcentaje de vivos.

i) Motilidad.

Se hicieron preparaciones frescas, colocando una gota de semen en un portaobjetos estéril, poniendo un cubreobjetos y agregando una gota de agua o de NaHCO₃ a 4° C (0.1 M, pH 9.14; Stoss, 1983). La motilidad se estimó usando un microscopio de contraste de fases y el objetivo de 40x. La motilidad fue evaluada de acuerdo al procedimiento descrito por Sorensen (1982) para evaluar la motilidad individual de semen de bovinos.

Esta forma de evaluación se puede extrapolar a la escala propuesta por Hara y col., (1982), para semen de peces y que a continuación se describe.

ESCALA	PORCENTAJE DE MOTILIDAD
0	0
1	1
2	1-5
3	5-30
4	30-70
5	70-100

ii) Porcentaje de espermatozoides vivos.

Esta característica se evaluó por medio de un frotis que se preparó con una gota de semen teñida con eosina-nigrosina (1 gr de eosina B, 5 gr de nigrosina en 100 ml de citrato de sodio al 3%). La mezcla se consiguió extendiendo el colorante y el semen a lo largo de un portaobjetos con la ayuda de otro limpio. Esta preparación se secó al aire, se montó y se observó en el microscopio con el objetivo de inmersión (100x). Las cabezas de los espermatozoides vivos se observaron blanquecinas, mientras que las de los muertos se tifieron de violeta. Se observaron cinco campos diferentes.

iii) Concentración.

Debido a la concentración muy grande de espermatozoides, se realizaron diluciones con solución salina fisiológica 1:400 y 1:800. Con una pipeta Pasteur se tomó una gota de la dilución apropiada, se secó la punta y se dejó fluir una gota en un hematocitómetro. Se observó al microscopio óptico con el objetivo

de 40x, se contaron los espermatozoides que estaban en las esquinas y centro de la cuadrícula del hematocitómetro. Se consideró la fórmula citada por Sorensen (1982) para calcular la concentración por ml de semen y concentración total.

$$\text{concentración en ml} = X * 50 * Y * 1000$$

en donde:

X = número de células contadas,

50 = constante para ajustar el volumen de la cámara de conteo, el cual es $1/50$ de mm^3 .

Y = dilución empleada ($1/400$ o $1/800$).

1000 = constante para ajustar de mm^3 a cm^3 .

e) Evaluación de la capacidad fertilizante del semen.

En un recipiente de plástico se colocó una cantidad conocida de óvulos y se adicionó la cantidad necesaria de semen fresco (2×10^5 espermatozoides/óvulo), diluido (2×10^5) o congelado (3×10^6), utilizando una concentración aproximada de 2.52×10^9 espermatozoides por 100 óvulos (Stoss, 1983). Con una pluma de ave se mezclaron, se dejaron en reposo durante 15 min y se adicionó agua corriente para lavar las impurezas. Los huevos se colocaron en bastidores de 27×35 cm y éstos en tinas de incubación tipo rústico hechas con troncos de árbol de 1.80×0.20 m. Los bastidores quedaron sumergidos en agua 6 cm y a una distancia de 10-12 cm del fondo.

El desarrollo embrionario de la trucha arco iris oscila entre los 20-30 días, esto depende de la temperatura y del fotoperiodo. Durante el periodo de incubación hay días críticos, durante los cuales el mínimo movimiento provoca un elevado índice de mortandad (días 7 al 9). Hacia el día 10 y el 13, se observan en los huevos embrionados manchas oculares; a esta etapa se le conoce como huevos oculados y en este periodo de pueden transportar. Aunque si la edad es mayor a 15 días es mejor no hacer el transporte, ya que pueden eclosionar en el camino, a partir de entonces se les denomina alevines (Ruiz, 1982).

El porcentaje de fertilización se estimó 25 días después de realizada la inseminación artificial, comparando el número de huevos inseminados con el número de huevos oculados.

f) Método de congelación.

Todas las muestras de semen se diluyeron en una proporción 1:3 (v:v) con el diluyente propuesto por Erdahl y col., (1982) (Cuadro 2).

El crioprotector que se utilizó fue DMSO en los siguientes porcentajes: 6.6, 7, 10 y 14%. El crioprotector se adicionó en forma paulatina a razón de 2.5% cada 5 min hasta obtener la concentración final esperada. El semen fue congelado en pajillas tipo francés de 0.5 ml de capacidad, de diferentes colores y en pastillas de 0.2 ml.

El congelado de las pastillas se realizó dejando gotear semen diluido en orificios hechos en hielo seco, ocurriendo una congelación instantánea (-79° C). Una vez obtenidos se trasladaron en pequeños frascos a un termo de almacenamiento con nitrógeno líquido (-196° C) (Stoss y Holtz, 1981a)

El llenado de las pajillas se realizó en forma manual al sumergirlas en el semen diluido. Con la ayuda de una pipeta Pasteur se eliminó una pequeña cantidad de semen de un extremo y éste se presionó en polvo de alcohol polivinílico para formar un tapón que permitiera un sello hermético. Las pajillas se congelaron en vapor de nitrógeno líquido, a una distancia de 2 cm de la superficie durante 2 min (Hara y col., 1982). Todas las pajillas se almacenaron en nitrógeno líquido a -196° C.

El procedimiento de descongelación se realizó colocando las pajillas en un recipiente con agua a 5° C hasta su descongelación (30 seg a 1 min), y se procedió a evaluar la motilidad y fertilidad, como ya se describió.

g) Análisis de la calidad del agua.

Se evaluaron las siguientes características del agua: pH, temperatura, cantidad de oxígeno disuelto y alcalinidad en las tinas de incubación del criadero. Esto fue para verificar que estas características estuvieran dentro de los límites confiables para la incubación de huevos de trucha arcoiris.

La temperatura se registró en las tinas de incubación cada tercer día. La cantidad de oxígeno disuelto y alcalinidad se evaluó en una sola ocasión siguiendo los procedimientos descritos en el Manual de Técnicas Limnobiológicas Simplificadas (1977).

RESULTADOS.

Características morfológicas de los animales utilizados.

El peso promedio de los seis animales utilizados fue de 5408.3 gr, la longitud total y patrón de 43.9 y 37.3 cm respectivamente. Todos los animales estaban sanos.

Evaluación de semen.

El volumen promedio del semen obtenido fue de 4.65 +/- 2.76 ml (1.9 a 11 ml; n = 12). La concentración fue de 1.195×10^{10} espermatozoides por ml. La motilidad se evaluó al adicionar agua o NaHCO₃ (0.1M) a una temperatura de 5° C y fue en promedio de 83.75 +/- 1.39%, que en la escala propuesta por Hara y col., (1982) corresponde a 5. El porcentaje de espermatozoides vivos fue de 93.6 +/- 3.4%.

Evaluación de la capacidad fertilizante de semen fresco.

Esta característica fue evaluada al fertilizar un total de 531 óvulos con aproximadamente 30 millones de espermatozoides por óvulo, siendo este semen fresco (Stoss, 1983). Los porcentajes promedio de fertilización y eclosión fueron de 79.10 y 84.66% respectivamente. Los resultados obtenidos con este grupo fueron considerados como controles para los tratamientos realizados (Figura 1).

Efecto del diluyente.

El volumen del diluyente utilizado en cada congelación varió de acuerdo al volumen del eyaculado y en promedio fue de 13.95 ml de diluyente. La motilidad no se vió afectada por el diluyente al inducirse nuevamente con NaHCO_3 . Además se observó que existía movimiento individual 5 h después de la colección, la cual se intensificó después de la adición del carbonato.

El porcentaje de espermatozoides vivos después de la adición del diluyente (7 y 10 % de DMSO) fue de 97 +/- 1.5 y 86.8 +/- 1.0% de espermatozoides vivos.

Como un segundo grupo control se fertilizaron 325 óvulos con el semen que contenía 7% de DMSO y una concentración de 1.62×10^{10} espermatozoides/ml. Los porcentajes de fertilización y eclosión fueron de 81.85 y 75.14% respectivamente. Con el diluyente con 10% de DMSO se fertilizaron 376 óvulos utilizando 1.58×10^{10} espermatozoides/ml. En este caso, los porcentajes de fertilización y eclosión fueron de 80.85 y 89.42% respectivamente. En ninguno de los tres grupos que fueron considerados como controles (semen fresco y diluidos con 7 y 10% de DMSO) se observaron diferencias significativas ($P > .05$).

Efecto de la criopreservación.

El primer aspecto evaluado después de la descongelación fue la motilidad, siendo ésta menor al 1%; por ésta razón, y apoyándose en el hecho de que el porcentaje de vivos fue de 88.9+/-1.5% al descongelar, se realizó una fertilización preliminar. Se utilizó el semen congelado en pajillas de 0.5 ml y pastillas de 0.2 ml. En ambos casos la motilidad fue baja, aunque se observó un ligero aumento después de la adición de NaHCO₃.

En este grupo se fertilizaron 1063 óvulos, obteniéndose 54.09% de fertilización y 11.65% de eclosión, indicando que la motilidad individual no fue un aspecto que influyó en la fertilización de este experimento; aunque los porcentajes de fertilización y eclosión fueron bajos.

Los porcentajes de espermatozoides vivos en el semen fresco, diluido y congelado fueron de 93.6 +/- 3.4, 93.6 +/- 3.1 y 88.9 +/- 1.5 % respectivamente.

Para evaluar la fertilidad del semen congelado se fertilizaron un total de 8070 óvulos utilizando aproximadamente 2.72×10^7 espermatozoides por óvulo y se obtuvieron los siguientes resultados: 61.77% de fertilización y 15.12% de eclosión.

En el cuadro 3 se observan los porcentajes de fertilización y eclosión en el periodo de congelación de diciembre de 1986 a febrero de 1987. Los porcentajes de fertilización son mayores para

los grupos control que en aquellos en los que se utilizó semen congelado (80.57 vs 61.96%). También se observó que la fertilidad es mayor cuando la concentración de DMSO fue de 14%, pero con el mínimo porcentaje de eclosión ($P < .01$). Por otro lado, el número de huevos que eclosionaron fue mayor en los grupos testigo y el mejor porcentaje de eclosión se obtuvo después de usar el semen congelado con 6.6% de DMSO (25.78%).

En el cuadro 4 se presentan los porcentajes de fertilización y eclosión con relación al intervalo de almacenamiento. Este es un factor interesante de mencionar, puesto que los mejores porcentajes de fertilización se obtuvieron después de 8 días de almacenamiento (Figura 3).

Como último punto que se presenta en los resultados obtenidos son los porcentajes de fertilización y eclosión de los diferentes animales utilizados en el experimento (cuadro 5). Como se puede observar, los porcentajes de fertilización en los animales son prácticamente constantes, aunque en el análisis estadístico se encontraron diferencias ($P < .05$). También es posible observar que en el semen diluido con altos porcentajes de DMSO, el número de huevos que eclosionaron disminuyó significativamente (Figura 2).

CUADRO 1. PROCEDIMIENTO PARA EVALUAR LA CONGELACION DE SEMEN DE TRUCHA ARCOIRIS.

REGISTRO DE PARAMETROS AMBIENTALES	
↓	
SELECCION E IDENTIFICACION DE ANIMALES	
↓	
COLECCION DE SEMEN	
MUESTRA A	MUESTRA B
↓	
EVALUACION DE SEMEN FRESCO	DILUCION Y CONGELACION
a) MOTILIDAD	1. EVALUAR EFECTO DE DILUYENTE
b) CONCENTRACION	a) MOTILIDAD
c) PORCENTAJE DE VIVOS	b) FERTILIDAD Y ECLOSION
d) FERTILIDAD Y ECLOSION	c) PORCENTAJE DE VIVOS
	2. EFECTO DE CONGELACION
	a) MOTILIDAD
	b) FERTILIDAD Y ECLOSION
	c) PORCENTAJE DE VIVOS.

CUADRO 2. DILUYENTE UTILIZADO PARA LA CONGELACION DE SEMEN DE TRUCHA ARCOIRIS.

MgCl ₂ -6H ₂ O	0.440	g
CaCl ₂ -2H ₂ O	0.205	g
Na ₂ HPO ₄	0.530	g
Acido cítrico	0.200	g
NaCl	11.682	g
KCl	5.115	g
Glucosa	20.0	g
KOH (1.27 g/100 ml)	20.0	ml
Bicina (5.3 g/100 ml)	40.0	ml
Água deionizada	200.0	ml
DMSO	6.6	%
	7.0	%
	10.0	%
	14.0	%
pH	7.9	

FUENTE: Erdahl, D. A. and Graham, E. F. 1980.

CUADRO 3. PORCENTAJES DE FERTILIDAD Y ECLOSION EN LA INSEMINACION ARTIFICIAL DE TRUCHA ARCOIRIS UTILIZANDO SEMEN FRESCO, DILUIDO Y CONGELADO CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE DMSO.

	% DMSO	S FERTILIZACION	% ECLOSION
CONTROL		79.10 a	84.66 a
DILUIDO	7.0	81.85 a	75.14 b
DILUIDO	10.0	80.85 a	89.42 a
CONGELADO	6.6	57.71 bc	25.78 c
CONGELADO	7.0	63.20 b	19.67 cd
CONGELADO	10.0	59.33 c	19.10 d
CONGELADO	14.0	67.62 d	1.95 e

a,b,c,d,e. Distintas literales en la columna son diferentes (P<.01)

CUADRO 4. PORCENTAJES DE FERTILIZACION Y ECLOSION UTILIZANDO SEMEN CONGELADO CON DIFERENTES PORCENTAJES DE DMSO Y A DIFERENTES INTERVALOS DE ALMACENAMIENTO.

% DMSO		1 HORA	1 DIA	1 SEM	3 SEM	TOTAL
6.6	FERTILIZACION	---	---	43.6 a	72.7 b	57.5
	ECLOSION	---	---	64.0 a	1.5 b	25.8
7.0	FERTILIZACION	63.8 a	50.5 b	77.5 c	---	63.2
	ECLOSION	23.9 a	11.7 b	24.5 a	---	19.7
10.0	FERTILIZACION	68.7 ab	65.3 a	72.8 b	41.4 c	59.3
	ECLOSION	24.4 a	29.5 a	16.1 b	6.1 b	19.1
14.0	FERTILIZACION	---	---	76.6 a	65.8 b	67.6
	ECLOSION	---	---	4.0 a	1.5 a	2.0
TOTALES		66.25	57.90	67.63	59.97	61.9

a,b,c. Renglones con distintas literales son estadísticamente diferentes (P<.1)

CUADRO 5. PORCENTAJES DE FERTILIZACION Y ECLOSION DESPUES DE LA INSEMINACION ARTIFICIAL CON SEMEN CONGELADO UTILIZANDO DIFERENTE CONCENTRACION DE DMSO DEPENDIENDO DEL ANIMAL.

ANIMAL	DMSO	% FERTILIZACION	% ECLOSION
A	6.6	57.71 a	25.78 a
B	10	35.36 b	7.42 b
B1	14	65.02 ac	2.27 cd
C	10	58.54 a	4.50 bc
C1	14	69.72 c	1.71 d
D	7	63.41 ad	21.12 ae
D1	10	69.11 c	30.24 af
E	7	62.54 ae	15.83 e
F	10	67.24 cde	28.33 af

a,b,c,d,e,f. Distintas literales en la columna son diferentes (P<.05).

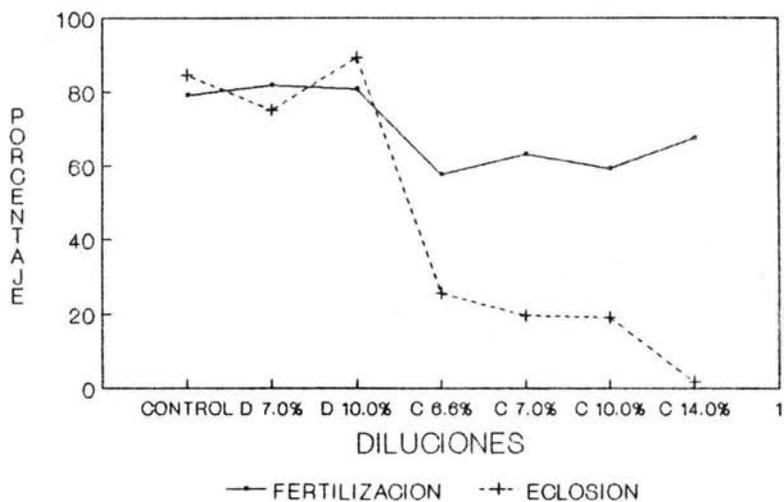


FIGURA 1. PORCENTAJES DE FERTILIDAD Y ECLOSION EN TRUCHA ARCOIRIS DESPUES DE LA INSEMINACION ARTIFICIAL CON SEMEN FRESCO, DILUIDO Y CONGELADO CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE DIMETILSULFOXIDO (DMSO)

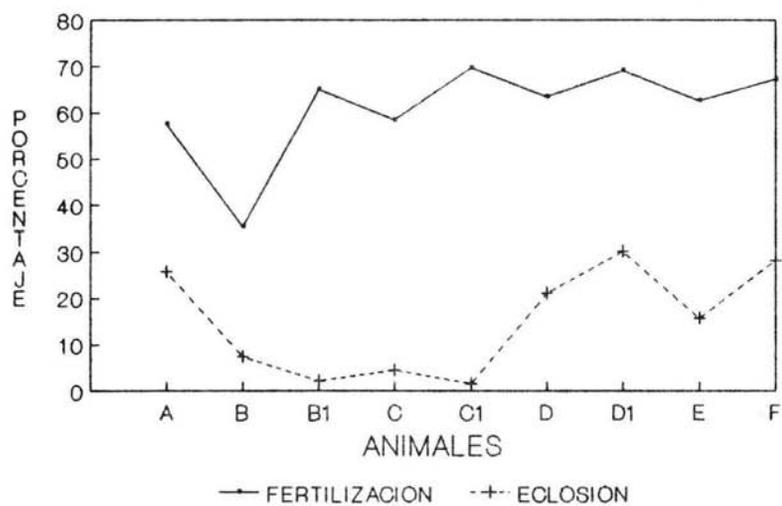


FIGURA 2. PORCENTAJES DE FERTILIDAD Y ECLOSION EN TRUCHA ARCOIRIS DESPUES DE LA INSEMINACION ARTIFICIAL CON SEMEN CONGELADO UTILIZANDO DIFERENTES PORCENTAJES DE DMSO Y DEPENDIENDO DEL ANIMAL.

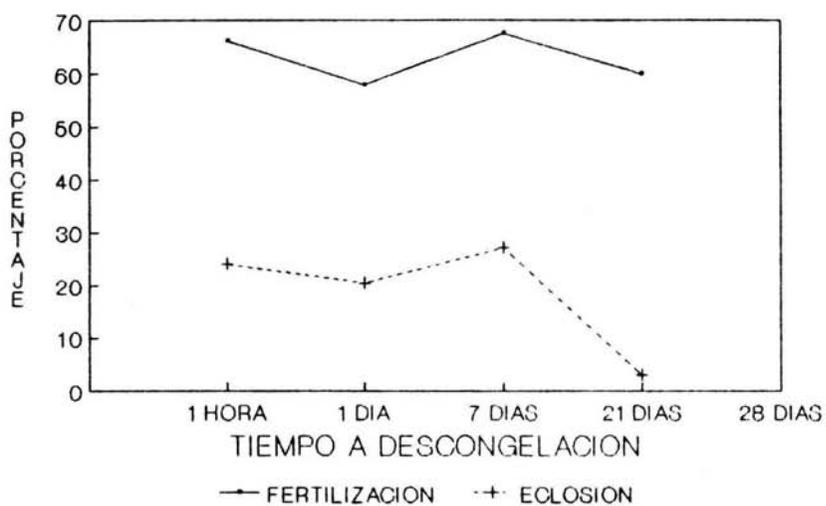


FIGURA 3. PORCENTAJES DE FERTILIZACION Y ECLOSION UTILIZANDO SEMEN CONGELADO Y DMSO COMO CRIOPROTECTOR Y A DIFERENTES INTERVALOS DE DESCONGELACION EN TRUCHA ARCOIRIS.

DISCUSION.

Se observó que el volumen de los eyaculados (1 a 9 ml) se encuentra entre los valores normales que han sido registrados por otros autores (Stoss y Holtz, 1981a; Stoss, 1983) que mencionan un rango de 2 a 10 ml.

Para la determinación de la concentración espermática se ha empleado generalmente la técnica del hematocitómetro. En el presente experimento, la concentración promedio fue de 1.19×10^{10} espermatozoides/ml; mientras que Moccia y Munkittrick (1987) obtuvieron $3-10 \times 10^9$ espermatozoides por ml y Stoss y Holtz (1981a) 10×10^{10} espermatozoides/ml. Las diferencias encontradas pudieron deberse entre otras cosas, al tipo de diluciones empleadas y posiblemente a la experiencia que se tiene en el conteo de los espermatozoides.

Se informa por primera vez del número de espermatozoides vivos en peces; éste es un parámetro importante en la criopreservación de semen en bovinos y que en el caso de la trucha arcoiris este porcentaje fue superior al 90% utilizando la tinción con eosina-nigrosina.

Para la estimación de la motilidad espermática se siguieron los lineamientos que se usan en bovinos y que pueden ser transpolados a la escala propuesta por Moccia y Munkittrick (1987) y Hara y col., (1982). Las muestras que presentaron una motilidad superior al 70% fueron las utilizadas para la criopreservación. En la literatura que se revisó, no se mencionan cuales son los

mejores porcentajes de motilidad espermática que se requieren para la criopreservación de semen de trucha; solo se indica que si no presentan una motilidad superior al 70% son descartadas, al considerarse la reducción de la motilidad en respuesta al estrés de la congelación y descongelación. Por otro lado Moccia y Munkittrick (1987), encontraron que la motilidad no suele ser un parámetro fidedigno para evaluar la capacidad fertilizante que tendrán los espermatozoides, ya que la cantidad de los mismos es lo que determina el porcentaje de los huevos inseminados que alcancen el estado oculado.

Considerando que el método para evaluar la motilidad es subjetivo debido principalmente a que en pocas ocasiones es evaluada por una misma persona y a que se utilizan diferentes soluciones para inducir la motilidad de los espermatozoides después de su colección. Esto es importante, puesto que los espermatozoides se encuentran cubiertos por el plasma seminal de la trucha y necesitan estar en contacto con el agua para poder iniciar el movimiento individual. Además de agua para inducir este movimiento, se han utilizado solución Ringer y bicarbonato de sodio.

La fertilidad obtenida después de la inseminación con semen fresco fue satisfactoria, encontrándose dentro de los rangos normales (79.1%). Algunos autores han obtenido porcentajes de fertilidad con semen fresco de 71.0 a 97.1% (Stoss y Holtz, 1981a; Kurokura e Hirano, 1980; Erdahl y Graham, 1980; Graybill y Horton, 1969; Erdahl y col., 1984), lo cual indica que los resultados obtenidos en este experimento se encuentran dentro de este rango.

Con respecto al porcentaje de eclosión (84.7%) en el grupo control, concuerda con los resultados encontrados por Stoss y Holtz, (1981a) que fue de 94.9%; sin embargo, fueron mayores a los publicados por Büyükhatoğlu y Holtz (1978), que en promedio fue de 26.2%. Los mejores porcentajes de fertilidad se obtuvieron cuando el semen se diluyó en una proporción 1:3 que cuando las diluciones que se realizan son mayores. Con base en estas observaciones, la dilución usada en este experimento fue de 1:3.

El diluyente utilizado no tuvo efectos negativos sobre los porcentajes de fertilización y eclosión al compararlo con los resultados de semen fresco (79.1% de fertilización en el grupo control vs 81.8 y 80.8% los grupos con 7 y 10% de DMSO respectivamente; y de 84.6% de eclosión en el control vs 75.1 y 89.0% de huevos eclosionados para los mismos grupos de fertilización con semen diluido). Al utilizar un diluyente se debe considerar que no active los espermatozoides, que las concentraciones de ión potasio no sean altas porque inhiben la motilidad de los espermatozoides (Billard, 1983).

Al hacer las comparaciones de los porcentajes de fertilización encontrados cuando se utilizó semen diluido se observó que son similares a los presentados por otros autores (Erdahl y col., 1984) que fueron de 65 al 75% con una dilución de 1:1 y de 60-72% con una dilución de 1:3. Asimismo, los resultados obtenidos utilizando diluyentes con concentraciones altas de DMSO (10%) fueron satisfactorios (84.4%) comparado con los de Erdahl y col., (1984), quienes obtuvieron un 82% de fertilización.

Como puede observarse en el cuadro 3, existió una disminución en la capacidad fertilizante del semen congelado (57.7 a 62.6%) comparado con el 79.1% del grupo control. En otras especies, como los bovinos, y de la misma forma en que ocurre en peces, se ha observado que las muestras de semen que son llevadas al proceso de criopreservación pierden gran parte de su capacidad fertilizante (Sorensen, 1982). Se considera que la tercera parte del total de espermatozoides muere a consecuencia de la congelación y que, gran parte de los espermatozoides vivos muestran una motilidad inferior a la observada en una muestra recién colectada.

En la revisión escrita por Stoss (1983), se hace mención respecto al rango óptimo del crioprotector usado, en este caso de DMSO, y que es de 6.8 a 12.5%, sin que esta variación influya en los porcentajes de fertilización; Erdahl y col., (1984), cuando utilizaron un 7% de DMSO, obtuvieron un rango de fertilidad variable (47-91%). Nuestros resultados pueden compararse satisfactoriamente con los de estos autores, sin embargo, la mayoría de ellos ha trabajado con pastillas en lugar de pajillas y, en esas condiciones se usan soluciones descongelantes que pueden activar a los espermatozoides antes de hacer contacto con el fluido ovárico. En 1980, Erdahl y Graham, utilizando pajillas con un 7% de DMSO, obtuvieron un 75% de fertilidad.

Si comparamos entre si las fertilidades obtenidas cuando se congeló con 7, 10 y 14% de DMSO, podemos observar que el rango en que se encuentran no es muy grande (59.3 a 67.6%).

A pesar de que la fertilidad obtenida fue satisfactoria después de la inseminación artificial las tasas de eclosión fueron muy variables (1.9 a 25.8%); estos resultados pueden deberse entre otras cosas, a que la incubación de los huevos fecundados se realizó en una incubadora horizontal rústica. En este tipo de incubadoras el agua corre libre pero no adecuadamente, y en ocasiones la calidad del agua no fue buena, puesto que estaba sucia y el fondo de la tina se llenaba de tierra y basura, lo cual influyó en la aereación de los huevos fertilizados (Roberts y Shepherd, 1980); los huevecillos de la trucha arcoiris son especialmente susceptibles al polvo o agua sucia y cuando existe, el polvo los cubre y asfixia.

Los porcentajes de fertilidad obtenidos a diferentes intervalos de tiempo guardan entre sí una gran similitud (Cuadro 4), por lo que se infiere que es posible que las muestras que se descongelen a largo plazo pueden conservar su capacidad fertilizante (Sorensen, 1982).

Como puede observarse, el semen colectado de diferentes organismos presenta un comportamiento muy similar durante el proceso de congelación y descongelación. Pudiendo obtenerse porcentajes de fertilidad aceptables (57.71-69.72%) con excepción del organismo B, en el que se obtuvo un porcentaje de fertilidad del 35.36%; esa disminución en la capacidad fertilizante pudo deberse al manejo que se le dió antes del proceso de congelación, puesto que en el segundo muestreo (B1) que se congeló, la fertilidad fue de 65.02%.

CONCLUSIONES.

1. Se considera que es posible la criopreservación de semen de trucha arcoiris en las condiciones que se presentaron en este experimento. Y si las condiciones son mejoradas, se podría realizar en forma comercial.

2. Aparentemente la motilidad espermática después de la criopreservación no es importante: este punto se basa en la observación de que la motilidad post-descongelación fue baja al momento de la inseminación artificial y el porcentaje de fertilidad en esos grupos fue satisfactorio (54.1%). Se requieren más estudios para verificar estos resultados.

3. Se menciona que la cantidad de espermatozoides vivos detectados por tinción con eosina-nigrosina se encuentra de los porcentajes esperados (88.9 a 93.6%).

4. Se abre la posibilidad de que las personas interesadas en las explotaciones trutícolas y principalmente en la congelación de semen puedan hacer modificaciones a la técnica, ya que con ella se puede beneficiar la producción de la trucha arcoiris.

BIBLIOGRAFIA.

1. ANUARIO ESTADISTICO DE PESCA. 1986. SEPESCA. México. 123 p.
2. BILLARD, R. 1983. Effects of celomic and seminal fluid and various saline diluents on fertilizing ability of spermatozoa in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *J. Reprod. Fert.* 68:77-84.
3. BÜYÜKHATİPOĞLU, S. and HOLTZ, W. 1978. Preservation of trout sperm in liquid or frozen state. *Aquaculture* 14:49-56. ✓
4. CUADERNO DE TRABAJO SOBRE PISCICULTURA No. 9. 1982. SEPESCA México. pp 9-15.
5. ERDAHL, D.A. and GRAHAM, E.F. 1980. Preservation of gametes of freshwater fish. In: 9th. Cong. Anim. Reprod. A.I. Vol. II. Madrid. España. 317-326.
6. ERDAHL, A.W., ERDAHL, D.A. and GRAHAM, E.F. 1984. Some factors affecting the preservation of salmonid spermatozoa. *Aquaculture* 43:341-350. ✓
7. GARCIA, E. 1973. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. *Instituto de Geografía*. UNAM. México, D.F....
8. GRAYBILL, J.R. and HORTON, H.F. 1969. Limited fertilization of steelhead trout eggs with cryo-preserved sperm. *J. Fish. Res. Bd. Canada.* 26:1400-1404. ✓
9. HARA, S., CANTO, T.J. and ALMENDRAS, M.E.J. 1982. A comparative study of various extenders for milkfish *Chanos chanos* (Forsskal), sperm preservation. *Aquaculture* 28:339-346.
10. HARVEY, B. and HOAR, W. 1979. The Theory and Practice of Induced Breeding in Fish. *IDRC*. Ottawa, Ont. 48 pp.
11. HORTON, H.F. and OTT, A.G. 1976. Cryopreservation of fish spermatozoa and ova. *J. Fish Res. Bd. Canada.* 33:995-1000. ✓
12. KUROKURA, H. and HIRANO, R. 1980. Cryopreservation of rainbow trout sperm. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 46:1493-1495.
13. MANUAL DE TECNICAS LIMNOBIOLOGICAS SIMPLIFICADAS. 1977. DEPECSA. Recopilación. México. pp 57, 59, 63-67.
14. MOCCIA, R.D. and MUNKITTRICK, K.R. 1987. Relationship between the fertilization of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) eggs and the motility of spermatozoa. *Theriogenology*. 27:679-688.
15. MUNKITTRICK, K.R. and MOCCIA, R.D. 1984. Advances in the cryopreservation of salmonid semen and suitability for a production-scale artificial fertilization program. *Theriogenology* 21:645-659.
16. ROBERTS, R.J. y SHEPHERD, C.J. 1980. Enfermedades de la trucha y del salmón. Ed. Acribia. Zaragoza, España. 88-91 pp.

17. RODRIGUEZ, N.R. 1987. Validez de las variables morfológicas relacionadas con la madurez sexual como método aplicativo en la selección de reproductores de trucha arco iris (*Salmo gairdneri*). Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM.

18. RUIZ, D.M.F. 1982. Desarrollo embrionario de la trucha arcoiris como aporte a la tecnología de su cultivo. *Rev. Lat. Acuicult.* 14:9-15.

19. SORENSEN, A.M. 1982. Reproducción Animal. Principios y Prácticas. McGraw Hill. México, 538 p.

20. STOSS, J. 1983. Fish gamete preservation and spermatozoan physiology. *Fish Physiol. Academic Press 9(CPB):305-350.*

21. STOSS, J. and HOLTZ, W. 1981a. Cryopreservation of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) sperm. I. Effect of thawing solution, sperm density and interval between thawing and insemination. *Aquaculture* 22:97-104.

22. STOSS, J. and HOLTZ, W. 1981b. Cryopreservation of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) sperm. II. Effect of pH and presence of a buffer in the diluent. *Aquaculture* 25:217-222.

23. ZARZA, M.E. 1982. La zootecnia acuicola en México. *Rev. Lat. Acuicult.* 14:16-25.