

# La criopreservación de esperma de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) y su importancia en la producción trutícola en México

*Nihil tam difficile est quin quaerendo investigari possiet*  
 "Nada hay tan difícil que no pueda encontrarse a fuerza de investigarlo."

MAGALY RIVERA GARZA, MIGUEL ÁNGEL DELGADO PICHARDO Y LAURA TORRENTERA BLANCO\*

## *Criopreservación de rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) sperm and its importance in trout production in Mexico*

**Abstract.** In the present study was applied the criopreservación technique to selected rainbow trout sperm at the Centro Trutícola El Zarco, Estado de Mexico, Mexico, a rainbow trout farm. After one year of observation and data collection of the life cycle, we selected adult females and males with the best characteristics of sexual maturation: average female and male body length (54 cm and 50 cm, respectively), average weight (1.5 kg) and health state (with no indication of diseases). We undertook artificial spawning and selection of viable sperm during the peak month of sperm production (January). The selected sperm from 6 males was extended with the Erdahl and Graham diluent (1980) at the ratio of 1:3 (semen:extender) and added to the extender dimetyl sulfoxide (DMSO) in a concentration of 7% as cryoprotector with an equilibrium time of the mixture of 20 min. After this treatment, semen was introduced into large straws in a volume of 0.5 ml/straw and stored in liquid Nitrogen at -196 degree C in a cryogenic tank during 7 days. We defroze the trout semen at 5 degrees C adding NaHCO<sub>3</sub> as thawing solution to activate the sperm. Different concentrations of defrozen semen were added at a constant number of ova (200 ova) and incubated during 28 days to obtain eye-eggs. The fertilization capacity of the thawed sperm and fresh sperm (from a control group) were compared yielding a semen fertilization success of 47.7% and 75%, respectively. Our results were compared with previous studies in which

similar or lower fertilization rates were obtained with the same trout species in other countries. From this work we conclude that cryopreserved sperm could be very useful in aquaculture production in Mexico, with applications in commercial hatcheries, broodstock management and international exchange of sperm banks, selective breeding sperm research programs and gene conservation from wild or native populations.

## Introducción

La acuicultura es una buena opción en la producción de alimento, un ejemplo de ello es el gran auge que ha tenido el cultivo de trucha arcoiris en todo el mundo debido a su alto valor nutritivo, poca grasa, buen sabor, dominio de su producción y rentabilidad de su cultivo.

Los países más avanzados en el área de acuicultura han desarrollado diversas técnicas para mejorar su producción, como la criopreservación, que consiste en detener prácticamente toda actividad metabólica, incluyendo la división celular, a bajas temperaturas. Este procedimiento permite preservar gametos



\* Facultad de Medicina, UAEM. Paseo Tolloca esq. Paseo Colón. Toluca, Estado de México. Agradecemos al biólogo Jorge del Castillo Collazo por su apoyo en este estudio. Al biólogo Juan Antón Pérez Hernández por facilitarnos las instalaciones y material biológico del Centro Trutícola El Zarco. Al Banco Central de Semen de la Comisión Nacional de Mejoramiento Genético y de la SARH en especial a los M.V.Z. Alberto Nuño Green, Rafael Vascos León y Enrique Moreno Cárdenas por el apoyo técnico y de instalaciones. A la Universidad Autónoma del Estado de México por el apoyo para la realización de dicho trabajo y al doctor Ricardo E. Carrillo Beltrán por la revisión editorial de este manuscrito.

bajo condiciones controladas que no inhiban su viabilidad y sus propiedades de fertilización.

La criopreservación ha tenido grandes avances dentro de la inseminación artificial que se aplica desde 1940 en ganado porcino, bovino, caprino y equino, entre otros, y apartir de los cincuentas en peces; pero es hasta la década de los setentas cuando esta técnica se empieza a aplicar en peces de importancia económica como los salmónidos, para incrementar y mejorar la producción animal.

El Estado de México es uno de los más importantes productores de trucha arcoiris en el país, y de los centros trutícolas de la entidad, El Zarco, centro trutícola dependiente de la Secretaría del Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca, es el más sobresaliente, pues abastecer huevo oculado y pies de cría a los piscicultores del estado, así como a los del centro y norte del país.

La trucha arcoiris se reproduce únicamente en los meses más fríos del año; presenta una asincronía de manera natural en su maduración sexual, pues las hembras alcanzan esta madurez antes que los machos. Este desfazamiento es mayor aún en aquellos años en que las temperaturas medias aumentan durante el invierno, lo cual puede suceder por variaciones climáticas naturales o por la urbanización de zonas adyacentes a las granjas de producción de peces. Un mayor desfazamiento en maduración sexual de machos y hembras ocasiona disminución en su producción anual, por lo que la criopreservación podría ser una alternativa para amortiguar dicha pérdida.

En el presente estudio se aplicó la técnica de criopreservación en esperma de trucha arcoiris del Centro Trutícola El Zarco. Este centro está localizado en el municipio de Huixquilucan, Estado de México, a 19° 17' latitud Norte y 99° 21' longitud Oeste, con altitud de 3,400 m.s.n.m, clima C(w<sub>2</sub>) (w) ci (templado subhúmedo) según Köpen modificado para México (García, 1988). El estudio tuvo el objetivo de analizar la capacidad de fertilización del esperma criopreservado y compararlo con la fertilización que se obtiene regularmente con esperma fresco.

## I. Metodología

### 1. Selección de adultos de trucha arcoiris

Después de un año de observaciones y registro de datos del ciclo de vida de la trucha arcoiris (Rodríguez, 1987), fueron seleccionados machos y hembras con las mejores características de madurez sexual, tamaño, peso y estado general de salud. Se seleccionaron 6 machos de trucha arcoiris con un

promedio de longitud de 49.8 cm, 13.3 cm de ancho y circunferencia de 30.5 cm con un peso promedio de 1.5 kg. Las hembras seleccionadas tuvieron una talla promedio de 56.6 cm de longitud, 14.6 cm de ancho, 32 cm de circunferencia y un peso promedio de 1.5 kg. Los peces seleccionados estaban libres de enfermedades y tenían una edad promedio entre los dos y tres años.

### 2. Desove y criopreservación del esperma

Se utilizó la técnica de desove manual en los machos durante el mes de mayor viabilidad espermática (enero). El esperma seleccionado mediante la prueba de viabilidad (técnica descrita posteriormente) fue mezclado con el diluyente de Erdahl y Graham (1980), que es una solución fisiológica con sales y algunos nutrientes en un rango de 1:3 (semen:diluyente). Se le adicionó paulatinamente dimetilsulfóxido-diluyente (DMSO) al 7% como crioprotector al diluyente-semen, dando un tiempo de equilibrio total de 20 min Después de este tratamiento la mezcla semen-diluyente-crioprotector fue almacenada manualmente en pajillas tipo francés de 0.5 ml/pajilla y selladas en su extremo con alcohol polivinílico; estas pajillas se colocaron horizontalmente en rejillas metálicas sobre vapores de nitrógeno líquido durante 12 min, posteriormente se sumergieron en nitrógeno líquido (-196°C) en un tanque criogénico 18XT Taylor-Wharton durante siete días.

### 3. Pruebas de viabilidad

Se realizaron las pruebas de motilidad y mortalidad al esperma criopreservado como indicadores de viabilidad del semen.

Para analizar la motilidad del esperma (fresco y criopreservado) se mezclaron muestras de esperma con NaHCO<sub>3</sub> y se colocaron en portaobjetos, entonces se caracterizó a los espermatozoides en movimiento y se clasificó su motilidad de acuerdo con la escala para peces propuesta por Hara, *et al.* (1982).

El porcentaje de mortalidad del esperma fresco y criopreservado se determinó tiñiendo con eosina-nigrosina mediante frotis de esperma, identificando a los espermatozoides muertos por sus cabezas teñidas (Sorensen, 1982). Este porcentaje de mortalidad del semen descongelado se comparó con el porcentaje de mortalidad del semen fresco.

El número de espermatozoides fue cuantificado en cámaras de Neubauer previamente diluidos en una relación 1:400 (0.1 M NaHCO<sub>3</sub>) de acuerdo con Sorensen (1982).

#### 4. Descongelación y fertilización con espermatozoides criopreservados

Después de las pruebas de viabilidad y para descongelar a los espermatozoides, las pajillas que contenían el semen congelado se sumergieron en agua a 5°C por un periodo de 90 segundos, inmediatamente después se cortaron los extremos de las pajillas (éstas variaban de 8 a 12) liberando el semen y depositándolo por gravedad en concentraciones variables sobre óvulos recién colectados (200) contenidos en charolas. Los óvulos y los espermatozoides se mezclaron a continuación con NaHCO<sub>3</sub> a una concentración de 119 m mol para activar a los espermatozoides, de acuerdo con Stoss y Holtz (1981a). Los huevos fertilizados se colocaron en incubadoras verticales a una temperatura de 11°C con suministro de agua de flujo continuo. Veinticuatro horas después de la fertilización se revisaron los huevos y se eliminaron a los muertos para evitar la contaminación de los fertilizados; a los 28 días de incubación se cuantificó el número de huevos fértiles oculados (embrión con desarrollo de ojos). Los huevos oculados se separaron en bastidores limpios para su eclosión.

#### 5. Análisis comparativo entre la capacidad de fertilización de semen fresco vs criopreservado

El porcentaje de fertilización obtenido con espermatozoides fresco sobre un número constante de óvulos se comparó con el porcentaje de fertilización obtenido con espermatozoides criopreservados sobre el mismo número de óvulos. Se utilizaron diferentes concentraciones de espermatozoides para determinar el número óptimo de los mismos capaces de fertilizar un número constante de óvulos y así caracterizar la capacidad de fertilización del espermatozoides criopreservados.

#### 6. Análisis estadístico de la viabilidad del espermatozoides

Se calcularon media, desviación estándar y error estándar de los resultados obtenidos: volumen y concentración espermática, motilidad y mortalidad tanto del espermatozoides fresco como del criopreservado, así como el porcentaje de viabilidad del espermatozoides descongelado y del fresco determinado en número de huevos fértiles oculados después de 28 días de incubación. El ANADEVA fue aplicado a los resultados de viabilidad espermática entre los individuos del lote experimental y del testigo. Se realizó el estadístico Duncan a las pruebas de viabilidad entre el grupo experimental y el testigo así como el estadístico Dunnett, ambos al 95% de confianza. Las pruebas estadísticas se calcularon mediante el paquete TM Graphics y Stat View SE, Abacus Co. Inc. 1988, para computadoras Macintosh.

## II. Resultados

### 1. Producción de espermatozoides

A partir de los datos obtenidos en el seguimiento de producción de espermatozoides, se determinó que el tiempo de producción de espermatozoides de trucha arcoiris en el Estado de México es de seis meses. Esta producción de espermatozoides es máxima durante cuatro meses que cubren el periodo noviembre-febrero. Se calculó que el volumen promedio de espermatozoides producido en estos cuatro meses fue de 11.65 ml/individuo, con una densidad promedio de  $5.7 \times 10^9$  espermatozoides por mililitro; el pH del semen osciló entre 6.0 y 7.0 durante los cuatro meses principales de producción. Cabe mencionar que este seguimiento de la producción anual de espermatozoides de trucha arcoiris es el primer reporte que existe al respecto en el país. En el cuadro 1 se muestran los resultados de producción de espermatozoides obtenidos de noviembre de 1993 a febrero

CUADRO 1

DATOS INDICADORES DE CONTROL DE CALIDAD DE LA PRODUCCIÓN DE ESPERMA (NOV-DIC, 1993; ENE-FEB, 1994) DE TRUCHA ARCOIRIS ( <i>ONCORHYNCHUS MYKISS</i> )					
CRITERIOS DE EVALUACIÓN	NOVIEMBRE	DICIEMBRE	ENERO	FEBRERO	$\bar{X}$
VOLUMEN DE ESPERMA (MILILITROS)	10.25	13.95	10.50	11.91	11.65
MOTILIDAD DE ESPERMA FRESCO	94.23%	92.3%	91.96%	95.06%	93.38%
(MILILITROS)	5	5	5	5	5
CONCENTRACIÓN DE ESPERMATOZOIDEOS POR MILILITRO ( $\times 10^9$ )	3.84	6.48	6.99	5.54	5.71
MORTALIDAD DE ESPERMA FRESCO	6.24%	7.44%	8.59%	9.54%	7.95%
MOTILIDAD DE ESPERMA DESCONGELADO			13.00%		
ESCALA			3		
MORTALIDAD DE ESPERMA DESCONGELADO			42.10%		

de 1994. La prueba de Duncan (95%) aplicada al análisis de la variabilidad en producción y viabilidad espermática en los cuatro meses analizados nos indicó que el volumen de esperma no varió significativamente durante los cuatro meses de producción ( $R=9.5$ ,  $P>0.05$ ). La misma prueba mostró diferencias significativas en cuanto a viabilidad espermática indicándonos que durante enero se obtuvo la mayor producción de esperma viable ( $R=3.67$ ,  $P<0.05$ ) de  $6.99 \times 10^9$  espermatozoides/ml. Estos resultados podrían estar relacionados con la temperatura, por que conforme esta variable fue descendiendo de noviembre a enero también se fue incrementando la producción de esperma, obteniéndose un máximo en enero y a partir de febrero descendió esta producción (cuadro 1). Estos registros coinciden con el trabajo de Rodríguez (1987), quien observó a nivel histológico el incremento de espermátidas durante un tiempo correlacionado con la temperatura.

CUADRO 2

ANÁLISIS DE VARIANZA DE LAS PRUEBAS DE VIABILIDAD ESPERMÁTICA, ENTRE UN GRUPO EXPERIMENTAL Y EL GRUPO TESTIGO (ENTRE INDIVIDUOS) CONDICIONES INICIALES

	GRUPO EXPERIMENTAL			
	A VOLUMEN DE ESPERMA	B MOTILIDAD DEL ESPERMA	C CONCENTRACIÓN DE ESPERMATOZOIDES	D MORTALIDAD DE ESPERMATOZOIDES
$\bar{X}$	11.91 ML	93.62%	$5.90 \times 10^9$ /ML	7.85%
DS	1.52	1.35	1.51	1.63
ES	0.50	0.50	1.67	0.735
GL	3	3	3	3
F	1.36	1.24	7.62	5.44
P	0.3019	0.3392	0.004	0.0136
	GRUPO TESTIGO			
$\bar{X}$	10.37 ML	91.97%	$4.67 \times 10^9$ /ML	8.38%
DS	1.98	2.77	1	1.81
ES	0.73	1.21	0.42	0.82
GL	3	3	3	3
F	1.77	1.39	4.24	2.73
P	0.1957	0.3964	0.0233	0.0806

DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS CUANDO  $P<0.05$ ,  $F>P$  AL 95%.

CUADRO 3

ANÁLISIS DE VARIANZA DE LAS PRUEBAS DE VIABILIDAD ESPERMÁTICA (MOTILIDAD Y MORTALIDAD) ENTRE ESPERMA FRESCO Y CRIOPRESERVADO (ENTRE GRUPOS)

	A	B	A	B
	MOTILIDAD ESPERMA FRESCO	MOTILIDAD ESPERMA CONSERVADO	MORTALIDAD ESPERMA FRESCO	MORTALIDAD ESPERMA CONSERVADO
$\bar{X}$	92.36%	13.00%	8.8%	42.06%
DS	2.25	4.47	0.77	0.80
ES	1.01	2	0.34	0.36
GL	1			1
F	3597.63		18437.67	
P	0.0001		0.0001	

## 2. Viabilidad del esperma fresco y criopreservado

La viabilidad determinada en términos de motilidad y mortalidad indicó lo siguiente:

### a) Motilidad esperma fresco

Durante los cuatro meses que duró el estudio el porcentaje de motilidad espermática promedio obtenido en los organismos seleccionados tuvo un valor de 93.3 %, que corresponde a 5.0 en la escala de Hara, *et al.* (1982).

### b) Motilidad esperma criopreservado

En este estudio se confirmó que el empleo de tiempos de equilibrio para la adición del diluyente: crioprotector al diluyente:semen, es crucial para proteger la integridad celular del espermatozoide durante la congelación. Igualmente importante resultó ser el empleo de la solución activadora durante la descongelación del semen. En aquellas muestras de semen para las que el tiempo de equilibrio fue de cero minutos la motilidad fue nula. Resultados similares de motilidad para semen criopreservado se obtuvieron cuando no se utilizó la solución activadora de  $\text{NaHCO}_3$  a 119 m mol recomendada por Stoss y Holtz (1981a), por lo que la viabilidad y capacidad de fertilización fue mínima o nula (Rivera y Delgado, 1995). Cuando el tiempo total de equilibrio empleado durante la congelación fue de 20 min y se usaron 5 ml de la solución activadora durante la descongelación para fertilizar muestras de 200 óvulos, se logró obtener un porcentaje de motilidad del 13%, que es equivalente a un valor de 3 en la escala de Hara.

### c) Mortalidad esperma fresco

La mortalidad del esperma fresco se registró durante los cuatro meses de producción máxima, observándose que la mortalidad aumenta con respecto al tiempo ( $P<0.05$ ), es decir, el número y calidad de los espermatozoides decae en relación con la regresión testicular que sufren los machos en los últimos meses de su época reproductiva, pues la mortalidad mínima se registró en noviembre (6.24%) y la máxima en febrero (9.54%).

### d) Mortalidad esperma criopreservado

La mortalidad promedio del esperma criopreservado fue de 42.10%, debida probablemente a los múltiples factores que involucra el proceso de criopreservación. Este problema de alta mortalidad ha sido poco estudiado por otros trabajos de criopreservación con

la misma especie. Munkittrick y Moccia (1984) mencionan que después del proceso de criopreservación se pierde aproximadamente una tercera parte del espermatozoide viable, reduciéndose por lo tanto la capacidad fertilizante en 33%. Durante la sección de discusión de este trabajo se analizan algunos de estos factores.

En los cuadros 2 y 3 se muestra el análisis de varianza de las características de viabilidad espermática, tanto del grupo experimental como del grupo testigo de la fase inicial (esperma fresco) y la fase final (esperma criopreservado) respectivamente. En la fase inicial (cuadro 2) se demuestra que la calidad del semen fresco es adecuada y similar en ambos grupos. A pesar de la selección cuidadosa de condiciones morfofisiológicas, existe variabilidad significativa entre los individuos de cada grupo en cuanto a las características espermáticas analizadas (volumen de esperma, concentración, mortalidad y motilidad espermática). En el cuadro 3 se muestra el análisis de varianza de la prueba de viabilidad (% de motilidad y % de mortalidad) entre esperma fresco y criopreservado, observándose que existe una diferencia significativa ( $P > 0.05$ ) entre estos grupos, la cual se debe principalmente al proceso de criopreservación.

La mayor concentración espermática viable se obtuvo en enero:  $6.99 \times 10^9$  espermatozoides/ml; mientras que la menor se observó en noviembre, que representó  $3.04 \times 10^9$  espermatozoides/ml. A partir de estas pruebas de viabilidad, se decidió seleccionar el esperma producido durante enero para la criopreservación porque reunía las mejores características.

### 3. Porcentaje de huevos fértiles oculados con esperma fresco y criopreservado

El porcentaje promedio de huevos fértiles oculados con esperma fresco fue de 75.2% con una densidad espermática de  $24 \times 10^9$  espermatozoides/ml; cuando se uso esperma criopreservado este porcentaje promedio fue de 47.7%. El cuadro 4 muestra la producción de huevos oculados con esperma fresco y criopreservado, así como los resultados obtenidos al variar el número de espermatozoides contenidos en las pajillas (de 8 a 12) utilizadas durante el experimento de fertilización con esperma criopreservado. Estos resultados indican que el porcentaje de fertilización se incrementa al aumentar el número de espermatozoides criopreservados para fertilizar un número constante de óvulos. El porcentaje de fertilización del grupo testigo (75.5%) representa el 100% que se toma como base para analizar el porcentaje de huevos fertilizados a partir de semen criopreservado.

CUADRO 4					
PRODUCCIÓN DE HUEVO OCULADO, A PARTIR DE ESPERMA FRESCO Y CRIOPRESERVADO DE TRUCHA ARCOIRIS ( <i>ONCORHYNCHUS MYKISS</i> ) EN EL CENTRO TRUTICOLA EL ZARCO					
ORG*	NÚMERO DE PAJILLAS	ESPERMATOZOIDES TOTALES POR GRUPO DE PAJILLAS ( $\times 10^9$ )	HUEVOS FERTILIZADOS (%)	DS	% HUEVOS FERTILIZADOS $\times 100$ / % HUEVOS FERTILIZADOS CONTROL
			$\bar{X}$		
1	8	24.08	31.62	2.00	42.01
2	9	27.27	34.25	9.01	45.51
3	10	31.20	36.25	1.50	48.17
4	11	37.95	38.37	3.56	50.99
5	12	45.36	39.00	3.24	51.82
6		24.00	75.25	8.52	100.0

1 A 5 = GRUPO EXPERIMENTAL; 6 = GRUPO TESTIGO  
 \* SE UTILIZÓ UN NÚMERO VARIABLE DE ESPERMATOZOIDES PARA FECUNDAR UN NÚMERO CONSTANTE DE 200 ÓVULOS CON CUATRO RÉPLICAS.

CUADRO 5		
ANÁLISIS DE VARIANZA DE HUEVOS OCULADOS CON ESPERMA FRESCO Y CRIOPRESERVADO ENTRE INDIVIDUOS		
	HUEVOS OCULADOS CON ESPERMA FRESCO (TESTIGO)	HUEVOS OCULADOS CON ESPERMA DESCONGELADO (EXPERIMENTAL)
X	150.50	71.8
DS	8.53	6.07
ES	3.81	2.72
GL	3	4
F	0.02	0.01
P	0.9964	0.9994

En el cuadro 5 se muestra el análisis de varianza de huevos oculados obtenidos a partir de esperma criopreservado y fresco, revelando que el proceso de criopreservación no afecta la capacidad de fecundación del esperma, por que no se observan diferencias significativas entre los huevos oculados de cada grupo. El porcentaje de huevos oculados con esperma descongelado (47%) en este estudio nos indica que la criopreservación de esperma en trucha arcoiris es una buena opción para incrementar la producción trutícola en México, pues estos resultados se comparan favorablemente con aquellos obtenidos en otros trabajos para esta especie reportados internacionalmente.

Los resultados de las pruebas realizadas durante este trabajo con diferentes muestras descongeladas a diferentes tiempos indican que la descongelación del esperma criopreservado debe efectuarse en un tiempo no menor de 60 segundos, porque el esperma empaquetado en las pajillas todavía está congelado y este tiempo de descongelación no debe ser mayor de 90 segundos, pues luego de ese lapso los espermatozoides comienzan a morir (Rivera y Delgado, 1995).

### III. Discusión

#### 1. Ventajas y desventajas de la criopreservación de esperma

El desfazamiento natural de la maduración sexual de machos y hembras de trucha arcoiris es una desventaja en la producción trutícola, pues sólo permite el aprovechamiento de cuatro meses de producción de

esperma y la fertilización manual de óvulos cada temporada anual, desperdiándose óvulos disponibles cuando los machos aún no son maduros y esperma disponible de buena calidad cuando las hembras ya terminaron su producción de óvulos. Sobre este hecho las observaciones de Rodríguez (1987) a nivel histológico concuerdan con las observaciones en la producción y calidad del semen durante los cuatro meses de registro presentadas en este trabajo.

La criopreservación del esperma tiene las siguientes ventajas: permite el uso eficiente de una reserva de esperma seleccionado y preservado por congelamiento para fertilizar un grupo de óvulos seleccionados para incrementar y mejorar la calidad de la producción de peces en los centros piscícolas. Nuestros estudios y los de otros autores (Stoss y Holtz, 1981a, 1981b, 1983a, 1983b; Erdahl y Graham, 1980, 1984; Schmidt-Baulain y Holtz, 1989; Wheeler y Thorgaard, 1991; Holtz, 1993) revelaron que la criopreservación de esperma de trucha es una buena opción para mejorar e incrementar la producción de las granjas piscícolas usando esperma fresco durante la temporada de producción y una reserva congelada y seleccionada para fertilizar un buen número de óvulos durante el año.

El análisis comparativo de los resultados de este estudio con los de otros autores indican que los porcentajes de fertilización obtenidos con semen criopreservado varían de una especie a otra por múltiples factores, los más importantes de ellos son los relacionados con la técnica de criopreservación, ya

que éstos pueden reducir la capacidad de fertilización del esperma a niveles muy bajos. Este trabajo y reportes previos de otros autores (cuadro 6) dan importancia a los siguientes aspectos: el tiempo transcurrido entre la colecta de semen y su almacenamiento por congelación, el uso de soluciones diluyentes y crioprotectoras para tratar de reducir el estrés térmico y osmótico en el esperma, el tiempo de almacenamiento y el tipo de depósito para semen (pajillas, pellets, ampollitas), y, finalmente, el tiempo transcurrido entre la descongelación y el uso o no de alguna sustancia activadora del esperma descongelado (Rivera y Delgado, 1995).

## 2. Medidas de control que se deben considerar en la aplicación de la técnica

Los empaques para la criopreservación de esperma son variados (ampollitas, pellets y pajillas). Erdahl, *et al.* (1984) encontraron que las pajillas ofrecen mejores rendimientos, ya que con semen de *O. mykiss* almacenado en pellets obtuvieron un porcentaje de fertilización muy bajo (5%), pero con semen almacenado en pajillas registraron porcentajes de hasta 98%. Por esta razón en este trabajo se utilizaron pajillas para el almacenamiento del esperma.

Se ha encontrado que el almacenamiento en nitrógeno líquido puede oscilar entre  $-79^{\circ}\text{C}$  y  $-196^{\circ}\text{C}$  sin que se registren diferencias significativas después de una hora de almacenamiento en dicho rango (Erdahl y Graham, 1984). En este trabajo se congeló el esperma

CUADRO 6

PRINCIPALES RESULTADOS REPORTADOS POR DIVERSOS AUTORES DEL USO DE CRIOPRESERVACION EN ESPERMA DE TRUCHA ARCOIRIS (*ONCORHYNCHUS MYKISS*)

AUTOR Y AÑO	FERTILIZACIÓN CON ESPERMA DESCONGELADO	FERTILIZACIÓN CON ESPERMA FRESCO	CONDICIONES EXPERIMENTALES				
	(%)	(%)	TEMPERATURA DE CONGELACIÓN	TIEMPO DE CONGELACIÓN	CRIOPROTECTOR	TIEMPO DE EQUILIBRIO	TIPO DE EMPAQUE
GRAYBILL Y HORTON (1969)	18	87.2	$-196^{\circ}\text{C}$	14-28 DÍAS	DMSO	30 MIN	AMPULAS
OTT Y HORTON (1971)	57	97	$-196^{\circ}\text{C}$	7 DÍAS	DMSO	120 MIN	AMPULAS
BUYUKATIGOGLU Y HOLTZ (1978)	12-45	58-95	$-196^{\circ}\text{C}$	3-4 MESES	DMSO	NDT	PELLETS
ERDAHL Y GRAHAM (1980)	40-60	90	$-79^{\circ}\text{C}$	1 HORA	DMSO 7%	10 MIN	PAJILLAS
STOSS Y HOLTZ (1981A)	75.3	97.1	$-196^{\circ}\text{C}$	3-7 DÍAS	DMSO	NDT	PELLETS
(1981B)	83.2	97	$-196^{\circ}\text{C}$	2-4 DÍAS	DMSO	NDT	PELLETS
(1983A)	75.5	91.5	$-196^{\circ}\text{C}$	2-6 DÍAS	DMSO	NDT	PELLETS
(1983B)	77.7	95.5	$-196^{\circ}\text{C}$	1-6 DÍAS	DMSO	NDT	PELLETS
ERDAHL <i>ET AL.</i> (1984)	89	93	$-196^{\circ}\text{C}$	1-2 DÍAS	DMSO 7%	NDT	PAJILLAS
SCHMIDT-BAULAIN Y HOLTZ (1989)	71.9-49.1	96.9	$-196^{\circ}\text{C}$	?	DMSO	NDT	PELLETS
WHEELER Y THORGAARD (1991)	88.8	89.2	$-196^{\circ}\text{C}$	?	DMSO	NDT	PAJILLAS
RIVERA Y DELGADO (1994)	42-52	75.5	$-196^{\circ}\text{C}$	7 DÍAS	DMSO 7%	20 MIN	PAJILLAS

NDT = NO SE DETERMINÓ.

de trucha arcoiris a una temperatura de  $-196^{\circ}\text{C}$  en Nitrógeno líquido durante una semana, porque es el tiempo que más se ha utilizado por otros investigadores como tiempo base. Para poder aplicar esta técnica posteriormente con más meses de almacenamiento es necesario incrementar las investigaciones que lleven a una estandarización de la técnica y a la optimización de la misma para poder aprovechar al máximo las ventajas de la criopreservación.

Schmidt-Baulain y Holtz (1989) encontraron que es importante determinar un tiempo óptimo entre la colecta del esperma fresco y su congelación, porque la tasa de fertilización —o sea, el porcentaje de huevos oculados— de *O. mykiss* obtenida con semen congelado puede reducirse por pérdida de viabilidad del semen si ese tiempo es muy prolongado. Estos autores, haciendo pruebas con tiempos mínimos de 0.33 min a tiempos máximos de 360 min encontraron fertilizaciones que iban de 74% a 50%, respectivamente. Por lo tanto, estos autores recomiendan coleccionar el semen directamente en la mezcla crioprotector-diluyente, con la idea de reducir al máximo la pérdida de viabilidad debido al tiempo transcurrido entre la colecta y la criopreservación. En el presente trabajo el porcentaje de huevos oculados con semen criopreservado (47%) es menor que los porcentajes reportados por los autores anteriores debido a las condiciones de trabajo, las cuales impidieron reducir al máximo el tiempo entre la colecta de esperma y su crioprotección, pues esta operación se llevó a cabo en un tiempo promedio de 50 minutos. Por lo anterior, se recomienda mantener las muestras de semen y el equipo que se requiere en el mismo laboratorio, para evitar pérdidas de viabilidad de espermatozoides por desnaturalización con respecto al tiempo. En relación a las demás condiciones experimentales recomendadas por los autores anteriores y por otros estudios, éstas fueron implementadas en este trabajo y se presentan en el cuadro 6 para su análisis y comparación.

Los resultados de fertilización de este trabajo y los resultados de otros autores se resumen en el cuadro 6; los más sobresalientes son los siguientes: Stoss y Holtz (1983b) reportaron un porcentaje de fertilización con esperma criopreservado de 77% de huevos oculados. Estos autores encontraron diferencias significativas entre diferentes concentraciones de DMSO y tiempos de equilibrio (con una probabilidad de ANADEVIA de  $P < 0.01$ , y el estadístico Tukey  $P < 0.05$ ). Estos mismos autores encontraron que es determinante el cálculo de la concentración de DMSO, así como del tiempo de equilibrio entre la mezcla esperma:DMSO:diluyente para contrarrestar la alta mortalidad debida al estrés osmótico (cuadro

6), con una concentración de 10 ml DMSO (3.6-12.5% v/v) y un tiempo de equilibrio de 60 segundos ( $P < 0.01$ ) son las condiciones más adecuadas. Stein (1979) reportó una concentración óptima de DMSO de 7.5%, mientras que Ott y Horton (1971), ubicaron la concentración óptima de esa sustancia en 10.8% (ambos reportados en Stoss y Holtz, 1983b). Otros autores reportan tiempos de equilibrio muy variables que oscilan entre 10 min y 120 min (Graybill y Horton, 1969; Ott y Horton, 1971; Erdhal y Graham, 1980). En este trabajo se seleccionó al DMSO como crioprotector en una concentración de 7% con un tiempo de equilibrio total de 20 min e intervalos entre cada adición del diluyente:crioprotector al diluyente:semen de 5 min; con estas condiciones se logró un porcentaje de fertilización con el esperma criopreservado de 42 a 52% de huevos oculados.

Otros estudios han reportado porcentajes de viabilidad espermática y porcentajes de fertilización con esperma criopreservado muy variables, tanto con la misma especie (cuadro 6) como con otras. Los porcentajes de fertilización reportados varían desde 38% en el salmón Chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) hasta 83.2% en el salmón rosado, *Oncorhynchus gorbacha* (Erdhal y Graham, 1984). En nuestro trabajo los porcentajes de fertilización obtenidos (% de huevos oculados) para trucha arcoiris *O. mykiss* se consideran adecuados a nivel internacional.

## Conclusiones

En este trabajo se demuestra que la técnica de criopreservación es una alternativa para incrementar la producción piscícola en nuestro país. La trucha arcoiris, *Oncorhynchus mykiss*, sólo se reproduce una vez al año, en los meses más fríos y debido al desfase de maduración entre machos y hembras de esta especie, existe un desperdicio de gametos: de óvulos al inicio del ciclo reproductivo y de espermatozoides al final. Mediante la criopreservación se puede almacenar el esperma excedente en cada temporada; de este modo es posible ampliar la fertilización durante el año y por lo tanto incrementar la producción, aprovechando al máximo el potencial de los centros trutícolas afectados en el presente por problemas ambientales diversos, como los aumentos de temperatura ambiental, los cuales exacerbaban el desfazamiento en la maduración sexual entre machos y hembras.

El seguimiento de la producción anual de esperma de trucha arcoiris que se hace en este trabajo constituye, hasta donde fue detectado en la revisión bibliográfica efectuada previamente, el primer reporte que existe al respecto en el país. Dicho seguimiento

permitió determinar que durante enero es cuando se obtienen las mejores características espermáticas.

El éxito de fertilización con esperma criopreservado observado en esta investigación depende de múltiples aspectos, la mayoría de éstos están directamente relacionados con la técnica de congelamiento, por lo cual son perfectibles; en consecuencia deben buscarse las condiciones óptimas de criopreservación para llegar al rendimiento óptimo en términos de viabilidad y capacidad de fertilización del esperma criopreservado, estableciendo así una técnica estandarizada de criopreservación adecuada a la especie. También confirmamos la importancia de usar un tiempo de equilibrio en la adición de la mezcla diluyente:crioprotector al diluyente:semen, durante la

congelación. Del mismo modo se confirmó que el empleo de una solución activadora durante la descongelación de esperma almacenado en pajillas permite incrementar el porcentaje de motilidad espermática y la fertilización.

El esperma criopreservado puede usarse potencialmente como una técnica de manejo para protección e introducción de genes de poblaciones nativas o silvestres, para renovar genéticamente líneas de los centros piscícolas y proveer de semen a programas de selección de líneas. La formación de bancos de semen de peces en nuestro país permitiría el establecimiento e intercambio en programas de investigación a nivel nacional e internacional encaminados a mejorar la calidad y la producción piscícola en México. ♦

#### BIBLIOGRAFÍA

- Büyükhapitoglu, S. y Holtz, W. (1978). "Preservation of trout sperm in liquid or frozen state" en *Aquaculture*. No. 14.
- Erdahl, A., Erdahl, D. y Graham, E. (1984). "Some factors affecting the preservation of salmonid spermatozoa", en *Aquaculture*. No. 43.
- Erdahl, D. y Graham, E. (1980). "Preservation of gametes of freshwater fish" en 9th Cong. Anim. Reprod. A. I. Vol II.
- García, E. (1988). *Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen*. UNAM, México.
- Graybill, J. y Horton, H. (1969). "Limited fertilization of steelhead trout eggs with cryo-preserved sperm", en *J. Fish. Res. Board. Can.* No. 33.
- Hara, S., Canto, J. y Almendras, J. (1982). "A comparative study of various extenders for milkfish *Chanos chanos* (forsskal), sperm preservation", en *Aquaculture*. No. 28.
- Holtz, W. (1993). "Cryopreservation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) sperm: practical recommendations", en *Aquaculture*. No. 110.
- Munkittrick, K. y Moccia, R. (1984). "Advances in the cryopreservation of salmonid semen and suitability for a production-scale artificial fertilization program", en *Theriogenology*. No. 21.
- Rivera, G. y Delgado, P. (1995). *Criopreservación de esperma en trucha arcoiris (Oncorhynchus mykiss)*. UAEM Escuela de Ciencias. Tesis Profesional.
- Rodríguez, N. (1987). *Validez de las variables morfológicas relacionadas con la madurez sexual como método aplicativo para la selección de reproductores de trucha arcoiris (Salmo gairdneri) en condiciones de cultivo*. UNAM Facultad de Ciencias. Tesis Profesional.
- Schmidt-Baulain, R. y Holtz, W. (1989). "Deep-freezing of rainbow trout *Salmo gairdneri* sperm at varying intervals after collection", en *Theriogenology*. No. 32 Vol. 3.
- Sorensen, A. (1982). *Reproducción animal. Principios y prácticas*. Mc Graw-Hill.
- Stoss, J. y Holtz, W.
- \_\_\_\_ (1981a). "Cryopreservation of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) sperm. I. Effect of Thawing solution, sperm density and interval between thawing and insemination", en *Aquaculture*. No. 22.
- \_\_\_\_ (1981b). "Cryopreservation of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) sperm. II. Effect of pH and presence of a buffer in the diluent", en *Aquaculture*. No. 14.
- \_\_\_\_ (1983a). "Cryopreservation of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) sperm. III. Effect of proteins in the diluent, sperm from different males and interval between collection and freezing", en *Aquaculture*. No. 31.
- \_\_\_\_ (1983b). "Cryopreservation of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) sperm. IV. The effect of DMSO concentration and equilibrium time on sperm survival, sucrose and KCl as extender components and osmolality of the thawing solution", en *Aquaculture*. No. 32.
- Wheeler, P. y Thorgaard, G. (1991). "Cryopreservation of rainbow trout semen in large straws", en *Aquaculture*. No. 93.