

**SUBVENCIÓN ESPECIAL N° 308-2006-CONCYTEC-0AJ**

## **PROTOCOLOS**

### **PROYECTO:**

**Innovación tecnológica de los procesos de producción masiva de ovas y alevinos de trucha (*Oncorhynchus mykiss*) en la Región de Puno.**

**Consultor:**  
**Prof. Dr. Iván Valdebenito Isler**  
**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE TEMUCO**  
**CHILE**

**Marzo de 2007**

## **Protocolo para la extracción y fecundación de ovas de trucha arcoiris**

### **I. Introducción**

Determinar tempranamente el momento de la ovulación de una hembra de trucha arcoiris, es clave para obtener altos porcentajes de fecundación, ya que la máxima fertilidad de los gametos de salmónidos se produce cerca de cuatro días después de la ovulación y en trucha arcoiris se obtienen porcentajes de fecundación altos hasta 70 Unidades Térmicas Acumuladas (UTA) después de la salida de los oocitos del ovario, lo que implica cerca de 7 días si se cultiva con 10°C. Luego de este tiempo, las ovas se sobremaduran y su fertilidad es baja. Por esta razón, si se mantienen reproductores a temperaturas cercanas a 10°C, bastará con que se evalúe una vez a la semana la madurez de las hembras.

### **II. Actividades**

Las actividades que se deben realizar para extraer y fecundar las ovas de trucha arcoiris se pueden dividir en las siguientes etapas:

- 1. Determinación de madurez**
- 2. Desove**
- 3. Evaluación de calidad**
- 4. Fecundación artificial**

### **III. Materiales:**

Los materiales necesarios para la obtención y fecundación de los gametos femeninos de la trucha arcoiris son: redes para la captura de reproductores, anestésico, tanque para anestesiado, mangas para el traslado de reproductores, contenedores para ovas, guantes de lana, incubadores.

### **IV. Desarrollo del proceso**

Actividades a realizar en las diferentes etapas de la extracción y fecundación de ovas de trucha arcoiris.

#### **1. Determinación de madurez**

Esta etapa es clave en el éxito de la fase de reproducción artificial de la trucha arcoiris, ya que una hembra puede tener la mejor calidad de ovas desde el punto de vista nutricional y genético, pero si sus gametos son extraídos después del periodo viable de ellos, la tasa de fecundación podría ser de 0%. Por esto, regularmente los planteles que realizan esta etapa del ciclo de vida de la trucha arcoiris, semanalmente están chequeando el estado de madurez de los especímenes con el fin de utilizar la mejor calidad de gametos.

Los indicadores utilizados para identificar si una hembra está ovulada, son los siguientes:

- Abdomen blando
- Liberación de ovas a través del poro genital
- Vaciamiento de los márgenes del poro al poner a la hembra de “cabeza”.

Regularmente y dependiendo de la variedad de truchas utilizada, se produce un marcado desarrollo del poro genital (Fig. 1), el que además adquiere un aspecto rojizo o hemorrágico y se marcan notoriamente los colores nupciales.



**Figura 1. Aspecto del abdomen y del poro genital (flecha) de una hembra de trucha arcoiris después de la ovulación.**

Una vez identificada la ovulación en una hembra, esta será separada del plantel de reproductores y trasladada a otro estanque a la espera de realizar el desove, el que regularmente se realiza uno o dos días después de la identificación de la ovulación.

## **2. Desove**

En la trucha arcoiris, el desove se realiza en forma manual, utilizando la yema de los dedos, o bien, el antebrazo. Para esto se debe anestesiar los especímenes y luego de secarlos, con una mano enguantada se toma firmemente la hembra desde el pedúnculo, con la otra mano, se masajea (y presionando levemente) el abdomen desde la región anterior a la posterior (Fig. 2). Si la hembra está ovulada, las ovas se liberarán suavemente acompañadas de un líquido claro y transparente (el líquido celómico). Como se señaló en protocolo de manejo de semen, este líquido es un activador espermático natural, por lo que si se encuentra en buenas condiciones, se debe conservar las ovas en él con el fin evitar la deshidratación y eventuales daños mecánicos a las ovas.

Se debe cuidar de mantener siempre la hembra con la cabeza hacia abajo, de lo contrario las ovas serán liberadas a través del poro genital.

Las ovas deben ser recibidas en contenedores limpios y secos. Luego de su extracción deben permanecer en un recipiente a la espera de que sean fecundadas.

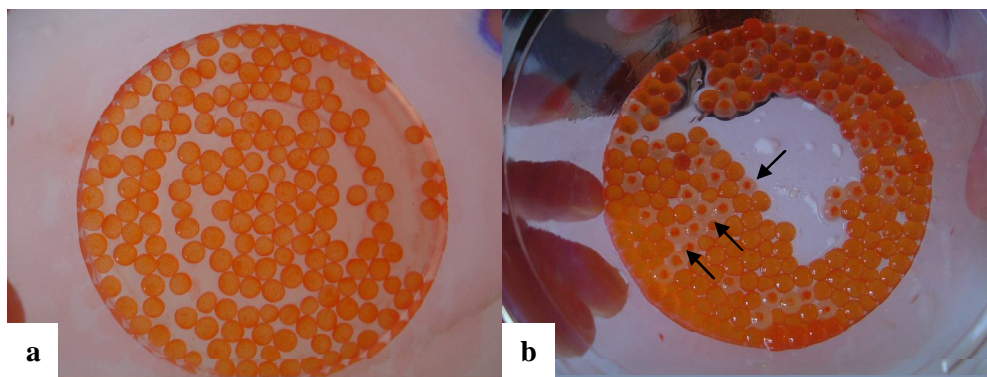


**Figura 2. Extracción de ovocitos de una hembra de trucha arcoiris mediante masaje abdominal (stripping).**

### **3. Evaluación de calidad**

Después de la extracción, las ovas deben ser evaluadas macroscópicamente para determinar su nivel de sobremadurez. Para esto se debe introducir suavemente la mano enguantada y moverlas suavemente, si se detectan algunas ovas muy turgentes, de mayor tamaño que las otras, con el vitelo separado en una porción anaranjada que contiene todo el pigmento y otra, más transparente que contiene el material lipídico del ovocito. Este aumento de tamaño y coloración, es producto de la sobremaduración y esas ovas no serán fecundadas. Las ovas de buena calidad, son aquellas de color anaranjado homogéneo, de forma irregular y poco turgentes (Fig. 3a y b).

Si el porcentaje de ovas sobremaduras en una hembra es muy alto, es recomendable eliminar todas las ovas, ya que el porcentaje de fecundación será bajo y además de inutilizar el incubador en que se dispongan, serán una fuente de materia orgánica para el desarrollo de agentes patógenos como el saprolegnia. Además, de generar más trabajo al personal de la piscicultura.



**Figura 3. a: Ovas de trucha arcoiris de aparente buena calidad y b: Ovas de truchas arcoiris con signos de sobremadurez (flechas).**

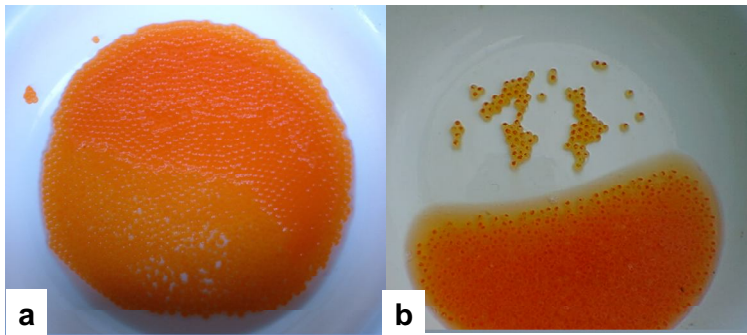
#### **4. Fecundación artificial**

La fecundación artificial se realiza siguiendo las siguientes etapas:

- a. Mezcla de gametos**
- b. Reposo**
- c. Lavado**
- d. Hidratación**

##### **a. Mezcla de gametos**

Para obtener altos porcentajes de fecundación, el espermatozoide requiere un medio líquido para desplazarse y encontrar el micropilo (orificio existente en el corion del ovocito) para tomar contacto con la membrana del ovocito. Para esto, se recomienda mantener las ovas en el líquido celómico que las acompaña, siempre y cuando, este se observe transparente, de aspecto homogéneo y bien líquido (Fig. 4). En caso contrario, se recomienda sustituirlo con una solución salina al 0,98% de NaCl que evitará el choque osmótico del espermatozoide y le permitirá desplazarse en busca del ovocito.



**Figura 4. a: Ovas de trucha arcoiris con líquido celómico de buena calidad. b: Ovas con líquido celómico alterado (hemorrágico).**

Para mezclar los gametos, lo más fácil y efectivo, es incorporar el semen sobre las ovas e inmediatamente, trasvasiar con suavidad la mezcla a otro contenedor (Fig. 5). Una vez realizado, volver al contenedor original la mezcla y así sucesivamente por tres veces. Esto permitirá una mezcla homogénea de los gametos y facilitará el encuentro del espermatozoide con los ovocitos (ovas).



**Figura 5. Aplicación del semen a ovas de truchas arcoiris durante la fecundación artificial. Se observa el contenedor vacío para realizar la mezcla de los gametos.**

### **b. Reposo**

Después de la mezcla de los gametos, se deben dejar reposar por cinco minutos en un ambiente de baja luminosidad y temperatura.

### **c. Lavado**

Después del reposo, se debe agregar agua de cultivo al interior del contenedor de las ovas con mucha suavidad. Tratando de hacer caer el agua con un ángulo para que adquiera una fuerza centrípeta en el interior del contenedor. Una vez lleno, se debe eliminar el agua agregada tratando que arrastre el exceso de semen y las impurezas (ovas reventadas, material fecal, coágulos de sangre, ovas sobremaduras, etc.). Repetir este proceso cuantas veces sea necesario para eliminar todas las impurezas. Una vez limpias las ovas, se debe agregar agua en forma abundante y dejar reposar.

### **d. Hidratación**

Después que las ovas han sido fecundadas, se produce la reacción cortical producto de la liberación de los gránulos corticales. Esto produce que el agua ingrese a la ova por osmosis, haciendo que esta aumente significativamente su tamaño y además, se vuelva muy turgente.

Para esto, las ovas deben estar en reposo con abundante agua de la mejor calidad por al menos 30min en un ambiente sombrío y a baja temperatura (Fig. 6).



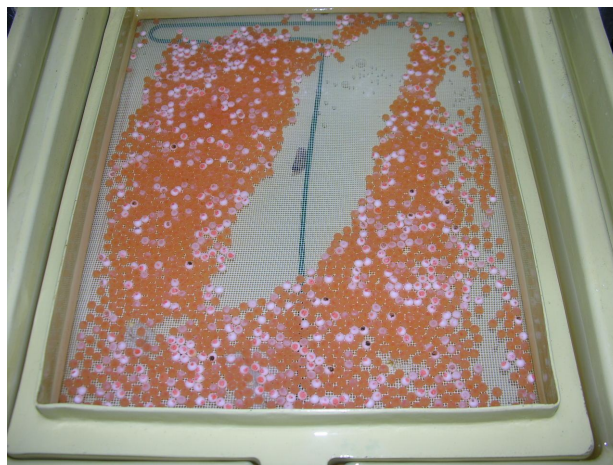
**Figura 6. Ovas de trucha arcoiris en proceso de hidratación.**



#### **e. Incubación**

Cumplido el tiempo de hidratación, las ovas están listas para ser incubadas, por lo que deben ser trasladadas a los incubadores con flujo abierto. La cantidad de ovas por incubador es muy variable y depende del tamaño de las ovas, del tipo de incubador utilizado y de la calidad del agua. En los incubadores verticales (tipo head-tecna), regularmente se incuban un litro de ovas por bandeja, o sea, aproximadamente 10.000 ovas. Los flujos también son variables en función de la calidad y cantidad de agua de la que se dispone, pero frecuentemente se debe disponer al menos de 1L/min de agua por cada 10.000 ovas que se incuban.

Hasta esta etapa, es conveniente mantener las ovas de cada hembra en forma individual. De manera que al tomar contacto con el agua, las ovas sobremaduras se tornarán blancas (Fig. 7). Es conveniente que antes de ingresar a los incubadores, las ovas blancas (muertas) sean eliminadas. Si un alto porcentaje de las ovas de una hembra se tornan blancas, se deberán eliminar todas, de manera que sólo comiencen el proceso aquellas ovas de aparente buena calidad. Una identificadas las ovas en buenas condiciones y si no hay control sanitario de por medio, se pueden mezclar las ovas de varias hembras para completar el volumen a mantener en cada incubador.



**Figura 7. Ovas de truchas arcoiris en el momento de la introducción en el incubador. Se observan ovas blancas (muertas) y anaranjadas (vivas).**

## **Protocolo para el manejo del semen de trucha arcoiris**

### **I. Introducción**

En salmónidos, mientras el espermatozoide se encuentra en el fluido seminal, los iones de  $K^+$  aquí presentes, hacen que el espermatozoide esté inmóvil, pero al tomar contacto con el agua o líquido celómico de la hembra, los iones de  $Ca^{++}$  que contienen estas soluciones, gatillan instantáneamente la actividad flagelar del espermatozoide. Este posee un anillo mitocondrial de sólo algunas mitocondrias, por lo que el tiempo de duración de la motilidad en condiciones naturales es de aproximadamente 45 a 60s, dependiendo de la temperatura y del pH del medio en que se diluyó. Después de este breve tiempo, se detiene su actividad flagelar al agotarse su capacidad de generar ATP y, aunque vivos, son incapaces de fecundar por carecer de energía para desplazarse. Esta es la razón por la que durante los procesos productivos, los recipientes en los que se recibe el semen deben estar extremadamente limpios y secos.

En la naturaleza, el factor que sí lleva a la destrucción del espermatozoide es el medio hipoosmótico (agua dulce) en el que es eyaculado el semen, este hace que el espermatozoide absorba agua por osmosis hasta reventar. Por esta razón, durante los procesos artificiales de fecundación es recomendable utilizar el líquido celómico que acompaña a las ovas (si este se encuentra de buen color y aspecto homogéneo), o bien, sustituirlo por una solución salina.

El espermatozoide durante la fertilización artificial, debe encontrarse a una temperatura idealmente no mayor a los 10 °C y en un pH óptimo de 8,8 a 9,0. Las temperaturas altas si bien es cierto provocan una actividad flagelar mayor, lo hacen por un tiempo más corto. El pH con valores muy ácido (menos de 6,5) pueden inhibir totalmente la motilidad espermática y con ello, la fertilidad del espermatozoide. Esta es la razón por la cual los activadores espermáticos mejoran la fertilidad del espermatozoide de salmónidos, ya que estas soluciones mantienen el equilibrio osmótico, regulan el pH y mejoran la capacidad de obtener energía del espermatozoide, esto prolonga su motilidad y con ello, los porcentajes de fecundación.

Los factores ambientales también pueden afectar la viabilidad del espermatozoide del pez, por ello se debe evitar el contacto directo con la luz, ya que éste es un potente espermicida. Por lo anterior, el semen después de su extracción y durante el periodo de evaluación temprana, debe mantenerse en ambiente de luz tenue u oscuro y a temperaturas no superiores a 4°C. En ausencia de un microscopio, la calidad del semen se puede estimar preliminarmente al observar su viscosidad y color (muy blanco a levemente anaranjado), ya que esto indica que no se ha contaminado con restos fecales o renales. El semen con estas características es potencialmente de buena calidad, para verificarlo, se debe evaluar la motilidad, que es uno de los mejores indicadores de la fertilidad del semen de peces.



## **II. Actividades**

Las actividades a realizar se pueden dividir en:

- 1. Selección de peces maduros**
- 2. Extracción del semen**
- 3. Almacenamiento del semen**
- 4. Evaluación de calidad (motilidad espermática)**
- 5. Fecundación**

## **III. Materiales**

Para el manejo del semen se necesitan los siguientes materiales: redes para la captura de especímenes, anestésico, mangas para el traslado de reproductores, contenedor para anestésico, toalla desechable o paños limpios para secar el cuerpo del pez, guantes, recipientes para la recolección del semen, nevera para el almacenamiento del semen, microscopio, porta y cubre objetos, gotario, solución activante y probeta.

## **IV. Desarrollo del proceso**

### **1. Selección de peces maduros**

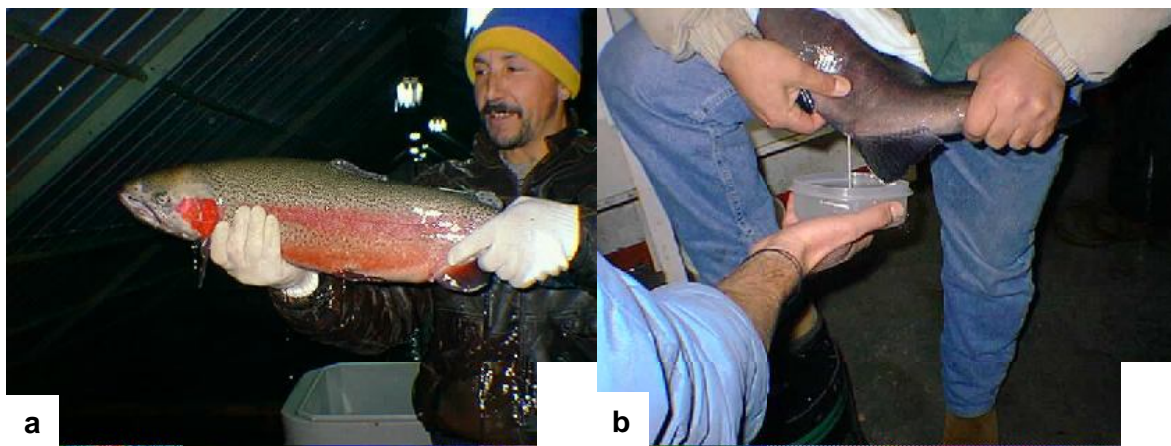
La identificación de los peces maduros es muy fácil, ya que los especímenes que pueden ser utilizados para la fecundación artificial son aquellos que liberan semen al recibir un leve masaje abdominal (Fig. 1a). El semen de “aparente” buena calidad es aquel que se observa bien fluido, de color blanco y “desaparece” rápidamente al tomar contacto con el agua. Para esto, es recomendable que los peces se encuentren anestesiados, regularmente se utiliza Benzocaína (BZ-20) en dosis de 15 a 20ml por metro cúbico de agua, o bien, MS222 en dosis de 1g por 20L de agua.

Para la etapa de selección los peces solo deben estar aletargados, de manera que se puedan capturar con facilidad y evaluar la liberación de semen desde el poro genital. Los peces considerados como maduros deben ser separados del estanque de los reproductores y dispuestos en un estanque especial a la espera de la extracción, que puede ser el mismo día de la selección, o el día siguiente.

### **2. Extracción del semen**

Para la extracción del semen, los especímenes deben estar en estado de narcosis profunda, con el fin de evitar dañarlos producto de caídas o movimientos bruscos producidos por el manipulador. En trucha arcoiris el semen de machos normales se extrae mediante masaje abdominal, tomando el espécimen con una mano enguantada desde el pedúnculo y con la mano libre, se realiza un suave masaje desde la región anterior hacia la posterior (Fig. 1b). Una vez liberado el semen (aproximadamente 10ml por macho), se debe evaluar su calidad

bajo un microscopio y almacenar utilizando materiales limpios, secos e idealmente, desechables a temperatura idealmente de entre 2-3°C (Fig. 2a y b).



**Figura 1. a: Características fenotípicas de una macho sexualmente maduro de Trucha arcoiris. b: Extracción de semen mediante masaje abdominal.**

### **3. Almacenamiento del semen**

El semen se debe almacenar en tientos plásticos de al menos 500ml de volumen y cuidando que la película de semen tenga un grosor máximo de 2mm. Además, se debe evitar el contacto del semen con el agua, ya que esto gatilla la motilidad espermática que se prolonga sólo por un minuto aprox..

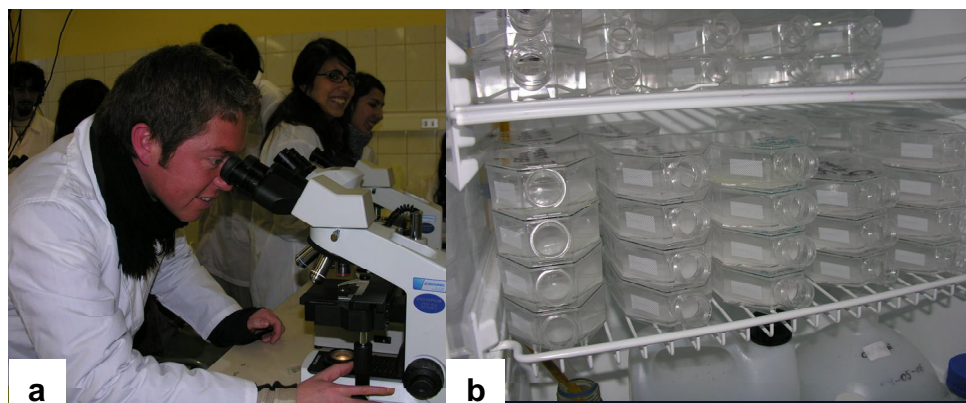
Una vez en los contenedores de almacenamiento, se debe proteger de las altas temperaturas y exceso de luz, almacenándolo en una caja de pluma-vit que contenga una pequeña cantidad de hielo para mantener la temperatura baja (entre 2-3°C), pero sin congelar (Fig. 2b). Si el semen se va a almacenar por más de un día, se le debe incorporar oxígeno al interior del contenedor con el fin de evitar que los espermatozoides se asfixien. Para el almacenamiento prolongado del semen, se debe diluir una parte de semen en dos partes de diluyente espermático y mezclarlos suavemente. Luego se debe almacenar al interior de un refrigerador a una temperatura de aproximadamente 2-3°C, cuidando que la película de semen no sea mayor a 2mm. Diariamente se debe realizar una suave agitación con el fin de evitar que los espermatozoides precipiten e inyectar oxígeno al interior del contenedor.

### **4. Evaluación de calidad (motilidad espermática)**

Para evaluar la calidad del semen, lo más recomendable es determinar su nivel de motilidad espermática. Para esto, se debe poner en un porta objeto ubicado en la platina de un microscopio (Fig. 2a), una pequeña alícuota de semen muy próxima a una gota de agua o de

activador espermático. Con la ayuda de una aguja, se debe poner en contacto el semen con el agua y observar el nivel de actividad flagelar que alcanzan los espermatozoides. Si se observa que todos los espermatozoides se mueven vigorosamente (valor 5 en la Escala de Evaluación de Sanchez-Rodríguez y Billard, 1967, Tabla 1), quiere decir que éste es de buena calidad y se puede utilizar para fertilizar.

El semen almacenado, debe ser evaluado nuevamente (rechequeado) antes de utilizarlo en la fecundación de un grupo de ovas.



**Figura 2. a: Evaluación microscópica del nivel de motilidad del semen de Trucha arcoiris. b: Frascos de cultivo utilizados para el almacenamiento de semen de salmónidos.**

## **5. Fecundación**

### **a. Semen fresco (sin diluir)**

En salmónidos, el semen tiene una densidad espermática de entre  $10$  y  $25 \times 10^9$  espermatozoides/ml. Esto significa que con 1ml de semen, se podrían fecundar todas las ovas de una temporada de desoves de cualquier piscicultura. Razón por la cual, bastará una pequeña alícuota de semen para fecundar los ovocitos de una hembra. Sin embargo, para dejar tranquilo al piscicultor, regularmente se utiliza aproximadamente 1ml de semen para 1L de ovas.

### **b. Semen almacenado (diluido)**

Después del almacenamiento, se debe rechequear la motilidad espermática y determinar su calidad. Si el semen presenta una alta actividad flagelar puede ser utilizado igual que el semen fresco, sólo se debe considerar la dilución realizada, por lo que será necesario utilizar aproximadamente 3ml de la mezcla de semen-diluyente para un litro de ovas.

Para obtener altos porcentajes de fecundación, el espermatozoide requiere un medio líquido para desplazarse y encontrar el micropilo (orificio existente en el corion del ovocito) para tomar contacto con la membrana del ovocito. Para esto, se recomienda mantener las ovas en el líquido celómico que las acompaña, siempre y cuando, este se observe transparente, de aspecto homogéneo y bien líquido. En caso contrario, se recomienda sustituirlo con una

solución salina al 0,98% de NaCl que evitará el choque osmótico del espermatozoide y le permitirá desplazarse en busca del ovocito.

Para mezclar los gametos, lo más fácil y efectivo, es incorporar el semen sobre las ovas e inmediatamente, trasvasiar con suavidad la mezcla a otro contenedor. Una vez realizado, volver al contenedor originar la mezcla y así sucesivamente por tres veces. Esto permitirá una mezcla homogénea de los gametos y facilitará el encuentro del espermatozoide con los ovocitos (ovas).

**Tabla. 1. Escala de evaluación de motilidad espermática para peces según Sánchez-Rodríguez & Billard (1967).**

<b>VALOR</b>	<b>TIPO DE MOVILIDAD</b>
<b>5</b>	Todos los espermatozoides se desplazan vigorosamente y es imposible fijar la vista en uno de ellos.
<b>4</b>	La mayoría de los espermatozoides se desplaza rápido, algunos lo hacen lento.
<b>3</b>	Los espermatozoides presentan 3 comportamientos: <ul style="list-style-type: none"><li>• Algunos se desplazan vigorosamente.</li><li>• Algunos se desplazan lentamente.</li><li>• Algunos están inmóviles.</li></ul>
<b>2</b>	Pocos espermatozoides se desplazan rápidamente, muchos lo hacen lentamente la mayoría está inmóvil.
<b>1</b>	Algunos espermatozoides se agitan ligeramente, la mayoría está inmóvil.
<b>0</b>	Ningún espermatozoide se mueve

## **Protocolo para el traslado de ovas de trucha arcoiris.**

### **I. Introducción**

Para el traslado de gametos femeninos (ovas) de trucha arcoiris, se deben seguir las mismas reglas señaladas para el traslado de semen. Es decir, estas deben ser trasladadas en ambiente frío y a baja temperatura. Regularmente, las ovas deben ser trasladadas en el líquido celómico que las acompaña para reducir impactos mecánicos producidos durante el viaje.

### **II. Actividades**

Las actividades que se deben realizar para el traslado de ovas de trucha arcoiris se pueden dividir en las siguientes etapas:

- 5. Evaluación de calidad**
- 6. Empaquetado**
  - a. Inyección de oxígeno**
  - b. Introducción en contenedor**
- 3. Recepción**

### **III. Materiales:**

Los materiales necesarios son: cajas de tecnopor, bolsas de nylon, oxígeno, cinta de embalaje y hielo.

### **IV. Desarrollo del proceso**

Actividades en las diferentes etapas de la recepción de ovas

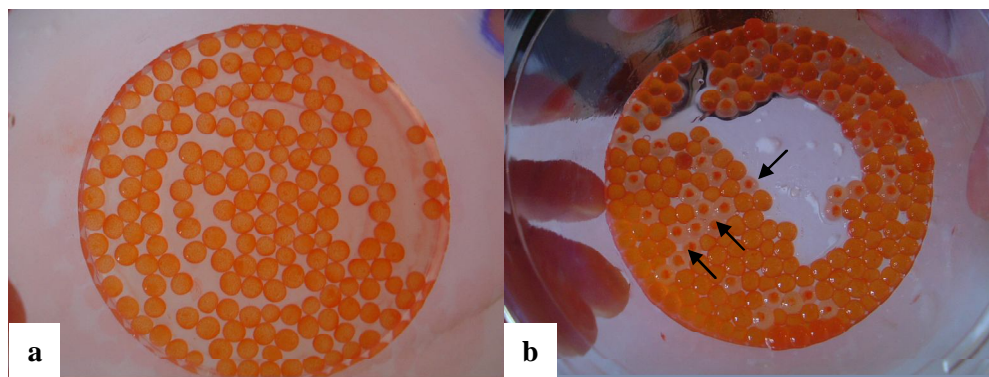
#### **1. Evaluación de calidad**

Regularmente, la calidad de las ovas se puede evaluar de dos maneras

##### **a. Visualmente**

Después de la extracción, las ovas deben ser evaluadas macroscópicamente para determinar su nivel de sobremadurez. Para esto se debe introducir suavemente la mano enguantada y moverlas suavemente, si se detectan algunas ovas muy turgentes, de mayor tamaño que las otras, con el vitelo separado en una porción anaranjada que contiene todo el pigmento y otra, más transparente que contiene el material lipídico del ovocito. Este aumento de tamaño y coloración, es producto de la sobremaduración y esas ovas no serán fecundadas. Las ovas de buena calidad, son aquellas de color anaranjado homogéneo, de forma irregular y poco turgentes (Fig. 1a y b).

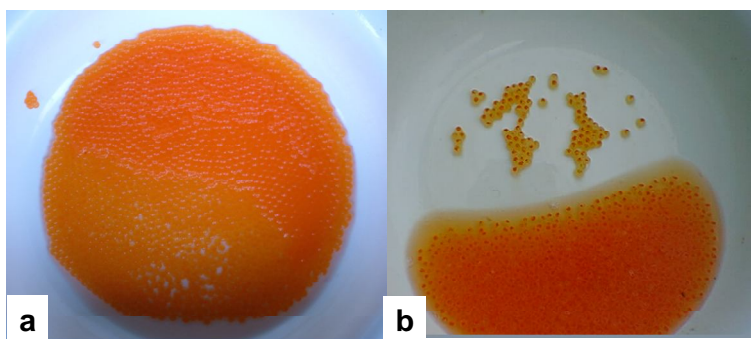
Si el porcentaje de ovas sobremaduras en una hembra es muy alto, es recomendable eliminar todas las ovas, ya que el porcentaje de fecundación será bajo y además de inutilizar el incubador en que se dispongan, serán una fuente de materia orgánica para el desarrollo de agentes patógenos como el saprolegnia. Además, de generar más trabajo al personal de la piscicultura.



**Figura 1. a: Ovas de trucha arcoiris de aparente buena calidad y b: Ovas de truchas arcoiris son signos de sobremadurez (flechas).**

#### **b. Salinidad del líquido celómico**

Las ovas de truchas, siempre están acompañadas del líquido celómico que es una solución que en la naturaleza ayuda a prolongar la motilidad espermática. Por esto, se recomienda mantener las ovas en el líquido celómico que las acompaña, siempre y cuando, este se observe transparente, de aspecto homogéneo y bien líquido (Fig. 2a y b). Cuando las ovas se sobremaduran, la salinidad del líquido celómico aumenta, por esto se puede medir la salinidad con un refractómetro y determinar su calidad (Fig. 3). Regularmente, valores cercanos a 18ppt se asocian a ovas de buena calidad. Valores superiores a 50ppt, están asociados a ovas sobremaduras.



**Figura 2. a: Ovas de trucha arcoiris con líquido celómico de buena calidad. b: Ovas con líquido celómico alterado (hemorrágico).**



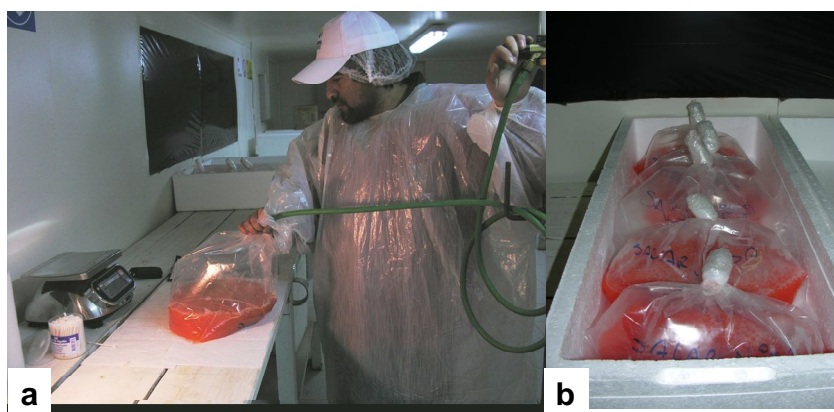


**Figura 3. Evaluación de la salinidad del líquido celómico en salmónidos.**

## **2. Empaquetado**

### **a. Inyección de oxígeno**

Una vez determinada la calidad de las ovas, se deben preparar para el traslado, para esto se debe inyectar abundante oxígeno al interior de la bolsa de nylon que contiene las ovas (Fig. 4), luego de esto, se deben sellar adecuadamente con el fin de que el oxígeno no se pierda durante el viaje.



**Figura 4. a. Inyección de oxígeno a la bolsa con ovas para su traslado. b: Disposición de las bolsas con ovas para el traslado.**



### **b. Introducción en contenedor**

Una vez inyectado el oxígeno a las bolsas, se deben disponer en el interior de las cajas de transporte, debidamente selladas para evitar el aumento de temperatura (Fig. 4b). Si las ovas son muy pocas, se deben acompañar de bolsas con hielo en el interior, pero sin que las ovas tomen contacto con el hielo. Las ovas deben ser separadas del hielo utilizando material aislante como el tecnopor. Se debe procurar mantener la temperatura interior de la caja con temperaturas de entre 2 a 4°C.

### **3. Recepción**

Al recibir las ovas, se deben disponer en un lugar sombrío y de baja temperatura. Una vez abierta la caja, se debe medir la temperatura interior y corroborar que no vienen bolsas rotas.

Una vez realizado esto, se debe abrir las cajas y extraer las ovas y disponer las ovas en los contenedores de fecundación (Fig. 5) y proceder según protocolo de fecundación.



**Figura 5. Recepción de ovas. a: apertura de las cajas. b: Apertura de las bolsas con ovas. c: Disposición de las ovas en contenedores de fecundación.**

## **Protocolo para incubación de ovas de trucha arcoiris.**

### **I. Introducción**

La etapa de incubación es una etapa clave en la producción piscícola. Corresponde a la etapa del desarrollo embrionario de los peces. En peces, el desarrollo no se mide en días sino en función del calor acumulado, o Unidades Térmicas Acumuladas (UTA), que no es otra cosa que la suma del promedio diario de temperatura a la que son incubadas las ovas (embriones). En truchas, el estado de embrión de ojos pigmentados (“ova con ojos”) se alcanza aproximadamente a las 210UTA, eso significa que si se incuba a 10°C se alcanzará este estado a los 21 días. Pero si se incubara a 5°C, se alcanzaría a los 42 días, aproximadamente porque existen otros factores que modelan el desarrollo, como el nivel de oxígeno y la salinidad, por ej. De manera que existe una relación inversamente proporcional entre el tiempo de duración del desarrollo de la trucha y la temperatura del agua a la que son incubadas.

Para esta etapa, se requiere agua de la mejor calidad física y química. Debe estar saturada de oxígeno y sin partículas en suspensión. Idealmente, la temperatura debe encontrarse entre 8 y 10°C. Durante toda la etapa de incubación, los embriones (ovas) deben ser mantenidos bajo oscuridad.

Esta etapa del desarrollo de las truchas es la más crítica frente a las acciones mecánicas, especialmente entre los 5-10 días de incubación, pero en la práctica se asume que mientras los embriones no pigmenten sus ojos (o se transformen en “ovas con ojos”) a las 210UTA, no deben ser movidos o manipulados.

### **II. Actividades**

Las actividades que se deben realizar durante la incubación de ovas de trucha arcoiris se pueden dividir en las siguientes etapas:

- 7. Estimación del número de ovas iniciales.**
- 8. Incubación**
- 9. Schoking**
- 10. Reincubación**

### **III. Materiales:**

Los materiales necesarios para la incubación de ovas de truchas son: incubadores, regla de Von Bayer, pipetas de limpieza, desinfectante, baldes y mangueras.

#### IV. Desarrollo del proceso

Las actividades que se deben realizar en las diferentes etapas del proceso de incubación se inician asignando a cada hembra un número, el que será registrado en una planilla en la que se consignará: La especie, grupo de reproductores al que pertenece, fecha del desove, ubicación (número de incubador en que se ubicarán las ovas), volumen de ovas producido, número de ovas en reglilla Von Bayer, fecundidad, sobrevivencia a “ojos”, sobrevivencia a la eclosión.

Las actividades que se deben realizar son:

##### 1. Estimación del número de ovas iniciales

Existen dos métodos para estimar el número de huevos en peces. El Método Directo, que implica contar individualmente las ovas de una hembra o contenedor. Esto se realiza manualmente mediante paletas que contienen 100 o hasta 1000 orificios del diámetro de las ovas que se van a contar. De manera que cada “paleteo” realizado significa que se han contado el número de orificios (ovas) que contiene la paleta. Por lo laborioso del proceso, este es poco utilizado y regularmente se utilizan Métodos Indirectos de cuantificación de huevos. Los más utilizados son los métodos de Von Bayer, de Burrows o gravimétrico.

El Método de Von Bayer consiste de cuantificar el número de ovas hidratadas y sin presionar que entran en la regla de Von Bayer (reglilla en forma de canal de 30cm de longitud). Con este valor se busca en la Tabla de Von Bayer el diámetro que tienen las ovas y el número de ovas por litro (Tabla 1).

**Tabla 1. Tabla de Von Bayer utilizada para estimar el número de ovas por litro en peces. El número de ovas es estimado en una reglilla de 30cm.**

Número de ovas	Diámetro (cm)	Número / litro	Número de ovas	Diámetro (cm)	Número / litro	Número de ovas	Diámetro (cm)	Número / litro
31	0.98	1232	61	0.50	9386	91	0.33	31161
32	0.95	1355	62	0.49	9855	92	0.33	32200
33	0.92	1486	63	0.48	10340	93	0.33	33262
34	0.90	1625	64	0.48	10840	94	0.32	34346
35	0.87	1773	65	0.47	11356	95	0.32	35454
36	0.85	1929	66	0.46	11888	96	0.32	36585
37	0.82	2095	67	0.45	12437	97	0.31	37741
38	0.80	2269	68	0.45	13002	98	0.31	38920
39	0.78	2453	69	0.44	13584	99	0.31	40124
40	0.76	2647	70	0.44	14184	100	0.30	41352
41	0.74	2850	71	0.43	14800	101	0.30	42605
42	0.73	3064	72	0.42	15434	102	0.30	43883
43	0.71	3288	73	0.42	16087	103	0.30	45186
44	0.69	3523	74	0.41	16757	104	0.29	46515
45	0.68	3768	75	0.41	17445	105	0.29	47870
46	0.66	4025	76	0.40	18152	106	0.29	49251
47	0.65	4293	77	0.40	18878	107	0.28	50658
48	0.64	4573	78	0.39	19624	108	0.28	52091
49	0.62	4865	79	0.39	20388	109	0.28	53552
50	0.61	5169	80	0.38	21172	110	0.28	55039
51	0.60	5485	81	0.38	21976	111	0.27	56554
52	0.59	5814	82	0.37	22800	112	0.27	58096
53	0.58	6156	83	0.37	23644	113	0.27	59666
54	0.56	6511	84	0.36	24509	114	0.27	61294
55	0.55	6880	85	0.36	25395	115	0.27	62891
56	0.54	7262	86	0.35	26302	116	0.26	64546
57	0.53	7658	87	0.35	27230	117	0.26	66229
58	0.53	8068	88	0.35	28180	118	0.26	67942
59	0.52	8493	89	0.34	29152	119	0.25	69684
60	0.51	8932	90	0.34	30145	120	0.25	71456

El método de Burrows consiste en estimar por desplazamiento (principio de Arquímedes) el volumen que ocupan 50 ovas. Luego se determina el volumen total de ovas mediante un jarro graduado y por medio de una regla de tres simple, se estima el número de ovas contenidas en el volumen total. De igual forma, con el método gravimétrico se estima el peso de 50 ovas, luego se pesa el total y por regla de tres simple, se estima el número total de ovas que contiene esa biomasa.

Luego de conocer el número de ovas de cada hembra y de saber que sanitariamente, las ovas están sanas, se puede iniciar el proceso de incubación propiamente tal.

## **2. Incubación**

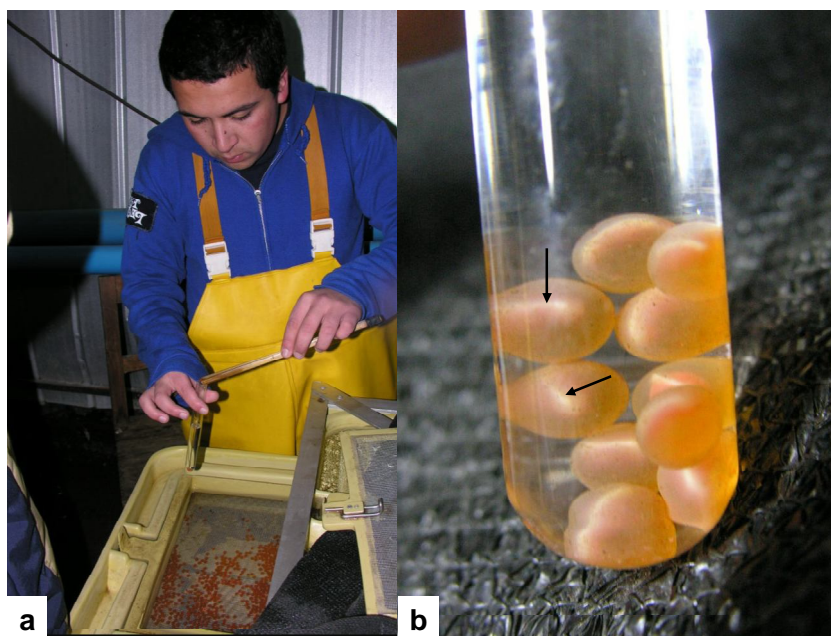
Como se señaló anteriormente, todo el proceso, desde la fecundación en adelante, se debe realizar en ausencia de luz, ya que los rayos UV pueden matar a un porcentaje importante de los embriones. Además, se reitera la necesidad de usar agua de la mejor calidad térmica y física, es decir, en ausencia de sólidos en suspensión.

Se debe recordar además, que durante esta etapa los embriones son muy débiles y no deben ser sometidos a estrés mecánicos (movimientos bruscos), razón por la cual no deben ser movidos hasta que se alcance el estado de embrión de ojos pigmentados, comúnmente denominado “ova con ojos”.

Para incubar, se recomienda utilizar un flujo de agua de al menos 1L/min por cada 10.000 ovas y día por medio, aplicar algún tratamiento antimicótico con algún producto autorizado. En la actualidad, en Chile el producto que asegura mejores resultados es el Bronopol que se utiliza en dosis de 50ml/m<sup>3</sup> de agua durante una hora (corroborar tratamiento con recomendaciones del fabricante).

Cuando los embriones alcancen cerca de 70UTA, se debe determinar el porcentaje de fecundación de las ovas. Para esto se debe preparar una solución de ácido acético al 10% (si no se dispone de este ácido, se puede utilizar vinagre de vino al 5%) y agregar esta solución en un tubo de ensayo hasta la mitad de su capacidad. De cada bandeja de incubación, se debe tomar cerca de 20 embriones e introducirlos en la solución. Agitar algunos minutos y esperar a que en los embriones se evidencie: Una línea de color blanco si las ovas han sido fecundadas y la línea observada corresponde al tubo neural. O bien, se observará un disco blanco, que indica que la ova no fue fecundada y lo que se observa es el disco embrionario (Fig. 1).

Cuando los embriones acumulen 230UTA, pueden ser manipulados con el fin de eliminar las ovas sin fecundar, los embriones débiles o muertos.



**Figura 1. Metodología para determinar el porcentaje de fecundación de ovas de trucha arcoiris. a. Introducción de ovas en ácido acético. b: Ovas embrionadas con el tubo neural en formación (flechas).**

### **3. Schoking**

Este proceso no es más que someter a los embriones a un golpe hídrico una vez que han alcanzado el estado de “ova con ojos”. Para esto se debe esperar que los embriones se pigmenten muy bien, una vez observado esto, las “ovas con ojos” son sacadas de su incubador mediante sifoneo y dejadas caer en el interior de un balde que inicialmente se encuentra con un 25% de su capacidad. Una vez que se ha succionado a todas las ovas del incubador (y que ahora se encuentran en el interior del balde) se deben filtrar en un colador y llevar al sitio en el que se separarán las ovas vivas (naranjas) de las muertas (blancas). En este momento se debe cuantificar con un frasco graduado el volumen total de ovas.

La separación de las ovas vivas de las muertas se puede realizar manualmente mediante “picaje”, que consiste en tomar con una bombilla o cánula las ovas muertas del interior del incubador. Una vez separadas, se cuantifica el volumen de ovas vivas y muertas, con el método de Von Bayer, se puede estimar el número total de ovas sobrevivientes y comenzar con ellas la próxima etapa. Si las cantidades de ovas cultivadas son muy altas, se recomienda el uso de una seleccionadora de ovas, máquina que mediante un haz de luz, es capaz de separar las ovas vivas de las muertas a una velocidad de hasta 100.000ovas por hora, incluso algunas máquinas realizan el recuento de las ovas vivas y muertas.

#### **4. Reincubacion**

Si se quiere comercializar “ovas con ojos”, se deben despachar después de realizar el schoking. Si la empresa pretende producir alevines, se debe disponer los sistemas de eclosión que permitan obtener las larvas sin manipular en exceso a los especímenes cultivados, disponiendo los embriones en estanques o bateas de alevinaje. Lo más recomendable es utilizar incubadores con fondo de rejilla de 2-3mm de abertura y que deben ser dispuestos a media agua, de manera que cuando se produzca la eclosión, las larvas al manifestar su geotactismo positivo, pasarán al fondo del estanque o la batea en que se encuentran los incubadores. Los embriones muertos o que no fueron capaces de eclosionar, quedarán sobre la rejilla y podrán ser sacados fácilmente cuando finalice la eclosion. La columna de agua durante la eclosión no debe superar los 20cm de altura y la intensidad luminosa debe ser baja o nula.

En trucha arcoiris, regularmente la absorción del saco vitelino de la larva se prolonga por cerca de 150UTA, lo que equivale a 15 días si la temperatura de cultivo se encuentra cercana a 10°C. Regularmente, se debe estar extrayendo la mortalidad y alevines deformes que se encontrarán en esta etapa.

## **Protocolo para la fase de alevinaje de trucha arcoiris.**

### **I. Introducción**

Las larvas de peces (comúnmente llamadas “alevines de saco”) no requieren alimentarse porque se nutren en forma endógena con las reservas alimenticias contenidas en el saco vitelino. Una de las etapas más críticas en el ciclo de vida de una especie, es cuando debe pasar de la alimentación endógena a la exógena. De hecho, se ha demostrado que en salmónidos silvestres, cerca del 80% de los especímenes muere en esta etapa. Sin embargo, en cultivo esta mortalidad no debiera superar el 5%.

La alimentación exógena debe comenzar en forma gradual cuando la larva aún conserva cerca de un 20% del saco vitelino, en este momento aunque la larva aún se nutre de su saco vitelino, ya tiene su boca funcional y puede comenzar a adaptarse al sabor, color, textura y forma de captura del alimento inerte, de manera que cuando el saco ya está absorbido, se tendrá un alevín que ya es capaz de alimentarse por sí solo.

Se debe considerar que en la primera y segunda fase del alevinaje se trabaja con especímenes que tienen conductas absolutamente diferentes:

En la primera fase, la larva (que aún posee saco vitelino) no se alimenta, es gregaria, es bentónica, tiene fototactismo negativo y geotactismo positivo. El objetivo de esta fase debe ser que la mayor cantidad del saco vitelino se transforme en tejidos corporales del espécimen, por lo que se debe trabajar con bajo flujo y luminosidad.

En la segunda fase, el alevín es pelágico, necesita luminosidad abundante para alimentarse y tenderá a mantenerse lejos del fondo del estanque.

### **II. Actividades**

Las actividades que se deben realizar durante el alevinaje se pueden dividir en las siguientes etapas:

**11. Larvicultura (alimentación endógena)**

**12. Alevinaje (alimentación exógena)**

### **III. Materiales:**

Los materiales necesarios para la fase de alevinaje son: estanques o artesas de fondo y paredes muy suaves, útiles de aseo, alimento, etc..



#### **IV. Desarrollo del proceso**

Actividades en las diferentes etapas del alevinaje:

##### **1. Larvicultura (alimentación endógena)**

La fase de alimentación endógena y exógena se deben realizar en la misma unidad de cultivo. El color de estanque más utilizado es el gris perla, aunque también son adecuados de color celeste o verde claro.

- Una vez instaladas las larvas en los estanques se debe considerar que la etapa de absorción del saco vitelino en la trucha arcoiris se prolonga por cerca de 150UTA, o sea, cerca de 15 días si se mantienen a 10°C.
- Las larvas tenderán a quedarse en el fondo del estanque y por su conducta gregaria, formarán grandes grupos en alguna porción del estanque (frecuentemente cerca de la entrada del agua). Aunque en truchas no es relevante, si la conducta gregaria es muy marcada, se puede agregar sustrato en el fondo del estanque con el fin de reducir el apiñamiento de los especímenes.
- Durante esta etapa se debe mantener oscuridad absoluta.
- Regularmente, se debe trabajar a una tasa de cambio igual a uno. Esto dependerá de la cantidad de oxígeno disponible, si fuera menor, se deberá aumentar levemente.
- Se recomienda medir el oxígeno a la salida de los estanques. Idealmente no debiera bajar de 5mg/L. Valores menores a 4mg/L ponen en riesgo la sobrevivencia de las larvas.
- Regularmente, se debe retirar la mortalidad y alevines deformes. Cuantificando adecuadamente los especímenes que se observan normales o deformes (cola de violín, siameses, cíclopes, mandíbula deforme, lordosis, escoliosis, etc.).
- Sólo si el agua presenta sedimento, se debe limpiar el fondo del estanque. Para esto se utiliza un suave flujo de agua (de la misma con la que se están cultivando las larvas) y se comienza a arrastrar el sedimento o especímenes muertos hacia la salida del estanque con la fuerza del flujo de agua.
- Cuando los especímenes comiencen a nadar en la columna de agua (a levantarse), se debe comenzar aplicar una mayor luminosidad al interior del estanque. Esto se logra levantando la protección del estanque, o aplicando luces de baja intensidad luminosa sobre el estanque.
- En esta etapa se puede ofrecer pequeñísimas cantidades de alimento de arranque. Idealmente con tamaños de partículas de 150 a 300µm de diámetro, con la mayor flotabilidad posible con el fin de que permanezca el mayor tiempo posible en la columna de agua y las larvas, aun lentas para nadar, puedan capturar pequeñas cantidades de alimento.

## **2. Alevinaje (alimentación exógena)**

Una vez que la mayor parte de los especímenes se encuentra nadando en la columna de agua, se comienza con la fase de alevinaje propiamente tal.

- Para facilitar la captura del alimento por los peces, se debe mantener una intensidad luminosa de 400lux en la superficie del agua y si existe el recurso, se puede mantener 24hr de luz.
- El alimento se debe suministrar “a libre disposición” la mayor cantidad de veces posible (pero en pequeñas dosis, no necesariamente a saciedad) y las 24hr del día. Esto implicará que se suministrará cerca de un 6 a 8%PC por día en alimento.
- La tasa de cambio se debe aumentar a no más de 1,5 veces por hora. Aunque se debe revisar en forma periódica el oxígeno de salida de los estanques. Tratando siempre de mantener 5mg/L de salida. Si el valor es mayor, se puede reducir levemente el flujo, si es menor, se debe aumentar.
- Parte del alimento que se suministrará no será utilizado por los peces y se acumulará en el fondo del estanque. Esto implicará que diariamente, se aplique la limpieza con el flujo de agua con la manguera igual que en la etapa anterior. Se debe registrar diariamente la mortalidad extraída y diferenciar sus malformaciones. Como ahora no existen especímenes en el fondo del estanque (salvo los muertos), se puede utilizar con mucho cuidado un cepillo o brocha para “barrer” el fondo del estanque y eliminar partículas contaminantes que pudieran estar adheridas a las paredes.
- Durante esta fase, si se alimenta durante el día solamente, los especímenes por lo menos duplicarán su peso cada 15 días aprox., por lo que no se recomienda realizar controles de crecimiento antes del mes de cultivo. Si se alimenta las 24hr del día, los especímenes presentarán crecimientos mucho mayores, fácilmente un 300% en un mes.
- Si esta fase se realiza en estanques exteriores y no se cuenta con energía eléctrica, se debe cubrir el estanque con malla negra que evite la luz directa sobre los peces, pero que se mantenga una adecuada iluminación indirecta en el interior de los estanques. Si se cuenta con energía eléctrica, se recomienda cubrir el estanque con malla de mayor protección (80%) y aplicar sobre los estanques tubos fluorescentes que puedan mantener cerca de 400lux en la superficie del agua. Como se señaló anteriormente, pueden ser durante las 24hr del día para mejorar la alimentación.
- Cuando los especímenes alcancen dos gramo de peso, pueden ser trasladados a sistemas de menor control como balsas jaulas y resistir traslados de varias horas de duración.
- Cuando no se registran brotes de enfermedades infecciosas, esta fase no debiera presentar mortalidades superiores al 5%.

## **Protocolo para la recepción, desinfección y reincubación de ovas de trucha arcoiris.**

### **I. Introducción**

Regularmente, los embriones de trucha arcoiris se pueden trasladar sin problemas una vez que alcanzan el estado de embrión de ojos pigmentados (regularmente llamado “ova con ojos”), estado del desarrollo en el que resisten acciones mecánicas fuertes como las recibidas durante el traslado de un continente a otro.

El transporte se realiza en cajas de tecnopor (pluma-vit) nuevas en el interior de las cuales se disponen las bandejas con ovas cubiertas con un paño húmedo. La bandeja superior viene sin ovas y se encontrará llena de hielo, este debe ser preparado con la misma agua de cultivo con el fin de que durante el viaje, este se derrita y el agua generada, escurra por entre las bandejas que contienen las ovas. El número de bandejas con ovas dependerá de la cantidad adquirida. La bandeja inferior debe venir vacía (sin ovas), con el fin de que el agua generada durante el viaje, se acumule en el espacio del fondo de la caja y no mueva en exceso a los embriones, lo que podría provocar la mortalidad de un porcentaje importante de ellos.

### **II. Actividades**

Las actividades que se deben realizar durante la recepción de ovas se pueden dividir en las siguientes etapas:

**13. Actividades anteriores a la apertura de las cajas.**

**14. Actividades posteriores a la apertura de las cajas:**

- c. Hidratación**
- d. Desinfección**
- e. Aclimatación**
- f. Reincubación**

### **III. Materiales:**

Los materiales necesarios son: Termómetro, jarros de plástico graduados, desinfectante yodado, reloj o cronómetro, hielo (preparado con agua de cultivo o clorada, en este último caso, debe estar dispuesto en bolsas de nylon que no estén rotas), tanque de desinfección (con flujo cerrado), tanque de aclimatación (con flujo abierto), probetas e incubadores.

## IV. Desarrollo del proceso

Actividades a desarrollar en las diferentes etapas de la recepción de ovas

### 1. Actividades anteriores a la apertura de las cajas.

Una vez recibidas las cajas con ovas se debe corroborar lo siguiente:

- Que se cumpla con toda la normativa vigente en relación al transporte de ovas dentro o fuera del país.
- Que las cajas no vengán dañadas y debidamente etiquetadas.
- Que estén acompañadas con el correspondiente certificado sanitario.
- Que tengan señaladas las UTA que tenían los embriones al momento de ser empacados en su piscicultura de origen.

### 2. Actividades posteriores a la apertura de las cajas.

Este proceso se debe realizar en el interior de una sala que tenga baja iluminación y su temperatura ambiente esté bajo 10°C. Una vez abiertas las cajas, se debe retirar la bandeja superior que solo contiene hielo y utilizarlo para bajar la temperatura del agua (si fuera necesario) que se utilizará en la desinfección. Luego se debe introducir cuidadosamente un termómetro entre las ovas con el fin de conocer la temperatura a la que se encuentran.

- Hidratación:** Durante el traslado, las ovas se deshidratan, razón por la cual se debe recuperar el balance hídrico de los embriones una vez abierta las cajas. Esto se realiza utilizando agua que se encuentre a la misma temperatura de las ovas, agregándola en flujos intermitentes durante aproximadamente 15min.
- Desinfección:** Una vez hidratadas las ovas, deben ser desinfectadas con algún compuesto yodado a una concentración de 100mg/L de yodo activo por un tiempo de 10min. Idealmente en este proceso las ovas deben estar dentro de incubadores cerrados, con el fin de que no se escapen de las bandejas y para trasladar fácilmente los embriones de una solución a otra.
- Aclimatación:** Después de la desinfección, los embriones deben ser trasladados rápidamente al sistema de aclimatación, el que contendrá agua a la misma temperatura que las ovas. Una vez introducidas las ovas, se debe abrir levemente el flujo del tanque o artesa, con el fin de que la temperatura del agua se incremente en aproximadamente 1°C por hora. Así, si existe un gradiente térmico de 4°C entre las ovas y el agua de cultivo, se deberá intentar que en cuatro horas se alcance la temperatura de la piscicultura. Mientras se realiza la aclimatación, se puede realizar la cuantificación del total de ovas recibido, ya sea por el método de Von Bayer u otro.
- Reincubación:** Una vez que las ovas han alcanzado la temperatura del agua de cultivo de la piscicultura, pueden ser trasladadas a los sistemas de reincubación

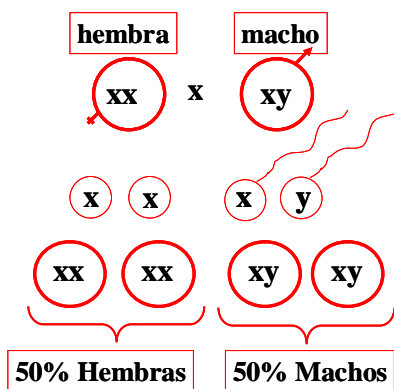
según metodología estándar de la piscicultura, es decir, aproximadamente incubar 10.000 ovas por cada bandeja de un incubador vertical.

Luego de 24hr de la recepción, extraer y cuantificar los embriones muertos y larvas eclosionadas. Estos valores no debieran ser superiores al 1-2% del total de ovas.

## Protocolo para la producción de poblaciones monosexo (todas hembras) en trucha arcoiris.

### I. Introducción

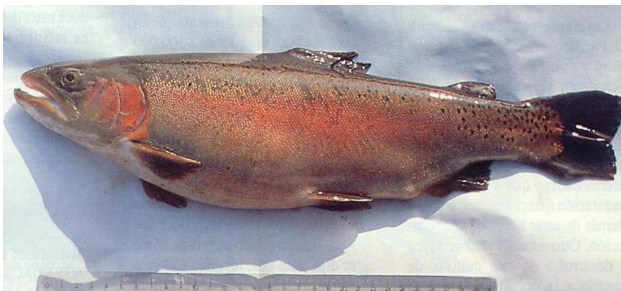
En salmónidos, el sexo está determinado genéticamente por los cromosomas sexuales X e Y. El genotipo de una hembra es XX, en cambio el de un macho es XY. Esto implica que en un proceso reproductivo normal (al azar), donde se encuentren gametos masculinos y femeninos en forma numerosa, siempre existirá la posibilidad de que la descendencia presente un 50% de especímenes machos y 50% de especímenes hembras (Fig. 1).



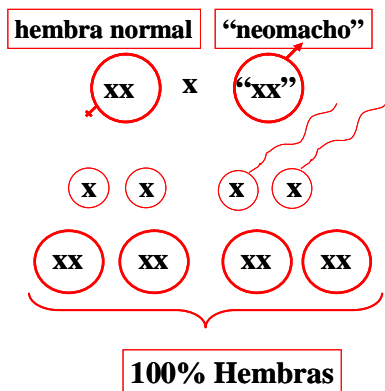
**Figura 1. Genotipos y descendencia probable de encontrar en un proceso reproductivo normal en truchas.**

Estos cromosomas determinarán la presencia de caracteres sexuales primarios (ovarios o testículos) y secundarios (forma de la mandíbula, tamaño de la cabeza, color externo, conducta agresiva en los machos, etc.).

En los animales, la composición genética que determina el sexo de un individuo no se puede modificar. Pero en peces, sí se puede modificar la expresión fenotípica del sexo. Esto ocurre regularmente, poco después de la eclosión, si artificialmente, el cultivador mantiene a sus peces en ambientes ricos en hormonas masculinas, las hembras de esa población modificarán su desarrollo gonadal hacia un testículo. Este individuo llamado productivamente “neomacho” (Fig. 2) ya que genéticamente es hembra, pero fenotípicamente es macho, desarrollará un testículo que podrá producir espermatozoides, pero todas estas células contendrán el cromosoma X. Por lo tanto, si se fecunda un grupo de ovocitos (que solo contienen el cromosoma X) con este semen la descendencia será 100% hembras (Fig. 3), comúnmente denominadas “toda hembra”.

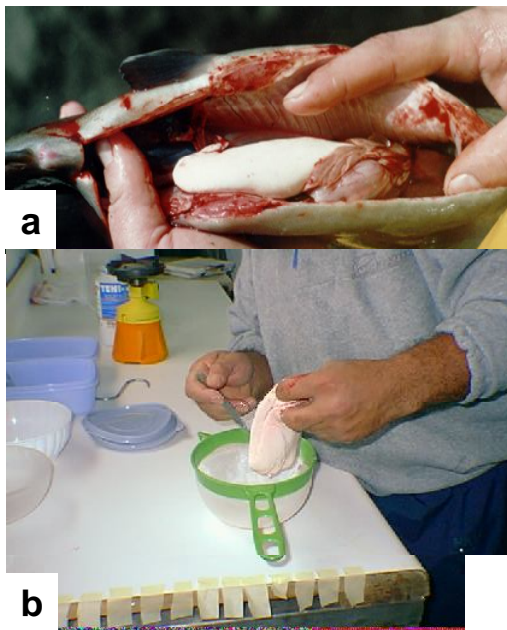


**Figura 2. Especimen “neomacho” (XX) de trucha arcoiris de dos años de edad con signos de maduración sexual.**



**Figura 3. Genotipos y probabilidad de descendencia entre una hembra normal y un "neomacho".**

La problemática surge porque el testículo de los "neomachos" deriva de los esbozos de un ovario, que en salmónidos carece de conducto, por lo tanto este nuevo "testículo" carecerá de conducto para evacuar el semen producido, por lo tanto, deberá ser sacrificado para obtener su semen (Fig. 4a). Luego se debe extirpar el testículo y macerarlo para extraer el semen (Fig. 4b).



**Figura 4. a: Vista macroscópica del testículo de un "neomacho" de trucha arcoiris. b: Maceración del testículo de un "neomacho" para obtener el semen.**

Los neomachos se demoran dos años en alcanzar la madurez sexual, por lo que este es el tiempo que se debe esperar para producir por primera vez una población monosexo. Existen métodos directos (ginogénesis) y más rápidos para obtener estas poblaciones formadas solo por hembras, pero la técnica arroja menores sobrevivencias y genera una alta homocigosis, por lo que productivamente es poco utilizada.

Si la aplicación de la hormona se realiza sobre larvas que provienen de una población "todo hembra" se facilita la identificación de los neomachos adultos, ya que todos los machos que se encuentren en la población, de seguro que son neomachos.



## **II. Actividades**

Las actividades que se deben realizar para obtener poblaciones “todo hembra” utilizando “neomachos” en truchas se pueden dividir en las siguientes etapas:

- 15. Preparación de la hormona**
- 16. Suministro de la hormona**
- 17. Evaluación de la eficiencia de la reversión**
- 18. Utilización de “neomachos” (después de dos años)**
  - g. Identificación de “neomachos”**
  - h. Extracción de testículos y semen**
  - i. Evaluación de calidad del semen**
  - j. Fecundación**

## **III. Materiales:**

Los materiales necesarios para la producción de poblaciones todo hembras, son: 17 $\alpha$ Metiltestosterona, alcohol absoluto, balanzas, alimento, pulverizador, microscopio, material quirúrgico, diluyente espermático, etc.

## **IV. Desarrollo del proceso**

Actividades a desarrollar en la producción de poblaciones monosexo en truchas

### **1. Preparación de la hormona**

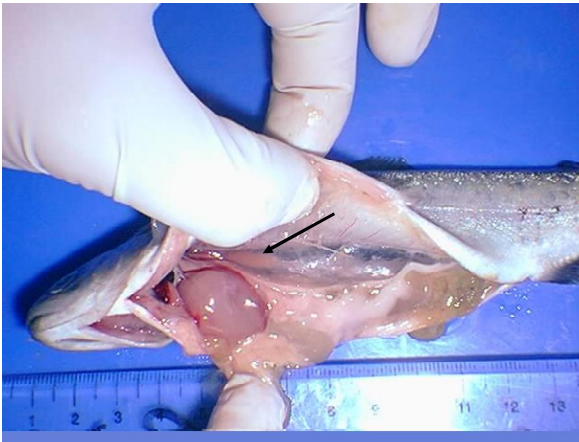
La hormona frecuentemente utilizada es la 17 $\alpha$  Metiltestosterona. Como es de naturaleza lipídica, debe ser disuelta en lípidos o alcohol. Lo más frecuente es utilizar alcohol etílico absoluto. Para un kilogramo de alimento, se debe suministrar 3mg de hormona y diluirla en 250ml de alcohol. Con un pulverizador, la mezcla de hormona y alcohol se debe distribuir lo más homogéneamente posible sobre el alimento, luego se mezcla bien para que todo el alimento pueda recibir hormona. Antes de suministrar a los peces, el alimento hormonado debe reposar por al menos 24hr en un lugar bien ventilado.

### **2. Suministro de la hormona**

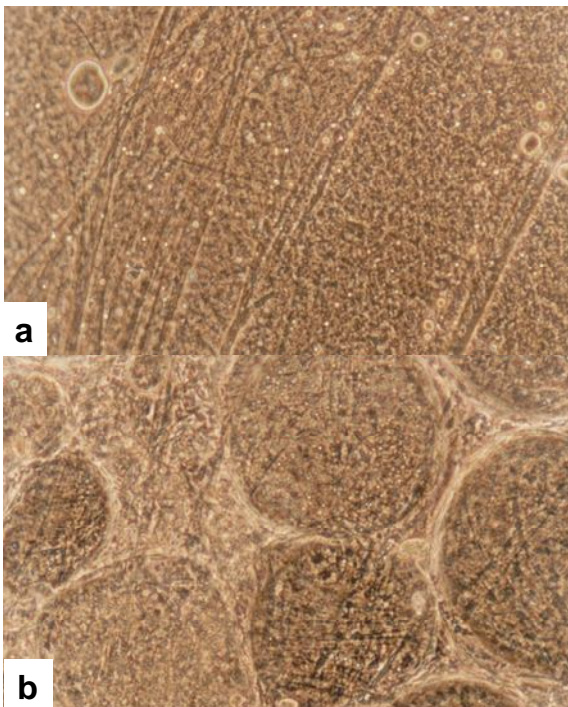
La hormona se debe suministrar desde el inicio de la primera alimentación hasta dos meses después, según la estrategia normal de alimentación utilizada en la piscicultura.

### 3. Evaluación de la eficiencia de la reversión

Después de aprox. 10 meses de la eclosión de los peces, se debe evaluar el porcentaje de eficiencia en la reversión. Para esto se toman 20 individuos y se les extrae la gónada mediante una disección (Fig. 5). Se debe tomar la gónada de cada individuo y ponerla entre dos portaobjetos y aplicar una fuerte presión con los dedos con el fin de reventar la gónada. Una producido esto, se deben observar bajo un microscopio normal y observar con aumento de 10 ó 20x. La gónada de los machos se observará formada sólo por filamentos, en cambio, los ovarios se verán formados por abundantes ovocitos redondos en los cuales es posible observar su vesícula germinal (Fig. 6a y b).



**Figura 5. Desarrollo gonadal (flecha) en un espécimen de trucha arcoiris de 10 meses de edad.**



**Figura 6. a: Microfotografía de un aplastado “in toto” de un testículo de trucha arcoiris de 10 meses de edad. b: Microfotografía de un aplastado “in toto” de un ovario de trucha arcoiris de 10 meses de edad con ovocitos en su interior. 10x**

#### **4. Utilización de “neomachos” (después de dos años)**

##### **a. Identificación de “neomachos”**

Una vez alcanzada la pubertad de los “neomachos”, como se observa en la Fig. 2 estos desarrollan caracteres sexuales secundarios similares a un macho normal, pero sin expresarlos tan marcadamente. Si la cohorte a la que se aplicó hormona era “toda hembra”, cualquier espécimen que se encuentre y que esté masculinizado, será un “neomacho”. En cambio si la población tratada era normal (50% machos y 50% hembras), se encontrarán individuos masculinizados que son machos normales y “neomachos”, para diferenciar con seguridad unos de otros, se deben sacrificar todos aquellos individuos que estén masculinizados, pero que al aplicar un masaje abdominal, no liberan semen.

Los “neomachos” son fácilmente reconocibles porque su testículo carece de conducto (Fig. 4a), es redondeado y además, frecuentemente se puede encontrar entre el tejido conectivo, pequeños grupos de ovas en diferente estado de la vitelogénesis. En cambio los machos normales tienen un testículo alargado con un conducto deferente que conecta el testículo con el poro genital (Fig. 7).



**Figura 7. Desarrollo testicular de forma alargada y con conducto deferente (flecha) de un macho normal de trucha arcoiris.**

##### **b. Extracción de testículos y semen**

Una vez realizada la disección del neomacho, se debe extraer el testículo y macerarlo sobre una malla o colador de apertura de malla superior a 2mm. Se debe realizar numerosos corte sobre el testículo con el fin de que el “semen” que contiene en su interior sea liberado (Fig. 4b). También en esta etapa, el testículo puede ser sumergido en un diluyente espermático para liberar las células espermáticas. El uso de un diluyente es muy recomendable ya que el “semen” de “neomachos” es muy denso y difícil de dosificar, por lo tanto, el diluyente facilita su uso y prolonga su viabilidad.

**c. Evaluación de calidad del semen**

Una vez extraído el semen, debe ser almacenado igual que el semen normal, es decir protegido de la luz y a baja temperatura. Antes de ser usado, debe ser evaluado el nivel de motilidad espermática que alcanza en forma similar a lo indicado para machos normales.

**d. Fecundación**

Después de corroborar el nivel de motilidad espermática, el semen de neomachos se debe utilizar en forma similar al semen de un macho normal.

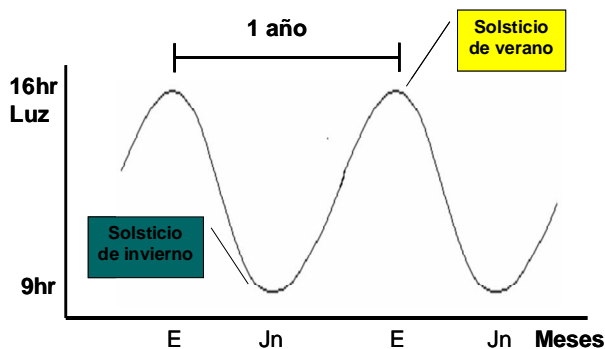
## Protocolo para el control de la reproducción en trucha arcoiris.

### I. Introducción

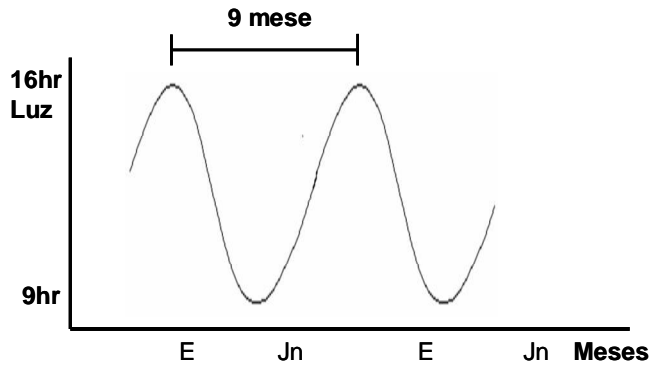
El control de la reproducción en peces es realizado por una serie de factores ambientales que regulan los ciclos hormonales que en definitiva son los que permiten a un pez realizar sus procesos reproductivos. Dentro de los factores ambientales que juegan un rol preponderante en regular la reproducción de los peces, se encuentran la temperatura y el fotoperiodo. La regulación artificial de estos factores, permiten obtener desoves de las especies cultivadas fuera de temporada. Regular la temperatura del agua de cultivo es de gran costo, por lo que frecuentemente en piscicultura se utiliza la modificación del fotoperiodo para obtener desoves fuera de temporada. Esto se basa fundamentalmente en que controlar este factor ambiental es relativamente fácil y de bajo costo. A pesar de lo anterior, la temperatura del agua en que se realizan los bioensayos, debe necesariamente encontrarse dentro de los rangos adecuados para los procesos reproductivos, de lo contrario, aunque los peces maduren sexualmente, la calidad de los gametos no será buena. Por otra parte, los tratamientos deben ser aplicados adecuadamente, una escoto fase (oscuridad) NO puede ser interrumpida por una iluminación brusca, o bien, una fase de luz no se puede transformar en escoto fase de un momento a otro por un corte de energía eléctrica.

Además, se debe considerar que al someter a fotoperiodos modificados a los peces cultivados, éstos no siempre responderán fácilmente. Siendo frecuente observar que los peces que responden a los tratamientos no es toda la cohorte que se cultiva, o bien, se pueden presentar problemas de baja fecundidad o fertilidad.

En condiciones naturales, un pez percibe el paso de un año a través del tiempo que transcurre entre dos solsticios de verano (es decir 12 meses) (Fig. 1). Si artificialmente se aplican fotoperiodos comprimidos y se producen estos solsticios entre un periodo de nueve meses, el pez “creerá” que ya ha transcurrido un año (aunque solo han pasado nueve meses) (Fig. 2). Lo mismo creerá si los periodos de máxima luminosidad (solsticios) se producen entre seis meses, y en trucha arcoiris, incluso se han realizado experiencia con ciclos de 3 meses, los que productivamente, no son beneficiosos para el productor.



**Figura 1. Variaciones en las horas de luz natural (aprox) en el Hemisferio Sur a lo largo de un año.**



**Figura 2. Modelo de fotoperiodo artificial comprimido de nueve meses para controlar la madurez sexual en trucha arcoiris.**

Para que estos manejos sean exitosos, las fases de luminosidad y oscuridad, deben ser respetadas rigurosamente, de lo contrario, los peces “no le creerán” al acuicultor que se encuentra en un verano o invierno artificial. Además, como se señaló anteriormente, la temperatura se debe encontrar idealmente en rangos cercanos a 10°C, porque el pez no creerá que se acerca el invierno si detecta una reducción en las horas de luz, PERO LA TEMPERATURA DEL AGUA ESTÁ SUBIENDO ;;;

## **II. Materiales:**

19. Los materiales necesarios son: Peces de un año de edad, estanques cubiertos, circuitos eléctricos, controladores de tiempo y materiales de uso rutinario en cultivo de peces.

## **III. Actividades**

Las actividades que se deben realizar controlar artificialmente la reproducción de la trucha arcoiris mediante fotoperiodos comprimidos se pueden dividir en las siguientes etapas:

1. Selección de los peces a tratar
2. Selección de fotoperiodos comprimidos
3. Evaluación de madurez

## **IV. Desarrollo del proceso**

Actividades a desarrollar en el control artificial de la reproducción de la trucha arcoiris.

### **1. Selección de los peces a tratar**

Idealmente, estas experiencias se recomienda iniciarlas con peces que ya han tenido su primera madurez sexual, esto con el fin de asegurarse que los especímenes utilizados no son estériles o de madurez tardía. En el caso de Chucuito, esto es difícil de lograr por la escasez de agua y de espacio, por lo tanto, excepcionalmente, se propone iniciar la

experiencia con peces de un año de edad, pero entre los cuales no se encuentren machos precoces.

## **2. Selección de fotoperiodos comprimidos**

Se recomienda trabajar con fotoperiodos comprimidos no menores a seis meses, ya que hasta este tiempo las hembras pueden producir ovas de tamaño aceptable para el manejo en cultivo, ya que cuanto más corto es el periodo entre un solsticio y otro, mayor gasto energético tendrá la hembra en sus actividades reproductivas, por lo que se le deberá dar una ración un poco mayor de alimento a los peces que se encuentren en fotoperiodos comprimidos de 6 meses.

Como se señaló anteriormente, los estanques deben ser de 1m<sup>3</sup> de capacidad útil y estar cerrados en forma hermética al paso de la luz (Fig. 3). Con una cavidad en la parte central de la tapa para poder instalar un tubo fluorescente, el que además, debe estar protegido con una lámina de vidrio para evitar que los peces salpiquen agua al circuito eléctrico y dañen la fuente de luz, lo que será perjudicial para el éxito del proyecto. Por esta razón, los circuitos eléctricos deben ser revisados diariamente, porque si se quema un tubo de iluminación, los peces no pueden permanecer en oscuridad hasta que los técnicos se percaten que el tubo está quemado. Por esto, se debe disponer de un stock de tubos de repuestos para cuando se queme alguno de ellos.



**Figura 3. Tipo de estanques recomendados para la aplicación de fotoperiodos comprimidos para la reproducción de trucha arcoiris.**

La experiencia debe comenzar cuando se produce el solsticio de invierno, ya que en ese momento los peces tendrán un año de nacidos. Se debe disponer de un total de 30 peces por estanque y someterlos a las condiciones rutinarias de cultivo. Suministrando una tasa de alimentación del 1% PC por día.

Se contempla el inicio de la experiencia en el mes de abril, cuando se ha visto que las truchas desovan masivamente en la piscicultura Chucuito.



**Fotoperiodo artificial de 12 meses:** Este tratamiento simulará el fotoperiodo natural y permitirá evaluar la respuesta de los peces al sistema artificial de iluminación.

**Fotoperiodo comprimido de 6 meses:** Este tratamiento permitirá que los peces estén en condiciones de desovar en el mes de octubre.

**Fotoperiodo comprimido de 9 meses:** Este tratamiento permitirá que los peces estén en condiciones de desovar en el mes de diciembre.

Para controlar las horas de luz, se debe regular semanalmente los controladores de tiempo con el fin de ir ajustando las horas de luz diaria al fotoperiodo que se quiere aplicar.

### **3. Evaluación de madurez**

Idealmente, se debiera sacrificar mensualmente al menos diez peces para determinar el estado de madurez sexual que llevan los especímenes. Considerando el escaso volumen de agua del que se dispone en Chucuito, lo que obliga a trabajar con un bajo número de especímenes, la evaluación deberá realizarse sólo en forma visual, siguiendo los criterios señalados en el protocolo de desove indicados en este informe. Esto implica básicamente, evaluar la coloración externa que se volverá más oscura cuando se aproxime la madurez, el desarrollo del poro genital y la expresión de los colores nupciales.

Una vez detectados especímenes con signos de maduración, deben ser desovados siguiendo los protocolos señalados anteriormente. Una vez terminado un ciclo de fotoperiodo, se debe continuar con su aplicación, ya que se ha observado que los peces con el tiempo se van adaptando a los fotoperiodos artificiales.