

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS



**INDUCCIÓN A LA MADURACIÓN GONÁDICA Y CONSERVACIÓN
DEL ESPERMA DE LA TRUCHA DE SAN PEDRO MÁRTIR**
Oncorhynchus mykiss nelsoni (EVERMANN)

T E S I S

**QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA
OBTENER EL GRADO DE**

**DOCTOR EN CIENCIAS EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y
BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA

MARISELA AGUILAR JUÁREZ

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO. DICIEMBRE DE 2010.

RESUMEN

La maduración gonádica en cautiverio de la trucha de San Pedro Mártir *Oncorhynchus mykiss nelsoni* (Evermann) fue determinada en condiciones *ex situ* con el propósito de generar un protocolo a corto y largo plazo que permita la conservación de su esperma bajo los estándares de un banco de germoplasma. La metodología consistió en mantener y madurar sexualmente a esta trucha nativa en condiciones de laboratorio, utilizando un sistema de fotoperíodo artificial y un sistema cerrado de recirculación que permitió desarrollar una metodología de conservación a corto y otra a largo plazo para los espermatozoides. El porcentaje de movilidad, el uso de tinciones fluorescentes y el ensayo cometa fueron comparados en la determinación del daño causado a los espermatozoides por el proceso de congelación y descongelación. Durante el mantenimiento de la trucha en cautiverio (13.2 meses), su tasa de peso y crecimiento somático fueron de 0.86 g /día y 0.42 mm/día, respectivamente. El sistema de fotoperíodo promovió el desarrollo gonadal de los machos en un promedio de 7.5 meses y el cambio del tipo de alimento favoreció la madurez gonádica en las hembras y la calidad de los espermatozoides liberados por los machos. Los espermatozoides suspendidos en la solución extensora de Erdhal y Graham (1:9) y la solución DIA 532 como medio de activación resultaron ser óptimas para mantener a los espermatozoides a 4°C por siete días y con un porcentaje de movilidad $\geq 80\%$. Una relación lineal fue obtenida entre el porcentaje de movilidad e integridad de membrana. Durante la conservación a largo plazo los espermatozoides de la trucha de San Pedro Mártir criopreservados con metanol y descongelados a 40°C, presentaron una resistencia mayor en cuanto a la integridad de membrana (63.2%) y ácido deoxiribonucleico (68.6%) con respecto a los criopreservados con dimetil acetamida (22.6% y 45.3%, respectivamente) o dimetil sulfóxido (17.8% y 39.5% respectivamente) y temperaturas de descongelados de 25°C. La integridad de membrana plasmática y el ácido deoxiribonucleico en los espermatozoides criopreservados, exhibieron un menor daño en comparación al registrado en su movilidad. La información generada en el presente estudio podría contribuir a prolongar la disponibilidad del esperma de esta trucha nativa para procesos reproductivos y ayudar con los programas para su repoblamiento y conservación.

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS
POSGRADO EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA

INDUCCIÓN A LA MADURACIÓN GONÁDICA Y CONSERVACIÓN DEL
ESPERMA DE LA TRUCHA DE SAN PEDRO MÁRTIR *Oncorhynchus*
mykiss nelsoni (EVERMANN)

T E S I S

QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA
OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

MARISELA AGUILAR JUÁREZ

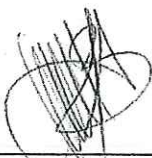
Aprobada por:



Dra. Carmen Guadalupe Paniagua Chávez
Director de tesis



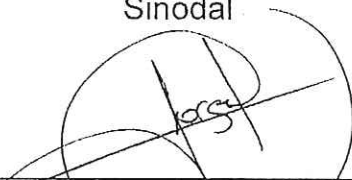
Dr. Gorgonio Ruiz Campos
Director de tesis



Dra. Irene de los Angeles Barriga Sosa
Sinodal



Dr. Faustino Camarena Rosales
Sinodal



Dr. Jorge Adrián Rosales Casán
Sinodal

CON TODO CARIÑO

A MIS PADRES:

Rosa María y Juventino

A MI ESPOSO

Martín

A MIS HERMANOS:

Daniel y Angy

A MIS SOBRINOS:

Asael, Fernando y Ángel

A LA MEMORIA DE UN GRAN AMIGO

Dr. Jorge de la Rosa V.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi profundo agradecimiento a la Dra. Carmen Paniagua Chávez, y el Dr. Gorgonio Ruiz Campos por la acertada dirección del presente trabajo. Les agradezco su tiempo y esfuerzo y el haberme apoyado en todo momento como su estudiante de doctorado. A los Doctores: Irene de los Ángeles Barriga, Jorge Caslán y Faustino Camarena, miembros de mi Comité de tesis, por las sugerencias y su siempre disposición durante la realización de éste trabajo. Al Dr. Jorge de la Rosa, porque en su momento formó parte de éste comité de tesis y aunque se nos adelantó, siempre estuvo con nosotros. A todos ustedes mil gracias.

Al Consejo Nacional de Ciencia y tecnología (CONACyT) por el apoyo económico, a través del programa de Becas para Estudios de Posgrado de la UABC, a la SEMARNAT a través del proyecto SEMARNAT-2002-CO1-00393 "Banco de Germoplasma de Especies Acuáticas de Baja California" y a la Dirección General de Vida Silvestre en México, a través de los Biólogos Fernando Sánchez y Salvador Balderas por el permiso otorgado para la colecta de las truchas (Núm. SGPA/DGVS 08473).

Al Dr. Domenico Voltolina, el Dr. Fernando Bückle y al Dr. Saúl Álvarez, por haberme recomendado como estudiante de Doctorado para el Posgrado de Ecología Molecular y Biotecnología de la UABC. Gracias, porque siempre estuvieron al pendiente de mi trayecto en el posgrado, proporcionándome si estaba en sus manos, lo necesario para continuar con esta meta.

A los miembros del Posgrado de Ecología Molecular y Biotecnología, Facultad de Ciencias Marinas, UABC; la Dra. Irma Soria, Dra. Yolanda Schramm, Dr. Luis Cupul, Dr. Eduardo Durazo, Dra. Ivone Giffard y en la parte administrativa al Lic. Enrique Pérez, Angélica Arce, Lorena Cavada, Nelly Osuna, Yoli Arechiga, Evelia Manríquez y Ernesto por su disposición y apoyo durante todos los trámites derivados de este trabajo. A mis profesores, la Dra. Tere Viana y el Dr. Luis Enríquez por los conocimientos compartidos y sus sugerencias al trabajo. Al Dr. Antonio Trujillo por su apreciable colaboración en la parte estadística y al Dr. Estéfano por su disponibilidad para el trabajo.

A la Dra. Amelia Portillo, Dr. José Luna, Luis C., M. en C. Conal Drue, Gerardo Sandoval, Dr. Manuel Segovia, Dra. Mónica Hernández y al Dr. Benjamín Barón por la disponibilidad de sus equipos y por las sugerencias para mejorar el trabajo. Al M. en C Arturo R., el Biólogo Leo G., a los estudiantes Constanza del Mar, Ana T., Genoveva O., Miriam V., Alex A., Edgardo L. y Luis M. que apoyaron en las salidas de campo, cuidado de los organismos y temporadas de espermiación de las truchas.

A los técnicos del Depto. de Acuicultura del CICES, José E., Yanet G., Gisela T., Francisco V., Alberto M., Omar, Luis M., Adrian C. Carlos C., Norberto F. y Lourdes T., por su apoyo y sugerencias durante la construcción del sistema de recirculación, mantenimiento de las truchas, ensayos de laboratorio y dibujos del sistema de recirculación. A Varu, Bibi y Cecy por su apoyo en las cuestiones administrativas. A la Biblioteca de la UABC, del CIBNOR y del CICESE, a Katy H., Ana Maria T., Lupita M., Cecilia y Oscar por su apoyo y eficiencia en conseguir el material solicitado. Al grupo de Telemática, Marisela O., Carlos F., Enrique E., M. Elena S., Verónica R., Rafael Z., Javier M., Gaspar C., Juan H., Víctor R. y Leo L (UAS). Al departamento de Servicios Generales, Mecánica Fina, Carpintería y a la Unidad del Parque Vehicular del CICESE, a través de Francisco L., Osvaldo L., Raúl M., Israel R., Gilberto G. y Guillermo S., por su apoyo en las cuestiones generales de diseño e ingeniería del sistema de recirculación y salidas de campo.

A mis compañeros de laboratorio J. Alberto R., Cynthia, Gladis P. y Kary; así como a mis amigos, A. Rosa S., Alberto A., A. Rosa J., Rosy, Lolita, Alejandra G., Marisol, Isidro O., Lalis O., Héctor Z., Juanita O., Gabriel G. y Araceli; a mis compañeros de Cuz Roja, Tony, Jose S., Raul M., Amalia, Rosa y a mis amigos ex-UNAM J. Luis T. y Juan V., por su gran apoyo durante la realización del trabajo. En especial a mi familia y a mi esposo Martín por estar siempre conmigo apoyándome para realizar esta meta, y a todas las personas que de alguna manera contribuyeron a la realización del presente estudio, que sin su apoyo no hubiera sido posible; a todos ustedes les reitero mi más sentido agradecimiento.

Marisela Aguilar Juárez

Ensenada, México 16 de diciembre de 2010.

INDICE DEL TRABAJO

	Página
Resumen	
Aprobación	
Agradecimientos	
Lista de tablas	
Lista de figuras, fotografías y gráficas	
CAPÍTULO I Introducción General	
Introducción	1
Trabajos previos y perspectivas	10
Descripción de la subespecie	20
Densidad	21
Diferenciación sexual	21
Fecundidad y desove	22
Desarrollo ontogénico	23
Clases de edad y longevidad	25
Crecimiento	25
Características morfológicas	26
Hábitos alimenticios	26
Distribución	27
Sitio de recolecta	28
Geohidrología	29
Hidrología	30
Calidad del agua	30
Clima	31
Vegetación	32
Objetivos	33
Literatura citada	34

Continuación.....

	Página
CAPÍTULO II Mantenimiento en Cautiverio e Inducción a la Maduración Sexual de la Trucha de San Pedro Mártir (<i>Oncorhynchus mykiss nelsoni</i>, Evermann) en Condiciones de Laboratorio	
Resumen	51
Introducción	52
Objetivo	57
Materiales y métodos	
I Captura de organismos	58
II Mantenimiento de los organismos en cautiverio	59
II.1 Peso corporal y longitud total	59
II.2 Período de cuarentena	60
II.3 Sistema de recirculación	60
II.4 Alimentación	62
III Inducción a la maduración gonádica	62
III.1 Sistema artificial de fotoperíodo	62
III.2 Régimen de fotoperíodo	64
III.3 Obtención de esperma	64
III.4 Evaluación de la movilidad	67
III.5 Número de espermatozoides	67
III.6 Morfometría del espermatozoide	67
IV Análisis estadístico	68
Resultados	
Mantenimiento de los organismos	68
Peso corporal y longitud total de las truchas de San Pedro Mártir	69
Maduración gonádica en machos de la trucha de San Pedro Mártir en condiciones de fotoperíodo	70
Maduración gonádica en hembras de la trucha de San Pedro Mártir en condiciones de fotoperíodo	71
Discusiones	

Continuación.....

	Página
Mantenimiento en cautiverio	72
Crecimiento de los organismos	75
Maduración gonádica de la TSPM en cautiverio	76
Evaluación de la calidad de los espermatozoides	79
Literatura citada	82
CAPÍTULO III Conservación a Corto Plazo del Esperma de la Trucha de San Pedro Mártir (<i>O. mykiss nelsoni</i>, Evermann)	
Resumen	92
Introducción	93
Objetivo	96
Materiales y métodos	
I Curvas de inactivación para el esperma de <i>O. mykiss nelsoni</i>	97
I.1 Obtención de las muestras de esperma	97
I.2 Evaluación de la movilidad	97
II Inactivación del esperma de la trucha de San Pedro Mártir	98
II.1 Inactivación del esperma en diferentes soluciones extensoras	99
II.2 Inactivación del esperma en soluciones con diferentes pH	99
II.3 Inactivación del esperma en diferentes sales	100
III Activación del esperma de la trucha de San Pedro Mártir	100
III.1 Inactivación del esperma	100
III.2 Activación del esperma con diferentes soluciones activadoras	101
IV Conservación a corto plazo del esperma de la trucha de San Pedro Mártir	102
IV.1 Obtención de las muestras de esperma	102
IV.2 Volumen y número de espermatozoides en las muestras recolectadas	102

Continuación.....

	Página
IV.3 Calidad de las muestras de esperma	102
IV.4 Conservación a corto plazo del esperma a diferentes concentraciones (<i>esperma:SE</i>)	103
IV.5 Evaluación de la integridad de membrana de los espermias conservados a corto plazo	103
V Análisis estadístico	104
Recolecta de esperma de la trucha de San Pedro Mártir	104
Inactivación y activación del esperma	104
Conservación a corto plazo del esperma	105
Resultados	
Muestras de esperma de <i>O. mykiss nelsoni</i> recolectadas en campo	106
Inactivación del esperma con diferentes soluciones extensoras	106
Inactivación del esperma en soluciones con diferente pH	107
Inactivación del esperma en KCl o NaCl	109
Medios de activación evaluados en el esperma de la trucha de San Pedro Mártir	111
Muestras de esperma de <i>O. mykiss nelsoni</i> recolectadas en laboratorio	112
Conservación a corto plazo del esperma de la trucha de San Pedro Mártir en diferentes tasas (<i>esperma:SE</i>)	113
Discusiones	
Efecto de la concentración iónica en la inactivación del esperma de la trucha de San Pedro Mártir	116
Efecto de la osmolalidad en la inactivación del esperma de la trucha de San Pedro Mártir	120
Efecto del pH en la inactivación del esperma de la trucha de San Pedro Mártir	124
Soluciones activadoras	126

Continuación.....

	Página
Conservación a corto plazo	129
Calidad del esperma conservado a corto plazo	131
Literatura citada	133
CAPÍTULO IV Conservación a Largo Plazo del Esperma de la Trucha de San Pedro Mártir (<i>O. mykiss nelsoni</i>, Evermann)	
Resumen	145
Introducción	146
Objetivos	151
Materiales y métodos	
I Obtención de las muestras de esperma de <i>O. mykiss nelsoni</i>	152
I.1 Valoración de la calidad del esperma recolectado	152
1.2 Volumen y número de espermatozoides	152
II Citotoxicidad de los crioprotectantes y concentraciones efectivas (EC50) en el esperma de la trucha de San Pedro Mártir	153
III Congelación a largo plazo del esperma de la trucha de San Pedro Mártir	154
III.1 Preparación de las muestras	154
III.2 Tasa de congelamiento	155
III.3 Descongelación de las muestras	156
III.3.1 Evaluación de la movilidad	157
III.3.2 Evaluación de la integridad de membrana con sondas fluorescentes	157

Continuación.....

	Página
III.3.3 Evaluación del ADN del esperma utilizando el ensayo cometa	158
III.3.3.1 Validación de la técnica	158
III.3.3.2 Preparación de los portaobjetos con las muestras	158
III.3.3.3 Lisis	159
III.3.3.4 Desnaturalización y electroforesis	160
III.3.3.5 Neutralización y fijación de las muestras	160
III.3.3.6 Análisis de las muestras	161
Análisis estadísticos	
Recolecta de esperma	163
Citotoxicidad de los crioprotectantes	163
Conservación a largo plazo	163
Resultados	
Recolecta de esperma de la trucha de San Pedro Mártir	164
Citotoxicidad de los crioprotectantes	165
Congelación a largo plazo del esperma	167
Discusiones	172
Literatura citada	186
CAPÍTULO V Conclusiones y Recomendaciones	
Conclusiones	201
Recomendaciones	203

Continuación.....

	Página
Apéndices	
Capítulo II	
Captura de <i>O. mykiss nelsoni</i> en su hábitat natural	204
Calidad del agua durante los primeros meses de cautiverio de las truchas	205
Crecimiento de las truchas mantenidas en cautiverio	210
Calidad del agua durante el mantenimiento de las truchas en un sistema de fotoperíodo artificial	211
Madurez gonádica de la trucha de San Pedro Mártir en un sistema de fotoperíodo artificial	213
Medidas morfométricas del esperma de la trucha de San Pedro Mártir	220
Capítulo III	
Curvas de inactivación	223
Soluciones activadoras	229
Conservación a corto plazo del esperma de la trucha de San Pedro Mártir	231
Daño ocasionado al esperma de la trucha de San Pedro Mártir durante la conservación a corto plazo	232
Capítulo IV	238
Colecta de esperma de <i>O. mykiss nelsoni</i> en condiciones de laboratorio	238
Citotoxicidad del crioprotectante en el esperma de la trucha de San Pedro Mártir	238
Congelación a largo plazo del esperma de la trucha de San Pedro Mártir y evaluación del daño	249

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
Capítulo I	
I.1 Desarrollo ontogénico de <i>O. mykiss nelsoni</i>	24
I.2 Clases de edad en la trucha de San Pedro Mártir	25
Capítulo II	
II.1 Régimen de fotoperíodo simulado para la trucha de San Pedro Mártir	64
II.2 Recolección de esperma después de que <i>O. mykiss nelsoni</i> se mantuvo 7.5 meses bajo condiciones de fotoperíodo artificial. Diferentes letras indican diferencias significativas entre valores en la misma columna (ANOVA de una vía, $\alpha = 0.05$, $a < b < c < d < e$). Los datos son expresados como el promedio $\pm$ SD	71
Capítulo III	
III.1 Soluciones extensoras utilizadas para inactivar el esperma de la trucha de San Pedro Mártir (<i>O. mykiss nelsoni</i>)	99
III.2 Soluciones activadoras que fueron empleadas para activar el esperma de la trucha de San Pedro Mártir	101
Capítulo IV	
IV.1 Determinación del EC50 para los espermatozoides de <i>O. mykiss nelsoni</i> , suspendidos en los diferentes ACPs (MT [metanol], DMA [N-N, Dimetil acetamida], GL [Glicerol], DMSO [Dimetil sulfóxido], PD [1,2-Propanodiol] y ETG [Etilenglicol]) por 30 minutos	167

LISTA DE FIGURAS, FOTOGRAFÍAS Y/O GRÁFICAS

Figura	Página
Capítulo I	
1.1 Macho y hembra de <i>O. mykiss nelsoni</i>	22
1.2 Características morfológicas externas de la trucha de San Pedro Mártir	26
1.3 Localización geográfica del Arroyo San Rafael en la Sierra de San Pedro Mártir, Baja California, México. Tomado de Ruiz-Campos, 1994	29
Capítulo II	
2.1 Equipo de electropesca utilizado para capturar a la trucha de San Pedro Mártir A). El transporte de los organismos fue realizado en bolsas de plástico con oxígeno a saturación B).	59
2.2 Sistema de recirculación para el mantenimiento en cautiverio de <i>O. mykiss nelsoni</i> . Un tanque circular de fibra de vidrio A) es conectado a una bomba B) que mueve el agua del tanque a un biofiltro C), el cual es conectado a un enfriador de agua D) que se encarga de regresar el agua al tanque. Un barril conteniendo agua desclorinada fue utilizado como reservorio de agua E).	61
2.3 Sistema de fotoperíodo artificial. El sistema consiste de una lámpara de acero inoxidable que contiene en su interior tres focos, A) los cuales están conectados individualmente a un controlador de tiempo eléctrico B). Este sistema fue suspendido 90 cm por encima de la superficie del agua contenida en el tanque de mantenimiento de los peces C).	63
2.4 Obtención de esperma. Organismos agrupados por parejas y colocados en contenedores con una solución de aceite de clavo A). Peces adormecidos debido al efecto del anestésico B). Para evitar contaminación de las muestras, se limpió el orificio genital C) y se procedió a presionar ligeramente el abdomen para extraer el esperma. La toma de esperma se realizó con pipetas de plástico D). Los peces de los cuales se obtuvo la muestra se colocaron en un tanque de recuperación E). Las muestras fueron colocadas en una hielera (4°C) y transportadas al BGEA F).	66

Continuación.....

Figura	Página
2.5 Trucha de San Pedro Mártir antes A) y después de dos años bajo condiciones de cautiverio B).	69
2.6 Espermatozoides de la trucha de San Pedro Mártir a un aumento de 400X y A) ovocitos liberados e hidratados B).	72

Capítulo III

3.1 Porcentaje promedio ($\pm$ Error estándar) de movilidad (línea continua de color rojo) del espermatozoide de <i>O. mykiss nelsoni</i> , suspendido en las diferentes soluciones extensoras (SE1, SE2, SE3, SE4) a las diferentes osmolalidades, y posteriormente activado con agua corriente (línea punteada). La muestra control presentó un 80% de movilidad	107
3.2 Porcentaje promedio ($\pm$ Error estándar) de movilidad del espermatozoide de la trucha de San Pedro Mártir (línea continua de color rojo), registrado en los diferentes valores de pH ajustados con HCl-NaOH (gráfica de la izquierda), o con Tris-Hepes (gráfica de la derecha), y posteriormente activado con agua corriente (línea punteada). La muestra control presentó un 80% de movilidad	109
3.3 Porcentaje promedio ($\pm$ Error estándar) de movilidad (línea continua de color rojo) del espermatozoide de la trucha de San Pedro Mártir en diferentes presiones osmóticas de NaCl (izquierda) o KCl (derecha), y posteriormente activado con agua corriente (línea punteada). La muestra control presentó un 80% de movilidad	110
3.4 Porcentaje de movilidad (promedio $\pm$ Error estándar) del espermatozoide de la trucha de San Pedro Mártir registrado en diferentes SE previamente escogidas, y activado con diferentes soluciones activadoras. La muestra control presentó un 80% de movilidad. *SE = solución extender que fue incorporada (Erdhal y Graham, 1980)	112
3.5 Porcentaje de movilidad (promedio $\pm$ Error estándar) de los espermatozoides almacenados en las diferentes diluciones a 4°C por nueve días	114
3.6 Porcentaje de integridad de membrana (promedio $\pm$ Error estándar) de los espermatozoides almacenados en las diferentes diluciones a 4°C por nueve días	114

Continuación.....

Figura	Página
3.7 Regresión lineal entre el porcentaje de movilidad e integridad de membrana de los espermatozoides mantenidos por nueve días a 4°C, en las diferentes diluciones evaluadas (1:3, 1:6 y 1:9)	115
Capítulo IV	
4.1 La mezcla del esperma y la solución extensora es colocada en pajillas, las cuales son puestas en macrotubos y estos, dispuestos por pares en cañas	155
4.2 Congelación del esperma de <i>O. mykiss nelsoni</i> por el método simplificado. Las cañas conteniendo las pajillas con muestra fueron colocadas en vapor de nitrógeno líquido a -70°C por 10 minutos A), después transferidas directamente al nitrógeno líquido a -196°C B), donde permanecieron por 30 días C)	156
4.3 Ensayo cometa. Sobre un portaobjetos esmerilado se esparce una capa de agarosa al 0.5%, una vez que ésta solidifica se le esparce encima una mezcla de esperma y agarosa de bajo punto de fusión al 0.5%. Por último, una capa de agarosa de bajo punto de fusión al 5% es colocada sobre las dos capas anteriores A). Cuando las tres capas de agarosa están solidificadas, los portaobjetos son colocados en una solución de lisis por 180 minutos B); posteriormente éstos son incubados por 10 minutos en una solución amortiguadora C) y al término de este tiempo es llevada a cabo la electroforesis a 25 V y 300 mA durante 10 minutos D). Finalmente los portaobjetos son colocados en una solución de neutralización por 5 minutos E), escurridos a temperatura ambiente y colocados en metanol por 3 minutos para su fijación F). El análisis de la muestras se realizó con bromuro de etidio al 0.5% G) y las muestras son analizadas en un microscopio con un filtro de excitación de 510-560 nm H)	161
4.4 Cometa típico que muestra el esparcimiento del material genético (cola) cuando la célula (cabeza) es dañada	162
4.5 Espermatozoides de la trucha de San Pedro Mártir a un aumento de 400X	165

Continuación.....

Figura	Página
4.6 Efecto citotóxico de los diferentes crioprotectantes (MT [metanol], DMA [N-N, Dimetil acetamida], GL [Glicerol], DMSO [Dimetil sulfóxido], PD [1,2-Propanodiol] y ETG [Etilenglicol]), en la movilidad de los espermatozoides de la trucha de San Pedro Mártir, en cuatro diferentes concentraciones e incubados en diferentes tiempos de equilibrio. La muestra control presentó del 80-90% de movilidad en los diferentes tiempos	166
4.7 Integridad de membrana en los espermatozoides de la trucha de San Pedro Mártir criopreservados con DMSO A), DMA B) o MT C). Las observaciones fueron realizadas en un microscopio de fluorescencia a un aumento de 200X, usando un filtro azul (excitación 490 nm y emisión 510 nm). Los espermatozoides con membrana dañada (de color rojo) y con membrana integra (color verde) están señalados por la flechas	168
4.8 Ensayo cometa. Integridad de ADN de los espermatozoides de la trucha de San Pedro Mártir criopreservados con DMSO A). Muestra control B) y espermatozoides con peróxido de hidrógeno C). Las observaciones fueron realizadas en un Microscopio de Fluorescencia utilizando un filtro de excitación de 510-560 nm	169
4.9 Efecto de la temperatura de descongelación en la movilidad, integridad de membrana y de ADN de los espermatozoides de <i>O. mykiss nelsoni</i> , criopreservados con DMSO 5% (Dimetil sulfóxido), DMA 5% (N-N, Dimetil acetamida) o MT 5% (Metanol) como crioprotectantes. El control presentó de un 88% para la movilidad, un 87% para la integridad de membrana y un 92% para daño al ADN	171

INTRODUCCIÓN GENERAL

Capítulo 1

INTRODUCCIÓN

México es considerado uno de los países con mayor diversidad biológica a nivel mundial (Mittermeier y Goettsch, 1992). Sin embargo, se calcula que más del 50% de las especies de vertebrados y cerca del 4% de las plantas del país se encuentran en peligro de extinción (Ceballos, 1993). En la Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas, órgano descentralizado de la SEMARNAT, se han hecho esfuerzos de conservación a nivel nacional y actualmente administran 172 áreas naturales protegidas (ANP) de carácter federal que comprenden 23,880,403 hectáreas. En la Península de Baja California existen 16 ANP, de las cuales dos son Parques Nacionales, cinco son consideradas Áreas de Protección de Recursos Naturales y nueve son Reservas de la Biosfera (CONANP, 2009).

En la parte norte de la Península de Baja California, la Sierra de San Pedro Mártir es considerada una Reserva de la Biosfera (UNESCO-MAB, México-MAB) debido a su riqueza biótica y a los organismos endémicos que se han registrado. Entre estos destaca una subespecie de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss nelsoni*), perteneciente al complejo taxonómico arcoíris costero y que habita en la parte noroccidental del territorio nacional (Ruiz-Campos, 1993). Esta trucha, forma parte de un complejo de morfotipos de salmónidos nativos, reconocidos como truchas nativas mexicanas, de las cuales solo *O. mykiss nelsoni* y *O. chrysogaster* han sido descritas (Nielsen y Sage, 2001; Hendrickson et al., 2002;

Ruiz-Campos et al., 2003; Hendrickson et al., 2006; Camarena-Rosales et al., 2008).

Además, *O. mykiss nelsoni* representa a una de las poblaciones de truchas más puras que existen en la región (Berg et al., ms). Su importancia además de lo anterior radica en su capacidad euritámica y comportamiento no migratorio, características que la hacen atractiva para la acuicultura (Ruiz-Campos, 1993). Desafortunadamente los estudios sobre su bionomía y ecología poblacional, indican que esta trucha es una forma vulnerable a los disturbios potenciales por alteración de su hábitat. Lo anterior manifiesta la situación crítica de ésta población y obliga a implementar estrategias que ayuden a su conservación (Ruiz-Campos et al., 2003).

La declinación de las poblaciones de peces puede ser ocasionada por cambios en el ambiente físico o en la biota. Estos cambios pueden ser provocados de forma natural por incendios y huracanes entre otros o por acciones antropogénicas como la deforestación, la agricultura, la ganadería y la introducción de especies exóticas. Sin embargo, en todos los casos, se generan notables efectos nocivos para los ecosistemas naturales y para la estabilidad de la diversidad genética de las poblaciones silvestres locales (Peña-Jiménez y Neyla-González, 1998).

Por ejemplo, en el Oeste de Estados Unidos, el declive de muchas poblaciones de truchas nativas fue ocasionado por la hibridación con especies no nativas. Un

caso reciente es *O. clarkii bouvieri* y *O. clarkii seleniris*, que son de las subespecies de truchas más raras en el mundo, y actualmente se encuentran amenazadas por procesos de hibridación con la trucha arcoíris (*O. mykiss*) introducida (Handerson et al., 2000).

En México se tiene un registro de más de 504 especies de peces de agua dulce, de las cuales 271 son endémicas del país, 48 nativas de las cuencas binacionales y entre 30 y 40 son especies no descritas (Contreras-Balderas et al., 2008). En los últimos años, el número de especies que reportan algún grado de riesgo se incrementó de 17 en 1963 a 192 en 2005 y el número de peces exóticos aumentó de cuatro especies registradas en 1904 a 115 en 2008.

Existe una tendencia paralela entre el incremento de especies exóticas y la de especies que presentan algún grado de riesgo, de las cuales algunas han llegado a la extinción. Por ejemplo, en 1997 se reportaron 19 especies extintas y para 2005 el número incremento a 27 (Contreras-Balderas et al., 2008). Desafortunadamente, el número de especies sigue creciendo, por lo que es importante efectuar estrategias para evitar que la trucha de San Pedro Mártir *O. mykiss nelsoni* llegue a formar parte de esta lista.

Pese a que el número de especies amenazadas en los sistemas acuáticos incrementa de manera considerable, las estrategias de conservación se han enfocado principalmente en organismos terrestres, sin considerar que el

panorama para los organismos acuáticos ya es preocupante (Ehrlich y Ehrlich, 1992).

La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO, 1995) y la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN, 1991) sugieren que la conservación de la diversidad genética de especies nativas debe mantenerse como una cuestión de principio, independientemente de si son o no de utilidad para la humanidad. Por tanto, es necesario implementar métodos que permitan la conservación de estos recursos, a fin de detener la pérdida de muchas especies de peces y preservar las que aún quedan (Ceballos, 1993).

El desarrollo de las ANP es una de las estrategias utilizadas para impedir la destrucción o degradación del hábitat. No obstante, Bart (1999) sugiere que esta práctica no ofrece garantía para la protección de las especies. Además, de que es costosa y requiere mucho tiempo para llevarlo a cabo (Hiemstra et al., 2005).

La acuicultura también ha sido una alternativa para disminuir la presión ejercida por el proceso de extinción. Sin embargo, esta alternativa puede ser utilizada solo para reforzar a corto plazo las poblaciones locales que tengan problemas temporales de reclutamiento. Esto se debe a que la mayoría de los recursos genéticos aún se encuentran ubicados en las poblaciones silvestres y el cultivo de muchas especies es dependiente de la obtención ya sea de reproductores o de semilla de dichas poblaciones (FAO/PNUMA, 1984). Por esto, la

conservación de las distintas poblaciones de organismos debe ser complementada con otros procedimientos. Actualmente tecnologías reproductivas y de criopreservación, así como la utilización de Bancos de Genes serían una alternativa viable en la conservación de las especies (Bart, 1999; Gibson y Pullin, 2005).

La criopreservación de gametos es una herramienta reciente que ha sido sugerida para la conservación del recurso genético de especies raras o en peligro de extinción, o de aquellas especies cuyo material biológico representen un potencial económico para el productor (Graham y Brandhorst, 1999; Bozkurt, 2005; Fickel et al., 2007). La conservación de los recursos genéticos implica conservar células a ultra bajas temperaturas (-196°C) con el propósito de reducir y detener la tasa metabólica para mantener la viabilidad celular por tiempos prolongados y restituirla en el momento más oportuno de su utilización (Ávila-Portillo et al., 2006).

Varios procedimientos para criopreservación de espermatozoides han sido desarrollados durante los últimos 20 años (Leung y Jamieson, 1991; Ritar y Campet, 2000; Ohta et al., 2001). En peces, por ejemplo, la conservación del recurso genético ha sido realizado en espermatozoides de salmónidos y ciprínidos (Lubzens et al., 1997; Vladić y Järvi, 1997; Lahnsteiner, 2000). Sin embargo, los resultados difieren con respecto a los diferentes protocolos de congelación utilizados. Por tanto, los protocolos ya establecidos necesitan ser ajustados para ser utilizados con otras especies.

En el caso de la criopreservación de huevos y embriones de organismos acuáticos, se ha tenido poco éxito (Bart, 2000). El problema es el gran tamaño y el alto contenido de lípidos que estos presentan. Incluso la organización polar que tienen tanto los ovocitos como los embriones ha hecho difícil su conservación a bajas temperaturas (Hiemstra et al., 2005). Además, en embriones la criopreservación involucra una serie de procesos entre éste y su medio circundante, por lo que el conocimiento de esta relación es esencial para el desarrollo de metodologías de congelación.

Aunque los métodos de criopreservación para esperma de peces han sido exitosas para más de 80 especies de peces de agua dulce y marinos (Scott y Baynes, 1980; Rana, 1995; Leung y Jaemison, 1991; Figiel y Tiersch, 1997; Medina-Robles et al., 2005), la criopreservación de huevos y embriones no ha sido del todo satisfactoria y solo existen pocas publicaciones con respecto a este tópico (Zell, 1978; Liu et al., 1993; Zhang y Rawson, 1995; Blesbois y Labbé, 2003; Tervit et al., 2005).

La congelación del material biológico (-196°C) tiene la ventaja de que puede ser mantenida por días o por períodos prolongados como meses o años. La conservación a corto plazo en peces implica la extracción de los gametos y la suspensión de las muestras con una solución fisiológica o extensora (SE), la cual es un compuesto de sales cuya función es mantener la viabilidad de la célula durante el proceso de congelación (Graybill y Horton, 1969). Después las muestras se almacenan a 4°C y se evalúa la calidad de los gametos.

Durante la criopreservación a largo tiempo, las muestras son mezcladas con la SE, a la cual se le adiciona uno o varios agentes crioprotectores (ACP). Los ACP son sustancias hidrosolubles y de baja toxicidad que disminuyen el punto eutéctico de una solución (punto en el cual una composición dada de A y B solidifica como un elemento puro), para alcanzar una concentración de solutos a una temperatura menor, de forma que la célula estará más deshidratada y el gradiente osmótico al que estará sometido será menor (Ávila-Portillo et al., 2006).

Las muestras así preparadas, son colocadas en pajillas o viales, se congelan a diferentes velocidades de enfriamiento y se almacenan a -196°C en nitrógeno líquido. Después, las muestras son descongeladas y la calidad del material criopreservado es evaluado. En el caso del espermatozoide, su capacidad para fertilizar es el principal indicador de la calidad de éstos (Tiersch, 2000).

Durante la conservación del material genético, las muestras están sujetas a cambios drásticos, principalmente durante el proceso de enfriamiento y congelación. Este procedimiento puede causar un daño a nivel celular, por lo que es de primordial importancia cuidar la viabilidad y funcionalidad celular durante el proceso (Wayman y Tiersch, 2000)

Las técnicas que permiten la determinación del daño a nivel celular en organismos acuáticos aún se encuentran en sus inicios, por consiguiente es necesario evaluar técnicas específicas que permitan detectar los cambios

ocasionados por el proceso de congelación. Entre estas opciones las técnicas de fluorescencia y el ensayo cometa podrían ser algunas alternativas viables (Mason, 1999) para evaluar el daño ocasionado por el proceso de congelación.

La conservación del recurso genético es una herramienta importante desde el punto de vista ecológico y acuicultural ya que puede ser una alternativa viable para la conservación del recurso genético de especies silvestres y de cultivo (Leibo, 2000). La técnica de criopreservación ha sido ampliamente reconocida por sus múltiples beneficios. En peces, la utilidad de conservar los recursos génicos a corto plazo (días, semanas) es reflejada en procesos como la reproducción asistida. Incluso, la disponibilidad de esperma congelado podría facilitar la fertilización artificial en otras partes del mundo, evitando el problema del transporte de reproductores (Bart, 1999).

Por otra parte, la conservación de material genético podría tener una influencia favorable en los programas de repoblamiento de peces, aumentando poblaciones de especies objetivo de la pesca comercial. Este punto es de especial interés para aquellas especies que conservan una significativa variabilidad genética, o que presentan genotipos o haplotipos particulares como es el caso de la trucha de San Pedro Mártir, *O. mykiss nelsoni* (Camarena-Rosales et al., 2008; com. pers. Camarena-Rosales, 2010).

La criopreservación de gametos ha sido de utilidad en la selección de reproductores, en la protección sanitaria del material biológico, en el suministro

permanente de gametos para utilización en criaderos o en investigación y como resguardo de líneas genéticas importantes. Además, es una herramienta fundamental en los bancos de germoplasma (Medina-Robles et al., 2005), cuyo objetivo es mantener líneas genéticas de interés en investigación y preservar material genético por tiempo indefinido, a fin de proteger a los organismos de la extinción, de la pérdida de la variabilidad genética y de la hibridación con otras especies (Cloud, 2000).

La técnica de criopreservación aplicada a subespecies como *O. mykiss nelsoni* podría beneficiar a otras truchas nativas del noroeste de México, cuya diversidad está amenazada por fragmentación de su hábitat o hibridación con especies exóticas (Ruiz-Campos et al., 2003). Incluso, la optimización de la técnica podría ser de gran utilidad para otras especies de salmónidos que se encuentren en peligro de extinción. Por lo anterior, la estandarización de la técnica de congelación del esperma de *O. mykiss nelsoni* podría ser considerada como una estrategia adecuada y factible a corto plazo para incrementar la población de la trucha de San Pedro Mártir.

Por consiguiente el objetivo de este trabajo es obtener la reproducción en cautiverio de la trucha de la Sierra de San Pedro Mártir (*O. mykiss nelsoni*) en condiciones de laboratorio y determinar un protocolo a corto y largo plazo, que permita la conservación genética del esperma de estos peces. Esto con el propósito de asegurar un acervo genético que permita contribuir a la

conservación de su población y como apoyo para otras truchas que se encuentran en peligro de desaparecer.

TRABAJOS PREVIOS Y PERSPECTIVAS

En los últimos años la criopreservación de gametos y embriones ha sido fundamental en el desarrollo de tecnologías reproductivas para animales de granja. La criobiología como el estudio de los efectos de las bajas temperaturas en los sistemas biológicos, tiene una larga historia. El primer experimento fue reportado por H. Power en 1663, quien mantuvo a un *□ematodo* parásito congelado en vinagre durante varias horas y este se recuperó después de descongelarlo. Sin embargo, el éxito de esta práctica se logró hasta el siglo XX con la introducción del glicerol como ACP de las células durante el proceso de congelación (Polge et al., 1949), y el subsecuente descubrimiento del Dimetil sulfóxido o DMSO (Me_2SO) (Lovelock y Bishop, 1959).

A raíz de estos descubrimientos muchas células y tejidos empezaron a ser congelados. Los primeros trabajos fueron realizados en esperma de mamíferos (Polge et al., 1949), de toro (Bratton et al., 1955), de cerdo (Pursel y Johnson, 1975) y de ratón (Okuyama et al., 1990). Después, se continuó con gametos y embriones de aves, mosca de la fruta, conejos y ratas (Schaffner et al., 1941; Whittingham et al., 1972; Bank y Maurer, 1974; Steponkus et al., 1990).

En organismos acuáticos, los trabajos, inician con Blaxter (1953), quien fertilizó huevos de arenque (*Clupea harengus*) utilizando semen congelado. A la fecha, se cuenta con un registro de entre 50 y 200 especies de peces, en los cuales la congelación de esperma ha logrado ser exitosa (Billard et al., 1995^a; Rana, 1995). Sin embargo, los resultados en este sentido no siempre han logrado ser reproducidos, por lo que se han tenido que reconstruir los protocolos utilizados o incluso, desarrollar métodos alternativos a fin de comparar resultados con otras especies (Tiersch, 2000).

En peces, los grupos beneficiados con la criopreservación han sido principalmente especies de interés en la pesca deportiva, especies de agua dulce, organismos de importancia comercial, especies marinas, peces salobres, especies silvestres y especies que se encuentran en peligro de extinción. En este último caso, los estudios han sido escasos, debido principalmente a que son pocas las organizaciones que se encargan de la preservación de material genético para fines de conservación (Beardmore, 1996).

En la trucha de San Pedro Mártir, no existe información sobre la criopreservación de gametos. Sin embargo, se tiene antecedentes de trabajos en esperma de especies cercanas como *O. gorbuscha* (Hodgins y Ridgway, 1964); *O. kisutch* y *O. tshawytscha* (Ott y Horton, 1971); *O. nerka* (Bilinski et al., 1981) y *O. mykiss* (Wheeler y Thorgaard, 1991; Holtz, 1993; Gwo et al., 1993; McNiven et al., 1993; Conget et al., 1996). Los resultados obtenidos en la conservación de material

genético en estas especies han sido significativos, por lo que las perspectivas de aplicar la técnica de congelamiento en *O. mykiss nelsoni* es viable.

Los primeros estudios en la trucha de San Pedro Mártir fueron realizados por Ruiz-Campos (1989, 1991^a, 1991b, 1993, 1994), Ruiz-Campos y Cota-Serrano (1992), Ruiz-Campos y Pister (1995) y Ruiz-Campos et al. (1997). Estos trabajos se refieren a su distribución, bionomía, ecología poblacional, hábitat y estado de conservación. Sin embargo los estudios para lograr su reproducción en cautiverio son escasos (Ruiz-Campos, 1994), pese a que éstos podrían ser relevantes en los programas de repoblamiento y conservación de esta trucha endémica.

En el caso de la criopreservación, las condiciones climáticas durante el periodo reproductivo (enero-marzo) de esta subespecie de trucha, han obstaculizado para obtener muestras de esperma y realizar estudios de conservación del material genético de estos peces (Ruiz-Campos, 1994). Por esto, se requiere de programas estratégicos que permitan mantener hasta la maduración gonádica a esta trucha en condiciones de laboratorio, a fin de realizar estudios para la criopreservación de su material genético, alternativa que podría apoyar de manera sustancial su conservación biológica.

Durante la criopreservación de esperma de salmónidos, Scott y Baynes (1980) hacen una análisis de los protocolos utilizados en *O. gorbuscha*, *O. tshawytscha* y *O. kistch*. Los autores sugieren que las diferencias en las

técnicas utilizadas se deben a las SE, ACP, al método de congelamiento y al descongelamiento, lo cual está en función de la calidad de los gametos. El uso de SE y ACP, es determinante para mantener la viabilidad del espermatozoides durante su almacenamiento a bajas temperaturas. Al igual, otros factores como la presión osmótica y la contaminación por bacterias, son factores importantes que pueden ser determinantes en este proceso.

Las SE han ayudado a mantener una alta movilidad del espermatozoides después del proceso de congelación al estabilizar las condiciones físico-químicas en el plasma seminal durante el almacenamiento (Tan-Fermin et al., 1999), y para mejorar las tasas de fertilización en algunas especies (Tambasen-Cheong et al., 1995; Ohta y Izawa, 1996). Su composición puede tener una formulación simple cuando incluye uno a dos ingredientes o compleja cuando se mezclan con varios aditivos de alto peso molecular. Estos aditivos contribuyen a mantener la viabilidad de la célula durante el proceso de enfriamiento. Por ejemplo, los azúcares proporcionan una fuente de energía esencial para el metabolismo anaerobio del espermatozoides (Scott y Baynes, 1980).

Generalmente las SE son elaboradas acorde al criterio de que su composición iónica y presión osmótica sean similares a aquellas en la sangre o plasma seminal del organismo (Morisawa y Susuki, 1980). No obstante, algunos autores preparan medios con la misma composición iónica y osmolalidad que la del plasma seminal para mantener inactivo al espermatozoides de los peces (Villani y Catena, 1991; Tan-Fermin et al., 1999; Asturiano et al., 2004).

Las SE más utilizadas en peces son NaCl, KCl, CaCl₂, NaHCO₃, MgSO₄, NaH₂PO₄ (H₂O), KHCO₃ (Medina-Robles, 2005). No obstante, a pesar de la gran lista de ingredientes que pueden ser utilizados, las SE simples (1-2 ingredientes), son más eficientes (Scott y Baynes (1980). Al respecto, Horton y Ott (1976) evaluaron la efectividad de diferentes SE y encontraron que el mejor resultado fue con una SE que contenía sólo NaCl para la tonicidad celular, NaHCO₃ como amortiguador y lecitina para proteger la membrana. No obstante, Stein y Bayrle (1978) encontraron diferencias especie-específicas utilizando la misma solución extender entre la trucha arcoíris y la trucha café. Resultados similares fueron reportados por Gwo et al. (1993) para *Cyprinus carpio*, *O. mykiss* y *Fugu niphoble*. Sin embargo, a la fecha no existe un criterio general que determine el éxito de usar un extender de formulación compleja o simple para la criopreservación de esperma de peces.

Referente a los ACP, estos son químicos que reducen el daño producido en las células durante el congelamiento en nitrógeno líquido y durante el proceso de descongelación. Bioquímicamente se pueden distinguir tres tipos, los alcoholes (metanol, etanol, propanol, 1-2 propanediol y glicerol), los azúcares (glucosa, lactosa, sucrosa, sacarosa) y el DMSO (Ávila-Portillo et al., 2006). Los ACP también pueden clasificarse en agentes penetrantes y no penetrantes de acuerdo a su habilidad para penetrar a través de las membranas celulares (Medina-Robles, 2005).

Los ACP permeables son sustancias de bajo peso molecular (glicerol, metanol, etilenglicol, 1,2-propanodiol, butanediol, acetamida y DMSO) que pueden penetrar el citoplasma celular (Mizukami et al., 1999). De esta manera, el fluido intracelular puede ser superenfriado a temperaturas entre -5 y -15°C , sin que ocurra la formación de cristales de hielo, debido a que estas sustancias disminuyen el punto de congelación debido a una reducida interacción entre las moléculas de agua (Vincent et al., 1998). En estas temperaturas, los cristales de hielo se forman en el medio externo y cuando las temperaturas descienden por debajo de estos intervalos, se inicia la formación de cristales de hielo intracelular (Mizukami et al., 1999).

Los ACP no permeables como el polivinil alcohol, hialuronato de sodio y la albúmina no penetran la membrana celular debido a su alto peso molecular. La función de estos químicos es remover osmóticamente el agua intracelular, remplazándola por los ACP permeables durante el enfriamiento, y prevenir el choque osmótico por medio del control de la rehidratación intracelular durante la descongelación (Mizukami et al., 1999).

De los ACP el dimetil sulfóxido (M_2SO) y el glicerol (Gly) son los más utilizados, solos o en combinación con aditivos de alto peso molecular como la sucrosa, lactosa, fructosa, glicina, glucosa, yema de huevo, albúmina de suero bovino, propina D, lecitina y manitol (Scott y Baynes, 1980). Actualmente, el Metanol (Jensen et al., 2008), el Dimetil acetamida (Bozkurt, 2005; Peng et al., 2008),

Propilen-glicol (Joo y Dupré, 2002) y etilenglicol (Carmona-Undurraga, 2005; Zhang et al., 2005) han sido utilizados con excelentes resultados.

No obstante, aunque la presencia de los ACP es requerida para la supervivencia celular durante el proceso de criopreservación, estos compuestos pueden ser potencialmente tóxicos (Wayman y Tiersch, 2000). Además, su eficiencia depende de la permeabilidad de la membrana plasmática, y de la toxicidad que producen al penetrar a la célula. Así, cada especie responde de singular manera a estas sustancias, originando diferentes efectos sobre los organismos al aplicar las mismas metodologías (Renard y Cochard, 1989), lo que indica que los ACP tienen efectos especie-específicos (Yao et al., 2000).

Aunque la función que tienen las soluciones extenders y los ACP sobre el proceso de congelación a corto y largo plazo del espermatozoides es importante, Stoss et al. (1978) sugieren considerar también otros factores como la presión osmótica, dilución, temperatura, contenido de oxígeno, materia orgánica disuelta y pH; los cuales podrían mejorar los resultados. En virtud de la interacción entre todas estas variables, es recomendable realizar pruebas de calidad en el espermatozoides, como viabilidad y contaminación bacteriana (Jenkins, 2000).

Evenson et al. (1982) y Auger et al. (1989) determinaron que la calidad del espermatozoides congelado puede tener una relación directa con el contenido de ATP de la mitocondria. Tsvetkova et al. (1995), encontraron que durante la congelación de espermatozoides de *C. carpio*, la cantidad de ATP disminuye y esto podría deteriorar

la calidad de las muestras. Para la misma especie, la movilidad del esperma se detuvo cuando la cantidad de ATP disminuyó en 50 y un 80%, por tanto la movilidad dependió de la cantidad de ATP almacenado (Billard et al., 1995b). Lo anterior no es exclusivo para especies de agua dulce; en especies como *Oreochromis niloticus*, que tolera aguas saladas, se ha encontrado que el nivel de movilidad del esperma disminuye al 70%, cuando la funcionalidad mitocondrial disminuye al 30 % (Segovia-Quintero et al., 2000)

Paniagua-Chávez et al. (2006), mencionan que la calidad del esperma puede ser evaluada en función de su movilidad (porcentaje de espermatozoides que se desplazan activamente), viabilidad (condición de la membrana citoplasmática), o por la tasa de fertilización (porcentaje de ovocitos fertilizados). Sin embargo, en la mayoría de los casos la movilidad ha sido el parámetro más utilizado para evaluar la calidad del esperma, aunque la posible correlación entre este parámetro y la fecundidad no ha sido plenamente demostrada (Verstegen et al., 2002). A lo anterior Mason (1999) y Gallardo-Escarate (2005) sugieren que técnicas como fluorescencia y la innovación del procesamiento digital de imágenes, podrían ser una opción en la determinación de la viabilidad del esperma después del proceso de congelación.

Aunque la criopreservación de esperma de peces ha sido lograda para algunas especies, la preservación de embriones ha tenido serios problemas (Medina-Robles et al., 2005). Los principales problemas encontrados en los embriones de

peces son su tamaño (>1 mm), el complejo sistema de membranas que presentan, la baja permeabilidad y el alto contenido de vitelo (Tiantian, 2004).

En estudios realizados en *O. mykiss*, se determinó que la criopreservación de blastómeros aislados podría ser una alternativa viable en la criopreservación de embriones (Leveroni y Maisse, 1998). Incluso, se sugiere que la técnica de vitrificación puede ofrecer buenos resultados (Bart, 2000). Desafortunadamente, el desarrollo de esta técnica requiere de una concentración y distribución homogénea del ACP, proceso que aún no ha sido alcanzado. A la fecha, la criopreservación de embriones de peces ha sido meramente empírica y sus resultados son escasos y poco alentadores. Sin embargo, los resultados obtenidos con gametos podrían ser el punto de partida para resolver estos problemas.

La conservación de recursos genéticos es una herramienta importante para la preservación de material genético de especies acuáticas. No obstante, su desarrollo aun adolece de la falta de información sobre la biología y fisiología de las especies, así como una estandarización de la técnica para ser aplicada en otros organismos (Lahnsteiner, 2000) y alcanzar tasas de fertilización cercanas a las obtenidas con esperma fresco. Además, es necesario evaluar nuevos ACP que disminuyan los efectos tóxicos y de criodañó sobre la célula espermática (Medina-Robles et al., 2005). Incluso, se ha recomendado explorar los alcances y mecanismos de la conservación del material genético así como la utilidad del

Banco de Genes, como herramientas complementarias en los procesos de conservación de los recursos naturales (Gibson y Pullin, 2005).

En la actualidad, los bancos de germoplasma son más comunes para las plantas que para animales (Wild, 1997). No obstante la producción animal también se ha visto beneficiada con los criobancos de esperma y embriones, los cuales han permitido mejorar la producción de carne y leche en el ganado doméstico. Incluso, los bancos de esperma y embriones congelados se han convertido en una solución para el mantenimiento de los genotipos (Wildt, et al., 1997).

Para peces existen algunos bancos de genes ubicados en Noruega, Finlandia, India, Rusia, Filipina, Canadá, Estados Unidos, Brasil, Colombia y Venezuela (Harvey, 2000) en donde los costos en tiempo, dinero y esfuerzo de estos proyectos, han resultado ser menores a los que conlleva la conservación en granjas o ANP. Además, se cuenta con la ventaja de evitar el riesgo de la contaminación y el uso de espacios más pequeños.

Gibson y Pullin (2005), sugieren trabajar muy de cerca con grupos como la Unión Internacional para la conservación de la Naturaleza (UICN), la FAO y otras agencias para revisar el estado en que se encuentra la conservación de especies silvestres y actuar donde sea necesario desarrollar estrategias para la conservación de especies endémicas en peligro de extinción.

México es uno de los países más diversos en cuanto a recursos naturales se refiere, sin embargo, una gran cantidad de especies, principalmente nativas, se

encuentran en peligro de extinción y los peces, principalmente los de agua dulce, son el grupo con las perspectivas más críticas de conservación (Ceballos, 1993).

A la fecha se ha prestado poca atención a la importancia de establecer y proteger los recursos naturales, principalmente, aquellos que se encuentran en los sistemas acuáticos localizados en las regiones de montaña, a pesar de que éstas constituyen una importante reserva de diversidad biológica, como es el caso de la sierra de San Pedro Mártir. Así, la importancia que tiene la criopreservación de recursos génicos de esta zona, es elaborar nuevos planes de manejo que permitan la conservación de sus especies.

DESCRIPCIÓN DE LA SUBESPECIE

La trucha arcoíris *O. mykiss nelsoni* (Evermann, 1908), es una subespecie endémica de la pendiente occidental de la Sierra de San Pedro Mártir, Baja California, México (Miller, 1950; MacCrimmon, 1972; Smith, 1984) en altitudes de 600 a 2,000 m (Ruiz-Campos, 1991a). Esta subespecie es considerada uno de los stocks más puros de trucha arcoíris costera en Norteamérica (Berg et al., ms). Entre sus características sobresalen su capacidad euritérmica y comportamiento no migratorio en su hábitat natural (Needham, 1938), lo que le confiere un gran atractivo y potencial acuicultural. Además representa un patrimonio biogeográfico y evolutivo que tiene prioridad de conservación (Ruiz-Campos, 1994).

No obstante, *O. mykiss nelsoni* es considerada una subespecie rara y sujeta a protección especial por la NOM-ECOL-059 (Secretaría de Medio Ambiente y recursos Naturales, 2002) debido a la restringida distribución y abundancia que presenta en su hábitat natural.

Densidad. Históricamente *O. mykiss nelsoni* ha experimentado fuertes fluctuaciones en su densidad poblacional como consecuencia del efecto de la construcción de avenidas que modificaron la geomorfología del arroyo y provocaron alteraciones en su hábitat (Everman, 1908; Nelson, 1921; Needham, 1938; Ruiz-Campos, 1993). Los estudios realizados por Ruiz-Campos (1993) determinan que la densidad de truchas en el Arroyo san Rafael es de 0.023 a 0.088 individuos/m².

Diferenciación sexual. La diferenciación sexual de la trucha de San Pedro Mártir se basa en una característica sexual secundaria a nivel de rostro y maxila (Fig. 1.1). En las hembras el diámetro ocular es igual a la longitud del rostro y en los machos este diámetro es mucho menor. Además, a partir del primer año de edad en los machos se observa una protuberancia de color oscura en la parte apical de la maxilar inferior y en las hembras este perfil es más redondeado (Ruiz-Campos, 1993).

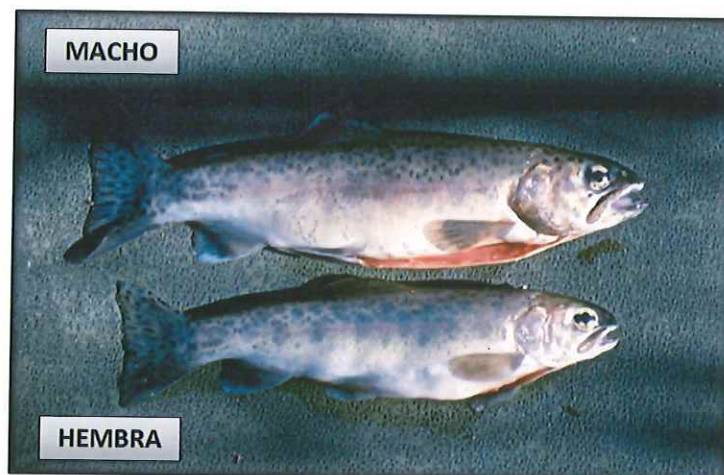


Figura. 1.1. Macho y hembra de *O. mykiss nelsoni*.

Fecundación y desove. La trucha de la Sierra de San Pedro Mártir es una especie ovípara de fecundación externa que se caracteriza por alcanzar la madurez gonádica después del primer año de vida, con una talla de 103-112 mm de longitud patrón (Ruiz-Campos, 1993). Los machos inician el desarrollo gonadal más temprano que las hembras, presentándose la madurez sexual a partir del intervalo de talla de 73-82 mm de longitud patrón. Lagler et al. (1984) sugiere que este fenómeno puede ser consecuencia del elevado nivel de metabolismo de los machos influenciado por procesos endócrinos.

El periodo de desove de la trucha de la Sierra de San Pedro Mártir es anual y se presenta en la estación de invierno, durante los meses de enero a marzo, siendo el mes de febrero el de mayor actividad reproductiva. Sin embargo, aunque la reproducción tiene lugar una sola vez al año, los machos pueden fecundar más de una vez. La temperatura registrada durante estos meses fluctúa entre 5.2 a

13.2°C y es considerada como óptima para la incubación de los huevos de esta trucha (Ruiz-Campos, 1993).

Las hembras, presentan un promedio de fecundidad absoluta de 15.34 ovocitos/cm de longitud, menor a la registrada en otras subespecies de truchas arcoíris con un promedio de 93.9 ovocitos/cm de longitud (Rounsefell, 1957). La trucha de la Sierra de San Pedro Mártir presenta un tamaño menor al comparado con otras subespecies de edad similar, por lo que la cantidad de ovocitos maduros también es menor. El tamaño promedio de los ovocitos de *O. mykiss nelsoni* es de 3.14 mm (Ruiz-Campos, 1993). Billard (1992) sugiere que un tamaño del ovocito puede verse influenciado con la edad y talla de la hembra. Incluso, un bajo régimen alimenticio puede alterar de manera importante el tamaño de los gametos. No obstante, Ruiz-Campos (1993) concluye que el tamaño del ovocito en la trucha de la Sierra de San Pedro Mártir es independiente de la talla y el peso del organismo.

Desarrollo ontogénico. Ruiz-Campos (1994) describe 23 días desde la etapa de fertilización hasta la eclosión para la trucha de San Pedro Mártir (Tabla I.1).

Tabla I.1. Desarrollo ontogénico de *O. mykiss nelsoni*.

Día	Descripción
1	Formación del blastocito
3	El blastocito mide ~1 mm diámetro
4	Migración celular descendente para cubrir el vitelo
6	Embrión, notocorda y los pliegues neurales longitudinales son visibles. Se aprecia acumulación de gotas de aceite en el vitelo
12	Embrión en fase oculada. Se observa el corazón latiendo y el flujo sanguíneo es visible
13	Corazón indiferenciado Aleta dorsal visible
14	Elongación del embrión Se observan movimientos
17	Aletas pectorales formadas
19	El embrión comienza a pigmentarse Tracto digestivo visible en su parte posterior
20	Inicia el proceso de eclosión
23	Eclosión masiva Longitud total de la larva 9.22 mm
37	Absorción del saco vitelino La larva mide 17.3 mm

Tomado de Ruiz-Campos, 1994.

Clases de edad y longevidad. La longevidad de la trucha de la Sierra de San Pedro Mártir es de 4 años. Ruiz-Campos (1993) registra cinco clases de edad (0-IV años) y una longitud máxima de 220 mm longitud patrón durante el último año (IV). La baja longevidad de esta especie es posiblemente atribuida a factores genéticos, ligados con el alto costo energético que es asociado al proceso de primera madurez gonádica y reproducción (Jonsson et al., 1991; Ruiz-Campos, 1993).

Crecimiento. La tasa de crecimiento somático anual registrado para la trucha de San Pedro Mártir en términos de longitud y peso es mayor durante el primer año de edad. Además, esta trucha presenta un lento crecimiento de tipo alométrico con la longitud del pez (Ruiz-Campos, 1993; Ruiz-Campos et al., 1997). De acuerdo a estos mismos autores la longitud promedio por clases de edad se presenta en la Tabla I.2.

Tabla I.2. Clases de edad en la trucha de San Pedro Mártir.

EDAD	Longitud promedio (mm)r	Peso promedio (g)
0	68.576	7.314
I	108.621	24.518
II	138.101	46.579
III	168.314	82.100
IV	211.000	151.800

Tomado de Ruiz-Campos, 1993 y Ruiz-Campos et al., 1997.

Características morfológicas. La trucha de la Sierra de San Pedro Mártir presenta manchas negras en ambos lados del iris de los ojos. Las aletas son pareadas y de color naranja brillante. La aleta pélvica presenta un color amarillento y la aleta anal presenta manchas negras de formas circulares y ovaladas que son de distinto tamaño (Fig. 1.2). La línea lateral está bien desarrollada y es de color rojo o rosa y se pueden observar algunas manchas circulares negras en la región ventral (Ruiz-Campos et al., 2003).



Figura. 1.2. Características morfológicas externas de la trucha de San Pedro Mártir.

Hábitos alimenticios. La dieta de la trucha de la Sierra de San Pedro Mártir es selectiva y básicamente insectívora, dominada en un 90 % por larvas y pupas del díptero Simuliidae, y larvas de tricópteros como Hydropschidae, Sericostomatida, e Hydroptilidae (Ruiz-Campos y Cota-Serrano, 1992).

Sin embargo, la dieta de esta subespecie tiene diferencias estacionales en la composición cualitativa de su alimento. Durante las estaciones de otoño-invierno las presas bentónicas son el alimento preferido y durante primavera-verano la dieta se caracteriza por una mayor cantidad de dípteros, efemerópteros y tricópteros. Las truchas de edad 0 ó juveniles del año (≤ 85 mm longitud patrón) se alimentan en mayor proporción de larvas y pupas de dípteros y las truchas adultas (≥ 86 mm longitud patrón) prefieren presas como larvas de tricópteros (Ruiz-Campos, 1993).

Distribución. La trucha arcoíris costera *O. mykiss nelsoni* se distribuye en la pendiente occidental de la Sierra de San Pedro Mártir a altitudes de 500 a 2030 msnm. El hábitat preferido de esta subespecie son los arroyos de aguas frías, claras y bien oxigenadas. Además muestra un patrón de permanencia principalmente en las pozas y recodos con una profundidad >30 cm, mayor cobertura (sombreado), sustrato arenoso y mayor disponibilidad de presas (Ruiz-Campos y Pister, 1995).

La distribución original de la trucha de la Sierra de San Pedro Mártir, fue restringida a una sección de 24.2 km del arroyo Santo Domingo y a su tributario, el Arroyo la Zanja en las proximidades del Rancho San Antonio (Evermann, 1908; Needham, 1938). Entre los años de 1929 y 1941 la distribución de esta subespecie se amplía a otros arroyos de la Sierra de San Pedro Mártir (Arroyos la Grulla, La Misión, La Zanja, Valladares y San Rafael) debido a las introducciones realizadas por el naturalista Charles Edward Utt, (Ruiz-Campos y

Pister, 1995). Ruiz-Campos (1993) registra la presencia de ésta trucha sólo en los Arroyos San Antonio de Murillos, La Zanja (parte baja), El Potrero, La Grulla, San Rafael y La Misión o San Pedro.

Sin embargo, la dispersión de *O. mykiss nelsoni* hacia aguas más arriba se ha visto imposibilitada debido a la presencia de una cascada ubicada 5 millas arriba del arroyo del Rancho San Antonio, la cual es considerada una barrera física para la dispersión de esta subespecie (Ruiz-Campos, 1993).

SITIO DE RECOLECTA

La Sierra de San Pedro Mártir, es la formación batolítica más alta dentro del rango Peninsular y está comprendido desde el sur de California, E.U.A. hasta el extremo sur de la península de Baja California, México (O'Connor y Chase, 1989). Al Este la Sierra está delimitada por un escarpamiento o escalón que supera los 2,500 m y que separa las cuencas del Valle Chico y Valle San Felipe, las cuales forman parte de la llamada depresión del Golfo. Al Norte, colinda con la Falla de agua Blanca y la parte occidental de bajo relieve (Barajas, 1991). El Arroyo San Rafael donde se distribuye *O. mykiss nelsoni*, es perenne en sus partes altas y medias, de naturaleza estrecha (5.58 m) y poco profundo (0.34 m). El arroyo se ubica entre el Rancho Mike's Sky y el Rancho Garet, en la porción Noroeste de la Sierra de San Pedro Mártir a 1,231 msnm (Fig. 1.3).

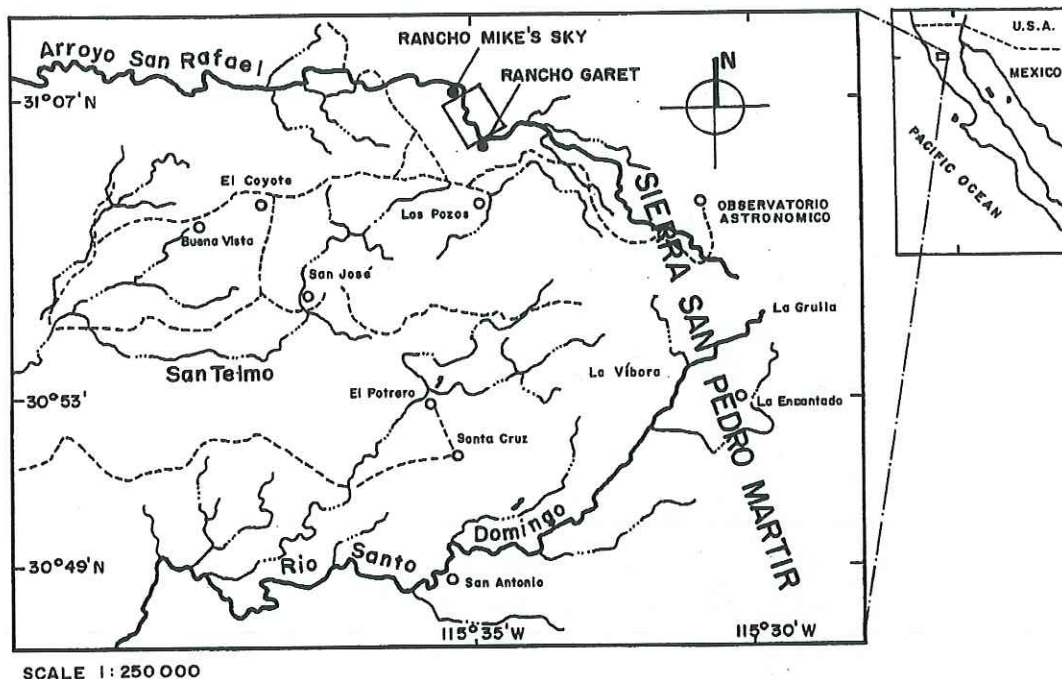


Figura 1.3. Localización geográfica del Arroyo San Rafael en la Sierra de San Pedro Mártir, Baja California, México. Tomado de Ruiz-Campos, 1994.

Geohidrología. El Arroyo San Rafael se caracteriza por tener sus valles fluviales en forma de "V" con una pendiente muy pronunciada, lo que permite la formación de sistemas de rabiones o de corriente. Presenta poca acumulación de materia orgánica y tiene un sustrato "limpio" compuesto principalmente de arena (93.1%), materia orgánica (0.83%) y grava de naturaleza ganítica. El arroyo está catalogado como una poza de mediana profundidad (1.5 a 2.0 m) que puede ser temporal y dependiente de los niveles de flujo de los arroyos. Esto debido al azolvamiento proveniente de zonas aledañas o al rompimiento de la estructura del repeso natural durante la temporada de lluvias en invierno (Ruiz-Campos, 1993).

Hidrología. La Sierra de San Pedro Mártir se caracteriza por una serie de corrientes intermitentes que drenan las áreas del clima mediterráneo (lluvias de invierno), las cuales se vuelven criptorreicas (corrientes de agua subterráneas) en sus partes próximas a la desembocadura al Océano Pacífico. Dichas partes presentan avenidas cuando algún ciclón recorre o cruza la Península (Tamayo y West, 1964). Al Norte, el Arroyo San Rafael, es uno de los flujos de agua que bajan a la Sierra de San Pedro Mártir con dirección al Océano Pacífico. Además este arroyo tiene tres tributarios que son la Fresa, Vallecitos y Agua Zarca (Ruíz-Campos, 1991a).

Calidad del agua. La calidad del agua en el Arroyo San Rafael depende de las características geomorfológicas, hidrométricas y de las condiciones meteorológicas presentes. Ruiz-Campos (1993) registró un promedio de temperatura de 15.4 °C con una mínima de 5.2 °C durante el invierno y hasta 29.4 °C en los meses más cálidos durante la temporada de verano. Incluso durante esta temporada, en un ciclo de 24 horas, la temperatura del agua registró un intervalo de 14°C a 24.6°C Ruiz-Campos (*op. cit.*). Las temperaturas más bajas se obtuvieron entre las 05:00 y las 09:00 horas y las más altas entre las 14:00 y 15:00 horas. Así mismo, las cantidades de oxígeno más altas (10.8 ppm) se encontraron entre las 05:00 y 06:00 horas y las más bajas (6.7 ppm) a las 14:00 horas. En invierno la temperatura del agua vario de 5.8 a 12.6°C durante el transcurso del día. Los valores más bajos (5.8 a 6.8°C) se encontraron entre las 01:00 y las 09:00 horas y los más altos (12.2 a 12.6°C) entre las 13:00 y

15:00 horas. El contenido de oxígeno registró sus valores más bajos (10.5 ppm) a las 18:00 horas y los más altos (14.0 ppm) a las 06:00 horas.

El pH registrado en el arroyo es considerado de los más altos en la Sierra, valores de 8.3 son registrados durante el año. La dureza total de agua en el arroyo tiene un promedio de 119.3 ppm, el calcio es un catión dominante (promedio 73.2 ppm), le sigue los iones bivalentes como el magnesio (promedio 46.8 ppm) y por último los silicatos (promedio 14.6 ppm). En el caso de los nutrientes, los fosfatos (ortofosfatos) y los nitratos se encuentran en cantidades <0.2 ppm (Ruiz-Campos, 1993).

Clima. El clima predominante en la Sierra de San Pedro Mártir es sub-húmedo con precipitación principalmente invernal, semifrío con una temperatura media anual de 7°C y un promedio diario de 10°C (Álvarez y Maisterrena, 1977). El clima se caracteriza por una precipitación promedio anual del orden de 400 m, con máximos durante algunos años de más de 1000 m.

El origen de las lluvias es de tipo orográfico, causadas por tormentas tropicales que entran al Golfo de California o del Océano Pacífico; o bien causadas por frentes fríos de tormenta que se originan en el Golfo de Alaska, que se mueven en dirección sureste (Álvarez, 1985). La temperatura ambiental presenta un amplio intervalo anual y diario, con mínimos hasta de -12°C durante los meses de invierno (Yruretagoyena-Ugalde, 1992) y máximos de 35°C en el verano.

Vegetación. En la Sierra de San Pedro Mártir predominan dos tipos de vegetación, el chaparral de montaña y el bosque de coníferas (Wiggins, 1980; Delgadillo-Rodríguez, 1992). En los márgenes del Arroyo San Rafael se distinguen tres niveles de vegetación: En la parte alta se encuentran freatoilas como el encino *Quercus agrifolia*, en la parte intermedia domina el sauce (*Salix lasiolepis* y *S. laevigata*), aliso (*Platanus racemosa*) y el álamo (*Populus fremontii*) y la parte baja representada por la cola de caballo (*Equisetum hiemale*), el pasto de banco (*Muhlenbergia richardsoni*) y juncos (*Scirpus sp.*, *Cyperus sp.*, y *Juncus tiehmi*).

La vegetación acuática presenta formas emergentes como el tule (*Typha dominguensis*) y el apio acuático (*Rorippa nasturtium*), formas flotantes enraizadas (*Potamogeton natans*), formas flotantes libres como la lenteja de agua (*Lemna gibba* y *L. trisulca*), y formas sumergidas como *Berula erecta*, *Ceratophyllum demersum*, *Ranunculus aquatilis*, y *R. hydrocharoides* (Delgadillo-Rodríguez, 1992).

La localización geográfica del sitio de recolecta fue determinado usando un sistema de GPS (Sistema de posición global) y su ubicación se asentó en un mapa topográfico 1:250,000 publicados por el Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI) y 1:50,000 publicado por la Comisión de Estudios del Territorio Nacional (CETENAL).

OBJETIVO GENERAL

Establecer la maduración gonádica en cautiverio de la trucha de la Sierra de San Pedro Mártir *Oncorhynchus mykiss nelsoni* en condiciones de laboratorio y determinar un protocolo a corto y largo plazo, que permita la conservación del esperma de esta subespecie nativa.

OBJETIVOS PARTICULARES

Mantener a la trucha de la Sierra de San Pedro Mártir *O. mykiss nelsoni* en condiciones de laboratorio.

Establecer las condiciones óptimas para la maduración gonádica de la trucha de la Sierra de San Pedro Mártir en condiciones de cautiverio.

Desarrollar un protocolo para la conservación a corto plazo del esperma de la trucha de San Pedro Mártir.

Desarrollar un protocolo para la criopreservación del esperma de *O. mykiss nelsoni*.

Evaluar el daño ocasionado por el proceso de congelación en esperma de la trucha a nivel celular y de DNA, utilizando sondas fluorescentes y el Ensayo Cometa respectivamente.

LITERATURA CITADA

- Álvarez, M., y J. Maisterrena, 1977. Observaciones meteorológicas y climatológicas en la Sierra de San Pedro Mártir. *Revista Mexicana de Astronomía y Astrofísica*. 2:43-52.
- Álvarez, M., 1985. Climatología de la Sierra San Pedro Mártir. *Proceedings of the desert ishes council*. 13:331-342.
- Ávila-Portillo, L. M., J. I. Madero, C. López, M. F. León, L. Acosta, C. Gómez, L. G. Delgado, C. Gómez, J. M. Lozano y M. T. Reguero, 2006. Fundamentos de criopreservación. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*. 57 (4):291-300.
- Asturiano, J., L. Pérez, D. Garzón, F. Marco-Jiménez, D. Peñaranda, J. Vicente y M. Jover, 2004. Physio-chemical characteristics of seminal and development of media and methods for the cryopreservation of European eel sperm. *Fish Physiology and Biochemistry*. 30 (3-4):283-293.
- Auger, J., X. Ronot y J. Dadoune, 1989. Human sperm mitochondrial function related to motility, a flow and image cytometric assessment. *Journal Androl*. 10:439-448.
- Bank, H., y R. R. Maurer, 1974. Survival of frozen rabbit embryos. *Experimental Cell Research*. 89:188-196.
- Barajas, A. M., 1991. La Sierra de San Pedro Mártir: crecimiento de un gigante. Memoria III. Semana de la exploración y la historia: Sierra de San Pedro Mártir. Lazcano (ed). Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada México. 27-28.
- Bart, A. N., 1998. Potential use and study of ultrasound in cryopreservation of fish embryos, mass-marking of fish population and drug delivery. *Proceedings of the Fifth Asian fisheries Forum. International Conference Nov 11-14. Chiang Mai, Thailand*. 22 p.

- Bart, A. N., D.W. Wolfe y R.A. Dunham, 1998. Fertilization of channel catfish, *Ictalurus punctatus*, eggs with cryopreserved sperm from blue catfish, *Ictalurus furcatus*. Transactions of the American Fisheries Society. 127:819-824.
- Bart, A. N., 1999. Biodiversity and *ex situ* Fish Genetic Conservation. AARM Newsletter. 4 (4):6-8.
- Bart, A. N., 2000. New Approaches in Cryopreservation of Fish Embryos. IN: Tiersch, T. R. y P. M. Mazik (eds). Cryopreservation in Aquatic Species. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana. 179-187.
- Beardmore, J., 1996. *Ex situ* genetic conservation and policy development at the International Fisheries Gene Bank. Consultation on fish genetic resources. (51):29-31.
- Behnke, R. J., 1992. Native trout of western North America. American Fisheries Society Monograph 6 Bethesda. 275 p.
- Berg, W. J., C. Yruretagoyena y E. P. Pister. Manuscrito. Genetic characterization and systematics of the San Pedro Mártir rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss nelsoni* (Evermann)
- Bilinski, E., G. Gibbard, F. Lee, S. Gibbard, D. Smith y M. Peters, 1981. Evaluation of the quality of sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka*, stored in ice or partially frozen in salt fortified refrigerated sea water. Canadian technology report of fisheries and aquatic science. Technology services branch Pacific Region, Department of fisheries and oceans, Vancouver British Columbia, Canada. 17 p.
- Billard, R., 1992. Reproduction in Rainbow trout: sex differentiation, dynamics of gametogenesis, biology and preservation of gametes. Aquaculture. 100:263-298.

- Billard, R., J. Cosson, L. Crim y M. Suquet, 1995a. Sperm physiology and quality IN: Bromage N. y Roberts R. (eds). Broodstock management and egg and larval quality. Blackwell Science Ltd. Cambridge, Massachusetts. 25-52.
- Billard, R., J. Cosson, G. Perchec, O. Linhart, 1995b. Biology of sperm and artificial reproduction in carp. *Aquaculture*. 129:95-12.
- Blaxter, J., 1953. Sperm storage and cross-fertilization of spring and autumn spawning herring. *Nature*. 172:1189-1190.
- Blesbois, E., y C. Labbé, 2003. Main improvements in semen and embryo cryopreservation for fish and fowl. IN: Planchenault D. (ed). Workshop on Cryopreservation of Animal Genetic Resources in Europe, Paris; 55-65.
- Bozkurt, Y., 2005. Effect of different cryoprotectants on viability of mirror carp (*Cyprinus carpio*) spermatozoa. Süleyman Demirel Üniversitesi. Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Dergisi. I (I):63-67.
- Bratton, R. W., R. H. Foote y J. C. Cruthers, 1955. Preliminary fertility results with frozen bovine spermatozoa. *Journal of Dairy Science*. 38:40-46.
- Camarena-Rosales, F., G. Ruiz-Campos, J. R. Vélez, R. L. Mayden, D. A. Hendrickson, A. Varela-Romero, F. J. García de León, 2008. Mitochondrial haplotype variation in wild trout populations (Teleostei: Salmonidae) from northwestern Mexico. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. 18:33-45.
- Carmona-Undurraga, J. H., 2005. Dinámica de proteólisis ruminal en muestras de forraje conservadas a bajas temperaturas. Tesis de licenciatura. Universidad Católica de Chile. 34 p.
- Ceballos, G., 1993. Especies en peligro de extinción. En: O. Flores y A. Navarro (Comps.). *Biología y problemática de los vertebrados en México*. Ciencias. (7):5-10.
- Cloud, J., 2000. Cryopreservation of sperm of steelhead rainbow trout after refrigerated storage. IN: Terrence T. y Patricia M. (eds). *Cryopreservation*

in Aquatic species. The world Aquaculture Society Advances in World Aquaculture. Baton Rouge, Louisiana; 101-103.

Conget, P., M. Fernández, G. Herrera, J. Minguell, 1996. Cryopreservation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa using programmable freezing. Aquaculture. 143:319-329.

Contrera-Balderas, S., Ruiz-Campos G., Schmitter-Soto J. J., Díaz-Pardo E., Contreras-McBeath T., Medina-Soto M., Zambrano-González L., Varela-Romero L., Mendoza-Alfaro R., Ramírez-Martínez C., Leija-Tristán M., Almada-Villela P., Hendrickson D., Lyons J., 2008. Freshwater fishes and water status in México: a country-wide appraisal. Aquatic Ecosystem Health & Management. 11 (3):246-256.

CONANP, (Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas). 2009. www.conanp.gob.mx. (29/11/2009).

Delgadillo-Rodríguez, J., 1992. Florística y ecología del Norte de Baja California. Universidad Autónoma de Baja California, México. 345 p.

Ehrlich, A.H. y P. R. Ehrlich, 1992. Causes and consequences of the disappearance of biodiversity. IN: Sarukhán, J. y Dirzo R. (eds). México Ante los Retos de la Biodiversidad. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). México; 43-55.

Evenson, D., Z. Darzynkiewicz y M. Melamed, 1982. Simultaneous measurement by flow cytometry of sperm cell viability and mitochondrial membrane potential related to cell motility. Journal of Histochemistry and Cytochemistry. 30:279-280.

Evenson, D. P., J. E. Parks y Kaproth L. K., 1993. Rapid determination of sperm cell concentration in bovine semen by flow cytometry. Journal of Dairy Science. 76:86-94.

Evermann, B. W., 1908. Descriptions of a new species of trout (*Salmo nelsoni*) and a new cyprinodont (*Fundulus meeki*) with notes on other fishes from

Lower California. Proceedings of the Biological Society of Washington. 21:19-30.

FAO, (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación)/PNUMA (Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente), 1984. Conservación de los recursos genéticos de los peces: problemas y recomendaciones. IN: FAO (eds). Informe de la Consulta de Expertos Sobre los Recursos Genéticos de los Peces. Documento técnico Pesca; (217):42.

FAO, (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación), 1995. Conservación de los recursos genéticos en la ordenación de los bosques tropicales. Serie Montes. Monografía No. 107. Roma: FAO. 37 p.

Fickel, J., A. Wagener y A. Ludwig, 2007. Semen cryopreservation and the conservation of endangered species. European Journal of Wildlife Research. 53:81-89.

Figiel, C. R. y T. R. Tiersch, 1997. Comprehensive literature review of fish sperm cryopreservation. Annual meeting of the World Aquaculture Society, Seattle, Washington. 155 p.

Gallardo-Escarate, C., 2005. Análisis Citogenético de tres especies de abulón de baja California mediante procesamiento digital de imágenes. Tesis Doctor en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE). 123 p.

Garner, L. D., L. A. Jhonson, 1995. Viability assessment of mammalian sperm using SYBR14 and propidium iodide. Biology of Reproduction. 53:276-284.

Gibson, J. P. y S. V. Pullin, 2005. Conservation of livestock and fish genetic resources. Cientific Report. Institute for Genetics and bioinformatics. University of New England. 3-29 p.

- Graham, E. y P. B. Brandhorst, 1999. Preservation of endangered species and populations: A role for genome banking, somatic cell cloning, and androgenesis? *Molecular Reproduction and Development*. 53:363-367.
- Graybill, J. R. y H. F. Horton, 1969. Limited fertilization of steelhead trout eggs with frozen sperm of Atlantic salmon. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*. 26:1400-1404.
- Gwo, J., H. Kurokura y R. Hirano, 1993. Cryopreservation of spermatozoa from Rainbow Trout, Common Carp, and Marine Puffer. *Nippon Suisan Gakkaishi*. 59:777-782.
- Habit, E., P. Victoriano y O. Parra, 2002. Translocación de peces nativos en la cuenca del Rio Laja (Región del Biobio, Chile). *Gayana (Concepc.)*. 66 (2):81-190.
- Handerson, R., J. Kershner y C. Toline, 2000. Timing and location of spawning by nonnative wild rainbow trout and native cutthroat trout in the South Fork Snake River, Idaho, with implications for hybridization. *North American Journal of Fisheries Management*. 20:584-596.
- Harvey, B., 2000. The application of cryopreservation in fish genetic conservation in North and South America. IN: Tiersch, T. y P. Mazik (ed). *Cryopreservation in Aquatic Species*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana; 332-337.
- Hendrickson, D. A., Espinosa, P. H., Findley, L. T., Forbes, W., Tomelleri, R., Mayden, R. L., Nielsen, L. J., Jensen, B., Ruiz, C. G., Varela, R. A., van der Heiden, A., Camarena, F. y García de León, F. 2002. Mexican native trouts: a review of their history and current systematic and conservation status. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 12: 273-316.
- Hendrickson, D.A., D.A. Neely, R. Mayden, K. Anderson, J. E. Brooks, F. Camarena-Rosales, R. Cutter, L. Cutter, A. B. De los Santos, G. W. Ernsting, H. Espinosa-Pérez, L. T. Findley, F. J. García de León, A. George, J. Hatch, B. R. Kuhajda, K. Mayden, K. McNyset, J. L. Nielsen, F.

- W. Pfeifer, D. L. Propst, G. Ruiz Campos, E. St. Clair, J. R. Tomelleri y A. Varela Romero. 2006. Conservation of Mexican native trout and the discovery, status. Protection and recovery of the Conchos trout, the first native. IN: Lozano-Vilano, M.L. y A. J. Contreras-Balderas (eds) Studies of North American Desert Fishes in Honor of E.P. (Phil) Pister, Conservationist. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), Monterrey, México; 162-201.
- Hiemstra, S. J., T. V. D. Lende y H. Woelders, 2005. The potential of cryopreservation and reproductive technologies for animal genetic resources conservation strategies. The Role of Biotechnology. Villa Gualino, Turin, Italia. 5-7:25-35.
- Hiemstra, S. J., T. V. D. Lende y H. Woelders, 2005. The potential of cryopreservation and reproductive technologies for animal genetic resources conservation strategies. IN: FAO 2005. The Role of Biotechnology for the Characterization and Conservation of Crop, Forestry, Animal and Fishery Genetic Resources. Proceedings of a workshop (FAO, EAAP, ASPA, ECONOGENE). Turin, Italy; 25-36.
- Hodgins, H., y G. Ridgway, 1964. Recovery of viable salmon spermatozoa after fast-freezing. The Progressive Fish-Culturist. 26:95-95.
- Holtz, W., 1993. Cryopreservation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) sperm: practical recommendations. Aquaculture. 110:97-100.
- Horton, H. y A. Ott, 1976. Cryopresevation of fish spermatozoa and ova. Journal of the Fisheries Research Board of Canada. 33:995-1000.
- Jenkins, J. A., 2000. Minimizing microbial contamination of sperm samples. IN: Tiersch, T. y Mazik P. (eds). Cryopreservation in Aquatic Species. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana; 276-279.
- Jensen, N. R., M. D. Zuccarelli, S. J. Patton, S. R. Williams, S. C. Ireland y K. D. Cain, 2008. Cryopreservation and methanol effects on burbot sperm

motility and egg fertilization. North American Journal of Aquaculture. 70 (1):38-42.

Jonsson, B., J. H. L'Abée-Lund, T. G. Heggbertget, A. J. Jensen, B. O. Johnsen, T. F. Naesje y M. Saettem, 1991. Longevity, body size, and growth in anadromous brown trout (*Salmo trutta*). Canadian Journal of Fisheries Aquatic Sciences. 48:1838-1845.

Joo, R. y E. Dupré, 2002. Efecto de diferentes crioprotectores sobre la motilidad espermática de la macha *Mesodesma donacium* (Mollusca, Bivalvia). Investigaciones Marinas, Valparaíso. 30 (2):75-79.

Knibb, W. R., A. Elizur, B. Moav y A. Robins, 1994. Inhibition of egg chorion hardening of the marine teleost, *Sparus aurata*. Molecular Biology and Biotechnology. 3:23-29.

Lagler, K. F., J. E. Bardach, R. R. Miller y D. R. M. Passino, 1984. Ictiología. Primera edición. Editoreal AGT, México. 489 p.

Lahnsteiner, F., 2000. Cryopreservation protocols for sperm of salmonid fishes. IN: Tiersch T. y Mazik P. (eds). Cryopreservation in Aquatic species. The world Aquaculture Society Advances in World Aquaculture. Baton Rouge, Louisiana; 91-100.

Leibo, S., 2000. Sources of variation in cryopreservation. IN: Tiersch T. y Mazik P. (eds). Cryopreservation in Aquatic species. The world Aquaculture Society Advances in World Aquaculture. Baton Rouge, Louisiana; 75-83.

Leung, L. K. y B. G. Jamieson, 1991. Live preservation of fish gametes. IN: Jamiesson Barrie G. M. (ed). Fish evolution and Systematics: Evidence from Spermatozoa. Cambridge University Press, Cambridge; 245-269.

Leveroni, C. y G. Maisse, 1998. Cryopreservation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) blastomeres: Influence of embryo stage on postthaw survival rate. Cryobiology. 36 (4):255-262.

- Lovelock, J. E. y M. Bishop, 1959. Prevention of freezing injury to cells by dimethyl sulfoxide. *Nature*. 183:1394–1395.
- Liu, K. C., T. C. Chou y H. D. Lin, 1993. Cryosurvival of goldfish embryo after subzero freezing. *Aquatic and Living Resource*. 6:63-66.
- Lubzens, E., N. Daube, I. Pekarsky, Y. Magnus, A. Cohen, F. Yusefovich y P. Feigin, 1997. Carp (*Cyprinus carpio* L.) spermatozoa cryobanks—strategies in research an application. *Aquaculture*. 155 (1-4):13-30.
- Mason, W., 1999. Introduction to fluorescent probes: properties, History and applications. IN: Mason, W. T. (ed). *Biological Techniques. Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Activity. A practical Guide to technology for quantitative real-time analysis*. Cambridge; 17-18.
- Mazur, P. S. P. Leibo, y E. G. E. Seidel Jr., 2008. Cryopreservation of the Germplasm of Animals Used in Biological and Medical Research: Importance, Impact, Status, and Future Directions. *Biology of Reproduction*. 78(2-12):2-12.
- McCrimmon, H. R., 1972. World distribution of rainbow trout (*Salmo gairdneri*): further considerations. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*. 29:1788-1791.
- McNiven, M., R. Gallant y G. Richardson, 1993. Fresh storage of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) semen using a non-aqueous medium. *Aquaculture*. 109 (1):71-82.
- Medina-Robles, V., Y. Velasco y C. Cruz, 2005. Aspectos generales de la crioconservación espermática en peces teleósteos. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 18 (1):34-48.
- Miller, R. R., 1950. Notes on the cutthroat and rainbow trouts with the description of a new species from the Gila River, New Mexico. *Occasional papers of the Museum of Zoology, University of Michigan*. 529:1-42.

- Mittermeier, R. y C. Goettsch, 1992. La importancia de la diversidad biológica en México. IN: Sarukhan, J. y Dirzo, R. (eds). México Ante los Retos de la Biodiversidad. CONABIO. México; 259-267.
- Mizukami, A, D. T Carrell y C. M Peterson, 1999. Cryopreservation of embryos. Encyclopedia of reproduction. Academic Press. Utah. 1:765-772.
- Morisawa, M. and K. Suzuki, 1980. Osmolality and potassium ion: their role in initiation of sperm motility. Science. 210:1145-1147.
- Needham, P.R., 1938. Notes on the introduction of *Salmo nelsoni* Evermann into California from Mexico. Transactions of the American Fisheries Society. 67:139-146.
- Nelson, E. W., 1921. Lower California and its natural resources. Memoirs of the National Academy of Sciences. 16:1-194.
- Nielsen, J. L. y G. K. Sage, 2001. Microsatellite analyses of the trout of northwest Mexico. Genetics. 111:269-278.
- O'Connor, J. E., y C. G. Chase, 1989. Uplift of the Sierra San Pedro Mártir Baja California. Tectonics. 8:833-844.
- Ohta, H., T. Izawa, 1996: Diluent for cold storage of the Japanese eel (*Anguilla japonica*) spermatozoa. Aquaculture. 142:107-118.
- Ohta, H., K. Kawawamura, T. Unuma y Takegoshi, 2001. Cryopreservation of the sperm of the Japanese bitterling. Journal of Fish Biology. 58 (3):670-681.
- Okuyama, M., S. Isogai, M. Saga, H. Hamada, S. Ogawa, 1990. *In vitro* fertilization (IVF) and artificial insemination (AI) by cryopreserved spermatozoa in mouse. Journal of Fertility and Implant, Tokyo. 7:116-119.
- Ott, A. y H. Horton, 1971. Fertilization of Chinook and coho salmon eggs with cryopreserved sperm. Journal of the Fisheries Research Board of Canada. 28:745-748.

- Paniagua-Chávez, C. Jenkins J., M. Segovia-Quintero y T. Tiersch , 2006. Assessment of gamete quality for the eastern oyster (*Crassostrea virginica*) by use of fluorescent dyes. *Cryobiology*. 53:128-138.
- Peng, Y. Z., W. V. Holt, J. Gosalvez, C. D. Allen, V. Nicolson, M. Pyne, M. Burrige, F. N. Carrick y S. D. Johnston, 2008. Dimethylacetamide can be used as an alternative to glycerol for the successful cryopreservation of koala (*Phascolarctos cinereus*) spermatozoa. *Reproduction, Fertility and Development*. 20 (6):724-733.
- Peña-Jiménez, y L. Neyla-González, 1998. Amenazas a la biodiversidad. IN: Zedillo-Ponce de León, E., Carabias J. L., Sarukhán J. K., Benítez H. D y E. L. Loa (eds). *La Diversidad Biológica de México: Estudio de País*, 1998. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (Conabio). México; 293 p.
- Polge, C.; A. U. Smith y A. S. Parks, 1949. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures, *Nature (Abstr.)*. 164(4172):666-667.
- Pursel, V. G. y L. A. Johnson, 1975. Freezing of boar spermatozoa: Fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. *Journal of Animal Science*. 40:99.
- Rana, K. J., 1995. Cryopreservation of fish spermatozoa. IN: Day D. G. y McLellan M. R. (eds). *Cryopreservation and Freeze Drying Protocols*. The Human Press Inc., New Jersey; 53-75.
- Renard, P. y J. Cochard, 1989. Effects of various cryoprotectants on Pacific oyster *Crassostrea gigas* Thunberg, Manila clam *Ruditapes philippinarum* Reeve and Yao, Z., Crim L., Richardson G. y Emerson C. 2000. Motility, fertility and ultrastructural changes of ocean pout (*Macrozoarces americanus* L.) sperm after cryopreservation. *Aquaculture*. 81:361-375.

- Ritar, A. J. y M. Campet, 2000. Sperm survival during short-term storage and after cryopreservation of semen from Striped Trumpeter (*Latris lineata*). *Theriogenology*. 54 (3):467-480.
- Rounsefell, G. A., 1957. Fecundity of North American Salmonidae. U. S. Department of the interior, U. S. Fish and Wildlife Service. Fishery Bulletin. 57 (122):451-468.
- Ruíz-Campos, G., 1989. Repoblación natural por trucha arcoíris (*Salmo gairdneri nelsoni*) en un transecto del Arroyo San Rafael. Noroeste de la sierra San Pedro Mártir, Baja California, México. *The Southwestern Naturalist*. 34:552-556.
- Ruíz-Campos, G., 1991a. Distribución y Binomía de la trucha de la sierra San Pedro Mártir (*Salmo gairdneri nelsoni*), como especie potencialmente cultivable en Baja California. Informe Técnico. Dirección General de Investigación Científica y Superación Académica, Secretaría de Educación Pública, México. Convenio 88-01-081 y 89-01-185.
- , 1991b. Caracterización Limnológica de los arroyos de la Sierra San Pedro Mártir, como hábitats de la trucha endémica *Oncorhynchus mykiss nelsoni* (Evermann). En Memoria III Semana de la Exploración y la Historia: Sierra San Pedro Mártir. C. Lazcano (ed). Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada. 39-41.
- Ruíz-Campos, y Cota-Serrano, 1992. Ecología alimenticia de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss nelsoni*) del Arroyo San Rafael, Sierra San Pedro Mártir, Baja California, México. *The Southwestern Naturalist*. 37 (2):166-177.
- Ruiz-Campos, G., 1993. Bionomía y ecología poblacional de la trucha arco iris, *Oncorhynchus mykiss nelsoni* (Evermann), de la Sierra San Pedro Mártir, Baja California, México. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México. 223 pp.

- , 1994. Cultivo experimental de la trucha arco iris *Oncorhynchus mykiss nelsoni* (Everman), para propósitos de repoblación y conservación del germoplasma endémico. Informe Técnico. CONACyT 0340N-9107. Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada. Mexico. 50 p.
- Ruiz-Campos, G. y E. P. Pister, 1995. Distribution, habitat, and current status of the San Pedro Mártir rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss nelsoni* (Evermann). Bulletin of the Southern California Academy of Sciences. 94:131-148.
- Ruiz-Campos, G., E. P. Pister, y G. A. Compeán-Jiménez, 1997. Age and Growth of Nelson's Trout, *Oncorhynchus mykiss nelsoni*, from Arroyo San Rafael, Sierra San Pedro Mártir, Baja California, México. The Southwestern Naturalist. 42 (1):74-85.
- Ruiz-Campos, G., F. Camarena-Rosales, A. Varela-Romero, S. Sánchez-González, y J. D. L. Rosa-Vélez, 2003. Morphometric Variation of Wild Trout Populations from Northwestern México (Pisces: Salmonidae). Reviews in Fish Biology and Fisheries. 13 (1):91-110.
- Scott, A. y S. Baynes, 1980. A review of the biology, handling and storage of salmonid spermatozoa. The Journal of Fish Biology. 17:707-739.
- Secretaría de Medio Ambiente y recursos Naturales, 2002. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2001. Protección Ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestre-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Diario Oficial De La Federación. México. Segunda sección. 1:153.
- Segovia-Quintero, M.; J. Jenkins; C. Paniagua-Chavez y T. Tiersch, 2000. Flow cytometric evaluation of antibiotic effects on viability and mitochondrial function of refrigerated spermatozoa of Nile tilapia. Theriogenology. 53:1489-1499.

- Shaffner, C. S., E. W. Henderson y C. G. Card, 1941. Viability of spermatozoa of the chicken under various environmental conditions. *Poultry Science*. 20:259-265.
- Smith, R.H., 1983. *Native Trout of North America*. Frank Amato Publications, Portland, Oregon. 144 p.
- Smith, C., 1984. Estimated costs of genetic conservation in farm animals. IN: *FAO/UNEP Technical Consultation (ed). Animal Genetic Resources Conservation and Management. Proceedings of the Animal Production and Health*. Rome; (44/1):44.
- Stein, H. y H. Bayrle, 1978. Cryopreservation of the sperm of some freshwater teleosts. *Annales de Biologie Animale, Biochimie, Biophysique*. 18 (4):1073-1076.
- Steponkus, P. L., S. P. Meyers, D.V. Lynch, L. Gardner, V. Bronshteyn, S. P. Leibo, W. F. Rall, R.E. Pitt, T. -T. Lin y R. J. MacIntyre, 1990. Cryopreservation of *Drosophila melanogaster* embryos. *Nature*. 345:170-172.
- Stoss, J., S. Buyukhatipoglu y W. Holtz, 1978. Short-term and cryopreservation of rainbow trout (*Salmo gairdnerii* Richardson) sperm. *Annales de Biologie Animale, Biochimie, Biophysique*. 18:1077-1082.
- Tamayo, J. L. y R. C. West 1964. The hydrography of middle America En *Handbook of middle America*. Vol. I. R. Wauchope (ed). University of Texas Press, Austin. 84-121.
- Tambasen-Cheong, M. V. P., J. D. Tan-Fermin, L. M. Garcia y R. B. Baldevarona, 1995: Milt-egg ratio in artificial fertilization of the Asian freshwater catfish; *Clarias macrocephalus*; injected salmon gonadotropin-releasing hormone analogue and domperidone. *Aquatic Living Resources*. 7:283-294.

- Tan-Fermin, J. D., T. Miura, S. Adachi y K. Yamauchi, 1999: Seminal plasma composition; sperm motility; and milt dilution in the Asian catfish *Clarias macrocephalus* (Gunther). *Aquaculture*. 171 (3-4):323-338.
- Tervit, H., S. Adams, R. Roberts, I. McGowan, P. Pugh, J. Smith y A. Janke, 2005. Successful cryopreservation of pacific oyster (*Crassostrea gigas*) oocytes. *Cryobiology*. 10 p.
- Tiantian, Z., 2004. Cryopreservation of gametes and embryos of aquatic species. IN: Barry J. Fuller, Nick lane y Erica E. Benson (eds). *Life in the Frozen State*. Crc Press Llc. London; 415-435.
- Tiersch, T. R., 2000. Introduction. IN: Tiersch, T. R. y Mazik P. M. (eds). *Cryopreservation in Aquatic Species*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana; XIX-XXVI.
- Tsvetkova, L., L. Titareva, A. Kochetov, V. Voronina, V. Milenko y N. Pronina, 1995. On some factors influencing the cryoresistance of carp (*cyprinus carpio*) sperm. *Voprosy Ikhtiologii*. 35 (6):804-810.
- UICN (Unión Mundial para la Naturaleza), 1996. Red List of threatened animals. Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza, Gland, Suiza.
- UICN (Unión Mundial para la Naturaleza), PNUMA (Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente) y WWF (World Wildlife Fund), 1991. Cuidar la Tierra. Estrategia para el futuro de la Vida. Gland, Suiza. 28 pp.
- Verstegen, J., M. Iguer-Ouada y K. Onclin, 2002. Computer assisted analyzers in 171 andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*. 57:149-179.
- Villani, P.; C. Catena, 1991: Criopreservazione di gamete maschili dispigola (*D. labrax*). *Rivista Italiana di Acquacoltura*. 26:217-222.

- Vincent, C., G. Pruliere, E. Pajot-Augy, E. Campion, P. Douzou, 1998. Biophysical chemical aspects of cellular cryobehavior. *Biophysical Chemistry*. 29:161-169.
- Vladić, T. V. y T. Järvi, 1997. Sperm motility and fertilization time span in Atlantic salmon and Brown trout—the effect of water temperature. *Journal of Fish Biology*. 50:1088-1093.
- Wayman, R. y T. Tiersch, 2000. Research methods for cryopreservation of sperm. IN: Tiersch T. y Mazik P. (eds). *Cryopreservation in Aquatic species. The world Aquaculture Society Advances in World Aquaculture*. Baton Rouge, Louisiana; 264-275.
- Wheeler, P. y H. Thorgaard, 1991. Cryopreservation of Rainbow Trout semen in large straws. *Aquaculture*. 93:95-100.
- Whittingham, D. G., S. P. Leibo y P. Mazur, 1972. Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -269°C . *Science*. 187:411-414.
- Wiggins, I. L., 1980. *Flora of Baja California*. Stanford University Press, Stanford, California. 1025 p.
- Wildt, D. E., 1997. Genome resource banking. Impact on biotic conservation and society. IN: Karow A. M. y Crister J (eds), *Tissue banking in reproductive biology*. Academic Press New York; 399-439.
- Wildt, D. E., W. F. Rall, J. K. Critser, S. L. Monfort, y U. S. Seal, 1997. Genome resource banks. Living collections for biodiversity conservation. *Bioscience*. 47:689-698.
- Yao, Z., L. Crim, G. Richardson y C. Emerson, 2000. Motility, fertility and ultrastructural changes of ocean pout (*Macrozoarces americanus* L.) sperm after cryopreservation. *Aquaculture*. 81:361-375.

- Yruretagoyena-Ugalde, C., 1992. Some geohydrological features of the Santo Domingo basin, Sierra San Pedro Mártir, Baja California Norte, Mexico. IN: Becker C. D. y Neitzel D. A. (eds). Water quality in North America Rivers Systems. Battelle Press, Columbus; 118-134.
- Zell, S. R., 1978. Cryopreservation of gametes and embryos of salmonid fishes. *Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique*. 18:1089-1099.
- Zhang, T. y D. M. Rawson, 1995. Studies on chilling sensitivity of zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos. *Cryobiology* 32:239-246.
- Zhang, Y. Z., S. C. Zhang, X. Z. Liu, Y. J. Xu, J. H. Hu, Y. Y. Xu, J. Li y S. L. Chenc, 2005. Toxicity and protective efficiency of cryoprotectants to flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos. *Theriogenology*. 63 (3):763-773.

MANTENIMIENTO EN CAUTIVERIO E
INDUCCIÓN A LA MADURACIÓN GONÁDICA
DE LA TRUCHA DE SAN PEDRO MÁRTIR
(*Oncorhynchus mykiss nelsoni*, EVERMANN)
EN CONDICIONES DE LABORATORIO

Capítulo II

RESUMEN

El mantenimiento y la maduración gonádica de la trucha de San Pedro Mártir (*Oncorhynchus mykiss nelsoni* Evermann) fueron estudiadas en condiciones de laboratorio utilizando un sistema de fotoperíodo artificial y un sistema cerrado de recirculación. Después de 13.2 meses de cautiverio, el sistema de recirculación mantuvo una calidad óptima de agua durante el mantenimiento de estas truchas. Las tasas de peso y crecimiento durante este tiempo fueron de 0.86 g /día y 0.42 mm/día respectivamente. Este crecimiento somático es hasta ahora el más alto reportado para esta subespecie en condiciones de cautiverio. El sistema de fotoperíodo promovió el desarrollo gonadal de los machos en un promedio de 7.5 meses, y el cambio del tipo de alimento favoreció la madurez gonádica en las hembras y la calidad de los espermatozoides liberados por los machos. Las muestras de esperma de ocho machos maduros (200-320 mm LT) fueron obtenidas por presión abdominal, y en un período de 97 días (enero-abril 2009) los machos fueron exprimidos en seis ocasiones con intervalos de 12-28 días. La movilidad de los espermatozoides varió de 80% a 95% con una actividad máxima de 15-17 segundos y un tiempo total de movilidad de 50-55 segundos. En las diferentes espermiaciones el volumen de esperma varió de 165 μL a 228 μL /organismo y el número de espermatozoides por espermiación de 235×10^6 a 4772×10^6 células/mL. La longitud promedio del flagelo fue de $33.17 \pm 0.83 \mu\text{m}$ y el ancho y longitud de la cabeza fueron de 2.14 ± 0.031 y $2.72 \pm 0.04 \mu\text{m}$, respectivamente. Este trabajo demuestra que la trucha de San Pedro Mártir (*O. mykiss nelsoni*) puede ser mantenida y aclimatada en un sistema de recirculación y que es posible inducir la maduración gonádica y mejorar la calidad de los gametos en estos peces mediante un sistema de fotoperíodo simulado y un suministro adecuado del alimento. Esta información puede ser de gran ayuda en la gestión de programas de conservación para esta trucha endémica de México.

INTRODUCCIÓN

En México, la trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss*, es una de las especies ícticas más cultivadas (Arredondo-Figueroa, 1983; Arredondo-Figueroa et al., 1996; Carta Nacional Pesquera, 2006).

Sin embargo, en el país existen por lo menos seis entidades evolutivas de truchas nativas cuya información referente a su cultivo aún es desconocida (Ruiz-Campos et al., 2003; Hendrickson et al., 2006; Espinosa et al., 2007). La trucha de San Pedro Mártir (TSPM) (*Oncorhynchus mykiss nelsoni*) es la población de trucha arcoíris costera más austral en Norteamérica (Behnke., 2002) y pese al gran atractivo que le confieren sus características euritéricas y comportamiento no migratorio para la acuicultura (Ruiz-Campos et al., 1997) esta subespecie aún no ha logrado ser mantenida en cautiverio.

Estudios sobre la biología y ecología de esta subespecie de trucha han sido realizados por Ruiz-Campos y Cota-Serrano (1992), León-García (1992), Ruiz-Campos (1993), Garduño-Franco (1994), Ruiz-Campos y Pister (1995), Ruiz-Campos et al. (1997), y Ruiz-Campos et al. (2003). No obstante, el mantenimiento en condiciones controladas con el propósito de reproducción, repoblación y manejo de poblaciones de esta trucha aún necesitan ser investigados.

Las primeras pruebas de cultivo de la TSPM fueron realizados entre 1936 y 1937, a partir de ejemplares recolectados por Paul R. Needham en el Arroyo Santa Cruz [sic] cerca del Rancho San Antonio, en Baja California, México y

los trasladó a la Piscifactoría de Forest Home, en California (E.U.A.). Sin embargo, nueve meses después de ser mantenidas en un arroyo experimental de la piscifactoría mencionada, los organismos murieron debido a una creciente provocada por una lluvia que devastó el arroyo (Needham, 1955).

A la fecha, pocos han sido los intentos para mantener a esta subespecie en cautiverio. En Nuevo León, en 1986, en las instalaciones del laboratorio de Acuicultura de la Universidad Autónoma de Nuevo León, a cargo del Dr. Arcadio Valdéz González, se mantuvieron en cautiverio por varios meses ejemplares de esta trucha nativa. Estas truchas murieron por efecto de las altas temperaturas del verano. En Baja California, Ruiz-Campos (1994) mantuvo a esta trucha en condiciones de laboratorio con el propósito de reproducirla. Desafortunadamente, el cautiverio de estos peces no duró más de dos meses debido a que los organismos se infestaron con piojos ancla (*Learnea* sp.) que adquirieron vía carpas (*Cyprinus carpio*) mantenidas en un estanque usado como filtro biológico. En el 2000, en el Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) se mantuvieron ejemplares de esta trucha en cautiverio durante seis meses. Sin embargo, los organismos murieron debido a las altas temperaturas ($>26^{\circ}\text{C}$) que prevalecieron durante la temporada de verano en la región (Dras. Carmen Paniagua y Mónica Hernández, com. pers.)

En general, las truchas al igual que el resto de los salmónidos tienen exigencias muy altas en lo que se refiere a la calidad del agua (Fernández-

San Juan, 1985). El ambiente acuático donde habitan estos peces es un complejo ecosistema con múltiples variables físico-químicas, de las cuales la temperatura, los sólidos suspendidos, el pH, el oxígeno disuelto (OD), los compuestos nitrogenados (nitrógeno total de amoníaco, nitritos, nitratos), el bióxido de carbono (CO_2) y la alcalinidad tienen un papel decisivo (Timmons et al., 2009). Cada una de estas variables es importante, pero la interrelación entre éstas influyen de manera significativa en el estado de salud de los peces (Malone y Beecher, 2000; Timmons et al., 2009).

Actualmente en los sistemas de cultivo intensivos se manejan diferentes técnicas para mantener en condiciones óptimas la calidad del agua donde se encuentran los organismos (Malone y De Los Reyes, 1997). Estos sistemas se han enfocado en la transformación y remoción de los desechos nitrogenados, para lo cual la filtración biológica ha demostrado ser eficiente (Hochheimer y Wheaton, 1991). A raíz de la eficacia de estos filtros en la calidad del agua, su uso ha sido extendido tanto en sistemas de cultivo de especies comerciales como peces ornamentales y peces tropicales (Malone y Beecher, 2000).

Además, el mantenimiento de organismos en cautiverio también exige un adecuado suministro de agua, por lo que la fuente de agua utilizada debe ser investigada y cuantificada en términos de cantidad y calidad. De las fuentes de agua que existen para las operaciones en acuicultura (aguas superficiales, subterráneas y municipales), la elección depende de la disponibilidad y economía del productor.

Pese a la constante innovación tecnológica mencionada para optimizar las diferentes variables de la calidad del agua en los sistemas de cultivo, los problemas para el mantenimiento de especies nativas aún no han sido totalmente cubiertos. Los estudios realizados en la trucha dorada (*O. chrysogaster*), sugieren que durante su mantenimiento en cautiverio tanto su crecimiento, como la tasa de fecundidad y reproducción se ven alteradas. (Barriga Sosa et al., 2010). En general, la reproducción de las especies acuáticas sólo ocurre cuando las condiciones ambientales favorecen la supervivencia de la descendencia y esto rara vez sucede en cautiverio. Por tanto, estos organismos difícilmente maduran en condiciones de cultivo (Valdebenito, 2008).

La manipulación de algunos factores ambientales como el fotoperíodo, temperatura, salinidad, volumen del tanque, vegetación del sustrato, etc., pueden incluso contribuir a mejorar la maduración sexual de los peces para el proceso de reproducción (Donaldson y Hunter, 1983; Zanuy et al., 1995; Prat et al., 1999; Rodríguez et al., 2000; Bromage et al., 2001). Sin embargo, el efecto de estos factores externos sobre la maduración gonádica puede variar considerablemente entre las distintas especies (Rottmann et al., 1991).

Entre los factores ambientales, la luz y la temperatura han sido señaladas como claves importantes para el desarrollo gonadal de muchas especies de peces (Titarev, 1975; Billard, 1985; Taranger y Hansen, 1993; Pankhurst et al., 1996; Davies y Bromage, 2002). En peces teleósteos, la regulación reproductiva está controlada tanto por variaciones de luz como de

temperatura (De-Vlaming, 1975; Billard y Breton, 1979), y en salmónidos como *O. mykiss* las variaciones de luz son las que afectan su reproducción (Pohl-Brascheid y Holtz, 1990; Randall, 2001; Bonnet et al., 2007; Pornsoping et al., 2007; Valenzuela et al., 2007).

Los métodos más utilizados para controlar la maduración gonádica en los peces son el control del fotoperíodo y la administración de hormonas, los cuales afectan la fisiología de los reproductores y modifican su calendario de maduración. No obstante, estas modificaciones no se transmite a los descendientes y el estímulo puede ser renovado o modificado para la siguiente temporada de liberación de gametos (Díaz y Neira, 2005).

En condiciones naturales, la trucha de San Pedro Mártir tiene una madurez gonádica a partir del primer año de vida (Ruiz-Campos, 1993) y su época de reproducción se extiende de enero a marzo (Ruiz-Campos, 1993; 1994). Por lo que las estrategias de maduración gonádica y reproducción de esta trucha en cautiverio podrían ser mejoradas mediante una apropiada manipulación ambiental. Debido al interés tanto de conservación como de cultivo de esta trucha, el objetivo de este capítulo consistió en diseñar un sistema que nos permitiera mantener a *O. mykiss nelsoni* bajo condiciones controladas de laboratorio, con el propósito de establecer su posible aclimatación a las condiciones de cultivo, estimar su tasa de crecimiento bajo condiciones controladas e inducir su maduración gonádica usando un régimen de fotoperíodo simulado.

OBJETIVO GENERAL

Determinar las condiciones óptimas para el mantenimiento y maduración gonádica de la trucha de la Sierra de San Pedro Mártir (*Oncorhynchus mykiss nelsoni*) en condiciones de cautiverio.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Desarrollar un sistema que permita mantener a la trucha de San Pedro Mártir en cautiverio bajo condiciones controladas.
2. Evaluar las condiciones óptimas de la calidad de agua para el mantenimiento en cautiverio de la trucha de San Pedro Mártir.
3. Determinar las condiciones óptimas de un sistema artificial de fotoperíodo para inducir la maduración gonádica de la trucha de San Pedro Mártir.
4. Determinar la tasa de crecimiento somático de la trucha de San Pedro Mártir en condiciones de cautiverio.

MATERIALES Y MÉTODOS

I. Captura de los organismos.

El área geográfica del sitio de captura de la TSPM fue determinado usando un Sistema de Posición Global (GPS) y por dos mapas topográficos. El primero (1:250,000) publicado por el Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI) y el segundo (1:50,000) por la Comisión de Estudios del Territorio Nacional (CETENAL). La captura de los organismos fue realizada en el Arroyo San Rafael ubicado entre el Rancho Mike's Sky y el Rancho Garet, en la porción Noroeste de la Sierra de San Pedro Mártir en el Municipio de Ensenada Baja California (ver capítulo I). Este arroyo se encuentra a 1,231 metros sobre el nivel del mar (msnm) y se caracteriza por ser estrecho (5.58 m) y poco profundo (0.34 m) (Ruiz-Campos, 1993).

En Marzo de 2007, 20 truchas (90-170 mm de longitud total [LT]) fueron capturadas del Arroyo San Rafael con un equipo de electropesca (AC Smith-Root 15-B POW) en un tramo de arroyo de 300 m (Fig. 2.1A) ubicado en 31°05'49.8" N, 115°37'18" W y 1,231 msnm.

Las truchas recolectadas fueron colocadas en bolsas de plástico con agua del medio y oxígeno a saturación (Fig. 2.1B). Las bolsas se cerraron con una liga para evitar la pérdida de oxígeno y fueron transportadas dentro de un contenedor apropiado al Banco de Germoplasma de Especies Acuáticas (BGEA), del CICESE.



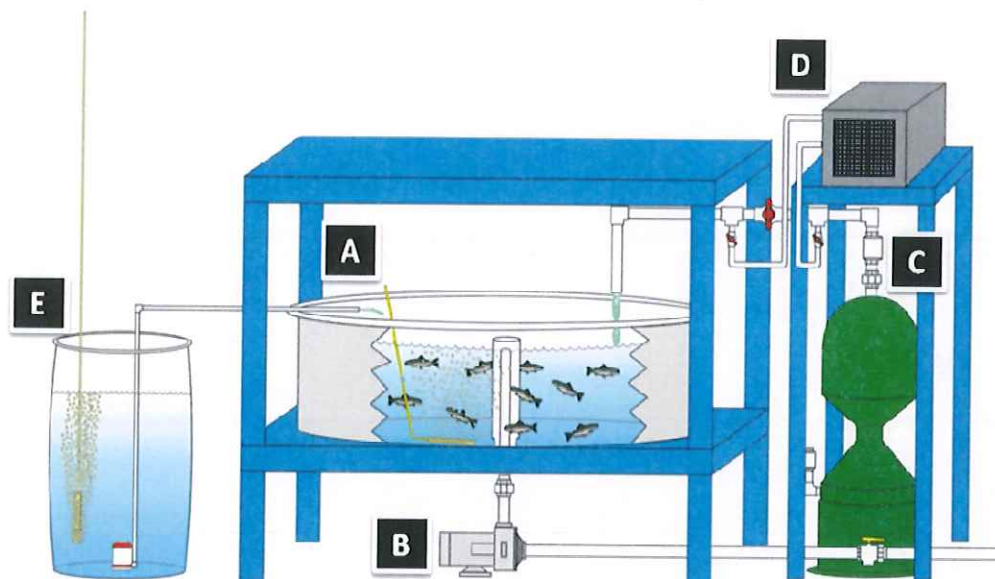
Figura 2.1. Equipo de electropesca utilizado para capturar a la trucha de San Pedro Mártir A). El transporte de los organismos fue realizado en bolsas de plástico con oxígeno a saturación B).

II. Mantenimiento de los organismos en cautiverio.

II.1. Peso corporal y longitud total. Una vez en el laboratorio, las truchas fueron medidas (longitud total [LT] en mm) y pesadas (g). La masa corporal de los organismos fue determinada con una balanza portátil (OHAUS Adventure Pro®). Posteriormente, las truchas se colocaron en un tanque de fibra de vidrio de 250 litros que contenía ~200 L de agua y un sistema de aireación constante.

II.2. Período de cuarentena. Con el propósito de eliminar bacterias provenientes del agua del arroyo usada para el transporte de las truchas, se agregaron al tanque 20 g/L de oxitetraciclina (Pfizer S. A. de C. V). Los peces fueron mantenidos en esta condición por tres días. Después, el agua que contenía este antibiótico fue removida, y el tanque se conectó a un sistema de recirculación. Al mismo tiempo los organismos fueron aclimatados de acuerdo al promedio estacional registrados por Ruiz-Campos (1993, 1994) para la TSPM en condiciones naturales (período de luz [L]: oscuridad [O], ~10 h L, 14 h O y una temperatura entre 11-17°C).

II.3. Sistema de recirculación. El sistema de recirculación consistió en un tanque circular de fibra de vidrio de 250 L con ~200 L de agua (incluyendo el agua del biofiltro) conectado a una bomba (Mag Drive MD12, 57 L/min) que movía el agua desde el tanque hasta un filtro biológico (BBF1, 16 gpm, 1 ft³). El filtro tenía la función de remover compuestos nitrogenados y capturar sólidos >15 µ, los cuales fueron descargados periódicamente. El filtro se encontraba conectado a un enfriador (AquaLogic Delta Star AE3 ¼ hp), el cual mantenía la temperatura del agua a la establecida para las diferentes épocas de año (Fig. 2.2). Dado que el agua utilizada por el sistema provenía de la ciudad y para evitar que las truchas recibieran agua tratada con cloro, un barril de plástico de 200 L conteniendo agua aireada y declorada con tiosulfato de sodio fue usado como reservorio.



Fig

ura 2.2. Sistema de recirculación para el mantenimiento en cautiverio de *O. mykiss nelsoni*. Un tanque circular de fibra de vidrio A) es conectado a una bomba B) que mueve el agua del tanque a un biofiltro C), el cual es conectado a un enfriador de agua D) que se encarga de regresar el agua al tanque. Un barril conteniendo agua desclorinada fue utilizado como reservorio de agua E).

En el estanque, a temperatura, el pH y los compuestos nitrogenados (nitrógeno total de amoníaco "NTA" $[\text{NH}_3/\text{NH}_4^+]$, nitritos $[\text{NO}_2]$ y nitratos $[\text{NO}_3]$) fueron registrados cada tercer día con una prueba API para acuarios de agua dulce (Aquarium Pharmaceuticals, Philadelphia, Pennsylvania). El intercambio de agua (100%) se realizó con agua aireada y declorada cada semana o más frecuente dependiendo de los resultados obtenidos de la calidad que presentara.

II.4. Alimentación. Durante las primeras tres semanas las truchas fueron alimentadas con mísidos congelados (Oceanaquatics, British Columbia) a una razón equivalente del 3% de su peso húmedo. Después, estos fueron reemplazados gradualmente con alimento comercial (El Pedregal Silver Cup, 42% de proteína y 15% de lípidos, 3.5 mm). Cuando las truchas estuvieron completamente acostumbradas al alimento comercial, estas fueron alimentadas dos veces al día (5% de su peso húmedo). El mantenimiento de las truchas bajo condiciones controladas fue de 14 meses (marzo de 2007 a abril de 2009).

III. Inducción a la maduración gonádica.

III.1. Sistema artificial de fotoperíodo (SAF). El sistema consistió en un foco fluorescente de L blanca (25W, 110-127 V) y dos reflectores (tipo bombilla) compuestos de diodos emisores de L (LED) (Montana 15 LED MR-16, 1W, 127 V). Estos reflectores fueron cubiertos de un plástico de polietileno rojo o azul a fin de tener diferente cantidad de L (Fig. 2.3A). Los focos se conectaron individualmente a un controlador de tiempo eléctrico (Omron H5S) (Fig. 2.3B) y se adaptaron a una lámpara de acero inoxidable. Esta estructura fue suspendida 90 cm por encima del tanque y sirvió para concentrar la L sobre la superficie del agua (Fig. 2.3C).

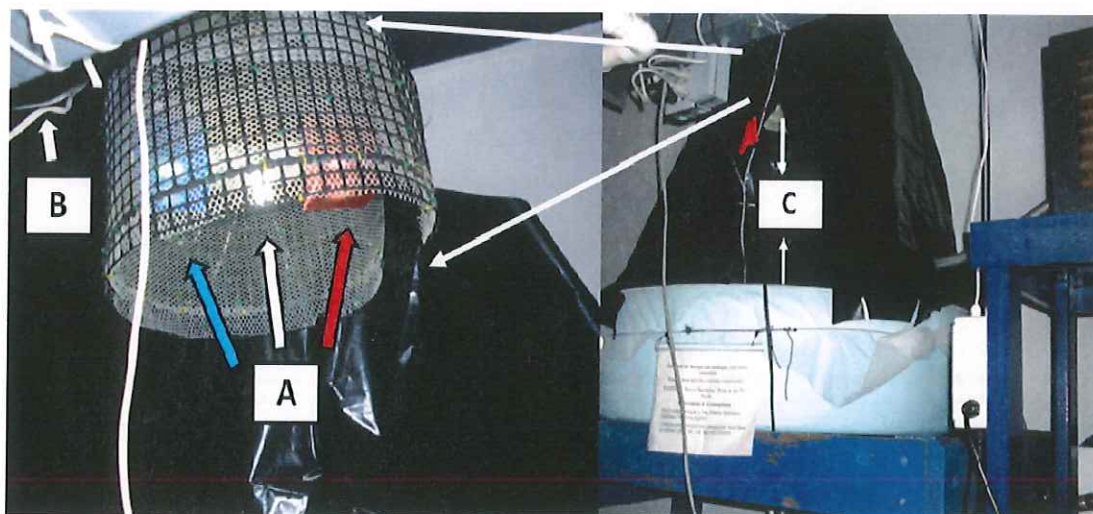


Figura 2.3. Sistema de fotoperíodo artificial. El sistema consiste de una lámpara de acero inoxidable que contiene en su interior tres focos, A) los cuales están conectados individualmente a un controlador de tiempo eléctrico B). Este sistema fue suspendido 90 cm por encima de la superficie del agua contenida en el tanque de mantenimiento de los peces C).

El régimen de L iniciaba simulando el alba por 15 minutos de L roja, después de este tiempo, un segundo foco con L azul se encendía durante 15 minutos y al final se prendía el foco con L blanca. Los tres focos encendidos simulaban el efecto de la L total del día (3.8 W/m^2). Para simular el ocaso, la L blanca se apagaba primero, seguida por la azul y finalmente la roja. Los tres focos apagados simulaban el efecto de oscuridad. Cada foco fue apagado con 15 minutos de diferencia. La duración de los períodos de luz y oscuridad ($L:O$) fueron diferentes según la estación del año que se deseara simular.

$$1 \text{ W/m}^2 = 2.50 \cdot 10^{18} \text{ cuantio/m}^2/\text{s} \text{ (1)}$$

III.2. Régimen de fotoperíodo. Para la maduración gonádica, ocho machos y cinco hembras (~2 años de edad) fueron expuestos en un SAF a diferentes ciclos de L:O (Tabla II.1). Todos los períodos presentaron un alba y un ocaso simulado de 30 minutos cada uno y la temperatura tuvo una variación diaria máxima de <1°C. Los organismos fueron pre-aclimatados por un mes y después expuestos al SFA por 7.5 meses (abril de 2008 a enero de 2009).

Tabla II.1. Régimen de fotoperíodo simulado para la trucha de San Pedro Mártir.

Estación del año	Ciclo de luz	Temperatura (°C)	Tiempo (días)
Aclimatación	12L:12°	14	33
Primavera	14L:10°	13	36
Verano	16L:8°	15	35
Otoño	13L:11°	17	63
Invierno	6L:18°	11	92

III.3. Obtención de esperma. La obtención del esperma se realizó de forma manual (Fig. 2.4). Para evitar el estrés, dos machos fueron colocados en un contenedor de 20 L. Inmediatamente se procedió a anestesiarse a los organismos añadiendo al agua 100 µL/L de solución de aceite de clavo, preparado previamente con etanol (1:9) (Anderson et al., 1997; Keene y Noakes, 1998; Meka y McCormick, 2005).

Después de 10-15 minutos de inmersión con el anestésico, los organismos se retiraron del agua y se procedió a secar el orificio genital con papel absorbente para evitar cualquier tipo de contaminación o activación de las muestras. Finalmente, se presionó suavemente la zona abdominal para obtener el esperma, la primera muestra contaminada con urea y heces fue eliminada antes de tomar la muestra final de esperma. Las muestras de semen fueron recolectadas con pipetas de plástico de 1.8 mL, colocadas en una hielera previamente enfriada con hielo ($\sim 4^{\circ}\text{C}$) y transportadas al laboratorio del BGEA (~ 5 min). Los machos fueron exprimidos seis veces durante 3.2 meses (enero a abril de 2009) en intervalos de 2-4 semanas entre cada espermiación.

Los peces exprimidos fueron trasladados a un tanque de 245 L con 200 L de agua limpia y aireación constante para su recuperación (~ 10 min) antes de ser regresados a su tanque de mantenimiento original. El mismo procedimiento fue realizado para los seis machos restantes.

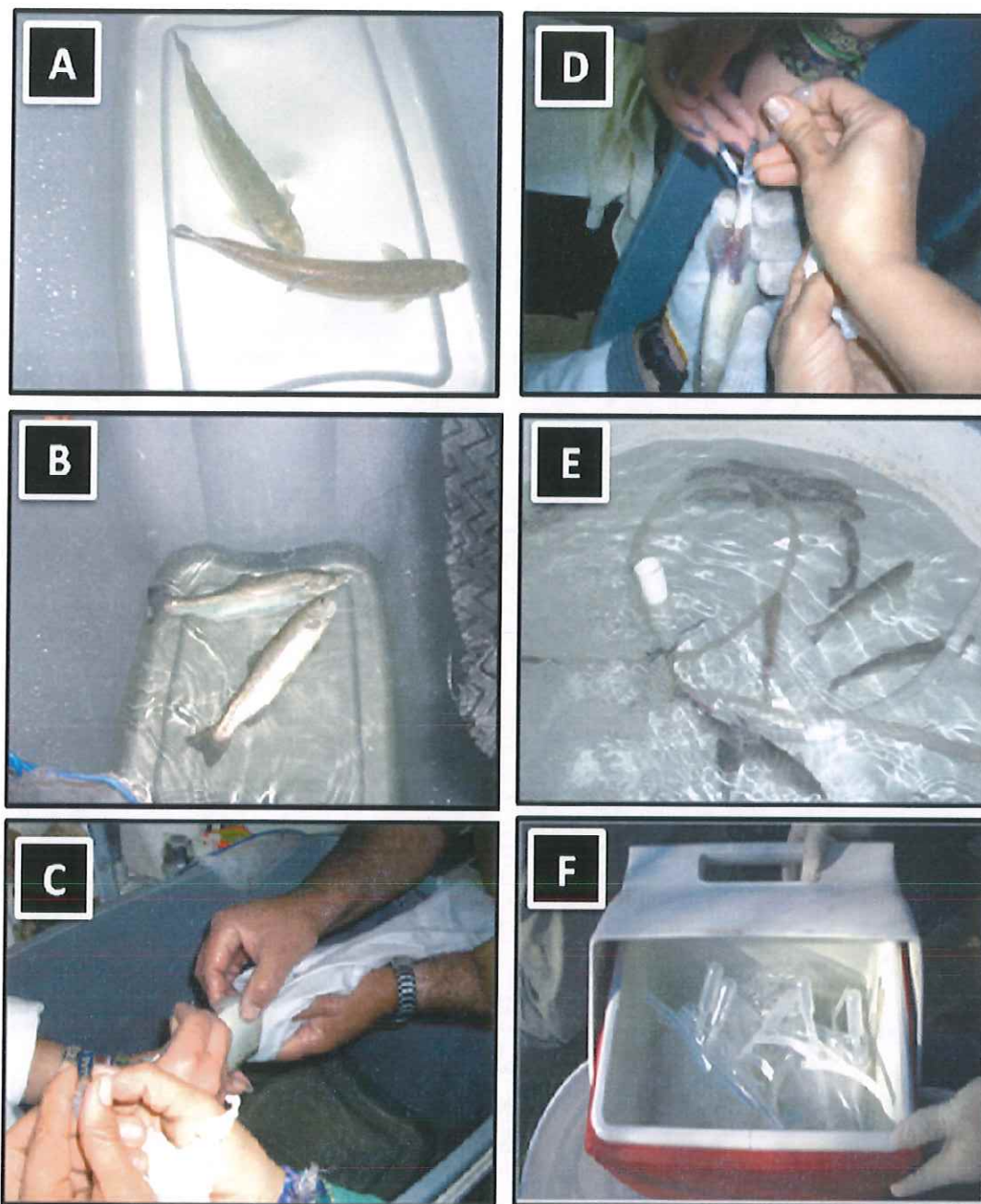


Figura 2.4. Obtención de esperma. Organismos agrupados por parejas y colocados en contenedores con una solución de aceite de clavo A). Peces adormecidos debido al efecto del anestésico B). Para evitar contaminación de las muestras, se limpió el orificio genital C) y se procedió a presionar ligeramente el abdomen para extraer el esperma. La toma de esperma se realizó con pipetas de plástico D). Los peces de los cuales se

III.4. Evaluación de la movilidad. Inmediatamente después de la obtención de esperma, 0.5 μ L de cada muestra se mezcló en un portaobjetos con 20 μ L de agua corriente para activarlos. El porcentaje de esperma con movimiento vigoroso hacia delante fue evaluado con un microscopio (Nikon H600L, Eclipse 80-i) a un aumento de 400X, usando microscopia de campo oscuro. Aquellas muestras que presentaron una movilidad $\geq 80\%$ fueron seleccionadas para los experimentos. Para evitar sesgos, la estimación de la movilidad de los espermatozoides fue realizada por el mismo observador.

III.5. Número de espermatozoides. Las muestras de esperma se fijaron con una solución de lugol al 1% y fueron contadas en un hematocitómetro. El número promedio de espermatozoides fue calculado a partir de tres repeticiones. El conteo de espermatozoides se realizó con un microscopio (Nikon H600L, Eclipse 80-i) a un aumento de 400X. La cantidad de los espermatozoides fue expresada como $\times 10^6$ cel/mL.

III.6. Morfometría del espermatozoide. El tamaño (μ m) y la forma del espermatozoide fueron determinadas a partir de 51 espermatozoides. Estos fueron observados en un microscopio con un aumento de 400X y fotografiados con el programa "Image-Pro Plus" (Media Cybernetic, Inc., version 5.1). Los parámetros medidos fueron la longitud del flagelo y el ancho y largo de la cabeza.

IV. Análisis estadístico.

El efecto de cada extracción de esperma en la movilidad y cantidad de espermatozoides fue analizado estadísticamente usando un ANOVA de una vía. Las diferencias específicas entre los grupos fueron identificados mediante una prueba de Tukey. Los datos obtenidos en porcentaje se transformaron a la raíz cuadrada del arcoseno antes de su análisis. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa de SAS para Windows® (SAS Institute Cary, North Carolina). La diferencia del peso corporal y la longitud total de las truchas, antes y después del tiempo de cautiverio, fue evaluada con una prueba de t para datos no pareados. Este análisis estadístico fue realizado con el programa de Systat, Inc. (SigmaStat ® 3.1, Point Richmond, CA). Todas las pruebas fueron ejecutadas con un $\alpha = 0.05$.

RESULTADOS

Mantenimiento de los organismos. Después de un período de 13.2 meses en cautiverio, las truchas registraron una supervivencia final del 65%. La mortalidad registrada fue debida a que algunos de los peces saltaron hacia afuera del tanque. Los 13 organismos restantes (ocho machos y cinco hembras) presentaron una supervivencia final del 100% después de 7.5 meses que estuvieron en condiciones de fotoperíodo. Durante este periodo los parámetros de la calidad del agua (promedio $\pm$ DE) fueron 0.15 ± 0.09 mg/L para NTA, 0.02 ± 0.09 mg/L para nitritos y 3.38 ± 7.71 mg/L para nitratos. Los valores de pH variaron entre 7.4 y 8.5 (7.93 ± 0.17).

Peso corporal y longitud total de las truchas de San Pedro Mártir. Cuando las truchas llegaron al BGEA, el índice promedio ($\pm$ SD) de peso corporal y LT fue de 20 ± 11 g (intervalo 8-47 g) y 125 ± 23 mm (intervalo 90-170 mm), respectivamente (Fig. 2.5A). Después de 13.2 meses bajo condiciones de laboratorio, los valores de peso corporal y longitud incrementaron a 360 ± 75 g (intervalo 230-449 g) y 290 ± 31 mm (200-320 mm), con una tasa de crecimiento de 0.86 g/d y 0.42 mm/d, respectivamente. Después de 7.5 meses en SAF, los valores finales fueron 426 ± 104 g (intervalo 274-662 g) y 348 ± 18 (intervalo 303-370 mm) y la tasa de crecimiento en peso y longitud por día fue de manera respectiva 0.29 g/d y 0.26 mm/d (Fig. 2.5B). Las diferencias entre antes y después de 13.2 meses fueron significativas para el peso corporal ($t_{2.040} = 20.04$, $P < 0.0001$) y la longitud total ($t_{2.040} = 17.45$, $P < 0.0001$), así como para después del período en el cual estuvieron en condiciones de fotoperíodo en el caso de la longitud ($t_{2.064} = 5.89$, $P < 0.0001$) pero no se detectaron para el peso ($t_{2.064} = 1.87$, $P < 0.073731$).



Figura 2.5. Trucha de San Pedro Mártir antes A) y después de dos años bajo condiciones de cautiverio B).

Maduración gonádica en machos de la trucha de San Pedro Mártir en condiciones de fotoperíodo. El número de machos que liberaron esperma en cada período de espermiación varió entre tres y ocho (Tabla II.2). El volumen de esperma por organismo osciló entre 165 y 228 μL y no se encontraron diferencias significativas entre espermiaciones ($F_{2,53} = 0.25$, $P < 0.9373$). Sin embargo, fueron encontradas diferencias ($F_{2,31} = 358.5$, $P < 0.0001$) en la concentración de espermatozoides. Altas concentraciones de células ($4\,772 \times 10^6$ cel/mL) fueron obtenidas durante la quinta ocasión que los machos fueron exprimidos, concentraciones $< 321 \times 10^6$ cel/mL se registraron durante las dos primeras veces que los machos liberaron esperma.

Diferencias significativas fueron detectadas en la movilidad espermática de estos peces ($F_{2,31} = 19.81$, $P < 0.0001$). Altos porcentajes de movilidad ($> 90\%$) fueron encontrados durante la cuarta y quinta vez que los machos liberaron esperma. Porcentajes bajos de movilidad fueron encontrados durante la primera y la segunda vez que se recolectó esperma (80% en ambos casos) (Tabla II.2).

En general, después de que los espermatozoides fueron activados con agua corriente, estos presentaron un movimiento vigoroso hacia el frente por ~15-17 segundos (actividad máxima). Después, la movilidad disminuyó progresivamente hasta detenerse después de ~50-55 segundos.

Tabla II.2. Recolecta de esperma después de que *O. mykiss nelsoni* se mantuvo 7.5 meses bajo condiciones de fotoperíodo artificial. Diferentes letras indican diferencias significativas entre valores en la misma columna (ANOVA de una vía, $\alpha = 0.05$, $a < b < c < d < e$). Los datos son expresados como el promedio $\pm$ SD.

Espermiación	Fecha	Machos que liberaron esperma	Volumen ($\mu\text{L/org}$)	Concentración de espermias ($10^6/\text{mL}$)	Movilidad
1	Enero7	3	$217 \pm 104a$	$235 \pm 90a$	$80 \pm 4a$
2	Enero 23	3	$187 \pm 201a$	$321 \pm 110a$	$80 \pm 3a$
3	Febrero 12	8	$226 \pm 90 a$	$1005 \pm 115b$	$87 \pm 6b$
4	Marzo 12	6	$173 \pm 132a$	$3000 \pm 448d$	$95 \pm 3c$
5	Marzo 23	7	$228 \pm 175a$	$4772 \pm 639e$	$91 \pm 6c$
6	Abril 7	7	$165 \pm 152a$	$2500 \pm 270c$	$86 \pm 6b$

La longitud promedio del flagelo del espermatozoide de la trucha de San Pedro Mártir fue de $33 \pm 6 \mu\text{m}$ y la longitud y el ancho de la cabeza de 2 ± 0.2 y $3 \pm 6 \mu\text{m}$, respectivamente (Fig. 2.6A).

Maduración gonádica en hembras de la trucha de San Pedro Mártir en condiciones de fotoperíodo. En el caso de las hembras, estas no presentaron signos de madurez gonadal. A excepción de un organismo, la cual expulsó ~70 ovocitos de color blanquecino opaco y de ~4 mm de diámetro promedio (Fig. 2.6B).

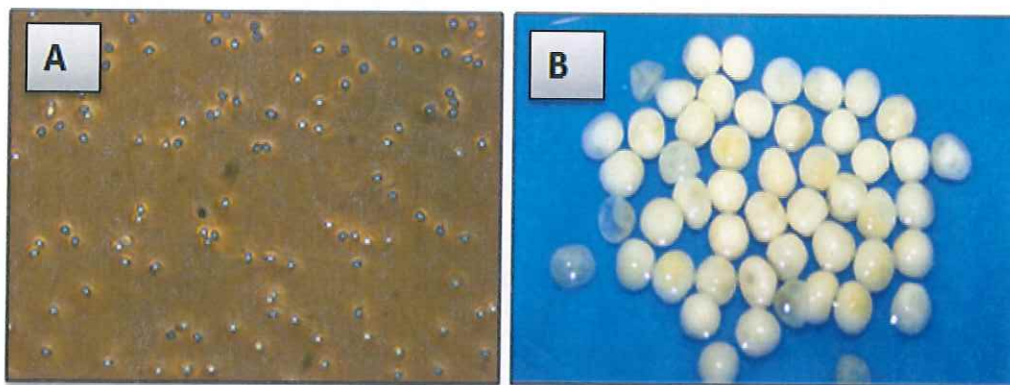


Figura 2.6. Espermatozoides de la trucha de San Pedro Mártir a un aumento de 400X y A) ovocitos liberados e hidratados B).

DISCUSIONES

La trucha de San Pedro Mártir ha sido inducida a la maduración y a la liberación de gametos *ex situ* mediante inyección de gonadotropina coriónica humana (3 UI/g de peso) (Garduño-Franco, 1994; Ruiz-Campos, 1994). No obstante ningún estudio había reportado el ciclo de maduración gonádica de esta trucha en condiciones de cautiverio usando un SAF, ni tampoco se había evaluado la calidad de los espermatozoides después de ser liberados. Este estudio demuestra que es posible aclimatar a la trucha de San Pedro Mártir, mantenerla en cautiverio e inducir su maduración gonádica en un sistema cerrado.

Mantenimiento en cautiverio. Para iniciar el mantenimiento en cautiverio de la TSPM (*O. mykiss nelsoni*), la prevención de enfermedades fue uno de los primeros pasos. En este estudio la adición de oxitetraciclina en el tanque de cultivo resultó ser un método eficiente para el control de enfermedades durante

el mantenimiento de estos organismos. Similares resultados han sido reportados en *O. mykiss* (Sichlau et al., 2003; Grondel et al., 2008), *O. tshawytscha* (Abedini et al, 1998), *Clarias gariepinus* (Grondel et al., 2008), utilizando oxitetraciclina como tratamiento para prevenir enfermedades. Además, cabe mencionar que las TSPM no presentaron irritaciones externas después de haber sido tratados con este antibiótico. Por tanto, podemos sugerir la adición de oxitetraciclina como medida preventiva cuando se pretende mantener organismos silvestres en cautiverio.

Durante el mantenimiento de esta trucha, el sistema cerrado ayudó a mantener una calidad del agua adecuada para el desarrollo de estos peces. En general, el pH registró valores constantes alrededor de 8, el cual es un valor cercano al establecido por Wild et al. (1971) como óptimo para el proceso de nitrificación y cae en el intervalo (6.5-9.0) sugerido por Timmons et al. (2009) como ideal para el crecimiento y salud de la mayoría de los animales dulceacuícolas. La exposición a un pH extremo puede ser estresante o letal pero lo más importante en acuicultura son los efectos indirectos resultantes de las interacciones del pH con otras variables. En este trabajo los valores de pH (~8.0) fueron mantenidos dentro del intervalo mencionado anteriormente, lo cual pudo ser importante para controlar las reacciones de equilibrio y solubilidad de la forma no ionizada y la ionizada de amoníaco y del nitrito.

En el caso de la temperatura, ésta presentó ligeros incrementos durante el primer año de cautiverio de la TSPM los cuales, pudieron ser ocasionados por la

presencia de aparatos cercanos al tanque de mantenimiento cuyo funcionamiento resultaba en un desprendimiento de calor. Durante el segundo año la incorporación de un enfriador al sistema de recirculación nos permitió mantener un control de la temperatura del agua.

En las diferentes formas nitrogenadas (NTA, nitritos y nitratos), los valores más altos se registraron durante los primeros meses de cautiverio de la trucha. Sin embargo, estos valores obedecen al período en el cual la maduración del filtro biológico aún estaba en proceso y el establecimiento de las bacterias benéficas encargadas de la transformación de los compuestos nitrogenados todavía no concluía. Durante el segundo año, el filtro maduró completamente. Con las comunidades bacterianas ya formadas se logró disminuir las concentraciones de las diferentes formas nitrogenadas y mantener estos valores dentro de los reportados como tolerables para la trucha arcoíris en un sistema de cultivo (Russo y Thurston, 1977; Arredondo-Figueroa et al., 1996; Arredondo-Figueroa et al., 2007). En el caso específico de los nitratos, debido a las altas concentraciones obtenidas durante los primeros meses, se decidió realizar los intercambios de agua en intervalos más corto logrando que las concentraciones se mantuvieron de 0.00 a 2.29 mg/L en los meses subsecuentes.

En adición, como medida preventiva, la remoción del cloro del agua procedente del municipio pudo ser relevante para la salud de las truchas. Lo anterior se debe a que este químico añadido al agua del tanque pudo haber reaccionado con la materia orgánica y generar compuestos tóxicos como los trihalometanos o

ácidos halocéticos (EPA, 1999), los cuales son tóxicos para cualquier organismos acuático.

En general se puede mencionar que tanto las variables físico-químicas como las diferentes formas nitrogenadas mantuvieron valores cercanos a los reportados para esta trucha autóctona en condiciones naturales (Ruiz-Campos, 1993) o la trucha arcoíris en condiciones de cultivo (Fernández-San Juan, 1985; García-Ortega y Calvario-Martínez, 2003; Ingle de la Mora et al., 2003; Arredondo-Figueroa et al., 2007). Por tanto, es posible que las condiciones experimentales probadas en este trabajo fueron adecuadas para el mantenimiento y crecimiento en cautiverio de la trucha de San Pedro Mártir.

Crecimiento de los organismos. En este trabajo se reporta por primera vez el más alto crecimiento somático en longitud (290 ± 8.62 mm LT) y peso corporal (360 ± 20.87 g) para *O. mykiss nelsoni* mantenida en cautiverio. Estos valores fueron superiores a los reportados para individuos silvestres de la misma subespecie con edad máxima de 4 años (241.6 mm LT [211 SL mm] y 151.8 g) (Ruiz-Campos, 1993; Ruiz-Campos et al., 1997). Similares resultado fueron reportados por Barriga-Sosa et al. (2010) para otra de las truchas endémicas, la trucha dorada (*O. chrysogaster*). Lo anterior sugiere que el mantenimiento en condiciones de cautiverio de las truchas endémicas es una opción viable, la que podría ser fundamental en la acuicultura de especies con potencial comercial en México.

Ruiz-Campos (1993) y Ruiz-Campos et al. (1997) sugieren que el lento crecimiento de los organismos silvestres puede deberse a la poca disponibilidad de alimento y a las altas temperaturas del agua que prevalecen durante el verano (16.5°C a 24.5°C) en los arroyos de la Sierra de San Pedro Mártir. En este trabajo, las truchas fueron alimentadas constantemente y la temperatura del agua no alcanzó los altos valores registrados por los autores citados. Por tanto, estas condiciones pudieron favorecer el crecimiento de estos organismos en condiciones de cautiverio.

Maduración gonádica de la TSPM en cautiverio. En general los organismos silvestres presentan problemas para madurar sexualmente y reproducirse en cautiverio, lo cual puede deberse a que las condiciones ambientales no son iguales a las que prevalecen en su hábitat natural (Donaldson y Hunter (1983). En peces, la madurez sexual es un proceso que depende de la interacción de los ritmos endógenos y factores exógenos como estímulos ambientales y sociales, por tanto, su control durante el mantenimiento de los organismos con fines de maduración gonádica es fundamental (Bromage et al., 2001). En *O. mykiss nelsoni*, la luz y la temperatura fueron factores relevantes para su desarrollo gonadal en condiciones de cautiverio, lo que coincide con lo reportado en *O. mykiss* (Pohl-Brascheid y Holtz, 1990; Randall, 2001; Bonnet et al., 2007; Pornsoping et al., 2007; Valenzuela et al., 2007).

En este estudio los machos de la TSPM liberaron esperma en seis ocasiones en un período de 97 días. La cantidad de espermatozoides obtenidos en esta subespecie de trucha fue ligeramente mayor (165-228 $\mu\text{L}/\text{organismo}$) a lo reportado en *O. mykiss nelsoni* (~100-200 $\mu\text{L}/\text{organismo}$) por Ruiz-Campos (1994) en su hábitat natural. Por otra parte, tanto el volumen como la cantidad de espermatozoides fue inferior a los registrados en la trucha arcoíris en condiciones de cultivo (Bastardo et al., 2004; Rains et al., 2005; Bozkurt et al., 2006).

Las diferencias en la literatura con los resultados obtenidos en este estudio podrían ser explicadas por otras variables como diferencias en el tamaño de la gónada, presencia de hembras listas para ovular (Billard, 1986), tipo de alimento (Lahnsteiner et al., 1998) o incluso el uso de hormonas para inducir la liberación de espermatozoides, lo que es común en peces de cultivo (Valdebenito, 2008). No obstante, el uso de hormonas no está exento de efectos negativos sobre la calidad de los gametos (Díaz y Neira, 2005).

Durante este estudio, las truchas fueron alimentadas con un alimento exclusivo para crecimiento y en mayo de 2009 se cambió a uno específico para inducir la maduración gonadal de estos peces (45% de proteína, 10% de grasas, con pigmento). Nueve meses después del cambio de alimento (Enero 2010), las truchas liberaron esperma y tanto el volumen como el número de esperma obtenido durante la primera espermiación (2009) incrementó significativamente de 216.67 $\mu\text{L}/\text{org}$ a 847.14 $\mu\text{L}/\text{org}$ y de 235 ± 29.89 hasta 6881 ± 23.53 ,

respectivamente. Además, de acuerdo a los resultados obtenidos con respecto a la integridad de membrana mediante sondas fluorescentes (Live/Dead kit L-7011) los espermatozoides mostraron una integridad de membrana >80%.

En adición, la calidad de los espermatozoides de la TSPM fue diferente conforme avanzó la temporada de espermiación, lo que coincide con lo reportado en peces salmónidos (Billard et al., 1971), donde generalmente en la primera extracción de esperma el volumen obtenido es pequeño y conforme avanza la temporada tanto la calidad como la cantidad de los espermatozoides incrementa hasta alcanzar un máximo, para después disminuir.

En los machos de *O. mykiss nelsoni*, el fotoperíodo y la temperatura fueron factores relevantes para inducir la maduración gonádica de esta trucha, y el tipo de alimento fue fundamental para mejorar la calidad de los espermatozoides. Por tal motivo, los factores antes mencionados deben ser considerados durante la maduración gonádica de la TSPM bajo condiciones de cultivo.

En cuanto a la morfología de los espermatozoides de *O. mykiss nelsoni*, ésta resultó muy similar a lo que se ha descrito en muchos peces teleósteos, en donde la ausencia de acrosoma es un carácter común (Mattei, 1970). El acrosoma es un pequeño depósito situado en el extremo apical de la cabeza del espermatozoide que contiene enzimas degradativas (hidrolíticas) cuya función es ayudar al espermatozoide en la penetración del huevo durante el proceso de fertilización. En las truchas este mecanismo no es necesario porque el

espermatozoide alcanza la membrana plasmática del huevo a través de un estrecho micrópilo (Rudolfson et al., 2008).

La cabeza del espermatozoide de la TSPM tiene una forma elongada y su forma (ancho y largo) así como la longitud del flagelo fueron muy similares a los reportados en *O. mykiss* (Fribourgh y Soloff, 1976; Tuset et al., 2008).

Evaluación de la calidad de los espermatozoides. En este estudio el porcentaje de movilidad registrado para los espermatozoides de la TSPM fluctuó entre 80 y 95%. Aunque existen una gran variedad de técnicas que permiten evaluar la calidad del espermatozoide como sondas fluorescentes (Garner y Johnson, 1995), Rodamina123 (Segovia et al., 2000), ensayo cometa (Cabrita et al., 2005) y la capacidad de fertilización de los espermatozoides (Paniagua-Chávez et al., 2006); el porcentaje de movilidad ha sido el procedimiento más utilizado (Tiersch, 2000) ya que su evaluación es rápida y relativamente barata. Sin embargo, aunque la posible relación entre el porcentaje de movilidad y la fecundidad aún no ha sido completamente demostrada (Ciereszko et al., 1999), la evaluación de la calidad del espermatozoide por medio de la movilidad puede ser considerado como un buen indicador cuando el estudio no involucra precisión extrema en la evaluación del daño.

En el caso de las hembras de *O. mykiss nelsoni*, estas no lograron madurar sexualmente durante el primer año que permanecieron en condiciones de mantenimiento. Después, cuando fueron mantenidas en un SAF, la liberación de

gametos ocurrió en el 20% de estas truchas, no obstante la inmadurez de los ovocitos obtenidos fue evidente. Posteriormente, se les proporciono un alimento exclusivo para maduración y se mantuvieron en un SAF. Nueve meses después, el 80% de las hembras desovaron gametos de buena calidad.

Durante el primer año en que los machos y las hembras de la TSPM permanecieron en el laboratorio la temperatura, las condiciones de luz, el alimento, la maduración del filtro y el estrés de los organismos al cautiverio pudieron ser factores relevantes para que la maduración gonádica de estos peces no se llevara a cabo. Durante el segundo año a diferencia de los machos, en las hembras el control de la luz y la temperatura no fue suficiente para que estas alcanzaran a completar su maduración gonádica.

Estay (1988) menciona que durante el cultivo de los organismos, las condiciones ambientales inadecuadas, la alimentación y el estrés de los organismos durante su cautiverio generan dificultades durante su reproducción. No obstante, estas alteraciones son registradas más frecuentemente en las hembras, las cuales, según Zohar y Mylonas (2001) responden al presentar ausencia tanto del desarrollo gonadal, como de la maduración final de los ovocitos o del desove.

Las hembras de la TSPM presentaron un comportamiento similar al descrito por los autores anteriormente citados, estas fueron más sensibles a las condiciones ambientales prevalecientes durante su cautiverio y más específicas en cuanto al tipo de alimentación que los machos de la misma subespecie, lo cual fue

determinante para alcanzaran su maduración gonádica. Resultados similares han sido reportados por Pohl-Branscheid y Holtz (1990) en *O. mykiss*. En este estudio, el cambio de alimento fue determinante en la maduración gonádica de las hembras de la trucha de San Pedro Mártir.

Los resultados obtenidos para el mantenimiento y maduración gonádica de la trucha de San Pedro Mártir en cautiverio, podrían ser importantes para promover proyectos que resulten en beneficios tanto para la conservación de la población de esta trucha, como para las regiones locales donde habitan estos peces. En el caso de *O. mykiss nelsoni* se podrían promover proyectos de repoblación de esta trucha nativa en su medio natural y establecer lugares prioritarios para la conservación de su población. Incluso, se podría ayudar a elaborar programas turísticos estableciendo sitios destinados exclusivamente para la pesca deportiva, la cual ha sido practicada en esta trucha por años sin un permiso previo. En las comunidades locales las ventajas de una producción basada en sus propios recursos naturales podrían mejorar el nivel nutricional de las familias y además puede ser una fuente de ingresos económicos mejorando la calidad de vida de la región.

En general los requerimientos para mantener cualquier especie en cautiverio son importantes y estos se vuelven más relevantes cuando se trata de mantener especies endémicas o en peligro de extinción como es el caso de la TSPM. En este trabajo, el sistema de recirculación utilizado demostró ser una herramienta útil para mantener a la TSPM en cautiverio. Incluso, este sistema podría ser

adaptado para estimular las condiciones de crecimiento de ésta y otras truchas autóctonas que se encuentran en peligro de extinción. Además, se proporcionan los requerimientos básicos para inducir la maduración gonádica de esta trucha en condiciones controladas de laboratorio. Con la información generada en este trabajo se podrían generar futuros programas de reproducción, repoblación y conservación de la población más meridional de trucha arcoíris costera en Norteamérica.

LITERATURA CITADA

- Abedini, S. R. Namdari y F. C. P. Law, 1998. Comparative pharmacokinetics and bioavailability of oxytetracycline in rainbow trout and chinook salmon. *Aquaculture*. 162 (1-2):23-32.
- Anderson, W. G., R. S. McKinley y M. Colavecchia, 1997. The use of clove oil as an anesthetic for rainbow trout and its effects on swimming performance. *North American Journal of Fisheries Management*. 17(2):301-307.
- Arredondo-Figueroa, J. L., 1983. Especies animales acuáticas de importancia nutricional, introducidas en México. *Biotica*. 9 (1):23-39.
- Arredondo-Figueroa, J. L., R. H. Valdivia-Soto, L. Hernández-Lastiri y Campos-Verduzco, 1996. Evaluación del crecimiento, factor de conversión de alimento y calidad del agua del cultivo de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) en un sistema cerrado. *Hidrobiológica*. 6(1-2):59-65.
- Arredondo-Figueroa, J. L., G. Ingle de la Mora, I. Guerrero-Legarreta, J. T. Ponce-Palafox y I. de los A. Barriga-Sosa. 2007. Ammonia and nitrite removal rates in a closed recirculating water system, under three load rates of rainbow trout

- Oncorhynchus mykiss*. Revista Mexicana de Ingeniería Química. 6(3):301-308.
- Barriga-Sosa, I. D. L. A., J. L. Arredondo-Figueroa, G. Ingle de la Mora, M. Banda-Cortés, L. Rendón y F. J. García de León. 2010. Primeras experiencias del cultivo de la trucha dorada (*Oncorhynchus chrysogaster*). <http://www.izt.uam.mx/pexpa/pdf/truchadorada.pdf>. 1-4.
- Bastardo, H., C. Guedez y M. León, 2004. Características del semen de trucha arco iris de diferentes edades, bajo condiciones de cultivo en Mérida, Venezuela. Zootecnia Tropical. 22(3):277-288.
- Behnke, R. J., 2002. Trout and Salmon of North America. The Free Press, New York, 359 p.
- Billard, R., B. Breton y B. Jalabert, 1971. La production spermatogénétique chez la truite. Annals of Biology Biochemistry and Biophysics. 11(2):199-212.
- Billard, R. y B. Breton, 1979. Rhythms of reproduction in teleost fish. IN: Thorpe J. E. (ed). Rhythms of Activity in Fish. Academic Press, New York; 31-53.
- Billard, R., 1985. Environmental factors in salmonid culture and the control of reproduction. IN: R.N. Iwamoto y S. Sowers (eds). Salmonid Reproduction, International Symposium on Salmonid Reproduction. Bellevue, Washington, DC, USA; 71-87.
- Billard, R., 1986. Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species. Reproduction Nutrition Development. 26:877-920.
- Bonnet, E., J. Montfort, D. Esquerre, K. Hugot, A. Fostier y J. Bobe, 2007. Effect of photoperiod manipulation on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) egg quality: A genomic study. Aquaculture. 268:13-22.

- Bozkurt, Y., S. Seer, N. Bukan, E. Akcay y N. Tekin, 2006. Relationship between body condition, physiological and biochemical parameters in brown trout (*Salmo trutta fario*) sperm. Pakistan Journal of Biological Sciences. 9(5):940-944.
- Bromage, N. R.; M. Porter y C. Randall, 2001. The environmental regulation of maturation in farmed finfish with special reference to the role of photoperiod and melatonin. Aquaculture. 197:63-98.
- Cabrita, E. V. Robles, L. Rebordinos, C. Sarasquete y M. P. Herráez, 2005. Evaluation of DNA damage in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) cryopreserved sperm. Cryobiology. 50:144-153.
- Carta Nacional Psquera, 2006. Secretaria de Agricultura, Ganadera, Desarrollo rural, Pesca y Alimentación. Diario Oficial. Parte 3. CONAPESCA. 85 p.
- Ciereszko, A., K. Dabrowski, F. Lin, S. A. Christ y G. P. Toth, 1999. Effect of extenders and time of storage before freezing on motility and fertilization of cryopreserved muskellunge spermatozoa. Progressive Fisheries Culturist American Fisheries Society. 128: 542-548.
- Davies, B. y N. R. Bromage, 2002. The effects of fluctuating seasonal and constant water temperatures on the photoperiodic advancement of reproduction in female rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Aquaculture. 205:183-200.
- De-Vlaming, V. L., 1975. Effects of photoperiod and temperature on gonadal activity in the cyprinid teleost, *Notemigonus crysoleucas*. Biological Bulletin. 148:402-415.
- Díaz, N. F. y R. Neira, 2005. Biotecnología Aplicada a la Acuicultura I. Biotecnologas clasicas aplicadas a la reproducción de especies cultivadas. Ciencia e Investigación Agraria. 32(1):45-59.

- Donaldson, E. M. y G. A. Hunter, 1983. Induced final maturation, ovulation and spermiation in cultured fishes. IN: Hoar W. S., Randall D. J. y Donaldson E. M. (eds). Fish Physiology. Reproduction, Vol. 9B. Academic Press, Orlando, USA; 351-403.
- EPA, (Environmental Protection Agency), 1999. Folleto informativo de tecnología de aguas residuales. Desinfección con cloro. EPA 832-F-99-062. Office of water, Washington, D. C. 9 p.
- Espinosa, H., F.J. García de León, G. Ruiz C., A. Varela, I. Barriga, J. L. Arredondo, D. Hendrickson, F. Camarena A. B. de los Santos y Grupo Truchas Mexicanas 2007. Las truchas mexicanas, peces enigmáticos del Noroeste. Especies, Revista sobre Conservación y Biodiversidad. 16:(1):8-14.
- Estay, F., 1988. Análisis de algunos factores determinantes de alteraciones en la maduración gonadal y fertilidad de trucha arco iris (*Salmo gairdneri*) cultivada. Tesis de Maestría. Universidad de Santiago, Chile. 98 p.
- Fernández-San Juan, J., 1985. Bases biológicas del proyecto de Pedras Blancas Lajes-SC. IN: FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación) (ed). Asistencia Técnica al Proyecto de Desarrollo Pesquero SUDEPE/BID. Proyecto 1, Report 6054/S. Roma; 1-79.
- Fribourgh, J. H. y B. L. Soloff, 1976. Scanning electron microscopy of the rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) spermatozoon. Arkansas Academy of Science Proceedings. XXX:41-43.
- García-Ortega, A. y O. Calvario-Martínez, 2003. Manual de Buenas prácticas de producción acuícola de trucha para la inocuidad alimentaria. IN: García-Ortega, A. y Calvario-Martínez O. (eds). Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Unidad Mazatlán en Acuicultura y Manejo Ambiental. SAGARPA. Manual/1. Mazatlán, Sinaloa, México; 86 p.

- Garduño-Franco, J. C., 1994. Desarrollo ontogénico, supervivencia y crecimiento de la trucha arco iris de San Pedro Mártir, *Oncorhynchus mykiss nelsoni* (EVERMANN), en condiciones de semicultivo. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Baja California. Facultad de Ciencias, Ensenada, Baja California, México. 82 p.
- Garner, D. L. y L. A. Jhonson, 1995. Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide. *Biology of Reproduction*. 53:276-84.
- Grondel, J. L., J. F. M. Nouws, A. R. Schutte y F. Driessens, 2008. Comparative pharmacokinetics of oxytetracycline in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and African catfish (*Clarias gariepinus*). *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 12:157-162.
- Hendickson, D. A., A. D. Nelly, L. R. Mayden, K. Anderson, J. E. Brooks, F. Camarena-Gonzalez, R. Cutter, A. B. De los Santos, W. G. Ernsting, H. Espinosa-Pérez, T. L. Findley, J. F. García de Leon, A. L. George, J. Hatch, R. B. Kuhajda, E. K. Mayden, K. McNyset, L. J. Nielsen, W. F. Pfeifer, L. D. Propst, G. Ruiz-Campos, G., S. E. Clair, R. J. Tomelleri, y A. Varela-Romero, 2006. Conservation of mexican native trout and the discovery, status, protection and recovery of the Conchos trout, the first native. IN: Lozano-Vilano, M.L. y Contreras-Balderas, A.J. (eds). *Studies of North American Desert Fishes in honor of E.P. (Phil) Pister, conservationist*. Universidad Autónoma de Nuevo Leon, México; 162-198.
- Hochheimer, J. N. y F. W. Wheaton, 1991. Understanding biofilters, practical microbiology for ammonia removal in aquaculture. *Proceedings of the Aquaculture Symposium*. Cornell University April 4-6, 1991. Ithaca, New York. 57-83.
- Ingle-De la Mora, G., Villareal-Delgado E. L., Arredondo-Figueroa J. L., Ponce-Palafox T. y I. A. Barriga-Sosa, 2003. Evaluación de algunos parámetros de calidad del agua en un sistema cerrado de recirculación para la acuicultura,

- sometido a diferentes cargas de biomasa de peces. *Hidrobiológica*. 13(4):247-253.
- Keene, J. L. y D. L. G. Noakes. 1998. The efficacy of clove oil as an anaesthetic for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture Research*. 29:89-101.
- Lahnsteiner, F., T. Weismann y R. A. Patzner, 1998. Evaluation of the semen quality of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by sperm motility, seminal plasma parameters, and spermatozoal metabolism. *Aquaculture*. 163:163-181.
- León-García, D. L. 1992. Determinación de la talla y edad de primera madurez sexual y fecundidad de la trucha, *Oncorhynchus mykiss* Nelson, de la Sierra San Pedro Mártir, B. C., México. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de Baja California. Facultad de Ciencias, Ensenada, Baja California, México. 99 p.
- Malone, R. F. y A. A. DeLosReyes Jr., 1997. Categories of Recirculating Aquaculture Systems. IN: M. B. Timmons y T. Losordo (eds). *Advances in Aquacultural Engineering*. Aquacultural Engineering Society (AES) Proceedings III, ISTA IV, Orlando, Florida, Nov. 9-12, NRAES New York; 197-208.
- Malone, R. F. y L. E. Beecher, 2000. Use of Floating Bead Filters to Recondition Recirculating Waters in Warmwater Aquaculture Production Systems. *Aquacultural Engineering*. 22:57-73.
- Mattei, X., 1970. Spermiogenese compare des poisons. IN: Baccetti B. (ed). *Spermatology*. Academic Press. New York; 57-69.
- Meka, J. M. y S. D. McCormick, 2005. Physiological response of wild rainbow trout to angling: impact of angling duration, fish size, body condition, and temperature. *Fisheries Research*. 72:311-322.

- Morel, A. y R. C. Smith, 1974. Relation between total quanta and total energy for aquatic photosynthesis. *Limnology and Oceanography*. 19:591-600.
- Needham, P.R. 1955. Trail of the Mexican trout (roads to discovery). *Pacific Discovery*. VIII (4):18-24.
- Paniagua-Chávez, C. Jenkins J., M. Segovia-Quintero y T. Tiersch, 2006. Assessment of gamete quality for the eastern oyster (*Crassostrea virginica*) by use of fluorescent dyes. *Cryobiology*. 53:128-138.
- Pankhurst, N. M., G. J. Purser, G. Van Der Kraak, P. M. Thomas y G. N. R. Forteath, 1996. Effect of holding temperature on ovulation, eggs fertility, plasma levels of reproductive hormones and in vitro ovarian steroidogenesis in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*. 146:277-290.
- Pohl-Branscheid, M. y W. Holtz, 1990. Control of spawning activity in male and female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by repeated foreshortened seasonal light cycles. *Aquaculture*. 86:93-104.
- Pornsoping, P.; G. Unsrisong; T. Vearasilp; S. Wessels y G. Hörstgen-Schwark, 2007. Reproductive performance of female rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) kept under water temperatures and photoperiod of 13° and 51°N latitude. *Aquaculture Research*. 38:1265-1273.
- Prat, F, S Zanuy, N Bromage, M Carrillo, 1999. Effects of constant short and long photoperiod regimes on the spawning performance and sex steroid levels of female and male sea bass. *The Journal of Fish Biology*. 54:125-137.
- Rains, S., L. Gasco y R. Ballestrazzi, 2005. Comparative study on milt quality features of different finfish species. *Italian Journal of Animal Science*. 2:355-363.
- Randall, C., 2001. Photoperiod effects on reproduction and growth in rainbow trout. *Trout News*. 32:12-16.

- Rodríguez, L., I. Begtashi, S. Zanuy, M. Carrillo, 2000. Development and validation of an enzyme immunoassay for testosterone: Effects of photoperiod on plasma testosterone levels and gonadal development in male sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) at puberty. *Fish Physiology and Biochemistry*. 23:141-150.
- Rottmann, R. W., J. V. Shireman y F. A. Chapman, 1991. Introduction to hormone-induced spawning of fish. The Southern Regional Aquaculture Center (SRAC) through Grant No. 89-38500-4516 from the United States. Publication. No. 421. 1-4.
- Rudolfsen, G., L. Figenschou, I. Folstad, O. Kleven, 2008. Sperm velocity influence paternity in the Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Aquaculture Research*. 39:212-216.
- Ruiz-Campos, G. y P. Cota-Serrano, 1992. Ecología alimenticia de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss nelsoni*) del Arroyo San Rafael, Sierra San Pedro Mártir, Baja California, México. *The Southwestern Naturalist*. 37(2):166-177.
- Ruiz-Campos, G. 1993. Bionomía y ecología poblacional de la trucha arco iris, *Oncorhynchus mykiss nelsoni* (Evermann), de la Sierra San Pedro Mártir, Baja California, México. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey. México. 223 p.
- Ruiz-Campos, G. 1994. Cultivo experimental de la trucha arco iris *Oncorhynchus mykiss nelsoni* (Everman), para propósitos de repoblación y conservación del germoplasma endémico. Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada, México. Informe CONACyT 0340N-9107. 1-50.
- Ruiz-Campos, G. y E. P. Pister, 1995. Distribution, habitat, and current status of the San Pedro Mártir rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss nelsoni* (Evermann). *Bulletin of the Southern California Academy of Sciences*. 94:131-148.

- Ruiz-Campos, G., E. P. Pister, y G. A. Compeán-Jiménez. 1997. Age and Growth of Nelson's Trout, *Oncorhynchus mykiss nelsoni*, from Arroyo San Rafael, Sierra San Pedro Mártir, Baja California, México. The Southwestern Naturalist. 42(1):74-85.
- Ruiz-Campos, G., F. Camarena-Rosales, A. Varela-Romero, S. Sánchez-González, y J. De La Rosa-Vélez. 2003. Morphometric Variation of Wild Trout Populations from Northwestern México (Pisces: Salmonidae). Reviews in Fish Biology and Fisheries. 13 (1):91-110.
- Russo, R. C. y R. V. Thurston, 1977. The acute toxicity of nitrite to fishes. IN: Tubbs, R. I. A. (ed). Recent Advances in Fish Toxicology. Environmental Protection Agency. Ecology Research Service. EPA-600/3-77-085. Corvallis. Oregon; 118-131.
- Segovia, M., J. A. Jenkins, C. Paniagua-Chávez y T. R. Tiersch, 2000. Flow cytometric evaluation of antibiotic effects on viability and mitochondrial function of refrigerated spermatozoa of Nile tilapia. Theriogenology. 53:1489-1499.
- Sichlau, M. B., L. Madsen y I. Dalsgaard, 2003. Efficiency of oxytetracycline treatment in rainbow trout experimentally infected with *Flavobacterium psychrophilum* strains having different in vitro antibiotic susceptibilities. Aquaculture. 215 (1-4):11-20.
- Taranger, G.L. y T. Hansen, 1993. Ovulation and egg survival following exposure of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., broodstock to different water temperature. Aquaculture and Fisheries Management. 24:151-156.
- Tiersch, T. R., 2000. Introduction. IN: Tiersch, T. y Mazik P. (eds). Cryopreservation in Aquatic Species. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana; xix-xxvi.

- Timmons, M. B., J. M. Ebeling y R. H. Piedrahita, 2009. Acuicultura en sistemas de recirculación. Primera edición en español. Cayuga Aqua Ventures, New York; 959.
- Titarev, Y. F., 1975 Acceleration of maturation in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*) under the influence of increased water temperature. Journal of Ichthyology. 15:507-509.
- Tuset, V. M., G. J. Dietrich, M. Wojtczak, M. Słowińska, J. de Monserrat y A. Ciereszko, 2008. Comparison of three staining techniques for the morphometric study of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. Theriogenology. 69:1033-1038.
- Valdebenito, I., 2008. Terapias hormonales utilizadas en el control artificial de la madurez sexual en peces de cultivo: una revisión. Archivos de Medicina Veterinaria 40:115-123.
- Valenzuela, A. E., V. M. Silva y A. E. Klempau 2007. Some changes in the haematological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to three artificial photoperiods regimes. Fish Physiology and Biochemistry. 33:35-48.
- Wild, H. E., C. N. Sawyer y T. C. McMahan, 1971. Factors affecting nitrification kinetics. Journal of Water Pollution Control Federation. 43:1845-1854.
- Zanuy, S., F. Prat, M. Carrillo, N Bromage, 1995. Effects of constant photoperiod on spawning and plasma 17 β -oestradiol levels of sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Aquatic Living Resources. 8:147-152.
- Zohar, Y, C. C. Mylonas, 2001. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. Aquaculture. 197:99-136.

CONSERVACIÓN A CORTO PLAZO DEL
ESPERMA DE LA TRUCHA DE SAN PEDRO
MÁRTIR (*Oncorhynchus mykiss nelsoni*,
EVERMANN)

Capítulo III

RESUMEN

El presente capítulo ofrece un protocolo de conservación a corto plazo de los espermatozoides de la trucha de San Pedro Mártir (*Oncorhynchus mykiss nelsoni*). La concentración iónica, la osmolalidad y el potencial de hidrógeno fueron evaluadas como soluciones extensoras. El agua destilada, el agua corriente, el agua de río, el NaCl y soluciones como D532 y DIA 532 fueron probadas como medios de activación de los espermatozoides de esta trucha. El esperma de la trucha fue mantenido en distintas soluciones extensoras a diferentes tasas de suspensión (1:3, 1:6, 1:9). Las muestras fueron mantenidas a 4°C por 10 días y el porcentaje de movilidad e integridad de membrana evaluados diariamente. Nuestros resultados sugieren que la inactivación y la subsecuente activación de los espermatozoides fueron influenciadas tanto por la concentración iónica como por la osmolalidad. Los espermatozoides suspendidos en la solución extensora de Erdhal y Graham (1:9) y la solución DIA 532 como medio de activación resultaron ser óptimas para mantener a los espermatozoides a 4°C por siete días y con un porcentaje de movilidad $\geq 80\%$. Una relación lineal fue obtenida entre el porcentaje de movilidad e integridad de membrana en las tres suspensiones evaluadas. La integridad de membrana fluctuó en promedio un 26% menor que el porcentaje de movilidad, lo que sugiere un posible efecto del SYBR14 en la membrana mitocondrial de los espermatozoides. El protocolo desarrollado aquí para la conservación a corto plazo del esperma de la trucha de San Pedro Mártir, podría contribuir a prolongar la disponibilidad del esperma de esta trucha nativa para procesos reproductivos en cautiverio y ayudar con los programas para su repoblamiento y conservación.

INTRODUCCIÓN

El conocimiento del proceso reproductivo de los peces en cautiverio es un componente esencial de la acuicultura que permite la producción continua de juveniles durante todo el año. No obstante, este proceso de reproducción puede no ser obtenido debido a la asincronización de la madurez gonádica de los reproductores en condiciones de cultivo (Bozkurt y Seğer, 2005), por lo que ha sido necesario desarrollar alternativas que permitan prolongar el tiempo de supervivencia de los espermatozoides liberados por los peces bajo condiciones controladas.

El almacenamiento de esperma a bajas temperaturas (4°C) surge como una estrategia para extender el tiempo de viabilidad de los espermatozoides por horas o días sin alterar su habilidad de fertilización (Cabrita et al., 2009). La utilidad de esta técnica ha sido reflejada en la reproducción de especies cultivadas con importancia comercial (Cloud et al., 1990; Bozkurt y Seğer, 2005), y podría contribuir en los procesos reproductivos encaminados a la conservación de aquellas especies que están amenazada o en peligro de extinción (Bozkurt et al., 2009) como es el caso de la trucha de San Pedro Mártir (TSPM), *Oncorhynchus mykiss nelsoni*.

Actualmente la reproducción de esta trucha en condiciones de cautiverio aún no ha sido exitosa, pese al estado de protección que estos peces presentan (Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales, 2002). La conservación

de los espermatozoides de *O. mykiss nelsoni* mediante técnicas criogénicas por tiempos prolongados, podría ayudar a optimizar los procedimientos de reproducción de estos peces y contribuir a la preservación de esta trucha en condiciones naturales.

Existen numerosos métodos de almacenamiento a corto plazo para el espermatozoides de peces de agua dulce como *O. mykiss*, *Cyprinus carpio*, *Sarotherodon mossambicus* (Scott y Baynes, 1980; Harvey y Kelley, 1984; Saad et al., 1988), y especies marinas como el rodaballo (*Scophthalmus maximus*) y algunas especies de teleósteos *Macrozoarces americanus* y *Latris lineata* (Chereguini et al., 1997; Yao et al., 1999; Ritar y Campet, 2000). Sin embargo, estas técnicas suelen ser específicas para cada especie (Stein y Bayrle, 1978; Gwo et al., 1993).

Durante la conservación de espermatozoides a temperaturas bajas, estos gametos son suspendidos en una solución extensora y posteriormente almacenados a 4°C por días o semanas. La solución extensora tiene la función de mantener a los espermatozoides en un estado inactivo sin afectar sus funciones fisiológicas vitales y al mismo tiempo no interferir con su habilidad para ser activados (Routray et al., 2007). Durante este procedimiento los espermatozoides están sujetos a cambios en su medio físico y químico, por tanto, la calidad espermática debe ser monitoreada constantemente. A la fecha el porcentaje de movilidad ha sido el criterio más utilizado para evaluar la calidad del espermatozoides (Cabrita et al., 2009), aunque la determinación de la integridad de

membrana por medio de sondas fluorescentes como SYBR14 y yoduro de propidio (Garner y Jhonson, 1995) son opciones viables en la determinación de la calidad del esperma después de su conservación a bajas temperaturas.

La conservación a corto plazo de los espermatozoides de la trucha arcoíris *O. mykiss nelsoni* podría contribuir a los procesos de reproducción de esta subespecie en condiciones de cautiverio. Además, un adecuado almacenamiento del esperma de esta trucha incrementa su uso potencial para estudios a largo plazo (criopreservación) encaminados a mejorar el estatus comercial, ecológico o de conservación. En virtud de lo anterior, el objetivo del presente trabajo es desarrollar un protocolo que permitiera conservar el esperma de *O. mykiss nelsoni* a bajas temperaturas por corto tiempo, y evaluar el efecto de este procedimiento sobre la movilidad e integridad de membrana.

OBJETIVO GENERAL

Determinar un protocolo que permita la conservación a corto plazo del esperma de la trucha de San Pedro Mártir *O. mykiss nelsoni*.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar una solución extensora para inactivar el esperma de la trucha de San Pedro Mártir.
- Generar un medio de activación para el esperma de esta trucha nativa.
- Evaluar la integridad de membrana de los espermatozoides de este salmónido, mediante el uso de tinciones fluorescentes después de su almacenamiento a bajas temperaturas.

MATERIALES Y MÉTODOS

I. Curvas de inactivación para el esperma de *O. mykiss nelsoni*.

I.1. Obtención de las muestras de esperma. En marzo de 2008, diez machos sexualmente maduros de *O. mykiss nelsoni* fueron capturados en el Arroyo San Rafael, en la parte noroccidental de la Sierra de San Pedro Mártir, ubicado en el municipio de Ensenada, Baja California. La captura de los organismos se realizó con ayuda de un equipo de electropesca (AC Smith-Root 15-B POW) a 90 y 120 V. La obtención del semen fue realizada acorde a la técnica descrita por Gwo et al. (1993). Brevemente, los peces capturados fueron extraídos del agua y la papila urogenital fue limpiada con un papel secante. Después la región ventral fue presionada para permitir la expulsión del esperma. La primera muestra de esperma fue eliminada por estar contaminada con orina o heces. Las muestras de esperma fueron recolectadas en pipetas Pasteur de 1.8 mL, las mismas que fueron selladas con papel parafilm, colocadas en una caja térmica de unicel (preparada previamente con hielo a 4°C) y transportadas (4 horas de viaje) al Banco de Germoplasma de Especies Acuáticas (BGEA) en el Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), en Ensenada, Baja California.

I.2. Evaluación de la movilidad. Ya en el laboratorio, fueron colocados 0.5 µL de cada muestra en un portaobjetos y se mezclaron con 20 µL de agua corriente para activarlos. Las muestras fueron observadas en un microscopio (Nikon

H600L, Eclipse 80-i) con un aumento de 400X, y el porcentaje de movilidad evaluado de acuerdo al método descrito en el capítulo I.

Debido a la poca cantidad de esperma obtenido durante la recolecta de esperma en el campo, las muestras que presentaron una movilidad $\geq 80\%$ fueron agrupadas en una sola muestra, la cual fue utilizada para experimentación. Para evitar errores en las mediciones, la estimación de la movilidad fue realizada por el mismo observador.

II. Inactivación del esperma de la trucha de San Pedro Mártir.

II.1. Inactivación del esperma en diferentes soluciones extensoras (SE). La inactivación del esperma de *O. mykiss nelsoni* fue probada en cuatro SE previamente utilizadas en peces salmónidos y ciprínidos (Tabla III.1). Cada una de las SE fueron evaluadas a diferentes osmolalidades (95, 191, 284, 379, 469, 561, 656, 750, 842 y 941 mOsmol/kg). Una alícuota de 5 μL de esperma fue suspendida en 15 μL de cada una de las SE a las diferentes osmolalidades y el porcentaje de movilidad fue evaluado con el método antes descrito. Después, las muestras de esperma suspendidas en los diferentes SE a las diferentes osmolalidades fueron reactivadas con agua corriente y el porcentaje de movilidad fue nuevamente medido. La osmolalidad fue evaluada con un osmómetro (Precision Systems Inc.- $\mu\text{Osmette}$ Model 5004).

Tabla III.1. Soluciones extensoras utilizadas para inactivar el esperma de la trucha de San Pedro Mártir (*O. mykiss nelsoni*).

Nombre de la SE/especie en la que ha sido utilizada	Composición de la SE	Referencia
(SE1) Kurokura/ <i>C. carpio</i>	75.29 mM NaCl, 83.17 mM KCl, 1.50 mM CaCl_2 , 0.84 mM MgCl_2 , 2.38 mM NaHCO_3 , pH 8.14 y 326 mOsmol/kg	Bozkurt y Seğer (2005)
(SE2) Cosson/ <i>O. mykiss</i>	125 mM NaCl, 0.1 mM CaCl_2 y 30 mM Tris-Cl y pH 8.5. 280 mOsmol/kg	Cosson et al. (1999)
(SE3) Lahnsteiner/Salmónidos	102.67 mM NaCl, 42.25 mM KCl, 1.02 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.81 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 19.72 mM Hepes y pH 7.8, 313.23 mOsmol/kg	Lahnsteiner (2000)
(SE4) Scott y Baynes/Salmónidos	140 mM NaCl, 20 mM KCl, pH 8.0, 320 mOsmol/kg	Scott y Baynes (1980)

II.2. Inactivación del esperma en soluciones con diferentes pH. La inactivación del esperma de la TSPM fue probada en agua destilada preparada a diferentes pH (5, 6, 7, 8, 9, 10), los cuales fueron ajustados con ácido clorhídrico 0.5 y 1 mM e hidróxido de sodio 0.5 y 1 mM (HCl-NaOH) o con tris (hidroximetil) aminometano 3 mM y 4 (2-hydroxyethyl) - ácido 1-piperazineethanesulfónico 2mM (Tris-Hepes) (SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO) (Bromage y Roberts, 2001; Salinas-Flores, 2003). El procedimiento utilizado para evaluar el efecto de los diferentes pH en la movilidad de los espermatozoides de la TSPM fue el descrito en el punto II.1. La osmolalidad en los diferentes pH fue registrada con ayuda de un osmómetro y ésta osciló entre 0-2 mOsmol/kg en todos los pH evaluados.

II.3. Inactivación de los esperma en diferentes sales. La inactivación del esperma de la TSPM fue evaluada con cloruro de sodio (NaCl) a 2, 16, 36, 71, 100, 143, 183, 221 y 254 mOsmol/kg o con cloruro de potasio (KCl) a 1, 18, 37, 56, 75, 94, 114, 132, 148, 164 y 188 mOsmol/kg (Bromage y Roberts, 2001). El procedimiento utilizado para evaluar el efecto de las diferentes sales a las diferentes osmolalidades en la movilidad del esperma fue el mismo descrito en el punto II.1.

III. Activación del esperma de la trucha de San Pedro Mártir.

La activación del esperma de la TSPM fue evaluada con ocho soluciones activadoras (SA), cuatro utilizadas previamente en especies de agua dulce y cuatro probadas por primera vez en este trabajo (Tabla III.2).

III.1. Inactivación del esperma. Para inactivar el esperma de la *O. mykiss nelsoni*, se seleccionaron las mejores SE obtenidas en los puntos II.1, II.2 y II.3. Además, se decidió incorporar la SE de Erdhal y Graham (1980) (SE-EG), la cual ha sido utilizada por Cabrita et al. (2009) en los espermatozoides de *O mykiss* y sugerida por el mismo autor (com. pers.) para los espermatozoides de la TSPM. La SE-EG contenía 0.102 g/L de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.22 g/L de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.26 g/L de Na_2HPO_4 , 2.61 g/mL de KCl, 0.1 g/L de ácido cítrico, 10 g/L de glucosa, 10mL de una solución de KOH (1.27 g/100 mL), 20mL de una solución de bicina (5.3 g/100 mL), 333 mOsmol/kg y pH 7.4. Todos los químicos utilizados fueron de

grado analítico (Sigma Chemical Co., St. Louis Missouri, USA) y la osmolalidad fue evaluada con un osmómetro.

III.2. Activación del espermatozoides con diferentes soluciones activadoras. Alícuotas de 0.5 µL de muestras de espermatozoides suspendidas en los diferentes extensores fueron mezcladas con 10 µL de cada una de las SA (Tabla III.2). Inmediatamente, el porcentaje de movilidad fue evaluado. Las muestras fueron generadas por triplicado.

Tabla III.2. Soluciones activadoras que fueron empleadas para activar el espermatozoides de la trucha de San Pedro Mártir.

Agente activador	Especie	Formula	Referencia
Agua destilada	<i>Osmerus mordax</i>	pH 5.6, 0 mOsmol/kg	DeeGraaf y Berlinsky (2004)
Agua corriente	<i>Xyrauchen texanus</i>	pH 7.0, 14 mOsmol/kg	Figiel et al. (1996)
Agua del hábitat natural de la TSPM	<i>O. mykiss nelsoni</i>	pH 10.99, temperatura 15 °C, sólidos disueltos totales 0.149 g/L, porcentaje de saturación de oxígeno 71.9, oxígeno 7.40 mg/L, conductividad del agua 0.234 µs/cm, 0 mOsmol/kg	Este trabajo
NaCl	<i>O. mykiss nelsoni</i>	NaCl 143 mOsmol/kg	Este trabajo
	<i>O. mykiss</i>	NaCl 183 mOsmol/kg	Este trabajo
	<i>O. mykiss nelsoni</i>	NaCl 221 mOsmol/kg	Este trabajo
Solución D532	<i>O. mykiss</i>	1 mM CaCl ₂ , 20 mM Tris, 30 mM glycine, 125 mM NaCl pH 9.0, 302 mOsmol/kg	Dietrich et al. (2005)
Solución DIA 532	<i>O. mykiss</i>	0.51 g/l NaCl, 3.75 g/l glycine, 2.42 g/l Tris, 87.39 mOsmol/kg	Billard (1977); Cabrita et al. (2001)

IV. Conservación a corto plazo del esperma de la trucha de San Pedro Mártir.

IV.1. Obtención de las muestras de esperma. En Febrero de 2009, ocho machos de *O. mykiss nelsoni* mantenidos y madurados en cautiverio (capítulo II de este trabajo) fueron colocados por pares en tinas (20 L) con 15 L de agua del tanque de cultivo y 100 μ L de aceite de clavo preparado previamente en etanol (1:9) (Meka y McCormick, 2005). Una vez que los peces perdieron el equilibrio (10-15 minutos de incubación) se procedió a la recolecta de esperma. Las muestras así obtenidas se transportaron (3 minutos) al BGEA para evaluarlas en cantidad y calidad.

IV.2. Volumen y número de espermatozoides en las muestras recolectadas. El volumen de esperma fue determinado por la cantidad de microlitros obtenidos en cada muestra. Para evaluar el número de espermatozoides, se tomó una alícuota de 1 μ L de esperma de cada muestra y se fijó con lugol al 1%. El conteo de espermatozoides se realizó con un hematocitómetro en un microscopio (Nikon H600L, Eclipse 80-i) a un aumento de 400X. El número promedio de espermatozoides fue calculado de tres réplicas y el número de espermatozoides fue expresado $\times 10^6$ células por mililitro.

IV.3. Calidad de las muestras de esperma. La calidad de esperma fue evaluada en función del porcentaje de movilidad de acuerdo a la metodología antes descrita. La mejor SA obtenida en el experimento anterior fue utilizada como

medio de activación. Debido a la poca cantidad de esperma obtenido, las muestras que presentaron una movilidad $\geq 80\%$ fueron agrupadas en una sola muestra, la cual fue utilizada para experimentación. Para evitar errores en las mediciones, la estimación de la movilidad fue realizada por el mismo observador

IV.4. Conservación a corto plazo del esperma a diferentes concentraciones (esperma:SE). Tres tasas de suspensión: 1:3, 1:6 y 1:9 fueron evaluadas para la conservación a corto plazo del esperma de la TSPM. Muestras de esperma de 100 μL fueron colocadas en tubos cónicos de 1.5-mL y se mezclaron con 300 μL , 600 μL y 900 μL de la SE-EG. El esperma suspendido en las diferentes diluciones fue mantenido por triplicado en un refrigerador convencional a 4°C por 10 días. Durante el mantenimiento de las muestras, el porcentaje de movilidad y la integridad de membrana del esperma fueron evaluados diariamente. Una muestra de esperma sin SE fue utilizada como muestra control.

IV.5. Evaluación de la integridad de membrana de los espermatozoides conservados a corto plazo. El kit LIVE/DEAD para viabilidad de esperma (L-7011 Molecular Probes, Inc., USA) fue utilizado para determinar la integridad de membrana y el protocolo de tinción fue realizado acorde a Molecular Probes (2005). De cada tasa evaluada (esperma:SE) una alícuota de 100 μL de cada muestra fueron mezcladas con 0.50 μL de SYBR 14 (20 nM concentración final) e incubada en la oscuridad por 10 minutos a temperatura ambiente ($\sim 19^{\circ}\text{C}$). Después, la muestra fue incubada por otros 10 minutos con 0.50 μL de yoduro de propidio (YP), el cual tenía una concentración final de 12 μM . Una vez que terminó el periodo de

incubación, las muestras fueron observadas en un Microscopio de Fluorescencia a un aumento de 200 o 400X, usando un filtro azul (excitación 490 nm y emisión 510 nm). Finalmente un total de 10 campos (100 células por campo) fueron observados en cada muestra. Células que mostraban integridad de membrana fueron registradas como viables (fluorescencia verde). Las células que no mostraban integridad de membrana fueron registradas como no viables (fluorescencia roja).

V. Análisis estadístico.

Recolecta de esperma de la trucha de San Pedro Mártir. Las diferencias entre el porcentaje de movilidad y el número de espermatozoides, de cada uno de los organismos que liberaron esperma en condiciones controladas de laboratorio, fueron evaluadas usando un ANOVA de una vía.

Inactivación y activación del esperma. Para determinar el efecto de las diferentes SE sobre el porcentaje de movilidad se utilizó una ANOVA de dos vías con la siguiente combinación de variables independientes: SE a diferentes presiones osmóticas, diferentes valores de pH con diferentes soluciones amortiguadoras, y las diferentes SE escogidas con diferentes SA evaluadas. El efecto de las diferentes osmolalidades de NaCl o KCl sobre el porcentaje de movilidad fue evaluado con un análisis de varianza de una vía.

Conservación a corto plazo del esperma. Las diferentes tasas de suspensión y su efecto en el porcentaje de movilidad e integridad de membrana con respecto al tiempo de almacenamiento fueron calculados con un análisis de varianza de dos vías. Un análisis de regresión lineal fue utilizado para determinar la correlación entre el porcentaje de movilidad y la integridad de membrana. El coeficiente de determinación (R^2) fue utilizado para analizar la relación entre éstas dos variables.

Antes de los análisis realizados, los porcentajes de movilidad fueron transformados a la raíz cuadrada del arcoseno. Diferencias específicas entre los grupos de tratamientos fueron identificadas por una prueba de Tukey a un $\alpha = 0.05$. El análisis fue realizado con el programa estadístico SAS para Windows® (SAS, Insititute, Cary, North Carolina, USA).

RESULTADOS

Muestras de esperma de O. mykiss nelsoni recolectadas en campo. Durante la recolecta de esperma de la trucha de San Pedro Mártir, se obtuvo un volumen total de 400 μ L de esperma con un porcentaje de movilidad del 80%.

Inactivación del esperma con diferentes soluciones extensoras. El porcentaje de movilidad del esperma de *O. mykiss nelsoni* obtenido en cada una de las SE a las diferentes osmolalidades utilizadas fue significativamente diferente ($F_{1,56} = 560.04$, $P < 0.0001$) (Fig. 3.1). La inactivación del esperma fue observada cuando los espermatozoides fueron suspendidos en presiones osmóticas de 469 hasta 941 mOsmol/kg. Además, cabe destacar que altos porcentajes de movilidad (87.5-100%) fueron observados en los espermatozoides suspendidos en osmolalidades de 95 y 191 mOsmol/kg (principalmente en la SE4 y la SE2).

Después, los espermatozoides mantenidos en estas condiciones fueron reactivados con agua corriente y su movilidad fue significativamente diferente ($F_{1,56} = 112.81$, $P < 0.0001$) en las distintas SE y osmolalidades (Fig. 3.1). El porcentaje más alto de movilidad (25%) con respecto al control, fue observado en los espermatozoides mantenidos en la SE2 a 469 mOsmol/kg, pero posterior a ésta osmolalidad, la movilidad de los espermatozoides fue nula en todas las SE evaluadas. Por tanto, la SE2 a una osmolalidad de 469 mOsmol/kg podría ser una SE viable para los espermatozoides de la TSPM.

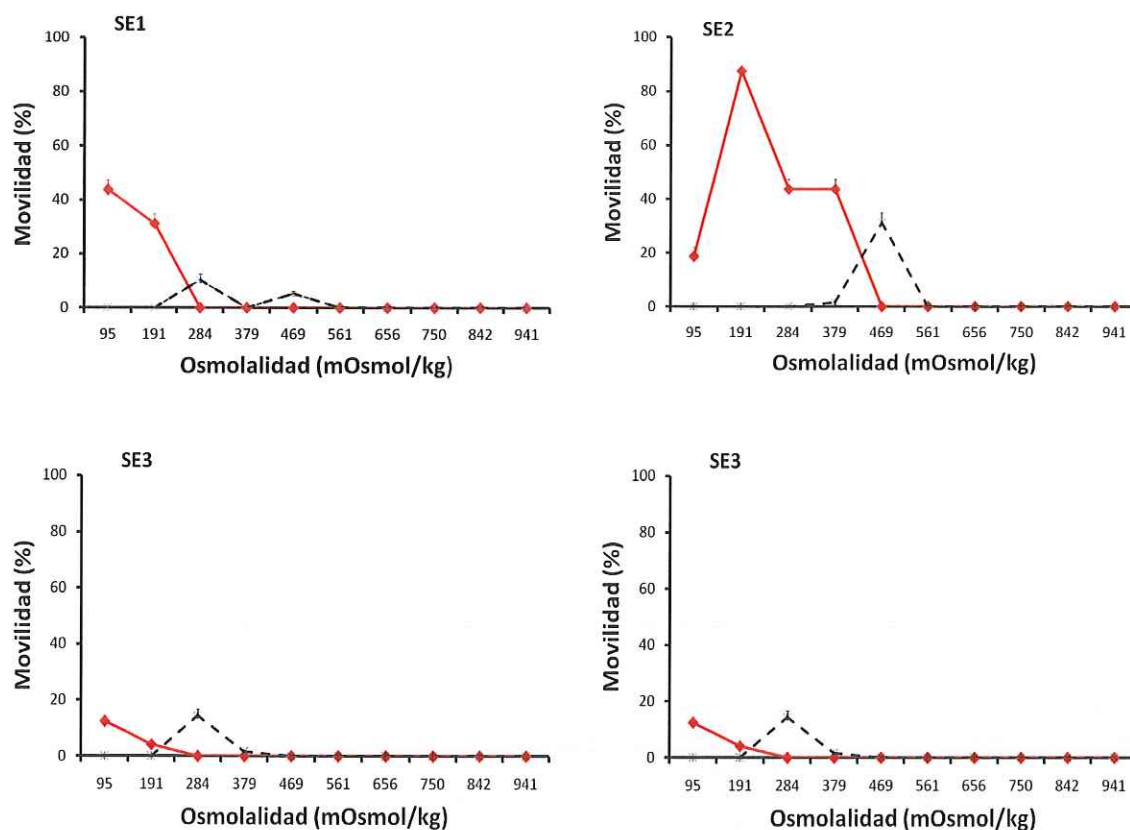


Figura 3.1. Porcentaje promedio ($\pm$ Error estándar) de movilidad (línea continua de color rojo) del esperma de *O. mykiss nelsoni*, suspendido en las diferentes soluciones extensoras (SE1, SE2, SE3, SE4) a las diferentes osmolalidades, y posteriormente activado con agua corriente (línea punteada). La muestra control presentó un 80% de movilidad.

Inactivación del esperma en soluciones con diferente pH. Los espermatozoides de *O. mykiss nelsoni* suspendidos en las diferentes soluciones de pH ajustadas con HCl-NaOH o Tris-Hepes presentaron diferencias significativas en el porcentaje de movilidad ($F_{2,25} = 416.18$, $P < 0.0001$). La inactivación de los espermatozoides fue obtenida sólo cuando éstos fueron mantenidos en un pH de

5 o 7 ajustados con Tris-Hepes. Los máximos porcentajes de movilidad con respecto al control fueron registrados en un pH de 8 ajustado con HCl-NaOH (81.25%) o Tris-Hepes (60.42%) (Fig. 3.2).

Después de reactivar las muestras de espermatozoides con agua corriente, la movilidad de los espermatozoides fue significativamente diferente ($F_{6,61} = 137.81$, $P < 0.0001$) en los distintos pH evaluados (Fig. 3.2). Sin embargo, el hecho de utilizar HCl-NaOH o Tris-Hepes como amortiguador para ajustar los valores de pH no fue diferente ($F_{6,61} = 0.98$, $P < 0.3325$). Aunque cabe destacar que el mejor porcentaje de movilidad después de ser reactivados (27.08%) con respecto al control, fue obtenido cuando los espermatozoides fueron suspendidos en una solución con un pH = 7 ajustado con Tris-Hepes. Por tanto, esta solución fue seleccionada como una opción para inactivar los espermatozoides de *O. mykiss nelsoni*.

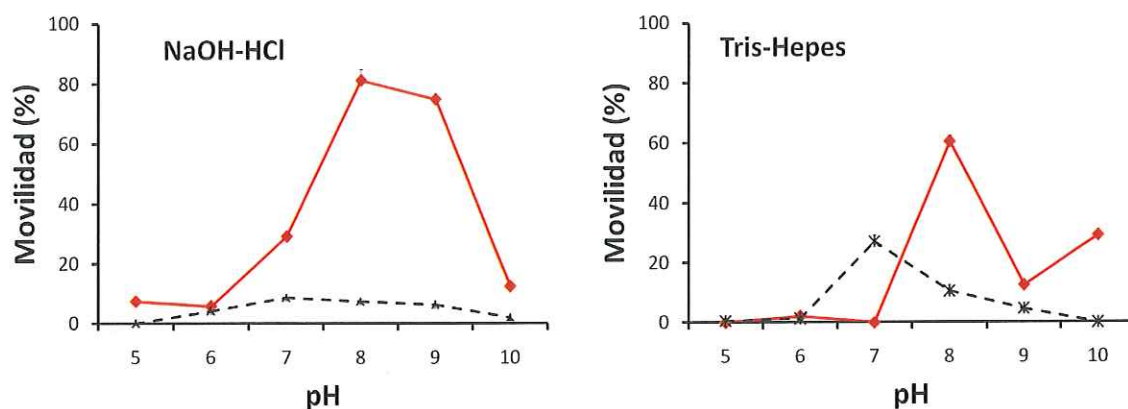


Figura 3.2. Porcentaje promedio ($\pm$ Error estándar) de movilidad del espermatozoide de la trucha de San Pedro Mártir (línea continua de color rojo), registrado en los diferentes valores de pH ajustados con HCl-NaOH (gráfica de la izquierda), o con Tris-Hepes (gráfica de la derecha), y posteriormente activado con agua corriente (línea punteada). La muestra control presentó un 80% de movilidad.

Inactivación del espermatozoide en KCl o NaCl. La movilidad de los espermatozoides de *O. mykiss nelsoni* no fue igual en las diferentes osmolalidades evaluadas de NaCl ($F_{2,51} = 28.83$, $P < 0.0001$) o KCl ($F_{2,30} = 274.54$, $P < 0.0001$).

Los espermatozoides suspendidos en NaCl registraron una actividad ascendente conforme incrementaban la osmolalidad de ésta sal. La movilidad máxima (100%) con respecto al control, fue observada cuando los espermatozoides se suspendieron en una solución de NaCl a 143 mOsmol/kg, y la inactivación de los espermatozoides no ocurrió en ninguna de las osmolalidades evaluadas (Fig. 3.3). Sin embargo, cuando los espermatozoides fueron colocados en KCl a las

diferentes osmolalidades, la inactividad de los espermatozoides fue observada en 75, 132, 148 y 188 mOsmol/kg (Fig. 3.3).

Después, cuando las muestras de espermatozoides fueron activadas con agua corriente el porcentaje de movilidad obtenido fue significativamente diferente tanto en NaCl ($F_{2,51} = 74.82$, $P < 0.0001$) como KCl ($F_{2,30} = 96.61$, $P < 0.0001$) a las diferentes osmolalidades. La actividad máxima de los espermatozoides fue registrada en 71 mOsmol/kg de NaCl (5.42%) y 132 mOsmol/kg de KCl (27.08%). En virtud de lo anterior, el NaCl a las diferentes concentraciones probadas podría no ser un medio apropiado para inactivar el espermatozoide de *O. mykiss nelsoni*, pero KCl a una concentración de 132 mOsmol/kg podría ser una alternativa.

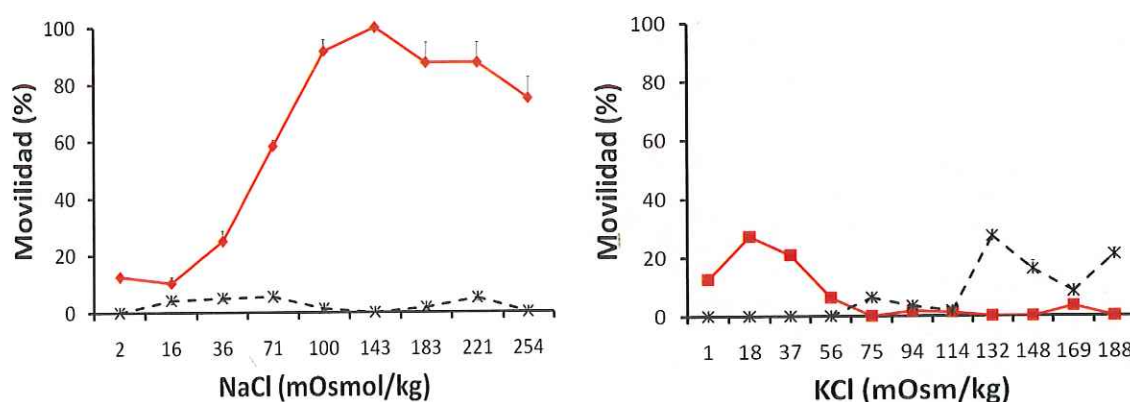


Figura 3.3. Porcentaje promedio ($\pm$ Error estándar) de movilidad (línea continua de color rojo) del espermatozoide de la trucha de San Pedro Mártir en diferentes presiones osmóticas de NaCl (izquierda) o KCl (derecha), y posteriormente activado con agua corriente (línea punteada). La muestra control presentó un 80% de movilidad.

Medios de activación evaluados en el esperma de la trucha de San Pedro Mártir.

Se detectaron diferencias significativas ($F_{1.65} = 191.65$, $P < 0.0001$) en el porcentaje de movilidad de los espermatozoides mantenidos en las diferentes SE previamente seleccionadas (SE2 a 469 mOsmol/kg, agua destilada ajustada a un pH de 7 con Tris-Hepes, KCl a una concentración de 132 mOsmol/kg, SE de Erdhal y Graham), y posteriormente activados con las diferentes SA evaluadas (Fig. 3.4).

Los porcentajes más altos de movilidad en las diferentes SE (SE2-43.75%; pH 7-29.17%, KCl 132 mOsmol/kg-33.33%; SE-EG-91.67%) fueron obtenidos con DIA 532 como SA, y los más bajos, en las distintas osmolalidades de NaCl (143, 183, 221 mOsmol/kg) y en tres de las SE (SE2- 2.08%; KCl 132 mOsmol/kg-0%; SE-EG-37.50%) (Fig. 3.4). La SE-EG y la solución activadora DIA 532, se consideraron como óptimas para la conservación a corto plazo de los espermatozoides de la TSPM.

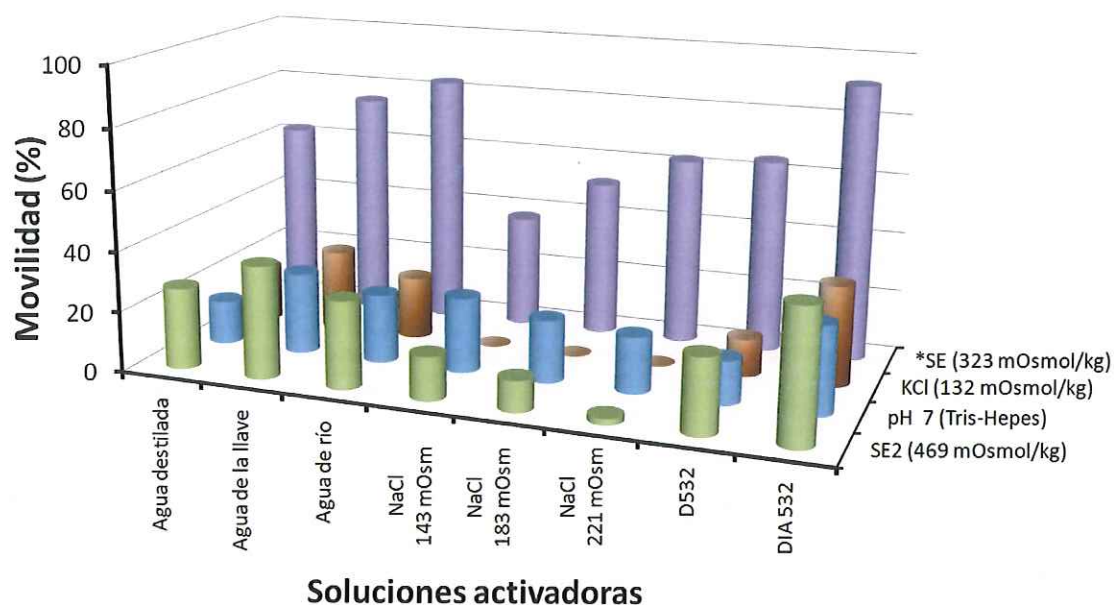


Figura 3.4. Porcentaje de movilidad (promedio $\pm$ Error estándar) del esperma de la trucha de San Pedro Mártir registrado en diferentes SE previamente escogidas, y activado con diferentes soluciones activadoras. La muestra control presentó un 80% de movilidad. *SE = solución extender que fue incorporada (Erdhal y Graham, 1980).

Muestras de esperma de O. mykiss nelsoni recolectadas en el laboratorio. Las muestras de esperma obtenidas de los ocho machos presentaron diferencias significativas tanto en la movilidad ($F_{2,66} = 9.70$, $P < 0.0001$) como el número de espermatozoides ($F_{2,66} = 406.64$, $P < 0.0001$). El volumen de esperma osciló entre 90 y 355 μL por organismo con un porcentaje promedio de movilidad del 87% y una cantidad de espermatozoides de $800\text{-}1200 \times 10^6$ cel/mL. El esperma de todos los organismos fue agrupado en una sola muestra y se obtuvo un volumen total de 1805 μL con una cantidad promedio de espermatozoides de 1005×10^6 cel/mL. Estos espermatozoides fueron utilizados para los experimentos de conservación a corto plazo.

Conservación a corto plazo del esperma de la trucha de San Pedro Mártir en diferentes tasas (esperma:SE). Los espermatozoides de la TSPM presentaron diferencias significativas en el porcentaje de movilidad ($F_{1,59} = 566.12$, $P < 0.0001$) e integridad de membrana ($F_{1,59} = 215.99$, $P < 0.0001$) cuando fueron mantenidos en las diferentes diluciones (1:3, 1:6, 1:9) con la SE-EG durante los nueve días que permanecieron almacenados a 4°C.

El mayor porcentaje de movilidad (>80% por siete días) e integridad de membrana ($\geq 80\%$ por dos días) registrado, fue obtenido cuando los espermatozoides se mantuvieron en una relación 1:9 con la SE. La muestra control y los espermatozoides que permanecieron en una relación 1:3 y 1:6 mantuvieron un porcentaje de movilidad $\geq 80\%$ durante 2-4 días y una integridad de membrana $\geq 80\%$, únicamente al principio del experimento (Fig. 3.5 y 3.6). Después, la movilidad e integridad de membrana de los espermatozoides en la muestra control y los mantenidos en las diferentes tasas de suspensión, decayeron conforme transcurrió el tiempo.

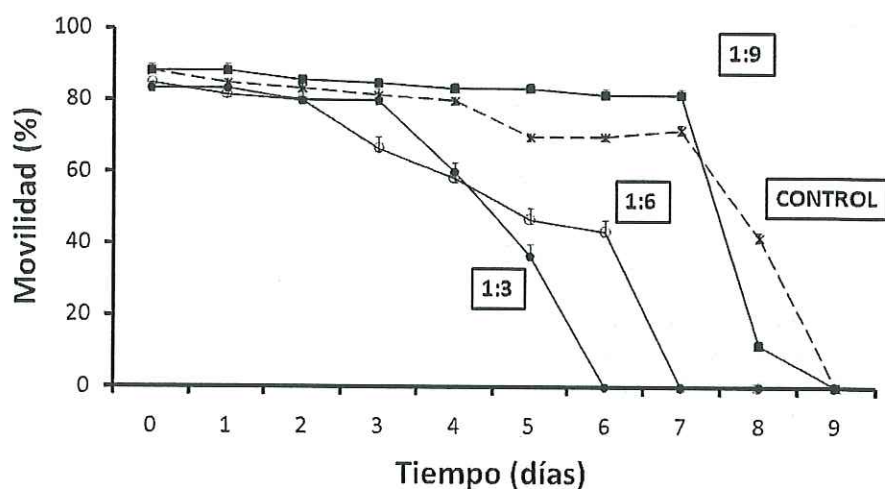


Figura 3.5. Porcentaje de movilidad (promedio $\pm$ Error estándar) de los espermatozoides almacenados en las diferentes diluciones a 4°C por nueve días.

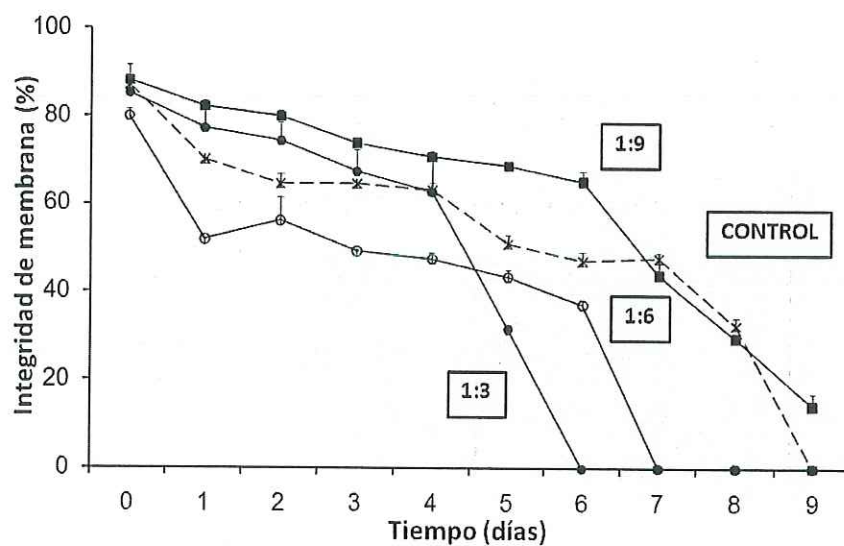


Figura 3.6 Porcentaje de integridad de membrana (promedio $\pm$ Error estándar) de los espermatozoides almacenados en las diferentes diluciones a 4°C por nueve días.

El análisis de regresión indica que hubo una relación significativa ($P < 0.0001$) entre el porcentaje de movilidad e integridad de membrana del control y suspensiones 1:3, 1:6 y 1:9 (Fig. 3.7).

La muestra control y los espermatozoides que fueron mantenidos en una relación 1:3, y 1:6 con la SE presentaron una correlación del porcentaje de movilidad e integridad de membrana >90% (Fig. 3.7). Sin embargo, esta correlación disminuyó (78.5%) cuando fueron suspendidos en una dilución 1:9.

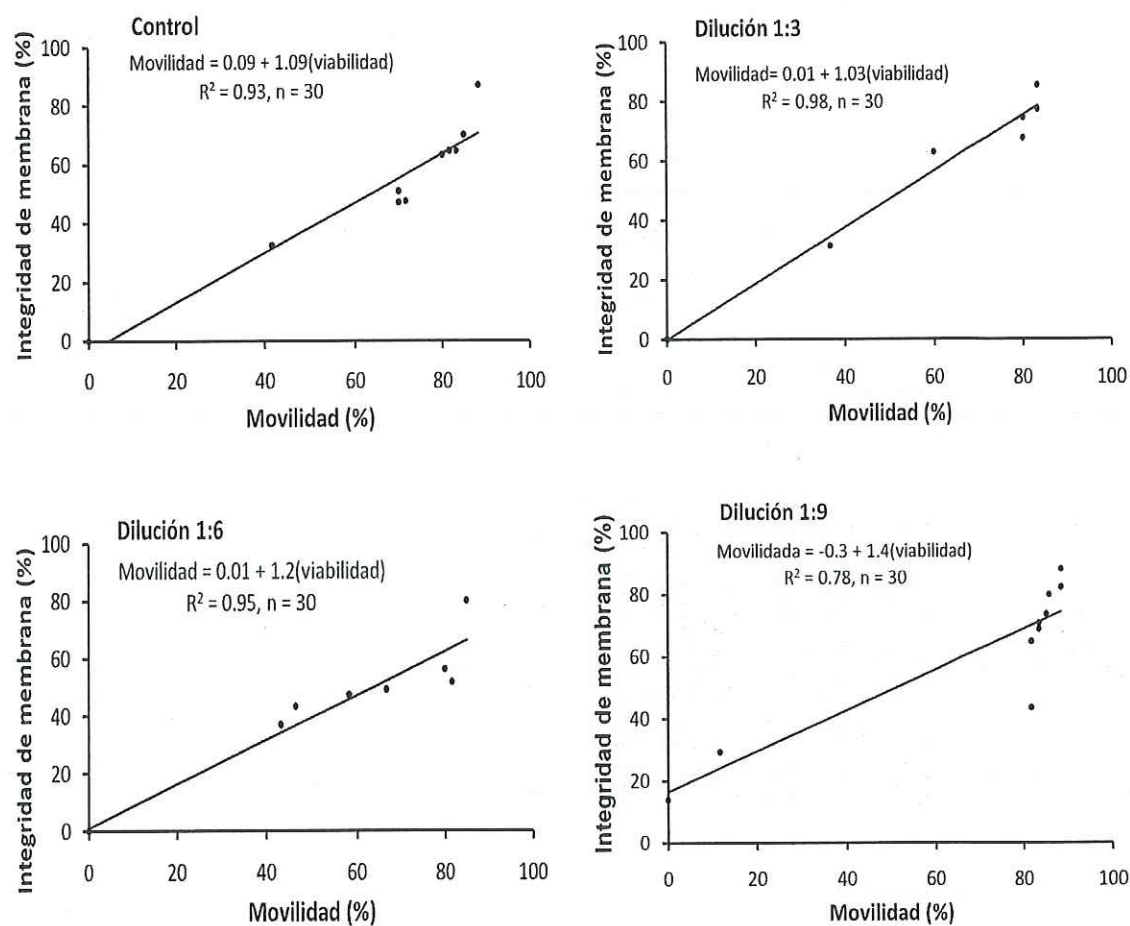


Figura 3.7. Regresión lineal entre el porcentaje de movilidad e integridad de membrana de los espermatozoides mantenidos por nueve días a 4°C, en las diferentes diluciones evaluadas (1:3, 1:6 y 1:9).

DISCUSIONES

Efecto de la concentración iónica en la inactivación del esperma de la trucha de San Pedro Mártir. En el fluido seminal del tracto genital de los machos de peces de agua dulce, los espermatozoides se encuentran inmóviles (Tabares et al., 2005), lo que sugiere que la composición iónica de este líquido los inmoviliza y los mantiene viables. Sin embargo, cada especie presenta características específicas en cuanto a los factores que inactivan o activan su movilidad espermática, su duración y el patrón de actividad flagelar, lo que hace difícil transferir protocolos de manejo de una especie a otra de forma exitosa (Valdebenito et al., 2009). La mayoría de las soluciones extensoras (SE) evaluadas en este trabajo resultaron eficaces para el esperma de otras especies (Scott y Baynes, 1980; Cosson et al., 1999; Lahnsteiner, 2000; Bozkurt y Seğer, 2005), aunque no para los espermatozoides de la trucha de San Pedro Mártir (TSPM).

En este trabajo, como una alternativa para propagar esta subespecie de trucha en condiciones de cautiverio, se desarrolló un protocolo para mantener el esperma en un refrigerador convencional sin alterar su habilidad de fertilización, para lo cual es fundamental disminuir la actividad metabólica de los espermatozoides en una SE. De acuerdo a Scott y Baynes (1980), el medio más adecuado para esta finalidad es una SE de formulación simple. Sin embargo, Morisawa y Suzuki (1980) y Wayman et al. (1996) coinciden en indicar que una

SE con una composición compleja y similar a la del plasma seminal del organismo objetivo podría ser una mejor opción.

En el presente estudio se determinó que la formulación compleja de la SE-EG fue la más adecuada para la inactivación de los espermatozoides de la TSPM. Esta solución fisiológica contiene los iones principales (potasio, sodio, calcio, magnesio, fósforo y glucosa) registrados en el plasma seminal de *O. mykiss* (Glogowski et al., 2000). Al igual su pH (7.4) y osmolalidad (333 mOsmol/kg), los cuales, son cercanos a los determinados por Glogowski et al. (2000) y Bozkurt et al. (2006) para la misma especie. Por consiguiente, esta SE debería presentar el ambiente iónico adecuado para mantener inactivos a los espermatozoides de la TSPM sin afectar su viabilidad.

Estudios previos en el fluido seminal de peces de agua dulce (Scott y Baynes, 1980), sugieren que el sodio (Na^+) y el potasio (K^+) son dos de los principales componentes iónicos. En los espermatozoides de *O. mykiss*, los trabajos de Alavi y Cosson (2006) reportan que el K^+ tiene la función de controlar la movilidad de los espermatozoides de estos peces. A lo anterior, Morisawa et al. (1983a) y Billard et al. (1987) sugieren que altas concentraciones intracelulares de K^+ (20-40 mM) suprimen totalmente la movilidad del espermatozoide de la trucha arcoíris. Lo reportado por estos autores, coincide con la baja o nula movilidad observada en los espermatozoides de *O. mykiss nelsoni*, cuando estos fueron suspendidos en presiones osmóticas de 75-148 mOsmol/kg (40-80 mM de KCl).

Por tanto, podemos sugerir que las SE con altas concentraciones de K^+ podrían ser eficientes para inactivar la movilidad de los espermatozoides de la TSPM.

En contraste al efecto inhibitor del potasio, una vez que los espermatozoides son liberados al medio externo, la presencia de altas concentraciones de sodio (Na^+) restablecen su movilidad (Baynes et al., 1981), situación que es coincidente con la activación de la movilidad de los espermatozoides de la TSPM observada en este trabajo a diferentes osmolalidades de NaCl. Estudios previos en la trucha arcoíris por Billard et al. (1987) y Gatti et al. (1990) reportaron resultados similares a los obtenidos en este estudio. Sin embargo, en este trabajo hubo ausencia de movilidad después de la reactivación del esperma con agua corriente.

Con excepción de la SE2, todas las SE evaluadas en este trabajo contenían K^+ , Ca^{2+} (excepto SE4), altas concentraciones de Cl_2^- y Na^+ (excepto SE-EG) e iones divalentes como Mg_2^+ , el cual se encontraba como $MgCl_2$ (SE1, SE-EG) o como $MgSO_4$ (SE3). Aunque las concentraciones de Na^+ y Mg^{2+} fueron muy diferentes, la relación molar $Na_2HPO_4:MgCl_2 \cdot 6H_2O$ de la SE-EG fue similar (1.85 mM:1.08 mM respectivamente). Además, a diferencia de las otras SE, la SE-EG contenía glucosa y ácido cítrico, lo que pudo ser relevante para la calidad de los espermatozoides de la TSPM mantenidos en temperaturas bajas.

Marshall et al. (1993) sugieren que en el plasma seminal de peces salmónidos, bajas concentraciones de Na^+ y altos contenidos de K^+ mantienen inactivos a los

espermatozoides hasta que son liberados al exterior y una vez que la relación Na^+/K^+ cambia ($\geq 16/1$) la movilidad espermática es activada. En este trabajo concentraciones mayores del ión K^+ en relación al Na^+ sólo fueron encontradas en la SE-EG, lo cual pudo haber contribuido a la efectiva inactivación de los espermatozoides de la TSPM. Resultados similares fueron reportado por Stoss et al. (1977), Baynes et al. (1981) y Christen et al. (1987) en *O. mykiss*.

Por otra parte, algunos monosacáridos como la glucosa han sido identificados en el plasma seminal de peces y aunque su función no es clara, se les relaciona con la alta demanda de energía de las testa durante la espermatogénesis o durante la síntesis de lípidos de los espermatozoides (Soengas et al., 1993). La glucosa también es conocida por contribuir en el mantenimiento del equilibrio osmótico (Ramos, 1986) y protección de la membrana plasmática de los espermatozoides de peces mantenidos en temperaturas ultra-bajas (-196°C) (Cabrita et al., 2009). Incluso los trabajos de Lin y Dabrowski (1996) en espermas del lucio (*Esox masquinongy*) sugieren que la glucosa es parte importante durante el proceso de activación de la movilidad espermática de estos peces.

En cuanto el ácido cítrico, este es conocido por su efecto anti-oxidativo (Dabrowski y Ciereszko, 1996) y se cree que podría contribuir a la osmolalidad del plasma seminal (Piirone, 1994). Además, debido a su habilidad para atrapar los iones de calcio y magnesio se ha sugerido que podría ser una parte

importante del mecanismo responsable de mantener a los espermatozoides en un estado inactivo (Baynes et al., 1981).

Los resultados obtenidos en este estudio podrían indicar que una vez que los espermatozoides de la TSPM son liberados al medio externo, el Na^+ , el Mg^{2+} (bajas concentraciones $\sim 1\text{-}2\text{ mM}$) y la glucosa podrían contribuir en la recuperación del potencial energético usado para la movilidad espermática de estos peces. En cuanto al K^+ y el ácido cítrico estos pudieron ser efectivos durante el mantenimiento inactivo de los espermatozoides de esta trucha nativa. Sin embargo, futuros estudios son necesarios para determinar el efecto de la glucosa y el ácido cítrico en la movilidad espermática de estos peces, así como también determinar el efecto de la relación $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ en este proceso.

Los estudios realizados en la trucha arcoíris sugieren que una SE compuesta de glucosa como fuente de energía y Na^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} como iones antagónicos del efecto inhibitorio del potasio en la movilidad espermática, es ideal para la conservación a corto plazo en bajas temperaturas de los espermatozoides de estos peces (Billard y Cosson, 1992; Cosson et al., 1999; Hatipoğlu y Akçay, 2010). Los resultados obtenidos en este trabajo apoyan lo establecido por los autores citados anteriormente.

Efecto de la osmolalidad en la inactivación del espermatozoide de la trucha de San Pedro Mártir. El efecto de la concentración iónica en una SE es difícil de separar de la osmolalidad y ambos son considerados factores relevantes en la inhibición

de la movilidad de los espermatozoides (Cosson et al., 2000). En este estudio, los espermatozoides de la TSPM que fueron suspendidos en las diferentes SE evaluadas (excepto la SE2), registraron una supresión de la movilidad en osmolalidades >284 mOsmol/kg y su actividad fue favorecida en condiciones hiposmóticas (95-191 mOsmol/kg).

Scott y Baynes (1980), sugieren que la activación de los espermatozoides de peces de agua dulce generalmente ocurre en condiciones hiposmóticas, estos autores reportan períodos más largos de activación entre 100 y 200 mOsmol/kg y una ausencia de movilidad en osmolalidades extremas de 0 ó >300 mOsmol/kg (Cosson et al., 1999). Lo anterior, coincide con los resultados obtenidos en este trabajo, a excepción de los espermatozoides suspendidos en la SE2, donde el intervalo de activación de la movilidad fue superior (191-379 mOsmol/kg) al referido para peces de agua dulce por Cosson et al. (*op. cit*).

Estudios previos en peces de agua dulce por Cosson et al., *op. cit* y Krasznai et al. (2003a) sugieren que cuando los espermatozoides son suspendidos en osmolalidades extremas éstos pueden presentar daños estructurales a nivel de membrana, aunque reversibles una vez que la osmolalidad es corregida. Pero cuando el choque es prolongado (condiciones hiperosmóticas) se puede modificar la permeabilidad de la membrana y la organización de la bicapa lipídica, lo que ocasiona ruptura de las mismas y la muerte celular (Krasznai et al., 2000).

Acorde a lo anterior, los espermatozoides de la TSPM suspendidos entre 191-469 mOsmol/kg y después reactivados con agua corriente registraron una baja o nula movilidad. Esta situación pudo ser ocasionada por daños a nivel de membrana, lo que evitó la completa reestructuración de estos gametos. Los espermatozoides suspendidos en presiones osmóticas >469 mOsmol/kg no presentaron movilidad después de ser reactivados con agua corriente, por lo que acorde a Krasznai et al. (2000) los daños a nivel de membrana fueron irreversibles en estas condiciones, lo que ocasionó la muerte de estos espermatozoides. En el caso de la SE-EG, la osmolalidad de 333 mOsmol/kg mantuvo a los espermatozoides de la TSPM inactivos sin alterar considerablemente su calidad, lo que sugiere que más que la osmolalidad algún componente iónico podría estar involucrado en la activación de la movilidad espermática de esta trucha.

Los efectos de la osmolalidad en la movilidad espermática de peces ciprínidos y en teleósteos marinos y de agua dulce, han sido enfatizados en diversos estudios (Cosson et al., 1999; Darszon et al., 1999; Krasznai et al., 2003a, 2003b). En este trabajo la osmolalidad parece no ser un factor determinante en la movilidad espermática de la TSPM, la cual parece estar más influenciada por iones como el K^+ , Na^+ y Mg^{2+} . Lo anterior coincide con Morisawa et al. (1983a) y Alavi y Cosson (2005) quienes sugieren que en peces salmónidos la movilidad espermática parece ser influenciada a nivel iónico.

Los trabajos realizados por Billard y Cosson (1992) mencionan que aunque las altas presiones osmóticas inhiben la movilidad espermática en salmónidos, la presión osmótica del plasma seminal de estos peces (aproximadamente 300 mOsmol/kg) no es lo suficientemente alta como para explicar el por qué de la inhibición de la movilidad en el esperma. Estas aseveraciones permiten pensar en la acción de uno o varios factores encargados de llevar a cabo la señalización para el inicio de la movilidad espermática en estos peces

Si se toman en cuenta los conocimientos actuales sobre las señales osmóticas en la activación de los espermatozoides de peces, la primera señal percibida por la membrana podría ser osmótica (Alavi y Cosson, 2006). Este proceso implica que el flujo de agua en cualquier dirección provoca la distorsión local de la membrana plasmática de los espermatozoides y con esto los canales de la membrana podrían responder a esta señal mecánica mediante el aumento de la permeabilidad local permitiendo que iones como Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} o K^+ se desplacen dentro o fuera de la membrana a través de estos canales (Yang y Sachs, 1993). Esto podría provocar un efecto autocatalítico a lo largo de la membrana flagelar y un cambio en la concentración iónica lo que ocasionaría la rápida activación de la movilidad espermática de estos peces (Alavi y Cosson, 2006).

En la TSPM el mecanismo de activación propuesto en peces salmónidos por Alavi y Cosson (*op. cit.*) podría ser una explicación a lo encontrado en este estudio. Los espermatozoides de la TSPM podrían responder primeramente a la

señal osmótica activando los diferentes canales iónicos, ocasionando un cambio en la concentración iónica y un desencadenamiento de la movilidad espermática de estos peces. Sin embargo, estudios puntuales de osmolalidad en los espermatozoides de la TSPM requieren ser realizados a fin de corroborar lo antes mencionado.

Efecto del pH en la inactivación del esperma de la trucha de San Pedro Mártir. El pH extracelular (pHe) es otro de los factores reconocidos por ser importante en la activación o inactivación de la movilidad espermática en peces dulceacuícolas (Márian et al., 1997). En este trabajo, la movilidad de los espermatozoides de la TSPM fue estimulada cuando éstos fueron colocados en una solución de agua destilada con un pH ≥ 8 y suprimida en valores < 7 . Sin embargo, después de que estos espermatozoides fueron reactivados con agua corriente el porcentaje de movilidad observado fue bajo.

Los trabajos realizados en *O. mykiss* reportan que una SE con un pH de 7 suprime la movilidad espermática (Ingermann et al., 2008), aumenta su actividad en un pH de 8.0 y se estabiliza en un intervalo de 8.5 a 9.5 (Darszon et al., 1999; Alavi y Cosson, 2005). Incluso, un pH de 8.5 ha sido establecido como óptimo para el mantenimiento de los espermatozoides de esta trucha (Woolsey et al., 2006). Los resultados obtenidos en los espermatozoides de la TSPM suspendidos en los diferentes valores de pH presentaron un patrón similar a lo reportado por Ingermann et al. (*op. cit.*) en *O. mykiss*.

Los estudios realizados en salmónidos concernientes al papel que tiene el pH en la movilidad espermática no han sido del todo consistentes (Morisawa y Morisawa, 1986, 1988; Hamamah y Gatti, 1998; Márián et al., 1997; Cosson et al., 1999; Ingermann et al., 2008). A la fecha los trabajos de Woolsey y Ingermann (2003) sugieren que el pHi está directamente relacionado con el pHe y que la previa incubación de los espermatozoides en este pHe podría controlar en parte la movilidad espermática a través de una influencia en la actividad hidrolítica ATP por la dinein-ATPasa. Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que la acción del pHe sobre el potencial de movilidad en los espermatozoides de la TSPM posiblemente podría tener una contribución sobre la movilidad espermática. Sin embargo, futuros estudios son necesarios para determinar su contribución en el proceso de activación espermática de *O. mykiss nelsoni*.

Por otro, lado se ha sugerido que el tipo de amortiguador utilizado para ajustar el valor de pH en sistemas bioquímicos, es un factor que podría también ser relevante en la calidad espermática (Stoll y Blanchard, 1990). En este trabajo nuestros resultados sugieren utilizar la combinación HCl-NaOH o Tris-Hepes indistintamente para ajustar el pH.

Estudios realizados en el salmón del Atlántico (*Salmo salar*) y el bacalao (*Gadus morhua*) sugieren que los amortiguadores constituidos de bicarbonato (KHCO_3) son mejores que los basados en tris o fosfato para la movilidad y capacidad de fertilización de los espermatozoides de estas especies (Mounib, 1978). Lo

anterior podría ser debido a la baja toxicidad de estos amortiguadores y a la habilidad del espermatozoide para fijar CO₂ (Mounib et al., 1968). Incluso se ha recomendado que para sistemas biológicos se utilice como sistema de amortiguación el Hepes o una combinación Hepes/Bicina en lugar de tris o HCl, debido a la posible toxicidad de éstos últimos (Cabrita et al., 2009).

En estudios de bioquímica y biología molecular el Hepes, tris, NaOH y HCl, son usados ampliamente como amortiguadores del pH (Jenkisn y Woods III, 2002; Baicu y Taylor, 2002). Sin embargo, es recomendable utilizar el Hepes debido a su eficacia para mantener el pH fisiológico a bajas temperaturas (Baicu y Taylor, *op. cit.*) y el tris debido a que su rango de pH (7-9.2) coincide con el pH fisiológico de muchos organismos (El-Harakany et al., 1984). Por tanto y acorde a lo descrito anteriormente, sugerimos que una combinación Tris-Hepes podría ser una mejor opción para ajustar el pH cuando se trabaja con sistemas biológicos como los espermatozoides. Esta opción permite proteger la viabilidad celular del esperma de estos peces durante el mantenimiento a bajas temperaturas.

Soluciones activadoras. Como ya fue mencionado, cambios en la concentración iónica o en la presión osmótica pueden ser importantes en la activación de la movilidad espermática en peces de agua dulce. En este estudio soluciones hiposmóticas como el agua destilada, agua corriente, agua de río y DIA 532 fueron mejores para reactivar la movilidad de los espermatozoides de la TSPM

que aquellas soluciones que presentaron una osmolalidad >87.39 mOsmol/kg (NaCl y D532).

Los trabajos realizados por Morisawa et al. (1983a) sugieren que durante la espermiación de peces salmónidos la actividad espermática es favorecida por una disminución en la concentración de potasio y que en ciprínidos (Morisawa et al., 1983b) una osmolalidad inferior a la del plasma seminal (300 mOsmol/kg) es fundamental para este proceso. En adición Takai y Morisawa (1995) sugieren que un cambio en la osmolalidad externa en los espermatozoides de teleósteos de agua dulce se convierte en un cambio en la concentración intracelular de K^+ , y este cambio afecta el axonema flagelar como una señal para iniciar o terminar la movilidad del esperma.

Los resultados obtenidos en este estudio fueron similares a lo encontrado en ciprínidos, lo que sugiere que en la TSPM la osmolalidad más que la concentración iónica podría tener un papel fundamental en la activación de los espermatozoides. Sin embargo, el intervalo sugerido para esta trucha nativa (0 a 87.39 mOsmol/kg) fue inferior a lo reportado para ciprínidos. Por otro lado, futuros estudios podrían ser realizados para determinar si lo sugerido por Takai y Morisawa (1995) en peces teleósteos ocurre también durante el proceso de activación de la movilidad espermática en la TSPM.

En condiciones de laboratorio, generalmente la activación de la movilidad en peces de agua dulce es llevada a cabo por agua corriente (Figiel et al., 1996), o

agua destilada (Deegraf y Berlinsky, 2004). Sin embargo, en peces salmónidos, el pez espátula (*Polyodon spathula*) y el esturión (*Scaphirhynchus platyrhynchus*), se ha reportado que la movilidad espermática dura más y el daño es menor cuando se utiliza una SA compuesta con algunas sales ((Billard, 1978; Scott y Baynes, 1980; Cosson et al., 2000). En este estudio las SA compuestas de NaCl a las diferentes concentraciones utilizadas no favorecieron la activación de la movilidad del espermatozoide de la TSPM.

Con relación a lo anterior, Basavaraja y Hegde (2005) registraron un incremento en la duración de la movilidad del espermatozoide de peces ciprínidos (*Tor khudree*) cuando se utilizó una SA compuesta de NaCl 0.5% y urea 0.4%, más que cuando se utilizó NaCl 0.3% o agua desclorinada o glucosa 1%. En este trabajo, una combinación del NaCl con glicina y tris (DIA 532) contribuyó a mejorar la activación del espermatozoide de esta trucha, lo que respalda lo sugerido por Basavaraja y Hegde (*op. cit.*). Posiblemente las características osmoprotectoras de la glicina y amortiguadoras del Tris como reporta Kunin et al. (1992) contribuyeron a mejorar la supervivencia de los espermatozoides de la TSPM. Finalmente, los resultados obtenidos sugieren que la activación de la movilidad del espermatozoide de *O. mykiss nelsoni* podría depender de la osmolalidad de la SA y un incremento en el porcentaje de movilidad podría ser obtenidos por la adición de otros compuestos como glicina y tris.

Conservación a corto plazo. La conservación a corto plazo de esperma de peces ha sido practicada en varias especies de salmónidos (Scott y Baynes, 1980; Billard, 1981; Jensen y Alderdice, 1984; McNiven et al., 1993) por lo que una gran variedad de técnicas han sido desarrolladas (Cabrita et al., 2009). Sin embargo, estas técnicas han tenido que ser estandarizados para cada especie y aunque la conservación del esperma de peces ha sido practicada durante muchos años, no existe información para *O. mykiss nelsoni*. En este trabajo se desarrolló un protocolo para mantener a los espermatozoides de la TSPM en bajas temperaturas por corto tiempo (días).

Carpentier y Billard (1978) y Scott y Baynes (1980), sugieren que los espermatozoides de salmónidos pueden ser mantenidos por varios días entre 1-4°C. No obstante, el éxito de esta conservación depende de factores como la temperatura, volumen espermático y un ambiente gaseoso (Büyükhatoğlu y Holtz, 1984; Jensen y Alderdice, 1984; Rana, 1995; Hatipoğlu y Akçay, 2008). En este trabajo, los espermatozoides de la TSPM fueron mantenidos a 4°C en diferentes suspensiones (*esperma:SE*) y un porcentaje de movilidad $\geq 80\%$ por siete días y por dos días para la integridad de membrana fue registrado cuando estos fueron suspendidos en una dilución 1:9 con la SE-EG.

Trabajos con esperma de *Prochilodus lineatus* (Marques y Pereira, 2004), *C. carpio* (Bozkurt y Seçer, 2005), *Ctenopharyngodon idella* (Bozkurt et al., 2009) y *Salmo trutta abanticus* (Hatipoğlu y Akçay, 2010) detectaron bajos porcentajes de movilidad después de que éstos fueron mantenidos a 4°C (después de 20 hr-

30%, después de tres días-18%, después de 8 hr-56%, después de dos días-53%). En el salmón de río (*Brycon orbignyanus*) un porcentaje de movilidad >37% fue reportado después de que los espermatozoides de esta especie fueron mantenidos a 4°C en una suspensión 1:10 con la SE (Maria et al., 2006). No obstante, los estudios realizados por Büyükhatipoglu y Holtz (1978) en *O. mykiss* y Basavaraja y Hegde (2005) en *Tor khudree* demostraron que la conservación a corto plazo del esperma de estos peces a 4°C puede ser mejorada en un ambiente oxigenado.

Los resultados obtenidos en el presente estudio fueron superiores a los reportados en las especies citadas anteriormente, lo que sugiere que los espermatozoides de la TSPM podrían tener una mayor resistencia al almacenamiento a bajas temperaturas que otras especies de agua dulce. No obstante, estudios referentes a la conservación a corto plazo del esperma de la TSPM en un ambiente oxigenado podrían ser considerados a futuro.

En lo referente a la relación *esperma:SE* para la preservación del esperma de peces de agua, los trabajos realizados a la fecha presentan inconsistencias en sus resultados. En peces salmónidos Truscott y Idler (1969), Ott y Horton (1971) y Horton y Ott (1976) sugieren que la calidad del esperma no varía en diluciones de 1:1 a 1: 9. En el esperma de *O. mykiss* (Legendre y Billard, 1980), *Esox lucius*, *Dicentrarchus labrax* y *Sparus aurata* (Billard, 1978) no fueron recomendables diluciones por encima de 1:3 y 1:2 respectivamente. En *Brycon orbignyanus*, una dilución 1:10 fue encontrada como óptima durante la

conservación a corto plazo del esperma. En este estudio se determinó que una dilución 1:9 (*esperma/SE*) fue la adecuada para la conservación a corto plazo del esperma de esta trucha nativa, lo que coincide con lo reportado por Maria et al. (2006) en el salmón de río, *Brycon orbignyanus*.

La variabilidad de nuestros resultados con los registrados en otros estudios podría ser debidos a factores como la alimentación, condiciones ambientales o tiempo de espermiación, el cual puede jugar un papel importante en las diferencias encontradas ya que la calidad del esperma varia conforme avanza la temporada de reproducción (Akçay et al., 2004).

Calidad del esperma conservado a corto plazo. La determinación de la calidad del esperma de peces ha sido evaluada comúnmente por el porcentaje de movilidad (Lahnsteiner y Patzner, 1998). Aunque en muchas especies la duración de la movilidad es muy corta e incluso puede variar estacionalmente (Hatipoğlu y Akçay, 2010). En este estudio el porcentaje de movilidad y la integridad de membrana fueron utilizados para evaluar la calidad del esperma de la TSPM y la relación entre estas dos variables fue positiva en las tres diluciones probadas durante los nueve días que permaneció el esperma almacenado a 4°C.

Estudios previos (Kao et al., 1998; Vetter et al., 1998) en humanos y ratas, sugieren que la integridad mitocondrial es afectada de la misma manera que la movilidad. En la TSPM la integridad de membrana presentó un patrón de comportamiento similar al de la movilidad, no obstante los valores registrados en

el porcentaje de movilidad fueron ligeramente mayores que los obtenidos para la integridad de membrana.

Los trabajos de Rodríguez-Martínez et al. (2001) reportan que el daño detectado por las diferentes técnicas en la membrana plasmática de los espermatozoides de cerdos no siempre estuvo de acuerdo con la fertilidad del semen, a menos que este daño fuera muy importante. Incluso los trabajos realizados por Donoghue et al. (1995), reportan un efecto deletéreo del 20-23% del SYBR14 sobre la viabilidad evaluada en esperma de guajolote.

En el esperma de la TSPM, la integridad de membrana fluctuó en promedio un 26% menor que el porcentaje de movilidad. Lo anterior, acorde a Donoghue et al. (*op. cit.*) posiblemente se relacione con la afección del SYBR14 a la membrana mitocondrial de los espermatozoides de esta trucha. Aunque, no al grado de inhibir su movilidad espermática, como sugieren Rodríguez-Martínez et al. (*op. cit.*). No obstante, futuros estudios podrían ser direccionados para determinar el efecto de SYBR14 en la calidad espermática y en su habilidad de fertilización *O. mykiss nelsoni*.

Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que técnicas como la movilidad y la integridad de membrana pueden ser efectivas en la determinación de la calidad espermática durante la conservación a corto plazo de los espermatozoides de la TSPM.

El protocolo de conservación a corto plazo desarrollado en este trabajo para los espermatozoides de la TSPM podría contribuir a prolongar la disponibilidad del esperma de esta trucha para procesos reproductivos en cautiverio, reduciendo la manipulación y el estrés originado en los machos para obtener esperma. Además, los espermatozoides almacenados en estas condiciones podrían servir como base para estudios de criopreservación.

En este estudio, los espermatozoides *O. mykiss nelsoni* pudieron ser almacenados en un refrigerador a 4°C con un porcentaje de movilidad $\geq 80\%$ por siete días y por dos días para la integridad de membrana. Además, nuestros resultados sugieren que tanto el porcentaje de movilidad como la integridad de membrana pueden ser utilizados para determinar el daño ocasionado al esperma de *O. mykiss nelsoni* debido a su almacenamiento.

LITERATURA CITADA

- Akçay, E., Y. Bozkurt, S. Seçer y N. Tekin, 2004. Cryopreservation of mirror carp semen. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences. 28(5):837-843.
- Alavi, S. M. y J., Cosson, 2005. Sperm motility in fishes. I. Effects of temperature and pH: A review. Cell Biology International. 29:101-110.
- , 2006. Sperm motility in fishes. II. Effects of ions and osmolality: a review. Cell Biology International. 30:1-14.
- Baicu, S. C. y M. J. Taylor, 2002. Acid-base buffering in organ preservation solutions as a function of temperature: new parameters for comparing buffer capacity and efficiency. Cryobiology. 45 (1):33-48.

- Basavaraja, N. y S. N. Hegde, 2005. Some characteristics and short-term preservation of spermatozoa of Deccan mahseer, *Toor khudree* (Sykes). *Aquaculture Research*. 36:422-430.
- Baynes, S. M., A. P. Scott. y A. P. Dawson, 1981. Rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, spermatozoa: effects of cations and pH on motility. *Journal of Fish Biology*. 19:259-267.
- Billard, R. A., 1977. A new technique or artificial insemination for salmonids using a sperm diluents. *Fisheries*. 1:24-25.
- , 1978. Changes in structure and fertilizing ability of marine and freshwater fish spermatozoa diluted in media of various salinities. *Aquaculture*. 14:187-198.
- , 1981. Short-term preservation of sperm under oxygen atmosphere in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture*. 23 (1-4):287-293.
- Billard, R., M. P. Cosson y R. Christen, 1987. Some recent data on the biology on trout spermatozoa. *Proceedings of the third international symposium on reproductive physiology of fish, St John's, Newfoundland*. 187-190.
- Billard, R. y M. P. Cosson, 1992. Some problems related to the assessment of sperm motility in freshwater fish. *Journal of Experimental Zoology*. 261:122-131.
- Bozkurt, Y. y S. Seer, 2005. Effect of short-term preservation of mirror carp (*Cyprinus carpio*) semen on motility, fertilization, and hatching rates. *The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*. 57(3):207-212.
- Bozkurt, Y., S. Seer, N. Bukan, E. Akçay y N. Tekin, 2006. Relation between body condition, physiological and biochemical parameters in brown trout (*Salmo trutta fario*) sperm. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 9(5):940-944.
- Bozkurt, Y., F. ğretmen y F. S. Seer, 2009. Effect of different extender and storage periods on motility and fertilization success of grass carp

- (*Ctenopharyngodon idella*) sperm during spawning season. *Tarim Bilimleri Dergisi*. 15:277-284.
- Bromage, N. R. y R. J. Roberts, 2001. Sperm physiology and quality. IN: Niall R. B. y Ronald J. R. Broodstock (eds). *Management and egg and larval quality*. Blackwell Science Ltd. Osney Mead, Oxford; 25-52.
- Büyükhatipoğlu, S. y W. Holtz, 1978: Preservation of trout sperm in liquid or frozen state. *Aquaculture*. 14 (1):49-56.
- Büyükhatipoğlu, S. y W. Holtz, 1984. Sperm output in Rainbow trout (*Salmo gairdneri*) effect of age, timing and frequency of stripping and presence of females. *Aquaculture*. 37:63-71.
- Cabrita, E., V. Robles, R. Álvarez, M. P. Herráez, 2001. Cryopreservation of rainbow trout sperm in large volume straws: application to large scale fertilization. *Aquaculture*. 201:310-314.
- Cabrita, E. V. Robles y P. Herráez, 2009. Sperm quality assessment. IN: Cabrita E., Robles V. y Herráez P. (eds). *Methods in Reproductive Aquaculture. Marine and Freshwater Species*. CRC Press Taylor y Francis group. Boca Raton; 93-147.
- Carpentier, P. y R. Billard, 1978. Conservation a court terme des gametes de salmonides a des temperatures voisines de 0°C. *Annales de Biologie Animale, Biochimie, Biophysique*. 18:1083-1088.
- Chereguini, O., R. M. Cal, C. Dreanno, B. O. deBaulny, M. Suquet y G. Maisse, 1997. Short-term storage and cryopreservation of turbot (*Scophthalmus maximus*) sperm. *Aquatic Living Resources*. 10 (4):251-255
- Christen, R., J. L. Gatti y R. Billard, 1987. Trout sperm motility: the transient movement of trout sperm is related to changes in the concentration of the

- ATP following the activation of the flagellar movement. *European Journal of Biochemistry*. 166:667-671.
- Cloud, J. G., W. H. Miller y M. J. Levanduski, 1990. Cryopreservation of sperm as a means to store salmonid germ plasm and to transfer genes from wild fish to hatchery populations. *Progressive Fish Culturist*. 52(1):51-53.
- Cosson, J., R. Billard, C. Cibert, C. Dréanno y M. Suquet, 1999. Ionic factors regulating the motility of fish sperm. IN: Gagnon C. (ed). *The Male Gamete from Basic Science to Clinical Applications*, Cache River Press, Vienna; 161-186.
- Cosson, J., O. Linhart, S. D. Mims, W. L. Shelton y L. M. Rodina, 2000. Analysis of motility parameters from paddlefish (*Polyodon spathula*) and shovelnose sturgeon (*Scaphirhynchus platyrhynchus*) spermatozoa. *Journal of Fish Biology*. 56 (6):1348-1367.
- Dabrowski, K. y A. Ciereszko, 1996. Ascorbic acid protects against male infertility in teleost fish. *Experientia*. 52:97-100.
- Darszon, A., P. Labarca P, T. Nishigaki y F. Espinosa, 1999. Ion Channels in Sperm Physiology. *Physical Review*. 79:481-510.
- DeeGraaf, J. D. y D. L. Berlinsky, 2004. Cryogenic and refrigerated storage of Rainbow smelt *Osmerus mordax* spermatozoa. *Journal of the World Aquaculture Society*. 35 (2):209-216.
- Dietrich, G. J., R. Kowalski, M. Wojtczak, S. Dobosz, K. Goryczko y A. Ciereszko, 2005. Motility parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa in relation to sequential collection of milt, time of post-mortem storage and anesthesia. *Fish Physiology and Biochemistry*. 31:1-9.

- Donoghue, M. A., D. L. Garner, D. J. Donoghue y L. A. Johnson, 1995. Viability assessment of turkey sperm using fluorescent staining and flow cytometry. *Poultry Science*. 74 (7):1191-1200.
- El-Harakany, A.A.; F. M. Abdel Halima y A. O. Barakat, 1984. Dissociation constants and related thermodynamic quantities of the protonated acid form of tris-(hydroxymethyl)-aminomethane in mixtures of 2-methoxyethanol and water at different temperatures. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 162(1-2):285-305.
- , 1987. Fertility of teleost semen as affected by dilution and storage in a seminal plasma-mimicking medium. *Aquaculture*. 60:317-321.
- Erdhal, D. A. y E. F. Graham, 1980. Preservation of spermatozoa from brook trout and rainbow trout. *CryoLetters*. 203-208.
- Erdahl, A. W., D. A. Erdahl y E. F. Graham, 1984: Some factors affecting the preservation of Salmonid spermatozoa. *Aquaculture*. 43:341-350.
- Figiel, C. R. Jr., T. R. Tiersch, W. R. Wayman, O. T. T. Gorman, J. H. Williamson y G. I. Carmichael, 1996. Collection, storage and cryopreservation of sperm from endangered razorback suckers. *Aquaculture Biotechnology Symposium Proceedings. International Congress on the Biology of Fishes. San Francisco, California*. 13-16.
- Garner, L. D. y L. A. Jhonson, 1995. Viability assessment of mammalian sperm using SYBR14 and propidium iodide. *Biology of Reproduction*. 53:276-284.
- Gatti, J. L., R. Billard, R. Christen, 1990. Ionic regulation of the plasma membrane potential of rainbow trout, *Salmo gairdneri*, sperm: role in the initiation of the motility. *Journal of Cellular Physiology*. 143:546-564.
- Glogowski, J., M. B. Kwasnik, K. Piros, K. Dabrowski, S. Goryczko, H. Dobosz, A. Kuzminski y A. Ciereszko, 2000. Characterization of rainbow trout milt

- collected with a catheter: semen parameters and cryopreservation success. *Aquaculture Research*. 31:289-296.
- Gwo, J., H. Kurokura y R. Hirano, 1993. Cryopreservation of spermatozoa from rainbow trout, common carp, and marine puffer. *Nippon Suisan Gakkaishi*. 59:777-782.
- Hamamah, S. y J. L. Gatti, 1998. Role of ionic environment and internal pH on sperm activity. *Human Reproduction*. 13:20-28.
- Harvey, B. y R. N. Kelley, 1984. Chilled storage of *Sarotherodon mossambicus* milt. *Aquaculture*. 36:85-95.
- Hatipoğlu, T. y E. Akçay, 2008. Short-term storage of abant trout (*Salmo trutta abanticus* Tontonese, 1954) semen and fertility trails. 16th International Congress on Animal Reproduction. 13-17 July Budapest, Rep. Dom. Anim. 43:141.
- Hatipoğlu, T. y E. Akçay, 2010. Fertilizing ability of short-term preserved spermatozoa abant trout (*Salmo trutta abanticus* T, 1954). *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. 57:33-38.
- Horton, H. F. y A. G. Ott, 1976. Cryopreservation of fish spermatozoa and ova. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*. 33:995-1000.
- Ingermann, R. L., M. Holcomb, M. D. Zuccarellia, M. K. Kannugaa y J. G. Clouda, 2008. Initiation of motility by steelhead (*Oncorhynchus mykiss*) sperm: membrane ion exchangers and pH sensitivity. *Comparative Biochemistry and physiology-Part A: Molecular and Integrative Physiology*. 151 (4):651-656.
- Jenkins, K. y L. C. Woods III, 2002. The cryopreservation of striped bass *Morone saxatilis* semen. *Journal of the World Aquaculture Society*. 33:70-77.

- Jensen, J. O. T. y D. F. Alderdice, 1984. Effect of temperature on short-term storage of eggs and sperm of chum salmon (*Oncorhynchus keta*). *Aquaculture*. 37:251-265.
- Kao, S., H. Chao y Y. Wei., 1998. Multiple deletions of mitochondrial DNA are associated with the decline of motility and fertility of human spermatozoa. *Molecular Human Reproduction*. 4:657-666.
- Krasznai, Z., T. Marian, H. Izumi, S. Damjanovich, L. Balkay, L. Tron. y M. Morisawa, 2000. Membrane hyperpolarisation removes inactivation of Ca^{2+} channels, leading to Ca^{2+} influx and subsequent initiation of sperm motility in the common carp. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 97:2052-2057.
- Krasznai, Z.; M. Morisawa, Z. T. Krasznai, S. Morisawa, K. Inaba, Z. K. Bazsane, B. Rubovszky, B. Bodnar, A. Borsos y T. Marian, 2003a: Gadolinium, a mechano-sensitive channel blocker, inhibits osmosis-initiated motility of sea- and freshwater fish sperm, but does not affect human or ascidian sperm motility. *Cell Motility and the Cytoskeleton*. 55:232-243.
- Krasznai Z, M. Morisawa, S. Morisawa, Z. T. Krasznai, L. Tron y T. Marian, 2003b. Role of ion channels and membrane potential in the initiation of carp sperm motility. *Aquatic Living Resources*. 16:445-449.
- Kunin, C. M, T. H. Hua y L. V. A. White, 1992. Growth of *Escherichia coli* in human urine: Role of salt tolerance and accumulation of glycine betaine. *Journal of Infectious Diseases*. 166:1311-1315.
- Lahnsteiner, F. y R. A. Patzner, 1998. Sperm motility of the marine teleosts *Boops boops*, *Diplodus sargus*, *Mullus barbatus* and *Trachurus mediterraneus*. *Journal of Fish Biology*. 52(4):726-742.

- Lahnsteiner, F., 2000. Cryopreservation protocols for sperm of salmonid fishes. IN: Tiersch, T. R. y Mazik P. M. (eds). Cryopreservation in Aquatic Species. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana; 91-100.
- Legendre, M. y R. Billard, 1980. Cryopreservation of rainbow trout sperm by deep-freezing. *Reproduction Nutrition Development*. 20(6):1859-1868.
- Lin, F. y K. Dabrowski, 1996. Characteristics of muskellunge spermatozoa II: Effects of ions and osmolality on sperm motility. *Transactions of the American Fisheries Society*. 125:195-202.
- Marques, S. y H. G. Pereira, 2004. Short-term cold storage of sperm from six neotropical characiformes fishes. *Brazilian archives of biology and technology*. 47(5):799-804.
- McNiven, M. A., R. K. Gallant, y G. F Richardson, 1993. Fresh storage of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) semen using a non-aqueous medium. *Aquaculture*. 709:71-82.
- Maria, A. N., A. T. M. Viveiros, R. T. F. Freitas y A. V. Oliveira, 2006. Extenders and cryoprotectants for cooling and freezing of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) semen, and Brazilian endangered teleost fish. *Aquaculture*. 260:298-306.
- Márián, T, Z. Krasznai, L. Balkay, M. Emri y L. Trón, 1997. Role of extracellular and intracellular pH in carp sperm motility and modifications by hyperosmosis of regulation of the Na^+/H^+ exchanger. *Cytometry*. 27:374-382.
- Marshall, W. S., S. E. Bryson y D. R. Idler, 1993. Gonadotropin action on brook trout sperm duct epithelium: ion transport stimulation mediated by cAMP and calcium. *General and Comparative Endocrinology*. 90:232-242.
- Meka, J. M. y S. D. McCormick, 2005. Physiological response of wild rainbow trout to angling: impact of angling duration, fish size, body condition, and temperature. *Fisheries Research*. 72:311-322.

Molecular Probes, 2005. Live-Dead Sperm Viability Kit. Product Information. 1-3.

Morisawa, M. y K. Suzuki, 1980. Osmolality and potassium ion: their role in initiation of sperm motility. *Science*. 210:1145-1147.

Morisawa, M., K. Suzuki y S. Morisawa, 1983a. Effects of potassium and osmolality on spermatozoa motility of salmonid fishes. *Journal of Experimental Biology*. 107:105-113.

Morisawa, M., K. Suzuki, H. Shimizu, S. Morisawa y K. Yasuda, 1983b. Effects of osmolality and potassium on motility of spermatozoa from freshwater cyprinid fishes. *Journal of Experimental Biology*. 107:95-103.

Morisawa, S. y M. Morisawa, 1986. Acquisition of potential for sperm motility in rainbow trout and chum salmon. *Journal of Experimental Biology*. 126:89-96.

Morisawa, S. y M. Morisawa, 1988. Induction of potential for sperm motility by bicarbonate and pH in rainbow trout and chum salmon. *Journal of Experimental Biology*. 136:13-22.

Mounib, M. S., P. C. Hwang y D. R. Idler, 1968. Cryogenic preservation of Atlantic cod (*Gadus morhua*) sperm. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*. 25:2623-2632.

Mounib, M. S., 1978. Cryogenic preservation of fish and mammalian spermatozoa. *Journal of reproduction and fertility*. 53:13-18.

Ott, A. G y H. F. Horton, 1971. Fertilization of steelhead trout eggs with cryopreserved sperm. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*. 28:1915-1918.

Piironen, J. 1994. Composition and cryopreservation of sperm from some finnish freshwater teleost fish. *Finnish Fisheries Research*. 15:27-48.

- Rana, K. J., 1995. Cryopreservation of fish spermatozoa. IN: Day J. G. y McLellan M. R. (eds). *Methods in molecular biology*. Humana Press Inc., New Jersey, 38:151-165.
- Ramos, S., 1986. Anotaciones sobre inseminación artificial. Facultad de Medicina Veterinaria. Universidad de la Salle, Santafé de Bogota, Colombia. 22 p.
- Ritar, A. J. y M. Campet, 2000. Sperm survival during short-term storage and after cryopreservation of semen from striped trumpeter (*Latris lineata*). *Theriogenology*. 54(3):467-480.
- Rodríguez-Martínez, H., M. Wallgren, E. Selles y P. Tienthai, 2001. Aspectos de función espermática en cerdos. III Congreso Ibérico de Reprodução Animal. Porto, 6-8/Portugal. Livro de resumos: 51-60.
- Routray, P., D. V. Verma, S. K. Sarkar y N. Sarangi, 2007. Recent advances in carp seed production and milt cryopreservation. *Fish Physiology and Biochemistry*. 33:413-427.
- Saad, A., R. Billard, M. C. Theron y M. G. Hollobee, 1988. Short-term preservation of carp (*Cyprinus carpio*) semen. *Aquaculture*. 71:133-150.
- Salinas-Flores, L. 2003. Criopreservación de esperma del abulón rojo *Haliotis rufescens*. Tesis de maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Ensenada, Baja California, México. 111 p.
- Scott, A. y S. Baynes, 1980. A review of the biology, handling and storage of salmonid spermatozoa. *Journal of Fish Biology*. 17:707-739.
- Secretaría de Medio Ambiente y recursos Naturales, 2002. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2001. Protección Ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestre-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Diario Oficial De La Federación. México. Segunda sección. 1:153.

- Soengas, J. L., B. Sanmartin, P. Barciella, M. Aldegunde y G. Rozas, 1993. Changes in carbohydrate metabolism in domesticated rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* related to spermatogenesis. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 105:665-671.
- Stein, H. y H. Bayrle, 1978. Cryopreservation of the sperm of some freshwater teleosts. *Annales de biologie animale, biochimie, biophysique*. 18 (4):1073-1076.
- Stoll, V. S. y J. S. Blanchard, 1990. Buffers: principles and practice. *Methods in Enzymology*. 182:24-38.
- Stoss, J., S. Buyukhatipoglu y W. Holtz, 1977. Der Einfluss bestimmter Electrolyte auf die Bewegungsauslosung bei Spermatozoen der Regenbogenforelle (*Salmo gairdneri*). *Zuchthygiene*. 12:178-184.
- Tabares, C. J., A. M Tarazona y M. Olivera-Ángel, 2005. Fisiología de la activación del espermatozoide en peces de agua dulce. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 18:(2):149-161.
- Takai, H. y M. Morisawa, 1995. Changes in intracellular K^+ concentration caused by external osmolarity change regulate sperm motility of marine and freshwater teleosts. *Journal of Cell Science*. 108:1175-1181.
- Truscott, B. y D. R. Idler, 1969. An improved extender for freezing Atlantic salmon spermatozoa. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*. 26:3254-3258.
- Valdebenito, I., C. Fletcher, V. Vera y J. Fernández. 2009. Factores fisicoquímicos que regulan la motilidad espermática en peces: aspectos básicos y aplicados. Una revisión. *Archivos de Medicina Veterinaria*. 41:97-106.

- Vetter, C.; J. Miller; L. Crawford; M. Armstrong; J. Clair; M. Conner; D. Wise y T. Skopel, 1998. Comparison of motility and membrane integrity to assess rat sperm viability. *Reproductive Toxicology*. 12:105-114.
- Wayman, W. R., R. G. Thomas y T. R. Tiersch, 1996. Cryopreservation of sperm of spotted sea trout (*Cynoscion nebulosus*). *Gulf Research Reports*. 9:183-188.
- Woolsey, J. y R. L. Ingermann, 2003. Acquisition of the potential for sperm motility in steelhead (*Oncorhynchus mykiss*): effect of pH on dynein ATPase. *Fish Physiology and Biochemistry*. 29:47-56.
- Woolsey, J., M. Holcomb, J. Cloud y R. Ingermann, 2006. Sperm motility in the steelhead *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum): influence of the composition of the incubation and activation media. *Aquaculture Research*. 37:215-223.
- Yang, X. C. y F. Sachs, 1993. Mechanically sensitive, non-selective cation channels. IN: Siemen D. y Hescheler J. (eds). *Non-Selective Ion Channels*. Heidelberg. Springer-Verlag. New York; 79-92.
- Yao, Z., G. F. Richardson y L. W. Crim, 1999. A diluent for prolonged motility of ocean pout (*Macrozoarces americanus* L.) sperm. *Aquaculture*. 174(1-2):183-193.

CONSERVACIÓN A LARGO PLAZO DEL
ESPERMA DE LA TRUCHA DE SAN PEDRO
MÁRTIR (*Oncorhynchus mykiss nelsoni*
EVERMANN)

Capítulo IV

RESUMEN

En el presente estudio se elaboró el primer protocolo para la conservación a largo plazo de los espermatozoides de la trucha de San Pedro Mártir (*Oncorhynchus mykiss nelsoni*). La citotoxicidad del Dimetil sulfóxido (DMSO), N-N, Dimetil acetamida (DMA), Etilenglicol (ETG), Glicerol (GL), metanol (MT) o 1,2-Propanodiol (PD) fue evaluada en la movilidad espermática de la TSPM. Los espermatozoides fueron diluidos (1:9) con la solución extender de Erdhal y Graham y MT, DMA o DMSO a una concentración final de 5%. Posteriormente, las muestras de espermatozoides se colocaron en vapor de nitrógeno líquido a -70°C por 10 minutos a una velocidad de enfriamiento de aproximadamente $-32^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ y transcurrido este tiempo, transferidas a un tanque de nitrógeno líquido (-196°C) por 30 días. La descongelación se realizó en un baño de agua a tres tasas diferentes: 25°C por 20 s, 35°C por 10 s ó 40°C por 7 s. El porcentaje de movilidad, el uso de tinciones fluorescentes y el ensayo cometa fueron comparados en la determinación del daño causado a los espermatozoides por el proceso de congelación y descongelación. Los resultados obtenidos indicaron que los espermatozoides de la TSPM suspendidos en los diferentes ACPs presentaron una movilidad mayor cuando fueron suspendidos en MT pero ausente cuando fueron colocados en ETG, el cual resultó ser el ACP más tóxico. Los espermatozoides criopreservados con DMSO o DMA o MT exhibieron un daño evidente a nivel de membrana, el cual fue superior al ocasionado en el ADN, pero menor que el obtenido en la movilidad espermática. Temperaturas de 40°C y MT como ACP presentaron una integridad de membrana, y de ADN superior que cuando se utilizaron temperaturas de descongelación bajas (25°C) y ACP como DMSO o DMA. Los resultados de este estudio comprueban que los daños en el ADN son una causa más de crio-daño en espermatozoides criopreservados de peces. La importancia de este estudio radica en que el material congelado formará parte del "Banco Periférico de Recursos Genéticos Acuáticos en México", y será considerado para futuros estudios de reproducción *ex situ* de esta especie nativa, con fines de conservación.

INTRODUCCIÓN

En México las condiciones geográficas favorecen al desarrollo de la diversidad biológica (Mittermeier y Goettsch, 1992). No obstante, la actual extinción de especies y el riesgo de desaparición de muchas otras, como es el caso de la trucha de San Pedro Mártir (TSPM), *Oncorhynchus mykiss nelsoni* (Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales, 2002) sugieren la necesidad de implementar nuevas estrategias a fin de evitar la extinción de este grupo de peces.

Actualmente los diversos planes desarrollados para la conservación de la diversidad biológica (FAO/Pnuma, 1984; Bart, 1999; Steane, 1992), coinciden en que estrategias ya establecidas como son las zonas protegidas y la acuicultura podrían ser complementadas con nuevas tecnologías reproductivas y de criopreservación.

Las primeras investigaciones sobre criopreservación se realizaron en el espermatozoide de mamíferos (Polge et al., 1949) y continuaron con gametos y embriones de bovinos, ratas, caprinos, conejos y ovinos (Evenson et al., 1993; Garner y Jonson, 1995). En organismos acuáticos, los trabajos, inician con Blaxter (1953), quien fertilizó huevos de arenque (*Clupea harengus*) con semen descongelado. A la fecha, se cuenta con un registro de entre 50 y 200 especies de este grupo de vertebrados, en los cuales la congelación de espermatozoide ha logrado ser exitosa (Rana, 1995; Tiersch et al., 2000), lo que no ha sucedido con la criopreservación

de huevos y embriones cuyos resultados son escasos (Zell, 1978; Liu et al., 1993; Zhang y Rawson, 1995; Blesbois y Labbé, 2003) y poco alentadores (Tiantian, 2004).

La criopreservación es una herramienta que permite mantener en temperaturas de -196°C cualquier conjunto biológico de células por tiempo indefinido (Tiersch, 2000). Sin embargo, durante este procedimiento, los espermatozoides pueden sufrir daños a nivel celular en diferentes grados, afectando su calidad y tasa de supervivencia (Gao et al., 1997). A la fecha los agentes crioprotectantes (ACPs) y la tasa de congelación/descongelación utilizada durante el proceso de criopreservación han sido reportados como factores clave para la viabilidad celular (Li et al., 2006).

Los ACPs son sustancias hidrosolubles que durante el proceso de criopreservación favorecen la disminución del punto eutéctico de una solución dada y reducen la formación de cristales de hielo intracelular (Ávila-Portillo et al., 2006). A pesar de esto, el efecto de estos aditivos químicos ha sido reportado como especie-específico (Yao et al., 2000), y la supervivencia de la célula es el producto de numerosos factores que frecuentemente no dependen solo de la acción de los ACPs. Muchas de las causas de lesiones a la célula ocurren durante el evento de la congelación y descongelación celular (Cabrita et al., 2005).

El efecto del proceso de congelación/descongelación en espermatozoides es a menudo evaluado en términos de su movilidad, viabilidad celular y capacidad de fertilización. Estudios previos en espermatozoides de peces de agua dulce, incluyendo la trucha arcoíris (*O. mykiss*), han sugerido que los daños asociados al proceso de criopreservación están asociados con pérdida de la integridad de la membrana plasmática, potencial de membrana mitocondrial y a un bajo contenido de adenosín trifosfato (ATP) (Labbé y Maisse, 1996; Ogier de Baulny et al., 1997; Cabrita et al., 2001b). En peces, recientemente la integridad de la membrana plasmática ha sido evaluada eficientemente con el uso de tinciones fluorescentes como SYBR14 (Flajšhans et al., 2004). Pero cabe mencionar que ninguno de los parámetros mencionados anteriormente provee información acerca de la integridad del ácido desoxirribonucleico (ADN).

El daño al ADN ha sido observado en muchas especies de mamíferos tales como humanos, ratones, caballos y cerdos usando diferentes técnicas (Ahmadi y Soon-Chye 1999; Hammadeh et al., 2001; Baumber et al., 2003; Hughes et al., 1997; Singh et al., 2003; Steele et al., 2000). A la fecha, en espermatozoides de la trucha arcoíris, la técnica del ensayo cometa ha sido utilizada eficientemente para determinar la fragmentación del ADN (Cabrita et al., 2005). Sin embargo, esta técnica requiere ser estandarizada para cada grupo de peces.

La criopreservación de material genético puede cumplir con dos funciones: la conservación de gametos (ovocitos y espermatozoides), de especies raras o en peligro de extinción y, la conservación del material genético de especies cultivadas con

características únicas que signifiquen una mejoría para un productor (crecimiento, resistencia a enfermedades etc.,) (Figiel y Tiersch, 1998). Por tanto, la técnica de criopreservación es una herramienta importante desde el punto de vista ecológico y acuicultural y puede ser una alternativa viable para la conservación del recurso genético de especies silvestres y de cultivo.

En la trucha de San Pedro Mártir (TSPM), no existe información con respecto a la criopreservación de gametos, pero se tienen antecedentes en esperma de otras truchas congénicas, tales como *O. gorbuscha* (Hodgins y Ridgway, 1964); *O. kisutch* y *O. tschawytscha* (Ott y Horton, 1971); *O. nerka* (Bilinski et al., 1981) y la misma trucha arcoíris, *O. mykiss* (Wheeler y Thorgaard, 1991; Holtz, 1993; Gwo et al., 1993; McNiven et al., 1993; Conget, 1996; Lahnsteiner et al., 1996a; Glogowski et al., 2000; Cabrita et al., 2001a; Babiak et al., 2002; Cabrita et al., 2005; Aral et al., 2009). Los resultados obtenidos en la conservación de material genético en estas especies han sido significativos, pero estos protocolos son intransferibles ya que cada especie responde de singular manera al aplicar las mismas metodologías (Renard y Cochard, 1989).

El desarrollo de un protocolo de criopreservación para los espermatozoides de la TSPM permitiría la conservación del acervo genético de esta trucha, lo cual ayudaría a incrementar las probabilidades de supervivencia de su población en su hábitat natural. Además, las experiencias y conocimientos adquiridos con la TSPM, podrían beneficiar en el desarrollo de técnicas específicas para otras especies de salmónidos nativos del noroeste de México, cuyo material genético

está amenazado por fragmentación de su hábitat o hibridación con especies exóticas (Ruiz-Campos, 1993). Incluso, el material genético criopreservado y mantenido en un Banco de germoplasma permitiría el intercambio genético tanto entre poblaciones (ya sea en la naturaleza o en cautividad) como entre generaciones. De esta forma se mejoraría tanto la conservación *in situ* como la conservación *ex situ* al evitarse la pérdida de variabilidad genética y la consanguinidad, fenómenos habituales en especies amenazadas (Cloud, 2000; Medina-Robles et al., 2005).

El objetivo de este trabajo es desarrollar una metodología que permita conservar a los espermatozoides de la TSPM en ultra-bajas temperaturas por largo tiempo y evaluar el efecto de la congelación/descongelación sobre la movilidad, integridad de la membrana plasmática y ADN.

OBJETIVO GENERAL

Generar una metodología que permita la conservación a largo plazo del esperma de la trucha de la Sierra de San Pedro Mártir, *Oncorhynchus mykiss nelsoni*.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar el efecto citotóxico del DMSO, DMA, Glicerol, Etilen-glicol, Metanol y el 1-2, propilenglicol en la movilidad espermática de la trucha de San Pedro Mártir.
- Generar una metodología de congelación para los espermatozoides de esta trucha.
- Determinar la tasa óptima de descongelación de los espermatozoides para esta misma trucha.
- Evaluar el daño ocasionado por el proceso de congelación en esperma de la trucha a nivel celular y de DNA, utilizando sondas fluorescentes y el Ensayo de electroforesis de células individuales también conocido como Ensayo Cometa.

MATERIALES Y MÉTODOS

I. Obtención de las muestras de esperma de *O. mykiss nelsoni*. Durante marzo y abril de 2009, ocho machos de la TSPM mantenidos y madurados en cautiverio (capítulo II de este trabajo) fueron colocados por pares en tinas de plástico con 15 litros de agua y anestesiados con 100 $\mu\text{L/L}$ de una mezcla de aceite de clavo con etanol (1:9) (Meka y McCormick, 2005). Una vez que los organismos perdieron el equilibrio (10-15 minutos de exposición) se procedió a la recolecta de esperma por el método ya descrito en el capítulo II de esta tesis.

I.1. Valoración de la calidad del esperma recolectado. Una alícuota de 0.5 μL de esperma fue colocada en un portaobjetos y mezclada con 20 μL de DIA 532 (0.51 g/l NaCl, 3.75 g/l glicina, 2.42 g/l Tris, 87.39 mOsmol/kg) como medio de activación. El porcentaje de esperma con movimiento vigoroso hacia delante fue evaluado mediante observación en un microscopio (Nikon H600L, Eclipse 80-i) a un aumento de 400X y con microscopia de campo oscuro. Debido a que algunos organismos liberaron muy poco esperma, las muestras que presentaron una movilidad $\geq 80\%$ se mezclaron con otras muestras y fueron utilizadas para los experimentos. Para reducir sesgos en las mediciones, la estimación de la movilidad fue realizada por el mismo observador.

I.2. Volumen y número de espermatozoides. Una alícuota de 1 μL de esperma fue suspendido con 1.9 mL de lugol al 1% y el número de espermatozoides fue determinado utilizando un hematocitómetro y un microscopio (Nikon H600L,

Eclipse 80-i) a un aumento de 400X. El número promedio de espermatozoides fue calculado de tres repeticiones y expresado como $\times 10^6$ células/mL. El volumen de esperma fue determinado por la cantidad de microlitros obtenidos en cada muestra.

II. Citotoxicidad de los crioprotectantes y concentraciones efectivas (EC50) en el esperma de la trucha de San Pedro Mártir. La citotoxicidad del Dimetil sulfóxido (DMSO), N-N, Dimetil acetamida (DMA), Etilenglicol (ETG), Glicerol (GL), metanol (MT) o 1,2-Propanodiol (PD) fue evaluada en la movilidad espermática de la TSPM. Todo el procedimiento fue realizado sobre una cama de hielo ($\sim 4^{\circ}\text{C}$).

A una tasa de suspensión de 1:9 (esperma/solución extender [SE]) una alícuota de 20 μL de esperma fue mezclada con 180 μL de la SE de Erdhal y Graham (SE-EG) (0.102 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.22 g/L $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.263 g/L Na_2HPO_4 , 2.61 g/mL KCl, 0.1 g/L ácido cítrico, 10 g/L glucosa, 10mL de solución de KOH [1.27 g/100mL], 20mL de solución de bicina [5.3 g/100mL], 333 mOsmol/kg y pH = 7.4). Esta SE fue preparada previamente a concentraciones de 5%, 7%, 10% y 15% con cada uno de los ACP evaluados (DMSO, DMA, ETG, GL, MT o PD). Una muestra de esperma sin SE fue utilizada como control. La solución de DIA 532 fue utilizada como medio de activación de los espermatozoides y el porcentaje de movilidad fue determinado cada cinco minutos por un lapso de 30 minutos. Como muestra control se utilizó el esperma fresco diluido en la SE-EG sin ACP.

III. Congelación a largo plazo del esperma de la trucha de San Pedro Mártir.

La criopreservación de los espermatozoides de la TSPM fue llevada a cabo sobre una cama de hielo ($\sim 4^{\circ}\text{C}$) en el Laboratorio de Germoplasma de Especies Acuáticas en el Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada.

III.1. Preparación de las muestras. Una alícuota de 660 μL de esperma de la TSPM fueron diluidos (1:9) en 5.9 mL de la SE-EG usando MT o DMA o DMSO como ACP permeable a una concentración final de 5%, y 10mg/mL de BSA como ACP no permeable. Cabe mencionar que con base en los resultados obtenidos en el experimento de citotoxicidad se utilizó el MT a una concentración del 5% como ACP para la criopreservación de los espermatozoides de la TSPM, pero además se decidió utilizar el DMA y el DMSO debido a su efectividad como ACP en espermatozoides de la trucha arcoíris (Babiak et al., 2002; Cabrita et al., 2005).

Los espermatozoides fueron mezclados con la SE-EG que contenía el ACP y se incubaron por un tiempo de equilibrio (TE) de 5 minutos. Después, con ayuda de una bomba de vacío (Cole-Palmer, Air AdmiralTM) las muestras de esperma fueron vaciadas en pajillas francesas de 0.5 mL (IMV International Corporation, Minneapolis, Minnesota) y sus bordes fueron sellados con polvo sellador (IMV International Corporation). Grupos de 5 pajillas fueron colocadas en macrotubos de 1 cm de diámetro, los cuales fueron dispuestas por pares en estructuras metálicas denominadas “cañas” (Fig. 4.1). Antes de iniciar el proceso de

congelación una alícuota de 5 μL de esta mezcla fue examinada para comprobar movilidad antes de congelar.

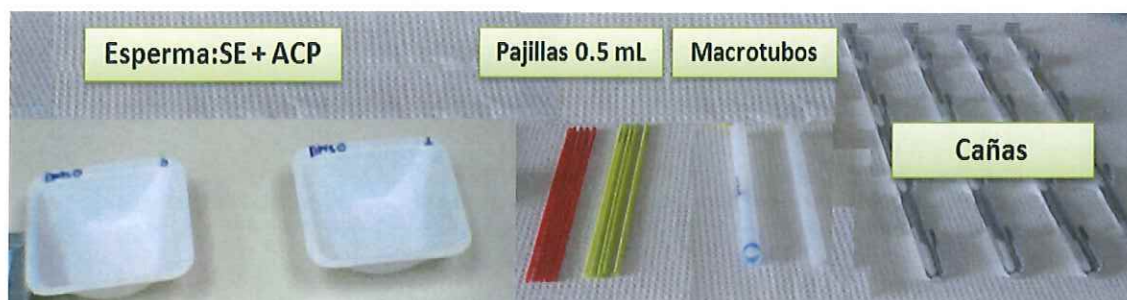


Figura 4.1. La mezcla del esperma y la solución extensora es colocada en pajillas, las cuales son puestas en macrotubos y estos, dispuestos por pares en cañas.

III.2. Tasa de congelamiento. El congelamiento de las muestras de esperma de la TSPM fue realizado por el método manual “simplificado”. Las cañas metálicas conteniendo las pajillas con esperma fueron colocadas por 10 minutos en vapor de nitrógeno líquido (VN_2L) a -70°C a una velocidad de enfriamiento de $\sim 32^\circ\text{C}/\text{min}$. Esto se logró colocando las cañas metálicas sobre una malla de plástico adherida a un fragmento de tubo de PVC (8'' diámetro x 1.5'' alto), el cual fue colocado en una caja de poliestireno de 10 L (con tapa) con ~ 3 cm de nitrógeno líquido (N_2L). La temperatura dentro de la caja fue monitoreada colocando una termocupla (Coler Palmer Instruments Company, Vernon Hills, IL) adherida al mismo nivel de las cañas metálicas y el control de la temperatura fue regulada al abrir o cerrar la caja (Fig. 4.2). Por último, las muestras fueron transferidas a un tanque de almacenamiento de N_2L (TAYLOR-WHARTON, HC-35) a -196°C donde permanecieron por 30 días.

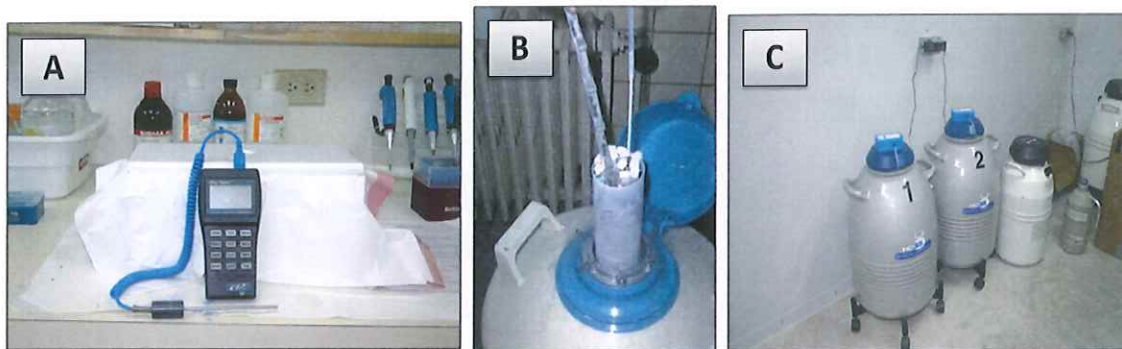


Figura 4.2. Congelación del esperma de *O. mykiss nelsoni* por el método simplificado. Las cañas conteniendo las pajillas con muestra fueron colocadas en vapor de nitrógeno líquido a -70°C por 10 minutos A), después transferidas directamente al nitrógeno líquido a -196°C B), donde permanecieron por 30 días C).

III.3. Descongelación de las muestras. La descongelación de las muestras de esperma de la TSPM fue evaluada con tres tasas diferentes: 25°C por 20 segundos (s), 35°C por 10s o 40°C por 7 s (Wheeler y Thorgaard, 1991; Holtz, 1993; Gwo et al., 1993). Brevemente, las pajillas fueron extraídas del tanque de N_2L y sumergidas en el baño de agua a la temperatura escogida, una vez que estas viraron de un color blanco opaco a ligeramente transparente fueron sacadas del agua, limpiadas con un papel secante, cortadas en sus extremos y la muestra colocada en un tubo de plástico de 1.5 mL el cual contenía SE-EG (1:1), esto con el propósito de eliminar el ACP.

Una vez descongeladas las pajillas, inmediatamente las muestras de esperma fueron evaluadas en su porcentaje de movilidad, integridad de membrana y daño al ADN.

III.3.1. Evaluación de la movilidad. Para determinar el porcentaje de movilidad de las muestras de esperma descongelada, una alícuota de 5 μL fue colocada en un portaobjetos y activada con 20 μL de DIA 532. El porcentaje de movilidad fue registrado de acuerdo a los procedimientos antes descritos.

III.3.2. Evaluación de la integridad de membrana con sondas fluorescentes. El kit LIVE/DEAD para viabilidad de esperma (L-7011 Molecular Probes, Inc., USA) fue utilizado para determinar la integridad de membrana. El protocolo de tinción fue realizado acorde a Molecular Probes (Molecular Probes, 2005). Alícuotas de 100 μL de muestra de espermatozoides descongelados fueron mezclados con 0.50 μL de SYBR 14 (20 nM concentración final) e incubada en la oscuridad por 10 minutos a temperatura ambiente ($\sim 19^\circ\text{C}$). Una segunda incubación con 0.50 μL de yoduro de propidio (YP) (12 μM concentración final) fue realizada por otros 10 minutos. Después del período de incubación, las muestras fueron observadas en un microscopio de fluorescencia a un aumento de 200 o 400 o 1000X, usando un filtro azul (excitación 490 nm y emisión 510 nm). Por cada muestra, un total de 10 campos con 100 células por campo fueron observados. Las células que mostraban integridad de membrana fueron registradas como viables (fluorescencia verde). Las células que no mostraban integridad de membrana fueron registradas como no viables (fluorescencia roja)

III.3.3. Evaluación del ADN del espermatozoide utilizando el ensayo cometa.

III.3.3.1. Validación de la técnica. Para el control positivo se utilizó una solución de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) preparada a diferentes concentraciones (100, 200, 400, 600, 800, 1000 mM). Una alícuota de 50 μ L de semen fresco fue suspendida en 30 μ L H_2O_2 a las diferentes concentraciones. La mezcla fue mantenida por 10 minutos a 4°C y la fragmentación del ADN fue evaluada en un microscopio de fluorescencia a un aumento de 200 o 400 o 1000X, usando un filtro de excitación de 510-560 nm. Para el control negativo se utilizó una alícuota de 50 μ L de semen fresco sin H_2O_2 .

III.3.3.2. Preparación de los portaobjetos con las muestras. La primera capa de agarosa fue formada al esparcir 100 μ L de agarosa 0.5% (AG) sobre un portaobjetos esmerilado y cubierta con un cubreobjetos. Las muestras fueron protegidas de la luz y el polvo y mantenidas en estas condiciones por 1.5 horas a temperatura ambiente (~19°C) para que solidificara la AG. Transcurrido este tiempo se retiraron los cubreobjetos y sobre la capa de AG se esparcieron 90 μ L de una mezcla que contenía 30 μ L de espermatozoide fresco (control) o descongelado y 225 μ L de agarosa de bajo punto de fusión (ABPF) al 0.5 (el volumen de espermatozoide añadido fue ajustado a fin de tener una concentración final de $\sim 10 \times 10^6$ espermatozoides/mL), se colocaron cubreobjetos limpios y las muestras se guardaron en un refrigerador a 4°C por 25 minutos. Al solidificar la agarosa se removieron los cubreobjetos de las muestras y sobre la capa anteriormente formada se esparcieron 100 μ L de ABPF. Los portaobjetos fueron protegidos con

cubreobjetos limpios y mantenidos de nuevo en un refrigerador a 4°C por 10 minutos para permitir la solidificación de la tercera capa (Fig. 4.3A-B).

Todo el material utilizado fue primeramente enjuagado con metanol y secado a temperatura ambiente para evitar cualquier residuo orgánico. Las soluciones de agarosa fueron preparadas al momento y mantenidas en un baño de agua (55-60°C) para evitar que solidificaran. Las muestras de los espermatozoides criopreservados con los diferentes ACPs y descongelados a las diferentes temperaturas fueron evaluadas por triplicado.

III.3.3.3. Lisis. A partir de este punto todo el procedimiento fue llevado a cabo con luz tenue (luz roja). La solución de lisis (2.5 M NaCl, 100 mM Na₂-EDTA, 10 mM Tris, 1% Triton X-100, 1% lauryl sarcosine) fue preparada un día antes y mantenida en refrigeración a 4°C hasta su uso. Primeramente se removieron los cubreobjetos de las muestras anteriormente preparadas y los portaobjetos fueron colocados en jarras de plástico con ~80 mL de la solución de lisis a 4°C por 1 hora (Fig. 4.3B). Después de este tiempo, para descondensar el ADN, a la solución de lisis se le agregó dithiothreitol (a una concentración final de 10mM) y las muestras permanecieron en esta solución a 4°C por 30 minutos. Después, a la solución previa se le añadió diiodosalicilato de litio (a una concentración final de 4 mM) y los portaobjetos se mantuvieron en incubación a temperatura ambiente por 90 minutos.

III.3.3.4. Desnaturalización y electroforesis. Para fomentar la desnaturalización del ADN de las muestras, los portaobjetos fueron removidos de la solución de lisis y se les eliminó el exceso de ésta solución. Enseguida, se colocaron horizontalmente en una cámara de electroforesis (BIO-RAD) que contenía solución amortiguadora (300 mM NaOH, 1mM Na₂-EDTA, pH 12) y permanecieron en esta solución por 20 min a 4°C sin voltaje. Posteriormente la electroforesis de las muestras fue llevada a cabo por 10 minutos a 25 V y 300 mA (Fig. 4.3C-D). Todo el procedimiento fue realizado a 4°C. La solución amortiguadora fue preparada un día y mantenida en refrigeración (4°C) hasta su uso.

III.3.3.5. Neutralización y fijación de las muestras. Al finalizar la electroforesis, la solución amortiguadora fue drenada y los portaobjetos colocados en una charola de plástico con solución neutralizante (0.4 mM Tris, pH 7.5) por 5 minutos a 4°C. Esta operación se repitió dos veces con solución fresca a fin de asegurar la eliminación de todos los alkali y detergentes. Después, la solución neutralizante fue drenada y la fijación de la muestra se realizó sumergiendo los portaobjetos en una solución de metanol por 3 minutos y posteriormente mantenidos a temperatura ambiente para que se secaran (Fig. 4.3E-F). Los portaobjetos ya fijados se colocaron en charolas de plástico, las cuales fueron introducidas en bolsas oscuras de plástico para que se protegieran del polvo y de la luz. Las muestras fueron almacenadas a ~4°C hasta su uso.

III.3.3.6. Análisis de la muestra. Para visualizar los cometas, las muestras fueron teñidas con 40 μ L de bromuro de etidio a una concentración de 0.5 μ g/mL, cubiertas con un cubreobjetos y observadas en un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse E800) con un filtro de excitación de 510-560 nm (Fig. 4.3G-H).

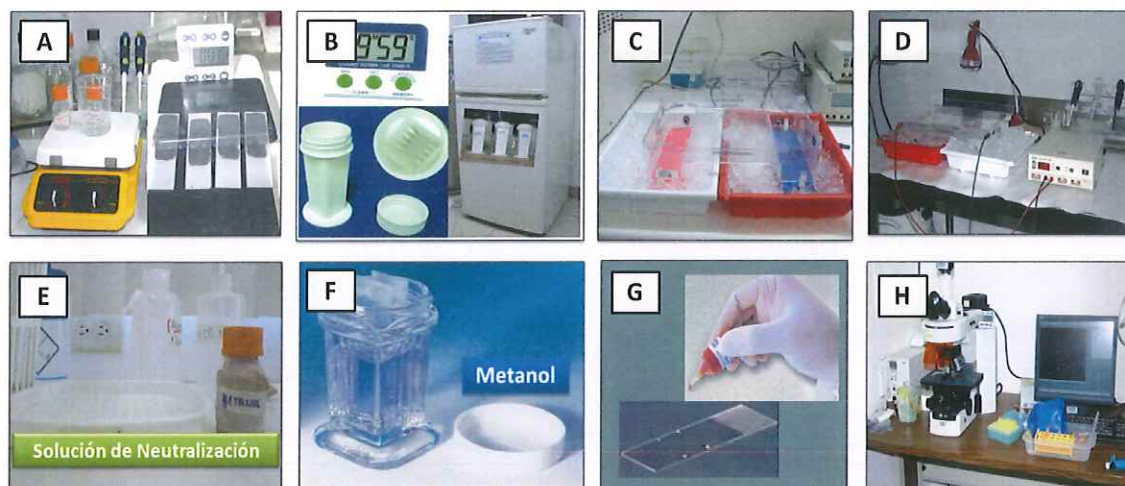


Figura 4.3. Ensayo cometa. Sobre un portaobjetos esmerilado se esparce una capa de agarosa al 0.5%, una vez que ésta solidifica se le esparce encima una mezcla de esperma y agarosa de bajo punto de fusión al 0.5%. Por último, una capa de agarosa de bajo punto de fusión al 5% es colocada sobre las dos capas anteriores A). Cuando las tres capas de agarosa están solidificadas, los portaobjetos son colocados en una solución de lisis por 180 minutos B); posteriormente éstos son incubados por 10 minutos en una solución amortiguadora C) y al término de este tiempo es llevada a cabo la electroforesis a 25 V y 300 mA durante 10 minutos D). Finalmente los portaobjetos son colocados en una solución de neutralización por 5 minutos E), escurridos a temperatura ambiente y colocados en metanol por 3 minutos para su fijación F). El análisis de la muestras se realizó con bromuro de etidio al 0.5% G) y las muestras son analizadas en un microscopio con un filtro de excitación de 510-560 nm H).

De cada portaobjetos analizado se seleccionaron al azar varios campos para registrar las imágenes, las cuales fueron capturadas con una cámara digital (EVOLUTION®VF, Media Cybernetics). Las imágenes fueron recuperadas con el programa Image Pro-Plus ® v. 6. 0. Aproximadamente 80 células de cada portaobjetos fueron fotografiadas y aquellas que presentaron una prolongación de su material genético fueron consideradas como dañadas y cuantificadas (%) como células cometas (Fig. 4.4).

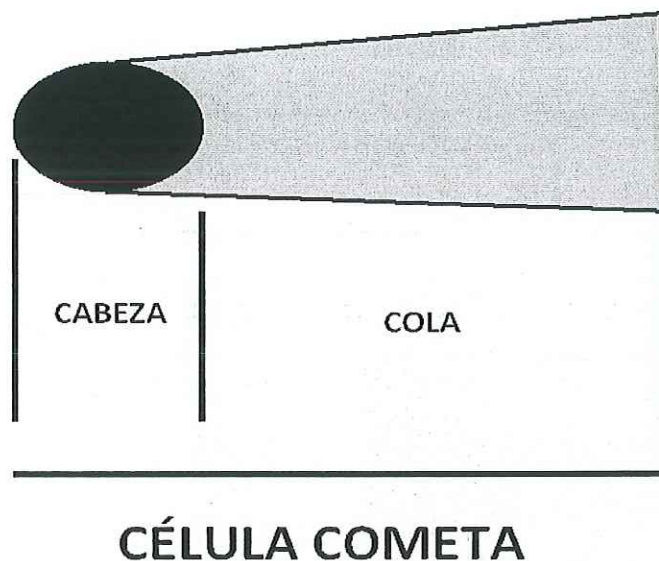


Figura 4.4. Cometa típico que muestra el esparcimiento del material genético (cola) cuando la célula (cabeza) es dañada.

IV Análisis estadístico.

Recolecta de esperma. El efecto de las diferentes temporadas de espermiación sobre la movilidad y el número de espermatozoides de la trucha de San Pedro Mártir fue evaluado mediante un ANOVA de una vía.

Citotoxicidad de los crioprotectantes. Para comparar el efecto de los diferentes ACPs (DMSO, DMA, ETG, GL, MT, PD), a las diferentes concentraciones (5%, 7%, 10% y 15%) sobre la movilidad espermática (%), en los diferentes tiempos (0, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 minutos), se utilizó un ANOVA de tres vías. Para determinar las concentraciones efectivas (EC50) de cada uno de los ACP evaluados en los espermatozoides de la TSPM a diferentes tiempos, se utilizó el Análisis "Probit" (Finney, 1971; Hong et al., 1988).

Conservación a largo plazo. El efecto del DMSO, DMA o MT sobre la movilidad espermática de la TSPM antes de ser congelados, fue evaluado con un ANOVA de una vía. Después del proceso de congelación/descongelación de los espermatozoides de la TSPM; el efecto de los ACPs mencionados anteriormente, fue evaluado sobre la movilidad, integridad de membrana y daño al ADN con un ANOVA de dos vías.

Para detectar diferencias significativas específicas se utilizó la prueba *a posteriori* de Tukey HSD ($\alpha = 0.05$). El análisis estadístico fue realizado con el paquete estadístico SAS para Windows® (SAS Institute, Cary, North Carolina).

Los resultados obtenidos en porcentaje fueron transformados a la raíz cuadrada del arcoseno antes de ser evaluados con el ANOVA, y se consideró un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$.

RESULTADOS

Recolecta de esperma de la trucha de San Pedro Mártir. De los ocho machos mantenidos en cautiverio, solo siete espermiaron. La liberación de esperma por la TSPM durante Marzo y Abril de 2009 fue significativamente diferente tanto en el porcentaje de movilidad ($F_{4,08} = 9.29$, $P = 0.0041$) como en el número de espermatozoides ($F_{2,05} = 225.40$, $P < 0.0001$). En cuanto al volumen total, se obtuvieron 1.6 mL de esperma durante Marzo y 1.2 mL durante la recolecta de Abril (Fig. 4.5). Los promedios ($\pm$ desviación estándar) de movilidad más altos ($91 \pm 6\%$) y concentración de espermatozoides ($4772 \pm 639 \times 10^6$), fueron obtenidos durante la recolecta de esperma en Marzo y disminuyeron en Abril ($86 \pm 6\%$, $2500 \pm 270 \times 10^6$, respectivamente).

Figura 4.5. Espermatozoides de la trucha de San Pedro Mártir a un aumento de 400X.

Citotoxicidad de los crioprotectantes. Con respecto al control, los espermatozoides que fueron suspendidos en las diferentes concentraciones de los distintos ACPs (DMSO, DMA, ETG, GL, MT y PD), presentaron diferencias significativas en el porcentaje de movilidad ($F_{1,77} = 280.54$, $P < 0.0001$) conforme

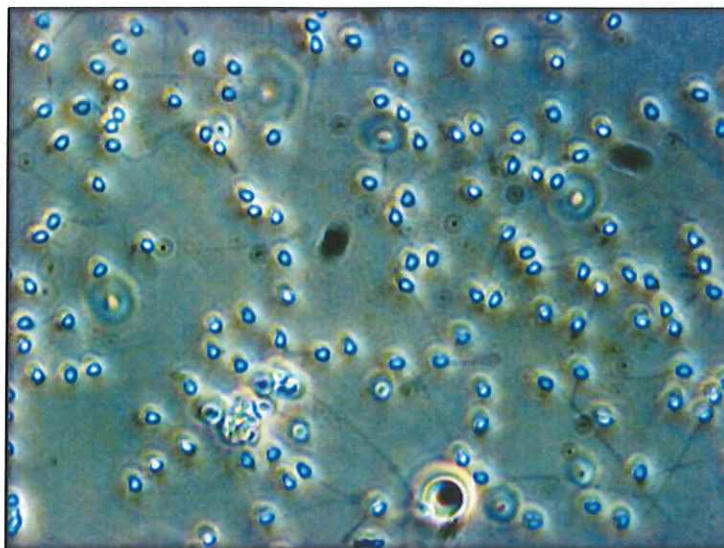


Figura 4.5. Espermatozoides de la trucha de San Pedro Mártir a un aumento de 400X.

Citotoxicidad de los crioprotectantes. Con respecto al control, los espermatozoides que fueron suspendidos en las diferentes concentraciones de los distintos ACPs (DMSO, DMA, ETG, GL, MT y PD), presentaron diferencias significativas en el porcentaje de movilidad ($F_{1,77} = 280.54$, $P < 0.0001$) conforme aumentó el tiempo de exposición del esperma al ACP. El efecto citotóxico sobre la movilidad espermática estuvo relacionado con la concentración del ACP y el tiempo de exposición. Los porcentajes más altos de movilidad (55.6%) fueron encontrados en los espermatozoides suspendidos en MT a los 5 minutos y concentraciones de 5 y 7%. Los mantenidos en ETG perdieron movilidad desde el inicio del experimento en todas las concentraciones evaluadas, y con DMA, PD, GL y DMSO, la movilidad fue $<20\%$ (Fig. 4.6). El orden de toxicidad de menor a mayor encontrado en los experimentos fue:

$$MT < DMA < DMSO < PD < GL < ETG.$$

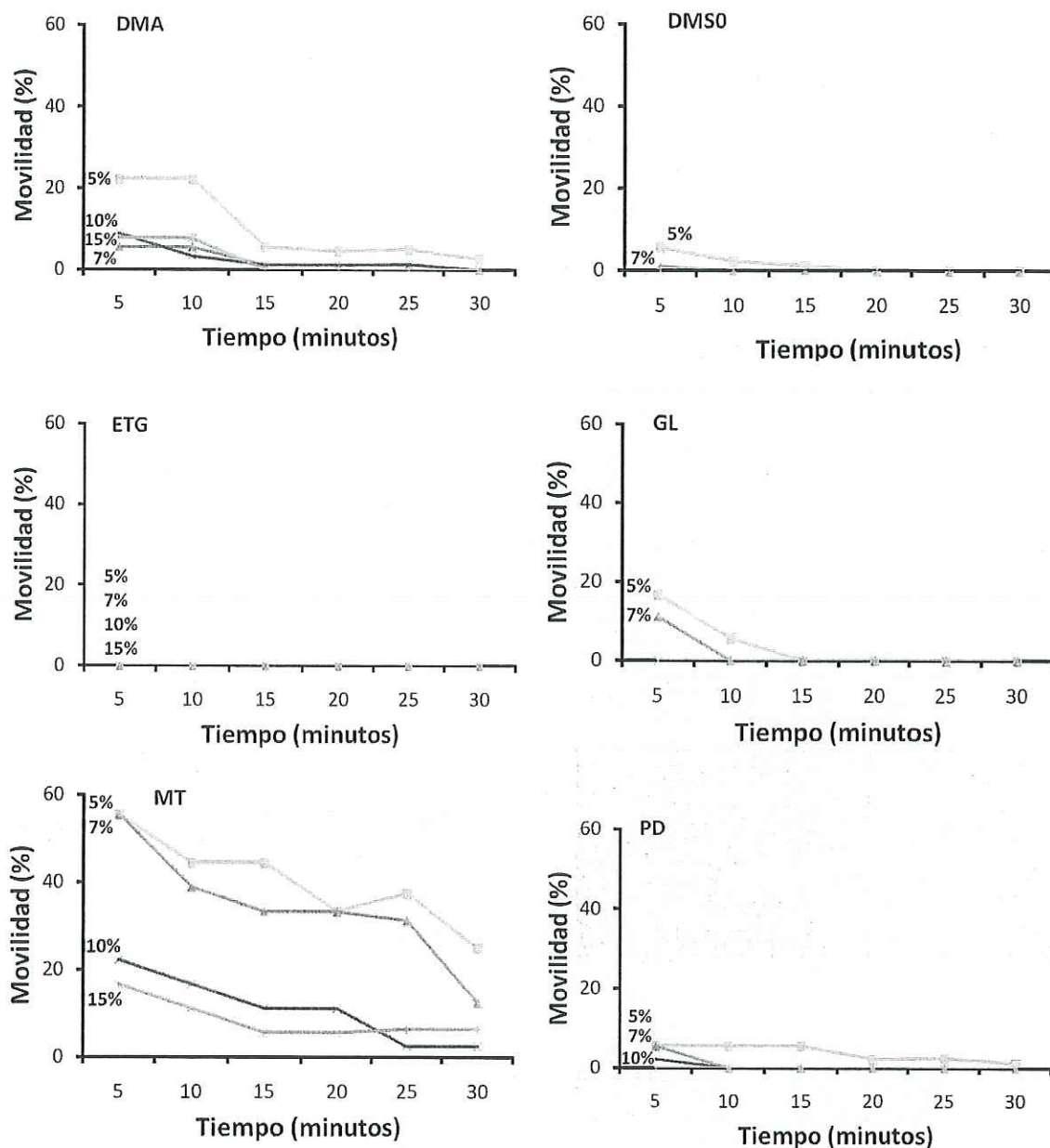


Figura 4.6. Efecto citotóxico de los diferentes crioprotectantes (MT [metanol], DMA [N-N, Dimetil acetamida], GL [Glicerol], DMSO [Dimetil sulfóxido], PD [1,2-Propanodiol] y ETG [Etilenglicol]), en la movilidad de los espermatozoides de la trucha de San Pedro Mártir, en cuatro diferentes concentraciones e incubados en diferentes tiempos de equilibrio. La muestra control presentó del 80-90% de movilidad en los diferentes tiempos.

De acuerdo al análisis "Probit", las EC50 de los diferentes ACPs al 5% fueron entre 0.00% para el ETG y hasta 6.28%% con el MT (Tabla IV.1). Este último valor representa el mayor porcentaje de movilidad espermática después de ser suspendidos en el ACP, por lo que el MT a una concentración del 5% con 5 minutos de equilibrio fue seleccionado para ser utilizado como ACP. El ETG, PD, DMSO, GL y DMA no fueron recomendables para el espermatozoide de la TSPM.

Tabla IV.1. Determinación del EC50 para los espermatozoides de *O. mykiss nelsoni*, suspendidos en los diferentes ACPs (MT [metanol], DMA [N-N, Dimetil acetamida], GL [Glicerol], DMSO [Dimetil sulfóxido], PD [1,2-Propanodiol] y ETG [Etilenglicol]) por 30 minutos.

Tiempo (min)	EC50 (%)					
	DMA	DMSO	ETG	GL	MT	PD
5	0.91	2.53	0.00	3.20	6.28	0.998
10	1.22	0.00	0.00	0.00	4.67	0.00
15	1.44	0.00	0.00	0.00	4.71	0.00
20	1.10	0.00	0.00	0.00	3.76	0.00
25	1.19	0.00	0.00	0.00	4.15	0.00
30	0.00	0.00	0.00	0.00	2.25	0.00

Congelación a largo plazo del espermatozoide. El porcentaje de movilidad de los espermatozoides suspendidos en los diferentes ACPs antes de iniciar el proceso de congelación fue significativamente diferente ($F_{4,07} = 342.84$, $P < 0.0001$). Antes de la congelación, los espermatozoides que fueron suspendidos en 5% MT presentaron los más altos porcentajes de movilidad ($58 \pm 1.67\%$) y los mantenidos en 5% DMSO los valores más bajos ($18 \pm 1.67\%$).

Después de que los espermatozoides de la TSPM fueron congelados y posteriormente descongelados, no se observó movilidad. Sin embargo, sí se obtuvo viabilidad celular, en términos de integridad de membrana (Fig. 4.7) y ADN (Fig. 4.8). Diferencias significativas fueron encontradas en cuanto a la integridad de membrana ($F_{1,97} = 3245.13$, $P < 0.0001$) y daño al ADN ($F_{2,27} = 367.81$, $P < 0.0001$) de los espermatozoides mantenidos en los diferentes tratamientos.

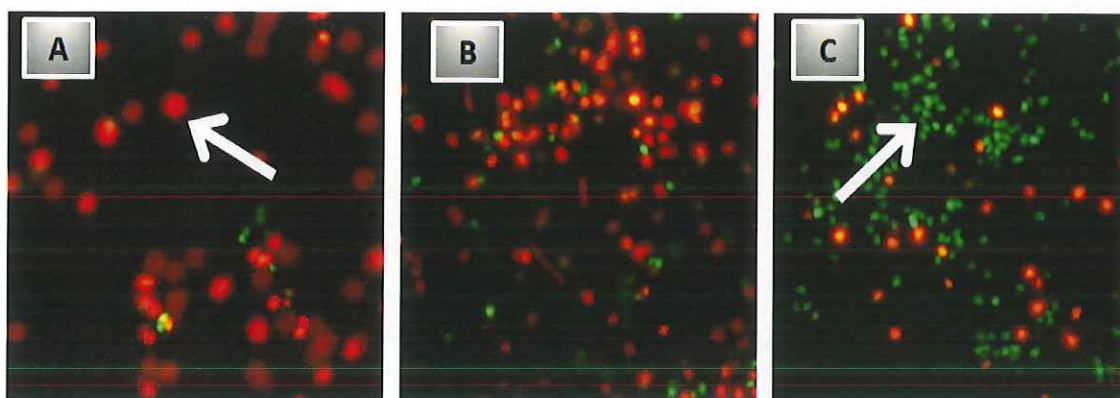


Figura 4.7. Integridad de membrana en los espermatozoides de la trucha de San Pedro Mártir criopreservados con DMSO A), DMA B) o MT C). Las observaciones fueron realizadas en un microscopio de fluorescencia a un aumento de 200X, usando un filtro azul (excitación 490 nm y emisión 510 nm). Los espermatozoides con membrana dañada (de color rojo) y con membrana íntegra (color verde) están señalados por la flechas.

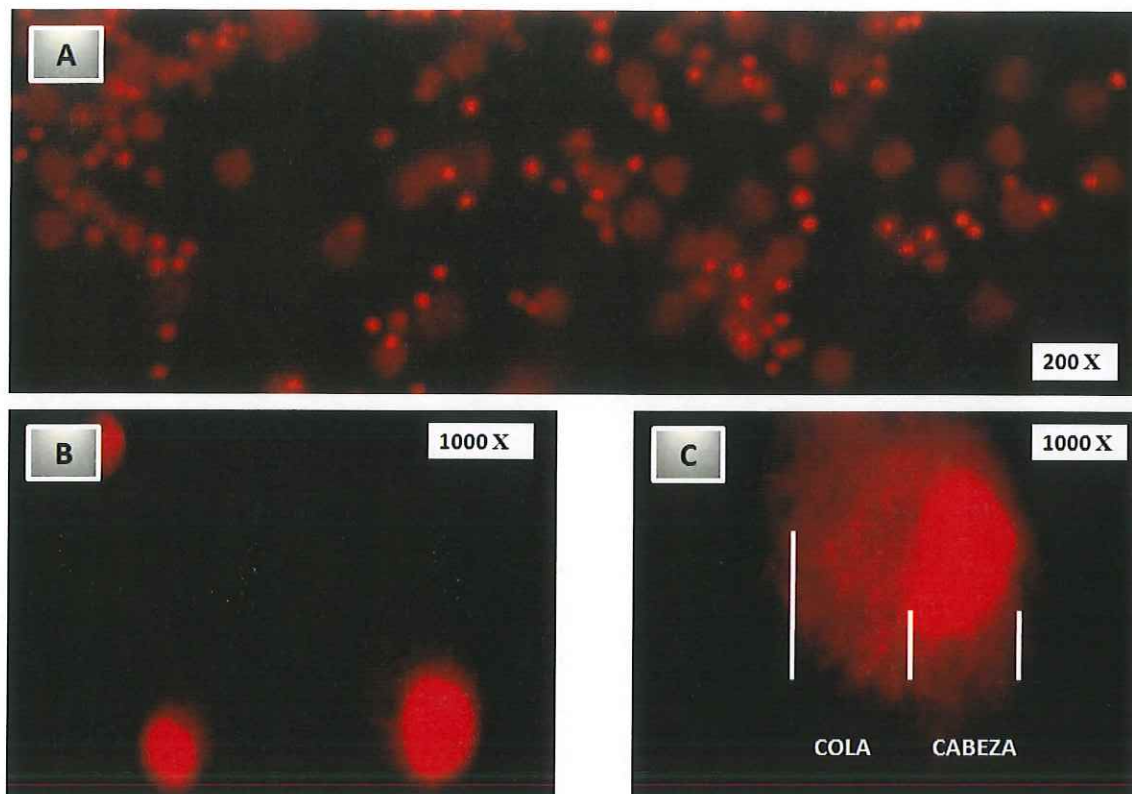


Figura 4.8. Ensayo cometa. Integridad de ADN de los espermias de la trucha de San Pedro Mártir criopreservados con DMSO A). Muestra control B) y espermias con peróxido de hidrógeno C). Las observaciones fueron realizadas en un Microscopio de Fluorescencia utilizando un filtro de excitación de 510-560 nm.

Los espermias criopreservados en los diferentes ACP y descongelados a 40°C por 7 segundos presentaron la mejor viabilidad. El mayor número de espermatozoides con integridad en la membrana ($63.17 \pm 0.85\%$) y ADN ($68.56 \pm 1.88\%$), fueron obtenidos cuando se utilizó MT como ACP.

Cuando los espermias fueron descongelados en temperaturas de 25°C por 20 segundos, y criopreservados con DMSO o MT, se obtuvieron los valores más bajos ($4.24 \pm 0.30\%$) en cuanto a integridad de membrana. La integridad del ADN alcanzó sus valores más bajos ($21.04 \pm 0.73\%$) en estas temperaturas de descongelación en espermias criopreservados con DMA (Fig. 4.9).

En los espermias de la TSPM la integridad de membrana fue afectada de manera importante por el proceso de descongelación. Temperaturas de 40°C (7 s) y MT como ACP favorecieron la integridad de la membrana (Fig. 4.9). El orden de menor a mayor daño con respecto a la temperatura fue: 40°C (7 s) < 35°C (10 s) < 25°C (20 s), y con respecto al tipo de ACP: MT < DMA < DMSO.

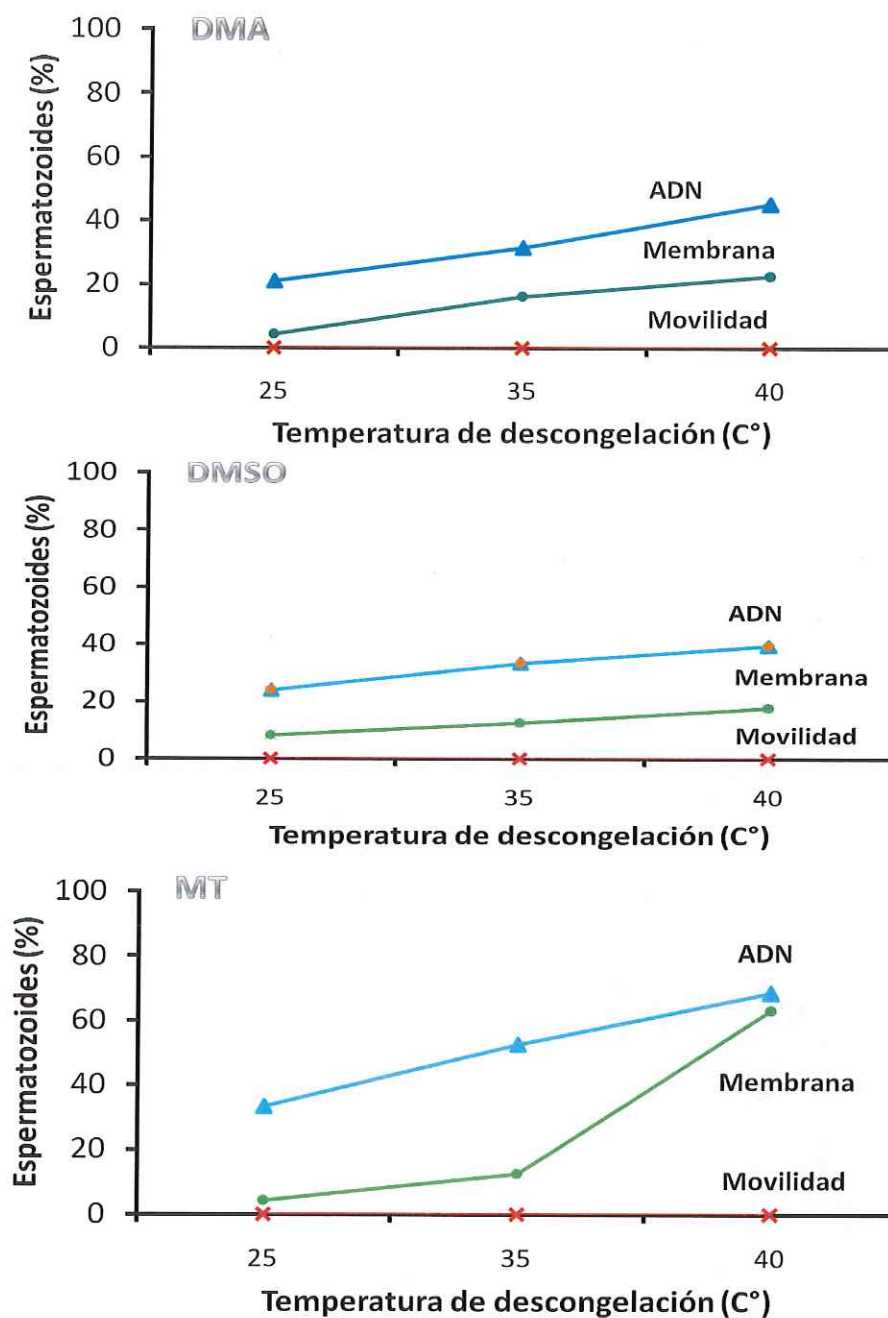


Figura 4.9. Efecto de la temperatura de descongelación en la movilidad, integridad de membrana y de ADN de los espermios de *O. mykiss nelsoni*, criopreservados con DMSO 5% (Dimetil sulfóxido), DMA 5% (N-N, Dimetil acetamida) o MT 5% (Metanol) como crioprotectantes. El control presentó de un 88% para la movilidad, un 87% para la integridad de membrana y un 92% para daño al ADN.

DISCUSIONES

Durante la criopreservación las células son expuestas a un considerable estrés físico-químico y su calidad y supervivencia pueden ser alteradas. Estudios previos con espermias criopreservados de peces han reportado daños a nivel de la movilidad, integridad y funcionalidad de la membrana plasmática, integridad del ADN y desarrollo embrionario (Cabrita et al., 2005, Pérez-Cerezales et al., 2010). Por tanto, el uso de diferentes aditivos químicos con características crioprotectoras y diversos métodos de congelación/descongelación, han sido evaluados para mejorar la supervivencia de los espermatozoides de peces durante su criopreservación (Tiersch, 2000; Medina-Robles, 2005; Cabrita et al., 2009).

En el presente estudio los espermias de la TSPM suspendidos en los diferentes ACPs presentaron una movilidad mayor cuando fueron suspendidos en MT y ausente cuando se colocaron en ETG, el cual resultó ser el ACP más tóxico. Además, conforme incrementó la concentración de los distintos ACPs y su TE, la movilidad espermática disminuyó.

Actualmente los aditivos químicos como el DMSO, GL y MT han sido ampliamente usados como ACPs en espermia de peces de agua dulce (McAndrew et al., 1993; Medina-Robles et al., 2005). Sin embargo, su efecto puede variar con las condiciones del sistema de experimentación y la especie (Fahy et al., 1987; Yao et al., 2000). El DMSO es el ACP más utilizado, aunque

en peces los resultados obtenidos en las diferentes especies muestran gran variabilidad (Medina-Robles et al., 2005). Este químico ha mostrado gran eficiencia en el proceso de criopreservación de esperma de *Thymallus thymallus* (Lahnsteiner et al., 1996b), *Chalcalburnus chalcoides* (Lahnsteiner et al., 2000), *Brycon siebenthalae* (Cruz-Casallas, et al., 2004) y *O. mykiss* (Robles et al., 2003; Tekin et al., 2007; Betancur et al., 2008; Aral et al., 2009). No obstante, resultados no satisfactorios han sido reportados en esperma de *Acipenser fulvescens* (Ciereszko, 1999), así como en el presente trabajo con la TSPM. De la misma manera, el DMA y el GL han sido reportados con buenos resultados en esperma de peces como la trucha arcoíris (McNiven et al., 1993; Lahnsteiner, 2000; Babiak et al., 2001), pero en el esperma de la trucha de San Pedro Mártir estos ACP no fueron eficientes.

El DMSO es considerado menos tóxico que el DMA y con una habilidad mayor para penetrar en la célula que el GL, por lo que su efecto letal acorde a Farshad et al. (2009) puede ser atribuido más a nivel bioquímico que al daño causado por el efecto osmótico. Cuando el DMSO penetra la célula se concentra en la región adyacente de la bicapa lipídica, por lo que la interacción electrostática de este aditivo con los fosfolípidos puede ser crítica para la viabilidad de la membrana post-descongelación (Porcu et al., 2001). Con el propósito de minimizar el efecto tóxico de estos aditivos químicos en las células, Best (2010) propone disminuir el tiempo de exposición entre estos dos componentes. Sin embargo, en este estudio TE cortos (<5 minutos) igualmente afectaron la movilidad espermática de

la TSPM, lo que podría sugerir que este ACP tuvo un efecto tóxico en los espermatozoides de esta trucha sin importar el TE. Por tanto, este aditivo químico no fue recomendado para los espermatozoides de esta trucha. Además cabe mencionar que de las propiedades importantes que le confieren al DMSO su facilidad de combinación con otros agentes deletéreos o carcinógenos, lo que lo convierten en un compuesto con mayor potencial tóxico (Brayton, 1986).

En cuanto al MT, este aditivo químico ha sido utilizado eficientemente en espermatozoides de peces de agua dulce como *Clarias gariepinus* (Viveiros et al., 2001), *Tunakia limbata* (Ohta et al., 2001) y *O. mykiss* (Lahnsteiner et al., 2002; Salte et al., 2004). No obstante, los resultados obtenidos con el uso del MT como ACP han sido menos homogéneos que los observados con DMSO (Medina-Robles et al., 1995). En este estudio, el MT a una concentración del 5% fue considerado el ACP más adecuado antes y después del proceso de criopreservación. Lo anterior puede ser atribuido principalmente a su capacidad de salir y entrar más rápidamente de la célula (Harvey y Ashwood-Smit, 1982; Hagedorn et al., 1997; Tiersch et al., 2000), debido a su bajo peso molecular (peso molecular = 32) con respecto a los demás ACPs evaluados (peso molecular = 62-92).

El PD, es un aditivo químico que ha sido utilizado con buenos resultados en aletas de peces (Mauger et al., 2006), pero su aplicación en células germinales primordiales de estos organismos no han sido satisfactorios (Kobayashi et al., 2003). El ETG por su parte ha sido utilizado con buenos resultados en células germinales de peces como la trucha arcoíris (*O. mykiss*) o en espermatozoides del mono

(*Macaca fascicularis*) y en humanos (Kobayashi et al., 2003; Li et al., 2005). Sin embargo, en esperma de peces como *Piaractus brachypomus* (Navarro et al., 2004), *Scophthalmus maximus* (Dreanno et al., 1997) y *Clupea pallasii* (Pillai et al., 1994), las expectativas con este ACP no fueron buenas. En los espermatozoides de la TSPM el efecto citotóxico de PD y el ETG fue evidente, principalmente con este último, el cual ocasionó la muerte de todos los espermatozoides desde el momento en que entraron en contacto con este aditivo químico.

Los trabajos de Wayman y Tiersch (2000) sugieren minimizar la concentración de los ACPs a fin de disminuir la pérdida de la movilidad atribuida al efecto tóxico de los ACP. Incluso, Bromage y Roberts (2001) reportan que la concentración adecuada de los ACP podría estar en función del tipo de aditivo químico, del TE o del criterio usado para la evaluación de la viabilidad post-descongelación.

En peces, los ACPs comúnmente utilizados, son manejados generalmente con TE cortos (5-15 minutos) y concentraciones de 7 a 15% (Bromage y Roberts, 2001). En especies de agua dulce el DMSO ha sido utilizado con buenos resultados en concentraciones de 5 al 15% (Robles et al., 2003; Navarro et al., 2004; Akçay et al., 2004; Bozkurt y Seçer, 2005; Tekin et al., 2007; Aral et al., 2009), el MT en 10% (Babiak et al., 2002; Lahnsteiner et al., 2002; Navarro et al., 2004) y el DMA del 15-20% (Wernecke y Pluta, 2003; Akçay et al., 2004). En este estudio con base en el análisis "Probit", concentraciones entre 4-6% de MT o de 0-3% para los demás ACP evaluados con TE de 5-10 minutos fueron recomendadas para los espermatozoides de la TSPM. Sin embargo, esta concentración

podría no ser suficiente para proteger a los espermatozoides de la TSPM durante su criopreservación. Incluso, concentraciones demasiado altas pueden ocasionar alteraciones a nivel bioquímico y osmótico (Chain, 2010) que afecten la calidad (movilidad y viabilidad) de los espermatozoides de esta trucha.

No obstante, los trabajos en peces salmónidos (Legendre y Billard, 1980; Stoss y Holtz, 1983; Lahnsteiner et al., 1992; Piironen, 1993; Lahnsteiner, 2000) sugieren minimizar o anular los TE. Esto con el propósito disminuir el efecto citotóxico de los aditivos químicos en las células espermáticas. Lo anterior se debe a que los espermatozoides de estos peces son células pequeñas (ancho de la cabeza 2-3 μm) y por tanto, no existen barreras de permeabilidad que limiten la penetración de estos aditivos químicos. Incluso, escasos estudios reportan que la implementación de un TE mejora la calidad del espermatozoide de estos peces post-descongelación (Baynes y Scott, 1987; Lahnsteiner et al., 1992).

En el presente estudio, TE cortos (0-5 min) presentaron los mejores porcentajes de movilidad espermática pre-congelación en la TSPM. Lo anterior se debe posiblemente a lo antes mencionado con respecto al tamaño de los espermatozoides de esta trucha (ancho de la cabeza 2.14 μm) y al tipo de químico utilizado como ACP.

La temperatura del sistema en la cual la interacción espermatozoide/ACP es llevada a cabo también ha sido relacionada con el efecto citotóxico de los ACPs sobre las células (Conget et al., 1996). Se ha sugerido que en bajas temperaturas se

necesitan grandes períodos de equilibrio y en altas temperaturas periodos más cortos (Chain, 2010). Sin embargo, los resultados en el presente estudio no apoyan esta aseveración, ya que en los espermatozoides de la TSPM las bajas temperaturas de exposición entre el ACP y el espermatozoide (4°C) con prolongados TE (>5 minutos), no fueron favorables en la movilidad pre-congelación de los espermatozoides. Aunque se coincidió en que una disminución de la temperatura en la cual las células son expuestas a altas concentraciones de solutos, podría resultar en un daño menor. Lo anterior es debido a que altas temperaturas favorecen las uniones hidrofóbicas de los ACPs con las proteínas, lo que puede ocasionar su desnaturalización (Arakawa et al., 1990; Chao, 1991).

Los distintos ACPs, las diferentes concentraciones de cada uno y diferentes TE en la solución crioprotectora, son factores relevantes en los resultados que se obtienen en la calidad del espermatozoide antes de ser criopreservados (Fahy et al., 1987; Rana, 1995). No obstante, durante la criopreservación factores como el método de enfriamiento y la tasas de enfriamiento han sido reportados como factores determinantes en la calidad y viabilidad espermática de peces de agua dulce (Cabrita et al., 2009).

Cuando los espermatozoides de la TSPM fueron criopreservados; el MT de nuevo resultó tener más características crioprotectoras que el DMA o el DMSO (todos en una concentración del 5%). No obstante, los espermatozoides criopreservados en estos tres ACP presentaron un evidente daño a nivel de ADN e integridad de membrana. Aunque este daño fue menor comparado con el efecto que tuvieron

en la movilidad espermática post-descongelación, la cual fue completamente nula en cualquiera de estos tres ACP.

Estudios previos en espermatozoides de humanos (Isachenko et al., 2004), perros (Stornelli y De la Sota, 2006), cerdos (Sancho et al., 2007), monos (Li et al., 2005) y peces (Muchlisin, 2005) sugieren que la movilidad post-descongelación disminuye significativamente después de la criopreservación con respecto a la movilidad evaluada en espermatozoides frescos. Los trabajos de Wernecke y Pluta (2003) en espermatozoides de *Cyprinus carpio* reportan que la mejor movilidad post-descongelación (40%) se obtuvo con DMA a una concentración entre 15-20%, y usando VN₂L como método de enfriamiento, antes de ser sumergidos en N₂L. En este estudio, utilizando el mismo método de enfriamiento y ACP como DMSO o DMA o MT a una concentración del 5%, la movilidad post-descongelación fue nula.

En peces de agua dulce, el enfriamiento de espermatozoides con VN₂L ha sido ampliamente utilizado (Medina-Robles et al., 2005) y pese a que algunos estudios no recomiendan el uso de VN₂L para enfriar (Bromage y Roberts 2001), algunos otros (Wernecke y Pluta, 2003; Ávila-Portillo et al., 2006) sugieren que esta técnica puede dar lugar a tasas de vida satisfactorias. Lo anterior se debe a que el VN₂L tiene una distribución de la temperatura más uniforme que el método de enfriamiento programable (Salinas-Flores, 2003) y puede manejar diferentes tasas de congelamiento, lo que no sucede cuando se utiliza hielo seco (Bromage y Roberts, 2001). Además es un método de fácil aplicación y que no requiere de

equipos especializados (Lahnsteiner, 2000). No obstante, la tasa y la temperatura de enfriamiento antes de la inmersión en N_2L son determinantes en la supervivencia celular (Bromage y Roberts, 2001).

En este estudio, las pajillas con esperma fueron colocadas en VN_2L ($-70^{\circ}C$) durante 10 minutos con una tasa de enfriamiento de $-32^{\circ}C/min$ y después sumergidas en N_2L ($-196^{\circ}C$). Estudios similares demostraron ser eficientes en la criopreservación del esperma de *O. mykiss*, *Cyprinus carpio*, *Polyodon spathula*, *Acipenser brevirostrum* y *Scaphirhynchus albus* (Vargas, 2001; Lahnsteiner et al., 2002; Robles et al., 2003; Akçay et al., 2004; Bozkurt, 2005; Horvath et al., 2008; Aral et al., 2009). Sin embargo, en los espermatozoides de la TSPM la movilidad post-descongelación fue completamente nula.

Estudios previos en peces sub-tropicales y tropicales (Bromage y Roberts, 2001) sugieren que estas especies prefieren bajas tasas de enfriamiento. En especies como *Dicentrarchus labrax* y *Tanakia limbata*, tasas de enfriamiento de $5-15^{\circ}C/min$ resultaron en una alta activación post-descongelación (Billard, 1978; Ohta et al., 2001). No obstante, especies de aguas más frías como la trucha arcoíris, prefieren tasas entre $30-80^{\circ}C/min$ (Scott y Baynes, 1980; Baynes y Scott, 1987; McAndrew et al., 1993).

Considerando que altas tasas de enfriamiento son preferidas por especies de aguas frías, posiblemente en los espermatozoides de la TSPM la tasa evaluada, aunque cae dentro del intervalo sugerido para *O. mykiss*, no fue lo suficientemente alta.

Estas condiciones pudieron ocasionar que los espermatozoides se deshidrataran en extremo y quedaran expuestos a altas concentraciones de solutos, ocasionando un daño a nivel osmótico y posibles alteraciones en la movilidad, como ha sido sugerido en espermatozoides de humanos y cerdos (O'Connell et al., 2002; Cerolini et al., 2001). Por tanto, futuros estudios con tasas de enfriamiento mayores podrían ser dirigidos en los espermatozoides de esta subespecie de trucha.

Aunque la movilidad ha sido comúnmente empleada en peces como indicadora de la calidad espermática, su relación con la habilidad de fertilizar aún no está del todo claro. Estudios previos en *O. mykiss* (Ciereszko et al., 1999) reportan que porcentajes nulos de movilidad (post-descongelación) ocasionaron un 68% de fertilización. Así, aunque la movilidad es a menudo usada como un criterio de viabilidad celular, ésta podría ser acompañada por otro método de evaluación más objetivo, como la integridad de membrana o ADN.

En peces, la membrana plasmática cumple un papel importante en las diferentes actividades celulares y rutas de señalización, que pueden conducir entre otros a la activación de la movilidad espermática (Márian et al., 1993) y a la habilidad de los espermatozoides para el proceso de fertilización (Cabrita et al., 2001b). No obstante durante el proceso de criopreservación se modifica su fluidez y se altera su permeabilidad (Hazel, 1995; Batellier et al., 2001, O'Connell et al., 2002).

Estudios en peces de agua dulce han reportado daños en membrana y ADN, los cuales fueron asociados al proceso de enfriamiento/descongelación (Bromage y

Roberts 2001; Cabrita et al., 2005). En este estudio, los espermatozoides de la TSPM criopreservados con DMSO o DMA o MT, presentaron daño en la membrana, el cual fue superior al ocasionado a nivel de ADN, pero significativamente menor con respecto al obtenido en la movilidad espermática. Esta diferencia puede ser atribuida a que espermatozoides que no presentaron movimiento, tenían una integridad de membrana intacta (Salinas-Flores, 2003). Por lo que es probable que estructuras involucradas en la movilidad del espermatozoides (axonema del flagelo y/o mitocondria) de la TSPM fueron alteradas (Billard et al., 2000; Tabares et al., 2005). Resultados similares a lo encontrado en este estudio, han sido reportados en espermatozoides de *Macaca fascicularis* (Li et al., 2005) y de humanos (Isachenko et al., 2004). No obstante, en espermatozoides de carnero este patrón difiere ya que la membrana plasmática fue más sensible que la parte locomotora de la célula espermática. En virtud de lo anterior, es evidente una respuesta especie-específica ante el proceso de congelación/descongelación.

Además en el presente estudio, la temperatura de descongelación y el tipo de ACP fueron factores determinantes en la viabilidad de los espermatozoides de la TSPM. Temperaturas de 40°C y MT como ACP presentaron una integridad de membrana y de ADN superior que cuando se utilizaron temperaturas bajas de descongelación (25°C) y ACP como DMSO o DMA. Cabe señalar que a pesar de la eficiencia reportada de estos dos factores en la viabilidad espermática de *O. mykiss* (Babiak et al., 2002; Cabrita et al., 2005; Tekin et al., 2007; Aral et al., 2009), éstos no fueron recomendables en los espermatozoides de la TSPM.

En cuanto al ADN, los estudios realizados en *O. mykiss*, *Salmo trutta* y peces marinos como *Dicentrarchus labrax*, las alteraciones por el proceso de enfriamiento/descongelación en el espermatozoides de estas especies fueron vinculadas a nivel de la cromatina (Billard 1983; Labbé et al., 2001; Zilli et al., 2003). Además, este daño no afectó el proceso de la fertilización, supervivencia ni la calidad de la descendencia de estas especies. No obstante, los estudios de Quintero (2003) realizados en espermatozoides de caballo, cerdo y conejos sugieren que las lesiones a nivel de la cromatina pueden incrementar la mortalidad embrionaria. En peces, estudios recientes en trucha arcoíris encuentran que los espermatozoides criopreservados de esta especie con un daño a nivel de ADN, mantuvieron su habilidad para fertilizar pero, la supervivencia de los embriones obtenidos fue afectada (Pérez-Cerezales et al., 2010).

Cabrita et al., (2005) sugieren que en trucha arcoíris la vulnerabilidad del ADN a la desnaturalización, tiene que ver con el nivel de empaquetamiento de la cromatina y de la tasa de histonas/protaminas en espermatozoides, el cual es diferente para cada especie. Lo que explica, el porqué los daños de ADN detectados en espermatozoides de humanos, por ejemplo, no son reportados en otras especies como cerdos (Evenson et al., 1994; Hammadeh et al., 2001). En la TSPM desafortunadamente no existe información sobre la estructura de la cromatina. Sin embargo, la fragmentación del ADN en los espermatozoides criopreservados de estos peces pudo estar vinculada con un estrés hipertónico, el cual ha sido ya reportado en peces (Hashimoto et al., 1998).

En el presente estudio, durante el ensayo cometa el procedimiento de lisis se realizó en una solución hiperosmótica durante largo tiempo (1 h) y esto, aunado al tipo de ACP (principalmente con DMSO o DMA), TE (>5 minutos) y proceso de enfriamiento/descongelación (temperaturas de descongelación de 25°C), pudieron haber contribuido con la fragmentación del ADN de estos espermatozoides. Además, de la posible contribución ocasionada por eventos apoptóticos (Cabrita et al., 2005). En peces, los trabajos de Labbé et al. (2001) reportan que los espermatozoides de la trucha arcoíris criopreservados con DMSO (10%) no presentaron un efecto significativo en la fragmentación de ADN. No obstante, los resultados de este estudio sugieren que la adición del DMSO en ninguna de las concentraciones evaluadas fue recomendada para la criopreservación de los espermatozoides de la TSPM.

A la fecha, se sugiere que la inestabilidad del ADN producida por la criopreservación podría ser reparada por el ovocito después de la fertilización y que este mecanismo de reparación podría estar en función del tipo y el nivel de daño (Ahmadi y Soon-Chye, 1999; Kopeika et al., 2004). En espermatozoides de humanos, los trabajos de Ahmadi (1999) reportan que los ovocitos tienen la capacidad de reparar el daño en el ADN del espermatozoides solo cuando el daño es menor al 8%. En peces como *O. mykiss*, se ha reportado que al menos un 10% del daño del ADN de los espermatozoides criopreservados es reparado por el ovocito durante la primera división de la célula fecundada (Pérez-Cerezales et al., 2010), no obstante, el proceso de reparación aún no es del todo claro.

La evaluación de la magnitud del daño a nivel de ADN resulta ser importante debido a la especificidad de los espermatozoides de las distintas especies durante el proceso de criopreservación. Además de las repercusiones que pudieran tener sobre la calidad del espermatozoide, el estado de fertilización del macho y el desarrollo ontogénico de los organismos producidos por el material criopreservado (Isachenko et al., 2004). Desafortunadamente a pesar de la importancia potencial del efecto de criopreservación sobre el genoma de las células reproductivas, los reportes en la literatura sobre este tema han sido limitados.

En este estudio, los espermatozoides de la TSPM criopreservados con MT (5%) presentaron una resistencia superior al proceso de criopreservación que los que fueron congelados con DMSO o DMA (5%). Los daños en la movilidad y membrana plasmática fueron evidentes en los espermatozoides criopreservados, principalmente a temperaturas bajas de descongelación. Además los resultados de este estudio comprueban que los daños en el ADN son una causa más de crio-daño en espermatozoides criopreservados de peces. El hecho de no tener movilidad en los espermatozoides criopreservados con los distintos ACP evaluados, no fue determinante en la calidad del espermatozoide de esta subespecie de trucha. Lo anterior posiblemente debido a que la integridad de membrana y principalmente la integridad del ADN de los espermatozoides de esta subespecie presentaron porcentajes de integridad entre 4-63% en membrana, y la diferencia entre la integridad de membrana y la del ADN fluctuó entre un 57% y un 61% en los distintos ACP y temperaturas de descongelación. Por tanto, podemos mencionar

que los mecanismos que controlan estos parámetros (movilidad, integridad de membrana y de ADN) presentaron una resistencia diferente al proceso de criopreservación y que los responsables de la movilidad son los más sensibles, y los que regulan la integridad del ADN los más resistentes en los espermatozoides de la TSPM.

Actualmente la técnica de criopreservación utilizada en peces ha contribuido de manera importante durante los procesos de reproducción en cautiverio. Los beneficios se han visto reflejados en la sincronización con la disponibilidad de gametos, transporte de gametos, simplificación en la manutención de reproductores y almacenamiento de información de germoplasma para programas de selección genética o conservación de las especies (Cabrita et al., 2010). Lo anterior sin duda beneficiará a la industria de la acuicultura. Incluso, la criopreservación aplicada en espermatozoides de especies en peligro de extinción como es el caso de la TSPM, podría contribuir con la conservación de su población. No obstante, estudios posteriores sobre la correlación del daño del ADN con la fertilidad y la tasa de eclosión y variabilidad genética de la descendencia podrían realizarse para determinar el grado de daño que puede ser aceptado para el uso de espermatozoides criopreservados con propósitos comerciales y de banco de genes.

En el presente estudio, determinamos el efecto de la criopreservación en la movilidad, integridad de membrana y ADN de los espermatozoides de la TSPM, especie cuyo estatus requiere de protección especial debido a su baja abundancia en el medio natural. La importancia de este análisis radica en que el material

congelado formará parte del "Banco Periférico de Recursos Genéticos Acuáticos en México", y será considerado para futuros estudios de reproducción de esta especie en cautiverio, con fines de conservación. Además cabe mencionar que ante las nuevas modificaciones climáticas en el hábitat de esta subespecie de trucha, la vulnerabilidad de su población puede verse incrementada, por tanto este tipo de estudios cobra mayor relevancia.

LITERATURA CITADA

- Ahmadi, A. y N. Sonn-Chye, 1999. Fertilizing ability of DNA damaged spermatozoa. *The Journal of Experimental Zoology*. 284(6):696-704.
- Akçay, E., Y. Bozkurt, S. Seçer y N. Tekin, 2004. Cryopreservation of mirror carp semen. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*. 28:837-843.
- Arakawa, T., J. F. Carpenter, Y. A. Kita y J. H. Crowe, 1990. The basis for toxicity of certain cryoprotectants: A hypothesis. *Cryobiology*. 27:401-415.
- Aral, F., E. Şahinöz, Z. Dogu y R. Demirkol, 2009. Effect of Equilibration Times on Sperm Cryopresevation of Juvenile Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* W. 1792). *International Journal of Natural and Engineering Sciences*. 3(1):09-12.
- Ávila-Portillo, L. M., J. I. Madero, C. López, M. F. León, L. Acosta, C. Gómez, L. G. Delgado, C. Gómez, J. M. Lozano y M. T. Reguero, 2006. Fundamentos de criopreservación. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*. 57(4):291-300.
- Babiak, I., J. Glogowski, K. Goryczko, S. Dobosz, H. Kuzminski, J. Strzezek y W. Demianowicz, 2001. Effect of extender composition and equilibration time on fertilization ability and enzymatic activity of rainbow trout cryopreserved spermatozoa. *Theriogenology*. 56(1):177-192.

- Babiak, I., J. Glogowski, S. Dobosz, H. Kuzminski y K. Goryczko, 2002. Semen from rainbow trout produced using cryopreserved spermatozoa is more suitable for cryopreservation. *Journal of Fish Biology*. 60(3):561-570.
- Bart, A. N., 1999. Biodiversity and *ex situ* fish genetic conservation. *Australian Association for Mental Retardation National Newsletter*. 4(4):6-8.
- Batellier, F., M. Vidament, J. Fauquant, G. Duchamp, G. Arnaud, J. M. Yvon y M. Magistrini, 2001. Advances in cooled semen technology. *Animal Reproduction Science*. 68:181-190.
- Baumber, J., B. A. Ball, J.J. Linfor y S. A. Meyers, 2003. Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. *Journal of Andrology*. 24:621-628.
- Baynes, S. M. y A. P. Scott, 1987. Cryopreservation of rainbow trout spermatozoa: the influence of sperm quality, eggs quality and extender composition on post-thaw fertility. *Aquaculture*. 66:53-67.
- Best, B., 2010. Viability, cryoprotectant toxicity and chilling injury in cryonics. <http://www.benbest.com/cryonics/viable.html>. 30p.
- Betancur, J. L., A. F. Montoya, T. Mira, F. A Rojas y M. Olivera-Ángel, 2008. Estandarización del manejo y la criopreservación de semen de hembras masculinizadas de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 21:340-350.
- Bilinski, E., G. Gibbard, F. Lee, S. Gibbard, D. Smith y M. Peters, 1981. Evaluation of the quality of sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka*, stored in ice or partially frozen in salt fortified refrigerated sea water. *Canadian Technology Report of Fisheries and Aquatic Science*. Technology Services Branch Pacific Region, Department of Fisheries and Oceans, Vancouver British Columbia, Canada. 17 p.

- Billard, R., 1978. Some data in gametes preservation and artificial insemination in teleost fish. Le thon rouge en Méditerranée. Biologie et Aquaculture. Sète 9-12. Actes de colloques du Centre National Pour l'Exploitation des Océans (CNEXO). 8:59-73.
- Billard, R., 1983. Ultrastructure of trout spermatozoa: changes after dilution and deep-freezing. Cell and Tissue Research. 228:205-218.
- Billard, R., J. Cosson y O. Linhart, 2000. Changes in the flagellum morphology of intact and frozen/thawed siberian sturgeon *Acipenser baerii* (Brandt) sperm during motility. Aquaculture Research. 31:283-287.
- Blaxter, J., 1953. Sperm storage and cross-fertilization of spring and autumn spawning herring. Nature. 172:1189-1190.
- Blesbois, E., y C. Labbé, 2003. Main improvements in semen and embryo cryopreservation for fish and fowl. IN: Planchenault D. (ed). Workshop on Cryopreservation of Animal Genetic Resources in Europe, Paris. 55-65.
- Bozkurt, Y. y S. Seğer, 2005. Effect of short-term preservation of mirror carp (*Cyprinus carpio*) semen on motility, fertilization, and hatching rates. The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh. 57(3):207-212.
- Brayton, C. F., 1986. Dimethyl sulfoxide (DMSO): A review. The Cornell Veterinarian. (76):61-90.
- Bromage, N. R. y R. J. Roberts, 2001. Broodstock Management and Larval Quality. Niall R. Bromage y Ronald J. Roberts (eds). Institute of Aquaculture. Blackwell Science Ltd. Cambridge, Massachusetts. 424 p.
- Cabrita, E. V. Robles, R. Álvarez, M. P. Herráez, 2001a. Cryopreservation of rainbow trout sperm in large volume straws: Application to large scale fertilization. Aquaculture. 201:301-314.

- Cabrita, E., L. Anel y M. P. Herraéz, 2001b. Effect of external cryoprotectants as membrane stabilizers on cryopreserved rainbow trout sperm. *Theriogenology*. 56:623-635.
- Cabrita, E. V. Robles, L. Rebordinos, C. Sarasquete y M. P. Herráez, 2005. Evaluation of DNA damage in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) cryopreserved sperm. *Cryobiology*. 50:144-153.
- Cabrita, E. V. Robles y P. Herráez, 2009. Sperm quality assessment. IN: Cabrita E., Robles V. y Herráez P. (eds). *Methods in Reproductive Aquaculture. Marine and Freshwater Species*. CRC Press Taylor y Francis group. Boca Raton, Florida; 93-147.
- Cabrita, E., C. Sarasquete, S. Martínez-Páramo, V. Robles, J. Beirão, S. Pérez-Cerezales y M. P. Herráez, 2010. Cryopreservation of fish sperm: applications and perspectives. *Journal of Applied Ichthyology*. 26:623-635.
- Cerolini, S, A. Maldjian, F. Pizzi y M. Gliozzi, 2001. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. *Reproduction*. 121:395-401.
- Chain, R. C., 2010. Cryobiology: An overview. IN: Ri-Cheng Chian y Patrick Quin (eds). *Fertility Cryopreservation*. McGill. University Montreal; 1-10.
- Chao, N. H., 1991. Fish sperm cryopreservation in Taiwan: Technology advancement and extention efforts. *International Symposium on Reproductive Biology in Aquaculture*. Taipei: Department of Aquaculture. Taiwan Fisheries Research Institute. 51-143.
- Ciereszko, A., K. Dabrowski, F. Lin, S. A. Christ, y G. P. Toth, 1999. Effect of extenders and time of storage before freezing on motility and fertilization of

- cryopreserved Muskellunge spermatozoa. *Progressive Fisheries Culturist American Fisheries Society*. 128:542-548.
- Cloud, J., 2000. Cryopreservation of sperm of steelhead rainbow trout after refrigerated storage. IN: Terrence T. y Patricia M. (eds). *Cryopreservation in Aquatic species. The world Aquaculture Society Advances in World Aquaculture*. Baton Rouge, Louisiana; 101-103.
- Conget, P., M. Fernández, G. Herrera y J. Minguell, 1996. Cryopreservation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa using programmable freezing. *Aquaculture*. 143:319-329.
- Cruz-Casallas, P. E., S. C. Pardo-Carrasco, J. A. Arias-Castellanos, P. E. Lombo-Castellanos, D. A. Lombo-Rodríguez y J. E. Pardo-Mariño, 2004. Cryopreservation of yamú *Brycon siebenthalae* milt. *Journal of the World Aquaculture Society*. 35(4):529-535.
- Dreanno, C., M. Suquet, L. Quemener, J. Cosson, F. Fierville, Y. Normant y R. Billard, 1997. Cryopreservation of turbot (*Scophthalmus maximus*) spermatozoa. *Theriogenology*. 48:589-603.
- Evenson, D. P., J. E. Parks y L. K. Kaproth, 1993. Rapid determination of sperm cell concentration in bovine semen by flow cytometry. *Journal of Dairy Science*. 76:86-94.
- Evenson, D., P. L. Thompson y L. Jost, 1994. Flow cytometric evaluation of boar semen by the sperm chromatin structure assay as related to cryopreservation and fertility, *Theriogenology*. 41:637-651.
- Fahy, G. M., 1987. Biological effects of vitrification and devitrification. IN: Karow, A. M. y Peeg D. E. (eds). *Biophysics of Organ Cryopreservation*. Plenum Press. New York; 265-293.

- Fahy, G. M., D. I. Levy, S. E. Ali, 1987. Some emerging principles underlying the physical properties, biological actions, and utility of vitrification solutions. *Cryobiology*. 24:196-213.
- FAO, (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación)/PNUMA (Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente), 1984. Conservación de los recursos genéticos de los peces: problemas y recomendaciones. IN: FAO (eds). Informe de la Consulta de Expertos sobre los recursos genéticos de los peces. Documento técnico de Pesca. (217):42.
- Farshad, B., B. Khalili y P. Fazeli, 2009. The effect of different concentrations of glycerol and DMSO on viability on markhoz goat spermatozoa during different freezing temperatures steps. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 12(3):239-245.
- Figiel, C. Jr. y T. Tiersch, 1998. Cryopreservation methods: A review. *Aquatic sciences and fisheries, abstracts database*. World Aquaculture Society. Jul. 9, 2005. USA, Louisiana Baton Rouge. 1-143.
- Finney, D. J., 1971. *Probit analysis*. Cambridge University Press, Cambridge. 333 p.
- Flajšhans, M. J. Cosson, M. Rodina y O. Linhart, 2004. The application of image cytometry to viability assessment in dual fluorescence-stained fish spermatozoa. *Cell Biology International*. 28:955-959.
- Gao, D., P. Mazur, J. Critser, 1997. Fundamental cryobiology of mammalian spermatozoa. IN: Karow A. M, Critser J. K. (eds.). *Reproductive Tissue Banking*. Academic Press. London; 263-328.
- Garner, L. D. y L. A. Jhonson, 1995. Viability assessment of mammalian sperm using SYBR14 and propidium iodide. *Biology of Reproduction*. 53:276-284.

- Glogowski, J., M. B. Kwasnik, K. Piros, K. Dabrowski, S. Goryczko, H. Dobosz, A. Kuzminski y A. Ciereszko, 2000. Characterization of rainbow trout milt collected with a catheter: semen parameters and cryopreservation success. *Aquaculture Research*. 31:289-296.
- Gwo, J., H. Kurokura y R. Hirano, 1993. Cryopreservation of spermatozoa from rainbow trout, common carp, and marine puffer. *Nippon Suisan Gakkaishi*. 59:777-782.
- Hagedorn, M., F. W. Kleinhans, D. E. Wildt y W.F. Rall, 1997. Chill sensitivity and cryoprotectant permeability of dechorionated zebrafish embryos, *Brachydanio rerio*. *Cryobiology*. 34(3):251-263.
- Hammadeh, M., E. D. Szarvasy, T. Zeginiadou, P. Rosenbaum, T. Georg y W. Schimdt, 2001. Evaluation of cryoinjury of spermatozoa after slow (programmed biological freezer) or rapid (liquid nitrogen vapour) freeze-thawing techniques. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 18:364-370.
- Harvey, B. y M. J. Ashwood-Smith, 1982. Cryoprotectant penetration and super cooling in the eggs of salmonid fish. *Cryobiology*. 19:29-40.
- Hashimoto, H., Y. Matsuo, Y. Yokoyama, H. Toyohara y M. Sakaguchi, 1998. Induction of apoptosis in fish cells by hypertonic stress. *Fish for Science*. 64:820-825.
- Hazel, J. R., 1995. Thermal adaptation in biological membranes: is homoeoviscous adaptation the explanation. *Annual Review of Physiology*. 57:19-42.
- Hodgins, H., y G. Ridgway, 1964. Recovery of viable salmon spermatozoa after fast-freezing. *The Progressive Fish-Culturist*. 26-95.
- Holtz, W., 1993. Cryopreservation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) sperm: Practical recommendations. *Aquaculture*. 110:97-100.

- Hong, W. H., P. G. Meier y R. A. Deininger, 1988. Estimation of a single probit line from multiple toxicity test data. *Aquatic Toxicology*. 12:193-202.
- Horváth, Á., W. R. Wayman, J. C. Dean, B. Urbányi, T. R. Tiersch, S. D. Mims, D. Johnson y J. A. Jenkins, 2008. Viability and fertilizing capacity of cryopreserved sperm from three north american acipenseriform species: a retrospective study. *Journal of Applied Ichthyology*. 24:443-449.
- Hughes, C. M., S. E. Lewis, V. J. McKelvey-Martin y W. Thompson, 1997. Reproducibility of human sperm DNA measurements using the alkaline single cell gel electrophoresis assay. *Mutation Research*. 374(2):261-268.
- Isachenko, V., E. Isachenko, I. I. Katkov, M. Montag, S. Dessole, F. Nawroth y H. Van der Ven, 2004. Cryoprotectant-Free Cryopreservation of Human Spermatozoa by Vitrification and Freezing in Vapor: Effect on Motility, DNA Integrity, and Fertilization Ability. *Biology of Reproduction*. 71:1167-1173.
- Kobayashi, T., Y. Takeuchi, G. Yoshizaki y T. Takeuchi, 2003. Cryopreservation of trout primordial germ cells. *Fish Physiology and Biochemistry*. 28:479-480.
- Kopeika, E., T. Zhang, D. M. Rawson y W. V. Holt, 2004. Effect of DNA repair inhibitor 3-Aminobenzamide on genetic stability of loach (*Mysgurnus fossilis*) embryos derived from cryopreserved sperm. *Theriogenology*. 61:1661-1673.
- Labbé, C. y G. Maisse, 1996. Influence of rainbow trout thermal acclimation on sperm cryopreservation: relation to change in the lipid composition of the plasma membrane. *Aquaculture*. 145:281-294.
- Labbé, C., A. Martoriati, A. Devaux y G. Maisse, 2001. Effect of sperm cryopreservation on sperm DNA stability and progeny development in rainbow trout. *Molecular Reproduction and Development*. 60:397-404.

- Lahnsteiner, F., T. Weismann y R. A. Patzner, 1992. Fine structural changes in spermatozoa of the grayling, *Thymallus thymallus* (Pisces: Teleostei), during routine cryopreservation. *Aquaculture*. 103:73-84.
- Lahnsteiner, F., B. Berger, T. Wiesmann y R. Patzner, 1996a. Changes in morphology, physiology, metabolism, and fertilization capacity of rainbow trout semen following cryopreservation. *The Progressive Fish-Culturist*. 58:149-159.
- Lahnsteiner, F., T. Weismann y R. Patzner, 1996b. Cryopreservation of semen of the grayling (*Thymallus thymallus*) and the Danube salmon (*Hucho hucho*). *Aquaculture*. 144:265-274.
- Lahnsteiner, F., B. Berger, A. Horvarth, B. Urbanyi y T. Weismann, 2000. Criopreservation of spermatozoa in cyprinid fishes. *Theriogenology*. 54:1477-1498.
- Lahnsteiner, F., 2000. Semen cryopreservation in the Salmonidae and in the Northern pike. *Aquaculture Research*. 31:245-258.
- Lahnsteiner, F., N. Mansour y T. Weismann, 2002. A new technique for insemination of large egg batches with cryopreserved semen in the rainbow trout. *Aquaculture*. 209:359-367.
- Legendre, M. y R. Billard, 1980. Cryopreservation of rainbow trout sperm by deep freezing. *Reproduction, Nutrition and Development*. 20:1859-1868.
- Li, Y. H., k. J. Cai, A. kovacs y W. Z. Ji., 2005. Effects of various extenders and permeating cryoprotectants on cryopreservation of cynomolgus Monkey (*Macaca fascicularis*) spermatozoa. *Journal of Andrology*. 26(3):387-395.
- Li, J., L. Qinghua y S. Zhang, 2006. Evaluation of the damage in fish spermatozoa cryopreservation. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*. 24(4):370-377.

- Liu, K. C., T. C. Chou y H. D. Lin, 1993. Cryosurvival of goldfish embryo after subzero freezing. *Aquatic and Living Resource*. 6:63-66.
- Márián T, Z. Krasznai, L. Balkay, M. Balázs, M. Emri, L. Bene y L. Trón, 1993. Hypo-osmotic shock induces an osmolality dependent permeabilization and structural changes in the membrane of carp sperm. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 41(2):291-197.
- Mauger, P. E., P .Y. Le Bail y C. Labbé, 2006. Cryobanking of fish somatic cells: Optimizations of fin explant culture and fin cell cryopreservation. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B. Biochemistry and Molecular biology*. 144(1):29-37.
- McAndrew, B. J., K. J. Rana, y D. J. Penman, 1993. Conservation and preservation of genetic variation in aquatic organisms. IN: Muir, J. F. y Roberts, R. J. (eds). *Recent Advances in Aquaculture*. Blackwell Scientific. Oxford; 295–336.
- McNiven, M. A., R. K. Gallant, y G. F Richardson, 1993. Fresh storage of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) semen using a non-aqueous medium. *Aquaculture*. 709:71-82.
- Medina-Robles, V., Y. Velasco y C. Cruz, 2005. Aspectos generales de la crioconservación espermática en peces teleósteos. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 18(1):34-48.
- Meka, J. M. y S. D. McCormick, 2005. Physiological response of wild rainbow trout to angling: impact of angling duration, fish size, body condition, and temperature. *Fisheries Research*. 72:311-322.
- Mittermeier, R. y C. Goettsch, 1992. La importancia de la diversidad biológica de México, IN: Sarukhán, J. y Dirzo, R. (eds). *México Ante los Retos de la Biodiversidad*. Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la biodiversidad (Conabio), México; 57-62.

- Molecular Probes, 2005. Live-Dead Sperm Viability Kit. Product Information. 1-3.
- Muchlisin, Z. A., 2005. Review: Current status of extenders and cryoprotectants on fish spermatozoa cryopreservation. *Biodiversitas*. 6(1):12-15.
- Navarro, O. J., Y. M. Velasco-Santamaría y P. E. Cruz-Casallas, 2004. Evaluación de cinco protectores para la crioconservación de semen de Cachama Blanca (*Piaractus brachypomus*). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 17:53-59.
- O'Connell, M., N. McClure y S. E. M. Lewis, 2002. The effect of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. *Human Reproduction*. 17:704-709.
- Ogier de Baulny, B., Y. Le Vern, D. Kerboeuf y G. Maisse, 1997. Flow cytometric evaluation of mitochondrial activity and membrane integrity in fresh and criopreserved rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. *Cryobiology*. 34(2):141-149.
- Ohta, H., K. Kawamura, T. Unuma y Y. Takegoshi, 2001. Cryopreservation of the sperm of the Japanese bitterling. *Journal of Fish Biology*. 58:670-681.
- Ott, A. G. y H. F. Horton, 1971. Fertilization of steelhead trout (*Salmo gairdneri*) eggs with cryopreserved sperm. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*. 28:1915-1918.
- Pérez-Cerezales, S., S. Martínez-Páramo, J. Beirão y M. P. Herráez, 2010. Evaluation of DNA damage as a quality marker for rainbow trout sperm cryopreservation and use of LDL as cryoprotectant. *Theriogenology*. 74:282-289.
- Pillai, M. C., R. Yanagimachi y G. N. Cherr, 1994. *In vivo* and *in vitro* initiation of sperm motility using fresh and cryopreserved gametes from the pacific herring; *Clupea pallasii*. *The journal of Experimental Zoology*. 269:62-68.

- Pironen, J., 1993. Cryopreservation of sperm from the brown trout (*Salmo trutta* m. lacustris L.) and arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.). *Aquaculture*. 116:275-285.
- Polge, C. A., U. Smith y A. S. Parkes, 1949. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*. 164:666.
- Porcu, E., R. Fabbri, P. Ciotti, S. Giunchi, R. Fratto, D. Caracciolo, 2001. Four healthy children from frozen human oocytes and frozen human sperms. *Fertility and Sterility*. 76(1):S76
- Quintero-Moreno, A. A., 2003. Estudio sobre la dinámica de poblaciones espermáticas en semen de caballo, cerdo, conejo. Tesis doctoral. Facultad de veterinaria de la Universidad Autónoma de Barcelona. 164 p.
- Rana, K., 1995. Preservation of gametes. IN: Bromage N. R. y Roberts R. J. (eds). *Broodstock management and egg and larval quality*, Blackwell Science, Ltd., Cambridge, Massachusetts; 53-75.
- Renard, P. y J. Cochard, 1989. Effects of various cryoprotectants on pacific oyster *Crassostrea gigas* Thunberg, manila clam *Ruditapes philippinarum* Reeve and king scallop *Pecten maximus* (L) embryos. Influence of the biochemical and effects. *Cryo-Letters*. 10: 169-180.
- Robles, V., E. Cabrita, S. Cuñado y M. P. Herráez, 2003. Sperm cryopreservation of sex-reversed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Parameters that affect its ability for freezing. *Aquaculture*. 224(1-4):203-212.
- Ruiz-Campos, G., 1993. Bionomía y ecología poblacional de la trucha arcoíris, *Oncorhynchus mykiss nelsoni* (Evermann), de la Sierra San Pedro Mártir, Baja California, México. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey. México. 223 p.

- Salinas-Flores, L., 2003. Criopreservación de esperma del abulón rojo *Haliotis rufescens*. Tesis de maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Ensenada, Baja California, México. 111 p.
- Salte, R., A. Galli, U. Falaschi, K. T. Fjalestad y R. Aleandri, 2004. A protocol for the on-site use of frozen milt from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) applied to the production of progeny groups: Comparing males from different populations. *Aquaculture*. 231:337-345.
- Sancho, S., I. Casas, H. Ekwall, F. Saravia, H. Rodriguez-Martinez, J. E. Rodriguez-Gil, E. Flores, E. Pinart, M. Briz, N. Garcia-Gil, J. Bassols, A. Pruneda, E. Bussalleu, M. Yeste y S. Bonet, 2007. Effects of cryopreservation on semen quality and the expression of sperm membrane hexose transporters in the spermatozoa of Iberian pigs. *Society for Reproduction and Fertility*. 111-121.
- Scott, A. y S. Baynes, 1980. A review of the biology, handling and storage of salmonid spermatozoa. *Journal of Fish Biology*. 17:707-739.
- Secretaría de Medio Ambiente y recursos Naturales, 2002. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2001. Protección Ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestre-categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Diario Oficial De La Federación. México. Segunda sección. 1:153.
- Singh, N. P., C.H. Muller y R. E. Berger, 2003. Effects of age on DNA double-strand breaks and apoptosis in human sperm. *Fertility and Sterility*. 80:1420-1430.
- Steane, D. E., 1992. Note on the FAO Expert Consultation on Management of Global Animal Genetic Resources. Rome: FAO. 39 p.
- Steele, E. K., N. McClure y S. E. M. Lewis, 2000. Comparison of the effects of two methods of cryopreservation on testicular sperm DNA. *Fertility and Sterility*. 74(3):450-453.

- Stornelli, M. A. y E. L. De la Sota, 2006. Fertilidad y supervivencia del semen canino criopreservado. *Analecta Veterinaria*. 25(2):29-38.
- Stoss, J. y W. Holtz, 1983. Cryopreservation of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) sperm: IV. The effect of DMSO concentration and equilibration time on sperm survival; sucrose and KCl as extender components and the osmolality of the thawing solution. *Aquaculture*. 32(3-4):321-330.
- Tabares, C. J., A. M Tarazona y M. Olivera-Ángel, 2005. Fisiología de la activación del espermatozoide en peces de agua dulce. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 18:(2):149-161.
- Tekin, N., S. Secer, E. Akcay, Y. Bozkurt y S. Kayam, 2007. Effects of glycerol additions on post-thaw fertility of frozen rainbow trout sperm, with an emphasis on interaction between extender and cryoprotectant. *Journal of Applied Ichthyology*. 23(1):60-63.
- Tiantian, Z., 2004. Cryopreservation of gametes and embryos of aquatic species. IN: Barry J. Fuller, Nick lane y Erica E. Benson (eds). *Life in the Frozen state*. London; 415-435.
- Tiersch, T. R., 2000. Introduction. IN: Tiersch, T. y Mazik P. (eds). *Cryopreservation in Aquatic Species*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana; xix-xxvi.
- Tiersch, T. R., C. R. Figiel Jr., W. R. Wayman, J. H. Williamson, G. J. Carmichael y O. T. Gorman, 2000. Cryopreservation of sperm of the endangered razorback sucker. IN: Tiersch, T. y Mazik P. (eds). *Cryopreservation in Aquatic Species*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana; 117-122.
- Vargas, J., E. Alvarado y C. Campos, 2001. Efecto de diferentes concentraciones de yema de huevo en el dilutor y distintos procesos de congelamiento en la

- criopreservación de esperma de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*).
Anales científicos. XVII:22-36.
- Viveiros, A. T. M., E. J. Lock, H. Woelders y J. Komen, 2001. Influence of cooling rates and plunging temperatures in an interrupted slow-freezing procedure for semen of the African catfish, *Clarias gariepinus*. *Cryobiology*. 43(3):276-287.
- Wayman, R. W. y T. R. Tiersch, 2000. Research methods for cryopreservation of sperm. IN: Tiersch, T. y Mazik P. (eds). *Cryopreservation in Aquatic Species*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana. 264-285.
- Wernecke, D. y H. J. Pluta, 2003. Motility and fertility capacity of frozen/thawed common carp (*Cyprinus carpio* L.) sperm using dimethyl-acetamide as the main cryoprotectant. *Aquaculture*. 215:167-185.
- Wheeler, P. y H. Thorgaard, 1991. Cryopreservation of rainbow trout semen in large straws. *Aquaculture*. 93:95-100.
- Yao, Z., L.W. Crim, G. F. Richardson y C. J. Emerson, 2000. Motility, fertility and ultrastructural changes of ocean pout (*Macrozoarces americanus* L.) sperm after cryopreservation. *Aquaculture*. 181:361-375.
- Zell, S. R., 1978. Cryopreservation of gametes and embryos of salmonid fishes. *Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique*. 18:1089-1099.
- Zhang, T. y D. M. Rawson, 1995. Studies on chilling sensitivity of zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos. *Cryobiology*. 32:239-246.
- Zilli, L., R. Schiavone, V. Zonno, C. Storelli, y S. Vilella, 2003. Evaluation of DNA damage in *Dicentrarchus labrax* sperm following cryopreservation. *Cryobiology*. 47:227-235.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Capítulo V

CONCLUSIONES

1. La trucha de San Pedro Mártir (*Oncorhynchus mykiss nelsoni*) puede ser mantenida en condiciones *ex situ* mediante un sistema de recirculación.
2. La tasa de crecimiento somático (longitud y peso) registrada para esta trucha nativa en condiciones de cautiverio (13.2 meses) fue de 0.86 g/día y 0.42 mm/día respectivamente.
3. Se demostró que la maduración gonádica de esta trucha es viable mediante un sistema artificial de fotoperíodo y que con un suministro adecuado de alimento, es posible aumentar la calidad del esperma en condiciones controlada.
4. Se generó un protocolo *ad doc* para la conservación a corto plazo del esperma de *O. mykiss nelsoni*.
5. Los espermatozoides almacenados a 4°C registraron un porcentaje de movilidad $\geq 80\%$ durante siete días y en la integridad de membrana este porcentaje se mantuvo por dos días.
6. Los espermatozoides de *O. mykiss nelsoni* suspendidos en los diferentes agentes crioprotectantes presentaron una movilidad mayor cuando fueron mantenidos en metanol.

7. La EC50 del metanol en los espermatozoides de la trucha de San Pedro Mártir fue determinada en concentraciones $<6.28\%$, aunque concentraciones muy bajas podrían no ser suficientes para protegerlos durante su almacenamiento a largo plazo en ultra-bajas temperaturas.
8. Los espermatozoides de la trucha de San Pedro Mártir criopreservados con metanol y descongelados a 40°C , presentaron una resistencia mayor en cuanto a la integridad de membrana (63.2%) y ADN (68.6%) con respecto a los criopreservados con dimetil acetamida (22.6% y 45.3% , respectivamente) o dimetil sulfóxido (17.8% y 39.5% respectivamente) y temperaturas de descongelados de 25°C .
9. La integridad de membrana plasmática y ADN en los espermatozoides criopreservados exhibieron un menor daño en comparación al registrado en su movilidad.
10. Las sondas fluorescentes y el ensayo cometa demostraron ser buenos métodos para evaluar el daño ocasionado por el proceso de criopreservación en el espermatozoide de la trucha de San Pedro Mártir.

RECOMENDACIONES

1. Utilizar un alimento específico para estimular la maduración gonádica de *O. mykiss nelsoni* durante condiciones de fotoperíodo artificial, con el propósito de optimizar y mejorar la obtención de gametos.
2. Evaluar la habilidad de fertilización de los espermatozoides de la trucha de San Pedro Mártir mantenidos en la solución extender de Erdhal y Graham a 4°C.
3. Evaluar si diferentes condiciones de oxígeno durante el almacenamiento a corto plazo (4°C) de los espermatozoides de esta trucha nativa podrían mejorar su viabilidad.
4. Determinar si el SYBR14 y el yoduro de propidio tienen algún efecto sobre la calidad espermática de la trucha de San Pedro Mártir.
5. Evaluar la habilidad de fertilización de los espermatozoides de la trucha de San Pedro Mártir criopreservados con metanol como agente crioprotectante y una temperatura de descongelación de 40°C por 7 segundos.
6. Evaluar si tasas de enfriamiento $>32^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ podrían mejorar la calidad (movilidad, integridad de membrana y ADN) de los espermatozoides durante su criopreservación.

APÉNDICES

APÉNDICE CAPÍTULO II

CAPTURA DE *O. mykiss nelsoni* EN SU HÁBITAT NATURAL

Reporte de la captura de los organismos en la Sierra de San Pedro Mártir durante la última semana del mes de marzo de 2008.

Ubicación	Coordenadas	msnm	Equipo de trabajo	Colecta inicio	Colecta fin
Arroyo San Rafael	31° 05'49.8" N 115° 37' 18" W	1231	Dr. Gorgonio Ruiz C. M. en C. Marisela Aguilar J. M. en C. Arturo Ramírez V. Biol. Leo Gandhi R.	13: 10	15:30
Equipo de captura		Electropesca			
Distancia muestreada (m)		300			
Organismos capturados		31			
Salida de la Sierra		16:25			

Variables estimadas en el campo durante la colecta de esperma en la Sierra de San Pedro Mártir.

Variable/Equipo	Hidrolab	Kit	Manual
Temperatura	—	—	15°C
pH	10.99	7.6	—
TDS	0.15 g/L	—	—
% Saturación de oxígeno	71.90%	—	—
O ₂	7.40 mg/L	—	—
Nitrógeno Total de Amoniac (TAN)	—	0	—
Nitritos	—	0	—
Nitatos	—	0	—
Conductividad del agua	0.23 µs/cm	—	—

Observaciones: Se colectaron 31 organismos de 0 a 4 años. De estos organismos, 20 pertenecían a la edad entre 0 y 1 año (64.52%) y 11 organismos a la edad de IV años (35.48%), estos últimos fueron liberados. La temperatura promedio del agua fue de del Arroyo San Rafael fue de 15°C. Al llegar al laboratorio, el agua donde venían los organismos registró una temperatura de 18°C. Los organismos no presentan lesiones o algún efecto dañino ocasionado por el voltaje suministrado del equipo de electropesca. Los organismos fueron transportados en bolsas de plástico con agua del medio y oxígeno a saturación.

CALIDAD DEL AGUA DURANTE LOS PRIMEROS MESES DE CAUTIVERIO DE LAS TRUCHAS

Sistema de datos de las diferentes variables de calidad del agua, monitoreadas durante el periodo de cautiverio de la trucha de San Pedro Mártir.

Fecha	Temperatura (°C)	pH	TAN (mg/L)	Nitritos (mg/L)	Nitratos (mg/L)
3/26/2007	17.00	8.20	0.50	0.25	5.00
3/29/2007	16.50	8.20	0.25	2.00	5.00
3/30/2007	16.50	8.20	0.25	1.00	5.00
3/31/2007	16.50	8.20	0.25	1.00	5.00
4/1/2007	17.00	7.60	0.00	1.00	0.00
4/2/2007	17.00	7.60	0.00	0.25	0.00
4/3/2007	16.50	7.60	0.00	0.00	0.00
4/4/2007	17.00	7.60	0.00	0.00	0.00
4/6/2007	17.00	7.60	0.00	0.00	0.00
4/8/2007	17.00	7.60	0.00	0.00	0.00
4/10/2007	17.00	7.60	0.00	0.00	0.00
4/12/2007	16.00	7.60	0.00	0.00	0.00
4/15/2007	16.00	8.20	0.00	0.00	0.50
4/20/2007	15.00	8.20	4.00	0.50	0.00
4/21/2007	16.00	8.20	4.00	1.00	0.00
4/22/2007	16.00	8.20	4.00	1.00	0.00
4/23/2007	16.00	8.20	2.00	1.00	0.00
4/24/2007	16.00	8.20	2.00	2.00	0.00
4/25/2007	16.00	8.20	2.00	3.00	4.00
4/26/2007	17.00	8.00	2.00	3.00	2.00
4/27/2007	15.50	8.20	1.50	5.00	4.00
4/28/2007	16.00	8.20	1.50	5.00	10.00
4/29/2007	16.00	7.70	1.00	4.00	10.00
4/30/2007	16.50	8.00	0.75	2.00	12.50
5/1/2007	17.00	8.20	0.37	3.00	7.00
5/2/2007	17.10	8.20	0.50	3.00	7.00
5/3/2007	15.50	8.20	0.50	3.00	7.50
5/4/2007	16.50	8.20	0.50	3.00	7.00
5/5/2007	16.00	8.20	0.37	3.00	7.00
5/6/2007	16.00	8.20	0.25	3.00	7.00
5/7/2007	16.90	8.20	0.25	3.00	10.00

Continuación de la tabla.....

Fecha	Temperatura (°C)	pH	TAN (mg/L)	Nitritos (mg/L)	Nitratos (mg/L)
5/8/2007	16.90	8.20	0.10	3.00	10.00
5/9/2007	17.00	8.00	0.25	4.00	10.00
5/10/2007	16.50	8.00	0.25	3.00	10.00
5/11/2007	16.50	8.20	0.20	3.00	9.00
5/12/2007	16.00	8.20	0.20	3.00	8.00
5/13/2007	17.20	8.20	0.20	3.00	7.00
5/14/2007	17.20	8.20	0.20	2.00	7.00
5/15/2007	17.50	8.10	0.25	2.00	7.00
5/16/2007	17.00	8.00	0.25	2.00	10.00
5/17/2007	18.00	8.20	0.25	2.00	8.00
5/18/2007	17.00	8.20	0.25	3.00	10.00
5/20/2007	17.00	8.20	0.25	3.00	15.00
5/21/2007	17.00	8.20	0.00	2.00	10.00
5/22/2007	17.00	8.00	0.00	2.00	8.00
5/23/2007	17.50	8.20	0.20	1.50	7.00
5/24/2007	17.00	8.20	0.20	3.00	6.00
5/25/2007	17.00	8.00	0.20	2.00	6.00
5/26/2007	17.00	8.00	0.20	1.50	4.00
5/27/2007	17.00	8.10	0.15	0.75	2.00
5/30/2007	15.50	8.20	0.50	0.25	10.00
6/2/2007	15.50	8.20	0.00	0.25	10.00
6/3/2007	16.50	8.00	0.00	0.25	7.00
6/5/2007	16.00	8.20	0.00	0.25	7.00
6/7/2007	17.00	8.20	0.00	0.00	10.00
6/9/2007	15.00	8.20	0.00	0.00	10.00
6/12/2007	17.00	8.10	0.15	0.15	0.00
6/15/2007	17.00	8.00	0.10	0.00	7.00
6/19/2007	18.00	8.00	0.00	0.00	5.00
6/21/2007	17.00	8.00	0.00	0.25	0.15
6/25/2007	17.00	8.20	0.00	0.00	0.00
6/27/2007	17.00	8.10	0.10	0.00	0.00
6/29/2007	17.00	8.00	0.10	0.00	0.00
7/3/2007	18.00	8.00	0.00	2.00	6.00
7/5/2007	18.00	8.00	0.25	3.00	7.00
7/6/2007	17.50	8.00	0.25	2.00	5.00
7/9/2007	17.00	8.30	0.10	0.25	2.00

Continuación de la tabla.....

Fecha	Temperatura (°C)	pH	TAN (mg/L)	Nitritos (mg/L)	Nitratos (mg/L)
7/10/2007	17.50	8.20	0.25	0.50	2.00
7/13/2007	17.50	8.00	0.25	0.25	2.00
7/16/2007	17.00	8.10	0.25	0.15	4.00
7/18/2007	18.00	8.00	0.10	0.25	6.00
7/20/2007	17.50	8.00	0.10	0.25	20.00
7/24/2007	17.50	8.10	0.10	0.15	10.00
7/27/2007	17.00	8.00	0.10	0.15	40.00
8/1/2007	17.00	8.10	0.10	0.10	40.00
8/6/2007	17.50	8.00	0.25	0.25	30.00
8/8/2007	17.00	8.00	0.10	0.00	2.50
8/9/2007	17.00	8.00	0.10	0.10	5.00
8/10/2007	17.50	8.00	0.10	0.25	5.00
8/14/2007	18.00	8.10	0.10	0.50	5.00
8/15/2007	18.20	8.00	0.10	0.25	3.00
8/16/2007	18.90	8.00	0.10	0.10	3.00
8/17/2007	18.90	8.00	0.10	0.10	2.50
8/20/2007	18.90	8.00	0.10	2.00	7.00
8/21/2007	18.90	8.00	0.00	0.25	15.00
8/23/2007	18.00	8.00	0.00	0.25	7.00
8/24/2007	19.00	8.00	0.00	0.25	10.00
8/26/2007	19.20	8.00	0.00	0.00	40.00
8/28/2007	19.00	8.10	0.10	0.00	7.00
8/29/2007	20.00	8.10	0.10	0.00	6.00
8/30/2007	21.00	8.00	0.10	0.00	5.00
8/31/2007	22.00	8.10	0.10	0.00	3.00
9/3/2007	21.00	8.10	1.00	0.70	5.00
9/4/2007	20.00	8.00	0.30	0.25	3.00
9/6/2007	17.50	8.00	1.00	1.00	5.00
9/7/2007	17.00	8.10	0.10	0.10	0.00
9/10/2007	15.50	8.20	0.50	0.50	5.00
9/11/2007	17.00	8.10	0.25	0.25	2.00
9/12/2007	17.00	8.10	0.50	0.50	2.00
9/13/2007	16.50	8.00	1.00	2.00	6.00
9/15/2007	17.00	8.00	0.10	0.00	10.00
9/17/2007	16.50	8.00	0.25	0.00	4.00
9/18/2007	17.00	8.00	0.10	0.00	0.00

Continuación de la tabla.....

Fecha	Temperatura (°C)	pH	TAN (mg/L)	Nitritos (mg/L)	Nitratos (mg/L)
9/20/2007	17.00	8.00	0.10	0.10	0.00
9/21/2007	17.00	8.10	0.25	0.15	40.00
9/24/2007	17.50	8.00	0.10	0.00	0.00
9/25/2007	17.50	8.00	0.10	0.00	0.50
9/26/2007	16.50	8.10	0.10	0.00	8.00
10/1/2007	17.50	8.00	0.10	0.00	0.00
10/2/2007	17.00	7.90	0.10	0.00	10.00
10/3/2007	17.00	8.10	0.10	0.00	7.00
10/8/2007	17.00	8.20	0.10	0.00	2.00
10/9/2007	17.00	8.00	0.10	0.00	5.00
10/10/2007	17.00	8.10	0.00	0.00	8.00
10/11/2007	17.00	8.00	0.10	0.00	30.00
10/12/2007	17.00	8.00	0.00	0.00	30.00
10/15/2007	17.00	8.00	0.00	0.00	15.00
10/16/2007	17.00	8.00	0.10	0.00	7.00
10/17/2007	17.00	8.00	0.10	0.00	3.00
10/19/2007	17.00	8.00	0.10	0.00	7.00
10/22/2007	17.00	8.10	0.10	0.00	1.00
10/25/2007	17.00	8.10	0.10	0.00	1.00
10/29/2007	17.00	8.00	0.00	0.00	0.00
11/9/2007	18.00	8.00	0.10	0.00	0.00
11/14/2007	17.50	8.10	0.10	0.00	0.00
11/15/2007	17.00	8.00	0.10	0.00	0.00
11/16/2007	17.00	8.00	0.10	0.00	0.00
11/26/2007	17.00	8.00	0.10	0.00	0.00
12/10/2007	18.00	8.00	0.10	0.00	0.00
12/21/2007	17.00	8.00	0.10	0.00	0.00
12/29/2007	16.00	8.00	0.00	0.00	0.00
1/31/2008	15.00	8.00	0.10	0.20	0.00
2/1/2008	16.00	7.90	0.20	0.00	0.00
2/5/2008	15.00	8.00	0.10	0.00	0.00
2/6/2008	15.00	8.00	0.20	0.00	0.00
2/7/2008	15.00	8.00	0.10	0.00	0.00
2/11/2008	15.00	7.90	0.10	0.25	0.00
2/15/2008	15.00	8.00	0.00	0.00	0.00
2/18/2008	15.00	8.00	0.20	0.00	0.00

Continuación de la tabla.....

Fecha	Temperatura (°C)	pH	TAN (mg/L)	Nitritos (mg/L)	Nitratos (mg/L)
2/20/2008	15.00	8.00	0.10	0.00	0.00
2/21/2008	15.00	8.00	0.10	0.00	0.00
2/25/2008	15.00	7.80	0.00	0.00	0.00
2/26/2008	15.00	8.00	0.10	0.00	0.00
2/27/2008	15.00	7.80	0.10	0.00	0.00
3/7/2008	15.00	7.40	0.10	0.00	0.00
3/10/2008	15.00	7.90	0.10	0.00	0.00
3/12/2008	15.00	7.80	0.10	0.00	0.00
3/27/2008	15.00	7.90	0.10	0.00	5.00
3/28/2008	14.00	8.00	0.10	0.00	7.00
3/29/2008	14.00	8.00	0.10	0.00	4.00
3/31/2008	14.00	8.00	0.00	0.00	0.00
4/1/2008	14.00	8.00	0.10	0.00	4.00
4/2/2008	14.00	8.00	0.10	0.00	0.00
4/7/2008	15.00	7.90	0.10	0.00	0.00
4/8/2008	14.00	7.90	0.10	0.00	0.00
4/10/2008	14.00	7.90	0.10	0.00	0.00
4/12/2008	14.00	8.00	0.10	0.00	0.00
4/15/2008	14.00	7.90	0.10	0.00	0.00
4/17/2008	14.00	8.00	0.10	0.00	0.00
4/20/2008	14.00	8.00	0.00	0.00	0.00
4/24/2008	14.00	8.00	0.10	0.00	0.00
<i>Promedio</i>	16.68	8.03	0.29	0.75	5.70
<i>SD</i>	1.40	0.15	0.63	1.19	7.82
<i>Máximo</i>	22.00	8.30	4.00	5.00	40.00
<i>Mínimo</i>	14.00	7.40	0.00	0.00	0.00

CRECIMIENTO DE LAS TRUCHAS MANTENIDAS EN CAUTIVERIO

Sistema de datos correspondientes al peso corporal y longitud de la trucha de San Pedro Mártir antes y después de 397 días de cautiverio.

Recaptura de organismos	Peso corporal (g)	Longitud total (mm)	Sexo			
Marzo 2007	1	13	—		<i>Peso corporal (g)</i>	<i>Longitud total (mm)</i>
	2	25	—			
	3	23	—	<i>Promedio</i>	20.45	125.25
	4	17	—	<i>SD</i>	10.59	23.14
	5	40	—	<i>Máximo</i>	47.00	170.00
	6	10	—	<i>Mínimo</i>	8.00	90.00
	7	18	—	<i>N</i>	20	20
	8	18	—			
	9	24	—			
	10	12	—			
	11	33	—			
	12	8	—			
	13	22	—			
	14	47	—			
	15	8	—			
	16	15	—			
	17	31	—			
	18	14	—			
	19	20	—			
	20	11	—			
Abril 2008	1	430	Hembra		<i>Peso corporal (g)</i>	<i>Longitud total (mm)</i>
	2	449	Hembra			
	3	425	Hembra	<i>Promedio</i>	360.00	290.00
	4	425	Hembra	<i>SD</i>	75.26	31.09
	5	230	Hembra	<i>Máximo</i>	449.00	320.00
	6	300	Macho	<i>Mínimo</i>	230.00	200.00
	7	300	Macho	<i>N</i>	13	13
	8	250	Macho			
	9	400	Macho			
	10	420	Macho			
	11	400	Macho			
	12	300	Macho			
	13	350	Macho			

Prueba de t (datos no pareados) para la diferencia de la masa corporal de las truchas, después de 397 días de mantenimiento en cautiverio ($\alpha = 0.05$).

Grupo	Uno	Dos	t	gl	Error estándar de la diferencia
Promedio	20.45	359.92	20.04	31	16.94
SD	10.59	75.26			
SEM	2.37	20.87			
N	20.00	13			

Prueba de t (datos no pareados) para la diferencia de la longitud total de las truchas, después de 397 días de mantenimiento en cautiverio. gl = grados de libertad ($\alpha = 0.05$).

Grupo	Uno	Dos	t	gl	Error estándar de la diferencia
Promedio	125.25	290.00	17.45	31	0.94
SD	23.14	31.09			
SEM	5.17	8.62			
N	20.00	13			

CALIDAD DEL AGUA DURANTE EL MANTENIMIENTO DE LAS TRUCHAS EN UN SISTEMA DE FOTOPERIODO ARTIFICIAL

Sistema de datos de las diferentes variables de calidad del agua, monitoreadas durante el período de fotoperíodo.

	Fecha	Temperatura (°C)	pH	TAN (mg/L)	Nitritos (mg/L)	Nitratos (mg/L)
<i>Aclimatación</i>	5/5/2008	14.00	7.90	0.10	0.10	0.00
	5/8/2008	14.00	7.80	0.20	0.50	4.00
	5/12/2008	14.00	7.80	0.20	0.50	4.00
	5/14/2008	14.00	8.00	0.20	0.10	0.00
	5/19/2008	14.00	8.00	0.10	0.10	0.00
	5/20/2008	15.00	8.00	0.10	0.10	10.00
	5/26/2008	14.00	8.00	0.10	0.00	20.00
	5/27/2008	13.00	8.00	0.25	0.10	30.00
<i>Primavera</i>	5/29/2008	14.00	7.90	0.10	0.00	1.00
	6/2/2008	13.00	7.90	0.10	0.00	5.00
	6/8/2008	13.00	7.90	0.00	0.00	0.00

Continuación de tabla.....

	Fecha	Temperatura (°C)	pH	TAN (mg/L)	Nitritos (mg/L)	Nitratos (mg/L)
<i>Verano</i>	6/16/2008	13.00	7.90	0.25	0.00	30.00
	6/19/2008	13.00	7.90	0.00	0.00	4.00
	6/25/2008	13.00	7.90	0.10	0.00	3.00
	7/4/2008	15.00	8.00	0.10	0.00	0.00
	8/4/2008	16.00	7.80	0.10	0.00	1.00
<i>Otoño</i>	8/5/2008	15.00	7.80	0.10	0.00	1.00
	8/7/2008	16.00	7.40	0.10	0.00	1.00
	8/11/2008	17.00	7.60	0.10	0.00	0.00
	8/12/2008	16.00	7.60	0.10	0.00	2.00
	8/13/2008	16.00	7.60	0.10	0.00	7.00
<i>Invierno</i>	8/14/2008	16.00	7.90	0.10	0.00	3.00
	8/26/2008	17.00	7.90	0.10	0.00	0.00
	9/9/2008	17.00	7.80	0.10	0.00	0.00
	9/3/2008	17.00	8.40	0.10	0.00	1.00
	9/23/2003	17.00	7.80	0.10	0.00	0.00
	9/30/2008	16.00	7.90	0.10	0.00	0.00
	10/2/2008	17.00	7.90	0.10	0.00	0.00
	10/3/2008	17.00	8.00	0.25	0.00	2.00
	10/6/2008	17.00	7.90	0.20	0.00	2.00
	10/7/2008	16.00	7.40	0.25	0.00	0.00
	10/8/2008	14.00	8.20	0.25	0.00	0.00
	10/10/2008	14.00	8.00	0.25	0.00	0.00
	10/13/2008	13.00	8.10	0.25	0.00	0.00
	10/14/2008	13.00	8.00	0.10	0.00	0.00
	10/16/2008	12.00	8.00	0.25	0.00	0.00
	10/17/2008	12.00	8.00	0.25	0.00	10.00
	10/22/2008	11.00	8.00	0.25	0.00	0.00
	10/23/2008	11.00	8.00	0.25	0.00	5.00
	10/24/2008	11.00	7.80	0.00	0.00	0.00
	10/27/2008	11.00	8.00	0.25	0.00	0.00
	10/28/2008	11.00	8.00	0.00	0.00	0.00
	10/29/2008	11.00	8.00	0.25	0.00	3.00
	10/30/2008	11.00	8.00	0.25	0.00	0.00
	10/31/2008	11.00	8.00	0.25	0.00	0.00
	11/3/2008	12.00	8.00	0.00	0.00	0.00
	11/6/2008	11.00	8.00	0.25	0.00	0.00
	11/7/2008	12.00	8.00	0.10	0.00	0.00
	11/10/2008	12.00	8.00	0.25	0.00	0.00
	11/11/2008	12.00	8.00	0.25	0.00	0.00
	11/14/2008	12.00	7.90	0.10	0.00	0.00
	11/17/2008	12.00	8.00	0.25	0.00	0.00

Continuación de tabla.....

Fecha	Temperatura (°C)	pH	TAN (mg/L)	Nitritos (mg/L)	Nitratos (mg/L)
11/18/2008	12.00	8.00	0.00	0.00	0.00
11/20/2008	12.00	8.00	0.10	0.00	0.00
11/24/2008	12.00	8.00	0.10	0.00	0.00
11/25/2008	12.00	8.00	0.10	0.00	0.00
11/27/2008	11.00	8.00	0.25	0.00	10.00
12/1/2008	12.00	8.00	0.25	0.00	0.00
12/2/2008	12.00	8.00	0.10	0.00	0.00
12/4/2008	12.00	7.80	0.00	0.00	0.00
12/8/2008	11.00	7.80	0.00	0.00	7.00
12/9/2008	11.00	8.50	0.10	0.00	4.00
12/15/2008	11.00	8.00	0.25	0.00	0.00
12/22/2008	11.00	7.90	0.20	0.00	0.00
12/27/2008	11.00	7.80	0.25	0.00	40.00
12/28/2008	11.00	7.80	0.25	0.00	20.00
1/3/2009	11.00	7.90	0.10	0.00	0.00
1/6/2009	11.00	7.90	0.10	0.00	0.00
<i>Promedio</i>	13.25	7.93	0.15	0.02	3.38
<i>SD</i>	2.10	0.17	0.09	0.09	7.71
<i>Máximo</i>	17.00	8.50	0.25	0.50	40.00
<i>Mínimo</i>	11.0	7.40	0.00	0.00	0.00

MADUREZ GONÁDICA DE LA TRUCHA DE SAN PEDRO MÁRTIR EN UN SISTEMA DE FOTOPERIODO ARTIFICIAL

Sistema de datos correspondientes a las diferentes variables determinadas durante los diferentes espermiaciones de la trucha de San Pedro Mártir.

Fecha	Espermiación	Tiempo entre desoves (días)	No. De organismos que liberaron esperma
7 Enero	1	0	3
23 Enero	2	16	3
12 Febrero	3	20	8
12 Marzo	4	28	6
26 Marzo	5	16	7
7 abril	6	10	7

Matriz de datos correspondientes al volumen, porcentaje de movilidad y número de espermatozoides registrado en cada espermiación de la trucha de San Pedro Mártir.

Espermiación 1

Organismo	1	2	3
<i>Volumen (μL)</i>	100.00	300.00	250.00
Volumen Total (μL)	650.00		
Promedio	216.67		
Desv. Estándar	104.08		
Error Estándar	60.09		
Valor máximo	300.00		
Valor mínimo	100.00		
<i>Movilidad (%)</i>			
R1	80	75	85
R2	80	85	80
R3	80	80	75
Promedio	80	80	80
Desv. Estándar	0.00	5.00	5.00
Error Estándar	0.00	2.89	2.89
Valor máximo	80	85	85
Valor mínimo	80	75	75
<i>Número de espermas(x10⁶)</i>			
R1	202	135	366
R2	193	173	338
R3	212	150	345
Promedio	202	153	350
Desv. Estándar	9.50	19.14	14.57
Error Estándar	5.49	11.05	8.41
Valor máximo	212	173	366
Valor mínimo	193	135	338

Espermiación 2

Organismo	1	2	3
<i>Volumen (μL)</i>	410.00	130.00	20.00
Volumen Total (μL)	560.00		
Promedio	186.67		
Desv. Estándar	201.08		
Error Estándar	116.09		
Valor máximo	410.00		
Valor mínimo	20.00		
<i>Movilidad (%)</i>			
R1	80	75	80
R2	80	80	80
R3	80	85	80
Promedio	80	80	80
Desv. Estándar	0.00	5.00	0.00
Error Estándar	0.00	2.89	0.00
Valor máximo	80	85	80
Valor mínimo	80	75	80
<i>Número de espermias ($\times 10^6$)</i>			
R1	483	308	215
R2	439	283	198
R3	443	315	207
Promedio	455	302	207
Desv. Estándar	24.33	16.82	8.50
Error Estándar	14.05	9.71	4.91
Valor máximo	483	315	215
Valor mínimo	439	283	198

Espermación 3

Organismo	1	2	3	4	5	6	7	8
Volumen (μL)	00.00	160.00	355.00	300.00	210.00	175.00	315.00	90.00
Volumen Total (μL)	1805.00							
Promedio	225.60							
Desv. Estándar	89.80							
Error Estándar	11.22							
Valor máximo	355.00							
Valor mínimo	90.00							
<i>Movilidad (%)</i>								
R1	90	83	85	80	75	90	90	95
R2	85	80	90	80	85	90	90	95
R3	80	85	95	80	80	90	90	95
Promedio	85	83	90	80	80	90	90	95
Desv. Estándar	5.00	2.50	5.00	0.00	5.00	0.00	0.00	0.00
Error Estándar	1.70	0.80	1.70	0.00	1.70	0.00	0.00	0.00
Valor máximo	90	85	95	80	85	90	90	95
Valor mínimo	80	80	85	80	75	90	90	95
<i>Número de espermias($\times 10^6$)</i>								
R1	1028	890	798	987	1095	1189	997	1004
R2	1025	905	790	1014	1089	1205	1008	995
R3	1040	906	813	998	1117	1207	1010	1002
Promedio	1031	900	800	1000	1100	1200	1005	1000
Desv. Estándar	7.90	9.00	11.70	13.60	14.70	9.90	7.00	4.70
Error Estándar	4.60	5.20	6.70	7.80	8.50	5.70	4.00	2.70
Valor máximo	1040	906	813	1014	1117	1207	1010	1004
Valor mínimo	1025	890	790	987	1089	1189	997	995

Espermación 4

Organismo	1	2	3	4	5	6
Volumen (μL)	340.00	300.00	50.00	130.00	15.00	200.00
Volumen Total (μL)	1035.00					
Promedio	172.50					
Desv. Estándar	131.67					
Error Estándar	76.02					
Valor máximo	340.00					
Valor mínimo	15.00					
<i>Movilidad (%)</i>						
<i>R1</i>	95	99	90	95	95	90
<i>R2</i>	95	90	95	95	95	99
<i>R3</i>	95	95	99	95	95	95
Promedio	95	95	95	95	95	95
Desv. Estándar	0.00	5.00	5.00	0.00	0.00	5.00
Error Estándar	0.00	2.89	2.89	0.00	0.00	2.89
Valor máximo	95	99	99	95	95	99
Valor mínimo	95	90	90	95	95	90
<i>Número de espermias($\times 10^6$)</i>						
<i>R1</i>	2091	3126	3356	3018	3003	3433
<i>R2</i>	2095	3125	3321	2993	3039	3425
<i>R3</i>	2106	3105	3315	2983	2997	3468
Promedio	2097	3119	3331	2998	3013	3442
Desv. Estándar	7.77	11.85	22.14	18.03	22.72	22.87
Error Estándar	4.48	6.84	12.78	10.41	13.11	13.20
Valor máximo	2106	3126	3356	3018	3039	3468
Valor mínimo	2091	3105	3315	2983	2997	3425

Espermiación 5

Organismo	1	2	3	4	5	6	7
Volumen (μL)	50.00	310.00	540.00	125.00	270.00	260.00	40.00
Volumen Total (μL)	1595.00						
Promedio	227.86						
Desv. Estándar	175.35						
Error Estándar	101.24						
Valor máximo	540.00						
Valor mínimo	40.00						
<i>Movilidad (%)</i>							
R1	95	90	90	85	95	85	95
R2	95	95	80	80	95	95	95
R3	95	99	85	90	95	90	95
Promedio	95	95	85	85	95	90	95
Desv. Estándar	0.00	5.00	5.00	5.00	0.00	5.00	0.00
Error Estand	0.00	2.89	2.89	2.89	0.00	2.89	0.00
Valor máximo	95	99	90	90	95	95	95
Valor mínimo	95	90	80	80	95	85	95
<i>Número de espermatozoides ($\times 10^6$)</i>							
R1	4453	4857	4026	5447	3856	5591	5139
R2	4446	4867	4097	5492	3867	5568	5149
R3	4424	4825	4081	5489	3856	5578	5099
Promedio	4441	4850	4068	5476	3860	5579	5129
Desv. Estándar	15.13	21.94	37.24	25.16	6.35	11.53	26.46
Error Estandár	8.74	12.67	21.50	14.53	3.67	6.66	15.28
Valor máximo	4453	4867	4097	5492	3867	5591	5149
Valor mínimo	4424	4825	4026	5447	3856	5568	10198

Espermación 6

Organismo	1	2	3	4	5	6	7
Volumen (μL)	50.00	100.00	20.00	300.00	30.00	255.00	400.00
Volumen Total (μL)	1155.00						
Promedio	165.00						
Desv. Estándar	151.79						
Error Estándar	87.64						
Valor máximo	400.00						
Valor mínimo	20.00						
<i>Movilidad (%)</i>							
R1	80	90	90	85	80	95	90
R2	80	80	90	85	80	95	90
R3	80	85	90	85	80	95	90
Promedio	80	85	90	85	80	95	90
Desv. Estándar	0.00	5.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Error Estándar	0.00	2.89	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Valor máximo	80	90	90	85	80	95	90
Valor mínimo	80	80	90	85	80	95	90
<i>Número de espermias ($\times 10^6$)</i>							
R1	2318	3035	2689	2459	2536	2249	2357
R2	2260	2987	2783	2435	2632	2213	2284
R3	2289	2970	2713	2313	2492	2169	2315
Promedio	2289	2997	2728	2402	2553	2210	2319
Desv. Estándar	29.00	33.71	48.84	78.29	71.59	40.07	36.64
Error Estándar	16.74	19.46	28.20	45.20	41.33	23.13	21.15
Valor máximo	2318	3035	2783	2459	2632	2249	2357
Valor mínimo	2260	2970	2689	2313	2492	2169	2284

Análisis de varianza de una vía para la comparación del porcentaje de movilidad en cada una de las seis espermiaciones de la TSPM. $g/$ = grados de libertad, F = distribución F , P = probabilidad. Los datos fueron transformados a la raíz del arcoseno antes de ser procesados.

Fuente de variación	$g/$	F tablas	F	$P > F$	∞
<i>Modelo general</i>	5	2.31	19.81	< 0.0001	0.05
Error	96				
Total correcto	10				

Análisis de varianza de una vía para la comparación de la cantidad de espermatozoides en cada una de las seis espermiaciones de la TSPM.

Fuente de variación	$g/$	F tablas	F	$P > F$	∞
<i>Modelo general</i>	5	2.31	358.50	< 0.0001	0.05
Error	96				
Total correcto	10				

MEDIDAS MORFOMÉTRICAS DEL ESPEMA DE LA TRUCHA DE SAN PEDRO MÁRTIR

Matriz de datos correspondientes a las medidas morfométricas del espermatozoide de la trucha de San Pedro Mártir.

	Longitud del flagelo (μm)	Ancho de la cabeza (μm)	Longitud de la cabeza (μm)
1	26.40	2.41	2.99
2	33.90	2.53	3.22
3	29.20	2.30	2.88
4	23.20	1.91	2.47
5	36.70	2.31	2.54
6	26.00	2.05	2.46
7	43.70	2.49	2.78
8	36.10	2.19	2.76
9	25.20	1.96	2.93
10	40.20	1.87	2.69

Continuación de tabla.....

	Longitud del flagelo (μm)	Ancho de la cabeza (μm)	Longitud de la cabeza (μm)
11	31.50	2.06	2.73
12	34.70	1.87	2.52
13	29.00	2.11	2.73
14	35.20	1.96	2.37
15	34.00	2.07	2.53
16	33.40	1.93	2.93
17	32.10	2.28	2.85
18	22.10	2.31	2.64
19	21.90	2.52	2.58
20	35.00	2.21	3.16
21	26.90	1.82	2.87
22	43.90	2.39	3.29
23	39.00	1.75	2.86
24	34.60	2.06	3.16
25	34.50	2.46	2.28
26	42.70	2.64	2.77
27	33.60	2.07	2.61
28	32.20	2.41	2.76
29	38.20	2.30	2.99
30	28.90	2.30	2.76
31	29.30	1.90	2.52
32	35.60	1.90	2.52
33	17.20	2.11	2.11
34	35.60	2.32	2.65
35	37.60	1.76	2.80
36	35.00	2.22	2.29
37	37.10	2.08	2.54
38	35.30	2.12	2.86
39	33.50	2.44	2.81
40	37.70	2.18	2.67
41	32.50	2.04	3.05
42	25.30	2.20	2.77
43	36.80	2.26	2.78
44	43.10	2.23	2.81
45	27.60	1.86	2.06
46	42.60	1.97	2.65

Continuación de tabla.....

	Longitud del flagelo (μm)	Ancho de la cabeza (μm)	Longitud de la cabeza (μm)
47	29.80	1.75	2.58
48	28.80	2.03	2.68
49	35.30	2.12	3.02
50	36.00	2.11	2.69
51	36.00	2.07	2.77
<i>Promedio</i>	33.17	2.14	2.72
<i>DS</i>	5.93	0.22	0.26
<i>Máximo</i>	43.90	2.64	3.29
<i>Mínimo</i>	17.20	1.75	2.06

APÉNDICE CAPÍTULO 3

CURVAS DE INACTIVACIÓN

Recolecta de las muestras de esperma de *O. mykiss nelsoni* en la Sierra de San Pedro Mártir (Marzo, 2008).

Organismo	Movilidad (%) Repetición 1	Movilidad (%) Repetición 2	Movilidad (%) Repetición 3	Movilidad (%) Promedio	Cantidad (μ L)
1	80	80	80	80	250
2	65	75	55	65	50
3	80	75	85	80	150
Total					450

Efecto de diferentes soluciones extensoras en la inactivación del esperma.

Formulación de las diferentes soluciones extensoras utilizadas.

Ingrediente	Concentración g/L				
	SE1	SE2	SE3	SE4	SE-EG
NaCl	4.40	7.31	6.00	8.18	---
KCl	6.20	---	3.15	1.49	2.61*
CaCl ₂	0.22	0.01	---	---	---
MgCl ₂	0.08	---	---	---	---
NaHCO ₃	0.20	---	---	---	---
Na ₂ HPO ₄	---	---	---	---	0.26
CaCl ₂ •2H ₂ O	---	---	0.15	---	0.102
MgCl ₂ •6H ₂ O	---	---	---	---	0.22
MgSO ₄ •7H ₂ O	---	---	0.20	---	---
Ácido cítrico	---	---	---	---	0.1
Glucosa	---	---	---	---	10
Tris-HCl	---	3.63	---	---	---
Solución de KOH (1.27 g/100 mL)	---	---	---	---	10**
Solución de Bicina (5.3 g/100 mL)	---	---	---	---	20**
Hepes	---	---	4.70	---	---
pH	8.14	8.5	7.8	8.0	7.4

SE1 (Bozkurt y Seğer, 2005), SE2 (Coson et al, 1999), SE3 (Lahnsteiner, 2000), SE4 (Scott y Baynes, 1980), SE-EG (Erdhal y Graham). *g/mL, **mL

Continuación de tabla.....

mOsmol/kg	<u>Inactivación</u>						<u>Activación</u>					
	R-1	R-2	R-3	Prom	DE	ES	R-1	R-2	R-3	Prom	DE	EE
750	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
842	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
941	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

Movilidad espermática de la TSPM registrada en la SE4.

mOsmol/kg	<u>Inactivación</u>						<u>Activación</u>					
	R-1	R-2	R-3	Prom	DE	ES	R-1	R-2	R-3	Prom	DE	EE
95	100.0	100.0	100.0	100.0	0.0	0.0	2.5	1.3	1.3	1.7	0.7	0.4
191	50.0	56.3	62.5	56.3	6.3	3.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
284	1.3	1.3	1.3	1.3	0.0	0.0	1.3	1.3	1.3	1.3	0.0	0.0
379	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
469	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.3	1.3	1.3	1.3	0.0	0.0
561	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
656	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
750	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
842	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
941	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

Análisis de varianza de dos vías para la comparación del efecto de los diferentes SE a las diferentes osmolalidades sobre la movilidad espermática de la TSPM. *gl* = grados de libertad, *F* = distribución *F*, *P* = probabilidad. Los datos fueron transformados a la raíz del arcoseno antes de ser procesados.

Fuente de Variación	<i>gl</i>	F tablas	F-valor	<i>P</i> > <i>F</i>	∞
<i>Modelo general</i>	39	1.56	560.04	< 0.0001	0.05
Error	80				
Total correcto	119				
<i>Modelo particionado</i>					
Solución extensora	3	3.86	533.30	< 0.0001	0.05
Osmolalidad	9		1426.36	< 0.0001	0.05
Interacción SE-osmolalidad	27		274.24	< 0.0001	0.05

Soluciones de pH utilizadas para la inactivación del esperma de la TSPM.

Solución de HCl 0.5 mM. Mezclar 2.15 mL de HCl (grado reactivo) en 20 mL de agua destilada, homogeneizar y aforar a 100 mL.

Solución de HCl 1 mM. Mezclar 4.30 mL de HCl (grado reactivo) en 20 mL de agua destilada, homogeneizar y aforar a 100 mL.

Solución de NaOH 0.5 mM. Mezclar 2.00 g de NaOH (grado reactivo) en 20 mL de agua destilada, homogeneizar hasta disolver completamente y aforar a 100 mL.

Solución de NaOH 1 mM. Mezclar 4.00 g de NaOH (grado reactivo) en 20 mL de agua destilada, homogeneizar hasta disolver completamente y aforar a 100 mL.

Solución amortiguadora Tris 3 mM. Mezclar 0.1816 g de Tris en 25 mL de agua destilada, homogeneizar hasta disolver completamente y aforar a 100 mL.

Solución amortiguadora Hepes 2 mM. Mezclar 0.2383 g de Hepes en 25 mL de agua destilada, homogeneizar hasta disolver completamente y aforar a 100 mL.

Movilidad espermática (%) de la TSPM registrada en los diferentes valores de pH ajustados con una combinación HCl-NaOH.

HCl-NaOH pH	<u>Inactivación</u>						<u>Activación</u>					
	R-1	R-2	R-3	Prom	DE	ES	R-1	R-2	R-3	Prom	DE	EE
5	6.3	8.8	7.5	7.5	1.3	0.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
6	5.0	6.3	6.3	5.8	0.7	0.4	3.8	5.0	3.8	4.2	0.7	0.4
7	31.3	25.0	31.3	29.2	3.6	2.1	8.8	8.8	8.8	8.8	0.0	0.0
8	87.5	75.0	81.3	81.3	6.3	3.6	6.3	8.8	7.5	7.5	1.3	0.7
9	75.0	75.0	75.0	75.0	0.0	0.0	6.3	6.3	6.3	6.3	0.0	0.0
10	12.5	12.5	12.5	12.5	0.0	0.0	2.5	2.5	1.3	2.1	0.7	0.4

Movilidad espermática (%) de la TSPM registrada en los diferentes valores de pH ajustados con una combinación Tris-Hepes.

HCl-NaOH pH	<u>Inactivación</u>						<u>Activación</u>					
	R-1	R-2	R-3	Prom	DE	ES	R-1	R-2	R-3	Prom	DE	EE
5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.3	0.4	0.8	0.4
6	2.5	1.3	2.5	2.1	0.7	0.4	1.3	1.3	1.3	1.3	0.0	0.0
7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	25.0	31.3	25.0	27.1	3.6	2.1
8	62.5	56.3	62.5	60.4	3.6	2.1	12.5	6.3	12.5	10.4	3.6	2.1
9	12.5	12.5	12.5	12.5	0.0	0.0	3.8	5.0	5.0	4.6	0.7	0.4
10	25.0	31.3	31.3	29.2	3.6	2.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

Análisis de varianza de dos vías para la comparación del efecto de los diferentes valores de pH ajustados con HCl-NaOH o Tris-Hepes sobre la movilidad espermática de la TSPM. Los datos fueron transformados a la raíz del arcoseno antes de ser procesados.

Fuente de variación	gl	F tablas	F-valor	P > F	∞
<i>Modelo general</i>	11	2.25	416.18	< 0.0001	0.05
Error	24				
Total correcto	35				
<i>Modelo particionado</i>					
Solución extensora	1	6.61	646.02	< 0.0001	0.05
pH	5		639.11	< 0.0001	0.05
Interacción SE-pH	5		147.28	< 0.0001	0.05

Soluciones de NaCl y KCl utilizadas para la inactivación del espermatozoide de la TSPM.

NaCl 200 mM. Mezclar 1.1688 g de NaCl (grado reactivo) en 20 mL de agua destilada, homogeneizar hasta disolver completamente y aforar a 50 mL.

KCl 100 mM. Mezclar 0.37275 g de KCl (grado reactivo) en 20 mL de agua destilada, homogeneizar hasta disolver completamente y aforar a 50 mL.

Soluciones de NaCl y KCl preparadas a las diferentes osmolalidades.

NaCl 200 mM (μL)	Agua destilada (μL)	Osmolalidad mOsmol/kg	KCl 100 mM (μL)	Agua destilada (μL)	Osmolalidad mOsmol/kg
005	995	2	010	990	1
050	950	16	100	900	18
100	900	36	200	800	37
200	800	71	300	700	56
300	700	100	400	600	75
400	600	143	500	500	94
500	500	183	600	400	114
600	400	221	700	300	132
700	300	254	800	200	148
			900	100	164
			1000	000	188

Movilidad espermática de la TSPM registrada en las diferentes presiones osmóticas de NaCl.

mOsmol/kg	Inactivación						Activación					
	R-1	R-2	R-3	Prom	DE	EE	R-1	R-2	R-3	Prom	DE	EE
2	12.5	12.5	12.5	12.5	0.00	0.00	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.00
16	12.5	6.3	12.5	10.4	3.61	2.08	5.0	3.8	3.8	4.2	0.72	0.42
36	18.8	31.3	25.0	25.0	6.25	3.61	6.3	5.0	3.8	5.0	1.25	0.72
71	62.5	56.3	56.3	58.3	3.61	2.08	5.0	6.3	5.0	5.4	0.72	0.42
100	87.5	87.5	100.0	91.7	7.22	4.17	1.3	1.3	1.3	1.3	0.00	0.00
143	100.0	100.0	100.0	100.0	0.00	0.00	0.0	0.0	0.0	0.0	0.00	0.00
183	75.0	100.0	87.5	87.5	12.50	7.22	1.3	2.5	1.3	1.7	0.72	0.42
221	100.0	87.5	75.0	87.5	12.50	7.22	5.0	3.8	6.3	5.0	1.25	0.72
254	62.5	87.5	75.0	75.0	12.50	7.22	0.0	0.0	0.0	0.0	0.00	0.00

Análisis de varianza de una vía para la comparación del efecto de las diferentes osmolalidades de NaCl sobre la movilidad espermática de la TSPM. Los datos fueron transformados a la raíz del arcoseno antes de ser procesados.

Fuente de variación	gl	F tablas	F-valor	P > F	∞
<i>Modelo general</i>	8	2.51	28.83	< 0.0001	0.05
Error	18				
Total correcto	26				

Movilidad espermática de la TSPM registrada en las diferentes presiones osmóticas de KCl.

mOsmol/kg	<u>Inactivación</u>						<u>Activación</u>					
	R-1	R-2	R-3	Prom	DE	ES	R-1	R-2	R-3	Prom	DE	EE
1	12.5	12.5	12.5	12.5	0.0	0.00	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.00
18	25.0	25.0	31.3	27.1	3.6	2.08	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.00
37	18.8	25.0	18.8	20.8	3.6	2.08	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.00
56	6.3	6.3	6.3	6.3	0.0	0.00	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.00
75	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.00	6.3	6.3	6.3	6.3	0.0	0.00
94	1.3	1.3	2.5	1.7	0.7	0.42	3.8	2.5	3.8	3.3	0.7	0.42
114	1.3	1.3	1.3	1.3	0.0	0.00	1.3	2.5	1.3	1.7	0.7	0.42
132	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.00	25.0	31.3	25.0	27.1	3.6	2.08
148	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.00	18.8	18.8	10.0	15.8	5.1	2.92
169	2.5	3.8	3.8	3.3	0.7	0.42	6.3	12.5	6.3	8.3	3.6	2.08
188	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.00	18.8	25.0	18.8	20.8	3.6	2.08

Análisis de varianza de una vía para la comparación del efecto de las diferentes osmolalidades de KCl sobre la movilidad espermática de la TSPM. Los datos fueron transformados antes a la raíz del arcoseno.

Fuente de variación	gl	F tablas	F-valor	P > F	∞
Modelo general	10	2.30	274.54	< 0.0001	0.05
Error	22				
Total correcto	32				

SOLUCIONES ACTIVADORAS

Formulación de las soluciones activadoras evaluadas.

Ingrediente	<u>Concentración (g/L)</u>	
	DIA 532	D532
NaCl	0.51	7.31
Glicina	3.75	2.25
CaCl ₂	---	0.11
Tris	2.42	2.42

DIA 532 (Billard, 1977), D532 (Dietrich et al, 2005)

Porcentaje de movilidad de los espermatozoides de la TSPM después de ser suspendidos en las diferentes SE y activados con ocho soluciones activadoras.

	Agua destilada	Agua corriente	Agua de río	NaCl 143 mOsm/kg	NaCl 183 mOsm/kg	NaCl 221 mOsm/kg	D532	DIA 532
<i>SE2-469 Omol/kg</i>								
R1	31.3	37.5	25.0	18.8	6.3	2.5	25.0	43.8
R2	25.0	37.5	31.3	12.5	12.5	1.3	25.0	43.8
R3	25.0	37.5	31.3	12.5	12.5	2.5	25.0	43.8
Promedio	27.1	37.5	29.2	14.6	10.4	2.1	25.0	43.8
DE	3.6	0.0	3.6	3.6	3.6	0.7	0.0	0.0
EE	2.1	0.0	2.1	2.1	2.1	0.4	0.0	0.0
<i>pH 7 (Tris-Hepes)</i>								
R1	18.8	31.3	25.0	25.0	18.8	18.8	18.8	31.3
R2	12.5	25.0	18.8	25.0	18.8	18.8	12.5	25.0
R3	12.5	25.0	25.0	25.0	25.0	18.8	12.5	31.3
Promedio	14.6	27.1	22.9	25.0	20.8	18.8	14.6	29.2
DE	3.6	3.6	3.6	0.0	3.6	0.0	3.6	3.6
EE	2.1	2.1	2.1	0.0	2.1	0.0	2.1	2.1
<i>KCl 132 m=smol/kg</i>								
R1	18.8	25.0	18.8	0.0	0.0	0.0	12.5	37.5
R2	18.8	31.3	18.8	0.0	0.0	0.0	12.5	37.5
R3	18.8	25.0	25.0	0.0	0.0	0.0	12.5	25.0
Promedio	18.8	27.1	20.8	0.0	0.0	0.0	12.5	33.3
DE	0.0	3.6	3.6	0.0	0.0	0.0	0.0	7.2
EE	0.0	2.1	2.1	0.0	0.0	0.0	0.0	4.2
<i>SE-EG 33 mOsmol/kg</i>								
R1	62.5	75.0	75.0	37.5	50.0	62.5	62.5	93.8
R2	62.5	75.0	87.5	37.5	56.3	62.5	68.8	93.8
R3	62.5	75.0	87.5	37.5	50.0	62.5	62.5	87.5
Promedio	62.5	75.0	83.3	37.5	52.1	62.5	64.6	91.7
DE	0.0	0.0	7.2	0.0	3.6	0.0	3.6	3.6
EE	0.0	0.0	4.2	0.0	2.1	0.0	2.1	2.1

Análisis de varianza de dos vías para la comparación del efecto de las diferentes soluciones activadoras sobre la movilidad espermática de la TSPM previamente suspendidos en cuatro SE. Los datos fueron transformados a la raíz del arcoseno antes de ser procesados.

Fuente de variación	gl	F tablas	F-valor	P > F	∞
<i>Modelo general</i>	31	1.65	191.65	< 0.0001	0.05
Error	64				
Total correcto	95				
<i>Modelo particionado</i>					
Solución activadoras	3	4.35	1286.71	< 0.0001	0.05
Soluciones extensoras	7		202.32	< 0.0001	0.05
Interacción SA-SE	21		31.66	< 0.0001	0.05

CONSERVACIÓN A CORTO PLAZO DEL ESPERMA DE LA TRUCHA DE SAN PEDRO MÁRTIR

Colecta de esperma

Análisis de varianza de una vía para comparar el porcentaje de movilidad espermática de los diferentes organismos de la TSPM que liberaron esperma durante Febrero de 2009. Los datos fueron transformados a la raíz del arcoseno antes de ser procesados.

Fuente de variación	gl	F tablas	F-valor	P > F	∞
<i>Modelo general</i>	7	2.66	9.70	< 0.0001	0.05
Error	16				
Total correcto	23				

Análisis de varianza de una vía para comparar el número de espermatozoides obtenido de cada uno de los organismos de la TSPM que liberaron esperma en Febrero de 2009. Los datos fueron transformados a la raíz del arcoseno antes de ser procesados.

Fuente de variación	gl	F tablas	F-valor	P > F	∞
<i>Modelo general</i>	7	2.66	406.64	<0.0001	0.05
Error	16				
Total correcto	23				

DAÑO OCASIONADO AL ESPERMA DE LA TRUCHA DE SAN PEDRO MÁRTIR DURANTE LA CONSERVACIÓN A CORTO PLAZO

Porcentaje de movilidad en la muestra control.

Días	R1	R2	R3	Prom	DE	EE
0	90	90	85	88	2.89	1.67
1	85	85	85	85	0.00	0.0
2	85	85	80	83	2.89	1.67
3	80	80	85	82	2.89	1.67
4	80	80	80	80	0.00	0.0
5	70	70	70	70	0.00	0.0
6	70	70	70	70	0.00	0.0
7	70	70	75	72	2.89	1.67
8	40	40	45	42	2.89	1.67
9	0	0	0	0	0.00	0.0

Porcentaje de movilidad de los espermatozoides que fueron suspendidos en la SE-EG en una dilución Esperma/SE-EG de 1:3.

Días	R1	R2	R3	Prom	DE	EE
0	80	85	85	83	2.89	1.67
1	85	85	80	83	2.89	1.67
2	80	80	80	80	0.00	0.00
3	80	80	80	80	0.00	0.00
4	60	60	60	60	0.00	0.00
5	40	30	40	37	5.77	3.33
6	0	0	0	0	0.00	0.00
7	0	0	0	0	0.00	0.00
8	0	0	0	0	0.00	0.00
9	0	0	0	0	0.00	0.00

Porcentaje de movilidad de los espermatozoides que fueron suspendidos en la SE-EG en una dilución Esperma/SE-EG de 1:6.

Días	R1	R2	R3	Prom	DE	EE
1	85	85	85	85	0.00	0.00
1	80	85	80	82	2.89	1.67
2	75	80	85	80	5.00	2.89
3	60	70	70	67	5.77	3.33
4	50	65	60	58	7.64	4.41
5	40	50	50	47	5.77	3.33
6	40	50	40	43	5.77	3.33
7	0	0	0	0	0.00	0.00
8	0	0	0	0	0.00	0.00
9	0	0	0	0	0.00	0.00

Porcentaje de movilidad de los espermatozoides que fueron suspendidos en la SE-EG en una dilución Esperma/SE-EG de 1:9.

Días	R1	R2	R3	Prom	DE	EE
1	90	90	85	88	2.89	1.67
1	90	85	90	88	2.89	1.67
2	87	85	85	86	1.15	0.67
3	85	85	85	85	0.00	0.00
4	85	85	80	83	2.89	1.67
5	85	80	85	83	2.89	1.67
6	85	80	80	82	2.89	1.67
7	85	80	80	82	2.89	1.67
8	15	10	10	12	2.89	1.67
9	0	0	0	0	0.00	0.00

Análisis de varianza de dos vías para la comparación del efecto de las diferentes diluciones Esperma/SE-EG (control, 1:3, 1:6, 1:9) y el tiempo de almacenamiento (4°C) sobre la movilidad espermática de la TSPM. Los datos fueron transformados a la raíz del arcoseno antes de ser procesados.

Fuente de variación	gl	F tablas	F-valor	P > F	∞
<i>Modelo general</i>	39	1.59	566.12	< 0.0001	0.05
Error	80				
Total correcto	119				
<i>Modelo particionado</i>					
Diferentes diluciones	3	3.86	865.70	< 0.0001	0.05
Tiempo (días)	9		1746.12	< 0.0001	0.05
Interacción Diluciones/tiempo	27		136.17	< 0.0001	0.05

Porcentaje de viabilidad (integridad de membrana) en la muestra control.

Días	R1	R2	R3	Prom	DE	EE
0	87	89	85	87	2.00	1.15
1	70	70	71	70	0.46	0.26
2	60	68	65	65	4.03	2.33
3	65	64	64	65	0.35	0.20
4	51	75	63	63	11.85	6.84
5	50	55	48	51	3.44	1.99
6	43	48	50	47	3.61	2.08
7	46	47	50	48	2.29	1.32
8	33	35	29	32	3.06	1.76
9	0	0	0	0	0.00	0.00

Porcentaje de viabilidad de los espermatozoides que fueron suspendidos en la SE-EG en una dilución Esperma/SE-EG de 1:3.

Días	R1	R2	R3	Prom	DE	EE
0	89	82	85	85	3.51	2.03
1	68	78	86	77	8.86	5.12
2	69	72	82	74	7.05	4.07
3	63	62	77	68	8.34	4.82
4	60	61	67	63	3.54	2.05
5	31	30	33	31	1.53	0.88
6	0	0	0	0	0.00	0.00
7	0	0	0	0	0.00	0.00

Continuación de tabla.....

Días	R1	R2	R3	Prom	DE	EE
8	0	0	0	0	0.00	0.00
9	0	0	0	0	0.00	0.00

Porcentaje de viabilidad de los espermatozoides que fueron suspendidos en la SE-EG en una dilución Esperma/SE-EG de 1:6.

Días	R1	R2	R3	Prom	DE	EE
0	79	83	78	80	2.65	1.53
1	52	51	52	52	0.44	0.25
2	67	51	50	56	9.53	5.50
3	50	49	49	49	0.75	0.44
4	50	46	46	47	2.24	1.29
5	45	40	45	43	2.90	1.68
6	37	39	35	37	2.00	1.15
7	0	0	0	0	0.00	0.00
8	0	0	0	0	0.00	0.00
9	0	0	0	0	0.00	0.00

Porcentaje de viabilidad de los espermatozoides que fueron suspendidos en la SE-EG en una dilución Esperma/SE-EG de 1:9.

Días	R1	R2	R3	Prom	DESV	EE
0	95	84	85	88	5.98	3.45
1	82	81	84	82	1.81	1.05
2	82	80	78	80	2.00	1.16
3	74	72	75	74	1.18	0.68
4	73	69	70	71	2.00	1.15
5	67	69	70	69	1.27	0.73
6	67	60	68	65	4.27	2.46
7	40	51	40	44	6.29	3.63
8	30	31	27	29	2.08	1.20
9	19	9	14	14	5.00	2.89

Análisis de varianza de dos vías para la comparación del efecto de las diferentes diluciones Esperma/SE-EG (control, 1:3, 1:6, 1:9) y el tiempo de almacenamiento (4°C) sobre la viabilidad espermática de la TSPM. Los datos fueron transformados a la raíz del arcoseno antes de ser procesados.

Fuente de variación	gl	F tablas	F-valor	P > F	∞
<i>Modelo general</i>	39	1.59	215.99	< 0.0001	0.05
Error	80				
Total correcto	119				
<i>Modelo particionado</i>					
Diferentes diluciones	3	3.86	370.55	< 0.0001	0.05
Tiempo (días)	9		677.61	< 0.0001	0.05
Interacción Diluciones/tiempo	27		44.95	< 0.0001	0.05

Análisis estadístico de la regresión lineal del porcentaje de movilidad y viabilidad en la muestra control. Los datos fueron transformados antes a la raíz del arcoseno.

Análisis de varianza	gl	Sumas de cuadrados	Cuadrado medio	F	P
Regresión	1	3.332	3.332	383.524	< 0.001
Residual	28	0.243	0.00869		
Total	29	3.575	0.123		

	Coficiente	Error estándar	t	P
1	0.0895	0.0470	1.903	0.067
Viabilidad	1.087	0.0555	19.584	< 0.001

Análisis estadístico de la regresión lineal del porcentaje de movilidad y viabilidad de los espermatozoides mantenidos en una dilución esperma/SE-EG de 1:3. Los datos fueron transformados antes a la raíz del arcoseno.

Análisis de varianza	gl	Sumas de cuadrados	Cuadrado medio	F	P
Regresión	1	7.739	7.739	1307.43	< 0.001
Residual	28	0.166	0.00592		
Total	29	7.905	0.273		

	Coeficiente	Error estándar	t	P
Constante	0.0107	0.0217	0.494	0.625
Viabilidad	1.029	0.0285	36.158	< 0.001

Análisis estadístico de la regresión lineal del porcentaje de movilidad y viabilidad de los espermatozoides mantenidos en una dilución esperma/SE-EG de 1:6. Los datos fueron transformados antes a la raíz del arcoseno.

Análisis de varianza	gl	Sumas de cuadrados	Cuadrado medio	F	P
Regresión	1	6.066	6.066	496.286	< 0.001
Residual	28	0.342	0.0122		
Total	29	6.408	0.221		

	Coeficiente	Error estándar	t	P
Constante	0.0127	0.0358	0.355	0.726
Viabilidad	1.161	0.0521	22.277	< 0.001

Análisis estadístico de la regresión lineal del porcentaje de movilidad y viabilidad de los espermatozoides mantenidos en una dilución esperma/SE-EG de 1:3. Los datos fueron transformados antes a la raíz del arcoseno.

Análisis de varianza	gl	Sumas de cuadrados	Cuadrado medio	F	P
Regresión	1	3.916	3.916	102.383	< 0.001
Residual	28	1.071	0.0382		
Total	29	4.987	0.172		

	Coeficiente	Error estándar	t	P
Constante	-0.301	0.131	-2.302	0.029
Viabilidad	1.400	0.138	10.118	< 0.001

APÉNDICE CAPÍTULO 4

COLECTA DE ESPERMA DE *O. mykiss nelsoni* EN CONDICIONES DE LABORATORIO

Análisis de varianza de una vía para la comparación de los diferentes porcentajes de movilidad espermática de los organismos que liberaron esperma en Marzo y Abril de 2009. *gl* = grados de libertad, *F* = distribución *F*, *P* = probabilidad. Los datos fueron transformados a la raíz del arcoseno antes de ser procesados.

Fuente de variación	<i>gl</i>	F tablas	F-valor	<i>P</i> > <i>F</i>	∞
<i>Modelo general</i>	1	4.08	9.29	0.0041	0.05
Error	40				
Total correcto	41				

Análisis de varianza de una vía para la comparación del número de espermatozoides de los organismos que liberaron esperma en Marzo y Abril de 2009.

Fuente de variación	<i>gl</i>	F tablas	F-valor	<i>P</i> > <i>F</i>	∞
<i>Modelo general</i>	1	4.08	225.40	< 0.0001	0.05
Error	40				
Total correcto	41				

CITOTOXICIDAD DEL CRIOPROTECTANTE EN EL ESPERMA DE LA TRUCHA DE SAN PEDRO MÁRTIR

Preparación de las diferentes concentraciones de crioprotectantes evaluados. Volumen final 1000 μ L.

Concentración del crioprotectante (%)	Solución extensora Erdhal y Graham (μ L)	Crioprotectante (μ L)
5	950	50
7	930	70
10	900	100
15	850	150

Efecto de los agentes crioprotectantes evaluados en diferentes concentraciones a diferentes tiempos sobre la movilidad espermática de la trucha de San Pedro Mártir.

Tiempo (min)	Dimetil sulfóxido (DMSO)						N-N, Dimetil acetamida (DMA)					
	5	10	15	20	25	30	5	10	15	20	25	30
Control	90	90	90	90	80	80	90	90	90	90	80	80
5%	5	2	1	0	0	0	20	20	5	4	4	2
7%	1	0	0	0	0	0	5	5	1	1	1	0
10%	0	0	0	0	0	0	8	3	1	1	1	0
15%	0	0	0	0	0	0	7	7	0	0	0	0

Tiempo (min)	Etilenglicol (ETG)						Glicerol (GL)					
	5	10	15	20	25	30	5	10	15	20	25	30
Control	90	90	90	90	80	80	90	90	90	90	80	80
5%	0	0	0	0	0	0	15	5	0	0	0	0
7%	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0
10%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tiempo (min)	Metanol (MT)						1,2-Propanodiol (PD)					
	5	10	15	20	25	30	5	10	15	20	25	30
Control	90	90	90	90	80	80	90	90	90	90	80	80
5%	50	40	40	30	30	20	5	5	5	2	2	1
7%	50	35	30	30	25	10	5	0	0	0	0	0
10%	20	15	10	10	2	2	2	0	0	0	0	0
15%	15	10	5	5	5	5	0	0	0	0	0	0

Análisis de varianza de tres vías para la comparación del efecto de los diferentes crioprotectantes DMSO, DMA, Glicerol, metanol, PP y EG a las diferentes concentraciones (control, 5%, 7%, 10%, 15%) sobre la movilidad espermática de la TSPM. Los datos fueron transformados a la raíz del arcoseno antes de ser procesados.

Fuente de variación	gl	F tablas	F-valor	P > F	∞
Modelo general		1.77	280.54	< 0.0001	0.05
Error	14				
Total correcto	165				

Continuación de tabla.....

Fuente de variación	gl	F tablas	F-valor	P > F	∞
<i>Modelo particionado</i>					
Crioprotectante	5	6.26	49.75	< 0.0001	0.05
Concentración (%)	4		907.62	< 0.0001	0.05
Tiempo (días)	5		9.66	< 0.0001	0.05

Análisis "Probit" aplicado a los espermatozoides suspendidos en DMA por 5 minutos.

Parámetro	Estimado	EE	Limites de confianza al 95%
Intercepto = a	5.052233	0.846127	(1.411350,8.693116)
Pendiente = b	1.290528	0.930584	(-2.713774,5.294829)
Tasa de respuesta espontanea	0.099883	0.053540	(-0.130499,0.330265)

Valor estimado de EC (concentración efectiva) y concentración de exposición.

Punto	Concentración de exposición
LC/EC 1.00	0.014
LC/EC 5.00	0.048
LC/EC 10.00	0.093
LC/EC 15.00	0.143
LC/EC 50.00	0.911
LC/EC 85.00	5.789
LC/EC 90.00	8.966
LC/EC 95.00	17.144
LC/EC 99.00	57.826

Análisis "Probit" aplicado a los espermatozoides suspendidos en DMA por 10 minutos.

Parámetro	Estimado	EE	Limites de confianza al 95%
Intercepto = a	4.862275	1.129978	(-0.000019,9.724568)
Pendiente = b	1.598961	1.260891	(-3.826652,7.024575)
Tasa de respuesta espontanea	0.099772	0.067868	(-0.192265,0.391808)

Valor estimado de EC y concentración de exposición.

Punto	Concentración de exposición (%)
LC/EC 1.00	0.043
LC/EC 5.00	0.114
LC/EC 10.00	0.193
LC/EC 15.00	0.274
LC/EC 50.00	1.219
LC/EC 85.00	5.424
LC/EC 90.00	7.721
LC/EC 95.00	13.028
LC/EC 99.00	34.755

Análisis "Probit" aplicado a los espermatozoides suspendidos en DMA por 15 minutos.

Parámetro	Estimado	EE	Limites de confianza al 95%
Intercepto = a	4.527642	1.079529	(2.411764,6.643519)
Pendiente = b	3.005992	1.349520	(0.360932,5.651052)
Tasa de respuesta espontanea	0.099991	0.029999	(0.041193,0.158788)

Valor estimado de EC, concentración de exposición y límites de confianza.

Punto	Concentración de exposición (%)	Limites de confianza al 95%	
		Inferior	Superior
LC/EC 1.00	0.242	0.000	1.113
LC/EC 5.00	0.407	0.000	1.473
LC/EC 10.00	0.538	0.000	1.710
LC/EC 15.00	0.649	0.000	1.893
LC/EC 50.00	1.436	0.000	2.912
LC/EC 85.00	3.176	0.023	4.571
LC/EC 90.00	3.833	0.108	5.155
LC/EC 95.00	5.062	1.006	6.536
LC/EC 99.00	8.532	6.597	101.660

Análisis "Probit" aplicado a los espermatozoides suspendidos en DMA por 20 minutos.

Parámetro	Estimado	EE	Limites de confianza al 95%
Intercepto = a	4.887072	1.075884	(2.778340,6.995804)
Pendiente = b	2.632952	1.327164	(0.031711,5.234192)
Tasa de respuesta espontanea	0.099999	0.030000	(0.041199,0.158798)

Valor estimado de EC, concentración de exposición y límites de confianza.

Punto	Concentración de exposición (%)	Limites de confianza al 95%	
		Inferior	Superior
LC/EC 1.00	0.144	0.000	0.955
LC/EC 5.00	0.262	0.000	1.291
LC/EC 10.00	0.360	0.000	1.518
LC/EC 15.00	0.446	0.000	1.693
LC/EC 50.00	1.104	0.000	2.694
LC/EC 85.00	2.732	0.000	4.371
LC/EC 90.00	3.386	0.000	4.959
LC/EC 95.00	4.6520. 000	0.000	6.269
LC/EC 99.00	8.442	6.264	%226927149056.000

Análisis "Probit" aplicado a los espermatozoides suspendidos en DMA por 25 minutos.

Parámetro	Estimado	EE	Limites de confianza al 95%
Intercepto = a	4.800296	1.095426	(2.653260,6.947331)
Pendiente = b	2.677760	1.349387	(0.032961,5.322559)
Tasa de respuesta espontanea	0.199997	0.040000	(0.121597,0.278396)

Valor estimado de EC, concentración de exposición y límites de confianza.

Punto	Concentración de exposición (%)	Limites de confianza al 95%	
		Inferior	Superior
LC/EC 1.00	0.161	0.000	1.009
LC/EC 5.00	0.289	0.000	1.358
LC/EC 10.00	0.394	0.000	1.592

Continuación de tabla.....

Punto	Concentración de exposición (%)	Limites de confianza al 95%	
		Inferior	Superior
LC/EC 15.00	0.487	0.000	1.773
LC/EC 50.00	1.187	0.000	2.802
LC/EC 85.00	2.895	0.000	4.526
LC/EC 90.00	3.574	0.000	5.141
LC/EC 95.00	4.885	0.000	6.617
LC/EC 99.00	8.777	6.493	%2548128808960.000

Análisis "Probit" aplicado a los espermatozoides suspendidos en DMSO por 5 minutos.

Parámetro	Estimado	EE	Limites de confianza al 95%
Intercepto = a	2.855035	1.847358	(0.765788,6.475857)
Pendiente = b	5.331258	2.488803	(0.453204,10.209312)
Tasa de respuesta espontanea	0.100013	0.030002	(0.041210,0.158816)

Valor estimado de EC y concentración de exposición.

Punto	Concentración de exposición (%)	Limites de confianza al 95%	
		Inferior	Superior
LC/EC 1.00	0.9250	0.000	2.180
LC/EC 5.00	1.241	0.000	2.546
LC/EC 10.00	1.452	0.000	2.766
LC/EC 15.00	1.614	0.000	2.926
LC/EC 50.00	2.525	0.001	3.721
LC/EC 85.00	3.951	0.113	4.815
LC/EC 90.00	4.393	0.385	5.188
LC/EC 95.00	5.139	2.177	6.307
LC/EC 99.00	6.897	5.827	87.604

Análisis "Probit" aplicado a los espermatozoides suspendidos en Glicerol por 5 minutos.

Parámetro	Estimado	EE	Limites de confianza al 95%
Intercepto = a	2.763465	0.791504	(1.212118,4.314813)
Pendiente = b	4.423975	0.994898	(2.473974,6.373977)
Tasa de respuesta espontanea	0.100380	0.030050	(0.041483,0.159278)

Valor estimado de EC, concentración de exposición y límites de confianza.

Punto	Concentración (%) de exposición	Limites de confianza al 95%	
		Inferior	Superior
LC/EC 1.00	0.954	0.218	1.701
LC/EC 5.00	1.361	0.411	2.179
LC/EC 10.00	1.644	0.575	2.489
LC/EC 15.00	1.868	0.722	2.723
LC/EC 50.00	3.203	1.874	4.001
LC/EC 85.00	5.493	4.627	6.184
LC/EC 90.00	6.241	5.490	7.154
LC/EC 95.00	7.540	6.661	9.428
LC/EC 99.00	10.749	8.811	17.190

Análisis "Probit" aplicado a los espermatozoides suspendidos en Metanol por 5 minutos.

Parámetro	Estimado	EE	Limites de confianza al 95%
Intercepto = a	2.852604	0.744368	(-0.350412,6.055621)
Pendiente = b	2.692068	0.796715	(-0.736198,6.120334)
Tasa de respuesta espontanea	0.100790	0.055442	(-0.137776,0.339356)

Valor estimado de EC y concentración de exposición.

Punto	Concentración de exposición (%)
LC/EC 1.00	0.858
LC/EC 5.00	1.537
LC/EC 10.00	2.097
LC/EC 15.00	2.586
LC/EC 50.00	6.276
LC/EC 85.00	15.229

Continuación de la tabla.....

Punto	Concentración de exposición (%)
LC/EC 90.00	18.7852
LC/EC 95.00	25.627
LC/EC 99.00	45.899

Análisis "Probit" aplicado a los espermatozoides suspendidos en Metanol por 10 minutos.

Parámetro	Estimado	EE	Limites de confianza al 95%
Intercepto = a	3.335643	0.408228	(2.535516,4.135769)
Pendiente = b	2.486392	0.445803	(1.612618,3.360167)
Tasa de respuesta espontanea	0.100223	0.030024	(0.041375,0.159070)

Valor estimado de EC, concentración de exposición y límites de confianza.

Punto	Concentración de exposición (%)	Limites de confianza al 95%	
		Inferior	Superior
LC/EC 1.00	0.542	0.124	1.104
LC/EC 5.00	1.018	0.328	1.767
LC/EC 10.00	1.425	0.549	2.273
LC/EC 15.00	1.789	0.778	2.696
LC/EC 50.00	4.671	3.314	5.653
LC/EC 85.00	12.196	10.286	16.275
LC/EC 90.00	15.305	12.388	22.687
LC/EC 95.00	21.426	16.107	37.597
LC/EC 99.00	40.272	25.982	98.360

Análisis "Probit" aplicado a los espermatozoides suspendidos en Metanol por 15 minutos.

Parámetro	Estimado	EE	Limites de confianza al 95%
Intercepto = a	2.798115	0.444438	(1.927017,3.669213)
Pendiente = b	3.272502	0.499046	(2.294371,4.250632)
Tasa de respuesta espontanea	0.100274	0.030027	(0.041421,0.159126)

Valor estimado de EC, concentración de exposición y límites de confianza.

Punto	Concentración de exposición (%)	Límites de confianza al 95%	
		Inferior	Superior
LC/EC 1.00	0.916	0.368	1.506
LC/EC 5.00	1.480	0.727	2.185
LC/EC 10.00	1.911	1.044	2.667
LC/EC 15.00	2.271	1.333	3.053
LC/EC 50.00	4.708	3.683	5.480
LC/EC 85.00	9.762	8.635	11.595
LC/EC 90.00	11.600	10.049	14.554
LC/EC 95.00	14.979	12.416	20.651
LC/EC 99.00	24.194	18.178	40.427

Análisis "Probit" aplicado a los espermatozoides suspendidos en Metanol por 20 minutos.

Parámetro	Estimado	EE	Límites de confianza al 95%
Intercepto = a	3.746294	0.412429	(2.937933, 4.554654)
Pendiente = b	2.179456	0.452063	(1.293413, 3.065500)
Tasa de respuesta espontanea	0.100789	0.030103	(0.041786, 0.159791)

Valor estimado de EC, concentración de exposición y límites de confianza.

Punto	Concentración de exposición (%)	Límites de confianza al 95%	
		Inferior	Superior
LC/EC 1.00	0.322	0.036	0.821
LC/EC 5.00	0.661	0.119	1.375
LC/EC 10.00	0.971	0.227	1.811
LC/EC 15.00	1.258	0.350	2.182
LC/EC 50.00	3.760	2.160	4.873
LC/EC 85.00	11.240	9.377	15.475
LC/EC 90.00	14.564	11.592	23.286
LC/EC 95.00	21.378	15.514	43.643
LC/EC 99.00	43.915	26.240	144.803

Análisis "Probit" aplicado a los espermatozoides suspendidos en Metanol por 25 minutos.

Parámetro	Estimado	EE	Limites de confianza al 95%
Intercepto = a	3.006855	1.133749	(-1.871667, 7.885377)
Pendiente = b	3.224467	1.283944	(-2.300345, 8.749279)
Tasa de respuesta espontanea	0.199823	0.090124	(-0.187981, 0.587626)

Valor estimado de EC y concentración de exposición

Punto	Concentración de exposición (%)
LC/EC 1.00	0.788
LC/EC 5.00	1.282
LC/EC 10.00	1.662
LC/EC 15.00	1.980
LC/EC 50.00	4.151
LC/EC 85.00	8.701
LC/EC 90.00	10.366
LC/EC 95.00	13.436
LC/EC 99.00	21.857

Análisis "Probit" aplicado a los espermatozoides suspendidos en Metanol por 30 minutos.

Parámetro	Estimado	EE	Limites de confianza al 95%
Intercepto = a	4.210642	0.529390	(3.173038, 5.248246)
Pendiente = b	2.236549	0.599366	(1.061792, 3.411306)
Tasa de respuesta espontanea	0.199462	0.039959	(0.121143, 0.277781)

Valor estimado de EC, concentración de exposición y límites de confianza.

Punto	Concentración de exposición (%)	Limites de confianza al 95%	
		Inferior	Superior
LC/EC 1.00	0.205	0.004	0.714
LC/EC 5.00	0.414	0.017	1.134
LC/EC 10.00	0.602	0.037	1.452

Continuación de la tabla.....

Punto	Concentración de exposición (%)	Límites de confianza al 95%	
		Inferior	Superior
LC/EC 15.00	0.775	0.063	1.717
LC/EC 50.00	2.254	0.585	3.510
LC/EC 85.00	6.551	4.833	8.089
LC/EC 90.00	8.433	6.836	11.486
LC/EC 95.00	12.257	9.582	23.023
LC/EC 99.00	24.721	15.795	96.960

Análisis "Probit" aplicado a los espermatozoides suspendidos en 1,2-Propanodiol por 5 minutos.

Parámetro	Estimado	EE	Límites de confianza al 95%
Intercepto = a	5.001805	0.748072	(3.535584, 6.468027)
Pendiente = b	2.098176	0.880597	(0.372206, 3.824145)
Tasa de respuesta espontánea	0.100058	0.030008	(0.041243, 0.158873)

Valor estimado de EC, concentración de exposición y límites de confianza.

Punto	Concentración de exposición (%)	Límites de confianza al 95%	
		Inferior	Superior
LC/EC 1.00	0.078	0.000	0.593
LC/EC 5.00	0.164	0.000	0.897
LC/EC 10.00	0.245	0.000	1.118
LC/EC 15.00	0.320	0.000	1.297
LC/EC 50.00	0.998	0.000	2.445
LC/EC 85.00	3.112	0.075	4.734
LC/EC 90.00	4.073	0.332	5.659
LC/EC 95.00	6.069	2.596	8.523
LC/EC 99.00	12.819	8.931	252.826

Evaluación de la integridad de membrana

Efecto de las diferentes temperaturas de descongelación en la integridad de membrana de los espermatozoides de la TSPM criopreservados con DMA o DMSO o Metanol como crioprotectante permeable. V = % de espermias de color verde o con membrana intacta, R = % de espermias de color rojo o con membrana dañada. T1 = 25°C (30 s), T1 = 35°C (8 s), T1 = 40°C (4 s).

Crioprotectante Temperatura Campo	<u>DMSO</u>		T2		T3		<u>DMA</u>		T2		T3	
	T1						T1					
	V	R	V	R	V	R	V	R	V	R	V	R
1	7	93	12	88	15	85	3	97	13	87	18	82
2	5	95	12	88	17	83	4	96	14	86	17	83
3	8	92	11	89	15	85	3	97	16	84	22	78
4	9	91	10	90	14	86	4	96	13	87	18	82
5	7	93	10	90	15	85	3	97	17	83	23	77
6	9	91	12	88	16	84	3	97	16	84	19	81
7	7	93	11	89	15	85	3	97	14	86	21	79
8	8	92	10	90	16	84	4	96	14	86	20	80
9	6	94	11	89	14	86	5	95	13	87	20	80
10	5	95	11	89	18	82	5	95	12	88	19	81
Promedio	7.10		11.00		15.50		3.70		14.20		19.70	
SD	1.45		0.82		1.27		0.82		1.62		1.89	
EE	0.46		0.26		0.40		0.26		0.51		0.60	

Crioprotectante Temperatura Campo	<u>METANOL</u>					
	T1		T2		T3	
	V	R	V	R	V	R
1	4	96	8	92	57	43
2	4	96	13	87	55	45
3	3	97	12	88	58	42
4	5	95	11	89	56	44
5	3	97	12	88	55	45
6	4	96	11	89	53	47
7	5	95	9	91	50	50
8	3	97	12	88	54	46
9	4	96	10	90	57	43
10	2	98	11	89	56	44

Continuación de la tabla.....

Crioprotectante Temperatura Campo	T1 Verdes	METANOL T2 Verdes	T3 Verdes
Promedio	3.70	10.90	55.10
SD	0.95	1.52	2.33
EE	0.30	0.48	0.74

Análisis de varianza de dos vías para la comparación de la integridad de membrana de los espermatozoides de la TSPM criopreservados con diferentes CPA y descongelados a diferentes temperaturas. *gl* = grados de libertad, *F* = distribución *F*, *P* = probabilidad. Los datos fueron transformados antes a la raíz del arcoseno.

Fuente de variación	gl	F tablas	F-valor	<i>P</i> > <i>F</i>	∞
<i>Modelo general</i>	8	2.07	724.08	< 0.0001	0.05
Error	81				
Total correcto	89				
<i>Modelo particionado</i>					
Crioprotectantes	2	19.00	247.57	< 0.0001	0.05
Temperaturas	2		1782.67	< 0.0001	0.05
ACP * TEMP	4		433.05	< 0.0001	0.05

Ensayo cometa

Controles. Todos los reactivos se preparan un día antes (Incluso hasta 2 días antes).

Control positivo. Peróxido de Hidrogeno (H_2O_2). Volumen final 100 mL. Hacer una solución madre (1000 mM) de H_2O_2 y de ahí preparar diferentes diluciones (100, 200, 400, 600, 800, 1000).

Reactivo	Fórmula	PM	Concentración	Cantidad
Peróxido de Hidrogeno	H_2O_2	34.02	30% w/w	1.33 μ L
Aforar a 100 mL en agua destilada y almacenar a 4°C				

Agarosa 0.5%. Volumen final 10 mL (suficiente para 12 muestras).

Marca/código	Reactivo	Cantidad	Concentración final
SIGMA A-9539	Agarosa	0.05 g	0.5 %
Aforar a 10 mL con agua Mili-Q (9.95 mL)			

Nota: La mezcla fue calentada en un horno de microondas por ~1.5 minutos. Cada 15 segundos la muestra fue removida del microondas y agitada ligeramente para evitar la formación de burbujas. Finalmente antes de que hierva la solución es retirada del microondas y mantenida en baño maría (55-60°C).

Agarosa de bajo punto de fusión preparada al 0.5%. Volumen final 10 mL (suficiente para 12 muestras).

Marca/código	Reactivo	Cantidad	Concentración (%)
SIGMA A-9414	Agarosa low melting point	0.05 g	0.5
Aforar a 10 mL con agua Mili-Q (9.95 mL)			

Sugerencias: Preparar las agarosas 1 día antes y almacenarla a 4°C.

Solución de lisis. Volumen final 1 litro.

Reactivo	Concentración	Cantidad
NaCl (Peso mol: 58.44)	2.5 mM	0.146 g
Na ₂ -EDTA (Peso mol: 372.24)	100 mM	37.224 g
Tris (Peso mol: 121.14)	10 mM	1.211 g
Triton X-100	1 %	10 mL
Lauryl sarcosine (Peso mol: 293.4)	1 %	10 g
pH	10	

Sugerencias:

- Asegurarse de mezclar bien (~20 minutos)
- Poner ~8g de NaOH para ajustar el pH a 10 esto mejora la mezcla además se puede mezclar a ~40°C. Después agregar (SLS)
- Cuando se hallan formado cristales de sales estos se pueden eliminar calentando la solución a temperaturas mayores de 40°C
- Para eliminar la solución de lisis, los portaobjetos son enjuagados con la solución (fría) de electroforesis. El enjuagar implica meter y sacar los portaobjetos rápido, no hay que moverlos mucho

Búfer para electroforesis. Volumen final 1 litro.

Reactivo	Concentración	Gramos
NaOH	300 mM	12.000
Na ₂ -EDTA	1 mM	0.372
pH	12	

Nota: Se usaron ~20 mL de HCl para ajustar el pH a 12

Solución de neutralización. Volumen final 250 mL.

Reactivo	Concentración	Gramos
Tris	0.4 mM	0.012114
pH	7.5	
Poner una gotita super diluida de HCl		

