

“LA GINOGENESIS COMO UNA ALTERNATIVA DE PRODUCCIÓN DE ALEVINOS DE TRUCHAS SOLO HEMBRAS EN EL ALTIPLANO NARIÑENSE”

GYNOGENESIS, AS AN ALTERNATIVE OF PRODUCTION OF ALL FEMALES FINGERLINGS TROUT IN THE NARIÑO HIGHLANDS"

Salas Benavides. J¹, Portillo Gomez N.H², Ramos Ramos A.A.³, Lopez Macias J N⁴

Resumen

El cultivo de trucha arcoíris en el trópico se caracteriza por desarrollarse en zonas de altura con fotoperiodo constante durante el año de 12 horas luz, 12 horas de oscuridad a diferencia de lo que sucede en zonas templadas, lo que implica que en las latitudes ecuatoriales el eje neuroendocrino de los ejemplares de los machos actúa precozmente generando a los 8 meses de cultivo reproductores machos viables pero sin sincronía reproductiva con las hembras. Lo anterior se traduce en pobres ganancias de peso de los machos, ataques con lesiones permanentes de las hembras y crecimiento heterogéneo de los lotes con precios poco atractivos reduciendo la rentabilidad de la industria truchícola.

Por lo anteriormente expuesto, en la explotación de salmónidos en las zonas ecuatoriales se recomienda el levante de sólo hembras; sin embargo, las técnicas tradicionales basadas en la inducción del sexo mediante hormonas, afecta negativamente la cadena trófica de los cuerpos de agua y la salud del consumidor final. Esta condición justifica plenamente la necesidad de evaluar nuevas técnicas amigables con el medio ambiente y que aseguren la mayor producción de hembras. Por esta razón, el Grupo de investigaciones en Acuicultura de la Universidad de Nariño – GIAC, analizó la eficiencia de la ginogénesis en la distribución de sexos de las ovas eclosionadas, comparando el efecto de diferentes temperaturas y periodos de exposición al choque térmico de los embriones. Con este propósito, se desarrollaron los siguientes experimentos:

ENSAYO 1. Se evaluaron 12500 ovas de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) adaptada al lago Guamuez, en el Centro Ambiental y Piscícola “Guairapungo”. Este material biológico fue fecundado con espermatozoides irradiados mediante una lámpara de luz UV, colocada a 10 cm de la película de semen y durante 270 segundos de exposición que aseguraba la destrucción del ADN del espermatozoide pero conservando la capacidad de este

¹Ingeniería en Producción Acuícola, Facultad de Ciencias Pecuarias, Universidad de Nariño, Pasto, Nariño, Colombia. Biol, Ecol. Teléfono 3117038251. biojull77@hotmail.com. ² Nestor Hernán Portillo Zootecnista. Universidad de Nariño. ³ Ayde Aleyda Ramos Ramos Zootecnista. Universidad de Nariño. ⁴ Jorge Nelson López Macías.D.M.V.Z., Esp., MSc., PhD.

para penetrar al óvulo e iniciar la división mitótica. Los embriones fueron sometidos a choques térmicos efectuados a diferentes temperaturas con una duración constante de 15 minutos, aplicados 25 minutos después de la fertilización. Se utilizó un diseño irrestrictamente al azar (DIA) conformado por cinco tratamientos con cinco replicaciones cada uno, distribuidos de la siguiente manera:

- T1 : Fecundación de ovas con espermatozoides no irradiados y sin aplicación de choque térmico.
- T2 : Espermatozoides irradiados y choque térmico de 25°C.
- T3 : Espermatozoides irradiados y choque térmico de 27°C.
- T4 : Espermatozoides irradiados y choque térmico de 29°C.
- T5 : Espermatozoides irradiados y choque térmico de 31°C.

El análisis de varianza y las pruebas de significancia, establecieron diferencias estadísticas, con relación al porcentaje de hembras del tratamiento testigo (T1). El tratamiento T3 registró el mejor porcentaje de hembras con 95,4% seguido por los tratamientos T4 y T2 con 93,55% y 91,2% respectivamente. Los ejemplares sometidos al tratamiento T5 no resistieron el choque térmico y murieron en la fase de reabsorción. En el tratamiento T1, se estableció, una distribución normal de machos y hembras (52% de hembras y 48% de machos). La mayor supervivencia, la registró el tratamiento T1 con 43,05% seguido por el T3 con (41,41%), T2 (37,7%) y T4 (25,52%).

ENSAYO 2. Se analizaron 10000 ovas de *Oncorhynchus mykiss*, el semen y óvulos fueron tratados con protocolos similares a los establecidos en el ensayo 1, manteniendo la temperatura del choque térmico constante pero variando la duración del mismo, según el siguiente diseño experimental:

- Tratamiento 1: sin radiación UV y sin choque térmico
- Tratamiento 2: choque térmico a 27 °C por 5 minutos
- Tratamiento 3: choque térmico a 27 °C por 10 minutos
- Tratamiento 3: choque térmico a 27 °C por 15 minutos
- Tratamiento 5: choque térmico a 27 °C por 20 minutos

El análisis de varianza y las pruebas de significancia, establecieron diferencias estadísticas altamente significativas, con relación a la proporción de hembras en el tratamiento 4. El análisis porcentual de ejemplares ginogenéticos demostró mayor efectividad en el T4 (100%), seguido del T2, 96,5%; T3, 93,2%; T1, 91,5% y T5, 89,5%. Igualmente, el T4 registró los mejores porcentajes de Supervivencia en las etapas de fertilización, embriogénesis y larvicultura.

Palabras Clave: Ginogénesis, embriogénesis, trucha arcoíris, irradiación UV

Key Words: Gynogenesis, embryogenesis, rainbowtrout, UV irradiation

Introducción. Es importante la evaluación experimental de técnicas que permitan aumentar los parámetros productivos y realizar un mejoramiento genético de las especies explotadas; entendiendo por mejoramiento, el cambio de frecuencia de una característica

deseable en una población o la introducción en ella de características presentes en otra población de la misma o diferente especie, la modificación de la constitución cromosómica o la inserción de nuevos genes, teniendo como objetivo que la nueva generación se desempeñe mejor que la parental.

En explotación intensiva de trucha arcoiris bajo condiciones de cautiverio, es deseable el cultivo de ejemplares solo hembras debido a la precocidad sexual de los machos, lo cual ocasiona que un buen porcentaje de los nutrientes de la dieta sean utilizados en la formación de esperma disminuyendo las tasas de conversión y ganancia de peso igualmente los machos son más agresivos y gastan gran cantidad de energía en el ataque a sus congéneres generando situaciones de jerarquía y dominancia, lo que se traduce en heridas y traumatismos en la piel y por ende, mayor incidencia y propagación de enfermedades causadas por agentes infecciosos.

De acuerdo con lo expuesto anteriormente, es recomendable evaluar técnicas que permitan la propagación de cultivos monosexuales de hembras, como es el caso de la ginogénesis, por medio de la cual la descendencia tiene únicamente la información genética de la madre debido a que el genoma paterno es destruido mediante procedimientos previos a la fertilización, complementando la técnica con la aplicación de choques térmicos a los huevos.

En consecuencia, la presente investigación se propuso determinar cuál temperatura produce el choque térmico que genere no solo el mayor número de hembras sino que también incida favorablemente en la supervivencia de estas.

Revisión de Literatura.

Según Pérez y Beaumont (1990)⁽¹⁾, el mecanismo de determinación sexual en truchas es similar al de los humanos de tal manera que las hembras son homogaméticas (XX) y los machos heterogaméticos (XY) con relación a los cromosomas sexuales. En consecuencia los machos producen dos tipos de espermatozoides los que llevan X y los que llevan Y. La mezcla al azar de los gametos da una población normal de machos y hembras en proporción de 1:1. Geodakyan y Kosobustkii (1972) citados por Narváez y Tovar (1991)⁽²⁾ demostraron que la distribución de sexo en los peces podría cambiar de acuerdo a las distintas condiciones medio ambientales y de manejo. De acuerdo con Lagler, et al (1984)⁽³⁾, las truchas machos generalmente maduran un año antes que las hembras, adquieren una apariencia desagradable y desarrollan conductas agresivas, la cual, facilita que se produzcan heridas frecuentes infectadas por bacterias y hongos. Chaparro (1994)⁽⁴⁾ observó que ejemplares de trucha arcoiris con madurez sexual tardía crecen mejor, en consecuencia el proceso de maduración sexual afecta negativamente el crecimiento. Este problema ha sido solucionado mediante diferentes técnicas que pretenden eliminar los machos mediante el empleo de hormonas, producción de triploides o ginogenéticos.

Chourrout (1986)(a)⁽⁵⁾ demostró que la producción de individuos con genoma originario de un solo padre se logra mediante los siguientes métodos :

- Autofertilización. Técnica que requiere inducir previamente ejemplares hermafroditas.
- Androgénesis, Necesita de ambos padres pero el huevo es únicamente un medio de desarrollo porque su constitución genética ha sido destruida antes de la fertilización. El genoma del embrión es provisto y puede ser doblado únicamente por supresión de la primera mitosis.
- Ginogénesis. Requiere de los dos padres, pero el esperma ha sido inactivado mediante tratamientos previos a la fertilización y se utiliza únicamente para iniciar el desarrollo del huevo, en consecuencia, no contribuye al genoma del embrión. Por lo tanto, para compensar la ausencia del genoma masculino, es necesario inhibir el desarrollo de la segunda división meiótica, evitando así la expulsión del correspondiente corpúsculo polar, para esto aplica un choque térmico a los huevos, evitando dicha división, de esta manera el ovocito conserva los dos lotes cromosómicos que forma un núcleo femenino diploide.

• Los choques térmicos se pueden reemplazar choques de alta presión hidrostática a los huevos. De esta manera se consigue duplicar el conjunto de cromosomas mediante la inhibición de la primera división celular, característica del desarrollo de la mitosis (Chaparro, 1994)⁽⁴⁾.

Según Stanley (1976) Streisinger, et al (1981), Nasi y Csanyi (1984) citado por Thorgaard (1986)⁽⁶⁾ la ginogénesis se aplicó inicialmente como método para el control del sexo y posteriormente se ha adoptado para el desarrollo de líneas genéticas de peces.

De acuerdo con Purdom (1969)⁽⁷⁾ y Chourrout (1986)⁽⁶⁾ la ginogénesis fue observada por primera vez en anfibios por Hertwig en 1911, quien posteriormente evaluó el efecto de incrementar dosis de rayos ionizantes en espermatozoides de truchas café. Al analizar la supervivencia de embriones obtenidos por inseminación con esperma irradiado, determinó una masiva y temprana mortalidad con dosis de radiación baja y masiva pero tardía mortalidad con dosis altas. Los anteriores resultados indican que las dosis de radiación baja no destruye totalmente el genoma del esperma, pero ocasionan una toxicidad dentro del embrión ; mientras que las dosis altas inducen la inactivación completa y dan como resultado embriones haploides no viables, que de cualquier manera alcanzan su estado larval. (Chourrout 1986)⁽⁵⁾.

En opinión de Hubbs y Hubbs (1932) citados por Salinas (1991)⁽⁸⁾ en algunos teleósteos como la *Mollinesia formosa*, y en poblaciones de goldfish (*Carassius auratus*) la ginogénesis es un tipo de reproducción natural, en estas lo que realmente ocurre es la fecundación de los huevos con esperma de otras especies que, sin aportar su ADN al embrión, activan el desarrollo embrionario del huevo.

De acuerdo con Chaparro (1994)⁽⁴⁾, para la obtención de peces ginogenéticos, es necesario bombardear el esperma con rayos ultravioleta (UV) para destruir el núcleo celular. Chourrout y Quillet, E (1982)⁽⁹⁾ los rayos ultravioleta causan la formación de enlaces entre dos pirimidinas adyacentes en una misma cadena de ADN, mediante la incorporación de una molécula de agua entre estas. A dos pirimidinas enlazadas de

esta manera se le llama dímeros. La formación de dímeros causa debilitamiento de los enlaces entre las pirimidinas dimerizadas y sus purinas complementarias en otra cadena de ADN. Esto entorpece la replicación, transcripción y por ende traducción del material hereditario. Los mismos autores manifiestan que este método es de fácil manejo, además los daños causados por los rayos UV pueden ser reparados exponiendo el esperma a la luz visible, la energía de luz corriente activa a cierta enzima que está unida al ADN la cual descompone los enlaces anormales entre los dímeros, retornando las bases a su estado normal.

Chourrout (1986)⁽⁵⁾ determinó que la radiación UV penetra débilmente en los núcleos celulares, por lo tanto, se requiere que el esperma a irradiar, se exponga en débiles películas sobre recipientes donde sea posible su agitación constante. Para Chourrout y Quillet (1982)⁽⁹⁾ los rayos X y gamma son frecuentemente utilizados por razones prácticas en la inactivación del ADN espermático, ya que tienen una alta penetrancia en grandes volúmenes de esperma; pero en trucha arcoiris se ha observado que después del tratamiento de esperma con estos rayos, altas dosis de fragmentos supernumerarios de cromosomas de origen paterno se presentan en las células del embrión haploide, los cuales afectan negativamente la supervivencia del embrión y podrían deprimir la fertilidad de los ginogenéticos adultos si ellos son estables.

Chourrout (1986)⁽⁵⁾ manifiesta que para la obtención de ginogenéticos y triploides viables se debe suprimir la segunda división meiótica del huevo después de la fertilización con semen irradiado y sin irradiación respectivamente. El anterior autor al igual que Pérez y Beaumont (1990)⁽¹⁾ sostienen que la poliploidía se puede obtener mediante: Choques térmicos fríos, choques térmicos cálidos, choques de presión hidrostática y compuestos químicos. Dichos procesos producen la ruptura del huso acromático, lo cual inhibe la formación y posterior eliminación de los cuerpos polares. Así, el juego de cromosomas que normalmente iría al cuerpo polar, es incorporado al futuro óvulo.

Chourrout y Quillet (1982)⁽⁹⁾ comprobaron que los choques fríos son mayormente utilizados en peces de aguas cálidas y los choques cálidos en peces de aguas frías. Además, demostraron que los choques fríos basados en temperaturas entre 0 y 4°C fueron parcialmente eficientes para la diploidización de trucha arcoiris ginogenética, pero esta técnica no ha sido optimizada comercialmente. Los mismos autores reportan mejores resultados con choques cálidos moderados a temperatura de 26 a 29°C.

En opinión de López y Toro (1990)⁽¹⁰⁾ los choques de presión hidrostática consisten en someter a los huevos a 400 - 500 atmósferas con ayuda de una prensa hidráulica. Aunque la técnica es eficiente no se utiliza comercialmente, debido a que son más costosos que los choques térmicos, ya que estos últimos permiten el tratamiento simultáneo de un mayor número de huevos. Los autores anteriormente citados afirman que los tratamientos químicos con sustancias tales como la citochalesina B o la colchicina pueden también inducir retención del cuerpo polar, y aunque no han tenido éxito en salmónidos si han dado buenos resultados en moluscos tales como ostras americanas y japonesas. La optimización de las técnicas de diploidización se evalúa teniendo en cuenta la producción de ginogenéticos diploides y la supervivencia (Chourrout 1986⁽⁵⁾).

Metodología.

Selección de Reproductores. Los reproductores utilizados en el ensayo se seleccionaron según las características fenotípicas de color, profundidad del filete, forma de la cabeza y grado de madurez sexual la cual se indica por enrojecimiento urogenital y dilatación de la cavidad abdominal. Los ejemplares se extrajeron de los estanques excavados mediante chinchorros y nasas de material suave.

El macho maduro se identificó por la salida del semen al ejercer una leve presión en sentido anteroposterior sobre el abdomen. La hembra se seleccionó teniendo en cuenta aspectos como vientre abultado, región urogenital enrojecida y además se realizó una leve presión sobre el abdomen para observar los oocitos respectivos.

Acción del Desove.

Los ejemplares fueron trasladados a la sala de manejo de reproductores con el fin de evitar la exposición de los mismos a los rayos solares y así proceder a la extracción de los productos sexuales en un recipiente con 25 litros de agua y 25mL de anestésico Triclaen Sulfato de Metilo que se utiliza como sedante, para disminuir el estrés causado por la manipulación. Al cabo de dos minutos el pez presentó pérdida del equilibrio por efecto del sedante; momento propicio para retirarlos del agua, secarlos suavemente con el fin de evitar el humedecimiento de los recipientes y contaminación de los productos sexuales. Posteriormente el reproductor fue sostenido lateralmente sobre el antebrazo derecho con el poro genital en dirección al recipiente, sujetando con la mano izquierda y una balletilla de algodón, la región caudal de tal forma que el ejemplar permanezca inclinado con la cabeza hacia arriba. Con el pulgar y el índice de la mano derecha, se ejerce una ligera presión en la cavidad abdominal desde la parte anterior del tronco hacia el orificio genital, efectuando esta operación 2 ó 3 veces. Toda actividad se desarrolló bajo techo, evitando los rayos directos del sol.

Irradiación del Esperma.

La totalidad del esperma obtenido se distribuyó en cajas de petri, algunas de las cuales según diseño experimental se sometieron a irradiación con luz ultravioleta emanada de una lámpara de 20W (vatios) durante cuatro minutos y 30 segundos y en ausencia de luz natural. Las cajas con el esperma se localizaron a una distancia de 10 cm de la lámpara. Teniendo en cuenta que este tipo de radiación penetra débilmente en los núcleos celulares el esperma se distribuyó en capas delgadas (3mm), agitando constantemente para máxima eficiencia.

Fecundación.

Las ovas obtenidas se colocaron en diferentes recipientes plásticos según los tratamientos experimentales y se mezclaron homogéneamente con el esperma irradiado según diseño experimental por espacio de dos minutos con una pluma de ave, luego se retiraron los residuos espermáticos con ayuda de un tamiz (colador) y suficiente agua.

Choque Térmico.

Con el propósito de inducir la retención del segundo cuerpo polar, los huevos (oocitos) fueron sometidos a choque térmico en baño de agua, calentada y estabilizada previamente a temperatura de 25, 27, 29 y 31 °C por periodos de 15 minutos para el ensayo 1. En el ensayo 2, se utilizó temperatura de 27 °C de forma constante en los tratamientos de 2 a 5, con tiempo de exposición de 5, 10, 15 y 20 minutos de acuerdo al tratamiento asignado.

Incubación.

Una vez terminado el choque térmico, las ovas se colocaron en incubadoras tipo horizontal, de tal forma que cada incubadora contenía dos réplicas de diferentes tratamientos distribuidos en forma aleatoria.

El período de incubación, se estimó en grados.día^{-1} , de acuerdo a la temperatura promedio durante el bioensayo. Al momento de la visualización macroscópica del embrión se lavan los bastidores para eliminar el sedimento adherido a ellos y periódicamente se extrajeron los huevos muertos los cuales se distinguen por su coloración blanquecina; se realizó así control diario de los huevos muertos mediante una bomba para evitar el ataque de hongos (*Saprolegnia*) y contaminación de los huevos sanos; además se realizaron como medidas profilácticas desinfecciones cada tres días con una solución de Iodo al 2% durante un minuto.

Alevinaje.

Las poslarvas se trasladaron a los canales de alevinaje, una vez los peces aceptaron el alimento artificial, suministrando este alimento cuatro veces al día; además se efectuaron labores de limpieza, desinfección y extracción de animales muertos (formolizados al 10%).

El alevinaje de los ejemplares en los diferentes tratamientos se realizó hasta que las truchas alcanzaron talla promedio entre cincuenta y sesenta milímetros. La citada talla permite realizar con seguridad la disección de los ejemplares con el fin de diferenciar el sexo según la técnica descrita por Guerrero y Shelton (1979)⁽¹¹⁾.

Material Biológico.

Se evaluaron, en los ensayos 1 y 2 respectivamente 12500 y 10000 ovas de *Oncorhynchus mykiss*, obtenidas de ejemplares nativos seleccionados del Centro Ambiental y Piscícola "Guairapungo", los cuales se fecundaron con esperma previamente irradiado según tratamientos con luz ultravioleta (UV), durante 270 segundos.

Diseño Experimental.

Se utilizó un diseño irrestrictamente al azar (DIA) conformado por cinco tratamientos, cada uno con cinco (5) y cuatro (4) réplicas (respectivamente Ensayos 1 y 2). Tablas 1 y 2

Tabla 1.. Condiciones experimentales de los diferentes tratamientos para la inducción de Ginogénesis en el Ensayo 1.

Tratamientos	Radiación UV	Choque Térmico	
	Tiempo (Segundos)	Temperatura (°C)	Tiempo (Minutos)
T1	--	--	--
T2	270	25	15
T3	270	27	15
T4	270	29	15
T5	270	31	15

Tabla 2.. Condiciones experimentales de los diferentes tratamientos para la inducción de Ginogénesis en el Ensayo 2.

Tratamientos	Radiación UV	Choque Térmico	
	Tiempo (Segundos)	Temperatura (°C)	Tiempo (Minutos)
T1	--	--	--
T2	270	27	5
T3	270	27	10
T4	270	27	15
T5	270	27	20

Fuente esta investigación

VARIABLES EVALUADAS

Proporción de Sexos. Se determinó las frecuencias por sexos para hembras (H) y machos (M) por tratamiento.

Sobrevivencia. El porcentaje de sobrevivencia, se calculó aplicando la siguiente fórmula:

$$S\% = \left[\frac{Nf}{Ni} \right] * 100$$

Dónde: S% = Mortalidad, Ni: número inicial de animales y Nf: número final de animales

Análisis Estadístico. Los datos fueron analizados mediante estadística descriptiva, análisis de varianza y pruebas de regresión y correlaciones, utilizando el programa Estadístico IBM SPSS Statistical 19. En aquellas variables que cumplieron los supuestos estadísticos, se aplicó análisis de varianza para determinar diferencias significativas entre los tratamientos; en los casos con diferencias, se realizó la prueba de comparación múltiple de Tukey para establecer el tratamiento con mejor media.

Resultados.

Ensayo 1. Proporción de Sexos.

Es importante aclarar que el T5 (31°C) se excluyó de este análisis estadístico debido a que las ovas presentes en este tratamiento no resistieron la intensidad del choque térmico, y únicamente alcanzaron las etapas de incubación y reabsorción.

Evaluando los tratamientos en términos de porcentaje de hembras obtenidas mediante ginogénesis se revela que el mejor tratamiento fue el T3 (27°C), el cual reportó una población de 95,4% de hembras, seguido por el T4 (29°C) con 93,55% y T2 (25°C) con 91,2%; el testigo reportó un porcentaje de hembras de 52%. Tabla 3.

Tabla 3. Porcentaje de hembras y machos de trucha arcoiris (*O. mykiss*) obtenidas mediante ginogénesis en la Estación piscícola de Guairapungo.

Tratamiento	Hembras (%)	Machos (%)
T1 (Testigo)	52,00	48,0
T2 (25°C)	91,20	7,8
T3 (27°C)	95,40	3,8
T4 (29°C)	93,55	4,4

El análisis de varianza presentó diferencias estadísticas altamente significativas, señalando que al menos uno de los tratamientos produjo resultado promedio diferente de los demás.

La prueba de contrastes ortogonales determinó que al comparar el T1 (testigo) con relación al T2 (25°C), T3 (27°C) y T4 (29°C) registró diferencias estadísticas altamente significativas ($P = 0,01$), por consiguiente los tratamientos T2, T3, T4 superan en media al tratamiento testigo en 41, 383% en cuanto al porcentaje de hembras.

Por otra parte, la comparación entre T2 (25°C) respecto a T3 (27°C) y T4 (29°C) resultó estadísticamente significativa a nivel del 5% de probabilidad ; es decir, el porcentaje de hembras obtenidas aplicando choque térmico de 27°C y 29°C supera en media en 3,27% con relación al porcentaje de hembras del tratamiento T2. Sin embargo, al comparar el T3 (27°C) con el T4 (29°C) no se observaron diferencias estadísticas significativas, pero en los resultados biológicos se observó que el T3 supera al T4 en 1,85% de hembras.

Los anteriores resultados coinciden con lo reportado por Salinas (1991)⁽⁸⁾ quien obtuvo un porcentaje de hembras de 94,3% aplicando radiación ultravioleta durante cuatro minutos 30 segundos y un choque de 27°C de 15 minutos de duración, aplicado 25 minutos después de la fertilización.

Chourrout (1986)⁽⁵⁾ demostró que una descarga de calor puede ser relativamente ineficiente en la supresión de la mitosis debido a un tiempo de aplicación inapropiado. Esto podría explicar, porque el T2 y el T4 (25 y 29°C, respectivamente) presentan un menor promedio que el T3 como lo demuestra el presente estudio, de tal manera que la proporción de hembras se incrementó a medida que aumentó la temperatura del choque hasta alcanzar los 27°C. Pero al continuar el ascenso de la temperatura, el porcentaje de hembras tiende a disminuir siempre y cuando se mantenga constante el tiempo de

aplicación (15 minutos). Sin embargo, los resultados pueden variar si disminuye el tiempo de exposición de las ovas al choque térmico como lo demuestra Chourrout y Quillet (1982)⁽⁹⁾. Los citados autores obtuvieron alta proporción de triploides y ginogenéticos diploides en un intervalo de tiempo de 0 a 30 minutos y los mejores resultados se reportaron a 26°C por 20 minutos y a 29°C por un período de 10 minutos; Diter, et al (1993)⁽¹³⁾ reportó que la mejor producción de ginogenéticos se obtuvo a partir de descargas de intensidad media de 30°C durante nueve minutos, 31°C por cinco minutos y 32°C durante cuatro minutos.

Al analizar el número de hembras reportadas por el T1, se puede deducir que los ejemplares obtenidos de huevos fecundados con esperma no irradiado y sin intervención del choque térmico presentaron una distribución normal de sexos 1:1, lo cual coincide con lo expresado por López (1980)⁽¹⁵⁾ y Narváez y Tovar (1991)⁽²⁾ con respecto a la distribución de sexos en tilápia aurea y trucha arcoiris respectivamente.

La aparición de machos y ejemplares atípicos en los lotes que fueron sometidos a radiación UV puede explicarse de acuerdo con CAICYT (1987)⁽¹⁶⁾ y Salinas (1991)⁽⁸⁾, a la insuficiente destrucción del material genético del esperma debido a que el semen no se colocó en las cajas de petri en capas lo suficientemente finas como para asegurar la penetración completa de los rayos UV, generando espermatozoides intactos o fragmentos supernumerarios de cromosomas masculinos.

Ensayo 2. Proporción de Sexos.

Se determinó las frecuencias por sexos, hembras (H) y machos (M) de ejemplares de *O. mykiss*.

Los ejemplares que entraron al procedimiento de sexaje, correspondieron al 15% de la sobrevivencia de la etapa de poslarvas (colisión del saco vitelino), periodo en el cual terminó la evaluación de la presente investigación.

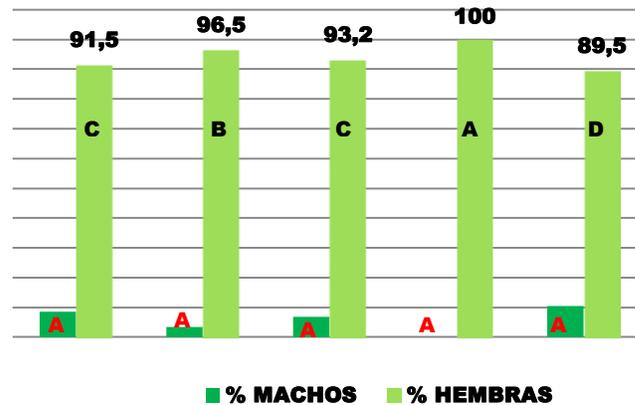
La evaluación comprometió el análisis de las dos gónadas de cada individuo, así en general para cada tratamiento se observaron 258, 172, 146, 278 y 114 glándulas de acuerdo a T1, T2, T3, T4 y T5 respectivamente.

A partir del análisis microscópico de las gónadas se estableció el genotipo de los ejemplares de acuerdo a los tratamientos; según el análisis de correlación en T1; por cada ejemplar macho existe 10,72 hembras (11M:118H); en T2, por cada ejemplar macho existe 27,7 hembras; en el T3, esta correlación se definió por cada ejemplar macho existe 14,8 hembras; el tratamiento 4 registro el 100% (0M:1H) de sus ejemplares con genotipo femenino; esta correlación en T5 se estimó como un macho por cada 8,5 hembras de la muestra (1:8,5).

El análisis de correlación y porcentaje de correlación de sexos para la especie *O. mykiss* de acuerdo a la presente investigación excluyendo el T4 (100% hembras) denota que este indicador es más alto en el tratamiento 2, índice de correlación 27,7 y porcentaje de correlación 2670% y menor en T5, respectivamente 8,5 y 750%.

El análisis porcentual de las muestras que definieron el genotipo de los ejemplares, demostraron que respectivamente de mayor a menor los individuos ginogenéticos para la especie de acuerdo al diseño experimental planteado fue: T4, 100% Hembras (H); T2, 96,5% H; T3, 93,2% H; T1, 91,5% H y T5, 89,5% H; señalando diferencias significativas entre los tratamientos. Figura 1.

Figura 1. Porcentaje de poslarvas Ginogenéticas por tratamiento.



Chourrout y Quillet (1982)⁽⁹⁾, encontraron altos porcentajes de individuos ginogenéticos diploides y triploides por periodos de 20 minutos a 26°C y 10 minutos a temperatura de 29°C.

Thorgaard (1986)⁽⁶⁾, señala que la ginogénesis se aplicó inicialmente como método para el control del sexo y posteriormente se ha adoptado para el desarrollo de líneas genéticas de peces..

Según Salinas (1991)⁽⁸⁾, en su aplicación de técnicas de ginogénesis en trucha arcoíris, encontró 94,3% hembras a choque térmico de 27°C por 15 minutos, previamente los gametos masculinos fueron irradiados en UV durante 4,5 minutos. Esta cifra se encuentra 6,04 puntos porcentuales por debajo del presente bioensayo de Ginogénesis.

Diteret *al* en 1993⁽¹³⁾, definió mayores proporciones de ginogenéticos en incubación (choque térmico) por espacio de 9 minutos a 30°C y 4 minutos a temperatura de 32°C.

La reversión sexual de ejemplares de trucha arcoíris mediante la inclusión hormonal de 17B estradiol, según Narváez, W y Tovar, J (1991)⁽²⁾, encontraron en promedio tasas de inducción a hembras del orden de 79,16% y 100% hembras alimentando alevinos con 80 mg.kg⁻¹ de 17B estradiol por ingestión, mientras que en el presente bioensayo la cifra de obtención de hembras está en 94,14%; esta distancia porcentual se estimó en 18,92%. Los tratamientos testigos (condición natural de fertilización-fecundación) comparando estas dos investigaciones presentaron porcentajes de reversión igual a 45,56% y 91,5% respectivamente.

El porcentaje de hembras en condiciones naturales del Centro Ambiental Piscícola Guairapungo desde el año 1997 a 2012 se ha incrementado, pasando cronológicamente de 52% a 91,5% debido quizá a un proceso eficiente y eficaz de selección del plantel de

reproductores de caracteres genotípicos y fenotípicos notables y cronológicamente jóvenes.

Ensayo 1. Sobrevivencia.

La evaluación de los tratamientos, determinó que el T5 no resistió el choque térmico y presentó mortalidad del 100% de los peces. Por el contrario los tratamientos que resistieron el choque térmico reportaron una mortalidad al finalizar el ensayo de 74,41% para T4, 62,29% para T2 y 58,58% para el T3 ; mientras que el testigo reportó una mortalidad de 56,94%.

Tabla 4. Mortalidad en trucha arcoiris (*O. mykiss*) durante las fases de incubación, reabsorción y alevinaje obtenida mediante ginogenésis en la Estación piscícola de Guairapungo.

Tratamiento	T1 Testigo	T2 25°C	T3 27°C	T4 29°C	T5 31°C
Huevos al inicio del ensayo	2585	2684	2738	2634	2586
Incubación	687	920	843	1422	2367
Reabsorción	110	111	106	146	219
Alevinaje	675	641	655	392	---
TOTAL	1472	1672	1604	1960	2586
%	56,94	62,29	58,58	74,41	100

Los resultados obtenidos en el presente estudio están de acuerdo con Purdom (1969)⁽⁷⁾, Chourrout y Quillet (1982)⁽⁹⁾ quienes demostraron que animales ginogenéticos como androgenéticos presentan una supervivencia inferior a los individuos normales; esto explica porque la mejor proporción de vivos resultantes se encontró en el tratamiento testigo con respecto a los animales que recibieron radiación y choque térmico.

La mortalidad para la fase de incubación fue evaluada por medio de la prueba de Brand Snedecor, mediante la cual se observó que existen diferencias estadísticas altamente significativas ($P = 0,01$) entre los tratamientos.

Para determinar el mejor tratamiento, desde el punto de vista de supervivencia se efectuó una comparación con cada uno de ellos y se obtuvo con un 99% de confianza que la mejor proporción de animales vivos fue obtenida por el tratamiento testigo (0,7342), seguido por el T3 (0,6921), T2 (0,6572), T4 (0,4601) y T5 (0,0846).

Durante la fase de incubación se observó mayor impacto de la temperatura en la supervivencia, confirmando lo observado por Chourrout (1986)⁽⁵⁾, quien demostró que el choque térmico logra la diploidización de aproximadamente el 75% de los embriones tratados. Los ejemplares restantes, son individuos de características haploides los cuales son abortados durante la primera fase de desarrollo.

La prueba de Brand Snedecor, demostró que en la fase de reabsorción, se presentaron diferencias estadísticas altamente significativas, o sea que con 99% de confianza se

puede afirmar que los animales vivos siguen siendo afectados por el choque térmico, teniendo en cuenta que son anatómica y fisiológicamente más débiles.

Al comparar los tratamientos, se determinó que los tratamientos T1, T2 y T3 no reportaron diferencias estadísticas ente sí, es decir, la mortalidad señalada en los tratamientos T2 (25°C) y T3 (27°C) no se debía probablemente al efecto causado por el choque térmico sino a efectos medioambientales y de manejo. Por el contrario, el tratamiento T4 presentó diferencias estadísticas altamente significativas con relación al T1, T2, T3 mientras que el T5 (31°C) tuvo una mortalidad del 100% en esta fase.

La proporción de animales vivos durante la fase de reabsorción, disminuyó en aquellos tratamientos donde la temperatura del choque térmico fue más alta, coincidiendo con López y Toro (1990)⁽¹⁰⁾ y Pérez y Beaumont (1990)⁽¹⁾, quienes comprobaron que el porcentaje de supervivencia de triploides de trucha arcoiris para varios niveles de choque térmico, descendía a medida que se incrementaba la temperatura del choque.

La prueba de Brand Snedecor para la proporción de peces vivos durante el alevinaje demostró que no existen diferencias estadísticas significativas entre tratamientos, lo que indica que la mortalidad presente en esta fase, se debió probablemente a factores no controlables y de manejo.

En el caso del tratamiento T4, la mortalidad disminuyó considerablemente hasta tal punto de no presentar diferencias estadísticas con los demás tratamientos. Lo anterior se explica por la alta mortalidad en el T4 establecida durante las fases de incubación y reabsorción, que permitió una menor siembra en el alevinaje y por ende menor impacto negativo generado por la competencia de alimento y espacio ocasionando mejores condiciones ambientales con respecto a los demás tratamientos.

Ensayo 2. Sobrevivencia.

La sobrevivencia se estimó para cada una de las fases del desarrollo de la especie durante el periodo de estudio.

El porcentaje acumulado de sobrevivencia mayor fue en el tratamiento 4, el cual arranco su desarrollo embriogénico con la totalidad de la población sembrada y se mantuvo así en todas las fases. La menor proporción de organismos vivos se registró en T5 con 19,1%. Tabla 5.

Tabla 5. Sobrevivencia durante las fases de desarrollo de la especie.

Tratamiento	Fecundación	Embriogénesis	Alevinaje - %
T1	1948	1380	862 - 43,10%
T2	1881	1253	573 - 28,65%
T3	2000	1327	485 - 24,25%
T4	2000	1705	925 - 46,25%
T5	1953	1580	382 - 19,10%

La sobrevivencia en la población de estudio en los periodos caracterizados, fue mayor en la fase de fecundación y embriogénesis; en orden decreciente los animales vivos en incubación fueron 1705 ejemplares (T4), 1580 ejemplares (T5), 1380 ejemplares (T1), 1327 ejemplares (T3) y 1253 ejemplares en el tratamiento 2.

La distancia porcentual de sobrevivencia entre los tratamientos con mayor y menor indicador se estimó en 142,14% evaluando T4 y T5.

Los anteriores resultados del bioensayo de ginogénesis están acordes a los registros promedio históricos de la Estación Piscícola Guairapungo adscrita a La Corporación Autónoma Regional de Nariño – CORPONARIÑO, 2011⁽¹⁴⁾.

Éstos márgenes de sobrevivencia-mortalidad se han mantenido para la especie a razón de su alta sensibilidad a los cambios ambientales del ecosistema en esta región del país y no aparentemente al proceso de ginogénesis con individuos provenientes de embriones haploides no viables, que han alcanzado esta fase, Chourrout(1986)⁽⁵⁾.

Según el Análisis de Varianza, existen diferencias significativas entre los diferentes tiempos de choque térmico de embriones en la producción monosexo de trucha arcoíris; en consecuencia se rechaza la H_0 y se concluye que al menos un promedio es diferente. Tabla 6.

Tabla 6. Análisis de Varianza Monofactorial en Ginogénesis.

GENERO	Suma de cuadrados	GI	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	2172,173	8	271,522	134,649	0,000
Intra-grupos	106,875	53	2,017		
Total	2279,048	61			

Según la Prueba de Comparaciones Múltiples de Tukey, los diferentes tiempos de choque térmico al cual fueron sometidos los embriones de *O.mykiss* difieren significativamente en la proporción de hembras para cada uno de los tratamientos. Existen diferencias entre los ejemplares hembra del T4 y los demás tratamientos; no existe diferencia significativa entre las hembras de los tratamientos T2 y T3, así como en T3 y T5. Entre los machos identificados en las muestras, no existen diferencias significativas en los tratamientos.

Conclusiones

El protocolo de ginogénesis aplicado en los dos ensayos realizados demostró diferencias en la proporción de hembras obtenidas.

El factor determinante para la obtención de hembras en la técnica ginogenética es la radiación ultravioleta y la función principal del choque térmico es la diploidización,

El mejor tratamiento con relación a la producción de hembras ginogenéticas, variando la temperatura de choque térmico fue el T3 (27°C) con 95,4%, seguido por el T4 (29°C) 93,55%, T2 ((25°C) con 91,2% y finalmente el testigo con 52%.

Los tratamientos que presentaron mejor supervivencia en el ensayo 1, fueron el testigo con 43,05%, T3 41,41%, T2 37,7% y T4 con 25,52%.

La correlación de los parámetros porcentaje de hembras y supervivencia, determinaron que el mejor tratamiento fue el choque térmico de embriones a 27°C durante 15 minutos; explicado en términos de alta retención de corpúsculos polares durante el proceso meiótico y menor número de individuos haploides en el momento de la eclosión, los cuales son incapaces de sufrir embriogénesis.

Recomendaciones

Aplicar el protocolo de ginogénesis de 27° C de exposición a choque térmico por un término de 15 minutos en *O. mykiss* en condiciones de cautiverio.

Difundir la técnica ginogenética entre los productores de trucha del país por ser amigable con el medio ambiente e inocua para el consumidor final.

Bibliografía

- ¹⁶COMISION ASESORA DE INVESTIGACION CIENTIFICA Y TECNICA (CAICYT). Reproducción en acuicultura. Madrid (España), L. Espinosa de los Monteros y U. Labarta, 1987. pp 1 - 102.
- ⁴CHAPARRO, M. Reproducción artificial y manipulación genética en peces. Barranquilla (Colombia), Mejoras, 1994. 208 p.
- ⁹CHOURROUT, D y QUILLET, E. Induced gynogenesis in the rainbow trout: sex and survival of progenies production of all - triploid populations. Theor. Appl. Genet. 63: pp 201 - 205, 1982.
- ⁵CHOURROUT, D. Genetic manipulations in fish: Review of methods. Francia, EIFAC/FAO. Symposium Bordeaux 27 - 30 may, 1986.
- ¹⁴CORPONARIÑO. Informe de producción, Centro Ambiental y Piscícola Guairapungo. 2011.
- ¹³DITER, A., *et al.* Supression of first egg mitosis induced by heat shock in the rainbow trout. Journal of fish biology 42: pp 777 - 786. 1993.
- ¹¹ GUERRERO, R y SHELTON, N. An Aceto - carmine squash method for sexing juvenile fishes. The progressive fish - culturist: 1979. p. 56.
- ³LAGLER, et al. Ictiología. México, AGT editores, 1984. 410 p.
- ¹⁵LOPEZ, J. Comparative efficacy of two androgens and two estrogens in functional sex reversal of *Tilapia aurea*, Auburn University, Auburn, Alabama, 1980. 37 p.
- ¹⁰ LOPEZ, C y TORO, M. Mejora genética de peces y moluscos. Madrid (España), Mundi - prensa. 1990. pp. 85 - 100.
- ² NARVAEZ, W y TOVAR, J. Eficacia del 17 Beta estradiol en la reversión sexual de alevinos de trucha arcoiris (*Salmo gairdneri*) a diferentes dosis de aplicación. Tesis. Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Pecuarias, Programa de Zootecnia, San Juan de Pasto, 1991. 60 p.

- ¹² PORTILLO, N y RAMOS A. Efecto de la temperatura en el porcentaje de hembras de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) obtenidas mediante Ginogénesis. 1997.
- ¹ PEREZ, J y BEAUMONT, A. Mejoramiento genético en acuicultura. Boletín. Red Acuicultura 4 (2): 3 - 12. 1990.
- ⁷ PURDOM, C.E. Radiation-induced gynogenesis and androgenesis in fish. Heredity. 24: 431 - 444. 1969.
- ⁸ SALINAS, J. Aplicación y optimización de técnicas de ginogénesis en trucha arcoíris. Tesis de Zootecnia, Bogotá, Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Zootecnia, 1991. 67 p.
- ⁶ THORGAARD, G. H. Poliploidy manipulation and performance. Aquaculture. 54: 57 - 64. 1986.