

CRIOCONSERVACIÓN DE SEMEN DE YAMÚ (*Brycon siebenthalae*): CALIDAD SEMINAL; DOSIS INSEMINANTE Y SISTEMAS DE EMPAQUE

Pablo Emilio Cruz-Casallas¹; Yohana María Velasco Santamaría²

Instituto de Acuicultura de la Universidad de los Llanos. Villavicencio, Meta - Colombia.

pecruz@telecom.com.co

RESUMEN

EXPERIMENTO I. Relación entre espermatozoides y concentración espermática y variación de la calidad seminal durante la estación reproductiva del yamú (*B. siebenthalae*). Setenta y cinco (75) machos adultos de yamú (*B. siebenthalae*) fueron inducidos hormonalmente para determinar la calidad seminal y la relación entre el espermatozoides (SPCTO) y la densidad espermática (DE), así como la variación estacional de estas características durante las épocas reproductivas de 2003 y 2004. El proceso de centrifugación para la determinación del SPCTO fue estandarizado en 14000 G durante 5 min. La densidad espermática fue evaluada mediante hemocitómetro utilizando una dilución 1:1200 con solución salina fisiológica. La relación entre SPCTO y DE fue positiva y altamente significativa ($n=75$; $p<0.0001$; $r^2 = 0.79$). Únicamente durante el inicio de la estación reproductiva (Febrero) la concentración espermática fue inferior ($p<0.05$) que en todos los demás meses evaluados.

EXPERIMENTO II. Determinación de la dosis inseminante con semen fresco y criopreservado. Para determinar el número mínimo de espermatozoides (sptz) móviles necesarios para fertilizar una cantidad conocida de oocitos, fueron evaluadas diferentes proporciones de sptz/oocito, utilizando semen fresco y semen criopreservado. Reproductores de yamú (*B. siebenthalae*) en estado de madurez sexual fueron tratados con extracto de hipófisis de carpa (EHC - 5,5 y 4,0 mg.kg⁻¹ de peso corporal para hembras y machos, respectivamente) para inducir la ovulación y espermiación. Se evaluaron con semen fresco seis proporciones de sptz/oocito: 0/1, 50/1, 1.000/1, 10.000/1, 50.000/1 y 100.000/1 ($n = 6$) y con semen criopreservado ocho, así: 1.500/1, 3.000/1, 7.500/1, 15.000/1, 30.000/1, 60.000/1, 75.000/1 y 150.000/1 ($n = 5$). La concentración espermática fue determinada mediante cámara de Neubauer y el número de oocitos contando la cantidad presente en un gramo. Cada prueba consistió en seminar 2 g de oocitos (ca. 2800) con un volumen de 160 o 500 μ L de semen fresco o descongelado, respectivamente. La fertilidad se evaluó 6 horas postseminación. En las proporciones con semen fresco de 0/1, 50/1, 1.000/1 y 10.000/1 la fertilidad aumentó ($p<0,05$) gradualmente desde 0 % hasta 65% (0 %, 16%, 34% y 65%, respectivamente), a partir de la cual se mantuvo estable y sin mostrar diferencias significativas (10.000/1: 65%; 50.000/1: 73% y para 100.000/1: 70%) ($p>0.05$). Por su parte, en las proporciones de semen descongelado 1.500/1, 3.000/1, 7.500/1, 15.000/1 y 30.000/1 la fertilidad aumentó ($p>0,05$) progresivamente: 18%, 22%, 25%, 28%, 33%; igualmente, entre 60.000/1 (41%) y 150.000/1 (46%) no hubo diferencia ($p>0.05$). El mayor porcentaje de fertilidad

¹ MVZ, MSc, PhD - Instituto de Acuicultura de la Universidad de los Llanos - Villavicencio

² MV - - Instituto de Acuicultura de la Universidad de los Llanos - Villavicencio

(61%) fue observado con la proporción 75,000/1. En conclusión, proporciones de 50,000 spz/oocito con semen fresco y de 75,000 spz móviles/oocito con semen descongelado, son suficientes para realizar eficientemente seminación artificial en esta especie.

EXPERIMENTO III. Efecto del volumen de empaque y de la temperatura de descongelación sobre la calidad seminal. Para evaluar el efecto de la temperatura de descongelación sobre la calidad de semen de yamú (*B. siebenthalae*) crioconservado en macropajillas, reproductores en estado de madurez sexual fueron tratados hormonalmente (5.75 mg y 4.0 mg.kg⁻¹ de peso corporal de Extracto de Hipófisis de Carpa - EHC, hembras y machos, respectivamente) para inducir la ovulación y espermiación. La calidad del semen fue evaluada a través de la movilidad y fertilidad 15 a 30 d después de su congelación. Como diluyente fue utilizada una solución de glucosa (5.5% p:v) - yema de huevo (12% v:v) y DMSO (10% v:v) como crioprotector. La concentración espermática fue determinada en cámara de Neubauer y la movilidad después de la activación con bicarbonato de sodio (NaHCO₃) al 1%. Se evaluaron tres volúmenes de empaque: 1.8, 2.5 y 4.0 mL (n=6 a 8). Para evaluar la fertilidad (6 h postseminación) 2 g de oocitos (ca. 2800) fueron seminados empleando 0.5 mL de semen descongelado (ca. 150,000 spz por oocito). La temperatura de descongelación de 35° C mostró mejores porcentajes de fertilidad (p<0.05) cuando comparados con 80° C. Finalmente, el tiempo de activación disminuyó significativamente en las pajillas de menor volumen (p<0.05).

EXPERIMENTO IV. Pruebas de fertilidad a escala comercial utilizando semen crioconservado en macropajillas de 4.0 mL. Con el fin de determinar la fertilidad de semen de yamú (*B. siebenthalae*) crioconservado en macropajillas fueron seminados oocitos en cuatro granjas productoras de alevinos del Departamento del Meta. Para este fin, reproductores en estado de madurez sexual fueron tratados con extracto de hipófisis de carpa - EHC - (5.5 mg y 4.0 mg.kg⁻¹ de peso corporal, para hembras y machos, respectivamente) para inducir la ovulación y espermiación. El semen fue diluido en una solución de glucosa (5.5% p:v) - yema de huevo (12% v:v) y DMSO (10% v:v) como crioprotector y posteriormente empacado en macropajillas de 4.0 mL. Cada prueba de fertilidad consistió en seminar 40 g de oocitos con aproximadamente 5.0 mL de semen (ca. 70,000 spz móviles/oocito) descongelado a 35° C. La fertilidad se evaluó 6 h postseminación. Los porcentajes de fertilidad con semen crioconservado fueron de 67 %, 75 %, 71 % y 51 %, para las granjas 1, 2, 3 y 4, respectivamente. Por el contrario oocitos fertilizados con semen fresco presentaron mayores (p<0.05) porcentajes de fertilidad (85 %, 86 % y 77 %) cuando comparados con los índices de fertilización con semen crioconservado. A pesar que los porcentajes de fertilidad observados con semen fresco fueron significativamente superiores a aquellos con semen crioconservado, las tasas de fertilidad con este último son consideradas aceptables a escala comercial.

Key words: Yamú, *Brycon siebenthalae*, calidad seminal, espermatoocrito, crioconservación de semen, macropajillas

Apoyo financiero: COLCIENCIAS, proyecto Código: 1122-09-12396; contrato: RC. No. 397 - 2002 Universidad de los Llanos – COLCIENCIAS.

INTRODUCCIÓN

El Yamú (*Brycon siebenthalae* - Eigenmann, 1912) es un pez de escama, nativo de los Llanos Orientales de Colombia, que por sus hábitos alimenticios omnívoros, rápido crecimiento, calidad y aceptación comercial de su carne, es una especie de excelentes condiciones para cultivo. Sin embargo, aún no ha sido posible su explotación comercial a gran escala, debido a la falta de conocimientos básicos de su biología reproductiva. Particularmente, no han sido realizados estudios concluyentes sobre la caracterización y crioconservación de los gametos de la especie y los resultados experimentales de crioconservación de semen en otras especies nativas sugieren que son necesarios trabajos adicionales que permitan aportar solución a los bajos índices de fertilidad obtenidos hasta ahora con semen crioconservado.

En todas las especies animales la evaluación de la calidad seminal es requisito para asegurar el éxito de la inseminación artificial y monitorear los procedimientos de manipulación del semen, tales como el almacenamiento en fresco y la crioconservación. Como en la mayoría de las especies, en los peces las variables más usadas para la evaluación de la calidad seminal son la movilidad y la concentración espermática (Billard *et al.*, 1995; Lahnsteiner y Patzner, 1998). La primera se evalúa por medio de microscopía directa de una gota de semen, previa activación con agua, mientras que la densidad espermática es determinada comúnmente mediante el empleo de una cámara contadora de partículas como la de Neubauer. Este proceso es laborioso y consume mucho tiempo, lo cual reduce su practicidad cuando el resultado de la concentración espermática de varios reproductores debe ser estimada en un corto periodo de tiempo (Rakitin *et al.*, 1999). Sin embargo, varios autores han reportado una relación positiva y estadísticamente significativa entre el espermatozoo y la concentración espermática para varias especies de peces (Piironen, 1985; Ciereszko y Dabrowski, 1993); pero, en el género *Brycon*, esta relación aún no ha sido establecida claramente.

Es ampliamente conocido que la tasa de fertilidad se correlaciona positivamente con el porcentaje de movilidad espermática del semen utilizado. Sin embargo, en algunos casos, semen que exhibe movilidad aceptable puede no ser fértil (Cognie *et al.*, 1989). Por lo tanto, la evaluación de la fertilidad constituye la prueba más confiable para determinar la calidad

seminal, siendo que actualmente es el procedimiento recomendado para evaluarla en la mayoría de los estudios sobre inseminación artificial y crioconservación espermática en peces (Babiak *et al.*, 1998; Tiersch *et al.*, 1998; Brown y Mims, 1999).

La práctica de la inseminación artificial en cualquier especie implica una mayor eficiencia en la utilización de los recursos disponibles, siendo la calidad y la cantidad de los gametos utilizados factores claves en este proceso. La fertilización artificial de oocitos de peces con cantidades conocidas de sptz ha sido objeto de varios estudios, orientados a optimizar los procesos comerciales de producción de alevinos y a estandarizar las pruebas de fertilidad a nivel experimental. Estos trabajos revelan que el número mínimo de sptz por oocito requerido varía dependiendo de la especie y de sus estrategias reproductivas (Suquet *et al.*, 1995). En yamú (*B. siebenthalae*), aunque se ha hecho alguna aproximación al conocimiento del número mínimo de sptz necesario para fertilizar eficientemente un volumen conocido de oocitos (Cruz-Casallas *et al.*, 2004), los resultados aún no pueden extrapolarse a escala comercial. En consecuencia, parte del propósito de este trabajo fue determinar el número mínimo de sptz necesario para fertilizar eficientemente una cantidad conocida de oocitos, ya sea utilizando semen fresco o semen crioconservado, para facilitar la preparación y crioconservación de dosis de semen ajustadas a los requerimientos de las granjas, permitiendo así un uso más eficiente de los recursos genéticos existentes.

La importancia de la conservación de sptz por largos periodos de tiempo con el propósito de conformar bancos genéticos es en la actualidad ampliamente reconocida (Cloud *et. al.*, 1990). Hasta hoy, los gametos de más de 85 especies de gametos de peces de agua dulce y de mar, particularmente de aquellas de interés comercial, han sido crioconservados con variados grados de éxito. La viabilidad reportada post-descongelación, inclusive para una misma especie, es muy variable. El procedimiento para la crioconservación de semen en peces incluye: dilución del semen en un diluyente apropiado, periodo de equilibrio, congelación del semen, almacenamiento en nitrógeno líquido y descongelación en soluciones apropiadas (Glogowski *et. al.*, 1999). Sin embargo, estos protocolos deben ser optimizados y adaptados para cada una de las especies tropicales.

La crioconservación de semen de peces en Colombia es un campo relativamente nuevo, en el cual todavía no se ha logrado muchos progresos prácticos y apenas unos pocos experimentos han sido realizados con limitado éxito (Neira *et al.*, 1992; Cruz-Casallas *et al.* 1999; Navarro - Poveda *et al.*, 2000). En consecuencia, hasta ahora ninguna de las granjas nacionales dedicadas a la producción comercial de alevinos emplea semen crioconservado en sus procesos de fertilización, recurriendo siempre a reproductores mantenidos en cautiverio o, en la mayoría de los casos, a ejemplares extraídos del ambiente.

El envase de semen en las tradicionales pajillas de 0.25 o 0.5 mL, ha sido utilizado con éxito para la crioconservación de semen de varias especies de peces y para fertilizar pequeñas cantidades de oocitos (Lahnsteiner *et al.*, 1997; Cabrita *et al.*, 2001; Cruz-Casallas *et al.*, 2004). Este método de envasado es apropiado para propósitos de laboratorio, tales como creación de bancos genéticos o para usos comerciales en aquellas especies en las cuales se requiere pequeñas cantidades de semen. Sin embargo, su aplicación a escala comercial demandaría un alto número de pajillas, debido a los grandes volúmenes de oocitos que es necesario fertilizar simultáneamente. En consecuencia, la crioconservación de esperma usando pajillas de 1.8, 2.5 o 4.0 mL podría reducir el tiempo requerido para empacar y descongelar el semen y facilitar su manejo durante el proceso de fertilización.

Durante los últimos años, la técnica de crioconservación de semen de peces ha sido estandarizada en algunas especies (Wheeler y Thorgaard, 1991; Lahnsteiner, 2000; Richardson *et al.*, 1999). Sin embargo, aún son muy pocos los reportes acerca de la eficiencia de la utilización de semen crioconservado a escala comercial (Wheeler y Thorgaard, 1991).

Los objetivos de estos trabajos fueron a) calcular la relación entre el espermatozoo y la densidad espermática y determinar la eventual variación de la calidad seminal durante la estación reproductiva de la especie; b) determinar el número mínimo de spermatozoides necesario para fertilizar eficientemente una cantidad conocida de oocitos, ya sea utilizando semen fresco o semen crioconservado; c) evaluar el efecto del volumen de empaque y de la temperatura de descongelación sobre la calidad del semen crioconservado de yamú (*B. siebenthalae*); y, d)

determinar la fertilidad de semen de yamú (*B. siebenthalae*) crioconservado en macropajillas de 4.0 mL en cuatro granjas productoras de alevinos del Departamento del Meta.

MATERIALES Y MÉTODOS

EXPERIMENTO I. Relación entre espermatozoides y concentración espermática y variación de la calidad seminal durante la estación reproductiva del yamú (*B. siebenthalae*).

Fueron utilizados 75 machos adultos de yamú (*B. siebenthalae*), criados y mantenidos en la estación piscícola del Instituto de Acuicultura de la Universidad de los Llanos, con peso corporal de $1.7 \pm 0,04$ kg. y longitud total de 49.4 ± 0.67 cm. La espermiación fue inducida con 4.0 mg.kg^{-1} de peso corporal de extracto de hipófisis de carpa (EHC) administrada en una única inyección IM y el semen extraído mediante masaje craneo - caudal del abdomen 18 a 20 h después de la inyección de la hormona y recolectado en tubos de ensayo aforados. Especial cuidado fue tomado para evitar contaminación del semen con agua, orina, bilis o materia fecal. Fueron estudiadas un total de 75 muestras, obtenidas de igual número de reproductores entre Febrero y Mayo de 2003 y 2004.

Para la determinación del espermatozoides la centrifugación se estandarizó en 14000 G de fuerza centrífuga (12000 r.p.m., Microcentrífuga EBBA 12, Alemania) durante 5 min. Para este propósito fueron utilizados tubos microcapilares de 75 mm de longitud y 1.1 mm de diámetro interno, los cuales se llenaron (*ca.* 90%) con semen y uno de los extremos sellado con plastilina e inmediatamente sometido a centrifugación como se describió anteriormente. Posteriormente se determinó la movilidad y el tiempo de activación, con ayuda de microscopio óptico y cronómetro.

La densidad espermática fue determinada dentro de las 24 h siguientes a la colección del semen por recuento en cámara de Neubauer, previa dilución del semen 1:1200, con solución salina fisiológica (0.9% NaCl). La cámara fue mantenida en atmósfera húmeda durante al menos 10 min antes del conteo de las células (40X). Para cada muestra, la evaluación fue realizada por duplicado y el promedio de las dos lecturas utilizado para los análisis

subsecuentes. Los datos fueron sometidos a análisis de regresión, utilizando el *software GraphPad* versión 2.01 (1996).

EXPERIMENTO II. Determinación de la dosis inseminante con semen fresco y crioconservado.

Fueron utilizados hembras y machos adultos de yamú (*B. siebenthalae*), criados y mantenidos en la estación piscícola del Instituto de Acuicultura de la Universidad de los Llanos (IALL - Unillanos), con peso corporal de 2.0 y 1.7 kg y longitud total de 52.0 y 49.4 cm, respectivamente. La maduración final ovárica y la ovulación fue inducida mediante la administración IM de 5.5 mg.kg⁻¹ de peso corporal de extracto de hipófisis de carpa (EHC) distribuida en dos aplicaciones con intervalos de 24 y 12 h y la espermiación con 4.0 mg.kg⁻¹ de EHC en una sola inyección.

La extracción de los oocitos fue realizada inmediatamente después de la ovulación mediante masaje cráneo-caudal del abdomen, 6 a 7 h después de la última inyección de hormona, mientras que el semen fue colectado 20 a 24 h después, empleando tubos de vidrio aforados, limpios y secos. La concentración espermática fue determinada mediante recuento en cámara de Neubauer y el número de oocitos por conteo directo de un gramo. Para determinar la proporción de sptz/oocito con semen crioconservado, semen fresco fue diluido (1:4) en una solución de glucosa (5.5 % p:v) - yema de huevo (12 % v:v) y dimetil sulfóxido (10 % v:v) como sustancia crioprotectora; posteriormente fue empacado en macropajillas de 4.0 mL, sometido a crioconservación y almacenado en nitrógeno líquido a -196° C.

El trabajo comprendió dos experimentos: en el primero se evaluaron 6 proporciones de sptz/oocito, utilizando semen fresco, así: 0/1, 50/1, 1,000/1, 10,000/1, 50,000/1 y 100,000/1 (n=6). Cada prueba consistió en seminar 2 g de oocitos (*ca.* 2800) fertilizados con 160 µL de semen fresco diluido con plasma seminal hasta obtener la proporción deseada. Para obtener el plasma seminal, las muestras fueron centrifugadas (14,000 G durante 10 min) y el volumen de la dosis inseminante fue ajustado adicionando plasma seminal libre de sptz. En el segundo experimento fueron evaluadas 8 proporciones de sptz/oocito empleando semen crioconservado, así: 1,500/1, 3,000/1, 7,500/1, 15,000/1, 30,000/1, 60,000/1, 75,000/1 y

150,000/1 (n=5). Igualmente, cada prueba consistió en seminar 2 g de oocitos fertilizados con 500 μ L de semen, descongelado a 35° C.

Los oocitos seminados se incubaron en recipientes plásticos de 1.5 L con flujo vertical. El porcentaje de fertilidad se evaluó 6 h postseminación para cada uno de los tratamientos. Los datos fueron sometidos a la prueba de Kruskal - Wallis.

EXPERIMENTO III. Efecto del volumen de empaque y de la temperatura de descongelación sobre la calidad seminal.

Fueron utilizados hembras y machos adultos de yamú (*B. siebenthalae*), criados y mantenidos en la Estación Piscícola del Instituto de Acuicultura (IALL) de la Universidad de los Llanos (UNILLANOS), con peso corporal de 2.3 ± 0.2 y 2.0 ± 0.1 kg y longitud total de 51.4 ± 1.7 y 49.5 ± 0.8 cm, respectivamente. La maduración final y la ovulación fueron inducidas mediante la administración IM de 5.75 mg.kg^{-1} de peso de extracto de hipófisis de carpa (EHC) distribuida en tres aplicaciones con intervalos de 24 y 12 h y la espermiación con 4.0 mg.kg^{-1} de EHC, administrada en una sola inyección. La extracción de los gametos fue realizada mediante masaje cráneo-caudal del abdomen, 6 a 7 h después de la última inyección. El semen fue recibido en tubos de vidrio aforados y los oocitos en recipientes plásticos. La concentración espermática fue determinada mediante recuento en cámara de Neubauer y el número de oocitos contando la cantidad presente en un gramo.

Semen apto para la congelación fue diluido (1:4) en una solución de 5.5% de glucosa, 12% de yema de huevo y 10% de dimetil sulfóxido (DMSO) y posteriormente empacado en pajillas de 0.5, 1.8, 2.5 o 4.0 mL. Una vez selladas, las pajillas fueron expuestas a vapores de nitrógeno líquido (NL) durante 30 min y finalmente sumergidas en NL a -196° C.

Para evaluar el efecto de la temperatura de descongelación sobre la movilidad y tiempo de activación espermática, 6 a 8 pajillas de cada volumen de empaque fueron sometidas a descongelación en baño María a 35 u 80° C durante un 60 o 20 seg, respectivamente. La movilidad fue inducida con NaHCO_3 al 1% y evaluada subjetivamente en porcentaje y el tiempo de activación registrado en segundos. Los datos de tiempo de activación fueron

analizados mediante análisis de varianza (ANOVA) y la movilidad con la prueba de Kruskall-Wallis.

Para evaluar el efecto de la temperatura de descongelación y del volumen de empaque sobre la fertilidad, 2 g de oocitos (ca. 2,800) fueron sembrados con 500 μL de semen descongelado (ca. 150,000 spz por oocito), activados con NaHCO_3 al 1% e incubados con flujo vertical en recipientes plásticos de 1.5 L. Como control se empleó la misma cantidad de oocitos sembrados con 160 μL de semen fresco (ca. 50,000 spz por oocito). El porcentaje de fertilidad se calculó 6 h postsembración y los datos fueron analizados mediante la prueba de Kruskall-Wallis.

EXPERIMENTO IV. Pruebas de fertilidad a escala comercial utilizando semen crioconservado en macropajillas de 4.0 mL.

Los experimentos se llevaron a cabo en cuatro granjas productoras de alevinos localizadas en el Departamento del Meta. Fueron utilizados hembras y machos adultos de yamú (*B. siebenthalae*), criados y mantenidos en cautiverio. La maduración final ovárica y la ovulación fue inducida mediante la administración IM de 5.5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de peso corporal de extracto de hipófisis de carpa (EHC) distribuida en dos aplicaciones con intervalos de 24 y 12 h y la espermiación con 4.0 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de EHC en una sola inyección.

Los oocitos fueron extraídos inmediatamente después de la ovulación mediante masaje cráneo-caudal del abdomen, 6 a 7 h después de la última inyección de hormona, mientras que el semen fue colectado 20 a 24 h después, empleando tubos de vidrio aforados, limpios y secos. La concentración espermática fue determinada mediante recuento en cámara de Neubauer y el número de oocitos por conteo directo de un gramo. Para realizar las pruebas de fertilidad con semen crioconservado, semen fresco fue diluido (1:4) en una solución de glucosa (5.5 % p:v) - yema de huevo (12 % v:v) y dimetil sulfóxido (10 % v:v) como sustancia crioprotectora; posteriormente empacado en macropajillas de 4.0 mL, sometido a crioconservación en vapores de nitrógeno líquido (NL) y luego almacenado en NL a -196°C durante un período que varió de 15 a 30 d.

El trabajo consistió en seminar 40 g de oocitos (*ca.* 1400 oocitos/g) con 5 mL de semen crioconservado a -196°C y descongelado a 35°C durante 1 min. Se empleó una proporción de *ca.* 70,000 sptz móviles/oocito. Como control, cantidades similares de oocitos fueron fertilizados con semen fresco ajustando el volumen de la dosis inseminante para obtener una proporción de 50,000 sptz móviles/oocito. En la granja 4 los ensayos fueron llevados a cabo durante el mes de Junio, fase final de la reproducción de la especie, razón por la cual no se trabajaron machos maduros en esta granja.

Los oocitos seminados fueron mantenidos en incubadoras con flujo vertical ascendente (Waynarovich o Nielsen) y el porcentaje de fertilidad evaluado 6 h postseminación.

RESULTADOS

EXPERIMENTO I. Relación entre espermatocono y concentración espermática y variación de la calidad seminal durante la estación reproductiva del yamú (*B. siebenthalae*).

La **Tabla 1** muestra las principales características seminales durante los años 2003 y 2004. Las variables tiempo de activación, concentración espermática y espermatocono fueron significativamente mayores durante el año 2003 cuando comparado con el año 2004 ($p < 0.05$).

Considerando las muestras evaluadas durante los dos años, la concentración espermática fluctuó entre 1.1×10^6 y 14.2×10^6 sptz/ μL y el espermatocono entre 1.9 y 22.4 %. La relación entre estas dos variables fue positiva y altamente significativa ($n=75$; $p < 0.0001$; $r^2 = 0.79$; ver **Figura 1**).

La **Figura 2** muestra los valores de espermatocono y concentración espermática durante cada uno de los meses de la estación reproductiva. Únicamente se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$), tanto en el espermatocono como en la concentración espermática, al comparar el mes de Febrero con los demás meses del año 2004. Sin embargo, tomados en conjunto los dos años, no se observaron diferencias significantes cuando se compararon los valores entre los meses de Marzo a Mayo. Adicionalmente, al realizar la comparación mensual entre los dos años, durante el mes de Abril de 2003 se observaron resultados significativamente superiores con respecto al mes de Abril de 2004 ($p < 0.05$).

Tabla 1. Características seminales de yamú (*B. siebenthalae*) durante la época reproductiva (Febrero - Mayo) de los años 2003 y 2004. Se presenta la media y el error estándar de la media.

VARIABLE	AÑOS				Consolidado	
	2003		2004		Media	SEM
	Media	SEM	Media	SEM		
Volumen (mL)	8.9	0.5	10.3	1.0	9.6	0.7
Movilidad (%)	90	0.0	85	1.2	88	0.5
Tiempo de activación (seg.)	41.4 *	1.1	35 *	0.7	38.2	0.9
Concentración sptz x 10 ⁶ .μL ⁻¹	13.6 *	0.6	11.1 *	0.8	12.6	0.5
Espermatocrito (%)	9.5 *	0.4	6.7 *	0.5	8.4	0.3

Medias diferentes estadísticamente ($p < 0.05$). SEM = Error estándar de la media

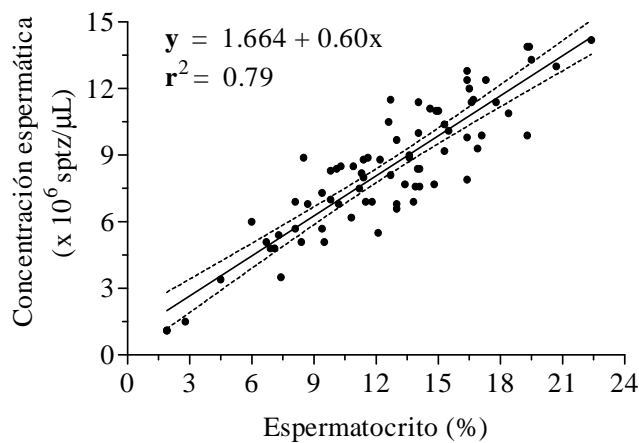


Figura 1. Relación entre espermatocrito (14000 G x 5 min) y densidad espermática determinada por recuento en cámara de Neubauer (dilución 1:1200; n=75; $p < 0.0001$; $r^2 = 0.79$).

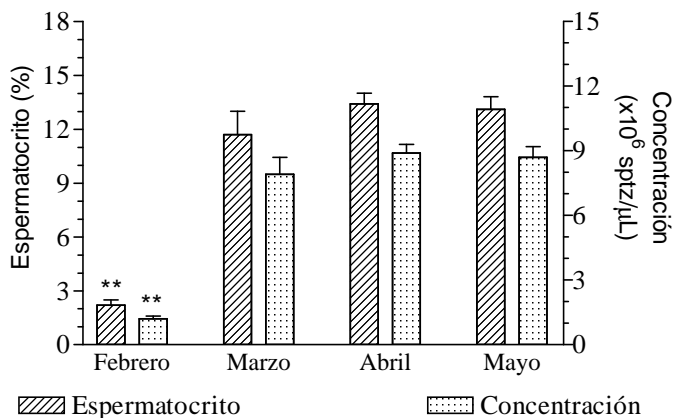


Figura 2. Variación mensual del espermatozocito y concentración espermática de reproductores de yamú (*B. siebenthalae*) durante la época reproductiva (Febrero - Mayo) de los años 2003 y 2004. Los machos fueron sometidos previamente a inducción hormonal ($4,0 \text{ mg.kg}^{-1}$ de EHC). Los valores corresponden a la media \pm error estándar de la media. Dentro de cada variable, barras con asteriscos difieren estadísticamente ($p < 0.05$).

EXPERIMENTO II. Determinación de la dosis inseminante con semen fresco y crioconservado.

Tanto con semen fresco como crioconservado, el porcentaje de fertilidad aumentó gradualmente a medida que aumentó el número de spz por oocito, hasta permanecer relativamente constante a partir de 10,000 y 75,000 spz por oocito, respectivamente. En las proporciones con semen fresco de 0/1, 50/1, 1,000/1 y 10,000/1 la fertilidad aumentó ($p < 0,05$) desde 0 % hasta 65% (0 % , 16%, 34% y 65%, respectivamente), a partir de la cual se mantuvo estable y sin mostrar diferencias significativas (10,000/1: 65%; 50,000/1: 73% y para 100,000/1: 70%, $p > 0.05$). Por su parte, con semen descongelado, con las proporciones 1,500/1, 3,000/1, 7,500/1, 15,000/1 y 30,000/1 la fertilidad aumentó progresivamente: 18%, 22%, 25%, 28% y 33% aunque sin presentar diferencias entre si ($p > 0,05$); igualmente, entre 60,000/1 (41%) y 150,000/1 (46%) no hubo diferencia ($p > 0.05$). El mayor porcentaje de fertilidad (61%) fue observado con la proporción de 75,000/1, sin presentar diferencias significativas cuando comparado con el control ($p > 0.05$).

La **Figura 3** ilustra los porcentajes de fertilidad con semen fresco, mientras que la **Figura 4** los porcentajes con semen criopreservado.

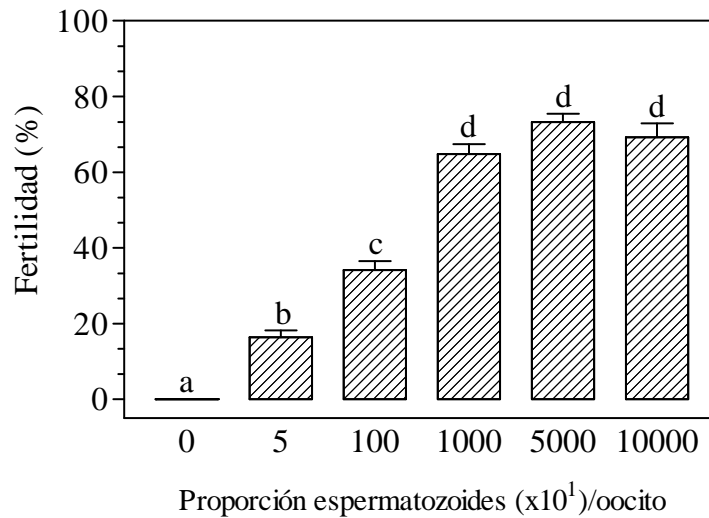


Figura 3. Porcentaje de fertilidad con semen fresco para las proporciones 0/1, 50/1, 1,000/1, 10,000/1 y 100,000/1 de spz/oocito. Los valores corresponden a la media \pm error estándar. Barras con letras no en común son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$).

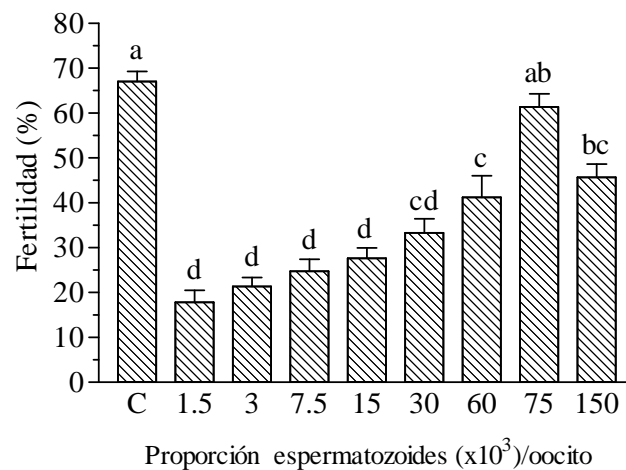


Figura 4. Porcentaje de fertilidad con semen descongelado para las proporciones 1,500/1, 3,000/1, 7,500/1, 15,000/1, 30,000/1, 60,000/1, 75,000/1 y 150,000/1 spz/oocito. Las barras representan la media \pm error estándar. C = Control (semen fresco: 50,000 spz/ oocito). Barras con letras comunes son iguales ($p > 0.05$).

EXPERIMENTO III. Efecto del volumen de empaque y de la temperatura de descongelación sobre la calidad seminal.

La **Tabla 2** presenta el porcentaje de movilidad espermática para cada volumen de empaque descongelado a 35 u 80° C. La temperatura no afectó la movilidad posdescongelación en ninguno de los volúmenes de empaque evaluados ($p>0.05$); sin embargo, pajillas de 1.8 mL descongeladas a 80° C mostraron mayores porcentajes de movilidad que pajillas de 2.5 o 4.0 mL descongeladas a 35° C, así como de pajillas de 2.5 mL descongeladas a 80° C. Por otra parte, el tiempo de activación no mostró diferencias significativas ($p>0.05$), siendo en promedio 46.9 ± 1.8 seg.

Los efectos del volumen de empaque y de la temperatura de descongelación sobre la fertilidad, son ilustrados en la **Figura 5**. Pajillas de 2.5 y 4.0 mL descongeladas a 35° C mostraron los mayores porcentajes de fertilidad (51 ± 4 y 56 ± 2 , respectivamente). En términos generales, altas temperaturas de descongelación (80° C) redujeron significativamente las tasas de fertilidad de los oocitos de yamú (*B. siebenthalae*) ($p<0.05$).

Tabla 2. Porcentaje de movilidad posdescongelación de semen de yamú (*B. siebenthalae*) crioconservado en pajillas de 1.8, 2.5 o 4.0 mL y descongelado a 35 u 80° C.

Temperatura de descongelación (°C)	Volumen de Empaque (mL)					
	1.8		2.5		4.0	
	Mediana	Media \pm SEM	Mediana	Media \pm SEM	Mediana	Media \pm SEM
35° C	30	34 ± 2 ^{ab}	25	26 ± 3 ^b	30	28 ± 3 ^b
80° C	40	39 ± 1 ^a	30	30 ± 3 ^b	30	30 ± 3 ^{ab}

^a Media con sobrescritos no comunes, son diferentes ($p<0.05$).

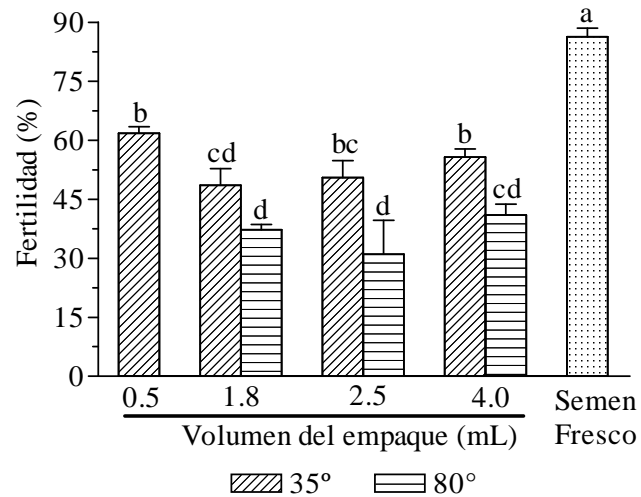


Figura 5. Efecto de la temperatura de descongelación sobre la fertilidad de semen de yamú (*B. siebenthalae*), criopreservado en pajillas de 0.5, 1.8, 2.5 o 4.0 mL. Los valores corresponden a la media \pm error estándar. Barras con letras no comunes son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$).

EXPERIMENTO IV. Pruebas de fertilidad a escala comercial utilizando semen criopreservado en macropajillas de 4.0 mL.

La **Figura 6** ilustra los porcentajes de fertilidad con semen fresco y criopreservado. Los oocitos seminados con semen criopreservado en macropajillas de 4.0 mL, presentaron porcentajes de fertilidad del 67 %, 75 %, 71 % y 51 %, para las granjas 1, 2, 3 y 4, respectivamente. Por el contrario, oocitos fertilizados con semen fresco presentaron mayores ($p < 0.05$) porcentajes de fertilidad (85 %, 86 % y 77 %) cuando comparados con los índices de fertilización con semen criopreservado.

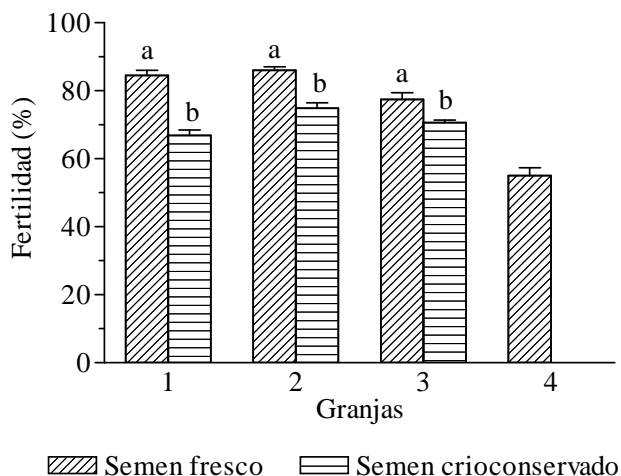


Figura 6. Porcentaje de fertilidad con semen fresco y criopreservado en macropajillas de 4.0 mL. Los valores corresponden a la media \pm error estándar. Barras dentro de la misma granja con letras no en común son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$).

DISCUSIÓN

La ecuación de regresión entre el espermatozoides y la densidad espermática obtenida en el presente trabajo, puede utilizarse como una alternativa para determinar la concentración espermática en yamú (*B. siebenthalae*), particularmente cuando deban procesarse un número grande de muestras. Aunque se ha reportado relación estadística entre estas dos características para otras especies ícticas (Bouck y Jacobson, 1976; Tvedt *et al.*, 2001, entre otros), trabajos realizados anteriormente por Cruz-Casallas (2002) en esta misma especie obtuvieron coeficientes de determinación inferiores ($r^2=0.30$).

Con base en los resultados anteriores, el espermatozoides constituye un procedimiento útil para determinar la concentración espermática en yamú (*B. siebenthalae*), sin que esta característica varíe significativamente durante el periodo de reproducción de la especie (Marzo-Mayo); sin embargo, es recomendable realizar un número mayor de observaciones durante los meses de Febrero y Junio, para considerar posibles variaciones durante el inicio y el final de la estación reproductiva de esta especie.

Los resultados indican que una proporción de 50,000 sptz móviles/oocito con semen fresco o de 75,000 sptz móviles/oocito con semen crioconservado, son suficientes para obtener máximos porcentajes de fertilidad en el proceso de seminación artificial en yamú (*B. siebenthalae*), sin que proporciones superiores afecten la fertilidad.

En el caso de semen fresco, esta proporción de sptz/oocito es superior a la reportada por Billard y Carpentier (1973) en trucha arco iris (*Onchorhynchus mykiss*), quienes determinaron una proporción óptima de 20,000 sptz/oocito; sin embargo, se aproxima bastante a la determinada para guppy (*Poecilia reticulata*) y catfish (*Ictalurus punctatus*) por Billard (1966), quienes reportaron una dosis inseminante óptima entre 50,000 y 100,000 y de 40,000 para guppy y catfish, respectivamente. Otras proporciones de sptz/oocito reportadas son considerablemente superiores a las halladas en el presente trabajo. Por ejemplo, para trucha arco iris (*Onchorhynchus mykiss*) y carpa (*Cyprinus carpio*), Billard (1975) reportó 300,000 sptz/oocito. Sin embargo, existen también reportes para otras especies de proporciones considerablemente bajas: 13,000 sptz/oocito para carpa y de 10,000 sptz/oocito tanto para esturión (Persov, 1953) como para Turbot (*Scophthalmus maximus*) (Suquet *et al.*, 1995).

El uso de pajillas de 0.5 mL en el proceso de crioconservación ha sido usado masivamente con fines experimentales; sin embargo, a nivel práctico, la seminación de oocitos con este volumen hace dispendioso el proceso de fertilización. Por tal razón, este trabajo muestra que la congelación de semen de yamú (*B. siebenthalae*) en pajillas de 2.5 y 4.0 mL y descongeladas a 35° C, es efectiva para el proceso de reproducción artificial de la especie, con resultados comparables a los obtenidos con las pajillas tradicionales de menor volumen (0.5 mL).

Finalmente, a pesar que los porcentajes de fertilidad observados con semen fresco fueron significativamente superiores a aquellos con semen crioconservado, las tasas de fertilidad con este último son consideradas aceptables a escala comercial.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Babiak, I.; Glogowski, J.; Kujawa, R.; Kuchrzyk, D.; Mamcarz, A. 1998. Cryopreservation of sperm from Asp *Aspius aspius*. *The Progressive Fish-Culturist* **60**: 146 – 8.
- Billard, R. 1966. Contribution à l'étude de la reproduction chez le poisson téléostéen *Lebistes reticulatus*, au moyen de l'insémination artificielle. Thèse 3ème cycle, Faculté des Sciences, Lyon, 83 p.p.
- Billard, R. 1975. L'insémination artificielle de la truite *Salmo gairdneri* Richardson. V. Effets de la dilution et définition du rapport optimum gametes/dilueur. *Bull. Fr. Piscicult* **257**: 121 -135.
- Billard, R.; Carpentier, H. 1973. Détermination du nombre optimum de spermatozoides nécessaires à la fécondation d'un ovule au cours de l'insémination artificielle de la truite. *Bull. Fr. Piscicult*. **251**: 73 - 76.
- Billard, R.; Cosson, J.; Crim, L. W.; Suquet, M. 1995. Sperm Physiology and Quality. pp 25 - 52 in N. R. Bromage & R. J. Roberts, editors. Broodstock management and eggs and larval quality. Blackwell Science, Cambridge, UK.
- Bouck, G. R.; Jacobson, J. 1976. Estimation of salmonid sperm concentration by microhematocrit technique. *Transactions of American Fisheries Society* **105**: 534-535.
- Brown, G. G.; Mims, S. D. 1999. Cryopreservation of Paddlefish *Polyodon spathula* Milt. *Journal of the World Aquaculture Society* **30**: 245 – 9.
- Cabrita, E.; Robles, V.; Alvarez, R.; Herráez, M. P. 2001. Cryopreservation of rainbow trout sperm in large volume straws: application to large scale fertilization. *Aquaculture* **201**: 301 - 304.
- Ciereszko, A.; Dabrowski, K. 1993. Estimation of sperm concentration of rainbow trout, whitefish and yellow perch using a spectrophotometric technique. *Aquaculture* **109**: 367 - 73.
- Cloud, J. G.; Miller, W. H.; Levanduski, M. J. 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**: 51 –53.
- Cognie, F.; Billard, R.; Chao, N. H. 1989. La cryopreservation de la laitance de la carpe *Cyprinus carpio*. *Journal of Applied Ichthyology* **5**: 569 - 92.
- Cruz-Casallas, P. E. 2002. Características Esperáticas y Crioconservación de Semen de yamú (*Brycon siebenthalae*): Situación Actual y Perspectivas. Memorias VIII Jornada de Acuicultura Universidad de los Llanos-IIOC-IALL-COLCIENCIAS-Universidad Nacional de Colombia. pp. 55
- Cruz-Casallas, P. E.; Pardo-Carrasco, S. C.; Arias-Castellanos, J. A.; Pardo-Mariño, J. E.; Lombo-Rodríguez, D. A. Fertilidad de semen de yamú *Brycon siebenthalae* criopreservado con DMSO y activado con bicarbonato de sodio. Page 36. In Cabrera T.,

- J. Daryl and M. Silva, editors. *Memorias II Congreso Latinoamericano de Acuicultura*. Sociedad Venezolana de Acuicultura, 1999.
- Cruz-Casallas, P. E.; Pardo-Carrasco, S. C.; Arias-Castellanos, J. A.; Lombo-Castellanos, P. E.; Lombo-Rodríguez, D. A.; Pardo-Mariño, J. E. 2004. Cryopreservation of Yamú *Brycon siebenthalae* Milt. *Journal of the World Aquaculture Society*, En prensa.
- Glogowski, J.; Ciereszko, A.; Dabrowski, K 1999. Cryopreservation of Muskellunge and Yellow Perch Semen. *North American Journal of Aquaculture* **61**: 258 – 262
- Lahnsteiner, F.; Patzner, R. A. Sperm motility of the marine teleosts *Boops boops*, *Diplodus sargus*, *Mullus barbatus* and *Trachurus mediterraneus*. *Journal of Fish Biology* **52**: 726 – 742, 1998.
- Lahnsteiner, F.; Weismann, T.; Patzner, R. A. 1997. Methanol as cryoprotectant and the suitability of 1.2 ml and 5.0 ml straws for criopreservation of semen from salmonid fishes. *Aquaculture Research* **28**: 471 - 479.
- Navarro - Poveda, O. J.; Lombo-Castellanos, P. E.; Cruz-Casallas, P. E.. 2000. Calidad y fertilidad de semen de cachama blanca, *Piaractus brachypomus* criopreservado con etilenglicol. Anais XI Simpósio Brasileiro de Aquicultura – SIMBRAQ, 2000.
- Neira, J.; Cruz-Casallas, P. E.; Jiménez, J.; Muñoz, D. 1992. Caracterización y Congelación de Semen de Cachama Blanca (*Piaractus brachypomun*). En: Programa Nacional de Ciencia y Tecnología del Mar - Investigación y Desarrollo Tecnológico en Acuicultura. p. 141-145.
- Persov. G. M. 1953. Determination of sperm as a method of management of fertilization of oviducts in sturgeon. *Dokl Akad Nauk SSSR*. **90(6)**:1183-5.
- Piironen, J. 1985. Variation of the properties of milt from the Finnish landlocked salmon (*Salmo salar* M Sebago Girard) during spawning season. *Aquaculture* **48**: 337 - 50.
- Rakitin, A., Ferguson, M. M.; Trippel, E. A. 1999. Spermatocrit and spermatozoa density in Atlantic cod (*Gadus morhua*): correlation and variation during the spawning season. *Aquaculture* **170**: 349 - 58.
- Richardson, G. F.; Wilson, C. E.; Crim, L. W.; Yao, X. Z. 1999. Cryopreservation of yellowtail flounder (*Pleuronectes ferrugineus*) semen in large straws. *Aquaculture* **174**: 89 - 94.
- Suquet, M.; Billard, R.; Cosson, J.; Normant, Y.; Fauvel, C. 1995. Artificial insemination in turbot (*Scophthalmus maximus*): determination of the optimal sperm to egg ratio and time of gamete contact. *Aquaculture* **133**: 83 - 90.
- Tiersch, T. R.; Figiel, C. R.; Wayman, W. R.; Williamson, J. H.; Carmichael, G. J.; Gorman, O. T. 1998. Cryopreservation of sperm of the endangered Razorback Sucker. *Transactions of the American Fisheries Society* **127**: 95 – 104.
- Tvedt, H. B.; Benfey, T. J.; Martin-Robichaud, D. J.; Power, J. 2001. The relationship between sperm density, spermatocrit, sperm motility and fertilization success in Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*. *Aquaculture* **194**: 191 – 200.

Wheeler, P.; Thorgaard, G. 1991. Cryopreservation of rainbow trout semen in large straws.
Aquaculture **93(1)**: 95 - 100.