

Evaluation of gynogenesis of rainbow trout (*O. mykiss*), using 27°C thermal shock during different exposure periods, at the Guairapungo Environmental Center (Nariño)

ABSTRACT. In intensive farming of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), which is the second most important fish species in Colombian aquaculture, only female alevines stocking is recommended since, because of tropical conditions, males present sexual precocity and use high percentage nutrients in sperm formation, decreasing growth, presenting more aggressiveness and therefore causing continuous attacks and injuries to females, which negatively affect the profitability of trout farms. For these reasons, this research evaluated the efficiency of gynogenesis in only female alevines production and their effect in growth. This technique is based on the exclusive transfer of genetic information from the mother, since the paternal genome is inactivated by irradiation with ultraviolet light (UV), prior to fertilization and the thermal shock eggs are put down which favors the retention of the second polar body during the second mitosis thus producing diploid alevines.

From the above reasons, the present research proposed to determine the optimal 27 °C thermal shock exposure time for eggs in terms of higher percentage of females and better zootechnical parameters, during hatchery. The study showed that the highest percentage of gynogenetic fish was obtained in treatment 4 (27 °C thermal shock during 15 minutes), which reported statistical differences ($p < 0.05$) compared to the other treatments, in the studied variables including weight and height increment, simple growth rate and survival.

Key words: embryos, irradiation, monosex, survival

Introducción

En las explotaciones intensivas de trucha arcoiris, es recomendable el cultivo de ejemplares sólo 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, afectando negativamente los parámetros zootécnicos. Además, los machos son más agresivos y gastan energía en el ataque de sus congéneres propiciando, 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.

El proceso de “la ginogénesis” descrito por Hertwig (1911), Hertwig *apud* Purdom (1969), irradiando semen de rana con rayos gamma, fue empleado en la fertilización de huevos. Como resultado Hertwig, observó que al incrementar las dosis de radiación, la viabilidad de los embriones decrecía hasta que se presentaba mortalidad. El “efecto Hertwig” se explica por la eliminación del ADN del espermatozoide.

La técnica ginogenética fue inicialmente aplicada por Oppermann (1913), en trucha café (*Salmo trutta*), Oppermann *apud* Thorgaard (1983). En años posteriores Romashov et al., 1961 *apud* Purdom, 1969), retoma las investigaciones en *Cyprinus carpio*, *Misgurnus fossilis* y *Acipenser ruthenus*. En los citados ensayos, en algunos

tratamientos, el semen fue inactivado mediante irradiación gamma, y posteriormente se efectuó la fertilización *in vitro* a temperatura ambiental, lo que generó embriones haploides no viables. En contraste en las unidades experimentales en que se aplicó a los huevos fertilizados choques térmicos fríos, se obtuvo embriones normales.

Chourrout, (1987) demostró diploidización en trucha arcoíris, mediante el proceso ginogenético, la cual quedó definida a través de la retención del segundo cuerpo polar durante la división meiótica.

En los últimos años en México se ha promovido la utilización de procedimientos ginogenéticos y androgenéticos en especies ícticas continentales y marinas de posible potencial acuícola como *Paralabrax maculato fasciatus* (Huerta, 1999), (*Spheoroides annulatus*), *Cichlasom aurophthalmus*, *Heros managuensis* y *Atractosteus tropicus*, etc (Chavez-Lomeli et al., 1989).

La investigación se propuso determinar el tiempo óptimo de exposición de los huevos a choques térmicos de 27°C mediante la comparación del número de individuos ginogenéticos de trucha arcoíris (*O.mykiss*) obtenidos. El ensayo se realizó en el Centro Ambiental Guairapungo (departamento de Nariño) y evaluó los parámetros zootécnicos de ganancia de Peso, Talla y porcentaje de Supervivencia durante la fase de larvicultura.

Se estableció como hipótesis nula (H_0), la ausencia de diferencias significativas entre los tratamientos y como hipótesis alterna (H_1), que al menos uno de los tratamientos registre un efecto medio diferente sobre las variables estudiadas.

Materiales y Métodos

La investigación se desarrolló durante 120 días entre los meses de enero a abril de 2012, en el Centro Ambiental y Piscícola Guairapungo adscrita a la Corporación Autónoma Regional de Nariño (CORPONARIÑO), ubicada a 28 Km al oriente de la ciudad de Pasto, altura de 2830 msnm, temperatura ambiental promedio 11,6°C, humedad relativa de 87%, precipitación anual de 1310,3 mm, Latitud 01°09' y longitud 77°08'.

Se seleccionaron de los estanques de reproducción, cuatro hembras y cuatro machos, según las características fenotípicas de color, altura del filete, forma de la cabeza y grado de madurez sexual. Los machos maduros se identificaron por la salida del semen, al ejercer leve presión en sentido anteroposterior sobre el abdomen y las hembras por el vientre abultado, región urogenital enrojecida y obtención de oocitos mediante leve masaje abdominal. Posteriormente, los ejemplares fueron trasladados a la sala de manejo de 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 L de agua y 25 ml de anestésico Tricacén Sulfato de Metilo, para disminuir el estrés causado por la manipulación. Cada uno de los reproductores estudiados fue sostenido lateralmente sobre el antebrazo derecho con el poro genital en dirección al recipiente, sujetando con la mano izquierda y un material textil suave la región caudal de tal forma que el ejemplar permaneciera inclinado con la cabeza hacia arriba. Luego con el pulgar y el índice de la mano derecha, se ejercía ligera presión en la cavidad

abdominal desde la parte anterior del tronco hacia el orificio genital, efectuando esta operación 2 a 3 veces.

Se obtuvo un promedio de 6 ml de semen por cada macho experimental, distribuido en cajas de petri, según tratamientos y réplicas, las cuales se colocaron debajo de una lámpara de luz ultravioleta de 20W, a una distancia de 10 cm, durante cuatro minutos y 30 segundos, en ausencia de luz natural. Las cajas de petri, contenían capas de semen de 3 mm para máxima eficiencia y penetración de luz UV en los núcleos celulares y de esta manera asegurar la inactivación del ADN paterno. Posteriormente, se mezcló el semen y óvulos en recipientes plásticos durante dos minutos con una pluma de ave para asegurar la máxima fertilización; se retiraron los residuos espermáticos con ayuda de un tamiz y suficiente agua y los huevos de los distintos tratamientos con excepción del T1, fueron sometidos a choques de inmersión a temperatura fija de 27°C por periodos de 5, 10, 15 y 20 minutos y se continuó el desarrollo embrionario en incubadoras tipo horizontal según los distintos tratamientos.

El período de incubación, se estimó en grados.día-1, de acuerdo a la temperatura promedio durante el bioensayo. Los bastidores se lavaban y desinfectaban profilácticamente con una solución comercial de yodo al 2% durante un minuto cada tercer día con el fin de eliminar el sedimento y la extracción de embriones muertos, los cuales se diferenciaban por su coloración blanquecina.

Las postlarvas se trasladaron a los canales de alevinaje a temperatura promedio de 12°C y se alimentaron cuatro veces al día con una dieta comercial de 48% proteína. Se efectuaron las labores de limpieza, desinfección y extracción de animales muertos. Los ejemplares de levantaron hasta una longitud total de cincuenta a sesenta milímetros con el propósito de efectuar exitosamente, la disección de las gónadas derecha e izquierda, las cuales fueron colocadas en frascos con formol bufferado al 2%. La totalidad de las gónadas fueron analizadas mediante la técnica squash acetocarmine según el protocolo establecido por Shelton et al. (1981) y la información obtenida fue registrada en las bases de datos correspondientes. Así mismo, el 15% de las gónadas de cada tratamiento fueron procesadas histológicamente con hematoxilina-eosina

Se utilizó un diseño irrestrictamente al azar (DIA) conformado por cinco tratamientos, cada uno con cuatro (4) réplicas de 500 ovas, para un total de 2000 ovas por tratamiento. (Tabla 1).

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

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

T1: No sometidos a radiación, No sometidos a choque térmico

Las variables evaluadas durante el ensayo fueron:

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

Incremento de peso diario. Es la ganancia de peso en un determinado periodo de tiempo.

$$IDP = \frac{Pf - Pi}{Tiempo} \quad (1)$$

Donde:

IDP (Incremento de Peso Diario (mg/día)), Pf (Peso Final (mg)), Pi (Peso Inicial (mg)) y t (Tiempo (días)).

Incremento de longitud Diaria. Ganancia de longitud en un determinado periodo.

$$ILD = \frac{Lf - Li}{Tiempo} \quad (2)$$

Donde:

ILD (Incremento de longitud Diaria (mm/día)), Lf (Longitud Final (mm)), Li (Longitud Inicial (mm)) y t (Tiempo (días)).

Tasa de crecimiento simple. Es el incremento de peso expresado en porcentaje, ganado por un individuo durante un determinado periodo de tiempo.

$$TCS\% = \frac{Pf - Pi}{Pi} \times 100 \quad (3)$$

Donde:

TSC% (Tasa de Crecimiento Simple), Pf (Peso Final (mg)), Pi (Peso Inicial (mg)).

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

$$S\% = \left[\frac{Nf}{Ni} \right] * 100 \quad (4)$$

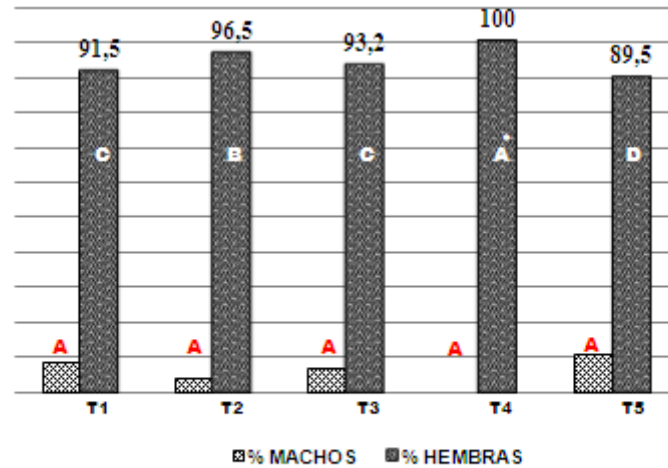
Donde:

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

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 y Discusión

Proporción de sexos. Se determinaron las frecuencias de los individuos ginogenéticos, identificados, mediante la coloración de acetocarmine y hematoxilina-eosina de gónadas de *Oncorhynchus mykiss*, según el porcentaje de mayor a menor de hembras: T4, 100% (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).



*Diferencia significativa

Figura 1. Porcentaje de poslarvas Ginogenéticas por tratamiento.

Chourrout & Quillet (1982), determinaron porcentajes altos de individuos ginogenéticos diploides y triploides por periodos de 20 minutos a 26°C y 10 minutos a temperatura de 29°C. López-Macías et al. 1998, evaluaron la temperatura como factor de inducción al sexo en ejemplares de *Oncorhynchus mykiss* y encontraron que a 27°C, el porcentaje de hembras fue de 95%, Salinas (1991), reportó 94% a la misma temperatura durante 15 minutos, Diter et al (1993), definieron mayores proporciones de ginogenéticos en incubación (choque térmico) por espacio de 9 minutos a 30°C y 4 minutos a temperatura de 32°C, en contraste con el T3 del presente ensayo que registró una población sólo hembras, mientras que el tratamiento testigo revelaba una población de hembras de 45%.

Caracterización morfológica de los testículos de *Oncorhynchus mykiss*. Los testículos aparecen como órganos pares de forma sacular y color blanco, suspendidos en la cavidad celómica localizados paralelamente a la vejiga hidrostática, se fusionan hacia la región caudal, dando origen a un conducto deferente corto que llega hasta el poro urogenital (Figura 2). Están unidos entre sí por una lámina de tejido pigmentado que a su vez los adhiere a la vejiga hidrostática. Los testículos inmaduros son de color blanco transparentes, delgados, cilíndricos y simétricos. (Figura 2).

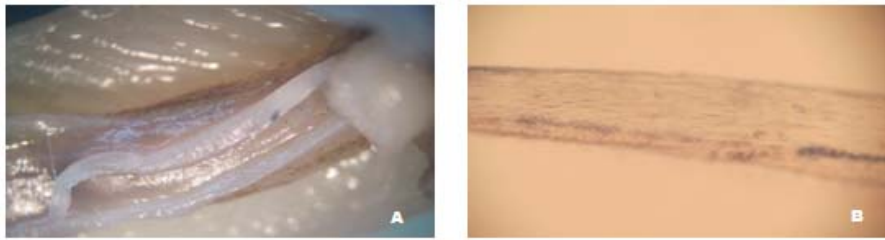


Figura 2. Gónada masculina de *O. mykiss*. A: Macroscópica, B: Microscópica

Caracterización histológica de los testículos de *O. mykiss*. En el estroma testicular, se encuentran los túbulos seminíferos, los cuales aparecen como estructuras a manera de ovillos constituidos por epitelio germinativo y en su interior se observan cistos de espermatogonias, espermatocitos primarios y espermátides (más diferenciados los cercanos a la luz del túbulo seminífero). (Figura 3). La trucha arcoíris, presenta producción continua de espermatozoides, una vez, los ejemplares alcanzan la madurez sexual. (Grizzle & Rogers, 1976; Bazzoli & Godinho, 1991; Landines, M. 2005; Urbinati. E. 2005). (Figura 3.)

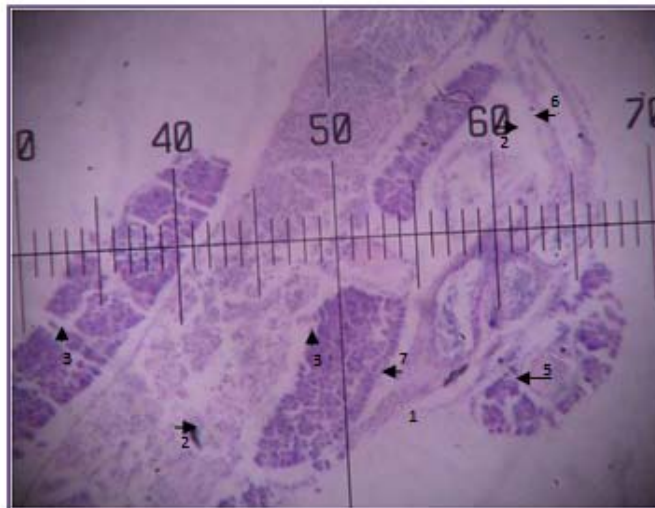


Figura 3. Organización histológica del Testículo en *Oncorhynchus mykiss*. Testículo en desarrollo mostrando Hilio testicular (1), Túbulos seminíferos (2), Cistos de espermatogonias (3), Conducto deferente (4), Epitelio Germinativo (5) y Parénquima Testicular (6), (flecha); 40x, coloración hematoxilina-eosina.

Caracterización morfológica de los ovarios del *O. mykiss*. Los ovarios de todos los ejemplares analizados, aparecen como estructuras pares lobuladas de color variable según la fase de desarrollo (Figura 4). Se relacionan lateralmente con la vejiga hidrostática y ventralmente con el corazón, estómago e intestinos. Anatómicamente se pueden describir tres regiones, la anterior o cefálica, media y posterior o caudal, la cual termina en el poro genital en un túbulo delgado denominado oviducto. Los ovarios corresponden al tipo cistovárico representan del 5% al 15% de peso vivo según los diferentes estadios de desarrollo. (Hoar & Randall, 1969).

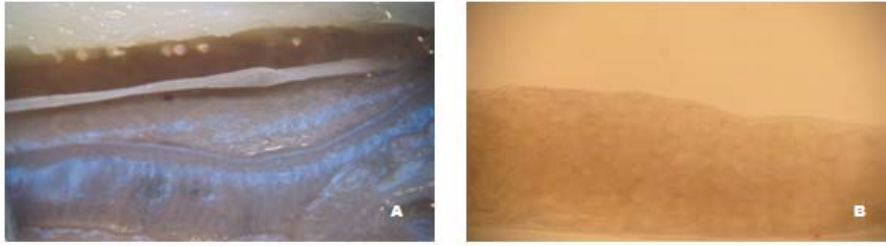


Figura 4. Gónada Femenina de *O. mykiss*. A: Macroscópica, B: Microscópica

Caracterización histológica de los ovarios de *O. mykiss*. Los individuos estudiados corresponden a las fases I (inmaduros), en las cuales se observa epitelio germinativo derivado de una extensión del peritoneo con oocitos primarios en folículos que se introducen en todo el estroma ovárico (Grizzle & Rogers, 1976; Landines, 2005; Urbinati 2005). (Figura 5).

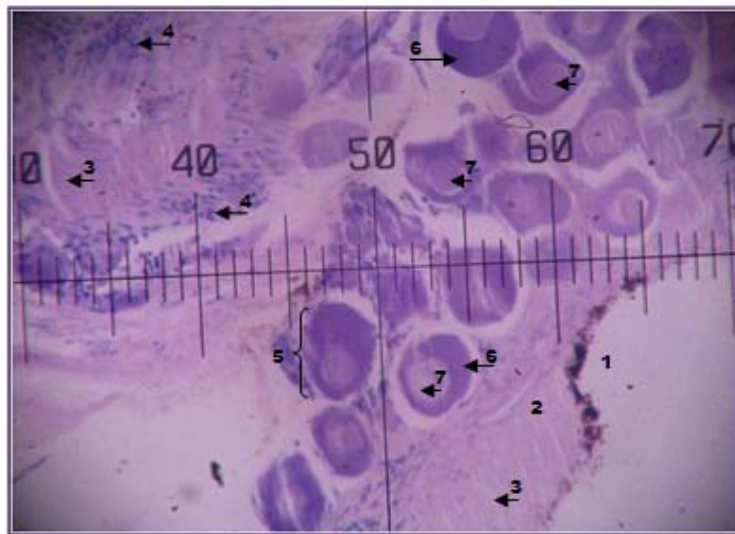


Figura 5. Organización histológica del ovario en estadio I de *Oncorhynchus mykiss*. Ovario en desarrollo mostrando Hilio del ovario (1), Vasos sanguíneos (2), Tejido parenquimatoso ovárico (3), Células germinativas (4), Folículos ováricos (5), Zona tecal (6) y Vesícula vitelina (7), (flecha); 40x, coloración hematoxilina-eosina.

Incremento de peso diario. Las mayores ganancias las registran los tratamientos 4 y 5 en contraste con T2 ($0,012 \text{ g.día}^{-1}$) y T1 ($0,011 \text{ g.día}^{-1}$). (Figura 6).

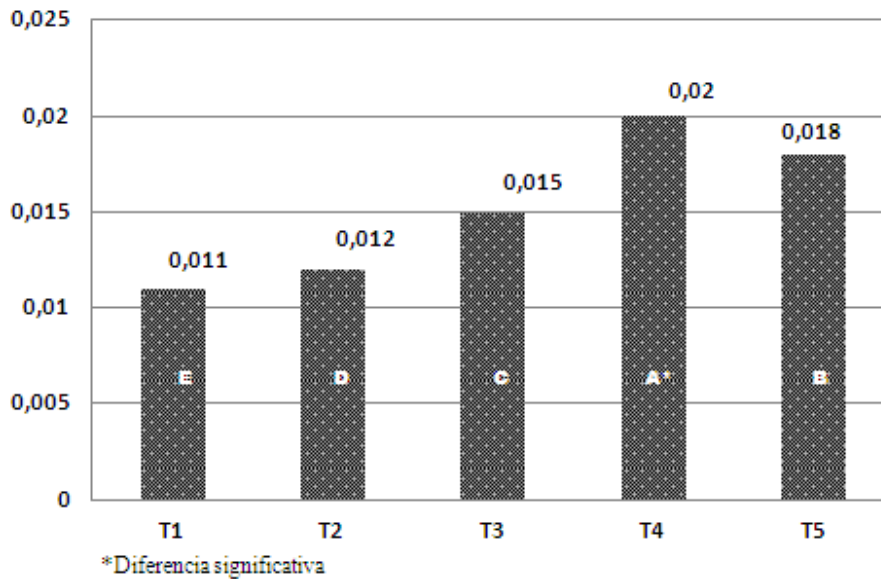


Figura 6. Incremento de Peso Diario.

El porcentaje de correlación demuestra que este valor es máximo entre los tratamientos 4 y 1 y corresponde a 81,81% y fue mínimo entre T2 y T1 con 9,09%. López et al. (2005), afirma que, “el incremento de peso de los organismos hidrobiológicos en cautiverio, inicia cuando los procesos anabólicos exceden a los procesos catabólicos y a la restauración, remodelación y mantenimiento de los tejidos, además de la eficiencia de nitrógeno y acumulación de nuevos tejidos relacionados con la calidad y consumo del alimento”.

Incremento de longitud diaria. Los mayores valores se establecieron en el tratamiento 4 (0,462) y los menores en el testigo (0,313). (Figura 7).

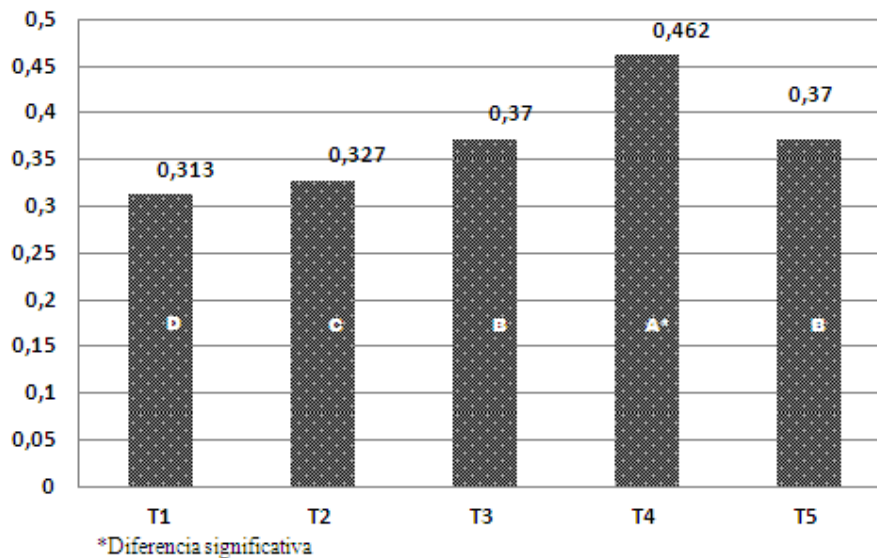


Figura 7. Incremento de longitud Diaria.

Tasa de crecimiento simple. Los mejores promedios se detectaron en el T4 (46,23%) en contraste con el testigo (31,34%). (Figura 8).

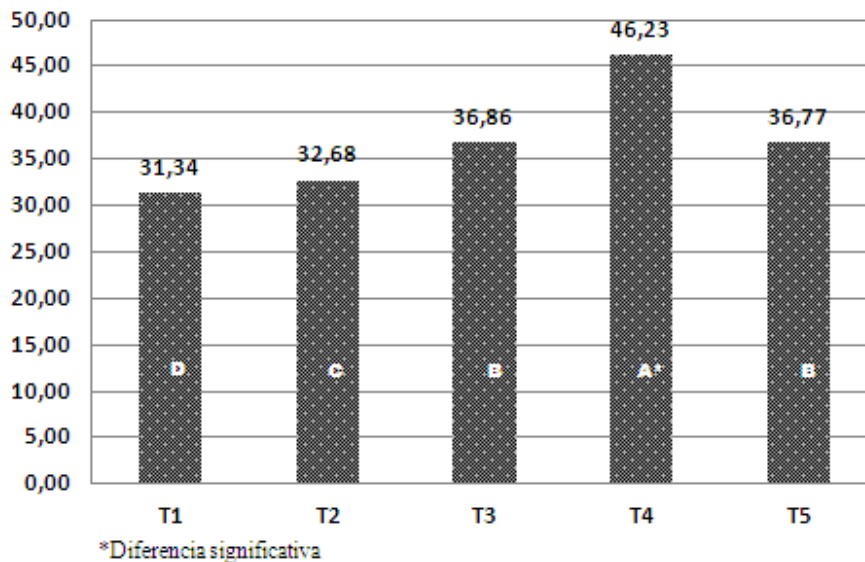


Figura 8. Tasa de Crecimiento Simple.

Sobrevivencia. El porcentaje promedio acumulado durante todo el periodo experimental fue mejor en el tratamiento 4 (46,2 %). En contraste el T5 presenta la mayor mortalidad principalmente durante la etapa de incubación, debido al registro de individuos no viables, posiblemente por poseer un número haploide de cromosomas. (Tabla 2). Según Chourrout (1986), embriones obtenidos por inseminación con espermatozoides irradiados, presentaron mortalidad temprana con dosis de radiación baja pero mortalidad tardía con dosis altas. Lo anterior se explica, porque la dosis de radiación baja no destruye totalmente el genoma del espermatozoide, pero ocasiona toxicidad dentro del embrión; mientras que la dosis alta induce inactivación completa y da como resultado embriones haploides no viables en el estado larval. El mismo autor demostró que la temperatura y periodo de exposición de los huevos al choque térmico, afecta la sobrevivencia por la presencia de embriones haploides no viables.

Tabla 2. Sobrevivencia durante las fases de desarrollo de la especie.

Tratamiento	Fecundación	Embriogénesis	Alevinaje	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

Tabla 3. Animales Ginogenéticos. Análisis de Varianza Monofactorial (SSPS).

GENERO	Suma de cuadrados	Gl	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			

Análisis de varianza monofactorial de individuos ginogenéticos. Determinó diferencias significativas entre los diferentes tiempos de exposición a choque térmico. (Figura 3).

Prueba de comparaciones múltiples de Tukey de individuos ginogenéticos. Se establecen diferencias en la proporción de hembras para cada uno de los tratamientos, de tal manera que el T4 registra el mayor número de individuos ginogenéticos. (Tabla 4).

Tabla 4. Animales Ginogenéticos. Prueba de Comparaciones Múltiples de Tukey.

	SEXO	Subconjunto para alfa = 0.05				
		1	2	3	4	5
HSD de Tukey ^{a,b}	T2Machos	1,0000				
	T3 Machos	1,0000				
	T5Machos	1,0000				
	T1Machos	1,3750				
	T5Hembras		6,3750			
	T3 Hembras		8,6250	8,6250		
	T2 Hembras			10,3750		
	T1 Hembras				14,7500	
	T4 Hembras					17,3750
	Sig.	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

Prueba de comparaciones múltiples de Tukey, incremento de peso y talla. Los tratamientos a diferentes tiempos de choque térmico, expuestos a 27 grados centígrados que obtienen mayor incremento en talla son el tratamiento 4 (15 minutos) y 5 (20 minutos); los cuales difieren significativamente del Testigo (T1) y de los Tratamiento 2 y 3.

Conclusiones

El protocolo aplicado en la presente investigación fue exitoso en el proceso de ginogénesis de la especie íctica *O. mykiss*, teniendo en cuenta que el T4 (27°C de choque térmico durante 15 minutos), registró un total del 100% hembras, seguido respectivamente por T2 (96,5%), T3 (93,2%), T1 (91,5%) y T5 (89,5%). El tratamiento 4 registró diferencias estadísticas ($p < 0,05$) con respecto a los demás tratamientos en las variables, número de individuos ginogenéticos obtenidos, incrementos de peso y talla, tasa de crecimiento simple y sobrevivencia.

Referencias bibliográficas.

Bazzoli, N. & Godinho, H. Reproductive biology of the *Acestrorhynchus lacustris* (Reinhardt, 1874) (Pisces: Characidae) from Tres Marias Reservoir, **Brazil. Zool. Anz.** v.226, n.5-6, p.285-297, 1991.

Chavez-Lomeli, M.O.; Mattheeuws, A.E.; Pérez, M.H. **Biología de los peces del río San Pedro en vistas a determinar su potencial para la piscicultura.** 1 ed. INIREBFUCTD. Xalapa, Veracruz, México. 222 p. 1989.

Chourrout, D & Quillet, E. Induced gynogenesis in the rainbow trout: sex and survival of progenies production of all - triploid populations. **Theor Appl Genet.** n.63, p.201–205. 1982.

Chourrout, D. Use of grayling sperm (*Thimallus thimallus*) as a marker for the production of gynogenetic rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Theor Appl Genet.** n.72, p.633-636.1986.

Chourrout, D. Genetic manipulations in fish: Review of methods. Francia, EIFAC/FAO. Symposium Bordeaux. 27 - 30 may. 1987.

Diter, A.; Quillet, E.; Chourrout, D. Supression of first egg mitosis induced by heat shock in the rainbow trout. **Journal of FISH BIOLOGY.** v.42, n.5, p.777-786, 1993.

Grizzle, J.M. & Rogers, W.A. Anatomy and histology of the channel catfish. Auburn Pinting Inc., Auburn University, Agr. Exptl. Station: 94p. 1976.

Huerta, B.M. **Inactivación genética de esperma de cabrilla arenera *Paralabrax maculato fasciatus* (Steindachnert, 1868) utilizando luz UV.** Mazatlán, Sinaloa, México: 89p. 1999. Tesis (Tesis de maestría Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo).

Hoar, W. & Randall, D. **Fish physiology.** Academic Press. Orlando, USA. 1969. 465 p.

Landines, M.; Daza, P.; Sanabria, A. (Eds). Mecanismos celulares de la reproducción de los peces. In: Reproducción de peces en el trópico. Instituto Colombiano de Desarrollo Rural. INCODER. Bogotá, D.C., Colombia. Primera edición. 246p. 2005.

López-Macías, J.; Portillo-Gómez, N. & Ramos-Ramos, A. Efecto de la temperatura en el porcentaje de hembras de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) obtenidas mediante ginogénesis. In: XXXIII Congreso nacional de ciencias biológicas. **Memorias...** Universidad del Tolima. Ibagué, Colombia. 1998. 222p.

López-Macías, J.; Mena, P.; Rodríguez, J. et al. **Evaluación de inmunoestimulantes en las fases de levante y ceba de trucha arcoiris (*O. mykiss*) cultivada en jaulas flotantes en el lago Guamuez.** Informe Final de Investigación. Vicerrectoría de Investigaciones Postgrados y Relaciones Internacionales. Universidad de Nariño, Pasto. Colombia, 2005, p278.

Purdom, C.E. Radiation-induced gynogenesis and androgenesis in fish. **Heredity.** n.24, p.431-444. 1969.

Salinas, J. **Aplicación y optimización de técnicas de ginogénesis en trucha arcoiris.** Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia, 1991. 67p. Tesis (Facultad de Zootecnia).

Shelton, W.L.; Rodriguez, G.D.; López, M.J. Factors affecting androgen sex reversal of *Tilapia áurea*. **Aquaculture**. v.25, n.1, p.59-65, 1981.

Thorgaard, G.H. Chromosome set manipulation and sex control in fish. In: *Fish Physiology*. v. 9, part B. (W. S. Hoar, D. J. Randall and E. M. Donaldson, eds). 405-434p. Academic press, New York. 477p. 1983.

Urbinati. E. Bases fisiológicas de la reproducción en peces tropicales 23-42 p. 2005.