

**EVALUACIÓN DEL DESARROLLO Y ALTERACIONES MORFOLÓGICAS DE
EMBRIONES DE YAMÚ (*Brycon amazonicus*) OBTENIDOS A PARTIR DE
REPRODUCCIÓN INDUCIDA, UTILIZANDO SEMEN FRESCO Y SEMEN
CRIOCONSERVADO, BAJO CONDICIONES CONTROLADAS.**

SANDRA MILENA MELO ROMÁN

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
PROGRAMA DE INGENIERÍA EN PRODUCCIÓN ACUÍCOLA
PASTO, COLOMBIA
2010.**

**EVALUACIÓN DEL DESARROLLO Y ALTERACIONES MORFOLÓGICAS DE
EMBRIONES DE YAMÚ (*Brycon amazonicus*) OBTENIDOS A PARTIR DE
REPRODUCCIÓN INDUCIDA, UTILIZANDO SEMEN FRESCO Y SEMEN
CRIOCONSERVADO, BAJO CONDICIONES CONTROLADAS.**

SANDRA MILENA MELO ROMÁN

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de
Ingeniero en Producción Acuícola.**

**Presidente
PABLO EMILIO CRUZ CASALLAS
Mvz, Ms, PhD.**

**Copresidente
ARIEL EMIRO GÓMEZ CERÓN
Biólogo Marino**

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
PROGRAMA DE INGENIERÍA EN PRODUCCIÓN ACUÍCOLA
PASTO, COLOMBIA
2010.**

“Las ideas y conclusiones aportadas en este trabajo de grado son responsabilidad exclusiva de su autor”.

Artículo 1º del acuerdo No. 324 de Octubre 11 de 1966, emanado del Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño.

NOTA DE ACEPTACIÓN

Pablo Emilio Cruz Casallas
Presidente de Tesis

Ariel Emiro Gómez Cerón
Copresidente de Tesis

Bolívar Lagos Figueroa
Jurado Delegado

Jorge Nelson López Macías
Jurado

San Juan de Pasto, 16 de Junio de 2010.

AGRADECIMIENTOS

La autora expresa sus más sinceros agradecimientos a:

PABLO EMILIO CRUZ CASALLAS.	MVZ, MS, PhD. Profesor investigador Universidad de los Llanos.
BOLÍVAR LAGOS FIGUEROA.	Profesor Universidad de Nariño
JORGE NELSON LÓPEZ MACÍAS	Profesor Universidad de Nariño
NATALIA V. PAREDES CASTILLO.	Ingeniera en Producción Acuícola
YOHANA VELASCO.	Investigadora Universidad de los Llanos.
MARCO ANTONIO IMUÉS.	Zoot., Esp. Profesor Universidad de Nariño
ARIEL EMIRO GÓMEZ CERÓN.	Biólogo Marino. Profesor Universidad de Nariño.
OSCAR MEJÍA.	Biblioteca recursos hidrobiológicos
PIEDAD MEJÍA.	Secretaria programa Ingeniería en Producción Acuícola

Profesores, pasantes y personal administrativo de la estación piscícola del Instituto de Acuicultura de los Llanos (IALL)

Y a todos aquellos que aportaron su conocimiento, trabajo y buenos deseos en el desarrollo de esta investigación.

DEDICATORIA

Quiero agradecer y dedicar este triunfo en primer lugar a la persona que a pesar de verme muchas veces desfallecer creyó en mí y me dio su constante apoyo Ruby Román, mi mamá, que ha sido además el motivo de mi lucha y arduo trabajo en todo el proceso para terminar mi carrera. A mi hermano Arturo Melo que ha sido mi compañero y amigo en todos los momentos de mi vida, a mi sobrino que es hoy el motivo de la sonrisa en mi rostro a pesar de las adversidades a las que me enfrento cada día.

De igual manera quiero extender mis agradecimientos a mis amigos y compañeros de formación, ellos quienes estuvieron conmigo, que me toleraron, me tuvieron paciencia, y ayudaron para que culminara mis estudios y hoy pudiera estar orgullosa de haberlo logrado...POR FIN!!!

Sandra Milena Melo Román

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	18
1. DEFINICIÓN Y DELIMITACION DEL PROBLEMA	20
2. FORMULACION DEL PROBLEMA	21
3. OBJETIVOS	22
3.1 OBJETIVO GENERAL	22
3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	22
4. MARCO TEORICO	23
4.1 GENERALIDADES DEL YAMÚ <i>Brycon amazonicus</i> (Spix & Agassiz, 1829)	23
4.1.1 Clasificación taxonómica	24
4.1.2 Descripción morfológica	25
4.1.3 Distribución	25
4.1.4 Hábitat	25
4.1.5 Hábitos alimenticios	25
4.1.6 Aspectos reproductivos	26
4.2 CRIOCONSERVACION	27
4.3 EMBRIOLOGIA EN TELEOSTEOS	30
5. DISEÑO METODOLÓGICO	33
5.1 LOCALIZACIÓN	33
5.2 PERIODO DE ESTUDIO	33
5.3 INSTALACIONES Y EQUIPOS	33
5.3.1 Material biológico	33

5.3.2	Materiales e insumos	34
5.4	PROCEDIMIENTO	34
5.4.1	Selección de reproductores de Yamú	34
5.4.2	Reproducción inducida	35
5.4.3	Obtención de los gametos	35
5.4.4	Congelación y descongelación de semen	38
5.4.5	Fertilización e incubación	40
5.4.6	Evaluación de fertilidad	41
5.4.7	Evaluación de diámetro ovocitario	42
5.4.8	Evaluación de embriones de Yamú con alteraciones morfológicas y embriones normales	42
5.4.9	Evaluación del desarrollo embrionario	42
5.4.10	Evaluación de la eclosión de embriones de Yamú (<i>Brycon amazonicus</i>)	42
5.4.11	Evaluación de semen congelado	42
5.4.12	Evaluación de semen fresco	43
5.5	TRATAMIENTOS	43
5.6	DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO	43
5.7	FORMULACION DE HIPÓTESIS	43
5.8	VARIABLES EVALUADAS	44
6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45
6.1	DIAMETRO PRE-POS FERTILIZACION	47
6.2	PORCENTAJE DE FERTILIDAD	49
6.3	PORCENTAJE Y TIEMPO DE ECLOSION	51
		Pág.

6.4 DESARROLLO EMBRIONARIO	52
6.5 ALTERACIONES MORFOLÓGICAS	62
7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	67
7.1 CONCLUSIONES	67
7.2 RECOMENDACIONES	68
8 BIBLIOGRAFÍA	69
ANEXOS	75

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Ejemplar maduro de Yamú (<i>Brycon amazonicus</i>)	24
Figura 2. Desove de una hembra inducida de Yamú (<i>Brycon amazonicus</i>)	36
Figura 3. Equipos para determinación de espermatozoides	37
Figura 4. Proceso de descongelación de semen crioconservado	38
Figura 5. Fertilización de ovocitos de Yamú con semen crioconservado	39
Figura 6. Incubadoras tipo Woynarovich y tipo experimental	40
Figura 7. Evaluación de porcentaje de fertilidad por el método de pipeta	41
Figura 8. Diámetro ovocitario antes y después de la fertilización con semen fresco y crioconservado	48
Figura 9. Comparación del porcentaje de fertilidad por tratamientos	50
Figura 10. Oocito maduro de <i>Brycon amazonicus</i>	53
Figura 11. Primer clivaje, división del blastodisco en dos blastómeros	54
Figura 12. Fase de clivaje (aproximadamente 64 blastómeros, 1h 30mpf)	55
Figura 13. Formación de la discoblástula (3hpf)	56
Figura 14. Migración del blastodermo y el periblasto hacia el polo animal (4hpf)	57
Figura 15. Inicio de gástrula tardía, 70 % epibolia (5h 30mpf)	58
Figura 16. Gástrula tardía 90% epibolia (6hpf)	58
Figura 17. Aparece la vesícula óptica y se distinguen ocho somitos	59
Figura 18. Embrión a las 8hpf (21 somitos)	60
Figura 19. Embrión desarrollado (10h 40mpf)	61
Figura 20. Larva de Yamú (<i>Brycon amazonicus</i>) recién eclosionada	62

Figura 21. Embrión de 2 h 36 mpf anormal	64
Figura 22. Malformación en embrión de 7h 46mpf (semen crioconservado)	64
Figura 23. Malformación de un embrión de Yamú obtenido de semen crioconservado	65
Figura 24. Embrión anormal (semen crioconservado) a las 9h 18 mpf	65

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Características reproductivas de hembras de Yamú (<i>Brycon amazonicus</i>)	45
Tabla 2. Características reproductivas de machos de Yamú (<i>Brycon amazonicus</i>)	46
Tabla 3. Parámetros (pH y T°) de incubación	47
Tabla 4. Datos de diámetro pre-fertilización y pos-fertilización con semen fresco y semen crioconservado	48
Tabla 5. Consolidado de fertilidad (en porcentaje), de cada tratamiento por réplicas	49
Tabla 6. Consolidado de eclosión (en porcentaje), de cada tratamiento por réplicas	51
Tabla 7. Tiempo de eclosión en hora y horas – grado, de cada tratamiento por réplicas	52
Tabla 8. Malformaciones de embriones de Yamú obtenidos con semen fresco y crioconservado	63

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A. Resumen de la condición reproductiva de las hembras de Yamú (<i>Brycon amazonicus</i>)	76
Anexo B. Características del semen utilizado para la seminación de oocitos de Yamú (<i>Brycon amazonicus</i>)	77
Anexo C. Análisis estadístico de características de semen fresco y semen crioconservado.	78
Anexo D. Datos de pH y Temperatura durante toda la investigación	80
Anexo E. Análisis estadístico para condición del agua (pH y T°)	82
Anexo F. Datos de diámetro tomados antes de la fertilización y después de la fertilización con semen fresco y crioconservado	84
Anexo G. Análisis estadístico de diámetro ovocitario pre-fertilización y pos-fertilización con semen fresco y crioconservado	90
Anexo H. Datos de fertilidad	93
Anexo I. Análisis estadístico para porcentaje de fertilidad (prueba de Brand Snedecor)	94
Anexo J. Datos de porcentaje y tiempo de eclosión	95
Anexo K. Análisis estadístico para porcentaje de eclosión (prueba de Brand Snedecor)	96
Anexo L. Datos de embriones normales y anormales por hora fertilizados con semen fresco y crioconservado	97
Anexo M. Análisis estadístico para embriones normales y anormales	99

GLOSARIO

Blastodermo. Parte celular del embrión, etapa comprendida entre el 30 % de epibolia y el final de la gastrulación¹.

Blastodisco. Parte de citoplasma parecido a un disco, segregado desde la yema hacia el polo animal durante y después de la etapa de una célula.

Blastómero. Célula que surge durante el clivaje, células incompletas al margen del blastodisco.

Blástula. Clásicamente la bola de células de capa simple formada de clivajes en organismos que muestran este tipo de desarrollo. Momento en que el blastodisco toma la forma de una bola, en la etapa de 128 células en el tiempo de gastrulación.

Clivaje. La segmentación o clivaje es una simple sucesión de divisiones mitóticas, y en teleósteos es de tipo discoidal, típica de huevos con alto contenido de vitelo. Esta segmentación se da solo en el polo animal formando la discoblástula o blastodisco, el polo vegetal no se segmenta y formara parte de la masa vitelina.

Concentración espermática. Número de células espermáticas por unidad de volumen. Se expresa en millones por mL.

Corion. Caparazón de los huevos.

Espermatocrito. Método utilizado para determinar la concentración espermática por volumen de células empacadas.

Fertilidad. Se efectúa después de 6 horas de incubación (en Yamú). Este momento coincide con el cierre del blastoporo. Se expresa en porcentaje, que se determina del cálculo de la proporción de oocitos fertilizados sobre el total de oocitos observados en muestras tomadas aleatoriamente de cada una de las incubadoras utilizadas.

Movilidad. Se mide de acuerdo a la amplitud de las ondas o remolinos que desplieguen los espermatozoides activados por un medio acuoso (agua o

¹ KIMMEL, Charles; BALLARD, William; KIMMEL, Seth; ULLMANN, Bonnie and SCHILLING, Thomas. Stages of embryonic development of the Zebrafish. Institute of neuroscience, University of Oregon, Eugene, Oregon. Department of Biology. Developmental dynamics, volume 203, number 3. July 1995 p 303.

bicarbonato de sodio al 1%). Es estimado en porcentaje de movilidad global o en masa.

Polo animal. Parte del huevo hacia donde los cuerpos polares emergen, correspondientes al punto de fertilización, justo abajo del micrópilo, donde el esperma penetra el corion.

Tiempo de activación. La duración de la motilidad espermática, es el periodo fértil del espermatozoide y es medida cronometrando el tiempo transcurrido desde el momento en que se adiciona la solución activadora al semen hasta la verificación de ausencia de motilidad espermática en la muestra.

Yamú. Especie nativa promisoría de los Llanos Orientales de Colombia, denominada científicamente *Brycon amazonicus*.

RESUMEN

La presente investigación se desarrolló en el Instituto de Acuicultura de los Llanos con el fin de determinar el efecto en la sobrevivencia y desarrollo embrionario del uso de semen crioconservado para fertilizar oocitos de Yamú, para la obtención de semilla, se utilizaron hembras maduras con peso de $2.200 \pm 294,39$ g, longitud total de $52,23 \pm 1,99$ cm y machos con peso de $1.637,5 \pm 160,08$ g y longitud total de $48,35 \pm 1,78$ cm, habituados a cautiverio, alimentados con concentrado comercial del 25% de proteína bruta a razón del 1,5 % de la biomasa y sometidos a reproducción inducida con EHC en dosis de 5.75 mg/Kg para las hembras y 4,0 mg/Kg para los machos de los que se obtuvo el semen fresco. El semen crioconservado fue manejado de acuerdo a los protocolos establecidos en el IALL.

El semen fresco utilizado presentó $12,83 \pm 2,38$ % de espermatozoides y movilidad de $82,50 \pm 5,0$ %, el semen crioconservado después de su descongelación presentó un espermatozoides de $12,18 \pm 0,35$ % y movilidad de 80 %.

Al evaluar el diámetro ovocitario antes y después de efectuar la fertilización, los resultados obtenidos indican que existen diferencias estadísticas significativas entre los ovocitos sin fertilizar ($1243,63 \pm 70,6\mu$) y los fertilizados con semen fresco T1 ($3411,0 \pm 186,1\mu$) y crioconservado T2 ($3319,88 \pm 151,4\mu$). De igual manera se demuestra que existen diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos.

El porcentaje de fertilidad fue de $72,17 \pm 12,61$ % para el T1 y de $46,17 \pm 8,82$ % para el T2, al realizar la prueba de Brand Snedecor se demuestra que existen diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos.

La eclosión en porcentaje fue de $60,21 \pm 19,12$ % en un tiempo de $13,5 \pm 1,0$ horas, a temperatura de $27,93 \pm 1,05^{\circ}\text{C}$ para el T1 y de $42,08 \pm 12,50$ % en $13,25 \pm 0,96$ horas, a $27,98 \pm 0,94$ °C para el T2. El análisis estadístico (prueba de Brand Snedecor) arrojó diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos siendo mejor el T1.

El desarrollo embrionario se describió por estadios, de los cuales se puede afirmar que las etapas de evolución de los embriones para los tratamientos fueron iguales por presentarse en el mismo tiempo.

Las alteraciones morfológicas más frecuentes fueron de cabeza, columna y vitelo, presentándose mayor número de deformidades en los embriones obtenidos a partir del T2.

ABSTRACT

This research was carried out in the Institute of Aquaculture of Los Llanos in order to determine the effect on survival and embryonic development with the use of cryopreserved semen to fertilize yamu oocytes. To obtain seed, mature females with weights of $2.200 \pm 294,39$ g, total length of $52,23 \pm 1,99$ cm were used, and males with weights of $1.637,5 \pm 160,08$ g and total length of $48,35 \pm 1.78$ cm, accustomed to captivity, fed with commercial food of 25% crude protein at the rate of 1,5 % biomass and under induced reproduction with EHC in dosis of 5.75 mg/Kg to the females and 4,0 mg/Kg to the males from which fresh semen was obtained. The cryopreserved semen was managed according to the protocols set in the IALL.

The fresh semen presented $12,83 \pm 2,38$ % of spermatocrit and mobility of $82,50 \pm 5,0$ %, after its thawing, the cryopreserved semen showed spermatocrit of $12,18 \pm 0,35$ % and mobility of 80 %.

In the evaluation of the oocyte diameter before and after doing the fertilization, the results showed significant statistical differences among the oocytes without fertilization ($1243,63 \pm 70,6\mu$) and the ones fertilized with fresh semen T1 ($3411,0 \pm 186,1\mu$) and cryopreserved semen T2 ($3319,88 \pm 151,4\mu$). In the same way it is demonstrated significant statistical differences between the two treatments.

The fertility percentage was of $72,17 \pm 12,61$ % in T1 and of $46,17 \pm 8,82$ % in T2, it is demonstrated that there are significant statistical differences between the two treatments when the Brand Snedecor test was used.

The percentage of hatching was of $60,21 \pm 19,12$ % in a time of $13,5 \pm 1,0$ hours, in temperatures of $27,93 \pm 1,05^{\circ}\text{C}$ for T1 and percentages of $42,08 \pm 12,50$ % in $13,25 \pm 0,96$ hours, in temperatures of $27,98 \pm 0,94$ °C for T2. the statistical analysis (Brand Snedecor test) gave significant statistical differences between the two treatments showing that T1 is the best one.

The embryonic development was described by stages, from which it is posible to affirm that there were no differences related to the time and stages of the development of the embryos between the treatments.

The more frequent morphological alterations were head, spine and yolk presenting the highest number of deformities in the embryos obtained from T2.

INTRODUCCIÓN

Colombia es un país reconocido mundialmente por la abundancia de sus recursos hídricos y por la infinidad biológica que acoge, sin embargo, las prácticas inapropiadas de producción y explotación han contribuido al deterioro de estos recursos.

En los últimos 12 años, la piscicultura ha sido el sistema de producción animal que ha registrado mayor crecimiento en los Llanos Orientales de Colombia², siendo comercialmente más atractivas las especies nativas.

Entre las especies ícticas susceptibles a explotación está el Yamú (*Brycon amazonicus*) que es una alternativa comercial de apetencia significativa, y de gran peso para la piscicultura de la región. Por lo anterior es necesario profundizar en aspectos como reproducción y obtención de semilla para producción.

Se han realizado estudios relacionados con la biología, crioconservación de gametos, cultivo, nutrición, alimentación del Yamú, sin embargo, hay otros aspectos a considerar para desarrollar otras técnicas de explotación.

La reproducción estacionaria propia de especies tropicales ha impulsado a la utilización de métodos como la crioconservación de semen que permite mantener viable material biológico por tiempo indefinido y abre un nuevo campo para la reproducción controlada de las especies de interés comercial. Esta técnica permite disponer de gametos masculinos rompiendo con la idea de los ciclos reproductivos, manteniendo la biodiversidad y asegurando la conservación física de la especie, además de conducir a programas de mejoramiento genético animal.

Las prácticas y experiencias de algunos investigadores revelan la presencia de malformaciones, disminución de crecimiento en el desarrollo y viabilidad de larvas obtenidas a partir de semen congelado.

La investigación en esta línea, está dirigida a determinar los posteriores efectos de la utilización de semen crioconservado en la sobrevivencia y desarrollo embrionario así como las posibles alteraciones morfológicas en embriones de Yamú. Permitiendo profundizar en el conocimiento de alternativas de reproducción

² CRUZ CASALLAS Pablo Emilio; HERNÁNDEZ ARÉVALO, Gilma y VELASCO SANTAMARÍA Yohana. Sobrevivencia, desarrollo y alteraciones morfológicas de larvas y postlarvas de Yamú (*Brycon siebenthalae*), obtenidas con semen congelado. Semilleros de investigación sobre conservación de gametos – SIGAME. Universidad de los Llanos - Instituto de Acuicultura: Villavicencio – Meta. 2004. p. 6 (P.16)

y obtención de semilla no ligadas a un ciclo o estación climática para contribuir a una comercialización permanente de alevines de Yamú.

Además, es posible establecer parámetros de evaluación de calidad de oocitos fertilizados con semen fresco y semen crioconservado y de embriones en su desarrollo.

1. DEFINICIÓN Y DELIMITACION DEL PROBLEMA.

El desarrollo avanzado de la inseminación artificial basada en gametos crioconservados ha permitido cambios de suma importancia en la industria pecuaria, por ende el semen congelado es usado mundialmente como una herramienta esencial en los programas de mejoramiento animal y en busca de beneficios similares en los paquetes reproductivos de especies ícticas.

Los estudios sobre la crioconservación y uso comercial de gametos de las especies de peces nativos en Colombia son escasos, sin embargo, durante los últimos cinco años, el instituto de acuicultura de los llanos (IALL) ha venido trabajando en crioconservación de semen de especies como Cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) y Yamú (*Brycon amazonicus*). Estos trabajos han permitido estandarizar, en primera instancia, un protocolo para la congelación de semen de estas especies, logrando reproducciones satisfactorias con obtención de alevines. Sin embargo, observaciones preliminares, particularmente en Yamú, han revelado una aparente alta incidencia de malformaciones u mortalidad tanto en embriones como en larvas, lo cual se convierte en un limitante para optimizar los procesos de reproducción artificial en la especie a partir del uso de esta herramienta biotecnológica.

En consecuencia, dada la posibilidad de implementar de manera masiva practicas reproductivas a partir de semen crioconservado en las piscifactorías nacionales, el conocimiento de posibles consecuencias desfavorables del uso de esta tecnología cobra especial importancia en el desarrollo del sector acuícola.

Siguiendo esta secuencia de ideas, se busca mediante la reproducción controlada con la utilización de semen fresco y semen congelado un paralelo de los efectos y alteraciones morfológicas de embriones de Yamú (*Brycon amazonicus*).

2. FORMULACION DEL PROBLEMA

¿Cuál es el efecto comparativo en el desarrollo de embriones de Yamú (*Brycon amazonicus*), obtenidos a partir de reproducción inducida utilizando semen fresco y semen crioconservado, en condiciones controladas?

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

- Comparar el desarrollo de embriones de Yamú (*Brycon amazonicus*), obtenidos a partir de reproducción inducida, utilizando semen fresco y semen crioconservado, bajo condiciones controladas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer las diferencias existentes en el aumento de diámetro ovocitario de los oocitos de Yamú (*Brycon amazonicus*) fertilizados con semen fresco T1 y semen crioconservado T2.
- Evaluar la diferencia del efecto de la utilización de semen fresco T1 y crioconservado T2 en la reproducción de Yamú (*Brycon amazonicus*) empleando el cálculo de porcentaje de fertilización.
- Calcular el tiempo y porcentaje de eclosión en la reproducción inducida de Yamú (*Brycon amazonicus*) utilizando semen fresco T1 y crioconservado T2.
- Determinar el efecto de la utilización de semen fresco T1 y crioconservado T2 en embriones de Yamú (*Brycon amazonicus*) con la observación de alteraciones morfológicas macroscópicas.
- Describir, de acuerdo al tiempo el estadio de evolución de embriones de Yamú (*Brycon amazonicus*), obtenidos con semen fresco T1 y semen crioconservado T2.

4. MARCO TEORICO

4.1 GENERALIDADES DEL YAMÚ *Brycon amazonicus* (Spix y Agassiz, 1829)

Según Howes³, el género *Brycon* es un grupo de carácidos neotropicales, ampliamente distribuido en las aguas continentales desde México hasta Argentina y es considerado uno de los más numerosos, con más de 60 especies descritas a lo largo de centro y sur América. *Brycon siebenthalae* como hasta hace poco fue llamada, fue propuesta como una nueva especie por Eigenmann⁴, basado en la descripción de un único ejemplar procedente de la guayana Británica. Howes⁵, describió las especies *Brycon siebenthalae* y *Brycon siebenthalae iquitensis*, encontradas en la parte alta del río Amazonas, la que ahora se conoce como *Brycon amazonicus* (Spix y Agassiz, 1829).

Este género también presenta un gran potencial en piscicultura continental en América latina⁶, según Zaniboni⁷ tiene buen comportamiento y rendimiento en sistemas de cultivo, aceptando dietas omnívoras y admite manipulación hormonal para su reproducción y obtención de semilla. Torres⁸ asegura que poseen un rápido crecimiento, calidad y aceptación comercial de su carne, alcanzando hasta 500 gramos de peso corporal después de seis meses de cultivo. Además, como lo mencionan Arias y Pardo⁹, el Yamú puede resistir variaciones relativamente amplias de pH, temperatura y oxígeno disuelto.

Arias¹⁰ menciona que el Yamú (*Brycon amazonicus*) es un pez de comportamiento grupal cuya reproducción natural se realiza durante la época de lluvias (febrero a junio). Según el mismo autor es reófilico, es decir, de comportamiento migratorio, sus desplazamientos son cortos, previos a la época de desove, desde los caños donde permanece en la época de verano, hacia los ríos donde realiza la fresa.

³ HOWES, G. Review of the genus *Brycon* (TELEOSTEI: CHARACOIDEI). Bulletin of British Museum of Natural History. 1982. 43 (I), 1- 47.

⁴ EIGENMANN, C., H. The freshwater fishes of british Guiana. Mem. Carnegie mus. Pittsbur. EEUU. V. V. Pp. 370-372.

⁵ Op cit. p. 39

⁶ WOYNAROVICH, E. A Propagação artificial de peixes de aguas tropicais. Manual de extensão. Brasilia, DF. FAO – CODEVASF – CNPq, Brasil. 1983. p 220.

⁷ ZANIBONI FILHO, E. Reprodução de espécies de peixes nativos. En Memorias I curso taller internacional de acuicultura. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia. 1997. p. 5

⁸ TORRES, Q. E. Apuntes sobre el cultivo del Yamú en los Llanos Orientales. En: Memorias VI jornada de Acuicultura. Segunda reunión regional del género *Brycon*. Villavicencio, Colombia: Unillanos, 2000. p. 9.

⁹ ARIAS, Alfredo y PARDO, Sandra. Estimación de parámetros básicos del cultivo y alimentación del Yamú. Proyecto de investigación. Villavicencio, Colombia: UNILLANOS-IALL-PLANTE, 1997. p. 11.

¹⁰ ARIAS, Alfredo. Contribución al conocimiento biológico de los peces de los Llanos Yamú (*Brycon siebenthalae*) y Sapuara (*Semaprochilodus laticep*), con fines de cultivo. Informe final. Villavicencio, Colombia: Universidad de los Llanos, Colciencias, 1995. p.30.

Sin embargo, Atencio¹¹, menciona que en los aspectos reproductivos se presentan dificultades debido a la reducida producción de alevinos, a causa de su reproducción marcadamente estacional y al canibalismo excesivo que presentan las larvas durante los primeros días de vida.

Figura 1. Ejemplar maduro de Yamú (*Brycon amazonicus*)



Fuente: Esta investigación.

4.1.1 Clasificación taxonómica. El Yamú (*Brycon amazonicus*) posee la siguiente clasificación taxonómica:

CLASE:	Osteichthyes
SUBCLASE:	Actinopterygii
SUPERORDEN:	Teleostea
ORDEN:	Characiformes
SUBORDEN:	Characina (Heterognathina)
FAMILIA:	Characidae
SUBFAMILIA:	Bryconinae
GENERO:	<i>Brycon</i>
ESPECIE:	<i>amazonicus</i> (Spix y agassaz, 1829) ¹²
NOMBRE COMÚN:	Yamú

¹¹ ATENCIO, G. Víctor. Algunos aspectos da fisiología do Yamú (*Brycon siebenthalae* Eigenman 1912). En: Revisión teórica acerca de la especie Yamú. Brasil: Universidad federal de Santa Catarina, 1999. p. 15.

¹² <http://www.fishbase.org/Summary/SpeciesSummary.php?id=52992>

4.1.2 Descripción morfológica. Para Arias¹³, el Yamú presenta cuerpo alargado y comprimido, de tono grisáceo a plateado, su dorso es oscuro con flancos azul oscuro metálico, el vientre plateado y muestra tres tenues manchas laterales. Su cuerpo está cubierto de escamas cicloides, el número de escamas esta entre 63, 12/7 a 64, 12/8; los adultos en promedio con peso de 1520 ± 1 g y LT de 42.6 ± 0.1 cm, su aleta dorsal con 10 a 11 radios, aletas pectorales con 15 radios cada una, aletas ventrales con 10 radios, aleta anal con 26 a 27 radios y aleta caudal de tipo homocerca con 22 a 23 radios; presenta la línea lateral curvada hacia abajo, la cual comienza desde la parte media del opérculo y se extiende hasta la base de la aleta caudal. La aleta adiposa es de tipo carnosa, de base ancha; presenta una banda oscura que atraviesa el ojo en sentido cráneo - caudal e iris oscuro.

Otros autores como Alvarez de Leon¹⁴, lo señala como pez de porte medio, cabeza roma, región interorbital arqueada, perfil dorsal arqueado, perfil ventral de regular tamaño, con un par de narinas delante de los ojos, tiene un espacio en el segundo suborbital, el maxilar está escasamente proyectado y presenta dientes ordenados en tres filas. Además, asegura que por su tipo de alimentación tiene un intestino largo y está provisto de estructuras especializadas como los ciegos pilóricos.

4.1.3 Distribución. Según Clavijo¹⁵, en Colombia, varios autores han referenciado cerca de 16 especies de bryconidos tales como *Brycon fowleri*, *Brycon henni*, *Brycon meeki*, *Brycon moorei moorei*, *Brycon moorei sinuensis*, en la cuenca del río Magdalena, *Brycon whitei* y *Brycon amazonicus* en la cuenca del río Orinoco. Para Arias¹⁶, el Yamú es una especie nativa de la cuenca del río Orinoco, distribuido en los llanos de Colombia y Venezuela.

4.1.4 Hábitat. Es un habitante natural de ríos y caños de la región orinocense, siendo un huésped permanente de aguas cálidas con temperaturas entre 26 a 30° C, oxígeno disuelto de 4 - 7 ppm y pH de 6 – 7, como lo afirma Arias¹⁷.

4.1.5 Hábitos alimenticios. Álvarez¹⁸ asegura que *B. amazonicus* posee hábitos alimenticios omnívoros con preferencia por los vegetales, Eslava et al¹⁹ citan a

¹³ Op cit . p 65

¹⁴ ALVAREZ DE LEON, M. Contribución al conocimiento de los peces de los llanos anatomía e histología básica del Yamú *Brycon siebenthalae*. Tesis medicina veterinaria y zootecnia. Universidad de los llanos. Villavicencio, Colombia 1991. p. 95

¹⁵ Op cit. p. 5

¹⁶ Op cit. p. 30.

¹⁷ ARIAS, Alfredo. Avances en la nutrición y alimentación de Yamú. En: memorias de la VII jornada de acuicultura. Tercera reunión regional del género *Brycon*. Villavicencio, Colombia. 2001. p 4-8.

¹⁸ Op cit. P. 95.

¹⁹ ESLABA MOCHA, René; PARDO CARRASCO, Sandra; ARIAS CASTELLANOS, Alfredo; CRUZ CASALLAS, Pablo. Morfología macro y microscópica del esófago, estomago y ciegos pilóricos del Yamú *Brycon siebenthalae*. Revista Orinoquía, Universidad de los Llanos. Instituto de Investigaciones de la Orinoquía Colombiana Vol 5 No1 año 2001 p 111-128.

Bernal y Cala quienes aseguran que el Yamú en sus hábitos naturales en época de verano su dieta esta constituida principalmente por insectos, seguido por material vegetal y peces. En la transición de verano a invierno, la dieta la constituye material vegetal, en invierno, el alimento predominante son semillas. Arias y Rodríguez²⁰, aseveran que en cautiverio, esta especie se adapta muy bien a los estanques y al suministro de dietas procesadas.

Hurtado y Useche²¹ describen porcentualmente la preferencia alimenticia de esta especie y aseguran prefiere material vegetal terrestre así: frutos 35.4%, semillas 47,0%, flores, cortezas y hojas 10,8% proveniente de la vegetación aledaña a los cursos fluviales. El material de origen animal, peces, escamas y artrópodos, representa aproximadamente el 6,8% del a dieta.

4.1.6 Aspectos reproductivos. El Yamú (*Brycon amazonicus*) es una especie reofílica estimulada básicamente por las condiciones medioambientales, como el incremento de las lluvias, desencadenando en las hembras la ovulación y en los machos la espermiación (Atencio²²).

Para Carrillo y Rodríguez²³, el Yamú es una especie cuya reproducción es bisexual. Tanto la fertilización como el desarrollo del embrión ocurren externamente. Los mismos autores, afirman que la reproducción es un evento condicionado a diversos factores, enmarcado por las condiciones ambientales y fisiológicas del pez. Las señales externas son captadas por los sistemas nervioso y endocrino los cuales responden transformándolas en indicaciones que activan la formación y liberación hormonal. El hipotálamo es el encargado de que dichas señales de tipo externo lleguen a la hipófisis, emitiendo mensajeros químicos que activan (Gn-Rh) y/o inhiben (GIRF) la liberación de las gonadotropinas que llegan a la hipófisis, está a su vez controla la maduración de las gónadas, desencadenando el proceso reproductivo²⁴.

Según Carrillo y Rodríguez²⁵, entre las hormonas involucradas en este proceso se encuentran la hormona liberadora de gonadotropina (Gn-RH), la cual ha sido

²⁰ ARIAS, Alfredo y RODRÍGUEZ, C. Experimentos con tres niveles de proteína, en la ración para el engorde de Yamú, *Brycon siebenthalae*. En: Memorias VI jornada de Acuicultura. Segunda reunión regional del genero *Brycon*. Villavicencio, Colombia: Unillanos, 2000. p.14

²¹ HURTADO, R. H., y USECHE, L. C. A. Estudio sobre la biología del Yamú, *Brycon siebenthalae* (EIGNMANN, 1912) y de la Palometa, *Mylossoma Duriventri* (CUVIER, 1818) (PISES: CHARACIDAE), en la parte baja del río Cafre, sistema del río Guaviare. Tesis. Universidad nacional de Bogotá, Colombia. 1986. p. 115

²² Op cit. p. 15.

²³ CARRILLO, A. M. Y RODRÍGUEZ, J. A. Bases fisiológicas de la reproducción de peces tropicales. En: Fundamentos de acuicultura continental. Bogotá: INPA, 2001. p. 204.

²⁴ CHIRINOS, Jose. La Cachama Ministerio de Agricultura de Venezuela. Caracas: imprenta gob. Ministerio de Agricultura y Pesca.1998. p. 50.

²⁵ Ibid., p. 123.

usada en la rutina de inducción reproductiva en peces, principalmente las obtenidas de Salmón.

Vazzoler²⁶, afirma que en la inducción reproductiva de especies reoófilas se utilizan diversos preparados hormonales (homoplásticos, heteroplásticos, sintéticos, o la combinación de ellos) interviniendo en distintos niveles del eje Hipotálamo – hipófisis – gónadas. Además la administración de EHC incrementa los niveles circundantes de gonadotropinas, actuando directamente sobre las gónadas y conduciendo a la maduración final de los oocitos y la liberación de los gametos. La interacción de gametos de peces con fertilización externa, depende básicamente de la presencia de agua, en donde los espermatozoides adquieren motilidad para poder fertilizar al oocito y así completar la segunda división meiótica, con posterior cierre del micrópilo como lo afirman Redding y Patiño citados por Rizzo²⁷.

Según Clavijo y Arias²⁸, para Yamú se han reportado fecundidades oocitarias totales de 231600 oocitos y una concentración espermática de $12,8 \times 10^9 \pm 1,1 \times 10^9$ espermatozoides por mililitro.

Arias y Aya²⁹ han reportado varios trabajos sobre aspectos reproductivos en el Yamú que han sido desarrollados en los últimos años, entre estos, su escala de maduración gonadal, definiendo el desarrollo ovarico como de tipo sincrónico por grupos, evaluación de prácticas de reproducción inducida estimando fecundidades alrededor de 120 mil oocitos por kilogramo y el establecimiento de planteles de reproductores, los cuales han contribuido a solucionar problemas de baja producción de oocitos y alta mortalidad de alevinos. Igualmente se ha caracterizado el semen de la especie, determinando su volumen, concentración espermática, movilidad, viabilidad, actividad respiratoria y el efecto de la temperatura del agua y soluciones de bicarbonato utilizadas por Cruz y Velasco³⁰ sobre la intensidad y duración de la movilidad de los espermatozoides.

²⁶ VAZZOLER, E. A. Biología de reproducción artificial de peixes teleósteos: teoría e práctica. Maringá, Brasil: Universidade Estatal de Maringá, 1996. p. 169.

²⁷ RIZZO, E. Biología de ovos de peixes neotropicais de agua doce: estudos comparativo e experimental, com ênfase na análise da superfície e do aparelho micropilar. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte – MG, Brasil. 2001 p. 103.

²⁸ CLAVIJO, Jhon y ARIAS, Alfredo. Desarrollo embrionario de Yamú (*Brycon siebenthalae*), En: Memorias XXXV Congreso Nacional de Ciencias Biológicas. Medellín, Colombia, 2000. p. 86.

²⁹ ARIAS, Alfredo y AYA, Elizabeth. Biología reproductiva del Yamú *Brycon siebenthalae*, en ambientes naturales. En: Resúmenes I Congreso de Zoología. Bogotá, 2000. p. 86.

³⁰ CRUZ, Pablo y VELASCO, Yohana. Crioconservación de semen de Yamú (*Brycon siebenthalae*): calidad seminal, dosis inseminante y sistemas de empaque. En: Memorias II Congreso Colombiano de Acuicultura, Villavicencio, Colombia: Unillanos, 2004. p. 27.

4.2 CRIOCONSERVACIÓN.

La crioconservación es la rama de la criobiología (estudio de la vida a bajas temperaturas) por medio de la cual se espera prolongar indefinidamente el potencial de vitalidad y las funciones metabólicas normales de las células a temperaturas criogénicas generalmente de -196 °C, permitiendo su conservación (Rodríguez³¹). Esta tecnología constituye una alternativa obligada para el establecimiento de bancos genéticos, los cuales permiten mantener la biodiversidad, asegurando la conservación de las especies.

Para Cloud, Miller y Levanduski³², los avances en criobiología han permitido la conservación a bajas temperaturas de una gran variedad de especímenes, incluyendo desde células aisladas, hasta organismos multicelulares más complejos como embriones. Esta tecnología constituye una herramienta imprescindible para el establecimiento de bancos de germoplasma, lo cual según Rodríguez³³, permite disponer de gametos masculinos durante todo el año, disminuyendo así la cantidad de reproductores machos y la dependencia de la sincronía entre la maduración de machos y hembras. Chaparro³⁴ ha observado como ciertas formas de vida pueden vivir congeladas durante algún tiempo y luego al descongelarse continúan con sus funciones vitales normales.

Labbe et al³⁵, confirman que la crioconservación de espermatozoides ha sido usada ampliamente para la reproducción asistida en humanos y en la industria animal, para la inseminación artificial de varias especies domésticas en programas de mejoramiento genético. Actualmente está siendo intensamente estudiada para su uso en acuicultura, haciendo cada vez más necesario el desarrollo de técnicas de crioconservación exitosas y viables. Para Ogier et al³⁶, esta técnica permite ampliar los periodos estacionales de producción de semilla, tener gametos maduros de líneas seleccionadas para mejoramiento genético disponibles durante

³¹ RODRIGUEZ, G. M. Genética aplicada a la piscicultura. Temas actuales sobre reproducción en teleosteos. Secretaría de pesca. México: Editorial, Rodríguez, G. M, 1992. p. 83.

³² CLOUD, J. G., MILLER, W. H. y LEVANDUSKI, M. J. Cryopreservation of sperm as a means to store salmonid germ plasm and to transfer genes from wild to hatchery populations. Program Fish Cult, 1990. p. 51.

³³ Op cit. p. 83.

³⁴ CHAPARRO, N. Reproducción artificial y manipulación genética en peces. Barranquilla: Editorial, mejoras, 1994. p. 36.

³⁵ LABBE, C., MARTORIATI, A., DEVAUX, A. y MAISSE, G. Effect of sperm cryopreservation on sperm DNA stability and progeny development in rainbow trout. Molecular Reproduction and Development, 201. p. 397.

³⁶ OGIER, B., VERN, Y., KERBOEUF, D. Y MAISSE, G. Flow cytometric evaluation of mitochondrial activity and membrane integrity in fresh and cryopreserved rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa, 1997. p. 141.

todo el año y para el establecimiento de bancos genéticos como lo aseguran Jenkis y Woods³⁷. Kerby³⁸ por su parte considera que estos últimos, podrían facilitar la producción comercial, ya que permiten reducir el número de machos reproductores mantenidos en las granjas, facilitando el intercambio y uso de semen de buena calidad y además como afirma Piironen³⁹ incrementando la diversidad genética de la población. De igual forma, para Gwo et al⁴⁰, los bancos genéticos facilitan la conservación de información genética importante, especialmente de aquellas especies amenazadas o en peligro de extinción.

El principal requerimiento para el uso de semen crioconservado, es que el proceso de descenso de temperatura no produzca alteraciones en la célula espermática que puedan impedir que la progenie se desarrolle, como lo explica Medina et al⁴¹, cuando afirma que los protocolos de crioconservación tienen un número de daños potenciales sobre las células ocasionadas por el choque térmico, el estrés tóxico producido por los crioconservantes y la formación y dilución de cristales que se forman intra y extracelularmente.

Cruz et al⁴² reportan resultados de movilidad espermática y porcentajes de fertilización obtenidos en distintas especies como *Brycon amazonicus* con 63,1% motilidad y 58,2 % de Fertilidad

Las consecuencias de la crioconservación de semen según Labbe et al⁴³, en la progenie han sido escasamente estudiadas, observando un gran número de malformaciones individuales en embriones y larvas recién eclosionadas provenientes de oocitos fertilizados con semen congelado. Contrario a esto, Gonzales y Fresneda⁴⁴ concluyeron que el desarrollo embrionario, larvario y la etapa de alevinaje en Cachama blanca (*Piaractus brachyomus*) y bagre rayado (*Pseudoplatystoma fasciatum*) obtenidos con semen congelado es normal e igual al obtenido con semen fresco.

³⁷ JENKIS, K. K. y WOODS, L. C. The cryopreservation of Striped Bass *Morone saxatilis* Semen. In: Journal of the World Aquaculture Society, 2002. p. 70.

³⁸ KERBY, J. H. Cryogenic preservation of sperm from striped bass. Transactions of the American Fisheries Society, 1983. p. 86.

³⁹ PIIRONEN, J. Cryopreservation of sperm from brown trout (*Salmo trutta*) and Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). Aquaculture 116, 1993. p. 275.

⁴⁰ GWO, J., STRAWN, K., LONGNECKER, M. T. y ARNOLD, C. R. Cryopreservation of atlantic croaker spermatozoa. Aquaculture 94, 1991. p. 275.

⁴¹ MEDINA, Victor, VELASCO Yohana, CRUZ Pablo. Aspectos generales de la crioconservación espermática en peces teleosteos. Revista Colombiana de Ciencias pecuarias. Universidad de Antioquia. Vol. 18:1, 2005. p. 34

⁴² Op cit. p. 30

⁴³ Op. cit., p. 404.

⁴⁴ GONZALES, E. y FRESNEDA, Adriana. Crioconservación de semen de Cachama blanca (*Piaractus brachyomus*) y Bagre rayado (*Pseudoplatystoma fasciatum*). En: Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias. Medellín, Colombia: Editorial, Universidad de Antioquia, suplemento, Julio, 1999.p. 197.

Cruz, et al.⁴⁵, estudiaron la calidad del semen de Yamú (*B. amazonicus*) en condiciones de cautiverio colectando a través de reproducción artificial, un volumen de $1,8 \pm 1,2$ mL, la concentración $13,9 \pm 4,0 \times 10^9$ espermatozoides por mL, espermatozocrito $41,5 \pm 10,8\%$; motilidad espermática de $88 \pm 9\%$ y tasa de fertilización de $84 \pm 8 \%$. Otros estudios por Cruz et, al.⁴⁶, describen que al mezclar el semen con un medio crioprotector (5.5 glucosa, 12% yema de huevo de gallina y 10% de DMSO) en una relación 1:4 (semen: medio) almacenado en pajillas francesas de 0.5 mL, congelados en nitrógeno líquido por 10 días o 12 meses, puede desarrollarse satisfactoriamente la criopreservación de semen de Yamú.

En yamú, la evaluación de diluyentes basados principalmente en yema de huevo y crioprotectores como dimetilsulfoxido, metanol, propilenglicol y etilenglicol, como lo reportan Bolaños y Romero⁴⁷ y el estudio de diferentes velocidades de congelación según Cruz et al⁴⁸ han permitido ajustar un protocolo para la crioconservación de semen de la especie, que ha demostrado ser eficiente de acuerdo con las tasas de fertilidad observadas en los ensayos a nivel de laboratorio y granjas comerciales, como lo indican cruz et al⁴⁹.

4.5 EMBRIOLOGÍA EN PECES TELEÓSTEOS.

Para Varzzoler⁵⁰, el desarrollo temprano de los peces, comprende tres estadios primarios. El primer estadio es el de huevo (comienza con la fertilización y finaliza con la eclosión de la larva), periodo en el que se lleva a cabo la división celular, formación y desarrollo del embrión e incluye tres subdivisiones como son temprano, medio y tardío. Al segundo estadio se le denomina larva, que comprende el periodo desde la eclosión hasta la transformación en juvenil, con

⁴⁵ CRUZ, Pablo; LOMBO, Dora; VELASCO, Yohana. Calidad del semen y morfología de los espermatozoides de los reproductores en cautiverio de *Brycon siebenthalae* (Eignmann). Instituto de acuicultura. Universidad de los Llanos, Villavicencio, Meta- Colombia. Aquaculture Research, 2005, p. 1-5.

⁴⁶ CRUZ, Pablo; PARDO, Sandra; ARIAS, Alfredo; LOMBO, Pedro; LOMBO, R. Dora; PARDO, Jaime. Criopreservación del semen de Yamú *B. siebenthalae*. Instituto de acuicultura. Universidad de los Llanos, Villavicencio, Meta- Colombia. Journal of the world aquaculture society. Volumen 35 No. 4 Diciembre 2004.

⁴⁷ BOLAÑOS, PM; ROMERO O. Evaluación del uso de propilenglicol, etilenglicol, metanol y dimetilsulfoxido para la crioconservación de semen de Yamú (*Brycon amazonicus*). Trabajo de pregrado, facultad de ciencias Agropecuarias y recursos naturales, Unieverssidad de los Llanos, Villavicencio, 2003.71 p.

⁴⁸ Op. cit., p. 35

⁴⁹ CRUZ CASALLAS Pablo Emilio, MEDINA ROBLES, Victor, VELASCO SANTAMARIA Yohana. Protocolo para la crioconservación de semen de Yamú *Brycon amazonicus* Spix y Agassiz 1829) grupo de reproducción y toxicología de organismos acuáticos GRITOS, instituto de acuicultura, facultad de ciencias agropecuarias y recursos naturales, Universidad de los Llanos, Villavicencio Meta, Colombia. revista colombiana de ciencias pecuarias volumen 19 no. 2 año 2006

⁵⁰ Op. cit., p. 168.

tres subdivisiones (preflexión, flexión y postflexión) y dos estadios transicionales (larva sacovitelinica y transformación).

El tercer estadio se conoce como juvenil donde el individuo alcanza sus proporciones corporales, pigmentación definitiva y hábitos propios de los adultos de su especie.

Vazzoler⁵¹ establece que la reproducción en teleósteos no solo pretende la sobrevivencia y continuidad de las especies, permite además, la transmisión, a las nuevas generaciones, de los caracteres genéticos modificados por selección natural a lo largo de la evolución. Así, las múltiples adaptaciones embrionarias y larvales desarrolladas y adquiridas por los peces óseos se relacionan, directamente, con los diversos mecanismos reproductivos que estas especies hidrobiológicas exhiben: gonocóristico, hermafrodita, partenogénico, hibridogénico y superfetación.

Leme⁵² da un ejemplo claro de lo escrito anteriormente, ya que mientras en las especies con fertilización y desarrollo externo por ejemplo la Cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) prima una rápida y amplia formación del espacio previtelínico como medio de protección del embrión, en especies con fertilización y desarrollo interno por ejemplo Guppy (*Poecilia reticulata*) prima la constitución de órganos que permitan el intercambio de materiales nutritivos y materiales de desecho entre el cuerpo materno y el del embrión en formación.

Según trabajos de Balinsky⁵³, Leme⁵⁴, Gilbert⁵⁵, Freire⁵⁶, entre otros autores, la embriología en teleósteos puede ser descrita así:

En teleósteos a partir del punto de contacto de la cabeza del espermatozoide de fertilización con la superficie citoplasmática del oocito, se desprende la onda de fertilización, en el cual se libera el contenido de los alvéolos corticales, dando inicio a la elevación y endurecimiento del corion, dando paso posterior a la formación del espacio previtelino. Los espermatozoides acceden a la superficie del oocito a través del vestíbulo y del canal micropilar. El micrópilo, estructura que permite el paso de los espermatozoides al interior del oocito, se encuentra en el

⁵¹ Ibid., p. 45.

⁵² LEME DOS SANTOS, H. S. Anatomía microscópica dos ovos teleósteos mas diferentes etapas do desenvolvimento embrionario. En: Resúmenes e palestras, segunda semana sobre histología de peixes da FCAVJ – UNESP, 1995. p. 51.

⁵³ BALINSKY, B. J. Introducción a la embriología. Tercera edición, Barcelona, España: editorial Omega, 1975. p. 631.

⁵⁴ Op. cit. p. 61.

⁵⁵ GILBERT, S. F. Developmental Biology. Sinaure Associates, Sunderland, Mass., EEUU, 1997. p. 77.

⁵⁶ FREIRE, B. D. Análise structural e ultrastructural da maturação final do ovocito, fertilização e primeira clivagem em Curimatá, *Prochilodus lineatus*. Tese de doutorado. Brasil: Universidade Estatal Paulista, 2001. p. 79.

sitio donde ha migrado la vesícula germinativa durante el proceso de maduración final, este se halla cubierto por la célula micropilar, su función es impedir la obstrucción del canal, siendo esta liberada en el momento de la ovulación. Luego de atravesar el vestíbulo y el canal micropilar el espermatozoide de fertilización penetra la superficie del oocito. La cariogamia de los pronúcleos femenino y masculino, permite el restablecimiento del número cromosómico de la especie y da origen a una ovocélula o cigoto.

Según los anteriores autores, como consecuencia de la fertilización se libera el segundo cuerpo polar, terminando casi la ovogénesis. A continuación el proceso de segregación plasmática divide la ovocélula en dos polos: polo animal y polo vegetal. La segmentación o clivaje es una simple sucesión de divisiones mitóticas, y en teleósteos es de tipo discoidal, típica de huevos con alto contenido de vitelo. Esta segmentación se da solo en el polo animal formando la discoblástula o blastodisco, el polo vegetal no se segmenta y formara parte de la masa vitelina. En la etapa de discoblástula en peces, es posible diferenciar dos grupos celulares bien definidos: el blastodermo el cual permitirá la constitución del cuerpo del embrión, y el periblasto o capa sincicial, intermedia entre el blastodermo y la masa vitelina, que participara en el transporte de sustancias.

Las segmentaciones pierden su sincronía a medida que avanza su desarrollo y las células empiezan a moverse, se dan los movimientos morfogénéticos, iniciando la gastrulación. Las células mas externas del blastodermo, por un movimiento epibólico, se expande sobre la superficie de la masa vitelina, llegando a cubrirla totalmente. La invaginación mesodérmica y endodérmica se realiza alrededor del perímetro del blastodisco, mientras que las células más internas del blastodermo debido a un movimiento de migración, convergen dorsalmente formando así el eje embrionario.

En teleósteos existen dos grupos bien diferenciados: la formación de los esbozos primarios de los órganos craneales (vesículas ópticas, vesículas óticas) y la diferenciación de la cola, etapa conocida como morfogénesis y organogénesis inicial. La etapa de formación del tubo neural, rudimento del sistema nervioso central, es conocida como neurulación y en peces es de tipo secundario.

A demás, se presentan las etapas de organogénesis media y tardía. En las cuales se indica la formación y funcionalidad de los esbozos primarios de los órganos notándose la diferenciación de las cavidades encefálicas, la diferenciación del lente o cristalino en las cápsulas ópticas, la formación de los otolitos en la vesículas óticas, la sedimentación mesodérmica con la formación de somitos pareados, el desarrollo del corazón y de los vasos periféricos del sistema circulatorio, el inicio de la circulación y la formación de las aletas primigenias, finalmente en el desarrollo embrionario de los peces teleósteos se da el periodo de eclosión en donde el embrión sale del corion y pasa a la fase del periodo larval.

5. DISEÑO METODOLÓGICO

5.1 LOCALIZACION

La investigación se desarrolló en la Estación Piscícola del Instituto de Acuicultura de los Llanos (IALL), localizada en la vereda Barcelona a 7 kilómetros de la cabecera municipal de la ciudad de Villavicencio, capital del departamento del Meta (Colombia) a una latitud de 4°05' N y longitud 73°37'0, la estación se halla a 418 msnm, las características climatológicas durante un ciclo anual presenta una temperatura ambiental media de 25° C, temperatura promedio del agua de 27° C, precipitación pluvial de 4050 mm y humedad relativa promedio del 75%⁵⁷.

5.2 PERIODO DE ESTUDIO.

La investigación se realizó, durante un periodo de cinco meses, tiempo durante el cual se efectuaron los ensayos de reproducción inducida de ejemplares de Yamú (*Brycon amazonicus*), de los cuales se obtuvieron embriones producto de la seminación de los oocitos con semen fresco y semen crioconservado.

5.3 INSTALACIONES Y EQUIPOS.

La investigación se desarrolló en el laboratorio de reproducción y en el laboratorio de crioconservación de semen de la Universidad de los Llanos

5.3.1 Material biológico. El material de estudio fueron los oocitos fertilizados con semen fresco y crioconservado y los embriones en desarrollo de Yamú (*Brycon amazonicus*) que provienen de las reproducciones inducidas.

Los reproductores machos y hembras de Yamú (*Brycon amazonicus*) provenían de los estanques de tierra de la estación piscícola IALL-UNILLANOS, donde se mantenían con una densidad de 170 g de peso corporal / m² y con recambio diario de agua del 5%, los animales eran alimentados una vez al día, seis veces por semana, a razón del 1.5% del peso vivo, con alimento peletizado de 25% de proteína bruta.

⁵⁷ Op. cit., p. 19.

5.3.2 Materiales e insumos. En la investigación se utilizaron elementos como.

- Nasa de 5cm * 10cm, con ojo de malla de 2.5 μ m.
- Baldes de 10 litros.
- Estereoscopio de microfotografía marca Nylon SMZ-V zoom 1.10.
- Cámara fotográfica, marca Nikon NY USA.
- Balanza analítica.
- Balanza gramera.
- Kit para análisis de agua marca HACH.
- Ictiómetro.
- Beaker de 25, 50, 100ml.
- Lupa.
- Microscopio óptico (Zeiss Axiostar).

5.4 PROCEDIMIENTO

El proceso inició con la selección de los ejemplares para inducir a la reproducción continuando con la observación del desarrollo embrionario de los productos obtenidos.

5.4.1 Selección de reproductores de Yamú. Inicialmente se realizó una preselección en los estanques de la estación, donde estaban los animales adaptados a cautiverio.

A los reproductores se les preseleccionó según las características morfológicas externas de maduración gonadal descritas por Woynarovich⁵⁸, detectando en los machos presencia de líquido seminal en la papila urogenital después de una leve presión cráneo-caudal del abdomen y en las hembras por el enrojecimiento de la papila urogenital y flacidez abdominal.

Los peces preseleccionados, se trasladaron al Laboratorio de Reproducción donde se depositaron en piletas circulares de concreto de 3,0 metros de diámetro.

⁵⁸Op. cit., p. 220.

Posteriormente las hembras escogidas se seleccionaron mediante porcentualización del estado de migración de la vesícula germinativa de muestras de ovocitos intraováricos obtenidos por biopsia ovárica, como lo sugiere Vazzoler⁵⁹ y Rodríguez⁶⁰. El diámetro ovocitario fue medido en μ bajo el micrómetro calibrado con la cámara de Neubauer según Kuo et al⁶¹, luego se sumergieron en líquido aclarador serra (60% de alcohol absoluto, 30% de formol y 10% de ácido acético glacial) como lo indica Billard⁶², para clasificar de acuerdo a la posición del núcleo de los ovocitos (centrales, migrando, periféricos y atrésicos).

5.4.2 Reproducción Inducida. Los animales seleccionados se trasladaron a piletas circulares de cemento, donde permanecieron durante 24 horas a fin de habituarlos a las condiciones experimentales y reducir la intensidad del estrés generado por la manipulación y cambio de ambiente. Los animales se identificaron individualmente mediante códigos de colores, instalados en la aleta dorsal y caudal hembra y macho respectivamente y se registró su longitud en centímetros y su peso en Kilogramos.

Las hembras de Yamú (*Brycon amazonicus*) se indujeron hormonalmente para lograr la maduración final de las gónadas con extracto de hipófisis de carpa (EHC) vía intramuscular a dosis de 5.75 mg.kg^{-1} de peso corporal distribuidas en tres dosis, la primera de 0.25 mg.kg^{-1} fue aplicada a las cero horas, la segunda dosis 0.5 mg.kg^{-1} a las 24 horas de la primera dosis, 5 mg.kg^{-1} la tercera y última dosis se aplicó 12 horas después de la segunda dosis. A los machos de los que se obtuvo el semen fresco, se suministró una única dosis de $4.0 \text{ mg} * \text{kg}^{-1}$ (EHC) para estimular la espermiación, aplicada simultáneamente con la segunda dosis de la hembra como lo reportan Cruz et al⁶³.

5.4.3 Obtención de los gametos. Después de 6 horas de la última aplicación, una vez verificada la ovulación, los animales fueron tranquilizados y manipulados en una solución de 2-fenoxietanol (300 ppm es decir 0.3 mL de anestésico por litro de agua) por 3-5 minutos hasta que pierden el eje de nado. A los reproductores en estado de aletargamiento se los secó y limpió en vientre y aletas para evitar el contacto con el agua y la activación de los gametos. La extracción se hizo por medio de una leve presión abdominal en sentido cráneo caudal, estos fueron depositados en utensilios plásticos, y pesados, para saber el peso de huevos obtenidos y se determinó el número de huevos por gramo, con muestras

⁵⁹Op. Cit., p. 78.

⁶⁰Op. Cit., p. 97

⁶¹ KUO, C. NASH, C. E. y SHEHADEH, Z. H. A procedural guide to induce spawning in grey mullet (*Mugil cephalus* L.). Aquaculture. Vol. 3 (1974). P. 10.

⁶² BILLARD, R. La gametogenese, le cycle sexuel et el contrôle dela reproduction chez les poissons téléostéens. Bull. Fr. Pisc. No. 273 (1979). P. 120.

⁶³ Op. cit., p. 529.

conservados en formol que se contaron después de terminada la reproducción (Figura 2).

Figura 2. Desove de una hembra inducida de Yamú (*Brycon amazonicus*)



Fuente esta investigación

El semen fue colectado en tubos de vidrio aforados estériles, posteriormente fue evaluado determinando volumen seminal (mL arrojado por el ejemplar), color (blanco o marfil), movimiento masal o movilidad masal (activando 20 μ L de semen con 180 μ L de bicarbonato de sodio al 1,0 %, el porcentaje debe ser igual o superior a 80%), tiempo de activación espermática se mide por medio de un cronometro digital, registrando el tiempo en segundos inmediatamente después de la activación hasta el cese de movimientos y espermatozoides en donde un capilar de 75mm de longitud y 1.1mm de diámetro interno, se llena con semen fresco y se sella un extremo con plastilina, se centrifuga a 12000 rpm durante 5 minutos (se mide la altura del paquete celular (zona blanca) y se calcula y expresa la proporción en porcentaje con relación a la columna total (espermatozoides + plasma seminal) Según lo establecido por Cruz et al⁶⁴ (Figuras 3).

⁶⁴ Op. cit., p. 147

Figura 3. Equipos para determinación de espermatozoides



5.4.4 Congelación y descongelación de semen. Para la congelación, el semen es en primera instancia diluido en una solución a base de yema de huevo de gallina (12%), glucosa (5.5%) y dimetilsulfoxido DMSO (10%) en 100 ml de agua bidestilada, el cual mostró ser eficiente para la especie. La relación semen: diluyente es de 1:4, empaquetado en pajillas de 4.0 mL selladas con polivinilo y algodón o con esferas de acero inoxidable. Se procede al congelar ubicándolos en un soporte de PVC y aluminio introduciéndolos en un termo seco de vapores de nitrógeno líquido (Taylor- Wharton, Cp 100) en el cual hay congelación rápida (en 30 minutos alcanza temperatura de -196°C), luego se trasladan a un termo de almacenamiento (Taylor – Wharton HC35) donde permanecen en nitrógeno líquido durante tiempo indefinido⁶⁵.

La descongelación es por inmersión directa en baño de agua a 35°C (baño maría) durante 90 segundos, este sistema ofrece una descongelación rápida evitando

⁶⁵ Op. cit., p. 529.

procesos de recristalización celular (Figura 4). Luego se abre la pajilla en un extremo y se vierte el semen en un tubo de vidrio estéril. El procedimiento de evaluación del semen descongelado es igual al de semen fresco (descrito anteriormente).

Figura 4. Proceso de descongelación de semen crioconservado



Fuente esta investigación

5.4.5 Fertilización e incubación. Según lo descrito por Cruz y Pardo et al⁶⁶, los gametos maduros obtenidos por estrujamiento provenientes de una misma hembra fueron divididos en dos baches, los cuales se fertilizaron con semen fresco y crioconservado, manteniendo una proporción aproximada de 50.000 y 75.000 espermatozoides por oocito, respectivamente (Figura 5).

Figura 5. Fertilización de ovocitos de Yamú con semen crioconservado



Fuente esta investigación

En ambos casos la activación se realizó con bicarbonato de sodio al 1% y posteriormente los oocitos fueron lavados mínimo 5 veces con agua proveniente del sistema de incubación para retirar el exceso de fluido seminal y otras impurezas permitiendo la activación e hidratación de los gametos, los oocitos fertilizados se dejaron en reposo aproximadamente 20 ó 30 minutos. Posteriormente, se depositaron en incubadoras cónicas de flujo ascendente tipo Woynarovich con una capacidad de 200 litros y un flujo continuo de agua de 6 litros/minuto e incubadoras experimentales de 1.5 litros de capacidad (Figura 6).

⁶⁶ Ibid., p. 533.

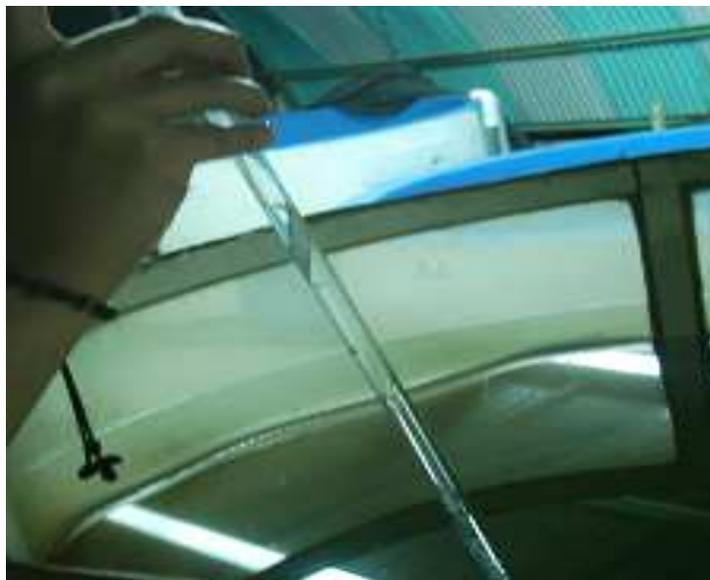
Figura 6. Incubadoras tipo experimental



Fuente esta investigación

5.4.6 Evaluación de fertilidad. Los huevos fertilizados fueron evaluados a las 6 horas postfertilización (hpf), para determinar el porcentaje de fertilidad se realizó un sondeo al azar, por triplicado, de aproximadamente 100 ovocitos y se cuantificó la proporción de ovocitos viables y huevos no fertilizados (Figura 7).

Figura 7. Evaluación de porcentaje de fertilidad por el método de pipeta



5.4.7 Evaluación del diámetro ovocitario. Se midió los diámetros de los ovocitos sin fertilizar, ovocitos fertilizados a los 20 minutos posfertilización (mpf) con semen fresco y con semen crioconservado, que fueron depositados en suero fisiológico y posteriormente se midió su diámetro en micras (μm) en el estereoscopio que estaba previamente calibrado mediante el uso de cámara de Neubauer.

5.4.8 Evaluación de embriones de Yamú con alteraciones morfológicas y embriones normales. La cuantificación y evaluación de los embriones normales y anormales se tomaron muestras al azar de aproximadamente 100 embriones por cada hora de post-fertilización y se llevó a cabo una observación de los embriones desarrollados normalmente y embriones con alteraciones morfológicas.

5.4.9 Evaluación del desarrollo embrionario. La descripción de los estadios de desarrollo y la evaluación del desarrollo embrionario de Yamú (*Brycon amazonicus*) se recolectaron muestras al azar de 100 ovocitos en desarrollo por tratamiento cada hora a partir de la hora cero (al momento de la activación) hasta el momento en el cual el 90% de la muestra de embriones habían eclosionado, siguiendo a Johnston et al⁶⁷

⁶⁷ JOHNSTON, I.A.; VERA, L.A.; VIEIRA, L. y ABERCROMBY, M. Temperature and myogenesis in embryos of the atlantic herring *Clupea harengus*. In: The journal of Experimental Biology.v.198, 1995. p. 1389.

Se registró los principales cambios de desarrollo morfológico del embrión de Yamú (*Brycon amazonicus*), las etapas de su desarrollo y el tiempo que tardó este hasta su eclosión, al mismo tiempo se detectó las anomalías que pudieron afectar la viabilidad de los embriones, para el registro de este proceso se tomó fotografías y registros videográficos por medio de una cámara digital (Nikon NY USA) acoplada a un microscopio óptico (Zeiss Axiostar), con el objetivo de realizar una descripción de los eventos en vivo.

5.4.10 Evaluación de la eclosión de embriones de Yamú (*Brycon amazonicus*). A las 12 horas postfertilización se evaluó al azar, por triplicado aproximadamente 100 embriones de los dos tratamientos y se cuantificó el porcentaje de eclosión para cada uno.

5.4.11 Evaluación de semen congelado. El semen diluido en una solución a base de yema de huevo de gallina (12%), glucosa (5.5%) y dimetilsulfoxido DMSO (10%) en 100ml de agua bidestilada, el cual mostró ser eficiente para la especie, fue contenido en pajillas las cuales se descongelaron para verificar la movilidad masal (calculado en porcentaje respecto a la columna total espermatozoides + plasma seminal), concentración y tiempo de activación de los espermatozoides (registrado en segundos).

5.4.12 Evaluación de semen fresco. Inmediatamente después de obtener el semen por estrujamiento mediante masaje abdominal en los machos, se depositó el fluido seminal en tubos de ensayo aforados, se tomó una muestra para comprobar la movilidad espermática, espermatozoides y tiempo de activación.

5.5 TRATAMIENTOS.

Se evaluaron dos tratamientos consistentes en:

T1: Embriones obtenidos de la reproducción inducida de Yamú, fertilizados con semen fresco.

T2: Embriones obtenidos de la reproducción inducida de Yamú, fertilizados con semen crioconservado.

5.6 DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó un diseño completamente al azar, constituido por dos tratamientos, con cuatro réplicas por tratamiento, para el análisis de los resultados se realizó inicialmente una descripción estadística de los datos y posteriormente se compararon las variables observadas entre los dos tratamientos a través de pruebas de comparación específicas, prueba de z y prueba de t, de student, la

primera para las variables paramétricas y la segunda para no paramétricas. En todos los casos $p < 0,05$ demostrará diferencias estadísticas significativas.

Cada unidad experimental, estuvieron constituidos por un promedio de 1560 huevos ± 2 que correspondían en peso a 1,0 g, distribuidos aleatoriamente con el fin de disminuir las fuentes de variación.

5.7 FORMULACIÓN DE HIPÓTESIS

Las hipótesis propuestas en la investigación fueron:

$H_0: \mu_1 = \mu_2.$

Los embriones obtenidos de la reproducción con semen congelado de Yamú (*Brycon amazonicus*) no difieren en su desarrollo y viabilidad respecto a los embriones obtenidos de la reproducción con semen fresco y la proporción de malformaciones no es significativa entre los dos tipos de semen.

$H_1: \mu_1 \neq \mu_2.$

Los embriones obtenidos de la reproducción con semen congelado de Yamú (*Brycon amazonicus*) difieren en su desarrollo y viabilidad respecto a los embriones obtenidos de la reproducción con semen fresco y la proporción de malformaciones es significativa entre los dos tipos de semen.

5.8 VARIABLES EVALUADAS.

Las variables a evaluar en la investigación se describen enseguida.

- **Diámetro de ovocitos.** Se midió en micras (μ) bajo un estereoscopio calibrado mediante el uso de la cámara de Neubauer.
- **Porcentaje de Fertilidad.** El porcentaje de fertilidad se midió a las 6 horas post-fertilización (hpf), cuando ocurre el cierre del blastoporo, con una muestra triplicada de 100 ovocitos por cada tratamiento, contando los fértiles y no fértiles.
- **Desarrollo embrionario.** Para describir el desarrollo embrionario se tomó muestras desde la hora cero, luego a los 20 mpf (minutos pos-fertilización), 40mpf, 1hpf (hora pos-fertilización) y de ahí en adelante cada hora hasta el momento de la eclosión de al menos un 80 % de los embriones.
- **Alteraciones morfológicas.** En esta variable se observó cada hora los embriones cuyo desarrollo no fuese normal, cuantificándolos mediante el

uso de estereoscopio en embriones viables y embriones con alteraciones morfológicas macroscópicas.

- **Tiempo y porcentaje de eclosión.** El porcentaje de eclosión se evaluó con una muestra triplicada de 100 embriones de cada tratamiento; el tiempo de eclosión se contabilizó desde la fertilización hasta el momento en que los embriones que presentaban movimiento caudal, rompieron el corion.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para obtener embriones de Yamú (*Brycon amazonicus*) se indujeron hembras con condición sexual como se muestra en la Tabla 1 y machos cuyas características se describen en la Tabla 2.

Tabla 1. Características reproductivas de hembras de Yamú (*B. amazonicus*)

Réplica	Hembra		Dosis inducción EHC	Migración (%)	Horas/grado	Fecundidad reproductiva aparente
	Peso	Longitud				
1	1800	50,6	5,75 mg/Kg	67	168,64	272.304,0
2	2300	52,3	5,75 mg/Kg	72	165,6	309.702,8
3	2200	55,0	5,75 mg/Kg	65	178,75	304.457,2
4	2500	51,0	5,75 mg/Kg	65	168	311.491,8
Promedio	2200	52,23		67,25	170,25	299.488,95
Desviación	294,39	1,99		3,30	5,82	18.367,51

Se utilizó una sola hembra por réplica para los dos tratamientos

La condición de las hembras como peso fue de $2.200 \pm 294,39$, migración del núcleo $67,25 \pm 3,30$ %, latencia $170,25 \pm 5,82$ horas-grado (a temperatura de $27 \pm 1,0$ °C) y fecundidad reproductiva aparente de $299.488,95 \pm 18.367,51$, lo que demuestra que fueron hembras maduras, aptas para reproducción inducida con EHC (5.75 mg/kg de peso vivo) Anexo A.

Según lo reportado por Cruz et al⁶⁸, a temperatura de $26 \pm 1,0$ °C el desove ocurre entre 6,0-7,5 horas es decir, 156-195 horas –grado, rangos de tiempo en los que se encuentra esta investigación.

⁶⁸ CRUZ CASALLAS, P. E; VELASCO SANTAMARÍA, Y. M. y ARIAS CASTELLANOS, J. A. Crioconservación de semen de peces tropicales. Curso taller II congreso colombiano de acuicultura X jornada de acuicultura IALL. Villavicencio Meta Colombia, octubre 2004. p. 5. 46p

Tabla 2. Características reproductivas de machos de Yamú (*B. amazonicus*)

Réplica	Peso (g)	Longitud (cm)	Volumen (ml)	Espermatocrito		Movilidad	
				SF	SC	SF	SC
1	1750	50	8	11	12	80	80
2	1800	49,4	9,8	12,8	12,3	90	80
3	1500	46	8,5	16,2	11,8	80	80
4	1500	48	5	11,3	12,6	80	80
Promedio	1.637,5	48,35	7,83	12,83	12,18	82,50	80
Desviación	160,08	1,78	2,0	2,38	0,35	5,0	0.0

SF: semen fresco; SC: semen crioconservado

Para evaluar la condición seminal en los dos tratamientos (Anexo B) se realizó un análisis estadístico, efectuando para espermatocrito (T1 12.83 ± 2.38 , T2 $12,18 \pm 0,35$) una prueba de f para varianzas de dos muestras arrojando varianzas diferentes, posteriormente se realizó prueba de t para varianzas desiguales lo que demostró que no hubo diferencias estadísticas entre las varianzas de los dos tratamientos, lo cual indica que para desarrollar la investigación, las condiciones de semen fresco y semen crioconservado fueron iguales (Anexo C).

En este orden de ideas, las condiciones seminales de esta investigación son similares a lo reportado por Cruz et al⁶⁹, espermatocrito de $13.8 \pm 0,7$ %, en otro trabajo Cruz et al⁷⁰, reporta que el Yamú en condiciones de cautiverio arroja un volumen de semen 1.8 ± 1.2 mL, la concentración $13.9 \pm 4.0 \cdot 10^9$ espermatozoides por mL⁻¹, espermatocrito $41.5 \pm 10.8\%$, movilidad masal espermática $88 \pm 9\%$, tiempo de activación 41 ± 7 seg.

⁶⁹ CRUZ CASALLAS, P.E; VELASCO SANTAMARÍA, Y.M. Caracterización Seminal de la proporción espermatozoides: oocito en Yamú (*Brycon siebenthalae*) En: Crioconservación de semen de peces tropicales. Curso taller II Congreso Colombiano de Acuicultura X Jornada de Acuicultura IALL. Villavicencio Meta Colombia, Octubre 2004.p.14. 46p

⁷⁰ Op. cit, p. 1-5

Tabla 3. Parámetros (pH y T) de incubación

Tratamiento	T1		T2	
	Réplicas	pH	Temperatura	pH
R1	6,38	26,8	6,34	27,05
R2	6,45	28,99	6,38	29
R3	6,28	28,64	6,18	28,54
R4	6,11	27,3	6,21	27,32
Promedio	6.31±0.15	27.93±1.05	6.28±0.10	27.98±0.94

(Anexo D)

Al realizar el análisis estadístico para pH y temperatura, la prueba de f indicó que no había diferencias entre varianzas y al realizar prueba de t para varianzas iguales, demostró que no hubo diferencias estadísticas en las condiciones del agua para los dos tratamientos (Anexo E).

Clavijo⁷¹ reporta que para el desarrollo embrionario de Yamú *B. Amazonicus* la temperatura de incubación es de $27.5 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ y pH 6.5 ± 0.3 .

6.1 DIÁMETRO PRE-POS FERTILIZACIÓN

Al hacer la comparación del diámetro ovocitario pre-fertilización ($1243,63 \pm 70,6\mu$) y pos-fertilización con semen fresco (T1: $3411,00 \pm 186,1 \mu$) la prueba de f (Anexo F) muestra que las varianzas son desiguales, enseguida se realizó la prueba de t para este tipo de varianzas lo que arrojó diferencias altamente significativas, al comparar diámetro de los ovocitos antes y después de la fertilización con semen congelado (T2: $3319,88 \pm 151.4$), (prueba de f y de t), también demuestran diferencias altamente significativas, estos resultados indican que hubo hidratación de los oocitos después de la fertilización con cada uno de los tratamientos.

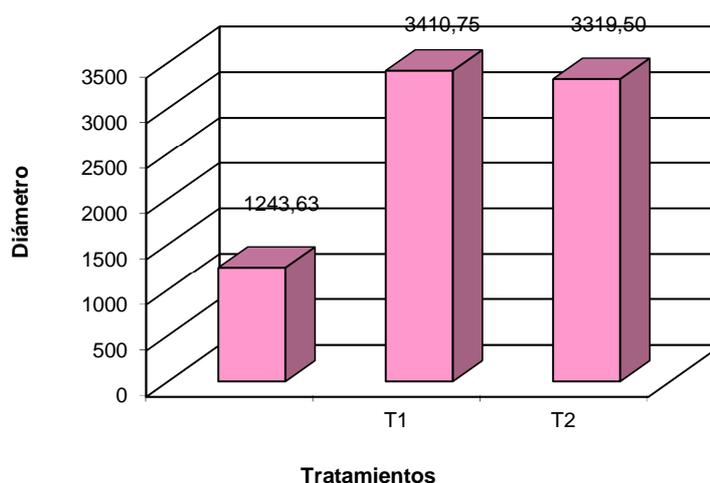
⁷¹ CLAVIJO AYALA John Alejandro y ARIAS CASTELLANOS José Alfredo. Avances en el estudio de la embriología del Yamu *Brycon siebenthalae* (pises:characidae). Universidad de los Llanos, Instituto de Acuicultura (IALL), Villavicencio Colombia. Dalia. Revista de la Asociación Colombiana de Ictiología 2004. Número 7 pág 37-48

Al realizar el análisis estadístico entre los dos tratamientos (prueba de f y de t), (Anexo G) los resultados arrojan diferencias altamente significativas siendo los oocitos del T1 (semen fresco, $3411,00 \pm 186,1 \mu$) los que alcanzaron mayor diámetro, indicando mayor hidratación y por consiguiente mayor espacio previtelino el cual proporciona mejor protección al embrión en su desarrollo.

Tabla 4. Datos de diámetro pre-fertilización y pos-fertilización con semen fresco y semen crioconservado

Tratamiento Réplicas	Ovocitos sin fertilizar	Ovocitos fertilizados con Semen fresco	Ovocitos fertilizados con Semen congelado
R1	1252,0 ± 65,9	3434,2 ± 147,8	3345,9 ± 142,5
R2	1239,7 ± 84,4	3435,3 ± 203,8	3327,9 ± 152,5
R3	1245,5 ± 57,5	3459,0 ± 173,1	3319,5 ± 138,5
R4	1237,5 ± 72,5	3314,5 ± 184,8	3285,0 ± 169,1
Promedio	1243,63 ± 70,6	3411,00 ± 186,1	3319,88 ± 151,4

Figura 8. Diámetro ovocitario antes y después de la fertilización con semen fresco y crioconservado.



Clavijo⁷² asegura que la hidratación del espacio perivitelino es progresiva, alcanzando los 3000 µm de diámetro a los 20 mpf. Al comparar con los resultados de esta investigación se puede notar que en ambos tratamientos se supera los datos de este reporte alcanzando diámetros de 3410,75 µm para el T1 y 3319, 50 µm para el T2.

6.2 PORCENTAJE DE FERTILIDAD

Esta variable fue estimada seis horas post fertilización, cuando ocurre el cierre del blastoporo, momento en el cual la influencia de los gametos paternos se manifiestan, originando la organogénesis⁷³. (Anexo H) El resumen de los datos se muestran en la Tabla 5.

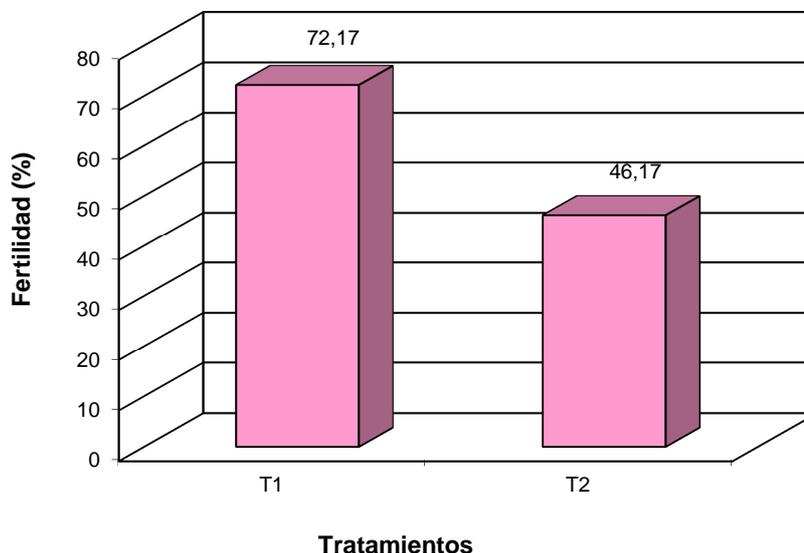
Tabla 5. Consolidado de fertilidad (en porcentaje), de cada tratamiento por réplicas

Tratamiento	Fertilidad Semen fresco	Fertilidad Semen crioconsevado
Réplicas		
1	63,00 ± 3,74	40,67 ± 2,94
2	79,33 ± 3,14	49,67 ± 4,18
3	87,83 ± 3,19	57,33 ± 3,78
4	58,50 ± 4,04	37,00 ± 4,00
Promedio	72,17 ± 12,61	46,17 ± 8,82

⁷² Op. cit., p. 40

⁷³ PAZ ROSERO, Wilson Orlando. Evaluación del desarrollo embrionario del bagre del patia rhamdia quelen (Quoy y Gaimard, 1824) a diferentes rangos de temperatura del agua de incubación. Tesis de grado Ingeniería en Producción Acuicola, Facultad de Ciencias Pecuarias, Universidad de Nariño. Pasto Colombia. 2005. p. 86 (107p.)

Figura 9. Comparación del Porcentaje de fertilidad por tratamientos.



En esta investigación el análisis estadístico (prueba de Brand Snedecor) demostró que existen diferencias altamente significativas entre las medias de los tratamientos presentando mejor porcentaje de fertilidad el T1 (semén fresco) con $72,17 \pm 12,61\%$ sobrepasando en casi 26% al T2 (semén crioconservado) con $46,17 \pm 8,82\%$. (Anexo I).

Los resultados obtenidos en esta investigación con semén fresco son superiores a los obtenidos por Arias et al.,⁷⁴ quien reporta un porcentaje de fertilidad en embriones de Yamú de $55.3 \pm 6.1\%$, sin embargo los resultados con semén crioconservado son inferiores a los datos obtenidos por este autor. Cruz et al.⁷⁵, asegura en esta especie una tasa de fertilización del $84 \pm 8\%$. Otros autores como Bolaños et al.⁷⁶, evaluaron semén fresco y crioconservado obteniendo fertilidades de 64.7 con fresco, 50% (propilenglicol 3.75%) y 43.8% semén congelado con metanol (3.75%) resultados que están de acuerdo a lo obtenido en este reporte.

⁷⁴ ARIAS CASTELLANOS, José Alfredo, PARDO CARRASCO, Sandra Clemencia, ATENCIO GARCIA, Victor, VASQUEZ TORRES, Walter, ZANIBONI FHILO, Evoy. Escala de maduración gonadal, reproducción inducida y alevinaje del Yamú (*Brycon siebenthalae* (PICES: CHARACIDAE). Universidad de los Llanos, Instituto de Acuicultura IALL, Colciencias. Villavicencio, Meta 2002. p. 5

⁷⁵ Op. cit., p. 1-5

⁷⁶ BOLAÑOS LOPEZ Paola Milena, ROMERO ORTIZ Orlando, CRUZ CASALLAS, Pablo Emilio. Evaluación del uso de propilenglicol, etilenglicol, metanol y dimetilsulfoxido (DMSO) para la crioconservación de semén de yamu (*Brycon siebenthalae*). En: crioconservación de semén de peces tropicales. Curso taller II Congreso Colombiano de acuicultura X jornada de acuicultura IALL. Villavicencio Meta Colombia, octubre 2004.p.14. 46p

6.3 PORCENTAJE Y TIEMPO DE ECLOSIÓN

El porcentaje de eclosión en esta investigación se lo tomó a temperatura de $27,93 \pm 1,05$ °C (Anexo J). La prueba de Brand snedecor para el análisis estadístico arrojó diferencias altamente significativas entre los tratamientos siendo el T1 con $60,21 \pm 19,12\%$ el que presentó mejor porcentaje de eclosión, superando en casi 20% al T2 cuyo resultado fue de $42,08 \pm 12,50\%$, sin embargo el tiempo de eclosión fue de $13,5 \pm 1,0\%$ (376,74 \pm 25,65 horas-grado) para el T1 y $13,25 \pm 0,96\%$ (370,65 \pm 29,12 horas-grado) para el T2, al realizar la prueba de f arrojó varianzas semejantes, y la prueba de t reveló que no existieron diferencias estadísticas significativas en los tiempos de eclosión (Anexo K).

En la Tabla 6 se presenta un consolidado de los datos obtenidos del porcentaje de eclosión.

Tabla 6. Consolidado de eclosión (en porcentaje), de cada tratamiento por réplicas

Tratamiento	Eclosión Semen fresco	Eclosión Semen crioconservado
Réplicas		
1	59,33 \pm 3,01	39,50 \pm 2,88
2	72,17 \pm 4,67	47,83 \pm 3,76
3	78,67 \pm 3,27	56,67 \pm 1,63
4	30,67 \pm 3,50	24,33 \pm 3,50
Promedio	60,21 \pm 19,12	42,08 \pm 12,50

Cruz et al⁷⁷ menciona que a temperatura de 26 - 27 °C la eclosión se produce a las 12 horas aproximadamente (de incubación) $325 \pm 15,0$ horas – grado. A temperatura de 30°C el tiempo baja a 10horas. Obteniéndose índices de hasta 90 % bajo estas condiciones, en la Tabla 7 se muestra el resumen de tiempo de eclosión.

⁷⁷ Op. cit., p.5.

Tabla 7. Tiempo de eclosión en horas y horas-grado, de cada tratamiento por réplicas

Tratamiento	Semen fresco		Semen crioconservado	
	Réplicas	horas	Horas-grado	horas
1	14	375,20	13	351,65
2	14	405,86	14	406,00
3	12	343,68	12	342,48
4	14	382,20	14	382,48
Promedio	13,5 ± 1	376,74 ±25.65	13,25 ±0,96	370,65 ± 29,12

Arias et al.,⁷⁸ reporta sobrevivencia embrionaria de $51 \pm 5.8\%$ en un tiempo de eclosión de 12 horas pos-fertilización, inferior a los resultados obtenidos en este trabajo con semen fresco $60,21 \pm 19,12\%$ pero superior al tratamiento con semen crioconservado $42,08 \pm 12,50\%$.

6.4 DESARROLLO EMBRIONARIO YAMÚ (*Brycon amazonicus*)

Los oocitos maduros de *Brycon amazonicus* son esféricos, la coloración de la masa vitelina está entre verde y azul, el corion presenta superficie lisa transparente y no presentan capa gelatinosa envolvente por lo que no son adherentes, igual a lo reportado por Clavijo⁷⁹ en esta misma especie. Diferiendo de los oocitos de *Rhamdia hilarii* y *R. quelen* que, según Godinho⁸⁰ y Paz⁸¹ presentan una capa gelatinosa envolvente.

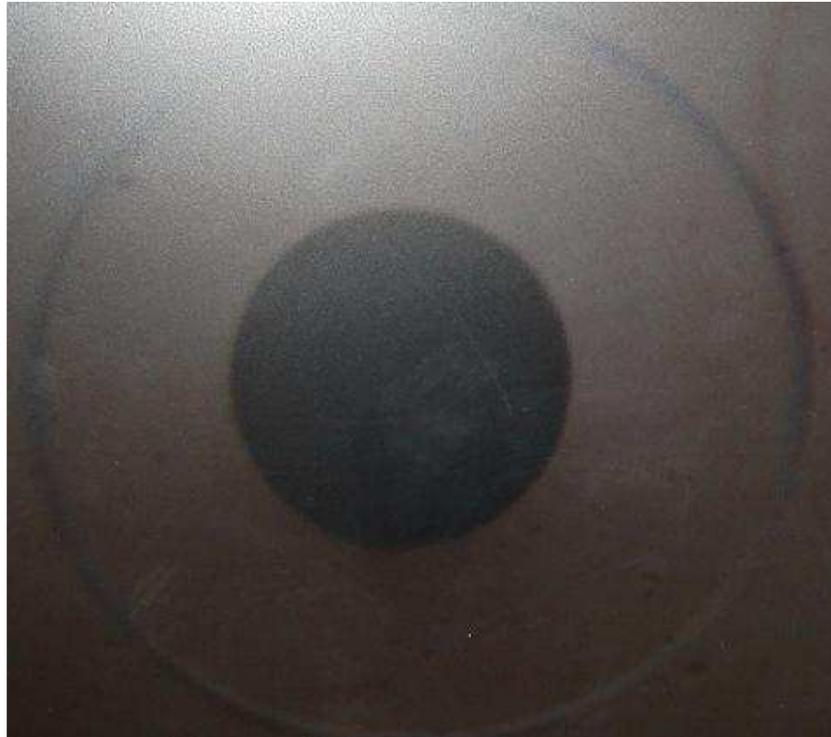
⁷⁸ ARIAS CASTELLANOS, José Alfredo, PARDO CARRASCO, Sandra Clemencia, ATENCIO GARCIA, Victor, VASQUEZ TORRES, Walter, ZANIBONI FHILO, Evoy. Escala de maduración gonadal, reproducción inducida y alevinaje del Yamú (*Brycon siebenthalae* (PICES: CHARACIDAE). Universidad de los Llanos, Instituto de Acuicultura IALL, Colciencias. Villavicencio, Meta 2002. p. 5

⁷⁹ Op. cit., p.42.

⁸⁰ GODINHO, HELOISA; FENERICH NELSY Y NARAHARA MASSUKA. Desenvolvimento embrionario e larval de *Rhamdia hilarii* (Valenciennes, 1840) (Siluriformes, pimelodidae). En revista brasil Biol..., 38(1):151-156. fevereiro, 1978- rio de janeiro, rj.

⁸¹ Op. cit., p. 85

Figura 10. Oocito maduro de *Brycon amazonicus*.



El desarrollo embrionario se describe a continuación por fases.

FASE: CLIVAJE

ESTADIO 1: Ovocélula.

El desarrollo embrionario fue similar para los dos tratamientos; en los primeros 5 mpf (minutos pst- fertilización), se distingue claramente un aumento en el diámetro ovocitario, producto de la elevación del corion y la hidratación progresiva del espacio previtelínico, inicia la diferenciación del polo animal (concentración de citoplasma) y el polo vegetal (vitelo). En *Rhamdia hilarii* según lo reportado por Godinho et al⁸², después de 15 mpf, se observa el polo animal y comienza la formación del blastodisco sobre el periblasto en el espacio previtelínico contenido

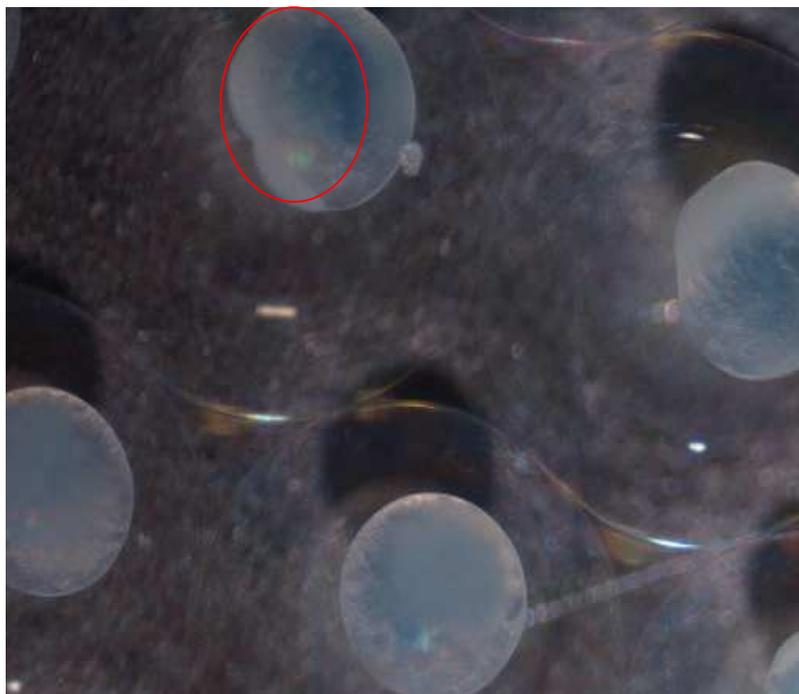
⁸² GODINHO, HELOISA; FENERICH NELSY Y NARAHARA MASSUKA. Desenvolvimento embrionario e larval de *Rhamdia hilarii* (Valenciennes, 1840) (Siluriformes, pimelodidae). En revista brasil Biol..., 38(1):151-156. fevereiro, 1978- rio de janeiro, rj.

por el corion; en el pez zebra, este proceso ocurre en los primeros 10 mpf (Kimmel, et al.⁸³)

FASE: CLIVAJE

ESTADIO 2: Clivajes.

Figura 11. Primer clivaje, división del blastodisco en dos blastómeros.



En la fase de clivajes, el polo animal se subdivide formando un blastodisco segmentado adosado al vitelo insegmentado, el primer clivaje se presenta entre los primeros 15 a 20 mpf como una división del blastodisco en la que se forman 2 blastómeros de igual tamaño (Figura 11), igual a lo reportado por Clavijo⁸⁴ en esta misma especie. En los siguientes 10 mpf se registra el segundo clivaje generando cuatro células de igual tamaño en ángulo recto.

Entre los 40 a 50 mpf se presenta el tercer clivaje observándose 8 blastómeros, a los 60 mpf se presenta el cuarto clivaje, momento en el que se observan 16 blastómeros, en este punto se dificulta la observación de las demás divisiones e

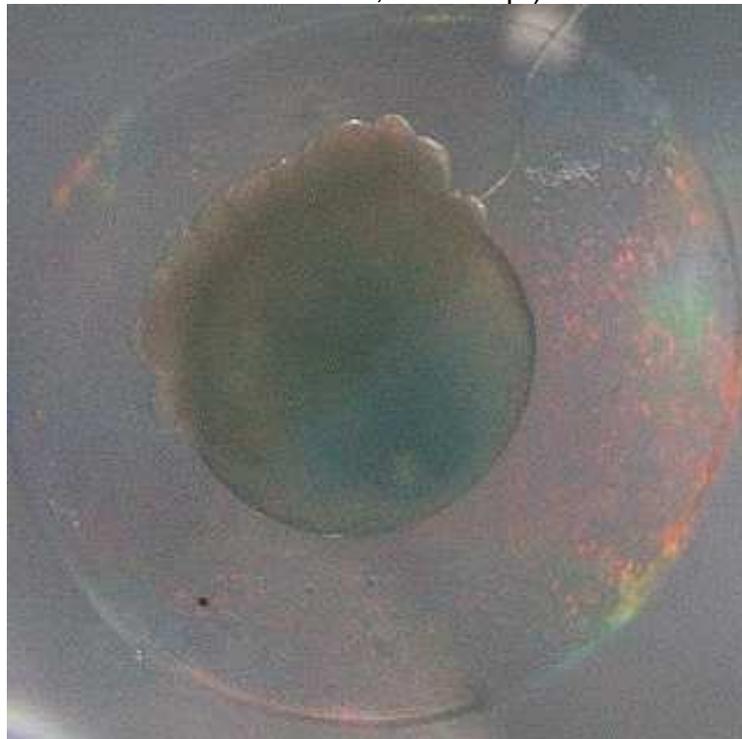
⁸³ Op. cit., p 303.

⁸⁴ Op. cit., p.46.

inicia la discoblástula Figura 12. Los clivajes en este periodo ocurren frecuentemente en orientaciones regulares, según lo reportado por Kimmel, et al.⁸⁵ en el pez cebra la formación de 4 blastómeros (2x2) se da alrededor de 1hpf, los 8 blastómeros (2x4) se observan a 1h 15mpf, y los 16 blastómeros se presentan en la 1h 30mpf.

En *Rhamdia hilarii* las divisiones de 2, 4, 8, 16 blastómeros ocurren en las primeras 2h 30 mpf. El blastodisco se torna multicelular formando una región opaca sobre el vitelo (Godinho et al⁸⁶).

Figura 12. Fase de clivaje (aproximadamente 64 Blastómeros, 1h 30 mpf)



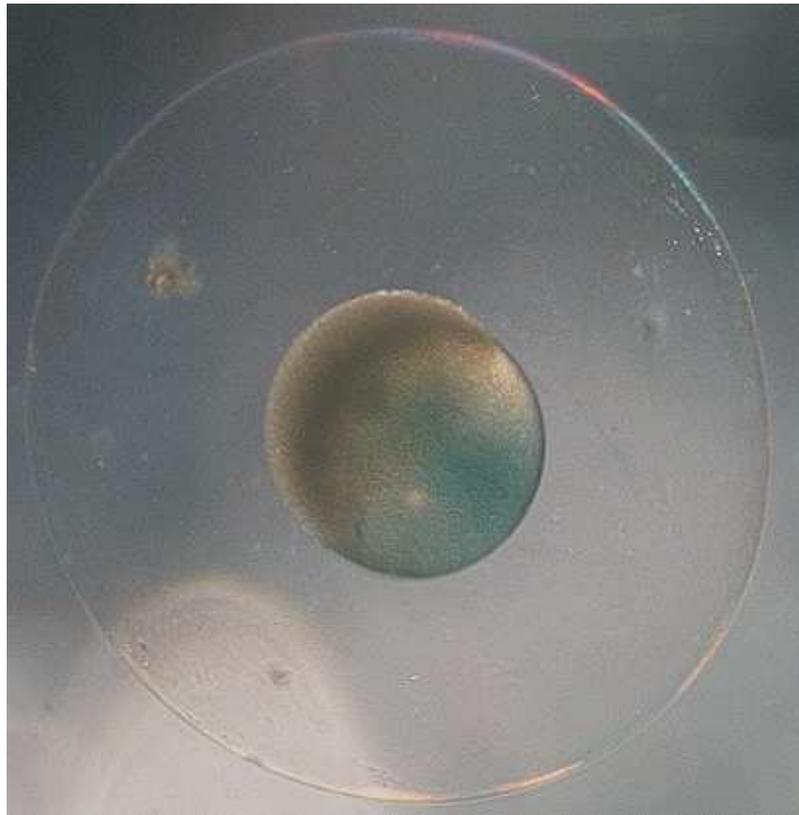
Este estadio se caracteriza por presentar varias capas celulares en el blastodisco en el que se dificulta contar el número de blastómeros 1 hora a 1 hora 30 min

⁸⁵ Op. cit., p 308.

⁸⁶ Op. cit., p 301

ESTADIO 3: Discoblástula

Figura 13. Formación de la discoblástula (3hpf)



En la etapa de discoblástula (2 a 3hpf) en peces, es posible diferenciar dos grupos celulares bien definidas: el blastodermo el cual permitirá la constitución del cuerpo del embrión, y el periblasto o capa sincicial, intermedia entre el blastodermo y la masa vitelina, que participará en el transporte de sustancias. En este punto, ya se han formado cerca de 256 células, se constituye el periblasto y las células de la base del blastodermo se fusionan con el vitelo subyacente. Para Godinho et al⁸⁷, en *Rhamdia hilarii* empieza una intensa proliferación de células, el blastodisco se expande sobre la superficie del vitelo y forma el anillo germinativo que envuelve completamente el vitelo.

⁸⁷ Op. cit., p 309

ESTADIO 4: Gástrula

Figura 14. Migración del blastodermo y el periblasto hacia el polo animal. (4 hpf)



Fuente esta investigación

En este estadio, las células del blastodermo y del periblasto adquieren movimiento y comienzan a migrar hacia el polo vegetal, recubriendo, progresivamente, la masa vitelina. Godinho et al⁸⁸, en *Rhamdia hilarii* observa la fase de gástrula con diferenciación de dos tejidos embrionarios (6hpf), el corion continua rígido y espeso.

Clavijo⁸⁹ reporta a las 5 hpf. gástrula temprana 10% epibolia, la gástrula media 50% epibolia a las 6hpf. La gástrula tardía 90% epibolia a las 6.5 hpf ocurre el cierre del blastoporo, se describe el eje antero-posterior del embrión.

⁸⁸ Op. cit., p 308

⁸⁹ Op. cit., p 110

Figura 15. Inicio de gástrula tardía, 70% epibolia (5h 30mpf)



Figura 16. Gástrula tardía 90% epibolia (6hpf)



EMBRIÓN

ESTADIO 5: Órganogénesis

En este punto del desarrollo embrionario (7hpf) se percibe la diferenciación cráneo-caudal sobre el saco vitelino. Inicia la formación de las vesículas ópticas, la notocorda, se observa la aparición de los primeros somitos mesodérmicos, el embrión y el vitelo asumen una forma elíptica dentro del espacio previtelínico. Como lo reporta Clavijo⁹⁰. Posteriormente se observan vesículas óticas y vesícula de kupffer. Godinho et al⁹¹, en *Rhamdia hilarii* a las 7h 30mpf reporta el inicio de la fase de formación del surco neural, segmentación somática y el comienzo de la diferenciación de cabeza y cola. A las 9hpf, para la misma especie, se diferencian vesículas ópticas y óticas, se observan 14 somitos y se despega la cola del saco vitelino.

Figura 17. Aparece la vesícula óptica y se distinguen 8 somitos



⁹⁰ Op. cit., p 46

⁹¹ Op. cit., p 305.

Según Cussac, et al⁹². en *Rhamdia sapo*, entre las 15 horas 30 minutos y 18 horas empieza la formación de somitos en la región dorsal del embrión, este permanece adosado al saco vitelino. Además entre las 16 a 19 horas se distinguen en el área neural los esbozos de las vesículas ópticas y formación de 5 somitos, la parte caudal aun esta adosada a la masa del vitelo. Entre las 18 a 24 horas la notocorda se observa adosada a la masa del vitelo, los somitos aparecen en la región media del embrión (8-10), la porción anterior del área neural se muestra ensanchada y con un surco longitudinal; el esbozo de las vesículas ópticas esta bien definido.

Figura 18. Embrión a las 8hpf (21 somitos)



La separación de la parte caudal de la porción vitelina, formación de al menos 28 somitos en un tiempo de 9h 30 mpf. Godinho et al⁹³, en *Rhamdia hilarii* 20hpf inician leves movimientos caudales, despegada totalmente la cola del saco vitelino.

⁹² Op. cit., p 30

⁹³ Op. cit., p 307

Figura 19. Embrión desarrollado (10 h 40 mpf)



A las 10h 40mpf se encuentra un embrión mas desarrollado, empiezan las contracciones somíticas, como lo reporta Clavijo⁹⁴. Se observan en las vesículas ópticas, el cristalino y en las óticas dos otolitos, empieza el desprendimiento de la cola del saco vitelino. Godinho et al⁹⁵, en *Rhamdia hilarii* 25hpf movimientos cardiacos, movimiento de todo el embrión. Presencia de otolitos en vesículas óticas y aparece diferenciado el cerebro.

A las 11h 30mpf el embrión de Yamú se halla la presencia de narinas y cavidades encefálicas. Inicia los latidos del corazón y empieza a circular periféricamente la sangre no pigmentada. Empiezan las contracciones caudales, se deteriora el corion.

⁹⁴ Op. cit., p 46

⁹⁵ Op. cit., p 309

ESTADIO 6: Eclosión

Entre las 12h 5mpf y 13 hpf se observa la eclosión de las primeras larvas. El cuerpo aun no posee pigmentación, el tracto digestivo es rudimentario sin abertura anal ni oral. Los ojos no tienen pigmentación, con aleta primigenia bien diferenciada, rodeando la cola. El desarrollo embrionario de híbridos de cachama blanca *Piaractus brachypomus* y hembras de cachama negra *Colossoma macropomun* tarda 12 hpf. Godinho et al⁹⁶, en *Rhamdia hilarii* 27hpf para la eclosión.

Figura 20. Larva de Yamú (*Brycon amazonicus*) recién eclosionada



6.5 ALTERACIONES MORFOLÓGICAS EN EMBRIONES DE YAMÚ

Las malformaciones en las etapas de desarrollo de embriones de Yamú obtenidos con semen fresco y crioconservado (Anexo L), fueron mas frecuentes para el T2, como lo muestra la tabla 8.

⁹⁶ Op. cit., p 309

Tabla 8. Malformaciones de embriones de Yamú obtenidos con semen fresco y crioconservado.

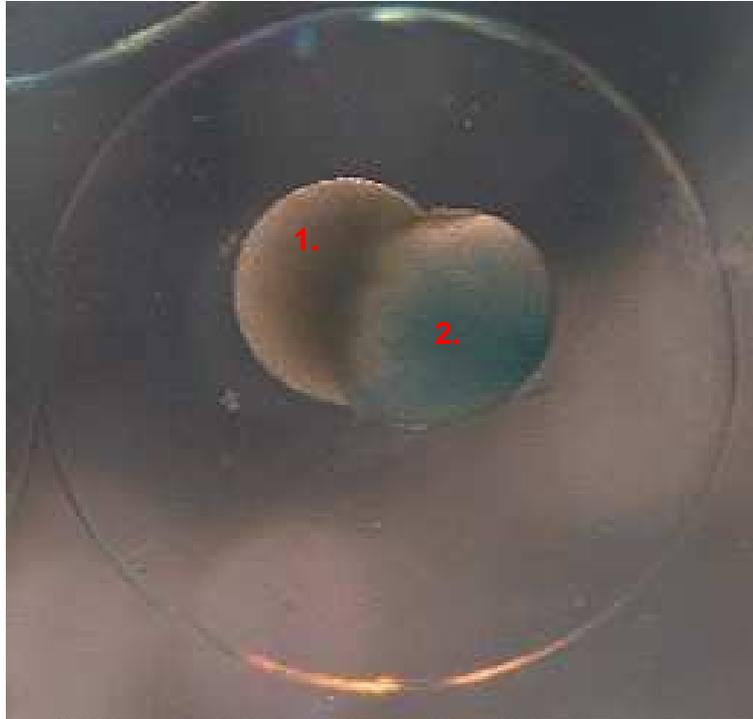
Réplica	Tratamientos	
	T1 Semen fresco	T2 Semen crioconservado
R1	46,07	49,85
R2	47,29	51,64
R3	46,83	49,42
R4	44,07	52,79
Promedio	46,04	51,00
Desviación	6,52	8,24

Al realizar la prueba de Brand Snedecor (Anexo M) los resultados indican que existen diferencias altamente significativas entre los tratamientos, siendo el T2 el que presenta mayor cantidad de malformaciones. Según Medina et al⁹⁷, la mayoría de malformaciones al utilizar semen crioconservado se presentan por las alteraciones de la membrana plasmática que ocurren en el proceso de congelación y descongelación del semen, lo que afecta la viabilidad para fusionarse con la membrana del oocito, de igual manera cuando en este proceso hay alteraciones en la organización mitocondrial estas se reflejan en la disminución del movimiento espermático y en el tiempo de activación que contribuyen a la formación de protuberancias en la membrana, la cabeza y la cola del espermatozoide generando también una alteración en el ADN de los núcleos espermáticos que son inversamente proporcionales a la tasa de fertilidad y se traducen luego en deformaciones del embrión durante todas sus etapas de desarrollo.

Las anomalías más comunes en los embriones fueron malformaciones en el vitelo, cefálicas y desviaciones en la columna y cola durante las diferentes etapas de desarrollo del embrión.

⁹⁷ Op. cit., p. 36.

Figura 21. Embrión de 2h 36 mpf anormal



1. formación irregular del blastodisco. 2. Malformación de vitelo.

Figura 22. Malformación en embrión de 7h 46 mpf (semen crioconservado)

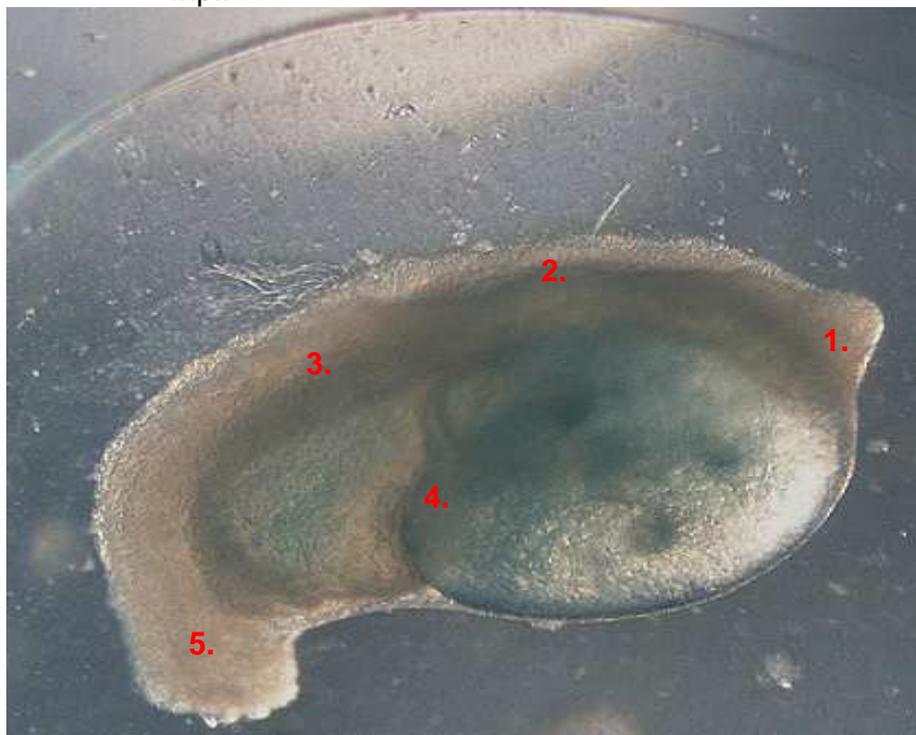


Figura 23. Malformación de un embrión de Yamú obtenido de semen criopreservado.



1. malformación de columna. 2. malformación cefálica. 3. Malformación caudal.

Figura 24. Embrión anormal (semen criopreservado) a las 9h 18 mpf.



1. malformación en cavidad craneal. 2. Malformación de columna. 3. Malformación del sistema digestivo primitivo. 4. malformación del vitelo. 5. malformación de la porción caudal.

Como se puede observar en la figura 24 la cavidad craneal esta atrofiada, no se observan vestigios de vesículas ópticas ni óticas, en la parte dorsal del embrión el desarrollo de la columna vertebral es confuso al igual que la distribución de los somitos; tampoco es posible diferenciar los vestigios del sistema digestivo primitivo, existe una evidente mal formación del vitelo y no se hacen visibles la cola ni vestigios de aletas, en este punto del desarrollo no existe la presencia de corion.

7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

7.1 CONCLUSIONES

- La evaluación de diámetro ovocitario de oocitos de Yamú fertilizados con semen fresco (T1) y semen crioconservado (T2), demuestra que existen diferencias estadísticas altamente significativas entre los tratamientos siendo el T1 el que presenta mayor tamaño proporcionando mayor hidratación y protección al embrión.
- Los porcentajes de fertilidad y eclosión, presentaron diferencias altamente significativas entre los tratamientos. El mejor promedio de fertilización se obtuvo en el T1, superando en aproximadamente 26 % al T2, se obtuvo para eclosión un mayor porcentaje en el T1 con $60,21 \pm 19,12$ sobrepasando en 18 % al T2 con $42,08 \pm 12,50$, lo que indica mayor obtención de embriones y por consiguiente mayor cantidad de semilla al fertilizar oocitos.
- El tiempo de desarrollo en embriones de Yamú con semen fresco y crioconservado es muy similar para los dos tratamientos en cada una de sus etapas, comprobando que el semen en sus dos protocolos funciona de igual manera para esta variable.
- El proceso de congelación y descongelación en la membrana y distribución mitocondrial en el espermatozoide, causa alteraciones morfológicas representadas con mayor énfasis en el T2 identificadas como malformaciones en cabeza, columna y cola.

7.2 RECOMENDACIONES

- Los resultados obtenidos en esta investigación demuestran la viabilidad de la obtención de semilla a través de la fertilización ovocitaria con semen crioconservado, por esta razón, se debe continuar los estudios referentes a esta técnica para estandarizar los protocolos para Yamú (*Brycon amazonicus*) y otras especies de interés comercial.
- La incidencia de la utilización de semen crioconservado en la obtención de semilla de Yamú (*Brycon amazonicus*) ha revelado una aparente alta incidencia de malformaciones en embriones, lo que refleja la importancia de ampliar este tipo de estudios a etapas de desarrollo más avanzadas para crear un paquete de información más completa de la especie.
- La obtención de semilla a través de semen crioconservado es de gran importancia ya que optimizan la producción de especies de difícil reproducción o que se encuentren en peligro de extinción, por lo que se sugiere la implementación de esta técnica en piscifactorías o en centros de investigación y/o producción animal.

8. BIBLIOGRAFIA

ALVAREZ DE LEON, M. Contribución al conocimiento de los peces de los llanos anatomía e histología básica del Yamú *Brycon siebenthalae*. Tesis medicina veterinaria y zootecnia. Universidad de los Llanos. Villavicencio, Colombia 1991. p. 95

ARIAS CASTELLANOS, José Alfredo. Avances en la nutrición y alimentación de Yamú. En: memorias de la VII jornada de acuicultura. Tercera reunión regional del género *Brycon*. Villavicencio, Colombia. 2001. p 4-8.

ARIAS CASTELLANOS, José Alfredo. Contribución al conocimiento biológico de los peces de los llanos Yamú (*Brycon siebenthalae*) y Sapuara (*Semaprochilodus laticep*), con fines de cultivo. Informe final. Villavicencio, Colombia: Universidad de los Llanos, Colciencias, 1995. p.30. 65P

ARIAS, Alfredo y AYA, Elizabeth. Biología reproductiva del Yamú *Brycon siebenthalae*, en ambientes naturales. En: Resúmenes I Congreso de Zoología. Bogotá, 2000. p. 86.

ARIAS, Alfredo y PARDO, Sandra. Estimación de parámetros básicos del cultivo y alimentación del Yamú. Proyecto de investigación. Villavicencio, Colombia: UNILLANOS-IALL-PLANTE, 1997. p. 11.

ARIAS CASTELLANOS, José Alfredo, PARDO CARRASCO, Sandra Clemencia, ATENCIO GARCIA, Victor, VASQUEZ TORRES, Walter, ZANIBONI FHILO, Evoy. Escala de maduración gonadal, reproducción inducida y alevinaje del Yamú (*Brycon siebenthalae*), PICES: CHARACIDAE. Universidad de los Llanos, Instituto de Acuicultura IALL, Colciencias. Villavicencio, Meta 2002. p. 5

ARIAS, Alfredo y RODRÍGUEZ, C. Experimentos con tres niveles de proteína, en la ración para el engorde de Yamú, *Brycon siebenthalae*. En: Memorias VI jornada de Acuicultura. Segunda reunión regional del genero *Brycon*. Villavicencio, Colombia: Unillanos, 2000. p.14

ATENCIO, G. Víctor. Algunos aspectos da fisiología do Yamú (*Brycon siebenthalae* Eigenman 1912). En: Revisión teórica acerca de la especie Yamú. Brasil: Universidad federal de Santa Catarina, 1999. p. 15.

BALINSKY, B. J. Introducción a la embriología. Tercera edición, Barcelona, España: editorial Omega, 1975. p. 631.

BILLARD, R. La gametogenese, le cycle sexuel et el contrôle de la reproduction chez les poissons téléostéens. Bull. Fr. Pisc. No. 273 (1979). P. 120.

BOLAÑOS LOPEZ Paola Milena, ROMERO ORTIZ Orlando, CRUZ CASALLAS, Pablo Emilio. Evaluación del uso de propilenglicol, etilenglicol, metanol y dimetilsulfoxido (DMSO) para la crioconservación de semen de yamu (*Brycon siebenthalae*). En: crioconservación de semen de peces tropicales. Curso taller II congreso colombiano de acuicultura X jornada de acuicultura IALL. Villavicencio meta Colombia, octubre 2004.p.14. 46p

CARRILLO, A. M. Y RODRÍGUEZ, J. A. Bases fisiológicas de la reproducción de peces tropicales. En: Fundamentos de acuicultura continental. Bogotá: INPA, 2001. p. 204.

CHAPARRO, N. Reproducción artificial y manipulación genética en peces. Barranquilla Colombia: Editorial, mejoras, 1994. p. 36.

CHIRINOS, José. La Cachama Ministerio de Agricultura de Venezuela Caracas: Imprenta gob. Ministerio de Agricultura y Pesca. 1998. p. 215.

CLAVIJO AYALA, John Alejandro. Desarrollo embrionario del Yamú *Brycon siebenthalae* (Eigenmann, 1912). Tesis de grado. Fundación Universitaria Agraria de Colombia, Facultad de Ciencias Agrarias, Programa de Zootecnia. Bogotá, 2002. p 5 (57 p)

CLAVIJO AYALA John Alejandro y ARIAS CASTELLANOS José Alfredo. Avances en el estudio de la embriología del Yamú *Brycon siebenthalae* (pises: characidae). Universidad de los Llanos, Instituto de Acuicultura (IALL), Villavicencio Colombia. Dalia. Revista de la Asociación Colombiana de Ictiología 2004. Número 7 pág 37- 48

CLAVIJO, Jhon y ARIAS, Alfredo. Desarrollo embrionario de Yamú (*Brycon siebenthalae*), En: Memorias XXXV Congreso Nacional de Ciencias Biológicas. Medellín, Colombia, 2000. p. 86.

CLOUD, J. G., MILLER, W. H. y LEVANDUSKI, M. J. Cryopreservation of sperm as a means to store salmonid germ plasm and to transfer genes from wild to hatchery populations. Program Fish Cult, 1990. p. 51.

CRUZ CASALLAS Pablo Emilio; HERNÁNDEZ ARÉVALO, Gilma y VELASCO SANTAMARÍA Yohana. Sobrevivencia, desarrollo y alteraciones morfológicas de larvas y postlarvas de Yamú (*Brycon siebenthalae*), obtenidas con semen congelado. Semilleros de investigación sobre conservación de gametos – SIGAME. Universidad de los Llanos - Instituto de Acuicultura: Villavicencio – Meta. 2004. p. 6 (P.16)

CRUZ, Pablo; LOMBO, Dora; VELASCO, Yohana. Calidad del semen y morfología de los espermatozoides de los reproductores en cautiverio de *Brycon siebenthalae* (Eignmann). Instituto de acuicultura. Universidad de los Llanos, Villavicencio, Meta- Colombia. Aquaculture Research, 2005, p. 1-5.

CRUZ CASALLAS Pablo, MEDINA ROBLES Victor, VELASCO SANTAMARÍA Yohana. Protocolo para la crioconservación de semen de Yamú (*Brycon amazonicus* Spix & Agassiz 1829). Grupo de reproducción y toxicología de organismos acuáticos GRITOS, instituto de acuicultura, facultad de ciencias agropecuarias y recursos naturales, Universidad de los Llanos, Villavicencio Meta Colombia. 2005. revista colombiana de ciencias pecuarias. vol.19 numero 2 año 2006 p. 147 (146 – 151p)

CRUZ, Pablo; PARDO, Sandra; ARIAS, Alfredo; LOMBO, Pedro; LOMBO, R. Dora; PARDO, Jaime. Criopreservación del semen de Yamú *B. siebenthalae*. Instituto de acuicultura. Universidad de los Llanos, Villavicencio, Meta Colombia. Journal of the world aquaculture society. Volumen 35 No. 4 Diciembre 2004.

CRUZ CASALLAS, P.E; VELASCO SANTAMARÍA, Y.M. Caracterización Seminal de la proporción espermatozoides: oocito en Yamú (*Brycon siebenthalae*) En: Crioconservación de semen de peces tropicales. Curso taller II Congreso Colombiano de Acuicultura X Jornada de Acuicultura IALL. Villavicencio Meta Colombia, Octubre 2004.p.14. 46p

CRUZ, Pablo y VELASCO, Yohana. Crioconservación de semen de Yamú (*Brycon siebenthalae*): calidad seminal, dosis inseminante y sistemas de empaque. En: Memorias II Congreso Colombiano de Acuicultura, Villavicencio, Colombia: Unillanos, 2004. p. 27.

CRUZ CASALLAS, Pablo Emilio, VELASCO SANTAMARÍA, Yohana y ARIAS CASTELLANOS, Alfredo. Crioconservación de semen de peces tropicales. Curso taller II Congreso Colombiano de Acuicultura X jornada de acuicultura IALL. Villavicencio Meta Colombia, octubre 2004. p. 5. 46p

EIGENMANN, C., H. The freshwater fishes of british Guiana. Mem. Carnegie mus. Pittsbur. EEUU. V. V. Pp. 370-372.

ESLABA MOCHA, René; PARDO CARRASCO, Sandra; ARIAS CASTELLANOS, Alfredo; CRUZ CASALLAS, Pablo. Morfología macro y microscópica del esófago, estomago y ciegos pilóricos del Yamú *Brycon siebenthalae*. Revista Orinoquía, Universidad de los Llanos. Instituto de Investigaciones de la Orinoquía Colombiana Vol 5 No.1 año 2001 p 111-128.

FREIRE, B. D. Análise structural e ultrastructural da maturação final do ovocito, fertilização e primeira clivagem em Curimatá, *Prochilodus lineatus*. Tese de doutorado. Brasil: Universidade Estadual Paulista, 2001. p. 79.

GILBERT, S. F. Developmental Biology. Sinaure Associates, Sunderland, Mass., EEUU, 1997. p. 77.

GODINHO, Heloisa; FENERICH Nelsy Y NARAHARA Massuka. Desenvolvimento embrionario e larval de *Rhamdia hilarii* (Valenciennes, 1840) (Siluriformes, pimelodidae). En revista Brasil Biol., 38(1):151-156. Fevereiro, 1978- Rio de Janeiro.

GONZALES, E. y FRESNEDA, Adriana. Criopreservación de semen de Cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) y Bagre rayado (*Pseudoplatystoma fasciatum*). En: Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias. Medellín, Colombia: Editorial, Universidad de Antioquia, suplemento, Julio, 1999.p. 197.

GWO, J., STRAWN, K., LONGNECKER, M. T. y ARNOLD, C. R. Cryopreservation of atlantic croaker spermatozoa. Aquaculture 94, 1991. p. 275.

HOWES, G. Review of the genus *Brycon* (TELEOSTEI: CHARACOIDEI). Bulletin of British Museum of Natural History. 1982. 43 (I), 1- 47.

HURTADO, R. H., y USECHE, L. C. A. Estudio sobre la biología del Yamú, *Brycon siebenthalae* (EIGNMANN, 1912) y de la Palometa, *Mylossoma Duriventri* (CUVIER, 1818) (PISES: CHARACIDAE), en la parte baja del río Cafre, sistema del río Guaviare. Tesis. Universidad Nacional de Bogotá, Colombia. 1986. p. 115

JENKIS, K. K. y WOODS, L. C. The cryopreservation of Striped Bass *Morone saxatilis* Semen. In: Journal of the World Aquaculture Society, 2002. p. 70.

JOHNSTON, I.A.; VERA, L.A.; VIEIRA, L. y ABERCROMBY, M. Temperature and myogenesis in embryos of the atlantic herring *Clupea harengus*. In: The journal of Experimental Biology.v.198, 1995. p. 1389.

KERBY, J. H. Cryogenic preservation of sperm from striped bass. Transactions of the American Fisheries Society, 1983. p. 86.

KIMMEL, Charles; BALLARD, William; KIMMEL, Seth; ULLMANN, Bonnie and SCHILLING, Thomas. Stages of embryonic development of the Zebrafish. Institute of neuroscience, University of Oregon, Eugene, Oregon. Department of Biology. Developmental dynamics, volume 203, number 3. July 1995 p 303.

- KUO, C. NASH, C. E. y SHEHADEH, Z. H. A procedural guide to induce spawning in grey mullet (*Mugil cephalus* L.). *Aquaculture*. Vol. 3 (1974). P. 10.
- LABBE, C., MARTORIATI, A., DEVAUX, A. y MAISSE, G. Effect of sperm cryopreservation on sperm DNA stability and progeny development in rainbow trout. *Molecular Reproduction and Development*, 201. p. 397.
- LEME DOS SANTOS, H. S. Anatomía microscópica dos ovos teleósteos mas diferentes etapas do desenvolvimiento embrionario. En: Resúmenes e palestras, segunda semana sobre histología de peixes da FCAVJ – UNESP, 1995. p. 51.
- MEDINA, Victor, VELASCO Yohana, CRUZ Pablo. Aspectos generales de la crioconservación espermática en peces teleosteos. *Revista Colombiana de Ciencias pecuarias*. Universidad de Antioquia. Vol. 18:1, 2005. p. 34
- OGIER, B., VERN, Y., KERBOEUF, D. Y MAISSE, G. Flow cytometric evaluation of mitochondrial activity and membrane integrity en fresh and cryopreserved rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa, 1997. p. 141.
- PAZ ROSERO, Wilson Orlando. Evaluación del desarrollo embrionario del bagre del patia *rhamdia quelen* (Quoy y Gaimard, 1824) a diferentes rangos de temperatura del agua de incubación. Tesis de grado Ingeniería en producción acuícola, Facultad de Ciencias pecuarias, Universidad de Nariño. Pasto Colombia. 2005. p. 86 (107p.)
- PIIONEN, J. Cryopreservation of sperm from brow trout (*Salmo trutta*) and Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Aquaculture* 116, 1993. p. 275.
- RIZZO, E. Biología de ovos de peixes neotropicais de agua doce: estudos comparativo e experimental, com ênfase na análise da superficie e do aparéelo micropilar. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte – MG, Brasil. 2001 p. 103.
- RODRIGUEZ, G. M. Genética aplicada a la piscicultura. Temas actuales sobre reproducción en teleósteos. Secretaría de pesca. México: Editorial, Rodríguez, G. M, 1992. p. 83.
- TORRES, Q. E. Apuntes sobre el cultivo del Yamú en los Llanos Orientales. En: Memorias VI jornada de Acuicultura. Segunda reunión regional del género *Brycon*. Villavicencio, Colombia: Unillanos, 2000. p. 9.
- VAZZOLER, E. A. Biología de reproducao artificial de peixes teleósteos: teoria e practica. Maringa, Brasil: Universiade Estatal de Maringa, 1996. p. 169.

WOYNAROVICH, E. y HORVÁTH, L. A propagação artificial de peixes de águas tropicais. En: Manual de extensão. Brasília, Brasil: DF. FAO/CODEVASF/CNPq, 1983. p. 220.

ZANIBONI FILHO, E. Reprodução de espécies de peixes nativos. En Memorias I curso taller internacional de acuicultura. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia. 1997. p. 5

ANEXOS

Anexo A. Resumen de la condición reproductiva de las hembras de Yamú
(*Brycon amazonicus*)

Ensayo	Peso	Longitud	Inducción (mg/K) EHC	Migración
R1	1800	50,6	5,75	67
R2	2300	52,3	5,75	72
R3	2200	55	5,75	65
R4	2500	51	5,75	65
Promedio	2200	52,23	5,75	67,25
Desviación	294,39	1,99	0,00	3,30

Ensayo	Hora Latencia	Temperatura	Horas-grado
R1	6,2	27,2	168,64
R2	6	27,6	165,6
R3	6,5	27,5	178,75
R4	6	28	168
Promedio	6,18	27,58	170,25
Desviación	0,24	0,33	5,82

Ensayo	Peso total oocitos	Numero de oocitos / gramo	Fecundidad	Diámetro pre- fertilización
R1	219,6	1240	272304,00	1252,04
R2	238,6	1298	309702,80	1239,71
R3	228,4	1333	304457,20	1245,50
R4	235,8	1321	311491,80	1237,50
Promedio	230,60	1298,00	299488,95	1243,69
Desviación	8,50	41,30	18367,51	6,5

Anexo B. Características del semen utilizado para la seminación de oocitos de Yamú (*Brycon amazonicus*).

Réplica	Peso	Longitud	Inducción EHC (mg/k)	Espermatocrito	
				SF	SC
R1	1750	50	4	11	12
R2	1800	49,4	4	12,8	12,3
R3	1500	46	4	16,2	11,8
R4	1500	48	4	11,3	12,6
Promedio	1637,5	48,35	4,00	12,83	12,18
Desviación	160,08	1,78	0,00	2,38	0,35

Réplica	Movilidad		Volumen semen fresco (ml)	Tiempo de activación	
	SF	SC		SF	SC
R1	80	80	8	33	40
R2	90	80	9,8	32	42
R3	80	80	8,5	45,5	38
R4	80	80	5	30	40
Promedio	82,50	80,00	7,83	35,13	40,00
Desviación	5,00	0,00	2,03	7,03	1,63

Anexo C. Análisis estadístico de características de semen de fresco y semen crioconservado.

▪ **ESPERMATOCRITO.**

	Semen Fresco	Semen Crioconservado
Media	12,825	12,175
Varianza	5,6825	0,1225
Observaciones	4	4
Grados de libertad	3	3
F	46,38776	
P(F<=f) una cola	0,005171	**
Valor crítico para F (una cola)	9,276628	

Prueba de f para análisis de varianzas de dos muestras

	Semen Fresco	Semen Crioconservado
Media	12,825	12,175
Varianza	5,6825	0,1225
Observaciones	4	4
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	3	
Estadístico t	0,539563	
P(T<=t) una cola	0,313486	
Valor crítico de t (una cola)	2,353363	
P(T<=t) dos colas	0,626973	NS
Valor crítico de t (dos colas)	3,182446	

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales

▪ **TIEMPO DE ACTIVACIÓN**

	Semen Fresco	Semen Crioconservado
Media	35,125	40
Varianza	49,395833	2,66666667
Observaciones	4	4
Grados de libertad	3	3
F	18,523438	
P(F<=f) una cola	0,0193743	**
Valor crítico para F (una cola)	9,2766282	

Prueba F para varianzas de dos muestras

	Semen Fresco	Semen Crioconservado
Media	35,125	40
Varianza	49,395833	2,66666667
Observaciones	4	4
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	3	
Estadístico t	-1,35127	
P(T<=t) una cola	0,1347391	
Valor crítico de t (una cola)	2,3533634	
P(T<=t) dos colas	0,2694782	NS
Valor crítico de t (dos colas)	3,1824463	

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales

Anexo D. Datos de pH y temperatura durante toda la investigación.

Réplica	Hora	Semen Fresco		Semen Crioconservado	
		PH T1	T °C T1	PH T2	T°C T2
R1	1	6,49	26,9	6,67	27
R1	2	6,50	26,9	6,49	27,1
R1	3	6,50	26,9	6,49	27,3
R1	4	6,70	27,1	6,74	27,3
R1	5	6,60	27,3	6,45	27,4
R1	6	6,34	27,1	6,44	27,3
R1	7	6,36	27,0	6,22	27,1
R1	8	6,17	26,8	6,22	26,9
R1	9	5,86	26,0	5,89	26,9
R1	10	6,27	26,8	6,18	26,9
R1	11	6,28	26,8	6,17	26,8
R1	12	6,46	26,0	6,17	26,6
R2	13	6,52	26,0	6,18	26,6
R2	1	6,54	28,7	6,54	28,7
R2	2	6,54	28,7	6,59	28,7
R2	3	6,54	28,7	6,73	29,0
R2	4	6,58	28,8	6,73	29,3
R2	5	6,59	28,8	6,36	29,3
R2	6	6,52	29,0	6,33	29,3
R2	7	6,49	29,2	6,33	29,3
R2	8	6,49	29,2	6,40	29,3
R2	9	6,33	29,2	6,29	29,2
R2	10	6,27	29,4	6,32	29,1
R2	11	6,34	29,3	5,89	29,1
R2	12	6,37	29,3	6,36	28,1
R2	13	6,37	28,8	6,24	28,8
R3	14	6,34	28,8	6,25	28,8
R3	1	6,65	29,0	6,56	28,8
R3	2	6,38	29,0	6,29	28,8
R3	3	6,38	29,0	6,29	28,8
R3	4	6,33	29,0	6,25	28,8
R3	5	6,39	29,0	6,20	28,8
R3	6	6,10	28,6	5,98	28,6
R3	7	5,82	28,6	5,81	28,6
R3	8	6,47	28,4	6,25	28,4
R3	9	6,47	28,4	6,25	28,4

Réplica	Hora	Semen Fresco		Semen Congelado	
		PH T1	T °C T1	PH T2	T°C T2
R3	10	6,03	28,4	6,02	28,3
R3	11	5,9	28,4	5,97	28,2
R4	12	6,4	27,9	6,23	28
R4	1	7,76	28,5	8	28,6
R4	2	7,14	27,5	7,57	27,7
R4	3	6,4	27,4	6,61	27,5
R4	4	5,72	27,3	5,66	27,3
R4	5	5,72	27,2	5,65	27,3
R4	6	6,15	27,3	6,22	27,4
R4	7	6,18	27,3	6,23	27,3
R4	8	6,16	27,3	6,24	27,2
R4	9	5,6	27,2	5,65	27,2
R4	10	5,67	27,2	5,9	26,8
R4	11	5,7	27	5,79	26,9
R4	12	5,66	26,8	5,68	27,1
R4	13	5,54	26,9	5,53	26,8
Promedio		6,30923077	27,925	6,27884615	27,9769231
Desviación		0,38728237	1,01186588	0,42601967	0,90826605

Anexo E. Análisis estadístico para condición del agua (pH y temperatura)

- pH.

PH

Prueba F para varianzas de dos muestras

	PH T1	PH T2
Media	6,30923077	6,27884615
Varianza	0,14998763	0,18149276
Observaciones	52	52
Grados de libertad	51	51
F	0,8264111	
P(F<=f) una cola	0,24921426	NS
Valor crítico para F (una cola)	0,62815166	

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales

	PH T1	PH T2
Media	6,30923077	6,27884615
Varianza	0,14998763	0,18149276
Observaciones	52	52
Varianza agrupada	0,1657402	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	102	
Estadístico t	0,38056294	
P(T<=t) una cola	0,35215949	
Valor crítico de t (una cola)	1,65992998	
P(T<=t) dos colas	0,70431898	NS
Valor crítico de t (dos colas)	1,9834952	

- Temperatura

	T1	T2
Media	27,925	27,9769231
Varianza	1,02387255	0,82494721
Observaciones	52	52
Grados de libertad	51	51
F	1,24113705	
P(F<=f) una cola	0,2215819	NS
Valor crítico para F (una cola)	1,59197224	

Prueba F para varianzas de dos muestras

	T1	T2
Media	27,925	27,9769231
Varianza	1,02387255	0,82494721
Observaciones	52	52
Varianza agrupada	0,92440988	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	102	
Estadístico t	-0,27536885	
P(T<=t) una cola	0,39179497	
Valor crítico de t (una cola)	1,65992998	
P(T<=t) dos colas	0,78358994	NS
Valor crítico de t (dos colas)	1,9834952	

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales

Anexo F. Datos de diámetros tomados antes de la fertilización y después de la fertilización con semen fresco y crioconservado.

Réplicas	Diámetro pre-fertilización	Diámetro T1	Diámetro T2
R1	1375	3325	3175
R1	1225	3500	3200
R1	1200	3625	3200
R1	1375	3575	3250
R1	1300	3475	3150
R1	1325	3450	3125
R1	1275	3500	3375
R1	1125	3375	3200
R1	1225	3300	3175
R1	1250	3325	3325
R1	1250	3500	3325
R1	1300	3500	3450
R1	1325	3475	3500
R1	1175	3825	3525
R1	1225	3750	3525
R1	1175	3675	3375
R1	1300	3500	3475
R1	1225	3475	3500
R1	1300	3425	3550
R1	1125	3400	3575
R1	1175	3400	3550
R1	1175	3375	3475
R1	1200	3500	3500
R1	1300	3500	3175
R1	1300	3175	3175
R1	1250	3175	3275
R1	1250	3150	3325
R1	1250	3550	3300
R1	1250	3550	3450
R1	1175	3300	3500
R1	1225	3325	3500
R1	1225	3300	3475
R1	1325	3625	3500
R1	1300	3500	3550
R1	1325	3500	3425
R1	1225	3425	3150

Réplicas	Diámetro pre-fertilización	Diámetro T1	Diámetro T2
R1	1375	3200	3125
R1	1375	3450	3125
R1	1225	3550	3450
R1	1225	3250	3325
R1	1200	3325	3250
R1	1175	3425	3250
R1	1125	3475	3300
R1	1225	3475	3425
R1	1250	3175	3400
R1	1325	3175	3175
R1	1325	3500	3325
R1	1250	3475	3250
R1	1250	3475	3250
R2	1350	3250	3175
R2	1250	3575	3175
R2	1200	3500	3050
R2	1200	3750	3325
R2	1250	3700	3375
R2	1225	3175	3425
R2	1300	3425	3475
R2	1200	3450	3375
R2	1325	3500	3500
R2	1275	3500	3525
R2	1400	3625	3500
R2	1250	3575	3250
R2	1250	3625	3325
R2	1375	3500	3175
R2	1175	3750	3325
R2	1250	3750	3400
R2	1100	3200	3125
R2	1325	3575	3125
R2	1350	3825	3175
R2	1375	3175	3525
R2	1000	3175	3500
R2	1125	3425	3250
R2	1125	3175	3325
R2	1250	3500	3425
R2	1300	3675	3625
R2	1175	3675	3600

Réplicas	Diámetro pre-fertilización	Diámetro T1	Diámetro T2
R2	1200	3425	3500
R2	1225	3400	3150
R2	1100	3200	3150
R2	1300	3200	3200
R2	1250	3825	3225
R2	1225	3400	3250
R2	1250	3425	3325
R2	1225	3175	3325
R2	1300	3175	3250
R2	1250	3750	3550
R2	1300	3450	3525
R2	1325	3375	3250
R2	1300	3250	3325
R2	1200	3375	3175
R2	1175	3375	3250
R2	1125	3750	3375
R2	1125	3450	3500
R2	1175	3450	3550
R2	1250	3175	3600
R2	1225	3175	3250
R2	1100	3175	3250
R2	1200	3250	3200
R2	1300	3300	3200
R2	1350	3325	3150
R2	1350	3300	3150
R3	1375	3250	3175
R3	1225	3050	3175
R3	1225	3250	3200
R3	1300	3375	3250
R3	1225	3175	3375
R3	1325	3425	3175
R3	1300	3375	3300
R3	1275	3500	3375
R3	1300	3425	3175
R3	1250	3500	3175
R3	1250	3500	3175
R3	1325	3575	3200
R3	1250	3625	3125
R3	1350	3750	3200

Réplicas	Diámetro pre-fertilización	Diámetro T1	Diámetro T2
R3	1175	3825	3500
R3	1250	3450	3525
R3	1325	3425	3200
R3	1250	3500	3250
R3	1250	3625	3375
R3	1125	3375	3450
R3	1250	3375	3200
R3	1300	3325	3250
R3	1175	3425	3450
R3	1175	3550	3200
R3	1175	3575	3300
R3	1200	3500	3600
R3	1200	3500	3550
R3	1250	3200	3625
R3	1250	3325	3425
R3	1250	3300	3175
R3	1250	3425	3325
R3	1300	3300	3425
R3	1225	3625	3425
R3	1250	3175	3175
R3	1175	3250	3500
R3	1175	3250	3525
R3	1225	3450	3200
R3	1250	3575	3250
R3	1125	3675	3175
R3	1300	3675	3175
R3	1250	3250	3175
R3	1125	3500	3500
R3	1175	3500	3450
R3	1300	3500	3475
R3	1250	3500	3275
R3	1300	3675	3300
R3	1250	3750	3375
R3	1300	3825	3375
R3	1275	3450	3275
R3	1200	3550	3450
R4	1250	3250	3200
R4	1375	3075	3200
R4	1200	3575	3000

Réplicas	Diámetro pre-fertilización	Diámetro T1	Diámetro T2
R4	1225	3325	3475
R4	1300	3175	3325
R4	1275	3500	3375
R4	1250	3500	3500
R4	1200	3550	3400
R4	1175	3250	3150
R4	1250	3675	3125
R4	1250	3575	3250
R4	1325	3050	3250
R4	1250	3175	3375
R4	1350	3125	3175
R4	1250	3100	3150
R4	1175	3050	3325
R4	1175	3500	3700
R4	1150	3450	3000
R4	1150	3250	3375
R4	1200	3175	3400
R4	1275	3550	3175
R4	1300	3500	3000
R4	1250	3375	3325
R4	1250	3375	3400
R4	1325	3200	3550
R4	1300	3375	3525
R4	1325	3125	3250
R4	1225	3125	3700
R4	1150	3500	3175
R4	1100	3675	3175
R4	1375	3250	3500
R4	1325	3375	3125
R4	1250	3325	3300
R4	1300	3450	3125
R4	1300	3250	3125
R4	1125	3250	3175
R4	1150	3250	3500
R4	1100	3375	3375
R4	1225	3175	3150
R4	1200	3175	3125
R4	1300	3050	3250
R4	1300	3175	3325

Réplicas	Diámetro pre-fertilización	Diámetro T1	Diámetro T2
R4	1250	3450	3300
R4	1250	3750	3175
R4	1325	3250	3250
R4	1175	3450	3250
R4	1150	3175	3625
R4	1150	3050	3125
R4	1100	3125	3175
R4	1250	3250	3250
Promedio	1243,63	3410,75	3319,50
Desviación	70,58	186,28	151,65

Anexo G. Análisis estadístico de diámetro pre-fertilización y post-fertilización con semen fresco y crioconservado

Diámetro Pre- Diámetro Semen Fresco

Prueba F para varianzas de dos muestras

	Diámetro pre	Diámetro T1 SF
Media	1243,625	3410,75
Varianza	4981,14008	34701,696
Observaciones	200	200
Grados de libertad	199	199
F	0,14354169	
P(F<=f) una cola		0 **
Valor crítico para F (una cola)	0,79155234	

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales

	Diámetro pre	Diámetro T1 SF
Media	1243,625	3410,75
Varianza	4981,14008	34701,696
Observaciones	200	200
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	255	
Estadístico t	-153,850038	
P(T<=t) una cola	8,514E-254	
Valor crítico de t (una cola)	1,65085109	
P(T<=t) dos colas	1,703E-253 **	
Valor crítico de t (dos colas)	1,96931051	

Diámetro Pre- Diámetro Semen Congelado

Prueba F para varianzas de dos muestras

	Diámetro pre	Diámetro T2 SC
Media	1243,625	3319,5
Varianza	4981,14008	22997,2362
Observaciones	200	200
Grados de libertad	199	199
F	0,21659734	
P(F<=f) una cola	0	**
Valor crítico para F (una cola)	0,79155234	

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales

	Diámetro pre	Diámetro T2 SC
Media	1243,625	3319,5
Varianza	4981,14008	22997,2362
Observaciones	200	200
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	281	
Estadístico t	-175,511244	
P(T<=t) una cola	1,65E-289	
Valor crítico de t (una cola)	1,65029432	
P(T<=t) dos colas	3,301E-289	**
Valor crítico de t (dos colas)	1,96844203	

T1 (diámetro semen fresco)-T2 (diámetro semen congelado)

Prueba F para varianzas de dos muestras

	Diámetro T1 SF	Diámetro T2 SC
Media	3410,75	3319,5
Varianza	34701,696	22997,2362
Observaciones	200	200
Grados de libertad	199	199
F	1,50895072	
P(F<=f) una cola	0,00193786	**
Valor crítico para F (una cola)	1,26334034	

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales

	Diámetro T1 SF	Diámetro T2 SC
Media	3410,75	3319,5
Varianza	34701,696	22997,2362
Observaciones	200	200
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	382	
Estadístico t	5,3723461	
P(T<=t) una cola	6,7696E-08	
Valor crítico de t (una cola)	1,6488523	
P(T<=t) dos colas	1,3539E-07	**
Valor crítico de t (dos colas)	1,96619343	

Anexo H. Datos de fertilidad.

Réplica	T1 SF		T2 SC	
	Fértiles	No Fértiles	Fértiles	No Fértiles
R1	65	35	42	58
R1	66	34	40	60
R1	63	37	42	58
R1	67	33	45	55
R1	59	41	38	62
R1	58	42	37	63
R2	76	24	47	53
R2	81	19	45	55
R2	80	20	55	45
R2	75	25	53	47
R2	83	17	52	48
R2	81	19	46	54
R3	92	8	53	47
R3	89	11	60	40
R3	87	13	54	46
R3	90	10	56	44
R3	86	14	58	42
R3	83	17	63	37
R4	55	45	30	70
R4	64	36	35	65
R4	63	37	38	62
R4	56	44	38	62
R4	58	42	41	59
R4	55	45	40	60
Sumatoria	1732	668	1108	1292
Promedio	72,17	27,83	46,17	53,83
Desviación	12,61	12,61	8,82	8,82

Anexo I. Análisis estadístico para porcentaje de fertilidad (prueba de Brand Snedecor)

PRUEBA DE BRAND SENEDECOR

Respuesta	Tratamientos		Total
	T1	T2	
Éxito	1.732,00	1.108,00	2.840,00
Fracaso	668,00	1.292,00	1.960,00
Total	2.400,00	2.400,00	4.800,00
Pi	0,722	0,462	0,592
Pi*a_i	1.249,927	511,527	1.680,333

n = 2
 n - 1 = 1
 Alfa = 0,05
 1 - alfa = 0,95
 p = 0,592
 q = 0,408

$$\chi^2_c = \frac{[\sum a_i \cdot p_i] - [p \cdot \sum a_i]}{pq}$$

Decisión = Existen diferencias estadísticas altamente significativas

$\chi^2_c = 335,765$

$\chi^2_{t(1-alfa)} = 3,84$

Anexo J. Datos de porcentaje y tiempo de eclosión

Réplica	T1		T2	
	Eclosión	No Eclosión	Eclosión	No Eclosión
R1	57	43	35	65
R1	59	41	40	60
R1	60	40	38	62
R1	55	45	42	58
R1	62	38	39	61
R1	63	37	43	57
R2	68	32	42	58
R2	71	29	52	48
R2	74	26	48	52
R2	78	22	45	55
R2	66	34	51	49
R2	76	24	49	51
R3	82	18	55	45
R3	83	17	58	42
R3	77	23	56	44
R3	75	25	57	43
R3	79	21	59	41
R3	76	24	55	45
R4	30	70	20	80
R4	35	65	23	77
R4	29	71	22	78
R4	32	68	25	75
R4	33	67	30	70
R4	25	75	26	74
Sumatoria	1445	955	1010	1390
Promedio	60,21	39,79	42,08	57,92
Desviación	19,12	19,12	12,50	12,50

Tiempo eclosión en horas

	T1 SF	T2 SC
R1	14	13
R2	14	14
R3	12	12
R4	14	14
Promedio	13,5	13,25
Desviación	1	0,96

Anexo K. Análisis estadístico para porcentaje de eclosión (prueba de Brand Snedecor)

PRUEBA DE BRAND SENEDECOR

Respuesta	T1	T2	Total
Éxito	1445,00	1.010,00	2.455,00
Fracaso	955,00	1.390,00	2.345,00
Total	2.400,00	2.400,00	4.800,00
Pi	0,602	0,421	0,511
Pi*a_i	870,010	425,042	1.255,630

n = 2
 n - 1 = 1
 Alfa = 0,05
 1 - alfa = 0,95
 p = 0,511
 q = 0,489

$$\chi^2_c = \frac{[\sum a_i \cdot p_i] - [p \cdot \sum a_i]}{pq}$$

Decisión = Existen diferencias estadísticas altamente significativas

$\chi^2_c = 157,770$

$\chi^2_{t(1-alfa)} = 3,84$

Anexo L. Datos de embriones normales y anormales por hora fertilizados con semen fresco y crioconservado

Réplica	Hora	T1		T2	
		Normales	Anormales	Normales	Anormales
R1	1 HPF	58	42	57	43
R1	2 HPF	54	46	55	45
R1	3 HPF	44	56	59	41
R1	4 HPF	58	42	55	45
R1	5 HPF	52	48	50	50
R1	6 HPF	53	47	42	58
R1	7 HPF	60	40	37	63
R1	8 HPF	51	49	59	41
R1	9 HPF	49	51	57	43
R1	10 HPF	47	53	45	55
R1	11 HPF	56	44	38	62
R1	12 HPF	55	45	40	60
R1	13 HPF	60	40	58	42
R1	14 HPF	58	42	-	-
R2	1 HPF	53	47	53	47
R2	2 HPF	53	47	52	48
R2	3 HPF	55	45	44	56
R2	4 HPF	49	51	55	45
R2	5 HPF	44	56	50	50
R2	6 HPF	58	42	41	59
R2	7 HPF	50	50	36	64
R2	8 HPF	56	44	52	48
R2	9 HPF	57	43	57	43
R2	10 HPF	52	48	58	42
R2	11 HPF	43	57	42	58
R2	12 HPF	47	53	41	59
R2	13 HPF	58	42	37	63
R2	14 HPF	63	37	59	41
R3	1 HPF	58	42	55	45
R3	2 HPF	54	46	57	43
R3	3 HPF	49	51	56	44
R3	4 HPF	54	46	59	41
R3	5 HPF	58	42	55	45
R3	6 HPF	52	48	42	58
R3	7 HPF	44	56	37	63
R3	8 HPF	42	58	36	64
R3	9 HPF	51	49	52	48
R3	10 HPF	53	47	45	55
R3	11 HPF	56	44	54	46

Réplica	Hora	T1		T2	
		Normales	Anormales	Normales	Anormales
R3	12 HPF	67	33	59	41
R4	1 HPF	65	35	64	36
R4	2 HPF	62	38	48	52
R4	3 HPF	58	42	51	49
R4	4 HPF	62	38	52	48
R4	5 HPF	60	40	43	57
R4	6 HPF	63	37	37	63
R4	7 HPF	54	46	42	58
R4	8 HPF	52	48	41	59
R4	9 HPF	55	45	53	47
R4	10 HPF	64	36	60	40
R4	11 HPF	62	38	50	50
R4	12 HPF	42	58	48	52
R4	13 HPF	41	59	37	63
R4	14 HPF	43	57	35	65
Suma		2914	2486	2597	2703
Promedio		53,96	46,04	49,00	51,00
Desviación		6,52	6,52	8,24	8,24
Suma normales y anormales			5400		5300

ANEXO M. Análisis estadístico para normales y anormales.

PRUEBA DE BRAND SENEDECOR

Respuesta	TRATAMIENTOS		Total
	T1	T2	
Éxito	2.486,00	2.703,00	5.189,00
Fracaso	2.914,00	2.597,00	5.511,00
Total	5.400,00	5.300,00	10.700,00
Pi	0,460	0,510	0,485
Pi*a_i	1.144,481	1.378,530	2.516,423

n = 2
n - 1 = 1
Alfa = 0,05
1 - alfa = 0,95
p = 0,485
q = 0,515

p=pi total =0,48

pi= Éxito /total

q= 1-p

$$\chi^2 c = \frac{[\sum a_i \cdot p_i] - [p \cdot \sum a_i]}{pq}$$

$\chi^2 c = 26,377$

$\chi^2 t_{(1-alfa)} = 3,84$

Decisión = SI ($\chi^2 c > \chi^2 t_{(1-alfa)}$); "Existen diferencias estadísticas altamente significativas"; "No existen diferencias estadísticas altamente significativas".