

MV  
0597  
EJ 1

045528

*Hemeroteca*

**EVALUACION DE LA UTILIZACION DE SEMEN CRIOCONSERVADO EN LOS  
PROCESOS DE REPRODUCCION ARTIFICIAL A ESCALA COMERCIAL DE  
CACHAMA BLANCA (*Piaractus brachypomus* Cuvier, 1818)**

**YASMIN PASCUALA RAMOS GOMEZ**

**UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS  
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES  
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA  
VILLAVICENCIO**

**2008**

**EVALUACION DE LA UTILIZACION DE SEMEN CRIOCONSERVADO EN LOS  
PROCESOS DE REPRODUCCION ARTIFICIAL A ESCALA COMERCIAL DE  
CACHAMA BLANCA (*Piaractus brachypomus* Cuvier, 1818)**

**YASMIN PASCUALA RAMOS GOMEZ**

**Proyecto de Trabajo de Grado presentado como requisito parcial para optar  
al Título de Médico Veterinario Zootecnista**

**Modalidad Investigativa**

**Dirección**

**PABLO EMILIO CRUZ CASALLAS**

**Co- Dirección**

**YOHANA MARIA VELASCO SANTAMARIA**

**UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS**

**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES**

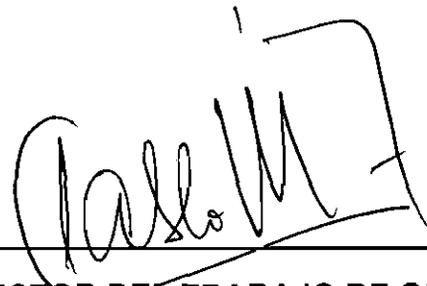
**ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**VILLAVICENCIO**

**2008**

NOTA DE ACEPTACION

APROBADO



DIRECTOR DEL TRABAJO DE GRADO



FIRMA DEL JURADO



FIRMA DEL JURADO

Villavicencio-Meta, Agosto de 2008

*DEDICATORIA*

A mi madre Ana flor Gomez y a Wilson Fernandez

A mi abuelita Carmen Gama

A quienes agradezco su incondicional apoyo emocional y economico  
Durante todo el tiempo necesario para lograr esta meta brindandome fortaleza  
Y esperanza para vencer cualquier contratiempo en mi lucha por culminar esta  
cumbre la cual solo inicio

*Yasmin*

## AGRADECIMIENTOS

Gracias a Dios por darme la oportunidad de culminar mi Ciclo Profesional en la Universidad de los Llanos para dedicarme a cuidar su Naturaleza, al Instituto de Acuicultura de la Universidad de los Llanos por hacerme participe de su gestion investigativa, a mi Director Doctor Pablo Emilio Cruz Casallas a mi Codirectora Doctora Yohana Maria Velasco Santamaria, a mis jurados Doctor Jose Ariel Rodriguez Pulido y Doctor Pedro Rene Eslava Mocha, quienes me guiaron en la elaboracion de este trabajo y a todos aquellos quienes participaron directa e indirectamente en el mismo

A la planta Friogan y todos sus directivos quienes permitieron crecer en el aprendizaje del dia a dia en mi experiencia laboral-

## TABLA DE CONTENIDO

		<i>Pagina</i>
	RESUMEN	7
	INTRODUCCION	8
	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	9
1	OBJETIVOS	10
1 1	General	10
1 2	Especificos	10
2	MARCO TEORICO	11
2 1	Taxonomia	11
2 2	Generalidades de la especie	11
2 3	Condiciones de cultivo	12
2 4	Generalidades de espermatozoides y oocitos	12
2 5	Dosis seminante	13
2 6	Caracteristicas seminales	13
2 6 1	Activacion espermatica	13
2 7	Evaluacion de la fertilidad	14
2 8	Efecto del volumen de la dosis seminante con semen fresco	14
2 9	Reproduccion artificial	16
2 10	Crioconservacion	16
2 11	Crioconservacion en otras especies de peces	17
3	MATERIALES Y METODOS	18

3 1	Localizacion	18
3 1 1	Estacion piscicola del Instituto de Acuicultura de los Llanos (IALL)	18
3 1 2	Granjas comerciales	18
3 2	Animales experimentales	18
3 3	Induccion hormonal y obtencion de gametos	19
3 4	Ensayos a Escala Comercial	20
3 5	Calidad seminal y crioconservacion	21
3 6	Diseño experimental	22
3 7	Pruebas de fertilidad, eclosion y sobrevivencia larval	22
3 8	Analisis estadistico	23
4	RESULTADOS	24
5	DISCUSION	29
6	CONCLUSIONES	33
7	RECOMENDACIONES	34
10	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	37

## LISTA DE FIGURAS

		Pagina
<b>Figura 1</b>	Ejemplares de cachama blanca ( <i>P. brachypomus</i> Cuvier, 1818)	18
<b>Figura 2</b>	Tranquilizacion de reproductor por inmersion en solucion de 2 fenoxietanol, previo a la obtencion de gametos	19
<b>Figura 3</b>	Obtencion de gametos macho y hembra respectivamente	20
<b>Figura 4</b>	Incubacion de oocitos medicion de fertilidad y eclosion	20
<b>Figura 5</b>	Porcentaje de fertilidad para semen crioconservado de cachama blanca ( <i>Piaractus brachypomus</i> ) realizados a escala comercial Barras con asterisco son significativamente diferente ( $p < 0.05$ ) al control (Semen fresco) $n=9$	28
<b>Figura 6</b>	Porcentaje de eclosion para semen crioconservado de cachama blanca ( <i>Piaractus brachypomus</i> ) realizados a escala comercial No se presentaron diferencias significativas entre tratamientos ( $p > 0.05$ ) $n=9$	28

## LISTA DE TABLAS

	Pagina
<b>Tabla 1</b> Proporción de espermatozoides móviles/oozito en algunas especies acuícolas de importancia económica	15
<b>Tabla 2</b> Características seminales (fresco) de Cachama blanca ( <i>Piaractus brachipomus</i> ), después de la administración IM de 40 mg Kg <sup>-1</sup> de Extracto de Hipofisis de Carpa (EHC) Datos expresados como media ± SEM (n=23)	24
<b>Tabla 3</b> Fertilidad de semen de Cachama blanca ( <i>Piaractus brachipomus</i> ) criopreservado con tres diferentes sustancias crioprotectoras (DMSO, ETG y MET) y tres volúmenes de empaque (0.5, 2.5 y 5.0 mL), descongelado en baño de agua a 35 y 80°C Datos expresados como media ± error estándar (n=6)	26
<b>Tabla 4</b> Eclosión de Cachama blanca ( <i>Piaractus brachipomus</i> ), obtenido con semen criopreservado con tres sustancias crioprotectoras (DMSO, ETG y MET) y tres volúmenes de empaque (0.5, 2.5 y 5.0 mL) descongelado en baño de agua a 35 y 80°C Datos expresados como media ± error estándar (n=6)	27



UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS  
SISTEMA DE BIBLIOTECAS  
CENTRO DE INVESTIGACION  
AGROPECUARIA

## INTRODUCCION

La cachama blanca (*Piaractus brachypomus* Cuvier 1818) es un caracido de interes en la investigacion, debido a que es la especie nativa mas importante de la piscicultura colombiana. Sin embargo la mayoría de las investigaciones han sido realizadas en especies foraneas, principalmente en tilapia roja (*Oreochromis spp*), tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*) (Castillo *et al* 2003) y trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*)

Estudios revelan que el numero minimo requerido de espermatozoides (sptz) por oocito varia dependiendo de la especie y de sus estrategias reproductivas (Suquet *et al* 1995). Existen algunas aproximaciones al conocimiento del numero de espermatozoides necesario para fertilizar eficientemente un volumen conocido de huevos en especies tropicales (Cruz-Casallas *et al* , 2003, 2004), pero no pueden extrapolarse para todas las especies.

En la cachama blanca (*Piaractus brachypomus*), una proporcion de 50 000 sptz moviles por oocito con semen crioconservado son suficientes para realizar eficientemente el proceso de seminacion artificial donde un gramo (g) contiene entre 1000 y 1600 oocitos en esta especie (Bohorquez *et al* 2006) facilitando la preparacion y crioconservacion de la dosis de semen ajustada a la fecundidad de esta especie para usarlo a escala comercial en las granjas, permitiendo asi un uso eficiente de los recursos geneticos existentes en la region.

La crioconservacion de semen de peces en Colombia es un campo relativamente nuevo, en el cual todavia no se han logrado muchos progresos practicos y apenas unos pocos experimentos han sido realizados con limitado exito (Neira *et al* 1992, Cruz-Casallas *et al* 1999, Navarro - Poveda *et al* 2000) por lo que aun se recurre con frecuencia a ejemplares mantenidos en cautiverio o extraidos del medio ambiente.

En consecuencia, el objetivo de este trabajo fue evaluar de la utilización de semen crioconservado en los procesos de reproducción artificial a escala comercial de la cachama blanca (*Piaractus brachypomus* Cuvier 1818)

El Instituto de Acuicultura de los Llanos (IALL) desde hace varios años ha venido estandarizando protocolos para la crioconservación de semen de especies tropicales para ser utilizado en prácticas de inseminación artificial (IA) la cual implica una mayor eficiencia en la utilización de los recursos disponibles siendo la calidad y la cantidad de los gametos utilizados factores claves en este proceso para cualquier especie

La cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) es importante como recurso genético por su rusticidad hábitos alimenticios y, además, por la aceptación en nuestra dieta alimenticia como parte de la seguridad alimentaria que el país está implementando. Por lo tanto es de interés generalizar las técnicas que permitan romper la estacionalidad reproductiva característica de esta especie ictica tropical implementando la utilización de macropajillas de semen crioconservado, con el fin de disponer tanto de material genético como de alevinos para su cultivo. Para este propósito, el trabajo conjunto con las granjas y productores permite implementar esta tecnología a escala comercial haciendo un mejor aprovechamiento de los recursos genéticos existentes y fortaleciendo la apropiación de conocimiento por la comunidad académica nacional

## 1 OBJETIVOS

### 1.1 General

Evaluar la utilización de semen crioconservado en los procesos de reproducción artificial a escala comercial de cachama blanca (*Piaractus brachypomus* Cuvier, 1818)

### 1.2 Específicos

- a Evaluar el efecto de la utilización de semen crioconservado sobre la fertilidad de oocitos de Cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) en procesos de reproducción artificial a escala comercial
- b Evaluar el efecto de la utilización de semen crioconservado sobre el porcentaje de eclosión de oocitos de Cachama blanca (*Piaractus brachypomus*), en procesos de reproducción artificial a escala comercial
- c Verificar la eficiencia de la dosis semillante en semen fresco y crioconservado calculadas bajo condiciones de laboratorio, para el proceso de seminación artificial en Cachama blanca (*Piaractus brachypomus*)

## 2 MARCO TEORICO

### 2 1 Taxonomia (Segun Cuvier, 1818)

NOMBRE COMUN	Cachama blanca
FAMILIA	<i>Characidae</i>
SUBFAMILIA	<i>Serrasalminae</i>
GENERO	<i>Piaractus</i>
ESPECIE	<i>brachypomus</i>

### 2 2 Generalidades de la especie

La cachama blanca (*P. brachypomus*) es un pez de escama, nativo de los Llanos Orientales, que por sus habitos alimenticios omnivoros rapido crecimiento, calidad y aceptacion comercial de su carne es una especie ampliamente cultivada en los Llanos Orientales de Colombia (Arias y Vasquez 1988, Hernandez *et al* 1996) Durante la epoca de lluvias los adultos acumulan importantes cantidades de grasa en su cavidad corporal, la cual es utilizada durante la epoca de verano para los procesos de maduracion gonadal (Novoa y Ramos 1982 Arias y Vasquez 1988, Goulding y Carvalho 1992)

Actualmente la cachama blanca (*P. brachypomus* Cuvier) es la especie ictica nativa mas importante de la piscicultura continental de Colombia (Vasquez, 2004) Como la mayoria de las especies reofilicas la cachama blanca no se reproduce en cautiverio siendo necesaria la administracion exogena de hormonas para inducir la ovulacion y la espermiacion dos eventos imprescindibles para la produccion comercial de alevinos (Fresneda *et al* 2004)

Estudios realizados por Silva y Acuña (1997) han permitido determinar que bajo condiciones de cautiverio la cachama alcanza el maximo desarrollo gonadal durante la epoca que coincide con el periodo de maxima precipitacion pluvial en la region la cual ocurre de Abril a Julio

### **2 3 Condiciones de cultivo**

La cachama blanca crece satisfactoriamente en cuerpos de agua con temperatura de 24 - 29 °C, pH de 6.5 - 8.5 concentraciones de oxígeno de 4 ppm y alcalinidad y dureza superiores a 20 mg l<sup>-1</sup>

### **2 4 Generalidades de espermatozoides y oocitos**

Los espermatozoides de los peces tienen una estructura simple de tipo primitivo (Andrade *et al* 2001) Fundamentalmente, en peces pueden distinguirse dos tipos de espermatozoides: aquaespermatozoides (fertilización externa con o sin acrosoma, uniflagelados o biflagelados) e introspermatozoides (fertilización interna con o sin acrosoma, uniflagelados o biflagelados) (Jamieson y Leung 1991) Por su parte, la forma de la cabeza del espermatozoide varía ampliamente entre las especies de peces (Billard, 1990)

La carencia de acrosoma en la mayoría de los sptz de teleosteos es compensada con la presencia del aparato micropilar, el cual es un orificio en el corion del oocito que permite la entrada del sptz (Cosson *et al* 1999),

Velasco-Santamaria *et al* (2003) reportó que los oocitos de yamu (*Brycon amazonicus*) una especie nativa de los Llanos Orientales pierden rápidamente su fertilidad cuando son sometidos a bajas temperaturas. Bohorquez-Paez (2006) reporta de igual manera en la cachama blanca (*P. Brachypomus*) la directa intervención de las bajas temperaturas que se ve reflejado en la dosis seminante para semen crioconservado la cual es mayor comparada con la de semen fresco. Otros estudios realizados reportan que un gramo puede contener aproximadamente entre 1000 (Fresneda *et al* 2004) y 1600 (Ramírez *et al* 2005) oocitos.

### **2 5 Dosis seminante**

En estudios realizados por Velasco-Santamaria *et al* (2004b) en yamu (*B. amazonicus*), reportaron una dosis seminante de 50 000 y 75 000 sptz móviles/oocito para semen fresco y crioconservado, respectivamente.

Estudios realizados por Bohorquez-Paez (2006) en cachama blanca (*P brachypomus*), reportaron una dosis seminante de 2 000 y 50 000 sptz móviles/ oocito para semen fresco y crioconservado respectivamente

Algunos reportes aun no pueden extrapolarse a escala comercial por tal motivo dicha variable ha sido objeto de varios estudios intentando optimizar los procedimientos a nivel productivo (Suquet *et al* 1995)

## **2 6 Características seminales**

Los sptz son inmóviles en los testículos en la mayoría de las especies de peces estudiadas por tal razón se les debe agregar una solución activadora que desencadena la movilidad del sptz. Experiencias con semen fresco y crioconservado en cachama blanca (*P Brachypomus*) muestran que la temperatura, la composición de la solución activadora, la calidad de agua y las sustancias crioprotectoras en el caso de semen crioconservado disminuyen la movilidad espermática (Bohorquez-Paez 2006)

### **2 6 1 Activación espermática**

El volumen a adicionar de solución activadora, debe conservar la proporción 1 3 (oocitos-semen solución activadora). Una solución de bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ) al 1% aumenta el tiempo de activación de sptz de yamu (*B amazonicus*) y cachama blanca (*P brachypomus*) (Navarro-Poveda *et al* 2000) siendo especialmente útil para activar la movilidad espermática de semen crioconservado (Cruz-Casallas *et al* 2004)

## **2 7 Evaluación de la fertilidad**

Las hembras deben estar sexualmente maduras presentando oocitos con predominancia de sus núcleos o vesículas germinativas en posición intermedia entre el centro y la periferia del oocito (Bruzka 1979). En la mayoría de las especies tropicales de agua dulce, la ovulación puede inducirse hormonalmente con extracto de hipófisis de carpa (EHC) administrado según los protocolos establecidos para cada especie. Por ejemplo para cachama blanca (*Piaractus*

*brachypomus*), se ha utilizado con éxito 5,75 mg de EHC repartida en tres inyecciones a intervalos de 24 y 12 h (Vasquez, 2004)

La medición de la fertilidad debe efectuarse después de 6 a 7 horas de incubación para yamu (*B amazonicus*) y cachama blanca (*P brachypomus*) respectivamente ya que este momento coincide con el cierre del blastoporo en estas especies. Un oocito fertilizado se caracteriza por ser esférico, translúcido y por contener en su interior un embrión en estado de cierre del blastoporo y los no fertilizados se muestran opacos, blanquecinos y con un contenido irregular en su interior (Cruz-Casallas *et al* 2005c)

El resultado se expresa en porcentaje, el cual se determina a partir 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

En la Tabla 1 se muestran las proporciones mínimas de spermatozoos móviles/oocito con semen fresco y crioconservado para obtener máximos porcentajes de fertilidad en algunas especies de importancia económica

## **2.8 Efecto del volumen de la dosis seminante con semen fresco**

Teóricamente pequeños volúmenes de dosis seminante podrían reducir los porcentajes de fertilidad debido a la menor posibilidad de interacción entre los gametos (Suquet *et al* 1995), sin embargo dosis de volúmenes muy pequeños hasta de 15  $\mu\text{L}$  pueden resultar tan eficientes como aquellas de 180  $\mu\text{L}$  en cachama blanca (*P brachypomus*) utilizando semen fresco (Bohorquez-Paez, 2006)

Estudios realizados en yamu (*B amazonicus*) dosis de 3  $\mu\text{L}$  mostraron porcentajes de fertilidad similares a dosis de volumen 60 veces mayor (Cruz-Casallas *et al* 2006) permitiendo la formulación de dosis seminantes de pequeños volúmenes, más fáciles de almacenar en los contenedores de nitrógeno líquido

Lo anterior tiene especial importancia particularmente cuando se utiliza semen crioconservado ya que el costo de almacenamiento del material seminal es

directamente proporcional al volumen de las dosis crioconservadas (Velasco-Santamaria *et al* 2004a)

**Tabla 1 Proporción de espermatozoides móviles/oocito en algunas especies acuícolas de importancia económica**

Especie	Numero de espermatozoides móviles/oocito		Referencia
	Semen Fresco	Semen Crioconservado	
<i>Brycon amazonicus</i>	50 000	75 000	Velasco Santamaria <i>et al</i> 2004b
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	20 000	NR <sup>1</sup>	Billard y Carpentier, 1973
	300 000	NR <sup>1</sup>	Billard, 1975
<i>Ictalurus punctatus</i>	40 000	NR <sup>1</sup>	Billard, 1966
	NR <sup>1</sup>	230 000	Tiersch <i>et al</i> 1994
<i>Cyprinus carpio</i>	13 000	NR <sup>1</sup>	Suquet <i>et al</i> 1995
	300 000	NR <sup>1</sup>	Koldras y Mejza, 1983, Billard, 1975
<i>Poecilia reticulata</i>	50 000 - 100 000	NR <sup>1</sup>	Billard, 1966
<i>Piaractus brachypomus</i>	2 000	50 000	Bohorquez Paez, 2006

NR<sup>1</sup> = No reportado

## 2.9 Reproducción artificial

La reproducción es un proceso biológico fundamental para la perpetuación de los organismos y el establecimiento de sistemas de producción comercial. Por lo tanto, se debe buscar y desarrollar métodos que permitan controlar y manipular el ciclo reproductivo de los organismos sometidos a cultivo de manera eficiente y ecológicamente conveniente. La crioconservación de gametos constituye una alternativa para el establecimiento de bancos genéticos, el mantenimiento de la biodiversidad y el aseguramiento de la conservación física de una especie.

(Ramirez *et al* 2005) Estas circunstancias han hecho que esta tecnología este siendo adaptada rápidamente para las especies nativas colombianas (Cruz-Casallas *et al* 2004)

El empleo de semen crioconservado, abre una nueva posibilidad para la producción comercial de alevinos, ya que permite reproducir los peces mediante todo el año (Cruz-Casallas *et al* 2005b) Los resultados experimentales sugieren que, en la mayoría de los casos, son necesarios ajustes especie-específicos a los protocolos existentes (Gow *et al* 1993 Ciereszko y Dabrowski, 1993 Cruz-Casallas 2001)

## **2 10 Crioconservacion**

Es una técnica de congelación de tejidos células u otros materiales biológicos a muy bajas temperaturas (-196° C), en la cual los materiales permanecen genéticamente estables y metabólicamente inertes (Caleño, 1995), permite el almacenamiento teóricamente indefinido sin deteriorarse a través del tiempo (Mazur, 1985), lo que representa un seguro de vida para muchas especies cuyo hábitat se encuentre intervenido o alterado. El uso de semen congelado es un medio práctico para aumentar el tamaño genéticamente efectivo de las poblaciones piscícolas y mantener su diversidad genética, especialmente de aquellas mantenidas en cautiverio (Piiironen, 1994)

El Instituto de Acuicultura de la Universidad de los Llanos, durante los últimos años ha venido estandarizando protocolos para la crioconservación de semen de especies de peces tropicales con la obtención de alevinos a nivel de laboratorio (Navarro-Poveda *et al* , 2004) lo cual abre la posibilidad de utilizar esta tecnología a escala comercial dejando ver el potencial reproductivo de las especies nativas

## **2 11 Crioconservacion en otras especies de peces**

La calidad del esperma crioconservado es dependiente de varios factores, tanto intrínsecos como extrínsecos. Entre los factores intrínsecos se puede mencionar el grado de maduración gonadal y la calidad inicial del esperma mientras que entre

los extrínsecos se incluyen todas las variables del proceso mismo de crioconservación (Kopeika *et al* 2000) La movilidad espermática es un requisito clave en la determinación de la calidad y capacidad fertilizante del semen (Stoss, 1983) Diversos parámetros han sido usados para evaluar la movilidad estudios más recientes se refieren al porcentaje de movilidad espermática observada visualmente (Cosson *et al* 1999, Ingermann *et al* 2002) La duración de la movilidad, habilidad de fertilización y velocidad del espermatozoide dependen de la temperatura de la solución de activación (Billard *et al* 1995) por lo tanto una disminución en la temperatura de la solución de nado resulta en una duración prolongada de la movilidad (Stoss, 1983)

El pH ha sido reportado como uno de los principales factores activantes del espermatozoide en algunas especies (Cosson y Linhart, 1996 Ingermann *et al* 2002) Se ha demostrado que el pH extracelular e intracelular así como la composición iónica de la solución activante influye la iniciación y duración de la movilidad espermática (Marian *et al* 1993) Medina *et al* (2005) reportaron que las condiciones de congelación-descongelación de semen se relacionan directamente con la movilidad y fertilidad postdescongelación del semen de yamu (*B. amazonicus*)



UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS  
SISTEMA DE BIBLIOTECAS  
INVESTIGACION  
VENEZUELA

### 3 MATERIALES Y METODOS

#### 3 1 Localizacion

##### 3 1 1 Estacion piscicola del Instituto de Acuicultura de los Llanos (IALL)

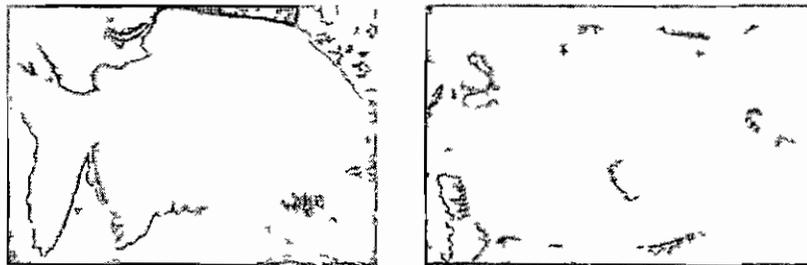
Todos los experimentos fueron realizados en la estacion piscicola del Instituto de Acuicultura de la Universidad de los Llanos localizada en la vereda Barcelona, a 4 km de la Ciudad de Villavicencio (Meta) El clima esta caracterizado por una altura de 418 msnm, temperatura promedio anual de 25°C precipitacion pluvial de 4050 mm y humedad relativa de 75% (IDEAM, 2008)

##### 3 1 2 Granjas comerciales

Para los ensayos a escala comercial fueron utilizadas dos granjas comerciales productoras de alevinos (Langostinos del Llano y Piscicola Aquaverde) ubicadas en los municipios de Cumaral y vereda La Cuncia, Municipio de Villavicencio – Departamento del Meta, respectivamente

#### 3 2 Animales experimentales

Se emplearon 23 reproductores adultos machos de Cachama blanca (*P brachypomus*) sexualmente maduros con mas de 6 años de edad con un peso corporal de  $5.0 \pm 0.6$  kg y longitud total de  $63.6 \pm 3.0$  cm, mantenidos en la Estacion Piscicola del IALL. Adicionalmente fueron utilizados 9 reproductores adultos machos de Cachama blanca (*P brachypomus*) sexualmente maduros, con peso corporal de  $5.1 \pm 0.7$  kg y longitud total de  $64.3 \pm 1.9$  cm, para la realizacion de los ensayos a escala comercial

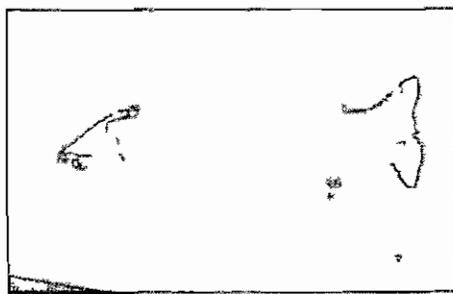


**Figura 1** Ejemplares de cachama blanca (*P brachypomus* Cuvier 1818)

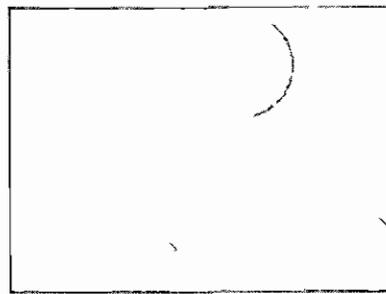
### 3.3 Inducción hormonal y obtención de gametos

En cada experimento la espermiación fue inducida con  $4.0 \text{ mg kg}^{-1}$  de peso corporal de extracto de hipófisis de carpa (EHC) administrada en una única inyección IM, mientras que la maduración final ovarica y la ovulación fueron inducidas con  $5.75 \text{ mg kg}^{-1}$  de EHC, distribuida en tres aplicaciones con intervalos de 24 y 12 h.

El semen y los oocitos fueron extraídos mediante masaje craneo-caudal del abdomen 18 a 20 h después de la inyección de la hormona y 6 a 7 h después de la última inyección de EHC, respectivamente. Antes de la extracción de los gametos de los reproductores, estos fueron sumergidos durante 3 a 5 minutos en una solución de 300 ppm de 2-fenoxietanol (Sigma Co. St. Louis, Missouri) para ser tranquilizados. Luego fueron retirados de la solución anestésica, secados cuidadosamente en la región abdominal para reducir el riesgo de contaminación de los gametos.



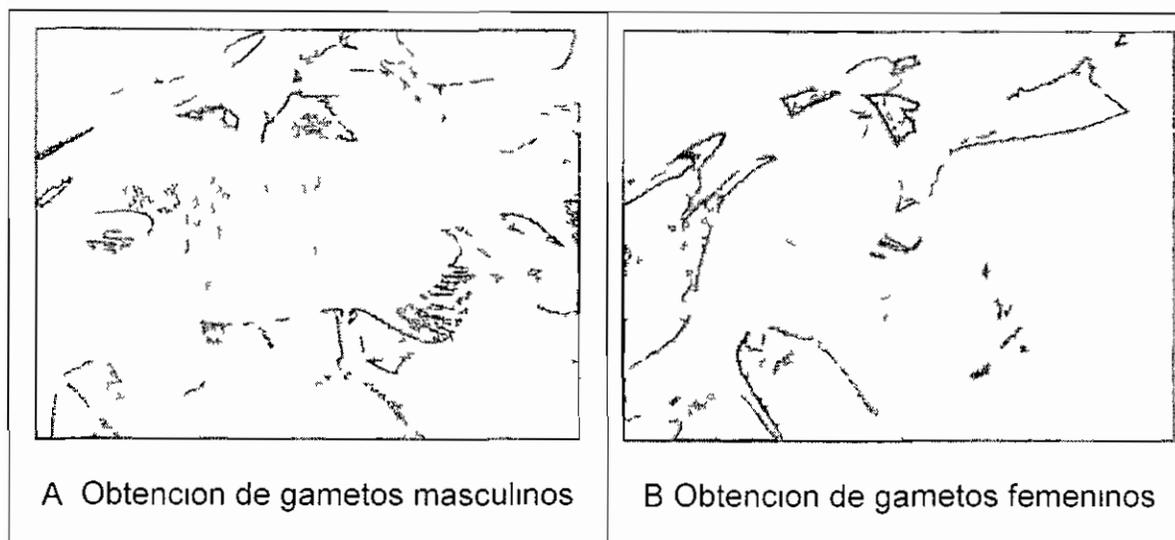
Inmersión en Solución anestésica



Oocitos vistos al estereoscopio

**Figura 2** Tranquilización de reproductor por inmersión en solución de 2-fenoxietanol, previa a la obtención de gametos

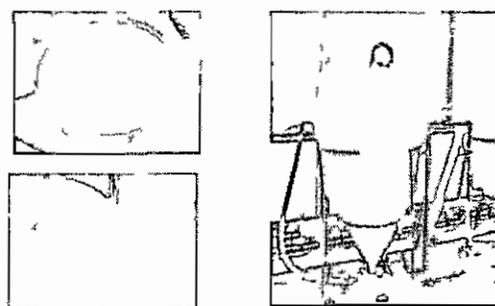
El semen fue colectado directamente en tubos de vidrio aforado de 15 mL y los oocitos en un recipiente plástico limpio y completamente seco, pesados en una balanza digital (Scout Pro Ohaus Corporation, Pine Brook, NJ, USA), evitando siempre el contacto con humedad para prevenir su hidratación prematura.



**Figura 3** A Obtencion de gametos macho Y B hembra respectivamente

### 3 4 Ensayos a Escala Comercial

Se llevaron a cabo pruebas de fertilidad a escala comercial en dos granjas productoras de alevinos del Departamento del Meta consistentes en seminar desoves completos de hembras inducidas hormonalmente como se describio anteriormente (peso desove  $200.6 \pm 21.7$  g ca  $1510 \pm 73$  oocitos/g) con dosis seminales promedio con semen fresco y crioconservado de 18 000 spz/oocito y 120 000 spz/oocito, respectivamente. Los oocitos seminados fueron mantenidos en incubadoras con flujo vertical ascendente tipo Waynarovich, bajo las condiciones de produccion de cada granja.



**Figura 4** Incubacion oocitos y proceso de medicion de fertilidad y eclosion

### 3.5 Calidad seminal y crioconservación

El volumen seminal se midió por medio del tubo de vidrio aforado de 15 ml donde fue recolectada la muestra. La movilidad fue estimada en una lamina excavada (1.0-1.2 mm de profundidad Micro Slides Premiere China) usando 10  $\mu$ L de semen activado con 190  $\mu$ L de agua destilada bajo un microscopio óptico (10X). El tiempo de activación fue cronometrado y expresado en segundos.

La movilidad y velocidad espermática individual fueron establecidas objetivamente por medio de un sistema asistido por computador para análisis espermático CASA (MedeaLab CASA-version 5.4 Alemania) para lo anterior fue previamente instalada una cámara de Makler (SefiMedical Instruments, Israel) acoplada a un microscopio óptico de contraste de fase (Nikon E400, Japon) en la cual fue depositada una alícuota de aproximadamente 0.2  $\mu$ L de semen fresco o crioconservado y posteriormente activado con 75  $\mu$ L de una solución de  $\text{NaHCO}_3$  al 1%. La movilidad fue registrada en video y posteriormente analizada en el CASA a intervalos de 10 seg hasta movilidad cero.

El espermatocrito se obtuvo por centrifugación de una muestra de semen (14000 G x 5 min, Microcentrifuga EBBA 12 Alemania) utilizando tubos microcapilares de 75 mm de longitud y 1.1 mm de diámetro interno y la concentración espermática por medio de recuento de espermatozoides en cámara de *Neubauer*, previa dilución 1:1200 con solución salina fisiológica.

Para cada congelación se utilizó un pool (*mezcla*) de semen de tres machos previamente evaluados, fueron diluidas en proporción 1:5 (semen diluyente) en una solución constituida por 5.5% de glucosa (p/v), 12% de yema de huevo (v/v), 10% de dimetilsulfoxido (DMSO Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA) o 5% de etilén glicol (Sigma Chemical Co St. Louis MO USA) o 10% de metanol (Sigma Chemical Co St. Louis MO USA). Muestras con movilidad masculina inferior a 80% no fueron procesadas. Posteriormente el semen fue empacado en pajillas de 0.5 mL (IMV Instrument de Medecine Veterinaire Minneapolis, USA), 2.5 y 5.0 mL (Minitub Abful - und Labortechnik GmbH & Co KG). Las pajillas fueron

selladas en ambos extremos con esferas metálicas posteriormente ubicadas en un soporte vertical e introducidas en un termo seco de vapores de nitrógeno líquido (NL) durante 30 min (Taylor-Wharton, CP 100, Theodore, AL USA) En todos los casos, durante el proceso de congelación el descenso de la temperatura fue monitoreado con una termocupla (WBrand USA Precisión 0.01°C y rango de -200 a 800°C) insertada directamente en una pajilla con el diluyente

Finalizado el proceso, todas las pajillas fueron trasladadas a un termo de almacenamiento (Taylor-Wharton HC 35 Theodore, AL, USA) y sumergidas directamente en el NL permaneciendo allí hasta su evaluación. Quince días después del proceso de congelación fueron tomadas al azar y descongeladas: doce (12) pajillas de cada tratamiento, seis de las cuales se descongelaron a 35°C y las seis restantes a 80°C. La descongelación del semen se realizó en baño de agua a 35°C durante 90 seg para todos los volúmenes de empaque y 80°C durante 10 seg para pajillas de 0.5 mL y 25 seg para pajillas de 2.5 y 5.0 mL.

### **3.6 Diseño experimental**

Se empleó un diseño experimental completamente al azar constituido por un arreglo factorial 3x3x2 donde el factor 1 corresponde a las tres sustancias crioprotectoras, el factor 2 a los tres volúmenes de empaque y el factor 3 a las dos temperaturas de descongelación, con un total de 18 tratamientos. En cada una de las pajillas fue evaluada la movilidad post-descongelación como se describió anteriormente.

### **3.7 Pruebas de fertilidad y eclosión**

Para evaluar el efecto de la temperatura de descongelación y del volumen de empaque sobre la fertilidad, 2 g de oocitos (ca. 3200 oocitos) fueron sembrados con 470 µL de semen descongelado, activados con NaHCO<sub>3</sub> al 1% e incubados con flujo vertical en recipientes plásticos de 2.0 L. Como control se empleó la misma cantidad de oocitos sembrados con 100 µL de semen fresco. Inicialmente se comparó conjuntamente el efecto de los tratamientos, descongelados a 35 y

80°C sobre el porcentaje de fertilidad y eclosion. Con base a los resultados del analisis anterior se evaluo el efecto de las sustancias crioprotectoras y del volumen de empaque sobre la fertilidad y eclosion manteniendo constante la temperatura de descongelacion en 35°C durante 90 seg. La fertilidad fue evaluada 6 horas postfertilizacion (HPF) calculando la proporcion de oocitos fertilizados (estado cierre del blastoporo aspecto translucido) en un total de 100 embriones y expresado en porcentaje. El porcentaje de eclosion fue determinado entre las 13 y 15 HPF.

### **3.8 Analisis estadistico**

Se utilizo estadistica descriptiva para la informacion correspondiente a las caracteristicas seminales. Los resultados del uso de semen fresco y crioconservado en terminos de tasas de fertilidad y eclosion, fueron analizados mediante pruebas de "t" no apareada o analisis de varianza no parametrico (prueba de Kruskal-Wallis). Previo a cualquier analisis estadistico de los resultados, fueron realizadas pruebas de Bartlett (Johnson & Leone, 1974) para determinar la homogeneidad de los datos obtenidos y orientar el tipo de analisis estadistico a realizar. Para los datos expresados en porcentaje, estos se transformaron en arcoseno para poder realizar el analisis respectivo. En todos los casos,  $p < 0,05$  fue utilizado como criterio estadistico para establecer diferencias significantes.

#### 4 RESULTADOS

El presente trabajo en conjunto con otros hechos anteriormente permitio establecer algunas características reproductivas en cachama blanca (*P. brachypomus*) especie nativa propia de los Llanos Orientales colombianos, sobre lo cual no hay informacion en esta especie

En La Tabla 2 se muestran las características del cuadro espermático de los 23 machos evaluados. El volumen seminal fue de  $13 \pm 1.4$  mL, mostrando una movilidad superior al 80%. Por su parte el tiempo de activación presento rangos entre 36 y 56 seg mientras que la concentración espermática fluctuo entre  $2.0 \times 10^6$  y  $18 \times 10^6$  espermatozoides por  $\mu\text{L}$ . Se encontro una relación positiva entre las variables de espermatocrito y concentración espermática ( $n=23$ ,  $r^2=0.62$ ,  $p<0.001$ ). La evaluación realizada, asistida por computador (CASA), mostro un semen con una movilidad total inicial de 84% descendiendo notablemente a partir de los 20 segundos.

**Tabla 2** Características seminales (fresco) de Cachama blanca (*Piaractus brachypomus*), después de la administración IM de  $4.0 \text{ mg Kg}^{-1}$  de Extracto de Hipofisis de Carpa (EHC). Datos expresados como media  $\pm$  SEM ( $n=23$ )

Característica Seminal	
Volumen (mL)	$13 \pm 1.4$
Movilidad (%)	$86.3 \pm 1$
Tiempo de Activación (seg)	$45.4 \pm 1.4$
Concentración espermática (Sptz/ $\mu\text{L} \times 10^6$ )	$11.3 \pm 0.9$
Concentración por reproductor ( $\times 10^9$ )	$30.0 \pm 4.0$
Espermatocrito (%)	$25 \pm 1.8$

La Tabla 3 muestra el efecto conjunto de las dos temperaturas de descongelación 35 y 80°C, sobre la tasa de fertilización. Se observa una tendencia de los mayores porcentajes de fertilidad con los crioprotectores DMSO al 10% y MET al 10% en pajillas de 0.5 y 2.5 mL descongelado a 35°C. El semen descongelado a 80°C presentó porcentajes de fertilidad más bajos con relación al semen descongelado a 35°C. En cuanto al porcentaje de eclosión, el semen crioconservado con DMSO al 10% y MET al 10% en pajillas de 2.5 mL descongelado a 35°C, registraron los porcentajes más altos con promedios similares (36.6%). De igual forma, el semen crioconservado con ETG al 5% y descongelado a la misma temperatura, mostró un comportamiento muy similar utilizando los tres volúmenes de empaque 0.5, 2.5 y 5.0 mL (27.8, 27.5 y 27.9%, respectivamente) sin diferencia significativa entre los tratamientos ( $p > 0.05$ ). El semen fresco mostró el mayor porcentaje de eclosión (85.3%) siendo significativo ( $p < 0.05$ ) en relación a los demás tratamientos (Tabla 4).

En los ensayos a escala comercial, el DMSO 10% presentó valores altos de fertilidad ( $72.7 \pm 4.9\%$ ) sin diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) cuando comparado con el semen fresco ( $82.1 \pm 3.4\%$ ) (Figura 5). En cuanto al porcentaje de eclosión, el MET 10% presentó el valor más alto ( $81.6 \pm 4.2\%$ ) cuando comparado con el semen fresco ( $78.8 \pm 3.4\%$ ) y el DMSO 10% ( $64.8 \pm 7.5\%$ ) sin diferencias significativas entre ellos ( $p > 0.05$ ) (Figura 6).

**Tabla 3** Fertilidad de semen de Cachama blanca (*Piaractus brachypomus*), criopreservado con tres diferentes sustancias crioprotectoras (DMSO, ETG y MET) y tres volúmenes de empaque (0.5, 2.5 y 5.0 mL), descongelado en baño de agua a 35 y 80°C. Datos expresados como media  $\pm$  error estándar (n=6)

Crioprotector	Baño de agua (°C)	Pajilla (mL)	Fertilidad (%)
DMSO 10%	35	0.5	59 $\pm$ 3 <sup>cde</sup>
		2.5	47 $\pm$ 6 <sup>abcd</sup>
		5.0	41 $\pm$ 4 <sup>abcd</sup>
	80	0.5	13 $\pm$ 5 <sup>ab</sup>
		2.5	18 $\pm$ 7 <sup>abc</sup>
		5.0	18 $\pm$ 6 <sup>abcd</sup>
ETG 5%	35	0.5	43 $\pm$ 5 <sup>abcd</sup>
		2.5	46 $\pm$ 2 <sup>abcd</sup>
		5.0	40 $\pm$ 3 <sup>abcd</sup>
	80	0.5	9 $\pm$ 4 <sup>a</sup>
		2.5	14 $\pm$ 6 <sup>ab</sup>
		5.0	17 $\pm$ 7 <sup>abc</sup>
MET 10%	35	0.5	53 $\pm$ 3 <sup>bcd</sup>
		2.5	63 $\pm$ 3 <sup>de</sup>
		5.0	41 $\pm$ 7 <sup>abcd</sup>
	80	0.5	28 $\pm$ 4 <sup>abcd</sup>
		2.5	23 $\pm$ 4 <sup>abc</sup>
		5.0	23 $\pm$ 10 <sup>abcd</sup>
Control (semen fresco)			89 $\pm$ 7.3 <sup>e</sup>

Superíndice diferentes en la misma columna indica diferencia estadística ( $p < 0.05$ )

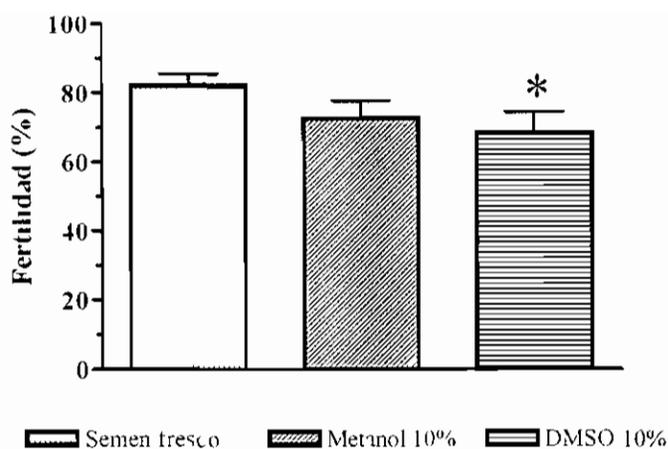
**Tabla 4** Porcentaje de eclosion de Cachama blanca (*Piaractus brachipomus*), obtenido con semen crioconservado con tres sustancias crioprotectoras (DMSO, ETG y MET) y tres volúmenes de empaque (0.5, 2.5 y 5.0 mL), descongelado en baño de agua a 35 y 80°C. Datos expresados como media  $\pm$  error estándar (n=6)

Crioprotector	Baño de agua (°C)	Pajilla (mL)	Eclosion (%)
DMSO 10%	35	0.5	25.9 $\pm$ 2.7 <sup>ab</sup>
		2.5	36.6 $\pm$ 8.5 <sup>ab</sup>
		5.0	22.9 $\pm$ 6.9 <sup>ab</sup>
	80	0.5	5.8 $\pm$ 2.9 <sup>a</sup>
		2.5	7.5 $\pm$ 3.3 <sup>a</sup>
		5.0	13.4 $\pm$ 6 <sup>ab</sup>
ETG 5%	35	0.5	27.8 $\pm$ 6.4 <sup>ab</sup>
		2.5	27.5 $\pm$ 5 <sup>ab</sup>
		5.0	27.9 $\pm$ 5.6 <sup>ab</sup>
	80	0.5	7.5 $\pm$ 3.4 <sup>a</sup>
		2.5	10.1 $\pm$ 5.1 <sup>ab</sup>
		5.0	19.8 $\pm$ 8.8 <sup>ab</sup>
MET 10%	35	0.5	26.2 $\pm$ 3 <sup>ab</sup>
		2.5	36.6 $\pm$ 8.5 <sup>ab</sup>
		5.0	26.4 $\pm$ 7.6 <sup>b</sup>
	80	0.5	8.9 $\pm$ 4.1 <sup>a</sup>
		2.5	16.2 $\pm$ 7.2 <sup>ab</sup>
		5.0	18.5 $\pm$ 12.8 <sup>ab</sup>
Control (semen fresco)			85.3 $\pm$ 3.7 <sup>c</sup>

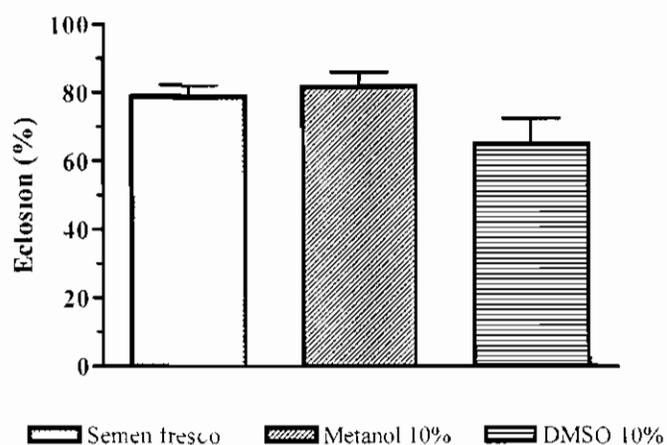
Superíndice diferentes en la misma columna indica diferencia estadística (p<0.05)



UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS  
 SISTEMA DE EDUCACIÓN  
 MÓDULO DE GRADUACIÓN  
 Villavicencio - Meta



**Figura 5** Porcentaje de fertilidad para semen crioconservado de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) realizados a escala comercial. Barras con asterisco son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ) al control (semen fresco)  $n=9$



**Figura 6** Porcentaje de eclosion para semen crioconservado de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) realizados a escala comercial. No se presentaron diferencias significativas entre tratamientos ( $p > 0.05$ )  $n=9$

## 5 DISCUSION

En la producción comercial de peces la evaluación de las características seminales es de gran interés para asegurar la eficiencia de la fertilización artificial y para evaluar los protocolos de crioconservación. Las muestras seminales para este trabajo presentaron condiciones aptas para su crioconservación mostrando un porcentaje de movilidad del 86%. Este valor se encuentra dentro del rango reportado para la Cachama blanca (Navarro *et al* 2004, Fresneda *et al* 2004) y para otra especie nativas como el Yamu (*Brycon amazonicus*) (Cruz-Casallas *et al* 2004)

La congelación espermática utilizando vapores de NL es la técnica más utilizada en peces (Cruz-Casallas *et al* , 2004). Durante este proceso el espermatozoide está sujeto a cambios drásticos en su medio físico y químico: formación de cristales de hielo, estrés mecánico y osmótico y desestabilización de la membrana plasmática (Lahnsteiner *et al* , 1992, Labbe *et al* 1997). Pajillas de menor diámetro como 0.5 mL proporcionan un índice de congelación más alto en relación con los macrotubos (2.5 y 5.0 mL), los cuales proporcionan índices más bajos de congelación y una meseta más larga (Bwanga *et al* 1990, 1991). Lahnsteiner *et al* (2000) y Cabrita *et al* (2001) reportan un índice de congelación alto para semen de ciprinidos y trucha arco iris empacado en pajillas de 0.5 mL ( $80^{\circ}\text{C min}^{-1}$  de  $-4$  a  $-50^{\circ}\text{C}$  y  $92.8^{\circ}\text{C min}^{-1}$  de  $-20$  a  $-100^{\circ}\text{C}$  respectivamente). De igual forma, este último muestra tasas relativamente bajas para pajillas de 1.8 y 5 mL similares o lo reportado en este estudio, así como lo reportado por Richardson *et al* (1999) para semen de *Pleuronectes ferrugineus* utilizando pajillas de 1.7 mL con una tasa de congelación de  $19.5^{\circ}\text{C min}^{-1}$  entre los  $-15$  y  $-45^{\circ}\text{C}$ .

El proceso de descongelación es uno de los parámetros más sensibles durante la crioconservación. Las movilidades post-descongelación determinadas en el presente estudio fueron inferiores a lo descrito por Carosfeld *et al* (2003) activando el semen de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) con bicarbonato al 1%. Navarro *et al* (2004), reportan movilidades post-descongelación superiores

utilizando sustancias crioprotectoras similares DMSO 10% (40%), ETG 5% (37%) y MET 10% (57%), estos últimos con incorporación de leche entera en polvo como diluyente con una temperatura de descongelación a 35°C Fresneda *et al* (2004) reportan valores superiores cuando comparado con el presente trabajo utilizando DMSO y MET (80.3 y 78% respectivamente) Cabrita *et al* (2001), muestran movibilidades del 45% para semen de trucha arco iris crioconservado con DMSO al 7%, descongelado a 25°C durante 30 seg. La evaluación del semen post-descongelación a una temperatura de 80°C, evidenció la disminución en el porcentaje de movilidad y el posible daño en la integridad de la membrana celular primordialmente en semen crioconservado en pajillas de 0.5 mL. Sin embargo, Velasco-Santamaria *et al* (2004b) reportan movibilidades para Yamu (*Brycon amazonicus*) crioconservado con DMSO en pajillas de 2.5 o 4.0 mL (30 y 30% respectivamente) valores similares a los encontrados en este estudio con una temperatura de descongelación de 80°C. Los crioprotectores de mejor comportamiento fueron DMSO y MET, debido probablemente a su capacidad de entrada y salida de la célula espermática a favor del gradiente de concentración (Tiersch *et al* 1998 Vincent *et al* , 1998) así como su capacidad de mantener la integridad de la membrana y la función mitocondrial (Ogier de Baulny *et al* , 1997). A pesar de las notables disminuciones de la movilidad espermática y tiempo de activación a 80°C como temperatura de descongelación las temperaturas altas pueden ser consideradas viables dentro de un rango de tiempo corto reflejando una velocidad de descongelación rápida que puede ayudar a disminuir el efecto de recristalización presentado para las células espermáticas y el efecto térmico sobre la membrana (Tiersch *et al* , 1998).

Fogli da Silveira *et al* (1990) obtuvieron una fertilidad media de 21.1% descongelando semen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) de 70 a 80°C (3 a 4 seg) en pellets de 0.5 mL porcentajes menores cuando comparado con lo observado en este estudio al utilizar como crioprotector MET en los tres volúmenes de empaque. Velasco-Santamaria *et al* (2004) obtuvieron fertilidades inferiores al 45% para Yamu (*Brycon amazonicus*) descongelando el semen a

temperaturas altas (80°C) reflejando una reducción en los porcentajes de fertilidad. La reducción de la calidad seminal puede ser atribuible posiblemente a ligeras desviaciones de las condiciones óptimas de descongelación para temperaturas altas como la utilizada en este estudio. Lo cual se pudo reflejar en la variabilidad de los porcentajes de fertilización obtenidos. Steinber *et al* (1995) reportan valores de 81% de fertilidad para semen de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) crioconservado en pajillas de 4 y 5 mL de igual forma Cabrita *et al* (2001), reportan para esta misma especie fertilidades del 75% en pajillas de 5 y 0 mL. Especie como *Ictalurus furcatus* muestra una fertilidad de 0% utilizando semen crioconservado con MET solución salina Hanks y leche en polvo en pajillas de 0.5 y 1 mL (Bart *et al* 1998), confirmando la diferencia en los procesos óptimos requeridos para cada especie.

Los volúmenes de empaque no tradicionales utilizados en el presente trabajo (2.5 y 5.0 mL) mostraron fertilidades cercanas al semen fresco, demostrando su utilidad desde el punto de vista práctico a pesar del posible alto porcentaje de células dañadas que puedan presentarse (Bwanga *et al* 1990, 1991) y de movibilidades menores del 50% (Yao *et al* 2000, Richardson *et al* 1999) reportadas en otras especies. Los resultados anteriores concuerdan con lo reportado por Ciereszco *et al* (1999) en la congelación de semen de muskellunge (*Exos masquinungy*) donde se expone que no existe una relación entre la movilidad espermática post-descongelación y la fertilidad. El volumen más grande reduce el tiempo necesario para congelar y descongelar y poder fertilizar volúmenes más grandes de oocitos requeridos en las granjas comerciales a demás de la poca utilización de pajillas durante el proceso de crioconservación.

De forma general las tasas de eclosión fueron menores utilizando 80°C como temperatura de descongelación, esto debido a los posibles daños sobre la membrana plasmática afectando el desarrollo de los primeros estados embrionarios. La literatura consultada no reporta resultados sobre sobrevivencia larval de la especie que permitan confrontar los resultados obtenidos. Sin embargo

en especies diferentes, Suquet *et al* (1998), evaluaron la sobrevivencia larval de *Psetta maxima* con semen crioconservado con DMSO al 10%, obteniendo un  $89.9 \pm 4.5\%$ , valor superior a lo mostrado en este estudio. Los efectos de la crioconservación sobre el material genómico son reflejados en las tasas de fertilidad, el desarrollo embrionario y en la sobrevivencia y desempeño larval.

Los resultados obtenidos en los experimentos de dosis seminales indican que una proporción de 2 000 sptz móviles/ovocito con semen fresco son suficientes para obtener porcentajes de fertilidad por encima del 90% y que una proporción ajustada de 50 000 sptz móviles/ovocito con semen crioconservado son suficientes para obtener porcentajes de fertilidad por encima del 80% en el proceso de seminación artificial en cachama blanca (*P. brachypomus*). Billard (1966) reportó en semen fresco una dosis seminale entre 50 000 y 100 000 y de 40 000 sptz móviles/ovocito para guppy (*Poecilia reticulata*) y catfish (*Ictalurus punctatus*), respectivamente. Billard y Carpentier (1973) reportaron con semen fresco para Trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) una proporción de 20 000 sptz móviles/ovocito y Velasco-Santamaria *et al* (2004b) reportaron una dosis de 50 000 sptz móviles/ovocito en yamu (*B. amazonicus*), siendo en general superiores a la encontrada en el presente estudio.

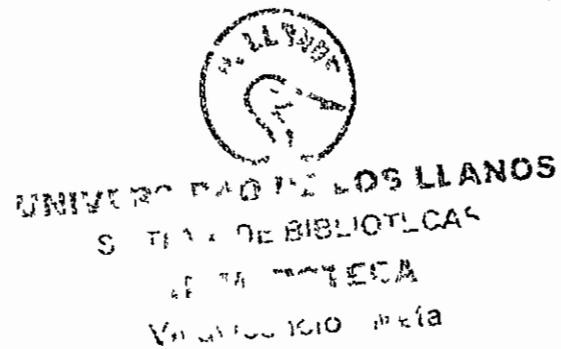
Tiersch *et al* (1994) reportaron para semen crioconservado de channel Catfish (*Ictalurus punctatus*) 230 000 sptz móviles/ovocito y Velasco-Santamaria *et al* (2004b) reportaron una dosis seminale ajustada a 75 000 sptz móviles/ovocito para semen crioconservado en yamu (*B. amazonicus*). Las proporciones reportadas anteriormente son considerablemente superiores cuando comparadas con la dosis seminale ajustada de 50 000 sptz móviles/ovocito para semen crioconservado halladas en el presente trabajo para cachama blanca (*P. brachypomus*).

## 6 CONCLUSIONES

- Las características seminales de la cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) observadas en el presente trabajo son coherentes con los reportes previos, lo cual confirma que la especie se caracteriza por altos volúmenes de semen de concentración intermedia, facilitando procesos de manipulación del semen como la crioconservación
- Un protocolo eficiente para la crioconservación de semen de cachama blanca debe incluir el uso de DMSO o Metanol al 10% como sustancias crioprotectoras empacarse en pajillas de 0.5 - 5.0 mL y descongelarse en baño María a 35 °C. Sin embargo, los porcentajes de fertilidad y de eclosión aun son inferiores al observado con semen fresco
- La crioconservación de semen de cachama blanca, puede ser una alternativa para suplir la deficiencia de machos maduros durante determinadas épocas del año, como son los meses de Noviembre, Diciembre y Enero, durante los cuales los individuos reproductores no presentan espermatogénesis activa y son refractarios a la estimulación hormonal

## 7 RECOMENDACIONES

- Ofrecer el servicio de crioconservación de semen de peces a las granjas productoras de alevinos, para permitir el conocimiento y recibir los beneficios directos de la utilización de dicha tecnología
- Incluir la experiencia y didáctica dentro del programa de prácticas de formación de estudiantes y profesionales de áreas relacionadas con la acuicultura y la reproducción animal



## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ANDRADE, R F BAZZOLI, N RIZZ, E Y SATO Y Continuous gametogenesis in the neotropical freshwater teleost *Bryconops affinis* (Pisces characidae) *Tissue y cell* 33 524-532 2001
- ARIAS, C J A Y VASQUEZ-TORRES W Ampliacion del conocimiento biologico de *colossoma sp* (Characidae) en ambientes naturales de la cuenca del rio Meta Villavicencio Universidad de los Llanos-Colciencias (Meta) (*Informe de campo*) 121,1988
- BART AN, WOLFE DF, DUNHAM RA Cryopreservation of blue catfish spermatozoa and subsequent fertilization of Channel catfish eggs *Transactions of the American Fisheries Society* 127 819-824 1998
- BILLARD, R COSSON, J PERCHEC G Y LINHART, O Biology of sperm and artificial reproduction in carp *Aquaculture* 124 95-112 1995
- BILLARD R Artificial insemination in fish LAMMING, G E (Org) Marshall's physiology of reproduction 4 ed Endinburgh, London, Melbourne and New York Churchill Livingstone 9 870-887, 1990
- BILLARD R Y CARPENTIER, H Determination du nombre optimum de spermatozoides necessaires a la fecondation d'un ovule au cours de l'insemination artificielle de la truite *Bulletin Francaise de Pisciculture*, 251 73-76, 1973
- BILLARD R Contribution a l'etude de la reproduction chez le poisson teleosteen *Lebistes reticulatus*, au moyen de l'insemination artificielle These 3eme cycle Faculte des Sciences, Lyon, 83, 1966
- BOHORQUEZ-PAEZ G A Efectos del numero de espermatozoides por oocito y del volumen de la dosis seminante sobre la fertilidad en cachama blanca (*Piaractus brachypomus* Cuvier, 1818) Tesis Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales Universidad de los Llanos, Villavicencio-Meta, Colombia, 2006
- BRUZSKA E The in vivo method of estimating the stages of maturation in carp (*Cyprinus carpio*) *Acta Hydrobiology* 21 423-433 1979
- BWANGA CO BRAGANCA MM EINARSSON S RODRIGUEZ-MARTINEZ H Cryopreservation of boar semen in mini and maxi-straws *Zentralbl Veterinaermed A* 37 651 - 658 1990
- BWANGA CO, EINARSSON S RODRIGUEZ-MARTINEZ H Cryopreservation of boar semen II Effect of cooling rate and duration of freezing point plateau on boar semen frozen in mini and maxi-straws and plastic bags *Acta Vet Scand* 32 455 - 461 1991

- CABRITA E, ROBLES V ALVAREZ R HERRAEZ MP Cryopreservation of rainbow trout sperm in large volume straws application to large scale fertilization *Aquaculture* 201 301 - 304 2001
- CALEÑO O Pruebas de fertilidad con semen de cachama blanca (*Piaractus brachypomus* Cuvier, 1818) criopreservado mediante dos extendidos diferentes Tesis Facultad Biología Marina Universidad Jorge Tadeo Lozano Bogota-Colombia, 131, 1995
- CAROSFELD J GODINHO HP ZANIBONI-FILHO E, HARVEY BJ Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation *Journal of Fish Biology* 63 472 - 489 2003
- CASTILLO A M, RAMIREZ, R Y RODRIGUEZ, J A Evaluacion del crecimiento de Tilapia Nilotica *Oreochromis niloticus* linea chitralada en el departamento del Meta IV Seminario internacional de acuicultura, II Congreso Nacional de investigaciones acuicolas, Universidad Nacional FMVZ Bogota, Colombia, Septiembre, 2003
- CIERESZKO, A Y DABROWSKI, K Estimation of sperm concentration of rainbow trout whitefish and yellow perch using a spectrophotometric technique *Aquaculture*, 109 367-373 1993
- CIERESZKO A, DRABROWSKI K LIN F, CHRIS SA, TOTH GP Effects of extenders and time of storage before freezing on motility and fertilization of cryopreserved Muskellunge spermatozoa *Transactions of the American Fisheries Society* 128 542 - 548 1999
- COSSON J BILLARD, R, CIBERT, C, DREANNO, C Y SUQUET, M Ionic factors regulating the motility of fish sperm GAGNON, C (Ed) The male gamete from basic science to clinical applications Vienna Cache River Press 16 162-186, 1999
- COSSON J Y LINHART, O Paddlefish (*Polyodon spathula*) spermatozoa Effects of potassium and pH on motility *Folia Zool*, 45 361-370 1996
- CRUZ-CASALLAS, P E, VELASCO-SANTAMARIA, Y M Y MEDINA-ROBLES V M Determinacion del espermatocrito y efecto del volumen de la dosis seminante sobre la fertilidad en yamu (*Brycon amazonicus*) Meta, Colombia *Rev Col Cienc Pec* V 19 2, 2006
- CRUZ- CASALLAS P E MEDINA-ROBLES V M VELASCO-SANTAMARIA Y M Evaluacion de diferentes crioprotectores para la crioconservacion de espermatozoides de yamu (*Brycon amazonicus*) *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* v 19 n 2, p 152 - 159 2006



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOS LLANOS  
 VILLAVICENCIO - META

- CRUZ-CASALLAS P E , VELASCO-SANTAMARIA Y M Y MEDINA-ROBLES V M Crioconservacion de gametos como herramienta para el mantenimiento de la biodiversidad y el mejoramiento de la produccion de especies icticas de cultivo *Memorias V seminario internacional de acuicultura* Bogota-Colombia Noviembre, 76-81, 2005b
- CRUZ-CASALLAS, P E LOMBO-RODRIGUEZ, D A Y VELASCO-SANTAMARIA Y M Milt quality and spermatozoa morphology of captive (*Brycon siebenthalae* Eigenmann) broodstock *Aquaculture Research* V 36 682-686, 2005c
- CRUZ-CASALLAS, P E , PARDO-CARRASCO, S P , ARIAS-CASTELLANOS, J A LOMBO-CASTELLANOS P E , LOMBO-RODRIGUEZ D A Y PARDO-MARIÑO, J E Cryopreservation of Yamu *Brycon siebenthalae* Milt *World Aquaculture Society*, 35 (4) 529-535 2004
- CRUZ-CASALLAS P E, VELASCO-SANTAMARIA Y M, ARIAS-CASTELLANOS J A Inseminacion artificial en yamu (*Brycon siebenthalae*) efecto de la proporcion de espermatozoides/huevo y de la dosis inseminante sobre la fertilidad *Memorias VI Encuentro Nacional de Investigadores de las Ciencias Pecuarias* Medellin 2003
- CRUZ-CASALLAS P E Experiencias en crioconservacion de semen de yamu (*Brycon siebenthalae*) y cachama (*Piaractus brachypomus*) *III Seminario Internacional de Acuicultura* Universidad Nacional de Colombia Bogota, 19-23 de Junio 2001
- CRUZ-CASALLAS P E , PARDO-CARRASCO S C ARIAS-CASTELLANOS J A , PARDO-MARIÑO J E LOMBO-RODRIGUEZ D A Fertilidad de semen de yamu *Brycon siebenthalae* criopreservado con DMSO y activado con bicarbonato de sodio In Cabrera T J Daryl and M Silva editors *Memorias II Congreso Latinoamericano de Acuicultura* Sociedad Venezolana de Acuicultura Page 36 1999
- FOGLI DA SILVEIRA W, KAVAMOTO ET, NARAHARA MY Avaliação espermatica, preservação criogenizado semen do pacu *Piaractus mesopotamicus* proveniente de reprodução inducida *Boletim do Instituto de pesca* 17 1 - 13 1990
- FRESNEDA, A , LENIS, G , AGUDELO, E , Y OLIVERA-ANGEL M Espermiacion inducida y crioconservacion de semen de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) *Rev Col Cienc Pec* V 17 (Suppl), 46-52 2004
- GOULDING, M Y CARVALHO Z M Life history and management of the tambaqui (*Colossoma macropomum* Characidae) and important Amazonian food fish *Revista Brasileira de Biologia*, V 1(2) 107-133, 1992

- GOW J KUROKURA H Y HIRANO, Y Cryopreservation of spermatozoa from rainbow trout, common carp, and Marine Puffer *Nippon suisan Gakkaishi Bull Jap Soc Sci Fish* 59(5) 777-782, 1993
- HERNANDEZ A MUÑOZ D FERRAZ DE LIMA J A DE SANTIS D F R, VASQUEZ-TORRES, W, GONZALEZ R, MORALES, R, ALCANTARA F, LUNA T M Y KOSSOWSKI C G Estado actual del cultivo de *Colossoma* y *Piaractus* en Brasil, Colombia, Panama Peru y Venezuela Segunda reunion internacional del grupo de trabajo tecnico de *Colossoma* y *Piaractus* *Boletin red de acuicultura* 3(4) 3-27 1996
- IDEAM, Instituto de Hidrologia Meteorologia y Estudios Ambientales [www.ideam.gov.co](http://www.ideam.gov.co), 2008
- INGERMANN R, HOLCOMB M ROBINSON M Y CLOUD J Carbon dioxide and pH affect sperm motility of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) *J Exp Bio* 205 2885-2890, 2002
- JAMEISON, B G M Y LEUNG, L K P Introduction to fish spermatozoa and the microphyle *JAMEISON, B G M* (Ed) *Fish Evolution and sistematic evidence from spermatozoa* Cambridge Cambridge University Press 5 56-72 1991
- KOPEIKA, E WILLIOT, P Y GONCHAROV, B Cryopreservation of Atlantic sturgeon *Acipenser sturio* L 1758 sperm First results and associated problems *Bol Inst Esp Oceanogr* 16 (1-4) 167-173, 2000
- LABBE C, CROWE LM CROWE JH Stability of the lipid Component of Trout Sperm Plasma Membrane during Freeze-Thawing *Cryobiology* 34 176 - 182 1997
- LAHNSTEINER F, BERGER B HORVATH A URBANYI B WEISMANN T Cryopreservation of spermatozoa ein Ciprinid fishes *Theriogenology* 54 1477 – 1498 2000
- LAHNSTEINER F WEISMANN T, PATZNER RA Fine structural changes in spermatozoa of the grayling (*Thymallus thymallus*) (Pisces Teleostei) *Aquaculture* 103 73 – 8 1992
- MARIAN T KRASZNAI, Z, BALKAY, L BALAZS M, EMRI, M, BENE L Y TRON, L Hypo-osmotic shock inducing osmolality dependent permeabilization and structural changes in the membrane of carp sperm *J Histochem Cytochem* 41 291-298, 1993
- MAZUR P Basic concepts in freezing cells Proceedings of the First International Conference on Deep Freezing of Boar Semen, Uppsala *L A Johnson y K Larsson* (eds) 91-111 1985
- MEDINA-ROBLES V M VELASCO-SANTAMARIA Y M Y CRUZ-CASALLAS P E Tasa de congelacion-descongelacion de semen de yamu (*Brycon amazonicum*) empacado en pajillas de diferentes volumenes y su efecto

- sobre la calidad espermática post-descongelación Instituto de Acuicultura de la universidad de los Llanos, *Rev Col Cienc Pec*, V 18(4) 331, 2005
- NAVARRO-POVEDA O J , VELASCO-SANTAMARIA, Y M Y CRUZ-CASALLAS P E Evaluación de cinco protectores para la crioconservación de semen de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) *Rev Col Cienc Pec*, vol 17(supl) 53-59 2004
- NAVARRO-POVEDA O J LOMBO-CASTELLANOS P E Y CRUZ-CASALLAS, P E Calidad y fertilidad de semen de cachama blanca *Piaractus brachypomus* crioconservado con etilenglicol *Memorias XI Simposio Brasileiro de Aquicultura-SIMBRAQ*, Florianópolis (SC), Brasil, 2000
- NEIRA, J CRUZ-CASALLAS, P E , JIMENEZ, J Y MUÑOZ D Caracterización y congelación de semen de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) *Programa Nacional de Ciencia y Tecnología del Mar-Investigación y Desarrollo Tecnológico en Acuicultura* 141-145, 1992
- NOVOA, D Y RAMOS F Aspectos generales sobre la biología de las principales especies de importancia comercial en el río Orinoco Corporación Venezolana de Guayanas-Caracas *Los recursos pesqueros del río Orinoco y su explotación Arte* (Ed) 386 1982
- OGIER DE BAULNY LE VERN Y, KERBOEUF D MAIS G Flow cytometric evaluation of mitochondrial activity and membrane integrity in fresh and cryopreserved Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa *Cryobiology* 34 141 - 149
- PIIRONEN, J Composition and cryopreservation of sperm from some Finnish teleost fish *Finnish Fish Research* 15 27–48, 1994
- PINZÓN - ARCINIEGAS, S M , MOJICA - RODRIGUEZ J E CRUZ-CASALLAS P E , Ensayos preliminares sobre crioconservación de semen de bagre rayado (*Pseudoplatystoma fasciatum* Linnaeus 1766) *Orinoquia*, v 9 n 2, p 28 - 37 2005
- RAMIREZ, M J A VELASCO-SANTAMARIA Y M MEDINA-ROBLES V M Y CRUZ-CASALLAS P E Crioconservación de semen de cachama blanca (*Piaractus brachypomus* Cuvier 1818) efectos del volumen de empaque y de la sustancia crioprotectora sobre la calidad seminal Instituto de Acuicultura de la universidad de los Llanos, *Rev Col Cienc Pec*, V 18(4) 2005,
- RICHARDSON GF WILSON CE, CRIM LW YAO XZ Cryopreservation of yellowtail flounder (*Pleuronectes ferrugineus*) semen in large straws *Aquaculture* 174 89 - 94 1999
- SILVA A Y ACUÑA, R Epocas de máximo desarrollo gonadal de la cachama y del morocoto en condiciones de cautiverio *Zootecnia Tropical- Centro de Investigaciones Agropecuarias de Monagas (Fonalap)-Nota Técnica*, Maturín-Venezuela V 15(2) 109-219 1997

- STEINBERG HA HEDDER R BAULAIN Y, HOLTZ W Cryopreservation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) semen in straws *Proceedings of the fifth International Simposium on the Reproductive Physiology of Fish* University of Texas at Austin 2-8 July 147 1995
- STOSS, J Fish gamete preservation and spermatozoan physiology *Fish Physiology IX B Academic Press New York Hoar WS Randall DJ, Donaldson EM (Eds) 305-350 1983*
- SUQUET M, BILLARD R COSSON, J, NORMANT, Y Y FAUVEL, C Artificial insemination in turbot (*Scophthalmus maximus*) determination of the optimal sperm to egg ratio and time of gamete contact *Aquaculture* 133 83-90, 1995
- TIERSCH TR, WILLIAMSON JH, CARMICHAEL GJ GORMAN OT Cryopreservation of sperm of the endangered razorback sucker *Transactions of the American Fisheries Society* 127 95 - 104 1998
- TIERSCH T R GOUDIE C A Y CARMICHAEL G J Cryopreservation of channel catfish sperm storage in cryoprotectans, fertilization trials and growth of channel catfish produced with cryopreserved sperm *Transactions American Fisheries Society*, 123 580-586 1994
- VASQUEZ, T W Retrospectiva del cultivo de las cachamas en Colombia // *congreso colombiano de acuicultura, X jornada de acuicultura Retos frente a la globalizacion de mercados Villavicencio 2004*
- VELASCO-SANTAMARIA Y M, MEDINA-ROBLES V M CRUZ-CASALLAS P E Cryopreservation of yamu (*Brycon amazonicus*) sperm for large scale fertilization *Aquaculture* 256(1-4) 264 – 271 2006
- VELASCO-SANTAMARÍA Y M CRUZ-CASALLAS P E CALDERON-FONSECA A E Y MEDINA-ROBLES, V M Crioconservacion de semen de yamu (*Brycon siebenthalae*) Efecto del volumen de empaque y de la temperatura de descongelacion sobre la calidad seminal // *congreso colombiano de Acuicultura-X jornada de Acuicultura-IALL, Villavicencio-Meta, Colombia Octubre, 108-109 2004a*
- VELASCO-SANTAMARIA, Y M CRUZ-CASALLAS, P E Y CALDERÓN-FONSECA A H Inseminacion artificial en yamu (*Brycon siebenthalae*) Determinacion de la dosis inseminante con semen fresco y crioconservado *Memorias II Congreso Colombiano de Acuicultura, X Jornada de Acuicultura IALL 105-107, 2004b*
- VELASCO-SANTAMARIA Y M CORREDOR-SANTAMARIA W CRUZ-CASALLAS, P E Variation of eggs fertility of yamu *Brycon siebenthalae* during short-term storage *Proceedings of the World Aquaculture Bahia Convention Center-Salvador Brazil 2003*

VINCENT C PRULIERE G PAJOT-AUGY E, CAMPION E DOUZOU P  
Biophysical chemical aspects of cellular cryobehavior *Biophysical Chemistry*  
29 161 - 169 1998

YAO Z CRIM LW RICHARDSON GF EMERSON CJ Motility fertility and  
ultrastructural changes off ocean put (*Macrozoarces americanus L*) sperm  
after cryopreservation *Aquaculture* 181 361 - 375 2000