



# UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE BIOLOGÍA  
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

---

---

ÁREA TEMÁTICA:  
ECOLOGÍA Y CONSERVACIÓN

INFLUENCIA DEL ALIMENTO BALANCEADO EN LA CALIDAD  
GAMÉTICA EN REPRODUCTORES DE TILAPIA (*Oreochromis  
niloticus*) LINEAS SUPERMACHO Y STIRLING.

TESIS

Para obtener el grado académico de:

**Maestro en Ciencias Biológicas**

PRESENTA

MVZ. Luis Eduardo Riveros Ramírez

DIRECTOR DE TESIS

Doctor en Acuicultura  
Antonio Campos Mendoza



FACULTAD  
DE  
BIOLOGÍA

MORELIA, MICHOACAN, JULIO 2015

## 1. TABLA DE CONTENIDO

1.	TABLA DE CONTENIDO .....	ii
2.	INDICE DE CUADROS .....	iv
3.	INDICE DE FIGURAS .....	v
4.	RESUMEN .....	2
5.	ABSTRACT .....	4
6.	INTRODUCCION .....	6
6.1.	Efecto de componentes de la dieta sobre la calidad del semen y huevo. ....	8
6.1.1.	Proteína .....	8
6.1.2.	Lípidos. ....	9
6.1.3.	Vitaminas.....	10
7.	HIPOTESIS.....	13
8.	OBJETIVOS.....	14
8.1.	Objetivo general.....	14
8.2.	Objetivos particulares. ....	14
9.	RESULTADOS. ....	15
9.1.	CAPITULO 1: INFLUENCIA DE TRES TIPOS DE ALIMENTO BALANCEADO EN LA CALIDAD ESPERMÁTICA, EN TILAPIA ( <i>Oreochromis niloticus</i> ) LINEAS SUPERMACHO Y STIRLING.....	15
9.1.1.	RESUMEN. ....	15
9.1.2.	ABSTRACT.....	17
9.1.3.	INTRODUCCIÓN.....	18
9.1.4.	MATERIALES Y METODOS.....	25
9.1.5.	RESULTADOS. ....	35
9.1.6.	DISCUSION.....	48
9.1.7.	CONCLUSIONES. ....	53
9.2.	CAPITULO 2: INFLUENCIA DE TRES TIPOS DE ALIMENTO BALANCEADO EN LA CALIDAD DE HUEVO DE TILAPIA ( <i>Oreochromis niloticus</i> ) LINEA STIRLING. ....	54
9.2.1.	RESUMEN. ....	54
9.2.2.	ABSTRACT.....	56
9.2.3.	INTRODUCCION.....	57

**Influencia del alimento balanceado en la calidad gamética en reproductores de tilapia (*Oreochromis niloticus*) líneas Supermacho y Stirling.**

---

9.2.4.	MATERIALES Y METODOS.....	62
9.2.5.	RESULTADOS. ....	70
9.2.6.	DISCUSIONES.....	75
9.2.7.	CONCLUSIONES .....	77
10.	DISCUSIÓN GENERAL.....	78
11.	LITERATURA CITADA.....	80

## 2. INDICE DE CUADROS

Cuadro 1.- Concentración espermática de algunas especies de peces .....	18
Cuadro 2. Contenido nutricional de los alimentos utilizados, datos proporcionados por cada casa maquiladora. ....	25
Cuadro 3 Esquema de alimentación de los animales en base a la biomasa de cada jaula. ....	29
Cuadro 4 Tabla de caracterización de la motilidad espermática. (Sánchez-Rodríguez y Billard 1977) .....	33
Cuadro 5 Comparación entre mismos tratamientos, muestreo inicial y muestreo final.....	36
Cuadro 6 Valores iniciales y finales de la comparación entre el muestreo inicial y final del tratamiento con alimento A, en supermachos.....	38
Cuadro 7 Comparación entre mismos tratamientos, muestreo inicial y muestreo final del tratamiento con alimento B, en supermachos.....	39
Cuadro 8 Valores iniciales y finales de la comparación entre el muestreo inicial y final del tratamiento con alimento C, en supermachos.....	39
Cuadro 9 Valores iniciales y finales de la comparación entre el muestreo inicial y final del tratamiento con alimento A, en machos Stirling.....	40
Cuadro 10 Valores iniciales y finales de la comparación entre el muestreo inicial y final del tratamiento con alimento B, en machos Stirling .....	40
Cuadro 11 Valores iniciales y finales de la comparación entre el muestreo inicial y muestreo final del tratamiento con alimento C, en machos Stirling. ....	41
Cuadro 12 Comparación de la composición proximal de los alimentos utilizados como tratamientos, entre los datos ofrecidos por las casas maquiladoras (maq) y los datos obtenidos en el laboratorio (lab). ....	46
Cuadro 13 Valores medios de contenido en los componentes analizados en las muestras de huevos de <i>Oreochromis spp.</i> (Valbuena <i>et al.</i> 2013).....	61
Cuadro 14 Contenido nutricional de los alimentos utilizados, datos proporcionados por cada casa maquiladora. ....	63
Cuadro 15 Esquema de alimentación de los reproductores en base a la biomasa de cada jaula .....	64
Cuadro 16 Comparación de variables en muestreo inicial y final del tratamiento con el alimento A. .	71
Cuadro 17 Comparación de variables en muestreo inicial y final del tratamiento con el alimento B...	71
Cuadro 18 Datos de análisis bromatológicos de los huevos en el muestreo inicial y final de cada tratamiento. ....	74

### 3. INDICE DE FIGURAS

Figura 1 Distribución espacial de los organismos en las jaulas y estanques.....	28
Figura 2 a y b. Espermatozoides de tilapia ( <i>O. niloticus</i> ) en tinción de eosina-nigrosina, vistos con objetivo 100X .....	31
Figura 3 a. Cámara de Neubauer b. Células espermáticas en cámara de Neubauer 40X. ....	33
Figura 4 Comparación de la viabilidad espermática del muestreo inicial, entre los grupos. ....	37
Figura 5 Comparación de la concentración espermática del muestreo inicial, entre los grupos .....	38
Figura 6. Comparación entre tratamientos y grupos en el muestreo final para la variable peso. SM (Supermacho), ST (Stirling).....	42
Figura 7 Comparación entre tratamientos y grupos en el muestreo final para la variable longitud estándar. SM (Supermacho), ST (Stirling). ....	43
Figura 8 Comparación entre tratamientos y grupos en el muestreo final para la variable longitud total. SM (Supermacho), ST (Stirling).....	43
Figura 9 Comparación entre tratamientos y grupos en el muestreo final para la variable viabilidad. SM (Supermacho), ST (Stirling).....	44
Figura 10 Comparación entre tratamientos y grupos en el muestreo final para la variable espermatozocrito. SM (Supermacho), ST (Stirling).....	45
Figura 11 Comparación entre tratamientos y grupos en el muestreo final para la variable espermatozocrito. SM (Supermacho), ST (Stirling).....	46
Figura 12. Distribución espacial de los organismos y las jaulas en los estanques. ....	63
Figura 13 a. Huevos extraídos de cada hembra por jaula. b. Medición de huevos en probeta. c. Pesaje del huevo.....	65
Figura 14 Conteo manual de los huevos. ....	66
Figura 15 . Medición de los huevos en 4X. a. Eje largo del huevo. b. Eje corto del huevo. ....	67
Figura 16 Comparación de medias para la variable humedad de todos los tratamientos. ....	73
Figura 17 Comparación de medias para la variable proteína de todos los tratamientos.....	74

#### 4. RESUMEN

El incremento de la producción mundial de tilapia a partir de la década de los 80's ha evidenciado notablemente la importancia que han tomado estas especies a nivel mundial. Este incremento se debe a la percepción que se tiene actualmente de aprovechar los cuerpos de agua para la producción intensiva de tilapia, esto debido al aumento de la población y el aumento de la demanda por los consumidores de alimentos de alto valor nutrimental. La nutrición tiene un papel relevante en la acuicultura, ya que la mayor parte de los costos de producción es el alimento, por esta razón es importante tener el conocimiento de las necesidades nutricionales de los peces de acuerdo a su estado de madurez o estado reproductivo. El estado nutricional de los reproductores influye en el desarrollo de las gónadas y limita la cantidad y calidad de los gametos. Las proteínas y los lípidos son los principales componentes de la dieta, y son componentes fundamentales en el proceso de desarrollo de las gónadas y la calidad gamética. El objetivo del presente estudio fue determinar si existe una influencia del suministro de diferentes dietas comerciales, una formulada para la etapa de finalización de la engorda, y dos formuladas especialmente para animales en fase de reproducción, en la calidad espermática de dos líneas de tilapia (*Oreochromis niloticus*) Supermacho y Stirling, y en la calidad del huevo de hembras de la línea Stirling. El diseño experimental consistió en un sistema de recirculación de agua con temperatura constante de 28°C, se instalaron nueve jaulas de las cuales tres fueron para las hembras y se colocaron diez organismos en cada jaula; cada jaula en un estanque individual, y las otras seis jaulas se instalaron de a dos en cada estanque para que quedaran diez Supermachos en una jaula y diez machos Stirling en otra pero en el mismo estanque, esto para cada tratamiento, en total fueron tres tratamientos basados en la dieta A la cual es dieta formulada para engorda, dieta B formulada para reproductores, y dieta C de igual manera dieta formulada para reproductores pero de la misma casa maquiladora que la dieta A. La alimentación se basó en el 1.5% de la biomasa de cada jaula por día, durante 40 días, ofrecida en dos raciones diarias y se realizó la

toma de muestra de semen y huevo al inicio y al final del experimento, para ambos sexos se tomaron medidas morfométricas peso, longitud estándar, longitud total, y en el caso de los machos para la evaluación de la calidad espermática se realizaron pruebas de viabilidad, concentración, motilidad espermática y espermatozoides; en el caso de las hembras se tomaron datos referentes a cantidad de huevo, peso del huevo, longitud del eje mayor del huevo, longitud del eje menor del huevo, además se realizó el análisis proximal de los huevos obtenidos en cada tratamiento. Con respecto a los machos, el alimento que influyó considerablemente en la calidad espermática fue el alimento C, siendo los Supermachos los que evidenciaron notoriamente estos cambios, y en las hembras los alimentos B y C sólo causaron un incremento en el porcentaje de proteína de los huevos. En conclusión este estudio indica que la alimentación y la composición nutricional de los alimentos es fundamental para que los animales tengan una eficiente producción de gametos de buena calidad, el tiempo de alimentación es importante ya que con una alimentación basada en dietas con contenido de proteína mayor a 35% se mejora considerablemente la calidad espermática y la composición proximal de los huevos.

**Palabras clave:** Calidad espermática, calidad de huevo, Supermachos, Stirling, *Oreochromis niloticus*.

## 5. ABSTRACT

The increase in world production of tilapia from the early 80's has greatly evidenced the importance that these species have taken worldwide. This increase is due to the perception we have now to take advantage of the water bodies for industrial production of tilapia, this due to increasing population and the increasing of consumer demand for food with high nutritional value. Nutrition plays an important role in aquaculture, as most of the production costs is the food, which is why it is important to have knowledge of the nutritional requirements of the fish according to its maturity or reproductive status. The nutritional status of a male and a female can influence the development of the gonads and limit the amount and quality of gametes. Proteins and lipids are major components of the diet, and are essential components in the process of development of the gonads and the quality of sperm and egg. The purpose of this study was to determine whether there is an influence of the supply of different commercial diets, one made at the end of the fattening stage, and two specially formulated for animals in reproductive stage, in sperm quality of two lines of tilapia (*Oreochromis niloticus*) Supermale line and Stirling, and egg quality of Stirling females. The experimental design consisted of a recirculating of 28 ° C water, where nine cages were installed, three were for females where ten animals were placed in each cage; each cage in a single pond, and six cages were installed in pairs in each pool to have ten Supermales in one cage and ten Stirling males in the other one but in the same pond, this for each treatment, in total there were three treatments based on the A diet, formulated for fattening diet, diet B formulated for producers and C likewise diet formulated for producers but the same producer of diet A. The food was based on 1.5% of the biomass of the each cage during 40 days, taking twice daily the sampling of semen and egg at the beginning and at the end of the experiment, for both genders morphometric measurements weight, standard length, overall length were registered, and in the case of males, to evaluate sperm quality viability, sperm concentration, motility, and spermatocrit testing was done; in the case of females data relating to the amount of eggs, egg weight, egg major axis, length of the major axis of

the egg, length of the minor axis of the egg were collected, furthermore the proximal analysis of the obtained eggs was done on each treatment. Regarding males the greatly influenced food in sperm quality was the line C where food were largely influenced Supermachos, and regarding females food B and C caused only increased the percentage of egg protein. In conclusion, this research indicates that food and nutritional composition of food is essential for animals to have an efficient production of high quality gametes, feeding time is important due to a diet based on 35% higher protein content considerably improves sperm quality and proximal composition of eggs.

**Keywords:** Sperm quality, egg quality, Supermachos, Stirling, *Oreochromis niloticus*.

## 6. INTRODUCCION

El incremento de la producción mundial de tilapia a partir de la década de los 80's es evidencia de la importancia que han tomado estas especies a nivel mundial. En la actualidad se conocen por lo menos 60 especies diferentes de tilapia, 10 de las cuales son utilizadas para el consumo humano (Mojica *et al.* 2010).

El grupo de las tilapias ocupa el segundo lugar mundial de producción por acuicultura (FAO 2008, 2010, 2012). En la década de los 90's su producción alcanzó 830,000 toneladas (t) (FAO 1999); en 2002 se incrementó a 1,500,000 t (FAO 2002), en 2003 y 2004 incrementó a 2,000,000 y 2,500,000 t respectivamente. Al momento, esta tendencia de expansión continua (Fitzsimmons 2003; Fitzsimmons y González 2005, FAO 2012).

El decline en la producción por pesquerías y la implementación de biotecnología para la producción (FAO 2004; 2008), así como la generación de políticas de impulso a la acuicultura (SAGARPA 2008) han beneficiado la producción de la tilapia. Otros factores importantes son la buena rentabilidad del cultivo de estas especies, la cual es el resultado de su alta tasa de crecimiento, tolerancia fisiológica, su adaptabilidad a variables ambientales y resistencia al manejo (Morales 1991, Garduño y Muñoz 1994, DeWandel 1995, Macintosh y Little 1995, Pompa y Masser 1999, Ross 2000, Alceste *et al.* 2001, Watanabe *et al.* 2002, Arredondo-Figueroa y Lozano 2003, Castro-Rivera *et al.* 2004). Adicionalmente la tilapia presenta una gran aceptación en el mercado debido su buena talla y sabor. Por ello, el consumo, precio y perspectivas futuras han incrementado significativamente (DeWandel 1995, Josupeit 2007).

Las tilapias fueron introducidas a México en 1964 (Arredondo-Figueroa y Lozano 2003). Ejemplares de las especies *Tilapia rendalli*, *Oreochromis mossambicus* y *O. aureus* fueron depositados en la estación piscícola de Temazcal, Oaxaca.

Posteriormente, los organismos se distribuyeron ampliamente en gran cantidad de embalses naturales y artificiales (Mojica *et al.* 2010). A partir de ese momento, la producción de esta especie ha sido de interés zootécnico en muchas regiones del país. En 1966, México logró ser el primer productor de tilapia en América, con una producción de 94,279 t (Fitzsimmons 2000).

En tanto que para el año 2006, México contribuyó con 2,5% de la producción mundial de tilapia (FIGIS 2006), No obstante, en 1990 y 2003 se observó una disminución considerable en la producción de tilapia en México. En la actualidad el país no puede satisfacer la demanda interna de tilapia por lo que ha recurrido a la importación del producto (Hartley-Alcocer 2007).

México fue el segundo importador mundial de tilapia de China en 2006, con 33,000 t (Josupeit 2007). A pesar del importante volumen de importación de tilapia, en 2003 la producción nacional por acuicultura para esta especie logró ubicarse entre los primeros lugares de producción (SAGARPA 2003), con 58,660 t con un valor de 57.6 millones de dólares americanos. Mientras que en la producción de las pesquerías la tilapia estuvo dentro de las especies que presentaron mayor aportación productiva al registrar 60,551 t (peso vivo) (SAGARPA 2003).

Entre los aspectos esenciales para el adecuado cultivo de tilapia están: la producción de gametos de buena calidad. La viabilidad del esperma y del huevo depende de factores ambientales, nutricionales, fisiológicos y del manejo de los organismos. (De Oliveira 2012)

Dentro de los grupos de peces, las tilapias (*Oreochromis spp.*) en general evidencian rápido crecimiento y amplia plasticidad de respuesta que se refleja en los parámetros de desempeño productivo. Por estas razones, la demanda de alevines ha crecido en forma significativa, a tal grado que actualmente, la tilapia es una especie de alto consumo mundial. Uno de los desafíos para la producción acuícola consiste

en sostener una oferta suficiente, en términos de calidad y cantidad de alevines (El-Sayed y Kawanna 2008). Esto se refleja en la importancia en el desarrollo adecuado de los gametos para hacer más eficiente el proceso reproductivo. Por lo anterior, el presente estudio se enfocó a conocer la relación entre la calidad de los gametos y su relación con la calidad del alimento.

## **6.1. Efecto de componentes de la dieta sobre la calidad del semen y huevo.**

### **6.1.1. Proteína**

Los peces tienen una capacidad limitada para ingerir y metabolizar hidratos de carbono, su mayor fuente de obtención de energía ocurre a través de la proteína y por ello presentan altos requerimientos de estos nutrientes. En experimentos con reproductores de trucha alimentados con 28% de proteína y 21% de lípidos produjeron mayor cantidad de huevo y alta tasa de eclosión. Esto sugiere la importancia de la relación proteína/energía en la dieta de reproductores (Watanabe *et al.* 1984).

La investigación y la experiencia práctica indican que los alimentos de engorda que contienen 28 - 32% de proteína bruta pueden ser apropiados para las necesidades nutricionales de los reproductores. Asimismo se ha determinado que niveles de proteína elevados (> 40%) no otorgan ninguna ventaja específica en términos de crecimiento de los reproductores e incluso disminuyen la frecuencia de la puesta (Wee y Tuan 1988). No obstante, se ha determinado que alimentar las tilapias con niveles de proteína de 32 y 40% permite que crezcan y maduren más rápidamente comparado con las tilapias alimentadas con niveles de proteína bruta de 10, 17 y 25%, además se ha establecido que la alimentación de reproductores de tilapia con niveles de 10% de proteína bruta, prolonga el intervalo entre puestas de huevo, aunque reduce el número de huevos por postura (Gunasekara *et al.* 1996).

Los reproductores alimentados con 35% de proteína reacondicionan sus ovarios más rápidamente que aquellos que han sido alimentados con niveles del 10 y 20% de proteína (Gunasekara y Lam 1997). Salama (1996) observó que un alimento balanceado con 28% de proteína (usando harina de pescado y de soya) fue más efectivo que los que contenían harina de pescado o harina de soja exclusivamente.

De lo anterior se deduce que el contenido de proteína bruta influye en el crecimiento, fecundidad, viabilidad y calidad de los huevos y puede estar influenciando la presencia de malformaciones de las larvas. El porcentaje de huevos flotantes cuando se realiza la incubación artificial y las tasas de eclosión en varias especies estudiadas pueden considerarse una evidencia de la calidad de los gametos (Watanabe *et al.* 1998).

### **6.1.2. Lípidos.**

Los requerimientos de ácidos grasos esenciales, varían entre las especies y entre las diferentes etapas de desarrollo (Gatesoupe y Le Milinaire 1985). Las especies de aguas cálidas presentan requerimientos menores en ácidos grasos esenciales que aquellas de aguas frías. Los factores ambientales (salinidad, temperatura, fotoperiodo, etc.) también influyen en los requerimientos de ácidos grasos (Henderson *et al.* 1987, Booth *et al.* 1999).

Los requerimientos de ácidos grasos altamente insaturados (HUFA) n-3 y n-6 en la dieta de los organismos aumentan durante la maduración de las gónadas y la gametogénesis y afectan la fecundidad, la calidad del desove, la supervivencia y el crecimiento de las larvas (Abi-ayad *et al.* 1997, Asturiano *et al.* 2001, Izquierdo *et al.* 2001). Cuando hay déficit de HUFA n-3 y n-6 se inhibe la síntesis y/o secreción de gonadotropinas y esteroides, lo que desencadena en mayor número de atresias, baja

fecundidad y/o volumen de espermatozoides, bajas tasas de fertilización y eclosión, así como elevadas tasas de mortalidad larvaria (Navas *et al.* 1997).

En los machos de peces teleosteos se ha observado que el contenido de HUFA en la dieta, influye sobre la duración del periodo de espermiación, la concentración y el volumen del espermatozoides, entre otros (Ciereszko 2008).

Las hembras, generalmente presentan requerimientos mayores de ácidos grasos altamente poliinsaturados HUFA para la maduración de las gónadas y la vitelogenénesis que los machos. Esto involucra la formación de vitelogeninas, las cuales se forman a través de un proceso mediado por el nivel de esteroides en el plasma en el que lípidos, vitaminas, hormonas, ARN y proteínas son transportados a través del plasma para su incorporación a las gónadas y finalmente a los oocitos (Arukwe y Goksoyr 2003). Durante este proceso, los HUFA son incorporados en los fosfolípidos del vitelo, mientras que ácidos grasos saturados y monoinsaturados son almacenados como triglicéridos y esteroides esterificados de las gotas lipídicas de los oocitos (Coutteau y Sorgeloos 1997).

### **6.1.3. Vitaminas.**

Las vitaminas son uno de los componentes importantes en las formulaciones de alimentos balanceados. Los peces no son capaces de sintetizar la vitamina C, la cual es importante en diversos procesos metabólicos y es considerada esencial para la mayoría de las especies hasta ahora estudiadas. La incapacidad de sintetizar esta vitamina se debe a la ausencia de la enzima L-gulonolactona oxidasa, la cual es formada a partir de glucosa (Lovell 1973), por esta razón debe ser adicionada en la dieta (Lim 1997).

La vitamina C es esencial para la producción y mantenimiento de la calidad del semen, además reduce la aglutinación de los espermatozoides (Lerner 1998), también se ha mencionado que protege de los daños genéticos y tiende a evitar los defectos congénitos (Sitios 2001).

En ambientes naturales o artificiales, cuando los animales son sometidos a estrés, los requerimientos de vitamina C pueden llegar a triplicarse (Halver 1972). El estrés causa una predisposición para la presentación de diversas enfermedades, las cuales afectan también la calidad de los gametos. La vitamina C es necesaria para el desarrollo de gametos de alta calidad y para darles resistencia al estrés (Dabrowski y Moreau 1996). Los efectos de la utilización de esta vitamina no solo están atribuidos a ella sino también a los cationes encontrados en el semen, que son con los que interactúa (Harris *et al.* 1979).

Una evaluación comparativa sobre la influencia de diferentes concentraciones de vitamina C adicionadas en la dieta y su efecto sobre las características del semen de la tilapia nilótica (*O. niloticus*) mostró cambios significativos relacionados con las concentraciones de vitamina C adicionadas en la dieta; no obstante la presencia de patologías espermáticas, cuyo valor fue menor en presencia de 300 mg de vitamina C/Kg de alimento. Aunque en otro estudio se determinó que 225 mg de vitamina C/Kg de alimento incrementó la motilidad progresiva en reproductores de tilapia nilótica (Mataveli *et al.* 2010).

Las vitaminas C y E actúan en el tejido animal como antioxidantes en la fase acuosa y lipídica, respectivamente. La vitamina E tiene la capacidad de impedir la propagación de reacciones en cadena inducidas por los radicales libres en las membranas biológicas (Traber y Packer 1995). En peces la vitamina E es utilizada en la suplementación de dietas con el fin de mejorar el crecimiento, la resistencia del sistema inmunológico y al estrés. El  $\alpha$ -tocoferol es una sustancia esencial para la reproducción de los peces ya que está involucrada en la permeabilidad de la

membrana embrionaria y la eclosión de los huevos. Para el ayu (*Plecoglossus altivelis*) se ha comprobado que el número de huevos, las tasas de fertilización y eclosión se reducen por un déficit de  $\alpha$ -tocoferol en la dieta (Takeuchi *et al.* 1981).

La vitelogenina conocida como fosfoglicoproteína específica, es secretada por la hembra durante la reproducción y se detecta en muchas especies de peces. La vitelogenina es producida en la hemolinfa y es captada por los oocitos por medio de endocitosis mediada por receptores. Esta se usa para formar la principal proteína del vitelo, que son las vitelinas (lipoglicoproteínas de alta densidad). Estas dos proteínas, vitelogenina y vitelina, son responsables del transporte de sustancias como el tocoferol del ovario para los oocitos durante la maduración sexual (Ando y Hatano 1986, Tokuda *et al.* 2000). Se ha demostrado que la suplementación de vitamina E en la dieta de los reproductores, contribuye para los procesos de reproducción y garantizar un mayor número de larvas.

## **7. HIPOTESIS.**

Existen diferencias significativas en la calidad espermática y de huevo en los reproductores de tilapia (hembras y machos) alimentados con tres tipos de alimento balanceado.

## 8. OBJETIVOS.

### 8.1. Objetivo general.

Evaluar la influencia de tres tipos de alimento balanceado en la calidad gamética en reproductores de tilapia (*Oreochromis niloticus*) línea Supermacho y Stirling.

### 8.2. Objetivos particulares.

- ✓ Caracterizar el esperma de la tilapia (*O. niloticus*) de líneas Supermacho y Stirling y el huevo de la línea Stirling.
- ✓ Evaluar el índice de motilidad espermática y la supervivencia de espermatozoides de los peces sometidos a diferentes dietas.
- ✓ Observar la morfología de los gametos en cada muestra.
- ✓ Realizar análisis bromatológicos de los alimentos probados y determinar su composición.
- ✓ Establecer la relación existente entre la calidad de los gametos y el nivel de proteínas del alimento usado en la manutención de los reproductores.

## 9. RESULTADOS.

### 9.1. CAPITULO 1: INFLUENCIA DE TRES TIPOS DE ALIMENTO BALANCEADO EN LA CALIDAD ESPERMÁTICA, EN TILAPIA (*Oreochromis niloticus*) LINEAS SUPERMACHO Y STIRLING.

#### 9.1.1. RESUMEN.

El éxito de la piscicultura depende, entre otros factores, de tecnologías confiables de producción de alevinos con calidad y en cantidad suficiente para garantizar la viabilidad del cultivo, dicha viabilidad ha sido focalizada por la industria piscícola en la calidad de los ovocitos más que en las células espermáticas, cuando realmente es la calidad de ambos gametos lo que determina el éxito o fracaso de la fertilización y la sobrevivencia larva. La producción espermática es un factor determinante para el potencial reproductivo de los machos, y la alimentación de los animales en la etapa reproductiva influye directamente sobre la calidad de los gametos, por esta razón el objetivo del presente estudio fue determinar si existe influencia de la dieta sobre la calidad espermática de los machos Stirling y Supermachos. El diseño experimental consistió en alimentar durante 40 días reproductores machos de tilapia nilótica (*O. niloticus*), con tres tipos de alimento balanceado comercial, el alimento A fue alimento formulado comercialmente para la etapa de finalización de la engorda y el alimento B y C son formulaciones específicas para animales en proceso reproductivo, estas dos, de casas comerciales diferentes. Se tomaron medidas morfométricas de longitud total, estándar y peso al inicial y finalizar el tratamiento, de igual manera para evaluar la calidad espermática se realizó la extracción de semen a cada macho y se realizaron pruebas de viabilidad, motilidad, concentración espermática, y espermatocrito al inicio y al final de los tratamientos. Se presentó una diferenciación notoria al comparar los resultados de cada evaluación en conjunto para todos los tratamientos, la línea que presentó mayores diferencias entre las pruebas de calidad espermática realizadas fueron los supermachos, y el alimento que influyó más a esta línea fue el alimento C. En conclusión este estudio indica que la alimentación y la composición nutrimental de

los alimentos es fundamental para que los animales tengan una eficiente producción de gametos de buena calidad, pero para determinar si existen cambios mayormente tangibles en la calidad espermática de los machos es necesario extender el estudio por un tiempo más prolongado para lograr diferenciar cuál de los tratamientos es el más indicado para los reproductores de tilapia.

**Palabras clave:** Supermacho, Stirling, *Oreochromis niloticus*, calidad espermática.

### 9.1.2. ABSTRACT.

The success of aquaculture depends, among other factors, on reliable production technologies of alevinos with quality and enough quantity to ensure the viability of the crop, this viability has been targeted by the fishing industry on oocyte more than sperm cells, when clearly is the quality of both gametes which determines the success or failure of fertilization and larval survival. Sperm production is a determinant factor for the reproductive potential of male, and feeding the animals in the reproductive stage directly influences the quality of gametes, therefore the objective of this study was to determine whether there is an influence of the diet on sperm quality in Supermachos and Stirling males. The experimental design consisted of feed for 40 days male tilapia nilotica producers (*Oreochromis niloticus*), with three types of balanced commercial food, A food was commercially formulated for the end of fattening stage foods B and C are Specific formulations for animal reproductive process, these two from different companies. Morphometric measurements of total length, standard and initial weight were taken and the end of the treatment, in the same way to assess sperm quality, an extraction of semen was performed on each male and tests of viability, motility, sperm concentration were performed, and spermatocrit at the beginning and at the end of treatment. A remarkable difference was presented when comparing the results of each evaluation together for all treatments, the line that showed higher differences between sperm quality tests were supermachos, and the food that most influenced this line was the food C. In conclusion, this research indicates that food and nutritional composition of foods is essential for animals to have an efficient production of gametes of high quality, but to determine whether most tangible changes in sperm quality of males it is necessary to extend the research to differentiate which treatment is most suitable for tilapia reproductive.

**Keywords:** Supermacho, Strirling, *Oreochromis niloticus*, Sperm quality.

### 9.1.3. INTRODUCCIÓN.

#### 9.1.3.1. Características del esperma de los peces.

La producción espermática es un factor determinante para el potencial reproductivo de los machos en los vertebrados (Nakatsuru y Kramer 1982), especialmente cuando están sometidos a una fuerte competencia espermática, es decir cuando espermatozoides de distintos machos compiten por fertilizar los oocitos. Un mayor número de espermatozoides en el eyaculado puede asegurar al macho el éxito en la fertilización (Parker *et al.* 1996).

Los peces producen un considerable número de gametos. El macho produce varios cientos de millones de espermatozoides por kilogramo de peso corporal o más de  $100 \times 10^6$ /g de testículo por día. Esto es diez veces superior a la producción registrada en los mamíferos (Guerrero-Quiroz *et al.* 2008).

En el Cuadro 1 se muestran ejemplos de concentración espermática en algunas especies.

Cuadro 1.- Concentración espermática de algunas especies de peces

Espece	Conc. espermática cel/mL.	Referencia
<i>Salmo salar</i>	$9.54 \times 10^9$	Aas <i>et al.</i> 1991
<i>Scophthalmus maximus</i>	$38.3 \times 10^9$	Sunquet <i>et al.</i> 1992
<i>O. mossambicus (agua dulce)</i>	$9.9 \times 10^9$	Linhart <i>et al.</i> 1999
<i>O. mossambicus (agua salada)</i>	$4.9 \times 10^9$	Linhart <i>et al.</i> 1999
<i>Gadus morhua</i>	$3.92 - 29.07 \times 10^9$	Rakitin <i>et al.</i> 1999
<i>Hippoglossus hippoglossus.</i>	$2 \times 10^{11} - 6 \times 10^{11}$	Tvedt <i>et al.</i> 2001
<i>Melanogrammus aeglefinus</i>	$1.84 - 13.15 \times 10^9$	Rideout <i>et al.</i> 2004
<i>Brycon amazonicus</i>	$4.8 - 14.2 \times 10^6$	Cruz-Casallas <i>et al.</i> 2006
<i>Perca fluviatilis</i>	$18.8 - 127.5 \times 10^9$	Wirtz y Steinmann 2006.
<i>Menidia estor</i>	$2.21 - 2.55 \times 10^9$	Peñalosa 2009

La estructura de los espermatozoides en los peces es simple, de tipo primitivo (Andrade *et al.* 2001). Los diferentes tipos de espermatozoides se clasifican según las características morfológicas y de fecundación que posean, los cuales pueden ser: a) espermatozoides de fertilización externa, con o sin acrosoma, b) uniflagelados o biflagelados (aqua-espermatozoides), c) espermatozoides de fertilización interna con o sin acrosoma y d) uniflagelados o biflagelados (intro-espermatozoides) (Jaimeson y Leung 1991).

En peces teleósteos, la morfología del espermatozoide es muy variada. En el caso de las tilapias, la cabeza del espermatozoide es generalmente esférica. Esta es la característica principal debida a la ausencia de acrosoma (Billard 1988, Mattei 1993). Para compensar esa ausencia, la cabeza contiene un depósito de enzimas hidrolíticas. La mayoría de los peces teleósteos en sus oocitos poseen un micrópilo ubicado en el córion, este orificio permite la entrada del espermatozoide (Cosson *et al.* 1999).

La cabeza del espermatozoide con fertilización externa mide entre 2-4 micras y es casi esférica, con un collar que forma la pieza media donde se encuentran los centríolos con 2 a 9 mitocondrias. El flagelo por lo general está constituido por el axonema, en un arreglo de nueve pares de microtúbulos periféricos y un par central, en tanto que el flagelo mide entre 20 y 100 micras (Cosson *et al.* 1999; Andrade *et al.* 2001).

#### **9.1.3.2. Motilidad del espermatozoide.**

En el caso de los espermatozoides, las dos características más estudiadas entre las especies son: a) la movilidad de los espermatozoides en el tracto genital y b) el tiempo extremadamente corto de nado con el que cuentan, una vez que la motilidad ocurre (Guerrero-Quiroz *et al.* 2008).

Dentro de las estructuras que posee el espermatozoide, la responsable de la motilidad es el flagelo, el cual contiene mitocondrias que son las encargadas de proveer energía suficiente para la motilidad. La imposibilidad de cubrir este requerimiento energético a través de la adenosina trifosfato (ATP) podría ser la responsable de la disminución en el porcentaje de espermatozoides móviles (Jenkis 2000). Sin embargo, se ha reportado que la motilidad se puede incrementar con el uso de la solución fertilizante de Woynarovich y Horváth, debido a que sus componentes activan a las mitocondrias del espermatozoide por el aumento del AMPc y por el decremento de K<sup>+</sup> (Rodríguez 1992).

Cuando el espermatozoide de los peces se encuentra en la gónada, está contenido en una secreción espermática que los mantiene inmóviles y su motilidad inicia al ser expulsados y entrar en contacto con el agua (Billard 1988). Esto ocurre debido a la disminución de la presión osmótica y al descenso de las altas concentraciones de potasio existentes en la secreción testicular. A este proceso se le conoce como activación (Billard 1988).

Cuando los espermatozoides de los peces son liberados al agua cuentan con un breve periodo de activación (limitado a pocos segundos en varias especies). La activación se expresa en motilidad y velocidad de desplazamiento progresivo para lograr la fertilización. Esto se relaciona con que al ser liberados los ovocitos en el agua se hidratan y cierran su micropilo, por lo cual los espermatozoides liberados deben activarse, desplazarse encontrar el micropilo e introducirse para lograr la fertilización (Tabares *et al.* 2005).

Por otra parte existen estudios relacionados con la posible relación del genotipo en la calidad del semen, donde se han evaluado la influencia del genotipo sexual en la calidad del espermatozoide en la tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*), para ello utilizaron machos XX, XY y YY y evaluaron el índice gonadosomático, conteo de

espermatozoides, motilidad espermática y la duración de la motilidad del esperma. En sus resultados encontraron que estos parámetros no mostraron diferencia significativa, por lo que concluyeron que ni el genotipo sexual ni los tratamientos de reversión sexual por medio de hormona afectan la calidad del esperma en la tilapia nilótica (*O. niloticus*). (Gennote *et al.* 2012)

### **9.1.3.3. Mecanismos de capacitación, inhibición y activación de la motilidad.**

#### **9.1.3.3.1. Capacitación.**

Las investigaciones realizadas en torno a los mecanismos de capacitación muestran que los espermatozoides maduran y adquieren capacidad de activación durante su paso a través del conducto espermático. En esta etapa se mezclan con el plasma seminal, que tiene pH básico y es rico en bicarbonato ( $\text{HCO}_3$ ) (Mochida *et al.* 1999). Los requerimientos de condiciones alcalinas se confirmaron cuando se trató, de inducir la activación de los espermatozoides de ayu (*Plecoglossus altivelis*) provenientes directamente del tejido testicular, ya que al presentar valores de pH y  $\text{HCO}_3$  mas bajos que en el conducto espermático no lograron activarse (Ohta *et al.* 2001). Esto indica que las células epiteliales del conducto espermático ejercen control sobre la capacidad de adquirir motilidad de los espermatozoides, lo que posiblemente ocurre a través de la regulación del pH del semen por secreciones ácido/base (Ingerman *et al.* 2002).

El balance iónico es importante en la adquisición de la capacidad para la activación de la motilidad y está relacionado con los cambios en las concentraciones extracelulares de  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{HCO}_3^-$ , y/o iones de hidrógeno (Ohta y Shinriki 1998).

#### 9.1.3.3.2. Inhibición de la activación a nivel testicular.

Al terminar la espermatogénesis, los espermatozoides son liberados al conducto espermático y son bañados por un fluido testicular donde permanecen inmóviles y con un metabolismo bajo. Las mitocondrias se encuentran con bajo potencial de membrana con el fin de preservar las pocas reservas energéticas y disminuir la formación de compuestos de oxidación endógenos que pondrían en riesgo la integridad de membranas o compuestos citoplásmicos. Esta fase quiescente puede tener diferente duración debido a que la actividad sexual estacionaria de los peces y termina cuando el semen es liberado en un medio externo donde el espermatozoide adquiere metabolismo activo y por consiguiente la motilidad (Hamamah y Gatti 1998). Durante su estancia en el testículo, los espermatozoides de los peces son inmóviles (Müller *et al.* 1994) y en muchas especies también en el plasma seminal. La movilidad la adquieren progresivamente a través de su paso por el conducto espermático. Por lo tanto, los espermatozoides permanecen inmóviles hasta ser liberados al medio acuoso, en ese momento diferentes factores interactúan para desencadenar una respuesta que produce la activación de la motilidad. Los espermatozoides al ser liberados al medio acuoso, deben responder a condiciones fisicoquímicas como cambios en la presión osmótica, balance iónico y pH (Cosson *et al.* 1999).

Los factores de inhibición de la motilidad espermática de los peces están ligados a la osmolaridad en el caso de los ciprínidos (Krasznai *et al.* 2000, Linhart *et al.* 2002), la presión osmótica, concentración de K<sup>+</sup>, concentración de sacarosa, y pH del plasma celular menor a 7.0 en salmónidos y una proteína con tasa de migración (Migration rate) Mr = 120,000 específica del plasma seminal en algunos cíclidos (Cosson *et al.* 2000).

La tilapia nilótica (*O. niloticus*) carece de conducto espermático principal y como sus espermatozoides son móviles una vez producidos, ni el K<sup>+</sup> ni la

osmolaridad suprimen su motilidad en el testículo. Solo la proteína Mr=120000, presente en el plasma seminal inhibe a los espermatozoides. Esta proteína es secretada por las células de Sertoli que se localizan en la cabeza del espermatozoide. Una vez en el plasma seminal, forman polímeros que producen un ambiente altamente viscoso que impide la motilidad (Mochida *et al.* 1999).

#### **9.1.3.3.3. Activación.**

En el momento de la espermiación, el semen al entrar en contacto con el agua se diluye. En este momento se desencadenan una serie de eventos que conllevan a la activación, la cual está mediada por factores como: choque hipostómico, balance iónico, pH, óxido nítrico, AMPc, radicales libres y calmodulina (Tabares *et al.* 2005).

El agua dulce posee una baja osmolaridad con respecto al plasma seminal, por lo que ocurre un choque hiposmótico, el cual genera la señal inicial de la activación y que en peces ducleacúcolas tiene una duración entre 30 y 40 segundos. Este choque produce una respuesta celular activando la respuesta flagelar y un aumento del pH intracelular debido al incremento o disminución de la concentración iónica interna (Tabares *et al.*, 2005). Otro de los factores que intervienen en la activación del espermatozoide, son los canales iónicos. La disminución en la concentración del ión potasio ( $K^+$ ) inhibe la motilidad espermática (Lin y Dabrowski 1996). El efecto del  $K^+$  en teleósteos es menos claro, pero se ha determinado que no inhibe la actividad flagelar de algunas especies (Morisawa 1994). Los iones más ampliamente estudiados en la activación de la motilidad espermática en los peces de agua dulce son el  $K^+$  y el  $Ca^{+2}$ . Asimismo se ha observado que en función de la osmolaridad, el cambio en el balance iónico es el que desencadena la motilidad en el espermatozoide.

El pH intra o extra celular de teleósteos marinos y dulceacuícolas no es reconocido como un regulador importante de la motilidad espermática (Marian *et al.* 1997), pero se ha visto que si juega un papel en el proceso de activación de los espermatozoides (Tabares *et al.* 2005). La regulación del pH intracelular incluye el intercambio de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  y  $\text{K}^+/\text{H}^+$  a nivel de la membrana plasmática y el co-transporte de  $\text{NaCl}$  y  $\text{HCO}_3^-$ , y ATPasas e  $\text{H}^+$ . Por lo tanto, el único factor aparente de regulación del  $\text{pH}_i$  parece ser el potencial de membrana plasmática, el cual es en si mismo dependiente en parte del  $\text{pH}_e$  y del mismo  $\text{pH}_i$ , por lo que el  $\text{pH}_i$  es diferente del pH extracelular (Hamamah *et al.* 1998). De esta forma, los efectos del pH sobre la motilidad espermática son parcialmente reversibles siempre y cuando no se comprometa la permeabilidad de la membrana. Lo anterior muestra nuevamente la complejidad de los eventos que actúan en la regulación del inicio de la activación de la motilidad.

La temperatura incide directamente sobre el metabolismo de los espermatozoides, dado que a bajas temperaturas se prolonga la motilidad a través del tiempo y se reduce la velocidad de desplazamiento (Billard y Cosson 1988).

#### 9.1.4. MATERIALES Y METODOS

El trabajo experimental se llevó a cabo en las instalaciones de la Unidad de Cuarentena de Tilapia y Bagre del laboratorio de Biología acuática “J. Javier Alvarado Diaz” en la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, la cual se encuentra ubicada en la ciudad de Morelia estado de Michoacán

##### 9.1.4.1. Origen de los animales.

Para el diseño experimental se utilizaron grupos de reproductores machos de tilapia (*O. niloticus*) de las líneas Supermacho y Stirling, de la colección que posee la unidad de cuarentena de Tilapia y Bagre del Laboratorio de Biología Acuática de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

##### 9.1.4.2. Alimentos balanceados

El alimento balanceado que se utilizó fue pellet comercial, dos son formulaciones específicas para reproductores y el otro es una formulación de la fase final de engorda, que para efectos del presente estudio se denominaron con letras A, B y C. La principal variante entre estas tres formulaciones es el nivel de proteína (Cuadro 2)

Cuadro 2. Contenido nutricional de los alimentos utilizados, datos proporcionados por cada casa maquiladora.

ALIMENTO	ALIMENTO	% PROT.	%GRASA	%FIBRA	%HUMEDAD	%CENIZA
ENGORDA	<b>A</b>	25	5	5.50	12	12
REPRODUCTORES	<b>B</b>	36	6	5	12	8
REPRODUCTORES	<b>C</b>	36	6	5	12	10

El alimento A es para la etapa de engorda de tilapia, su presentación es extruido flotante en partícula de 7.5 mm, recomendado para tilapias con un intervalo de peso de 501 a 1000 grs o en etapa de finalización de la engorda.

El alimento B es una dieta basada en proteína marina, formulada para varios tipos de peces reproductores omnívoros y piscívoros de cultivo. Este pellet (6.5 mm) es especial para generar un desarrollo gonadal eficiente y esta adicionado con vitaminas y carotenoides y suplementos que son requeridos para el adecuado desarrollo de los huevos y esperma. .

El alimento C es para la etapa de “Reproducción de bagre y tilapia”. Su presentación es un extruido flotante en partícula de 4.8 mm. Este producto esta reforzado con vitaminas, minerales y aditivos para los peces reproductores de cualquier peso.

#### **9.1.4.3. Determinación de la composición proximal de los alimentos balanceados.**

Para evaluar la composición bioquímica de las muestras, se llevó a cabo la determinación de la composición proximal de cenizas, humedad, lípidos totales, proteína y ácidos grasos a partir de muestras de 100 g de cada tipo de alimento como a continuación se explica:

##### **9.1.4.3.1. Humedad**

El contenido de humedad se realizó por desecación de las muestras en un horno a 100 °C por 12 horas y se determinó por método gravimétrico (diferencia entre el peso inicial y final) (AOAC 2000).

Cálculos: contenido de humedad (%)= $[(A-B)/A]*100$

Donde: A= Peso de la muestra humedad (g)

B= Peso de la muestra seca (g)

#### **9.1.4.3.2. Proteína cruda**

Este análisis evalúa el contenido de nitrógeno total proteínico en la muestra. Este se determina con el uso de un auto analizador Nitrógeno/Proteína (Leco FP528) por medio de la técnica de Dumas (conductividad de gases) utilizando helio como referencia y multiplicando el resultado por el factor 6.25 para conocer la concentración de proteína (16%N) (Olvera *et al.* 1993).

#### **9.1.4.3.3. Extracto etéreo**

El contenido de lípidos totales se determina mediante el método Soxhlet, (SOXHLET AVANTI TECATOR, modelo 2050) utilizando éter de petróleo como solvente (AOAC 2000).

Cálculos: contenido de extracto etéreo (%)= $[(B-A)]*100$

Donde: A=peso del crisol limpio y seco (g)

B=peso de crisol con grasa (g)

#### **9.1.4.3.4. Ceniza**

La ceniza considerada como contenido de minerales totales o material inorgánico de la muestra, se determinó mediante la calcinación total de la muestra a 550 °C en una mufla durante 3 horas hasta alcanzar peso constante (AOAC 2000).

Cálculos: contenido de ceniza (%)= $100-[(B-A)/C]*100$

Donde: A=Peso del crisol con muestras (g)

B=Peso del crisol con ceniza (g)

C=Peso de la muestra (g)

#### 9.1.4.4. Distribución de los animales.

Los animales se separaron en grupos de 10 organismos por jaula y dos jaulas por estanque de 7 m<sup>3</sup>, equivalente a 10 peces de cada variedad por dieta. Cada tanque mantuvo un flujo constante de agua de 30 L/min (Figura 1). El agua estuvo recirculada y filtrada con un sistema de biofiltro para mantener la calidad adecuada para los animales, además el sistema contó con un sistema de calefacción lo que permitió que la temperatura del agua registrara en promedio 28°C.

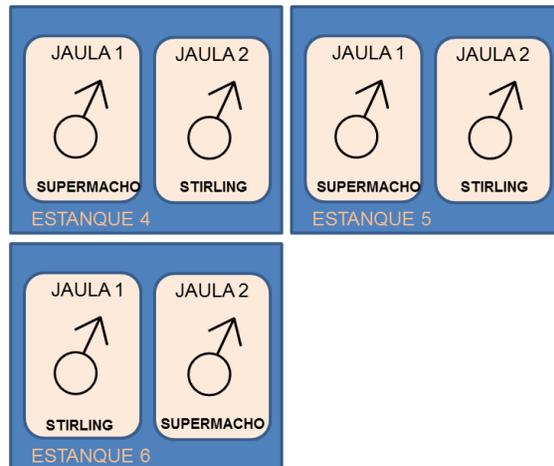


Figura 1 Distribución espacial de los organismos en las jaulas y estanques.

#### 9.1.4.5. Alimentación.

El esquema de alimentación que se utilizó en el presente experimento fue de 1.5 % de la biomasa de cada jaula, dividido en dos raciones diarias, para lo cual

previamente los organismos fueron pesados para realizar los cálculos correspondientes a las raciones (Cuadro 3).

Cuadro 3 Esquema de alimentación de los animales en base a la biomasa de cada jaula.

ESTANQUE	JAULA	LINEA	BIOMASA (g)	ALIMENTO	RACION/DIA (g)
4	1	SUPERMACHO	14032	A	210.48
	2	STIRLING	9214	A	138.21
5	1	SUPERMACHO	16362	B	245.43
	2	STIRLING	8210	B	123.15
6	1	STIRLING	8682	C	130.23
	2	SUPERMACHO	17374	C	260.61

#### 9.1.4.6. Evaluación reproductiva.

Al iniciar y finalizar el experimento, todos los animales fueron pesados y se les realizó morfometría (peso, longitud total y estándar) y al final del experimento se evaluó de la ganancia de peso

Ganancia de peso:

Es el incremento de peso de la población durante el experimento.

PG= Peso final – Peso inicial

Dónde:

PG= Ganancia de peso

La evaluación de la calidad espermática de los animales se realizó iniciando el experimento y a los 40 días de alimentación continua. Para la recolección de semen los machos se anestesiaron con benzocaína, solución previamente preparada en

medio acuoso (100 gr/L de alcohol); los animales se mantuvieron en la solución anestésica hasta que perdieron el equilibrio y fueron manipulables, aproximadamente 2 minutos. Inmediatamente después se retiraron de la solución anestésica, se secaron del exceso de agua con una franela húmeda, se sujetaron por la cabeza y la región caudal se movió suavemente hacia los lados para relajar la musculatura. Seguidamente se les dio masaje y se realiza una presión en los flancos desde atrás de los opérculos hacia el poro genital, siguiendo la región donde se localizan las gónadas. Para evitar al máximo la contaminación con heces u orina, el poro urogenital se limpió con papel absorbente y el esperma inicial que se descartó. Una vez que el semen quedó expuesto, se colectó con ayuda de un tubo capilar introducido en un tubo Eppendorf de 0.6 mililitros a temperatura ambiente para su posterior utilización.

La evaluación de la viabilidad espermática se extrajo el esperma mediante el método anteriormente descrito. Previo a la obtención de la muestra de esperma se preparó un colorante especial de acuerdo con la técnica de eosina-nigrosina para teñir a los espermatozoides. La preparación del colorante se realiza agregando a 100 mL de agua destilada 0.67 gramos de eosina amarilla y 0.9 gramos de cloruro de sodio, esta mezcla debe hacerse en una placa de calentamiento. Después de que se disolvió completamente la eosina, se agregan 10 gramos de nigrosina. La mezcla se deja enfriar, se filtra y se almacena en un frasco color ámbar de vidrio a temperatura ambiente.

#### **9.1.4.7. Evaluación de la viabilidad espermática.**

Para la tinción de los espermatozoides se obtuvieron alícuotas de 2.5  $\mu$ l las cuales colocaron en tubos Eppendorf de 0.6 mL y posteriormente se les adicionó 2.5  $\mu$ L decolorante, posteriormente las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente por 30 segundos. Transcurrido el tiempo, con una micropipeta se tomó una alícuota de 2.5  $\mu$ L, las cuales se transfirieron a un portaobjetos de vidrio y se realizó un

extendido de la gota con la ayuda de otro portaobjetos, este procedimiento se realizó por duplicado.

Los portaobjetos que contienen el extendido fueron secados al aire examinados directamente bajo el microscopio compuesto con aumento de 100X (Figura 1).

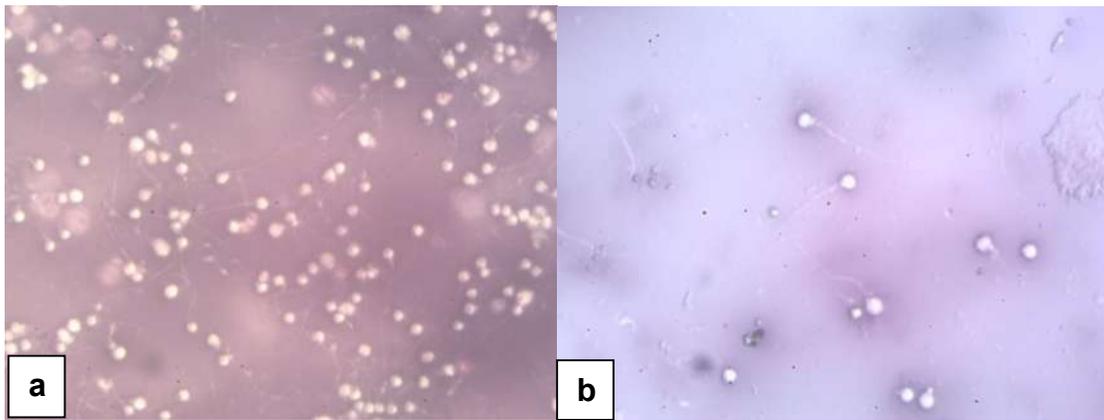


Figura 2 **a y b**. Espermatozoides de tilapia (*O. niloticus*) en tinción de eosina-nigrosina, vistos con objetivo 100X

Los espermatozoides que se observaron blancos fueron clasificados como vivos y aquellos que mostraron coloración rosa o roja en el interior del citoplasma fueron clasificados como muertos.

Se realizó un conteo total de 200 células en cada placa y se determinó el porcentaje de viabilidad observando la proporción de espermatozoides muertos con respecto al total espermatozoides observados en el conteo realizado.

#### **9.1.4.8. Dilución y cuantificación de espermatozoides.**

Para determinar la dilución adecuada para la cuantificación espermática se realizaron las siguientes diluciones 1:10, 1:100, 1:500 y 1:1000, con una solución a

base de formol (formol 37% + 5 g de bicarbonato de sodio) la cual inhibe la motilidad de los espermatozoides en la solución

El tubo que contiene la mezcla de esperma/solución formol y bicarbonato, se agita por un espacio de 5 segundos con la finalidad de homogeneizar la mezcla. Posteriormente, se toma una cantidad suficiente para cargar la cámara de Neubauer y observa en un microscopio compuesto con un aumento de 40X y de esta manera se determina cuál es la dilución más adecuada para contar las células espermáticas.

#### **9.1.4.9. Evaluación de la concentración espermática.**

Para la determinación de la concentración espermática se utilizaron dos métodos: a) Evaluación del espermatocrito y b) Conteo celular en hematocitómetro.

Para la medición del espermatocrito, se llenan  $\frac{3}{4}$  partes de un tubo capilar de 75.0 mm de largo y 0.2 mm de diámetro interno con la muestra de semen, y posteriormente se sella uno de sus extremos con plastilina. Seguidamente los capilares se centrifugan a 1200 rpm durante 15 minutos en una centrifuga para microhematocrito. Una vez transcurrido el tiempo de centrifugación se sacan los tubos e inmediatamente después se mide la altura del paquete celular (columna blanca) y se calcula su proporción (%) con relación a la altura total de la columna de esperma.

Para el método del hematocitómetro se evaluó la densidad espermática bajo un microscopio compuesto con un aumento de 40X usando una cámara de Neubauer. El esperma de cada macho fué diluido en una proporción de 1:1000 . En la cámara de Neubauer se realiza el conteo de cinco cuadrantes en la cámara superior y cinco en la cámara inferior (1 mm<sup>2</sup>) y se determinó la densidad espermática (cel/mL) por macho (Figura 3).

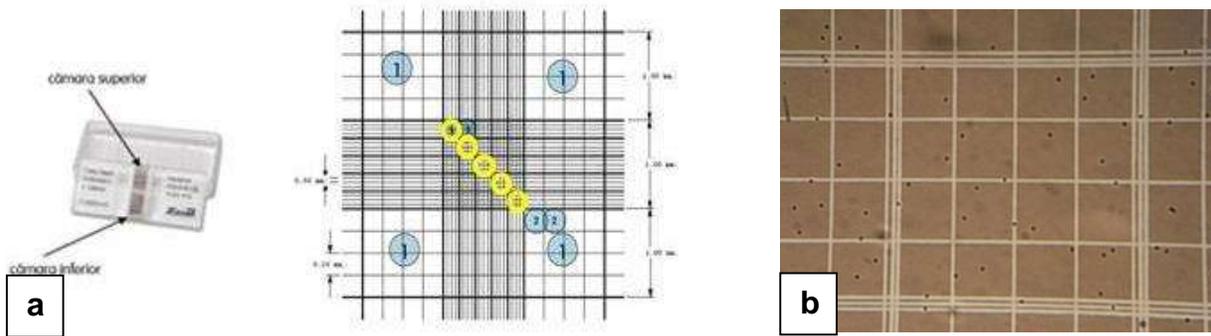


Figura 3 a. Cámara de Neubauer b. Células espermáticas en cámara de Neubauer 40X.

Para determinar la concentración espermática se aplicó la siguiente fórmula:

$$\text{CONCENTRACIÓN} = \frac{\text{número de células} \times 10.000}{\text{Numero de cuadros} \times \text{dilución}}$$

#### 9.1.4.10. Evaluación del tiempo y motilidad espermática.

La motilidad espermática se determinó después de activar la muestra colocando una gota de semen en un portaobjetos y una gota de agua, y luego fue observada en un microscopio compuesto con un aumento de 20X. El grado de motilidad es estimado usando una escala de unidades arbitrarias de 0 a 5 propuesta por Sánchez-Rodríguez y Billard (1977). La estimación de la motilidad espermática es iniciada inmediatamente (aproximadamente 30 segundos) después de la dilución (Cuadro 4).

Cuadro 4 Tabla de caracterización de la motilidad espermática. (Sánchez-Rodríguez y Billard 1977)

INDICE	CARACTERISTICAS DE MOTILIDAD
5	La mayoría de los espermatozoides muestran movimiento rápido, es imposible seguir la trayectoria de cualquier espermatozoide.

4	Muchos espermatozoides se mueven rápidamente mientras que algunos se mueven lentamente.
3	Tres clases de espermatozoides pueden ser encontrados en números equivalentes: espermatozoides con movimiento rápido, espermatozoides con movimiento lento o vibratorio, y aquellos que permanecen inmóviles.
2	Muchos espermatozoides tienen vibración o están inmóviles.
1	Muchos espermatozoides son inmóviles y algunos presentan vibración lateral.
0	Todos los espermatozoides están inmóviles.

#### 9.1.4.11. Análisis estadísticos

Para el análisis estadístico de los resultados obtenidos en las diferentes pruebas realizadas se utilizó el programa estadístico Minitab versión 16, con él se corrieron pruebas de Anova con comparación de medias de Tuckey y Fisher.

Se realizó una comparación entre el muestreo final para cada variable, donde se puede determinar si existió diferencia entre los tratamientos y los grupos.

Al realizar el muestreo inicial los animales estaban siendo alimentados con el alimento A; se evaluaron las variables peso, longitud estándar, longitud total, viabilidad espermática, concentración espermática, espermatozoides y motilidad espermática.

### 9.1.5. RESULTADOS.

El ANOVA demostró que entre las variables morfométricas, existen diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre los grupos (Cuadro 5). Los supermachos presentan más peso que los machos Stirling, de igual manera se encontraron en las variables longitud estándar y longitud total que los supermachos tienen valores más altos con respecto a los macho

Influencia del alimento balanceado en la calidad gamética en reproductores de tilapia (*Oreochromis niloticus*) líneas Supermacho y Stirling.

Cuadro 5 Comparación entre mismos tratamientos, muestreo inicial y muestreo final

	GRUPOS					
	SUPERMACHO	SUPERMACHO	SUPERMACHO	STIRLING	STIRLING	STIRLING
	EST. 4	EST. 5	EST. 6	EST. 4	EST. 5	EST. 6
	MED ± EE	MED ± EE	MED ± EE	MED ± EE	MED ± EE	MED ± EE
<b>PESO</b>	1403.2 ± 77.6 <sup>b</sup>	1636.2 ± 88.5 <sup>ab</sup>	1737.4 ± 87.1 <sup>a</sup>	921.4 ± 17.9 <sup>c</sup>	821 ± 27.7 <sup>c</sup>	868.2 ± 16 <sup>c</sup>
<b>LONG. ESTANDAR</b>	35.3 ± 0.496 <sup>a</sup>	36.3 ± 0.593 <sup>a</sup>	36.57 ± 0.516 <sup>a</sup>	30.2 ± 0.35 <sup>b</sup>	29.87 ± 0.362 <sup>b</sup>	30.35 ± 0.213 <sup>b</sup>
<b>LONG. TOTAL</b>	42.3 ± 0.735 <sup>ab</sup>	44.32 ± 0.756 <sup>a</sup>	44.51 ± 0.411 <sup>a</sup>	36.87 ± 0.36 <sup>bc</sup>	32.14 ± 3.6 <sup>c</sup>	36.59 ± 0.227 <sup>bc</sup>

\*Grupos que no comparten la misma letra muestran diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ).

La viabilidad espermática mostró diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre los grupos, las muestras de semen de los supermachos del estanque 5 y 6 presentaron mayor viabilidad espermática ( $1.94 \pm 0.0081$  y  $1.94 \pm 0.0091$  respectivamente) comparados con los supermachos del estanque 4 ( $1.88 \pm 0.0199$ ) (Figura 4Figura 4).

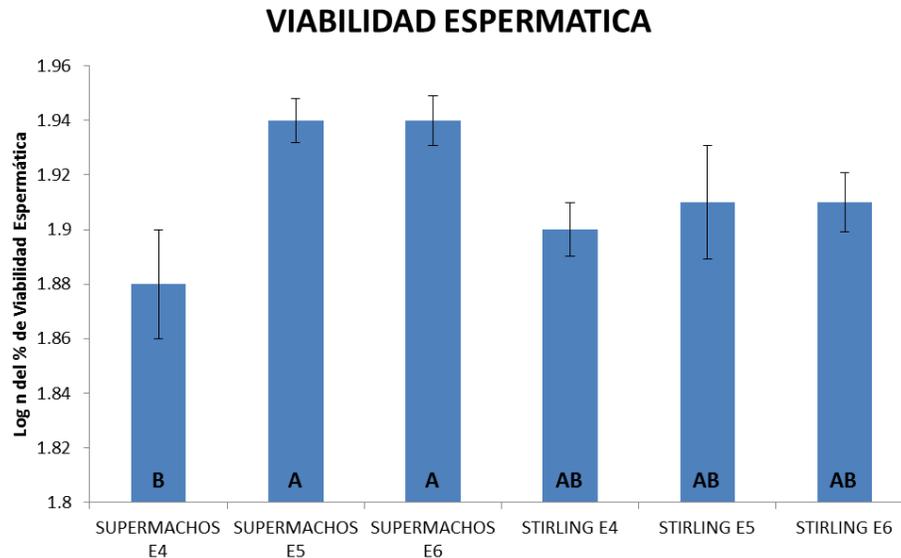


Figura 4 Comparación de la viabilidad espermática del muestreo inicial, entre los grupos.

La concentración espermática evidenció diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre los grupos. Las muestras de semen de los supermachos del estanque 5 y 6 presentaron mayor concentración espermática ( $6506 \pm 938$  y  $6641 \pm 2169$  respectivamente) que las muestras de los otros grupos, en tanto que los machos Stirling del estanque 4 presentaron la menor concentración espermática ( $1344 \pm 387$ ) (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**).

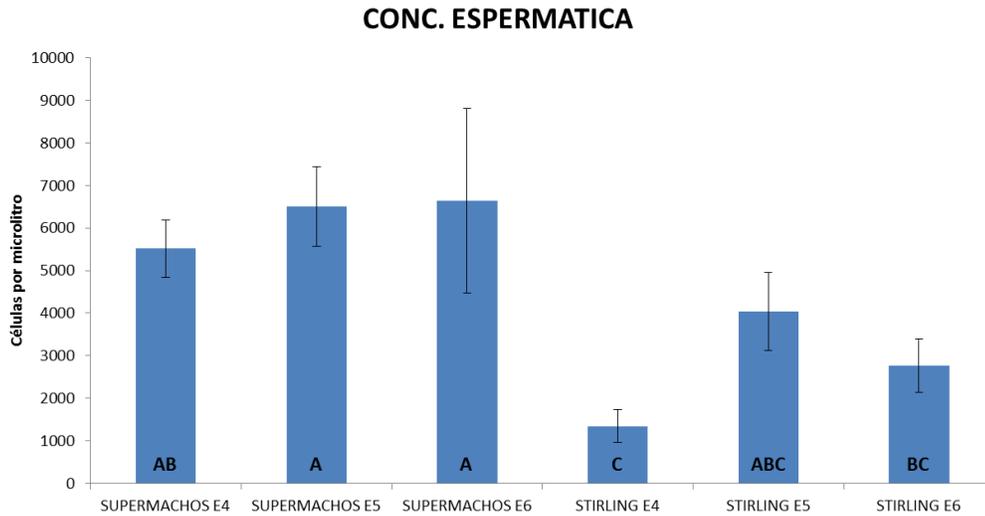


Figura 5 Comparación de la concentración espermática del muestreo inicial, entre los grupos

En lo que respecta a las variables espermatocono y motilidad, no hubo diferencia significativa ( $p \geq 0.05$ ) entre los grupos.

#### 9.1.5.1. Comparación entre mismos tratamientos, muestreo inicial y muestreo final

Para los supermachos del tratamiento A, solo presentaron diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) en el espermatocono, el cual disminuyó en el muestreo final ( $0.674 \pm 0.136$ ). En el Cuadro 6 se muestran todas las variables evaluadas y sus respectivas comparaciones.

Cuadro 6 Valores iniciales y finales de la comparación entre el muestreo inicial y final del tratamiento con alimento A, en supermachos

Variables	Alimento "A" Supermachos				Comparación Grupos
	Muestreo inicial		Muestreo final		
	Media	EE	Media	EE	
Peso	1043.2	77.60	1642	109.0	AA <sup>ns</sup>
LE	35.30	0.496	35.78	0.652	AA <sup>ns</sup>
LT	42.30	0.735	43.66	0.776	AA <sup>ns</sup>

**Influencia del alimento balanceado en la calidad gamética en reproductores de tilapia (*Oreochromis niloticus*) líneas Supermacho y Stirling.**

Viabilidad	1.880	0.019	1.930	0.006	AA <sup>ns</sup>
Conc. esper.	5113	673	1559	422.0	AA <sup>ns</sup>
Espermatocrito	1.012	0.117	0.674	0.136	AB*
Motilidad	15.84	0.272	15.81	0.286	AA <sup>ns</sup>

\*Diferencias significativas  $p \leq 0.05$  y ns diferencias no significativas.

Para el tratamiento con el alimento B, las variables evaluadas no presentaron diferencias significativas a excepción de la concentración espermática donde sí se observaron diferencias ( $p \leq 0.05$ ) El muestreo inicial mostró un valor 2,2 veces mayor que el muestreo final (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**).

Cuadro 7 Comparación entre mismos tratamientos, muestreo inicial y muestreo final del tratamiento con alimento B, en supermachos

Variables	<b>Alimento "B" Supermachos</b>				Comparación Grupos
	<b>Muestreo inicial</b>		<b>Muestreo final</b>		
	Media	EE	Media	EE	
Peso	1636.2	88.5	1786.8	78.00	AA <sup>ns</sup>
LE	36.30	0.593	36.330	0.545	AA <sup>ns</sup>
LT	44.32	0.756	45.020	0.618	AA <sup>ns</sup>
Viabilidad	1.940	0.0081	1.950	0.679	AA <sup>ns</sup>
Conc. esper.	6506	938.0	2878.0	609.0	AB*
Espermatocrito	1.048	0.170	0.9116	0.048	AA <sup>ns</sup>
Motilidad	15.76	0.292	15.767	0.335	AA <sup>ns</sup>

\*Diferencias significativas  $p \leq 0.05$  y ns diferencias no significativas.

Para los peces (supermachos) alimentados con la dieta C aunque los valores de concentración espermática presentaron una fuerte disminución entre los valores iniciales y finales, la única variable que tuvo diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) fue la viabilidad espermática que aumentó en el muestreo final ( $1.970 \pm 0.004$ ) (Cuadro 8).

Cuadro 8 Valores iniciales y finales de la comparación entre el muestreo inicial y final del tratamiento con alimento C, en supermachos.

Variables	<b>Alimento "C" Supermachos</b>				Comparación Grupos
	<b>Muestreo inicial</b>		<b>Muestreo final</b>		
	Media	EE	Media	EE	

**Influencia del alimento balanceado en la calidad gamética en reproductores de tilapia (*Oreochromis niloticus*) líneas Supermacho y Stirling.**

Peso	1737.4	87.10	2013	161.0	AA <sup>ns</sup>
LE	36.57	0.516	37.27	0.475	AA <sup>ns</sup>
LT	44.51	0.411	45.85	0.515	AA <sup>ns</sup>
Viabilidad	1.940	0.009	1.970	0.004	AB*
Conc. esper.	6641	2169	3150	781.0	AA <sup>ns</sup>
Espermatocrito	0.730	0.176	0.39	0.071	AA <sup>ns</sup>
Motilidad	15.48	0.149	15.31	0.140	AA <sup>ns</sup>

\*Diferencias significativas  $p \leq 0.05$  y ns diferencias no significativas.

En el caso de los machos Stirling con el alimento A se evidenciaron diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) en la longitud estándar ( $31.27 \pm 0.372$ ) y viabilidad espermática ( $1.940 \pm 0.007$ ) que fueron significativamente mayores en el muestreo final (Cuadro 9).

Cuadro 9 Valores iniciales y finales de la comparación entre el muestreo inicial y final del tratamiento con alimento A, en machos Stirling.

Variables	Alimento "A" Machos Stirling				Comparación Grupos
	Muestreo inicial		Muestreo final		
	Media	EE	Media	EE	
Peso	921.4	17.90	1139.6	30.40	AB*
LE	30.20	0.359	31.27	0.372	AA <sup>ns</sup>
LT	36.87	0.365	38.77	0.340	AB*
Viabilidad	1.90	0.009	1.940	0.007	AB*
Conc. esper.	1344	387.0	1235	290.0	AA <sup>ns</sup>
Espermatocrito	0.65	0.127	6.640	0.075	AA <sup>ns</sup>
Motilidad	16.42	0.376	16.74	0.229	AA <sup>ns</sup>

\*Diferencias significativas  $p \leq 0.05$  y ns diferencias no significativas.

Las tilapias de la variedad Stirling tratadas con el alimento B evidenciaron diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) en las variables peso ( $1017.3 \pm 32.40$ ), longitud estándar ( $31.47 \pm 0.375$ ) y viabilidad espermática ( $1.960 \pm 0.006$ ), cuyos valores fueron mayores en el muestreo final (Cuadro 10).

Cuadro 10 Valores iniciales y finales de la comparación entre el muestreo inicial y final del tratamiento con alimento B, en machos Stirling

**Influencia del alimento balanceado en la calidad gamética en reproductores de tilapia (*Oreochromis niloticus*) líneas Supermacho y Stirling.**

<b>Alimento "B" Machos Stirling</b>					
Variables	<b>Muestreo inicial</b>		<b>Muestreo final</b>		<b>Comparación Grupos</b>
	Media	EE	Media	EE	
Peso	821.0	27.70	1017.3	32.40	AB*
LE	29.87	0.362	31.47	0.375	AB*
LT	32.14	3.600	37.24	0.608	AA
Viabilidad	1.910	0.026	1.960	0.006	AB*
Conc. esper.	4044	918.0	3735	1522	AA <sup>ns</sup>
Espermatocrito	0.690	0.138	0.583	0.109	AA <sup>ns</sup>
Motilidad	16.14	0.201	16.03	0.192	AA <sup>ns</sup>

\*Diferencias significativas  $p \leq 0.05$  y ns diferencias no significativas.

Las tilapias que consumieron el alimento C, presentaron diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) en todas las variables (con valores mayores en el muestreo final), a excepción de la concentración espermática que no tuvo diferencia (Cuadro 11).

Cuadro 11 Valores iniciales y finales de la comparación entre el muestreo inicial y muestreo final del tratamiento con alimento C, en machos Stirling.

<b>Alimento "C" Stirling</b>					
Variables	<b>Muestreo inicial</b>		<b>Muestreo final</b>		<b>Comparación Grupos</b>
	Media	EE	Media	EE	
Peso	868.2	16.0	1203	88.50	AB*
LE	30.35	0.21	31.62	0.319	AB*
LT	36.59	0.22	38.35	0.362	AB*
Viabilidad	1.910	0.01	1.950	0.006	AB*
Conc. esper.	2764	630	3414	748.0	AA <sup>ns</sup>
Espermatocrito	0.450	0.13	0.820	0.086	AB*
Motilidad	15.90	0.27	15.83	0.119	AA <sup>ns</sup>

\*Diferencias significativas  $p \leq 0.05$  y ns diferencias no significativas.

**9.1.5.2. Comparación entre el muestreo final todos los tratamientos y todos los grupos.**

En la comparación entre los dos grupos, para el peso, longitud estándar y total presentaron tendencias similares. Para ambas variables fueron significativamente mayores en peso y LE las tilapias del grupo supermacho alimentadas con las dietas C y B. En segundo lugar fue para los supermachos alimentados con la dieta A. Y el tercer grupo con los valores promedio más bajos los obtuvieron los peces de la variedad Stirling con las tres dietas ( $p \leq 0.05$ ) ( Figura 6, Figura 7 y Figura 8).

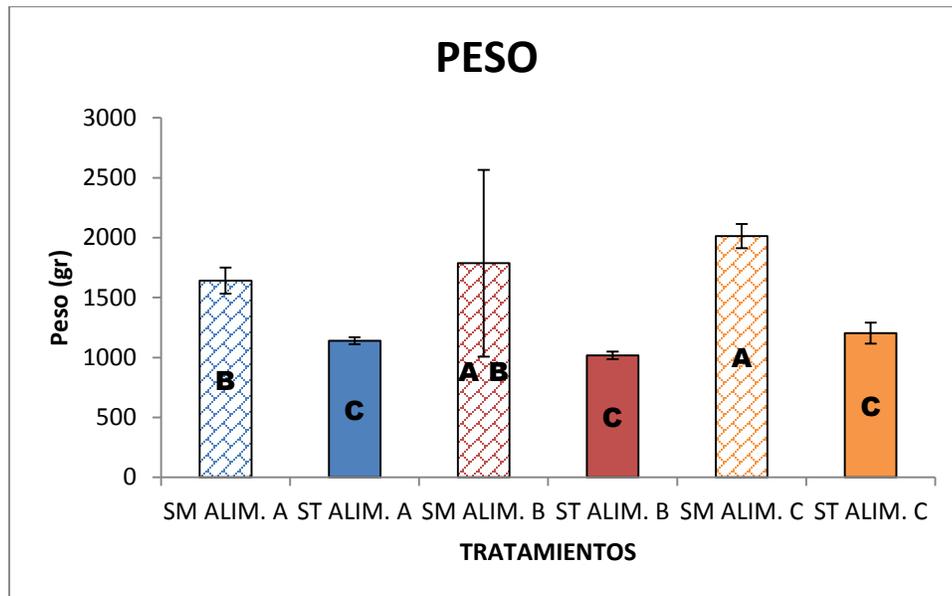


Figura 6. Comparación entre tratamientos y grupos en el muestreo final para la variable peso. SM (Supermacho), ST (Stirling)

Influencia del alimento balanceado en la calidad gamética en reproductores de tilapia (*Oreochromis niloticus*) líneas Supermacho y Stirling.

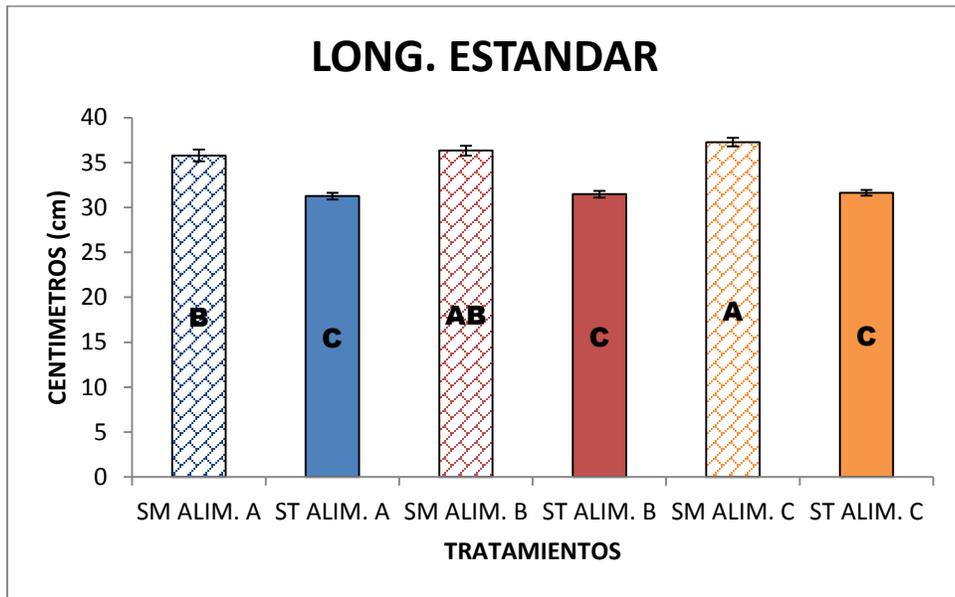


Figura 7 Comparación entre tratamientos y grupos en el muestreo final para la variable longitud estandar. SM (Supermacho), ST (Stirling).

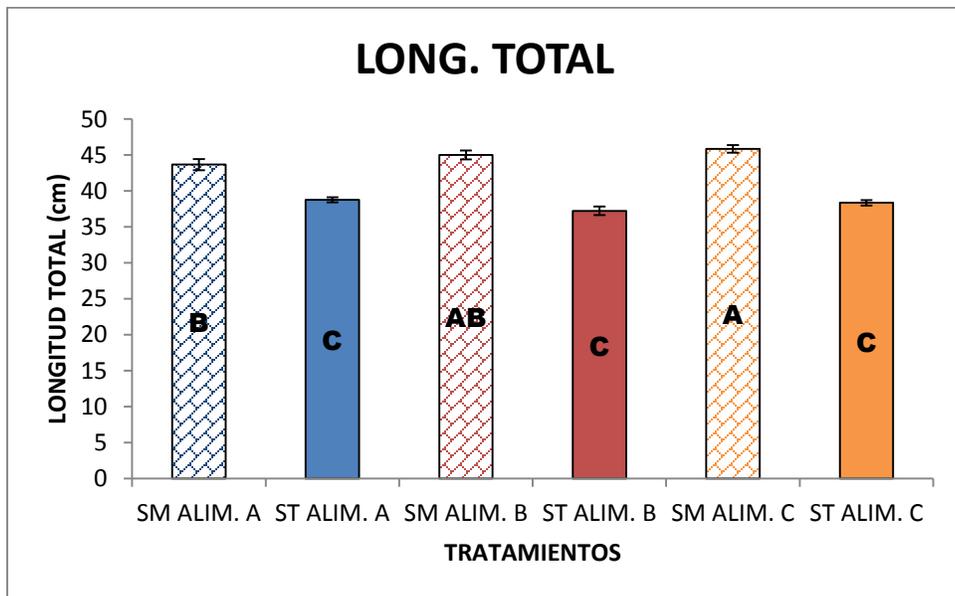


Figura 8 Comparación entre tratamientos y grupos en el muestreo final para la variable longitud total. SM (Supermacho), ST (Stirling).

En la variable viabilidad espermática, en el tratamiento con alimento C, los supermachos presentaron diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) con valores más altos ( $1.97 \pm 0.0041$ ) con respecto a los demás, y en los machos Stirling los valores más altos los presentó el tratamiento con alimento B ( $1.96 \pm 0.006$ ) (Figura 9).

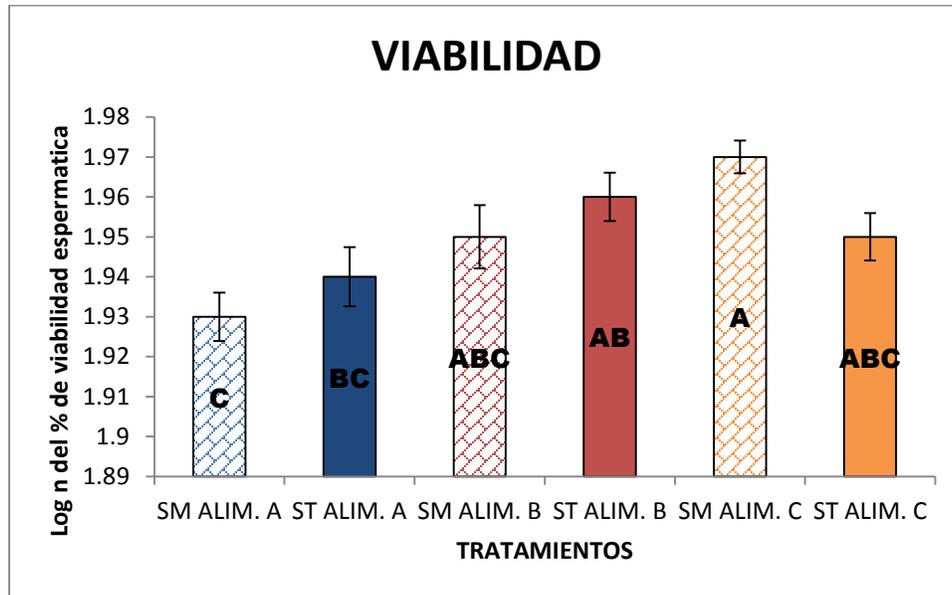


Figura 9 Comparación entre tratamientos y grupos en el muestreo final para la variable viabilidad. SM (Supermacho), ST (Stirling)

En la evaluación de la variable concentración espermática no hubo diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) entre los tratamientos y los grupos. Para la variable espermatocrito se evidenciaron diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre los tratamientos y entre los grupos. Los supermachos tratados con el alimento B lograron alcanzar un mayor valor ( $0.911 \pm 0.048$ ) y en tanto que los machos Stirling del tratamiento C obtuvieron valores más altos ( $0.82 \pm 0.086$ ) (Figura 10).

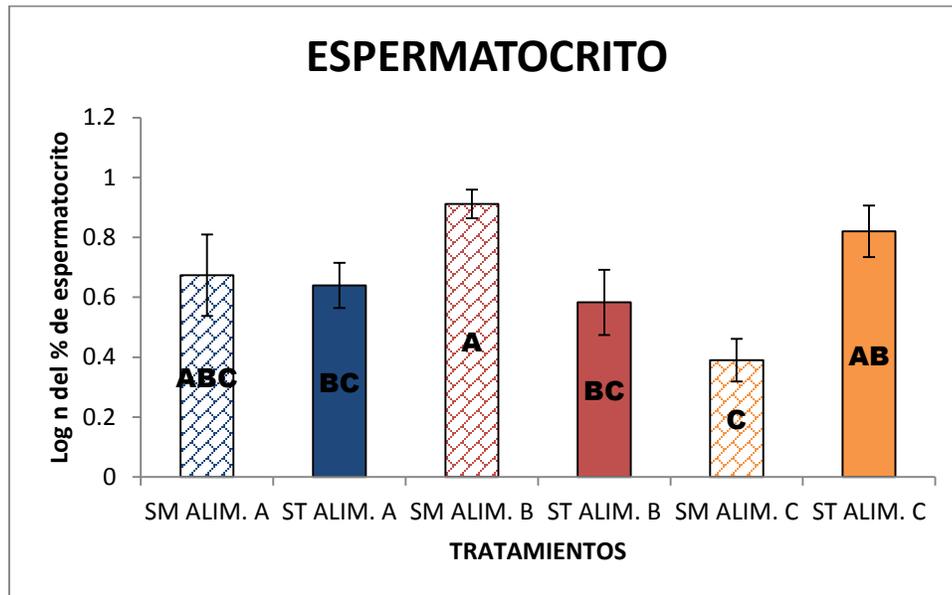


Figura 10 Comparación entre tratamientos y grupos en el muestreo final para la variable espermatozoides. SM (Supermacho), ST (Stirling).

En la motilidad espermática existieron diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre los tratamientos y grupos los machos Stirling del tratamiento A, registraron mayor motilidad ( $16.74 \pm 0.229$ ) con respecto a todos los grupos. Los supermachos del mismo tratamiento obtuvieron un valor mayor ( $15.81 \pm 0.286$ ) comparativamente con los de su misma variedad (Figura 11).

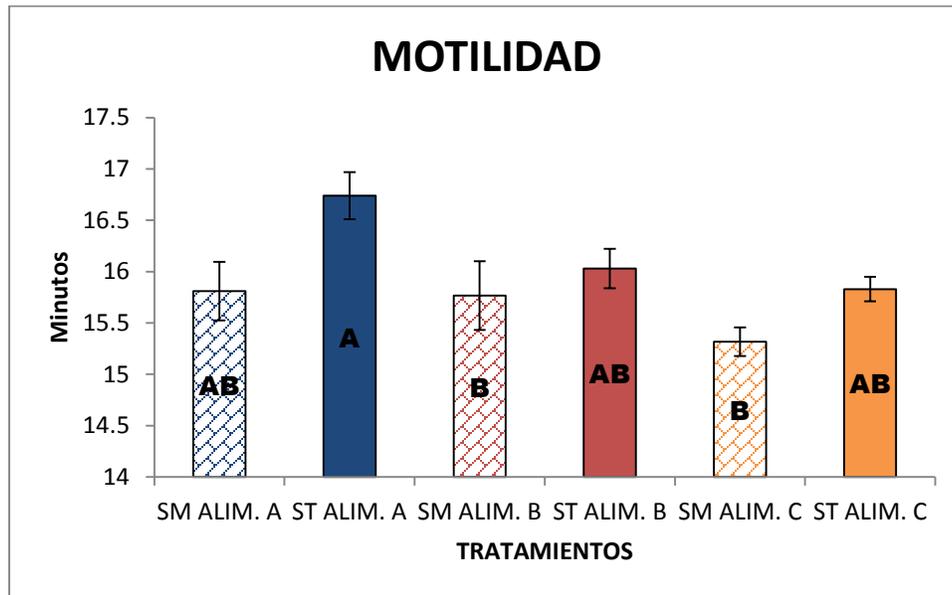


Figura 11 Comparación entre tratamientos y grupos en el muestreo final para la variable espermatocrito. SM (Supermacho), ST (Stirling).

### 9.1.5.3. Composición proximal de los alimentos utilizados como tratamientos.

En el cuadro 12 se comparan los valores de porcentaje de proteínas, grasas, humedad y ceniza que ofrecen las casas maquiladoras y los obtenidos en laboratorio para cada tipo de pellet utilizado en este experimento (Cuadro 12).

Cuadro 12 Comparación de la composición proximal de los alimentos utilizados como tratamientos, entre los datos ofrecidos por las casas maquiladoras (maq) y los datos obtenidos en el laboratorio (lab).

Alimento	% Proteína		% Grasa		% Humedad		% Ceniza	
	maq	lab	maq	lab	maq	lab	maq	lab
<b>Engorda (A)</b>	25	27.4	5	3.2	12	8	12	12.4
<b>Reproductores (B)</b>	36	39.6	6	4	12	7.8	8	12.6
<b>Reproductores (C)</b>	36	37.2	6	7.2	12	8.3	6	14.2

Los porcentajes de proteína obtenidos en las pruebas de análisis proximal son mayores a los datos de etiqueta de los alimentos. En cuanto al porcentaje de grasa en el alimento A y B presentaron menor cantidad de grasa a diferencia del alimento C que tuvo mayor cantidad que la reportada en etiqueta comercial.

En el porcentaje de humedad los valores obtenidos en el laboratorio son menores que los reportados por las casas maquiladoras y en el porcentaje de ceniza en el alimento A los valores son muy similares, a diferencia de los alimentos B y C donde son mayores los resultados obtenidos en las pruebas realizadas.

### 9.1.6. DISCUSION.

Al iniciar el experimento, el peso inicial de los machos de tilapia línea Supermachos presentó diferencias significativas respecto a los machos de la línea Stirling. El peso inicial promedio para Supermachos fue de 1737.4 ( $\pm 87.1$ ), mientras que los machos Stirling pesaban un promedio de 921.4 ( $\pm 17.9$ ). En general las tilapias evidencian una plasticidad con respecto al crecimiento y a la respuesta en parámetros de desempeño productivo.

La comparación de la viabilidad espermática en el muestreo inicial, fue mayor en los Supermachos del estanque 5 y 6 ( $1.94 \pm 0.0081$  y  $1.94 \pm 0.0091$  respectivamente), este es un parámetro importante ya que permite conocer la integridad de la membrana plasmática de los espermatozoides además permite descartar posibles problemas que puedan estar causando alguna alteración a nivel de membrana, la cual es primordial para la respuesta que tiene el espermatozoide con su entorno.

En la concentración espermática los Supermachos del estanque 5 y 6 presentaron mayores valores con respecto a los demás ( $6506 \pm 938$  y  $6641 \pm 2169$ ), comparado con un estudio similar por Genotte *et al.* (2012), donde se trató de determinar si existían diferencias en la calidad de gametos entre machos YY y XY, se demostró que ni el genotipo sexual ni tratamientos de reversión de sexo hormonales afectan la calidad del espermatozoide en las tilapias, esto sugiere que independientemente la línea de tilapia que se esté evaluando sus características en calidad gamética no van a estar ligadas a su genotipo.

La evaluación del espermatozoide y la motilidad fueron variables que no presentaron diferencia significativa al realizar el análisis estadístico.

#### **9.1.6.1. Comparación de las líneas Supermachos y Stirling entre los muestreos inicial y final con alimento A.**

Al realizar la comparación de las líneas Supermachos y Stirling entre el muestreo inicial y el final con alimento A, la única variable con diferencias significativas fue el porcentaje de espermatozoides. En este caso, los Supermachos alimentados con el alimento A, presentaron un valor final menor ( $0.674 \pm 0.136$ ) en comparación con el valor del inicial ( $1.012 \pm 0.117$ ) probablemente la disminución de la ración en la alimentación haya causado alteraciones en la concentración del espermatozoides, ya que los animales antes de iniciar los tratamientos estaban con ración ad libitum y cuando se inicia el experimento, se les ofreció una ración controlada equivalente al 1.5% de su peso vivo por día.

Los machos Stirling presentaron diferencias significativas en las variables longitud total ( $38.77 \pm 0.365$ ) y viabilidad espermática ( $1.94 \pm 0.0074$ ), aunque fueron animales más pequeños en comparación de los Supermachos, tuvieron un crecimiento uniforme durante el tratamiento.

El alimento A es un alimento destinado para la última fase de la etapa de engorda y su formulación no está diseñada para peces que están en proceso reproductivo (reproductores). Por ende, no contiene los aditivos vitamínicos ni los mayores valores de proteína que contienen los alimentos B y C, que si están formulados para reproductores. Por estas razones se esperaba que fuera el tratamiento donde los animales presentaran las menores variaciones en las variables que se midieron.

#### **9.1.6.2. Comparación de las líneas Supermachos y Stirling entre los muestreos inicial y final con alimento B.**

En la comparación estadística entre el muestreo inicial y el final de las líneas Supermachos y Stirling con alimento B, los Supermachos sólo presentaron diferencia significativa en la concentración espermática la cual fue menor en el muestreo final ( $2878 \pm 609$ ). La variación en la concentración espermática puede estar relacionada también con la condición en la que se mantienen los peces, el método de obtención del esperma, las condiciones del cultivo, el intervalo entre días en los que se realizan las colectas, como sucede en otras especies de peces (Alavi *et al.* 2007). A pesar de que los animales en este tratamiento tuvieron una dieta apropiadamente formulada para su condición de reproductores, hay que considerar los factores anteriormente mencionados, pues no solamente la alimentación influye directamente sobre la calidad de los gametos.

Los machos Stirling tuvieron diferencias significativas en el peso ( $1017.3 \pm 32.40$ ), la longitud estándar ( $31.47 \pm 0.375$ ) y la viabilidad espermática ( $1.96 \pm 0.006$ ), siendo estos valores mayores en el muestreo final. Al suministrar mayores porcentajes de proteína en la dieta; en este caso 36% según el dato que proporciona la casa maquiladora y 39.6% según el análisis realizado en laboratorio, se evidencia notoriamente la ganancia de peso de los animales en un periodo de tiempo corto; lo que se ve reflejado en el aumento en los valores morfométricos y en concordancia con lo que mencionan Gunasekara *et al.* (1996) donde determinan que alimentar las tilapias con niveles de proteína de 32 y 40% hacen que crezcan y maduren más rápidamente que los alimentados con niveles de proteína bruta de 10, 17 y 25%.

#### **9.1.6.3. Comparación de las líneas Supermachos y Stirling entre los muestreos inicial y final con alimento C.**

Según el muestreo inicial y final realizado a los Supermachos alimentados con el alimento C, solo existió diferencia significativa en la viabilidad espermática, siendo mayor ( $1.97 \pm 0.004$ ) en el muestreo final. En los machos Stirling, este alimento mostró un efecto mayor que el obtenido en los Supermachos; ya que se presentaron

diferencias significativas en el peso ( $1203 \pm 88.50$ ), longitud estándar ( $31.62 \pm 0.319$ ), longitud total ( $38.35 \pm 0.362$ ), viabilidad espermática ( $1.95 \pm 0.006$ ) y espermatozoides ( $0.82 \pm 0.086$ ), valores que fueron mayores en el muestreo final.

Estos cambios pueden ser ocasionados por la presencia de vitamina C; añadido durante la maquila de este alimento. La vitamina C, es esencial para la producción y mantenimiento de la calidad del semen, además reduce la aglutinación de los espermatozoides según Lerner (1998), también los protege de daños genéticos y tiende a evitar los defectos congénitos (Sitios 2001).

#### **9.1.6.4. Comparación del muestreo final de los alimentos A, B, C entre Supermachos y machos Stirling.**

La línea que presentó mayores diferencias entre las pruebas de calidad espermática realizadas fueron los Supermachos y el alimento que influyó más a esta línea fue el alimento C. Al ser el alimento una dieta formulada específicamente para reproductores, su influencia en la calidad espermática es mayor comparada con una dieta para animales en etapa de finalización de la engorda.

La composición proximal de estos alimentos es de vital importancia para poder determinar la causa de los incrementos en los valores de cada evaluación. En este sentido el alimento A, no está diseñado para reproductores y aunque los alimentos B y C si lo están, estos últimos presentaron diferencias entre sí. La principal diferencia radica en el porcentaje de grasa, ya que el alimento C presentó hasta 80 % más en comparación al alimento B. La importancia de la grasa en el alimento radica en dos cuestiones primordiales; la palatabilidad del alimento y fuente de energía metabolizable. Al mantener un elevado porcentaje de grasa, el alimento C pudo haber presentado una mejor palatabilidad, adicionalmente, resaltan el sabor y mejoran la textura del alimento haciéndolo más atractivo para los peces y por ende, consumiéndolo en su totalidad y en poco tiempo; antes de que los componentes

nutricionales del mismo se diluyan en el agua. Aunado a esto, tienden a disminuir la tasa de pasaje del alimento a través del tracto digestivo, permitiendo al sistema digestivo extraer más nutrientes del alimento ingerido. Así, al ingerir el alimento balanceado con mayor contenido de grasa, los animales pudieron canalizar esa fuente de energía para los procesos metabólicos de las actividades diarias del pez; lo cual permitió que la proteína consumida se canalizara exclusivamente a la generación de carne. Por lo cual, se obtuvo mejor desempeño productivo, que también se vio reflejado en el reproductivo.

Con respecto a los machos Stirling aunque estuvieron por debajo de los valores obtenidos por los Supermachos en cada evaluación, no es posible determinar en general cual fue el alimento que más influenció los cambios en esta línea ya que en los resultados obtenidos en cada evaluación se presentan valores altos en uno y otro tratamiento.

### 9.1.7. CONCLUSIONES.

En conclusión este estudio indica que la alimentación y la composición nutricional de los alimentos es fundamental para que los animales tengan una eficiente producción de gametos de buena calidad, pero para determinar si existen cambios mayormente tangibles en la calidad espermática de los machos es necesario extender el estudio por un tiempo más prolongado para lograr diferenciar cuál de los tratamientos es el más indicado para los reproductores de tilapia.

## **9.2. CAPITULO 2: INFLUENCIA DE TRES TIPOS DE ALIMENTO BALANCEADO EN LA CALIDAD DE HUEVO DE TILAPIA (*Oreochromis niloticus*) LINEA STIRLING.**

### **9.2.1. RESUMEN.**

La nutrición tiene un papel relevante en la acuicultura, el conocimiento de las necesidades nutricionales de los peces es uno de los puntos más importantes en la formulación de dietas balanceadas. El estado nutricional de una hembra puede influir en el desarrollo de las gónadas y limitar la cantidad y calidad de los huevos. Las proteínas y los lípidos son los principales componentes de la dieta, están presentes en el huevo y se utilizan como una fuente de nutrientes durante la embriogénesis, y cuando están presentes en cantidades adecuadas, las proteínas y lípidos contribuyen a una mayor tasa de supervivencia de los embriones y larvas. Las proteínas están presentes en los huevos de peces como lipoproteínas, hormonas y enzimas que determinan la calidad de los huevos. El objetivo del presente estudio fue determinar si existe influencia de la dieta sobre la calidad del huevo tilapia (*Oreochromis niloticus*) de la línea Stirling. El diseño experimental consistió en alimentar durante 40 días reproductores hembras de tilapia nilotica (*O. nilóticus*), con tres tipos de alimento balanceado comercial, el alimento A fue alimento formulado para la etapa de finalización de la engorda y el alimento B y C son formulaciones específicas para animales en proceso reproductivo, estas dos, de casas comerciales diferentes. Se tomaron medidas morfométricas de longitud total, estándar y peso al iniciar y finalizar el tratamiento, de igual manera para evaluar la calidad del huevo se realizó la extracción manual de los huevos en cada hembra y se realizaron mediciones como volumen de huevo, peso de huevo, eje corto y eje mayor del mismo, además se realizó el análisis proximal de las muestras de huevo. De acuerdo con los resultados obtenidos en el muestreo final donde se realizó una comparación de los cuatro tratamientos A inicial A, B y C finales, se determinó que las dietas B y C influenciaron significativamente en la composición proximal del huevo, siendo el incremento en porcentaje de proteína en el huevo el cambio más evidente. En

conclusión este estudio indica que la alimentación y la composición nutrimental de los alimentos es fundamental para que los animales tengan una eficiente producción de gametos de buena calidad, el tiempo de alimentación es importante ya que con una alimentación basada en dietas con contenido de proteína mayor a 35% se mejora considerablemente la composición y la viabilidad de los huevos.

**Palabras clave:** Calidad de huevo, Stirling, *Oreochromis niloticus*.

### 9.2.2. ABSTRACT.

Nutrition plays an important role in aquaculture; knowledge of the nutritional needs of the fish is one of the most important points in the formulation of balanced diets. The nutritional status of a female can influence the development of the gonads and limit the amount and quality of eggs. Proteins and lipids are major components of the diet, contained in the egg and used as a nutrient source during embryogenesis, and when present in adequate amounts, proteins and lipids contribute to greater survival rate embryos and larvae. Proteins are present in fish eggs as lipoproteins, hormones and enzymes that determine the quality of the eggs. The aim of this research was to determine whether there is influence of diet on tilapia eggs quality (*Oreochromis niloticus*) of the Stirling line. The experimental design consisted on feeding for 40 days female brood stock of tilapia (*O. niloticus*), with three types of commercial food, A food was commercially formulated for the end of fattening stage foods B and C are Specific formulations for animal reproductive process, these two from different companies. Morphometric measurements of total length, standard and weight were taken at the beginning and at the end of the treatment, this to assess egg quality a manual extraction of eggs per female was performed and measurements as volume egg, egg weight, short axis and long axis of the egg were performed, additionally the proximal analysis of egg samples was done. According to the obtained results in the final sampling where a comparison of the four treatments A initial, A, B and C final was done, it was determined that diets B and C significantly influenced egg proximate composition, with the increase in percentage of egg protein most obvious change. In conclusion, this study indicates that food and nutritional composition of foods is essential for animals to have an efficient production of high quality gametes, feeding time is important due to a diet based on 35% higher protein content considerably improves sperm quality and proximal composition of eggs.

**Keywords:** egg quality, Stirling, *Oreochromis niloticus*.

### **9.2.3. INTRODUCCION.**

La reproducción de peces teleósteos abarca diferentes aspectos que influyen directamente en el éxito de la misma. Desde la maduración gonadal hasta la sincronización final del desove y la fecundación son resultado de la interacción de numerosos factores que incluyen, los factores ambientales (principalmente temperatura e iluminación), la nutrición, la interacción social, entre otros. Dentro del proceso reproductivo, una de las piezas fundamentales es la gametogénesis (Ocampo 2002). La comprensión de las peculiaridades de la gametogénesis para una determinada especie es útil cuando se busca reproducir a los organismos y lograr una alta producción de crías.

#### **9.2.3.1. Desarrollo del oocito en peces teleósteos.**

A fin de identificar el desarrollo de los oocitos para diferentes especies es necesario contar con una escala que permita comparar entre ellas. Los criterios comunes durante todo el proceso de desarrollo de los oocitos en los peces teleósteos reconoce diferentes estadios a través del desarrollo. En esta escala, en la fase de crecimiento primario se identifican el estadio de cromatina nucleolar, en el cual existe un citoplasma escaso y un núcleo central con un único nucléolo en el oocito. En esta fase el oocito ya está rodeado por células foliculares. El estadio siguiente denominado perinucleolar, es caracterizado por el crecimiento del núcleo y la aparición de múltiples nucléolos, los cuales pueden diferir en morfología entre especies (Wallace y Selman 1981).

En la segunda fase del crecimiento es conocida como alveolo cortical o de formación de vesículas de vitelo (aunque algunos autores mencionan que las vesículas de vitelo son precursores de los alvéolos corticales). Estos alvéolos se fusionan con el oolema para liberar el contenido durante la reacción cortical.

La tercera fase del desarrollo es la vitelogenesis, donde el oocito acumula la vitelogenina producida por el hígado, que posteriormente formará las reservas de vitelo proteico. Y la última fase se da en la hidratación, la cual se produce por una rápida acumulación de agua al interior del oocito (Wallace y Selman 1981).

Otro trabajo propone que los eventos de desarrollo del oocito pueden ser clasificados en 6 fases: oogénesis, crecimiento primario, estadio de alveolo cortical, vitelogenesis, maduración y ovulación (Tyler y Sumpter 1996). En esta propuesta, los alvéolos corticales que aparecen en el crecimiento secundario, son las primeras estructuras citoplasmáticas que se pueden distinguir con el microscopio y que difieren de las vesículas de vitelo, además de que no son precursores de ellas. Los alvéolos corticales están compuestos por polisialoglicoproteínas, mientras que las vesículas de vitelo están formadas por glicofosfoproteínas. (Wallace y Selman 1981)

Dentro de la segunda fase de crecimiento, las inclusiones lipídicas son consideradas como otro indicador de desarrollo del oocito. Estos cuerpos lipídicos (CL) coinciden con la aparición de pigmentos carotenoides, los cuales están asociados a los componentes lipídicos de la vitelogenina (VTG). Los CL son sintetizados por el hígado y comienzan a acumularse en el oocito antes de darse una síntesis más grande de VTG, que a su vez da inicio a la fase vitelogénica (Tyler y Sumpter 1996).

La vitelogenesis es el principal evento responsable del gran crecimiento de los ovocitos en muchos teleósteos y puede representar hasta un 95% del tamaño final

de huevo (Tyler 1991). La vitelogénesis, por lo tanto, ha sido un área de interés en el estudio del desarrollo ovárico.

En esta fase de vitelogénesis el ovocito acumula reservas nutricionales necesarias para el desarrollo del embrión. En este período, el ovocito también acumula RNA (conocida como ARN materna) y completa la diferenciación de sus cubiertas celulares y no celulares. Durante este tiempo el ovocito permanece en detención meiótica, al final de la profase y en la etapa de diploteno. Los procesos de maduración se caracterizan por la reducción o interrupción de la endocitosis, la reanudación de la meiosis, ruptura de la vesícula germinal (GVBD), la formación de una monocapa de alvéolos corticales bajo el oolemma, la disolución de plaquetas de la yema de los oocitos cuando se someten a la hidratación. La primera división meiótica da lugar a dos células que difieren en tamaño: se forma una pequeña celda con la primera degeneración del cuerpo polar y el ovocito secundario grande, y finalmente, la ovulación tiene lugar al final del proceso de maduración (Lubzens *et al.* 2010).

El ovocito secundario se extruye a continuación, a partir de sus capas de células foliculares que lo rodean y se mueve en el lumen de ovario o en la cavidad abdominal (dependiendo de la especie). En esta etapa el gameto femenino se conoce como un óvulo. Es haploide como resultado de la ocurrencia de la segunda división meiótica y la formación del segundo cuerpo polar que también se degenera. Durante la fertilización, el núcleo del óvulo haploide se fusiona con el núcleo haploide del espermatozoide y forma el huevo diploide (Lubzens *et al.* 2010)

#### **9.2.3.2. Calidad del huevo**

La eficiencia reproductiva en las diferentes especies de peces está determinada por diversos factores; uno de los más importantes es la calidad de los

gametos producidos, además de las propiedades intrínsecas del propio óvulo y el entorno en el que es fertilizado (Brooks *et al.* 1997).

Como una adaptación a su forma altamente especializada de cuidados parentales, los huevos de las tilapias son grandes, con una porción de proteínas y grasas la cual sirve como la principal fuente de alimento para el embrión temprano y sin una capa adhesiva, el volumen de huevo en *O. niloticus* oscila entre los 2.85 hasta los 11.15 mm<sup>3</sup> (Rana 1986).

En las tilapias (*O. niloticus* y *O. mossambicus*) las hembras de mayor edad producen huevos más grandes (Rana 1986), debido a esto los huevos contienen mayor cantidad de vitelo y por consiguiente las larvas provenientes de estos huevos pueden tolerar el hambre por un periodo de tiempo más largo ya que esta reserva de vitelo tarda más días en reabsorberse, además estudios han demostrado que los alevines resultan ser más grandes, efecto detectable aún a los 60 días de eclosión (Bomage y Roberts 1995).

Para la tilapia roja (*Oreochromis spp*) se determinó la existencia de relaciones funcionales entre la estructura del huevo tanto en dimensión como en composición y de esta forma se definió la calidad del huevo en términos de índices de supervivencia en las etapas iniciales (Valbuena *et al.* 2013),

La relaciones entre el tamaño de la hembra (longitudes total y estándar y peso) con el tamaño de los huevos (medidos en término de peso y volumen) no han mostrado ser significativas. Otros estudios similares no detectaron diferencias en el diámetro de los huevos provenientes de hembras sometidas a dietas de diferente origen, lo que indica que no existe relación significativa entre estas dos variables (Valbuena *et al.* 2013, Rana 1986).

La composición proximal de los huevos de tilapia nilótica (*Oreochromis spp.*) en cuanto a los valores de proteína, lípidos y ácidos grasos se resume en el Cuadro 13

Cuadro 13 Valores medios de contenido en los componentes analizados en las muestras de huevos de *Oreochromis spp.* (Valbuena *et al.* 2013).

Variable	Máximo	Mínimo	Promedio±DE	Cv
<b>Proteína (% Materia Seca)</b>	61.28	50.71	55.95 ± 2.349	4.2
<b>Extracto Etéreo (% Materia Seca)</b>	66.46	16.17	27.45 ± 9.013	32.8
<b>Energía (cal g<sup>-1</sup>)</b>	7167.79	3245.91	6320.91 ± 786.65	12.4
Á. grasos <b>poliinsaturados (%)</b>	31.61	19.28	24.06 ± 2.513	10.4
Á. grasos <b>monoinsaturados (%)</b>	38.76	29.99	34.72 ± 1.792	5.2
Á. grasos saturados (%)	45.52	37.04	41.22 ± 2.071	5.0
Ácidos grasos serie n - 3 (%)	19.93	8.36	12.01 ± 2.154	17.9
Ácidos grasos serie n - 6 (%)	13.47	8.81	11.44 ± 1.087	9.5
<b>Relación n-3/n-6</b>	1.80	0.68	1.057 ± 0.213	20.2
<b>Relación EPA/DHA</b>	0.08	0.02	0.04 ± 0.015	37.8

Otros estudios revelan que el cambio en la alimentación de los reproductores de tilapia utilizando otro tipo de fuentes proteicas como la espirulina influyen considerablemente en la composición proximal de los huevos, evidenciando altos valores de ácido linoleico, ácido  $\gamma$ -linolénico, y  $6-\Sigma n$ , y ácidos grasos altamente insaturados (20: 3n-6, 20: 4n -6, 22: 4n-6, 22: 5n-6). Además la tilapias alimentadas exclusivamente alimentos a base de espirulina podrían mantener la reproducción normal a lo largo de tres generaciones (Lu y Takeushi 2004).

Se ha demostrado que valores de proteína bruta de 38%, mejoran considerablemente el tamaño y la viabilidad de los huevos, la relación entre los niveles de proteína y los parámetros reproductivos es muy importante ya que la alimentación tiene un efecto directo sobre el desarrollo de los gametos y la fecundidad de los mismos (De Oliveira 2012)

### **9.2.3.3. Relación entre nutrición y reproducción.**

Los diferentes niveles nutricionales pueden afectar el desarrollo de los órganos reproductores, además de acarrear alteraciones en el funcionamiento del sistema endocrino (Maggioni *et al.* 2008), el cual está directamente implicado en la producción de gametos.

La fertilidad de un organismo se ve directamente influenciada por la condición nutricional de este. La suplementación de nutrientes específicos que son necesarios para el desarrollo de los folículos, la ovulación, maduración oocitaria, fecundación y sobrevivencia embrionaria promueven la integridad de los procesos no solamente en los órganos reproductores sino también en las hormonas y otros metabolitos que son requeridos para que los procesos de desarrollo gonadal sean adecuados (Robinson *et al.* 2006).

### **9.2.4. MATERIALES Y METODOS.**

El trabajo experimental se llevó a cabo en las instalaciones de la Unidad de Cuarentena de Tilapia y Bagre del laboratorio de Biología Acuática en la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, la cual se encuentra ubicada en la ciudad de Morelia, Michoacán.

#### **9.2.4.1. Origen de los animales.**

Para el diseño experimental se utilizaron grupos de reproductores hembras de tilapia (*O. niloticus*) de la línea Stirling, de la colección que posee la unidad de cuarentena de Tilapia y Bagre del Laboratorio de Biología Acuática de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

#### 9.2.4.2. Distribución de los animales.

Las hembras de la línea Stirling fueron acomodadas en grupos de 10 organismos en tres jaulas de 2x1x1 m (Figura 12).; las condiciones de estos animales fueron las mismas que se citaron para los machos en el capítulo 1 de este documento.

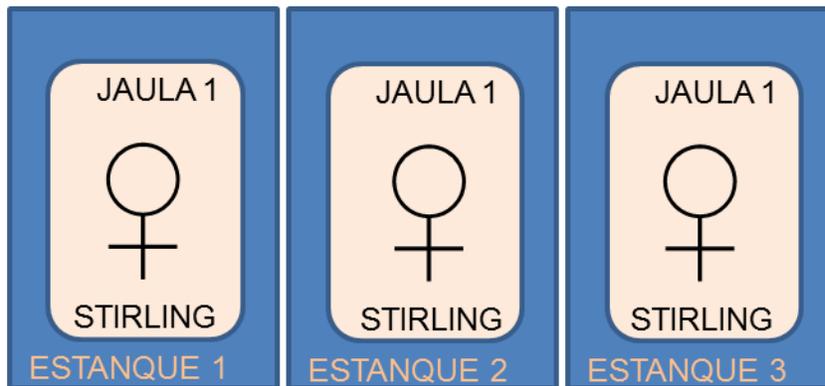


Figura 12. Distribución espacial de los organismos y las jaulas en los estanques.

#### 9.2.4.3. Alimentación

El alimento balanceado que se utilizó fue pellet comercial de tres tipos, dos son formulaciones específicas para reproductores y el otro es una formulación de la fase final de engorda, que para efectos del presente estudio se denominaron con letras como lo indica la (¡**Error! No se encuentra el origen de la referencia.**!).

La descripción detallada de los alimentos se realizó en el capítulo 1 de este documento.

Cuadro 14 Contenido nutricional de los alimentos utilizados, datos proporcionados por cada casa maquiladora.

ALIMENTO	ALIMENTO	% PROT.	%GRASA	%FIBRA	%HUMEDAD	%CENIZA
ENGORDA	A	25	5	5.50	12	25

**Influencia del alimento balanceado en la calidad gamética en reproductores de tilapia (*Oreochromis niloticus*) líneas Supermacho y Stirling.**

<b>REPRODUCTORES</b>	<b>B</b>	36	6	5	12	36
<b>REPRODUCTORES</b>	<b>C</b>	36	6	5	12	36

Macintosh y Little (1995) recomiendan alimentar los reproductores de tilapia con el 2 o 3% de su peso vivo/día (PV/d) dividido en tres raciones iguales a lo largo del día. Ernst *et al.* (1991) describen la alimentación de los reproductores con una tasa del 1-3% PV/d en dos tomas. El esquema de alimentación que se utilizó en el presente experimento fue de 1.5% de la biomasa de cada jaula, dividido en dos raciones diarias, para lo cual previamente los organismos fueron pesados para realizar los cálculos correspondientes (Cuadro 15).

Cuadro 15 Esquema de alimentación de los reproductores en base a la biomasa de cada jaula

<b>ESTANQUE</b>	<b>JAULA</b>	<b>LÍNEA</b>	<b>BIOMASA (g)</b>	<b>ALIMENTO</b>	<b>RACION/DIA (g)</b>
<b>1</b>	1	STIRLING	5778	A	86.67
<b>2</b>	1	STIRLING	5692	B	85.38
<b>3</b>	1	STIRLING	5600	C	84

#### **9.2.4.4. Evaluación reproductiva de las hembras**

Las hembras antes de ser manipuladas para la extracción del huevo, se sedaron con benzocaína, solución previamente preparada en medio acuoso; los animales permanecieron en la solución anestésica hasta que fueron manipulables, aproximadamente por dos minutos. Posteriormente, son retiradas de la solución anestésica, se secó el exceso de agua con una franela húmeda, se procedió a realizar la toma de datos (peso, longitud estándar y longitud total).

Los animales fueron marcados con un microchip el cual se implantó en la región del dorso con un aplicador tipo jeringa, esto con el fin de identificar a cada organismo y poder relacionar las muestras obtenidas individualmente.

Luego de realizar la biometría se procedió a la extracción de huevo realizando una presión leve en los flancos desde la parte caudal de los opérculos hacia el poro genital, siguiendo la región donde se localizan las gónadas. Los huevos fueron colectados en recipientes plásticos debidamente identificados con el número de chip de cada individuo, luego se midieron en una probeta de 10 ml, para después realizar el pesaje de los mismos (Figura 13).

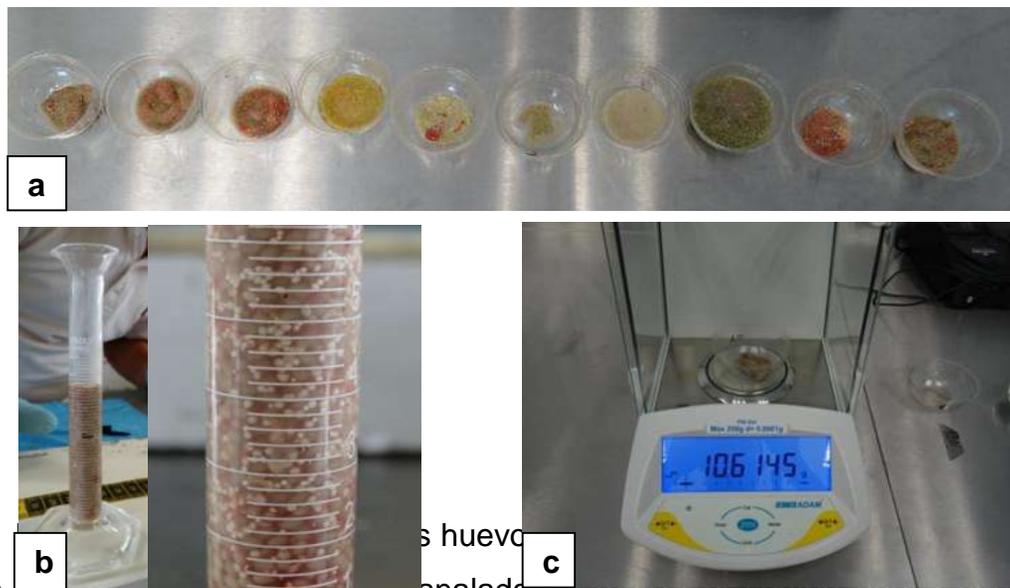


Figura 13 a. Huevos extraídos de cada hembra por jaula. b. Medición de los huevos en probeta. c. Pesaje del huevo. Se realizaron dos colectas de huevo, la primera al iniciar la prueba y la segunda a los 40 días de alimentación (Figura 14).



Figura 14 Conteo manual de los huevos.

#### 9.2.4.5. Determinación del tamaño medio y el diámetro del huevo.

Para la medición de los huevos se tomó una submuestra de 50 huevos por hembra, los cuales fueron colocados en una lámina portaobjetos y observados en un microscopio compuesto con el objetivo 4X. Los huevos se midieron con la regleta del ocular que previamente se calibró con base al aumento del objetivo.

Los huevos de la tilapia (*O. niloticus*) tienen una forma ovoide. Por lo tanto, con el fin de evaluar el tamaño del huevo y el diámetro de los huevos, se deben medir dos variables: eje largo y el eje corto de huevo (Figura 15). El diámetro de los huevos se calcula fácilmente por este método.

El diámetro del huevo se determina con la siguiente fórmula

$$D = L + s/2$$

Donde:      d= Diámetro del huevo (mm)  
                 L= Longitud media del eje mayor del huevo (mm)  
                 s= Longitud media del eje corto del huevo (mm)

#### 9.2.4.6. Determinación del volumen medio individual.

$$v = \pi \times l \times h^3 / 6$$

Donde:  $v$  = Volumen de huevo (mm<sup>3</sup>)

$l$  = Longitud media del eje mayor del huevo (mm)

$h$  = Longitud media del eje menor del huevo (mm)

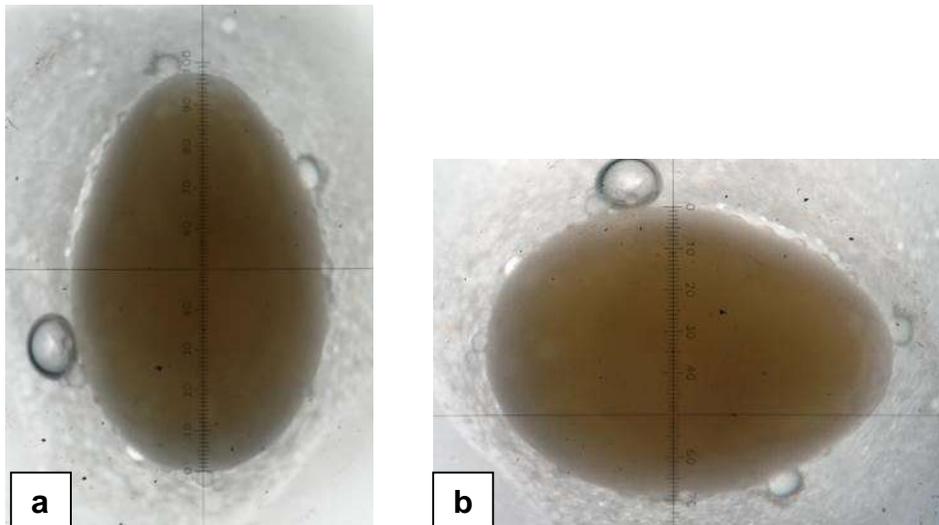


Figura 15 . Medición de los huevos en 4X. a. Eje largo del huevo. b. Eje corto del huevo.

#### 9.2.4.7. Determinación de la composición proximal del huevo.

Se tomó una alícuota de 100 gr de cada muestra a utilizar para determinar su composición proximal.

Se realizaron dos tomas de muestra para análisis, en la primera toma se colectaron los huevos las hembras de las tres jaulas y se depositaron en un recipiente como una sola muestra ya que esta correspondió a la muestra inicial,

debido a que los animales antes de iniciar el experimento estaban en las mismas condiciones y con el mismo tipo de alimentación.

Para la segunda toma de muestras, se colectaron los huevos de los organismos de cada jaula por separado, obteniendo al final tres muestras.

Para evaluar la composición bioquímica de las muestras, se llevó a cabo la determinación de la composición proximal de cenizas, humedad, lípidos totales y proteína como a continuación se explica:

#### **9.2.4.7.1. Humedad**

El contenido de humedad se realizó por desecación de las muestras en un horno a 100 °C por 12 horas. Se determinó por método gravimétrico, es decir la diferencia entre el peso inicial (antes del horno) y final (después de estar en el horno) (AOAC 2000).

Cálculos: contenido de humedad (%) =  $[(A-B)/A] * 100$

Donde: A= Peso de la muestra humedad (g)

B= Peso de la muestra seca (g)

#### **9.2.4.7.2. Proteína cruda**

El análisis de proteína de la muestra de huevo se realizó con el uso de un auto analizador Nitrógeno/Proteína (Leco FP528) por medio de la técnica de Dumas (conductividad de gases) utilizando helio como referencia y multiplicando el resultado por el factor 6.25 para conocer la concentración de proteína (16%N) (Olvera *et al.* 1993).

#### 9.2.4.7.3. Extracto etéreo

El contenido de lípidos totales se determinó mediante el método Soxhlet, con el uso de equipo SOXHLET AVANTI TECATOR (modelo 2050) utilizando éter de petróleo como solvente (AOAC 200).

Cálculos: contenido de extracto etéreo (%)=[(B-A)]\*100

Donde: A=peso del crisol limpio y seco (g)

B=peso de crisol con grasa (g)

#### 9.2.4.7.4. Ceniza

La ceniza considerada como contenido de minerales totales o material inorgánico de la muestra. Se determinó mediante la calcinación total de la muestra a 550 °C en una mufla durante 3 horas hasta peso constante (AOAC,2000).

Cálculos: contenido de ceniza (%)=100-[(B-A)/C]\*100

Donde: A=Peso del crisol con muestras (g)

B=Peso del crisol con ceniza (g)

C=Peso de la muestra (g)

### 9.2.5. RESULTADOS.

Para el análisis estadístico de los resultados obtenidos en las diferentes pruebas realizadas se utilizó el programa estadístico Minitab versión 16, con él se corrieron los análisis de varianza (ANOVA) con comparación de medias de Tukey y Fisher.

Al realizar el muestreo inicial los animales de los tres grupos estaban siendo alimentados con el alimento A, se evaluaron las variables peso, longitud estándar, longitud total, volumen de huevo, peso del huevo, diámetro del huevo, y volumen medio individual.

Se hizo una comparación entre los tres grupos de hembras al comenzar el experimento, y no hubo diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) para ninguna de las variables mencionadas anteriormente, de igual manera no hubo diferencia significativa entre la comparación realizada entre el muestreo inicial y final de cada tratamiento.

#### 9.2.5.1. Comparación entre muestreo inicial y muestreo final de cada tratamiento con las variables de análisis proximal de los huevos.

Se realizó una comparación entre las variables humedad, ceniza, grasa y proteína de la composición proximal de los huevos al iniciar y al finalizar el experimento.

El muestreo inicial en todas las comparaciones corresponde al alimento A, ya que los organismos tenían esa misma dieta.

Para el análisis estadístico de las variables anteriormente mencionadas, debido a que el dato final expresado es en porcentaje, se realizó la conversión a logaritmo

natural del valor porcentual de cada variable, y en base a estos resultados se corrieron las pruebas estadísticas.

En la comparación del muestreo inicial y el muestreo final del tratamiento con el alimento A, se evidenciaron diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) en la variable humedad, siendo mayor el valor correspondiente al muestreo final ( $1.801 \pm 0.0057$ ); las demás variables no presentaron diferencias significativas al realizar el análisis estadístico (Cuadro 16).

Cuadro 16 Comparación de variables en muestreo inicial y final del tratamiento con el alimento A.

Variables	Alimento "A"				Comparación Grupos
	Muestreo inicial		Muestreo final		
	Media	EE	Media	EE	
Humedad	1.782	0.0015	1.801	0.0057	AB*
Ceniza	0.873	0.0079	0.892	0.0233	AA <sup>ns</sup>
Grasa	0.558	0.0800	0.486	0.0983	AA <sup>ns</sup>
Proteína	1.745	0.0017	1.757	0.0083	AA <sup>ns</sup>

\*Diferencias significativas  $p \leq 0.05$  y ns diferencias no significativas.

En lo que respecta a la comparación de los muestreos correspondientes al tratamiento con el alimento B, la variable humedad y grasa fueron menores en el muestreo final ( $1.766 \pm 0.0009$  y  $0.305 \pm 0.0092$  respectivamente), a diferencia de la proteína la cual tuvo un valor mayor en el muestreo final ( $1.777 \pm 0.0019$ ). Los datos correspondientes a ceniza no presentaron diferencia significativa (Cuadro 17).

Cuadro 17 Comparación de variables en muestreo inicial y final del tratamiento con el alimento B.

Variables	Alimento "B"				Comparación Grupos
	Muestreo inicial		Muestreo final		
	Media	EE	Media	EE	
Humedad	1.782	0.0015	1.766	0.0009	AB*
Ceniza	0.873	0.0079	0.886	0.0025	AA <sup>ns</sup>

**Influencia del alimento balanceado en la calidad gamética en reproductores de tilapia (*Oreochromis niloticus*) líneas Supermacho y Stirling.**

Grasa	0.558	0.0800	0.305	0.0092	AB*
Proteína	1.745	0.0017	1.777	0.0019	AB*

\*Diferencias significativas  $p \leq 0.05$  y ns diferencias no significativas.

El tratamiento con el alimento C evidenció solo diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) en la variable proteína, siendo el valor de esta mayor ( $1.774 \pm 0.0030$ ) en el muestreo final. Las demás variables no presentaron diferencias estadísticamente significativas (Cuadro 22).

**Cuadro 22.** Comparación de variables en muestreo inicial y final del tratamiento con el alimento C.

Variables	Alimento "C"				Comparación Grupos
	Muestreo inicial		Muestreo final		
	Media	EE	Media	EE	
Humedad	1.782	0.0015	1.775	0.0035	AA <sup>ns</sup>
Ceniza	0.873	0.0079	0.896	0.0033	AA <sup>ns</sup>
Grasa	0.558	0.0800	0.564	0.0891	AA <sup>ns</sup>
Proteína	1.745	0.0017	1.774	0.0030	AB*

\*Diferencias significativas  $p \leq 0.05$  y ns diferencias no significativas.

Se realizó una comparación general entre el muestreo inicial y final para cada variable, para determinar si existió diferencia entre los tratamientos.

En la figura se observa que al realizar la comparación de medias entre los tratamientos, la variable humedad presentó un valor mayor en el muestreo final del tratamiento con el alimento A ( $1.801 \pm 0.023$ ), a diferencia del tratamiento con el alimento C, el cual tuvo el valor más bajo de los tratamientos ( $1.775 \pm 0.003$ ) (Figura 16).

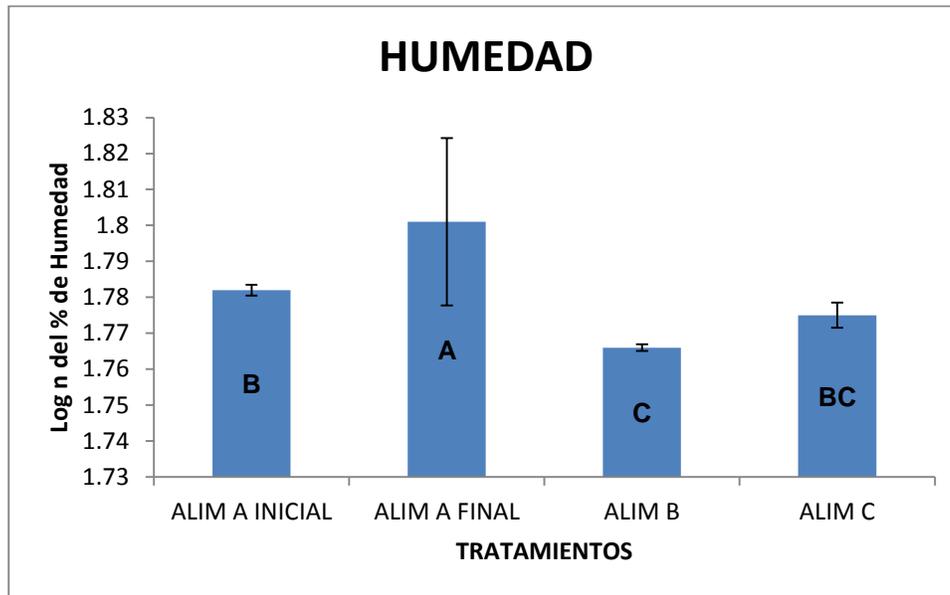


Figura 16 Comparación de medias para la variable humedad de todos los tratamientos.

En las variables ceniza y grasa no se presentaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) al realizar la comparación de medias entre todos los tratamientos.

Por último la variable proteína tuvo valores más altos en los tratamientos con el alimento B y C ( $1.777 \pm 0.0019$  y  $1.774 \pm 0.003$  respectivamente), a diferencia del alimento A tanto en el muestreo inicial como en el final (Figura 17).

Influencia del alimento balanceado en la calidad gamética en reproductores de tilapia (*Oreochromis niloticus*) líneas Supermacho y Stirling.

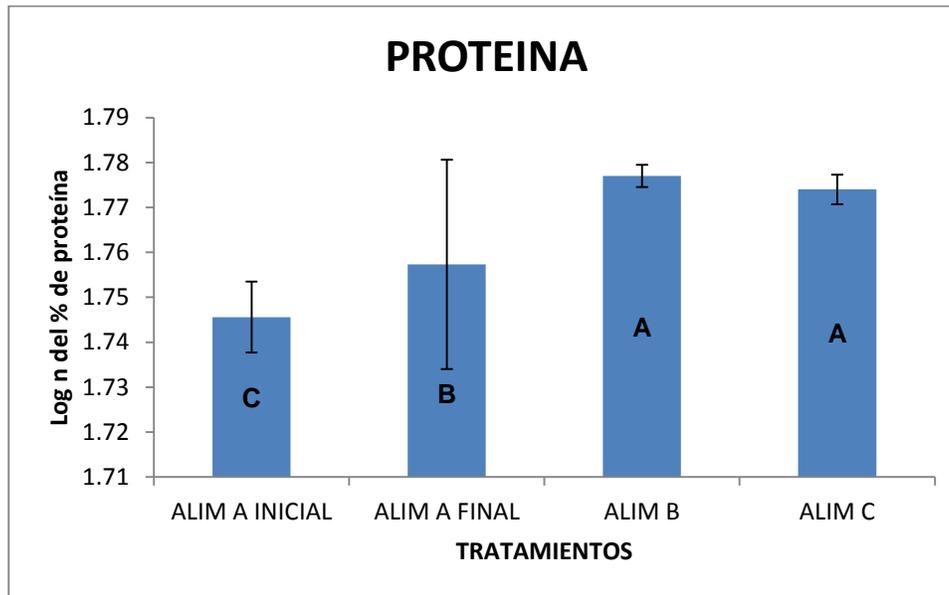


Figura 17 Comparación de medias para la variable proteína de todos los tratamientos.

A continuación se muestran los resultados obtenidos en el análisis bromatológico de los huevos, según el tratamiento (Cuadro 18).

Cuadro 18 Datos de análisis bromatológicos de los huevos en el muestreo inicial y final de cada tratamiento.

		% HUMEDAD	% CENIZA	% GRASA	%PROTEINA
<b>MUESTREO INICIAL</b>	ALIM. A	66.63	7.47	3.74	55.66
	ALIM. B	63.34	7.82	11.45	57.19
<b>MUESTREO FINAL</b>	ALIM B	58.46	7.7	4.22	59.91
	ALIM. C	59.58	7.89	9.44	59.45

### 9.2.6. DISCUSIONES.

No hubo diferencias significativas entre las medidas morfométricas de los animales y los datos de producción de huevo al iniciar y al terminar el experimento, esto debido a que al realizar la colecta se encontraron diferentes estadios de desarrollo de los huevos, además hubo presencia de huevos en la boca de algunas hembras al momento de la colecta, aunque al iniciar el experimento a todas las hembras se les practicó la extracción, no estaban en iguales condiciones de tiempo para ovopositar, debido a esto se encontró tanto en el muestreo inicial y final huevos inmaduros y huevos maduros.

Para poder determinar con exactitud la cantidad de huevos maduros en las hembras es necesario diseñar un modelo experimental diferente, donde se puedan apreciar los cambios en la papila genital y la zona abdominal, que preceden a la ovulación, para posteriormente realizar la extracción y tener un dato comparativo entre las hembras.

Los animales al iniciar el experimento estaban siendo alimentados con alimento A el cual es alimento en etapa de finalización de la engorda, por esta razón los datos relacionados en los cuadros y gráficos en las sección anterior corresponden al mismo dato inicial entre cada tratamiento, ya que en el muestreo inicial se colectaron los huevos de todas las hembras, se homogenizó la muestra y se realizaron los análisis proximales como un único muestreo inicial.

En la comparación de los muestreos inicial y final de cada tratamiento, no hubo diferencia entre la composición proximal de los huevos del tratamiento con alimento A ya que como se mencionó anteriormente corresponde al mismo alimento.

Los huevos de las hembras del tratamiento con el alimento B, presentaron disminución en el contenido de humedad ( $1.766 \pm 0.0009$ ) y grasa ( $0.305 \pm 0.0092$ ) y

el valor de proteína incrementó ( $1.77 \pm 0.0019$ ), lo cual es similar a los resultados obtenidos por (Valbuena *et al.* 2013) donde realizó análisis bromatológicos a huevos de tilapia roja (*Oreochromis sp.*).

De igual manera en las hembras del tratamiento con el alimento C, hubo una diferencia significativa entre el contenido de proteína del muestreo inicial ( $1.745 \pm 0.0017$ ) y el muestreo final ( $1.774 \pm 0.0030$ ), el cual fue mayor.

Al ser alimentados con formulaciones específicas para animales en etapa de reproducción, estos alimentos contienen un mayor porcentaje de proteína, alimento B 36% de proteína según información de la casa maquiladora y 39.6% siendo el dato obtenido en el análisis proximal en laboratorio, para el alimento C 36% de proteína según información de casa maquiladora y 37.2% de proteína obtenido en el análisis proximal en laboratorio; en un estudio realizado por Gunasekera *et al.* 1996 se evidenció que al suministrar dietas con porcentajes de proteína de 35%, los huevos incrementan el valor de la proteína significativamente en comparación con dietas con menor contenido de proteína.

De acuerdo con esto y con los resultados obtenidos en el muestreo final donde se realizó una comparación de los cuatro tratamientos A inicial A, B y C finales (Figura 15), se determinó que las dietas B y C influenciaron significativamente en la composición proximal del huevo, siendo el incremento en porcentaje de proteína en el huevo el cambio más evidente.

### 9.2.7. CONCLUSIONES

En conclusión este estudio indica que la alimentación y la composición nutricional de los alimentos es fundamental para que los animales tengan una eficiente producción de gametos de buena calidad, el tiempo de alimentación es importante ya que con una alimentación basada en dietas con contenido de proteína mayor a 35% se mejora considerablemente la composición y la viabilidad de los huevos.

Para la adecuada evaluación de la cantidad de huevo y la morfología del mismo es necesario plantear un diseño experimental diferente ya que en el que se realizó no fue posible determinar el tiempo apropiado para la extracción de los huevos.

## 10. DISCUSIÓN GENERAL.

La línea que presentó mayores diferencias entre las pruebas de calidad espermática realizadas fueron los Supermachos y el alimento que influenció más a esta línea fue el alimento C. Al ser el alimento una dieta formulada específicamente para reproductores, su influencia en la calidad espermática es mayor comparada con una dieta para animales en etapa de finalización de la engorda.

A diferencia de los machos, no hubo diferencias significativas entre las medidas morfométricas de los animales y los datos de producción de huevo al iniciar y al terminar el experimento, esto debido a que al realizar la colecta se encontraron diferentes estadios de desarrollo de los huevos, además hubo presencia de huevos en la boca de algunas hembras al momento de la colecta, aunque al iniciar el experimento a todas las hembras se les practicó la extracción, no estaban en iguales condiciones de tiempo para ovopositar, debido a esto se encontró tanto en el muestreo inicial y final huevos inmaduros y huevos maduros.

Lo que permitió evidenciar un efecto de la dieta en la calidad de huevo fue el contenido de proteína de los mismos al finalizar el experimento, pero para comprobar si hay cambios mayores en otros componentes del huevo, es necesario diseñar un experimento diferente para poder realizar una evaluación más confiable donde se puedan obtener más datos y trabajar con muestras más homogéneas.

La composición proximal de estos alimentos es de vital importancia para poder determinar la causa de los incrementos en los valores de cada evaluación. En este sentido el alimento A, no está diseñado para reproductores y aunque los alimentos B y C si lo están, estos últimos presentaron diferencias entre sí. La principal diferencia radica en el porcentaje de grasa, ya que el alimento C presentó hasta 80 % más en comparación al alimento B. La importancia de la grasa en el alimento radica en dos

cuestiones primordiales; la palatabilidad del alimento y fuente de energía metabolizable.

Al mantener un elevado porcentaje de grasa, el alimento C pudo haber presentado una mejor palatabilidad, adicionalmente, resaltan el sabor y mejoran la textura del alimento haciéndolo más atractivo para los peces y por ende, consumiéndolo en su totalidad y en poco tiempo; antes de que los componentes nutricionales del mismo se diluyan en el agua.

Notoriamente los machos fueron más susceptibles a la influencia de los alimentos en la calidad de sus gametos con respecto a las hembras, pero para afirmar esta susceptibilidad es necesario extender la prueba mínimo 120 días, para que como lo evidencia De Oliveira *et al.* (2014), existan cambios en la composición bromatológica de los huevos en hembras alimentadas con diferentes niveles de proteína.

## 11. LITERATURA CITADA

- Abi-ayad, S. M. E. A., Melard, C., Kestemont, P. (1997). Effects on n-3 fatty acids in Eurasian perch broodstock diet on egg fatty acid composition and larvae stress resistance. *Aquaculture International*, 5: 161-168.
- Alceste, C., D.E. Jory y T.R. Cabrera (2001). The US Tilapia Market. *Global Aquaculture The Advocate*. 4(1): 92 - 94.
- Ando, A & Hatano, M. (1986) Carotenoids in the egg yolk protein of chum salmon *Oncorhynchus keta*. *Agricultural and Biological Chemistry* 50, 1043– 1044.
- Arredondo, F. J.L; Lozano, G.S.D. 2003. La acuicultura en México, Universidad Autónoma Metropolitana, Div. Ciencias Biológicas y de la Salud. 265 pp.
- Asturiano, J. F., Sorbera, L. A., Carrillo, M., Zanuy, S., Ramos, J., Navarro, J. C., Bromage, N. (2001). Reproductive performance in male European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) fed two PUFA-enriched experimental diets: a comparison with males fed a wet diet. *Aquaculture*, 194: 173-190.
- Andrade, R. F., N. Bazzoli, E. Rizzo y Y. Sato. 2001. Continuous gametogenesis in the neotropical freshwater teleost, *Bryconops affinis* (Pisces:characidae). *Tissue and Cell* 33: 524-532.
- Arukwe, A., Goksoyr, A. (2003). Eggshell and egg yol proteins in fish: hepatic proteins for the next generation: oogenetic, population and evolutionary implications of endocrine disruption. *Comparative Hepatology*, 2 (4): 1-21.

- Billard, R y J. Cosson. 1988. Sperm motility in Rainbow trout, *Parasalmo gairdneri*; Effects of pH and temperature. En: Breton B, Y. Zohar (Ed.) Reproduction in fish Basic and Applied Aspects in Endocrinology and Genetics. INRA, Paris. pp. 161-167.
- Bromage, N.R y R.J Ronald. 1995. **Nile tilapia** In Bromage, N.R **Broodstock management and egg larval quality**. Blackwell Science. UK. pp. 277-320
- Booth, R. K., McKinley, R. S., Ballantyne, J. S. (1999). Plasma non esterified fatty acid profiles in wild Atlantic salmon during freshwater migration and spawning. *Journal of Fish Biology*, 55: 260-273.
- Brooks, S.; Tyler, C. y Sumpter, J. Egg quality in fish: what makes a good egg? En: e-views in Fish Biology and Fisheries.1997. Vol. 7, p. 387-416.
- Castro Rivera. R; G. J. P. Hernández y Aguilar G. B (2004) Evaluación del crecimiento de alevines de tres especies de Tilapia (*Oreochromis* sp.) en aguas duras, en la región de la Cañada, Oaxaca, México *Revista AquaTIC*, nº 20, pp. 38-43.
- Cosson, J., R. Billard, C. Cibert, C. Dreanno y M. Suquet. 1999. Ionic factors regulating the motility of fish sperm. En: Cagnon, C (Ed.) *The Male Gamete: From Basic Knowledge To Clinical Applications*. Cache River Press: 161-186.
- Cosson J, Linhart O, Mims SD, Shelton WL, Rodina M. Analysis of motility parameters from paddlefish and shovelnose sturgeon spermatozoa. *J Fish Biol* 2000; 56: 1348- 1367.

- Coutteau, P., Sorgeloos, P. (1997). Manipulation of dietary lipids, fatty acids and vitamins in zooplankton cultures. *Freshwater Biology*, 38: 501-512.
- De Oliveira, M. 2012 Dietas para reproductores de Tilapia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) Tese doutorado. Universidade Federal de Lavras.
- De Oliveira, M., T. Ribeiro., T. Orlando, D. Garcia., M. Martins., R. Tadeu., P. Vieira. Effects crude protein levels on female Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) reproductive performance parameters. *Animal Reproduction Science* Vol.150,2014, Pag 62–69
- DeWandel R (1995). Annual tilapia situation and outlook report. *Aquaculture Magazine* 25:6-11.
- Dabrowski, K.; Moreau, R. Do all fish need ascorbic acid? *Aquaculture magazine*, v. 22, n. 5, p. 96-98, 1996.
- El-Sayed, A-F y Kawanna, M. Effects of dietary protein and energy levels on spawning performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) broodstock in a recycling system. En: *Aquaculture*. 2008. Vol. 280, p. 179-184.
- Ernst, D.H.; Watanabe, W.O.; Ellington, L.J.; Wicklund, R.I. y Olla, B.L. 1991. Commercial-scale production of Tilapia roja de Florida seed in low- and brackish-salinity Tanques. *Journal of the World Aquaculture Society* 22:36-44.
- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2004-2011). Cultured Aquatic Species Information Programme (CASIP). Fishery Fact Sheets Collections - Perfiles. FIGIS Data Collection. Visto en: FAO Fisheries and Aquaculture Department [online]. Rome.

[http://www.fao.org/fishery/countrysector/FI-CP\\_MX/es39](http://www.fao.org/fishery/countrysector/FI-CP_MX/es39).

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2008). The state of world fisheries and aquaculture, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Roma.

FAO (2012). Estado mundial de la pesca y la acuicultura. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación Viale delle Terme di Caracalla 00153 Roma, Italia.

FIGIS, Fisheries Global Information Systems. (2006). Global Production Statistics 1950-2001.

Fitzsimmons, K. (2000). Tilapia aquaculture in Mexico. Pags 171–183 en B.A. Costa-Pierce y J.E. Rakocy (eds.). Tilapia aquaculture in the Americas, Vol. 2. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, United States.

Fitzsimmons, K. (2003). Tilapia production and markets. Accesada de: <http://ag.arizona.edu/aaqua/ata.html>.

Fitzsimmons, K. y Gonzalez-Alanis, P. (2005). Tilapia aquaculture. And overview: Selection of systems-ponds, tanks, raceways, cages. 2° Foro Internacional de Acuicultura. Hermosillo, Sonora. SAGARPA. México.

Garduño Lugo, M. y Muñoz Córdova G. (1998). Comparación de parámetros reproductivos, de crecimiento, fenotípicos y económicos de tilapia roja. Accesado de [http://www.ecologia.edu.mx/sigolfo/página\\_3.htm](http://www.ecologia.edu.mx/sigolfo/página_3.htm).

- Gatesoupe, F.J. & LE Milinaire, C. 1985. Adaptation de la qualité alimentaire des filtreurs-proies aux besoins nutritifs des larves de poissons marins. Coll. fr.-japon. Océanogr., Marseille 16-21 Sept. 85. 8: 51-63.
- Gennotte, V; E. François; C. Rougeot; J. Ponthier; S. Deleuze; C. Mélard. (2012). Sperm quality analysis in XX, XY and YY males of the Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). Elsevier. July 1, 2012 Volume 78, Issue 1, Pages 210–217.
- Gunasekara, R.M.; Shim, K.F. y Lam, T.J. 1995. Effect of dietary protein level on puberty, oocyte growth and egg chemical composition in the tilapia *Oreochromis niloticus*(L.). *Aquaculture* 134:169-183.
- Gunasekara, R.M.; Shim, K.F. y Lam, T.J. 1996. Effect of dietary protein level on spawning performance and amino acid composition of eggs of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture* 146:121-134.
- Gunasekara, R.M. y Lam, T.J. 1997. Influence of dietary protein level on ovarian recrudescence in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture* 149:57-69.
- Halver, J.E. 1972 *Fish nutrition*. Orlando: Academic Press. 713p.
- Hamamah S, Gatti JL. Role of the ionic environment and internal pH on sperm activity. *Hum Reprod* 1998;13 Suppl 4:20-30.
- Hartley-Alcocer, A. G. (2007). *Tilapia as a global commodity; a potencial role for México?*. Tesis de doctorado Institute of Aquaculture, University of Stirling. Escocia.

- Harris, W.A.; Endureça, T.E.; Dawson, E.B. 1979 O efeito aparente de medicação de ácido ascórbico em níveis de metal no sêmen. Disponível em: <http://www.healthgate.com/cgi-bin/q>
- Henderson, R.J. & Tocher, D.R. 1987. The lipid composition and biochemistry of freshwater fish. *Prog. Lipid Res.*, 26: 281-347.
- Ingerman RL, Holcomb M, Robinson ML, Cloud JG. Carbon dioxide and pH affect sperm motility of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*). *J Exp Biol* 2002; 205:2885-2890.
- Izquierdo, M. S., Fernández, P. H., Tacon, A. G. J. (2001). Effect of broodstock nutrition on reproductive performance on fish. *Aquaculture*, 197: 25-42.
- Jamieson, G.M. y K.P. Leung. 1991. Introduction to fish spermatozoa and the micropyle. In Jamieson, B. G. M. (ed) *Fish evolution and systematic: evidence from spermatozoa*. Cambridge: Cambridge University Press. 5: 56-72.
- Jenkins, A. J. 2000. Minimizing microbial contamination of sperm samples. En: Tiersch, T. R y P. M. Mazik (Ed.) *Cryopreservation in Aquatic Species*. World Aquaculture Society. Baton Rouge, Louisiana. pp. 343-363.
- Josupeit, H. (2007). World tilapia trade. *Proceedings of Globefish, INFOFISH Tilapia Conference*, Kuala Lumpur, August 2007. Accesada de: <http://www.thefishsite.com/article/331/world-tilapia-trade>.
- Krasznai Z, Márián T, Izumo H, Damjanovich S, Balkay L, et al. Membrane hyperpolarization removes inactivation of Ca<sup>2+</sup> channels, leading to Ca

influx and subsequent initiation of sperm motility in the common carp. PNAS 2000; 97: 2052- 2057.

Lerner, J. 1998 Mejorando la calidad del semen. Disponible en: <http://www.unifertes.com/titulares23.php3>

Lim, C. 1997 Nutrition and feeding of Tilapias. In: SIMPOSIO CENTROAMERICANO DE ACUACULTURA, 4., Alabama, 1997. Anais... p.94ñ107.

Lin, F. y K. Dabrowski. 1996. Characteristics of muskellunge spermatozoa. In: Effects of ions and osmolality on sperm motility. Transactions of the American Fisheries Society 125: 195-202.

Linhart O, Cosson J, Mims SD, Shelton WL, Rodina M. Effects of ions on the motility of fresh and demembrated paddlefish (*Polyodon spathula*) spermatozoa. Reprod 2002; 124: 713-719.

Lovell, R.T. 1973 Essentiality of vitamin C in feeds for intensively fed caged channel catfish. Journal of Nutrition, 103: 134ñ138.

Lu, Jun y T. Takeushi. 2004. Spawning and egg quality of the tilapia *Oreochromis niloticus* fed solely on raw Spirulina throughout three generations. Aquaculture. Vol 234 Pag. 625-640.

Macintosh, D. J. y Little, D. C. (1995). Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Niall, R. B. y Ronald, J. R. (Eds) 1995. Brookstock managment and egg and larval quality. Blackwell Science. 277- 320.

- Maggioni, D., Rotta, P. P., Ito, R. H., Marques, J. A., Zawadzki, F., Prado, R. M. & Prado, I. N. (2008) Influência da proteína sobre a reprodução animal: uma revisão. Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia 2, 105-110.
- Márian, T., Z. Krasznai, L. Balkay, M. Emri y L. Trón. 1997. Role of extra-and intracellular pH in the sperm motility. Hyperosmosis modifies regulation of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger. Cytometry 27: 374-382.
- Mataveli, M; G, Moares; D, Streit; L, Vargas; E, Sakaguti, J, Toninato, R, Barbosa, L, Merlini. 2007. Avaliação da qualidade do sêmen de tilapia do nilo (*Oreochromis niloticus*), linhagem chitralada, suplementada com diferentes concentrações de vitamina C. B. Inst. Pesca, São Paulo, V.33. Nº1. Pág. 1-7.
- Mataveli, M; G, Moares; D, Streit, R, Pereira; E Gasparino. 2010. Qualidade do sêmen de tilapia do nilo (*Oreochromis niloticus*), alimentadas com dietas contendo diferentes níveis de vitamina C. Acta Scientiarum. Animal Sciences. Maringá. Vol 32. Nº3, pág. 345-349.
- Mattei, X. And Thiom, O.T. 1993. Acrosome-like in the spermatozoa of teleosts ish. Can., J. Zool. 71: 883-888.
- Mochida K, Kondo T, Matsubara T, Adachi S, Yamauchi K. A high molecular weight glycoprotein in seminal plasma is a sperm immobilizing factor in the teleost Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Dev Growth Differ 1999; 41: 619-627.
- Mojica Sastoque, F. J; M. Vivanco Aranda; F. J. Martinez Cordero; R. Trujillo Cabezas. (2010). TILAPIA 2020: PROSPECTIVO DEL SISTEMA-PRODUCTO NACIONAL DE TILAPIA EN MÉXICO. Comité Sistema Producto Tilapia de México, A. C. – Comité Nacional Sistema Producto

Tilapia CIAD, A.C. Unidad Mazatlán (LEAP) – Universidad Externado, Colombia.

Morales-Díaz, A. 1991. La tilapia en México: Biología, cultivo y pesquerías. A. G. T. Editor, S. A. México.

Morisawa, M. 1994. Cell Signaling Mechanisms. Zoological Science 11: 647-662.

Müller K, Labbé C, Zachowski A. Phospholipid transverse asymmetry in trout spermatozoa plasma membrane. Bioch et Bioph Acta 1994; 1192 :21-26.

Nakatsuru, K y D. L. Kramer. 1982. Is sperm cheap limited male-fertility and female choice in the lemon tetra (Pisces, Characidae). Science 216, 753- 755.

Navas, J. M., Bruce, M., Thrush, M., Farndale, B. M., Bromage, N., Zanuy, S., Carrillo, M., Bell, J. G., Ramos, J. (1997). The impact of seasonal alteration in the lipid composition of broodstock diets on egg quality in the European sea bass. Journal of Fish Biology, 51: 760-773.

Ocampo, C.J.A. 2002. Desarrollo gonádico y actividad reproductiva de *P. maculatofasciatus*. Tesis. Instituto Politecnico Nacional, Centro interdisciplinario de Ciencias Marinas. La paz, Baja california Sur, México.

Ohta H, Shinriki Y. Changes in osmotic pressure that trigger the initiation of sperm motility in the river sculpin *Cottus hangiongensis*. Fish Phys and Bioch 1998; 18: 29-35.

Ohta H, Unuma T, Tsuji M, Yoshioka M, Kashiwagi M. Effects of bicarbonate ions and pH on acquisition and maintenance of potential for motility in ayu,

Plecoglossus altivelis Temminck et Schlegel (osmeridae), spermatozoa. Aquac Res 2001; 32: 385-392.

Parker, G. A., M. A. Ball, P. Stockley, y M. J. G. Gage. 1996. Sperm competition games: individual assessment of sperm competition intensity by group spawners. Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B 263, 1291-1297.

Rana, K.J. 1986. Parenteral influences on egg quality, fry production and fry performance in *Oreochromis niloticus* (Linnaeus) and *O. mossambicus* (Peters). PhD thesis, Institute of aquaculture, University of Stirling.

Robinson, J.J., Ashworth, C.J., Rooke, J.A., Mitchell, L.M. & Mcevoy, T.G. (2006) Nutrition and fertility in ruminant livestock. Animal Feed Science and Technology 126, 259–76.

Rodríguez, G., M. 1992. Técnicas de evaluación de la madurez gonádica en peces. AGT editor, México. 79pp.

Salama, M.E. 1996. Effects of sex ratio and feed quality on mass production of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), Alevines. Aquaculture Research 27:581-90%.

Ross, L. G. (2000). Environmental physiology and energetics. En Tilapias: Biology and Exploitation. Beveridge, M. C. M. y McAndrew, B. J. (Eds). Kluwer Academic Publishers. Great Britain. 89-128p.

SAGARPA (2003) Anuario Estadístico de Pesca 2003. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.

- SAGARPA, Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. (2008). Diagnostico productivo con información preliminar para el ordenamiento del Sistema Producto Tilapia 2008.
- SITIOS. 2001 Protección a la semilla. Disponible em: <http://www.lacuarta.cl/sitios/vas/2001/01/14/sexil.html>
- Tabares, C; A. Tarazona; M. Olivera. 2005. Fisiología de la activación del espermatozoide en peces de agua dulce. Revista Colombiana de ciencias pecuarias. Vol.18:2, 2005.
- Takeuchi, M., Ishii, S. & Ogiso, T. (1981) Effect of dietary vitamin E on growth, vitamin E distribution, and mortalities of the fertilized eggs and fry in Ayu *Plecoglossus altivelis*. Bulletin of Tokai Regional Fisheries Research Laboratory 104, 11–112.
- Tokuda, M., Yamaguchi, T., Wakui, K., Sato, T., Ito, M. & Takeuchi, M. (2000) Tocopherol affinity for serum lipoproteins of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* during the reproduction period. Fisheries Science 66, 619-624.
- Traber, M. G. & Packer, L. (1995) Vitamin E - beyond antioxidant function. Journal of Clinical Nutrition 62,1501–1509.
- Tyler, C.R. y J.P. Sumpter. 1996. Oocyte growth and development in the teleost. Rev. Fish Biol. Fish. 6: 287-318.
- Valbuena,V.R.D; Rosado, P.R; Ruales, C.A.D. 2013. Relación entre factores dimensionales y de composición en la determinación de la calidad del

huevo en tilapia roja (*Oreochromis* spp). Revista Lasallista de investigación. Vol. 10 N° 1 pág. 27-37.

Wallace, R.A. y K. Selman. 1981. Cellular and dynamics aspects of oocyte growth in teleosts. Amer Zool. 21:325-343.

Watanabe, T; Itoh, A; Kitajima, C. y Fujita, S. 1984. Effect of protein levels on reproduction of red sea bream. Nippon Suidan Gakkaishi 50, 1015 -1022.

Watanabe, W. O., Losordo, T. M., Fitzsimmons, K. y Handley, F. 2002. Tilapia production systems in the Americas: Technology advances, trends y challenges. Fisheries Science. 10 (3): 165- 198.

Wee, K.L. y Tuan, N.A. 1988. Effects of dietary protein level on growth and reproduction in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). In: R.S.V. Pullin; T. Bhukaswan; K. Tonguthai and J.L. Maclean (Editors). The Second International Symposium on Tilapia in Aquaculture. Department of Fisheries, Bangkok, Tailandia and International Center for Living Aquatic Resources Management, Manila, Filipinas. p. 401-410.