

**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE TEMUCO.
FACULTAD DE ACUICULTURA Y CS. VETERINARIAS.
ESCUELA DE ACUICULTURA.**



“Efecto de la osmolaridad, pH y temperatura, en la movilidad y fertilidad del espermatozoide de puye (*Galaxias maculatus*) (Jenyns, 1842) en condiciones de cultivo experimental.”

Tesis de grado presentada como parte de los requisitos para optar al grado de Licenciado en Ciencias de la Acuicultura.

Víctor Manuel Vera Moll

**TEMUCO CHILE
-2004-**

Agradezco

A mis padres por su confianza y apoyo incondicional en estos años de estudio.

A mis hermanas y sobrina, por su motivación para seguir adelante.

A Melissa por su cariño y amor.

A mis compañeros de Acuicultura Experimental, por su ayuda y disposición a la hora de realizar los experimentos de esta Tesis.

A mis amigos, con quienes viví y compartí como familia en estos años de estudio fuera de mi hogar.

A mis profesores, en especial al Sr. Iván Valdebenito, por su gran apoyo durante la realización de esta Tesis

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Pagina
Resumen	1
Abstract	2
1. Introducción	3
1.1. Importancia comercial.	5
1.2. Biología reproductiva de <i>G. maculatus</i>.	6
1.3. Factores que regulan la movilidad espermática en peces.	10
1.3.1. Osmolaridad.	10
1.3.2. pH.	12
1.3.3. Composición iónica.	14
1.3.4. Temperatura.	16
2. Objetivos	17
2.1. Objetivo general.	17
2.2. Objetivos específicos.	17
3. Hipótesis.	18
3.1. Efecto del pH y temperatura.	18
3.2. Efecto de la osmolaridad y temperatura.	19

4. Metodología	20
4.1. Obtención de gametos.	20
4.2. Determinación de la densidad espermática.	21
4.3. Determinación del número de espermatozoides por ova.	22
4.4. Preparación de soluciones.	22
4.4.1. Preparación de soluciones de pH.	22
4.4.2. Preparación de soluciones de osmolaridad.	23
4.4. Experimentos para evaluación de movilidad espermática.	24
4.5. Experimentos para la evaluación de fertilidad.	25
4.6. Análisis estadístico.	27
5. Resultados.	32
5.1. Determinación de la densidad espermática.	32
5.2. Efecto del pH y temperatura en la fertilidad.	32
5.3. Efecto de la osmolaridad y temperatura en la fertilidad.	34
5.4. Evaluación de la movilidad espermática de puye bajo distintas soluciones de pH a tres temperaturas de activación.	36
5.5. Evaluación de la movilidad espermática de puye bajo distintas soluciones de osmolaridad a tres temperaturas de activación.	40
6. Discusión.	44
7. Conclusiones.	55
8. Bibliografía.	57

INDICE DE FIGURAS

	Pagina
Figura 1. A: Individuos adultos de <i>G. maculatus</i> hembra (superior) y macho (inferior). B: Se observa un macho en maduración máxima. C: Se observa una hembra en maduración máxima. D: Extracción de semen de un macho de puye. E: Desove de una hembra de puye.	30
Figura 2. A: Proceso de fertilización en seco de gametos de puye. B: Vista de ova recién fertilizada de puye. C y D: sistema de cultivo y mantención de reproductores de puye en “hatchery”.	31
Figura 3. Porcentajes de fertilidad ($X \pm D. E.$) de ovas de puye (<i>G. maculatus</i>) fertilizadas con soluciones de diferentes valores de pH y temperatura (n = 6).	33
Figura 4. Porcentajes de fertilidad ($X \pm D. E.$) de ovas de puye (<i>G. maculatus</i>) fertilizadas con soluciones de diferente osmolaridad y temperatura (n = 6).	35
Figura 5. Niveles de movilidad (moda) del espermatozoide de puye (<i>G. maculatus</i>) a 5°C en tres distintos valores de pH (n = 15).	37
Figura 6. Niveles de movilidad (moda) del espermatozoide de puye (<i>G. maculatus</i>) a 10°C en tres distintos valores de pH (n = 15).	38
Figura 7. Niveles de movilidad (moda) del espermatozoide de puye (<i>G. maculatus</i>) a 15°C en tres distintos valores de pH (n = 15).	39
Figura 8. Niveles de movilidad (moda) del espermatozoide de puye (<i>G. maculatus</i>) a 5°C en tres distintas osmolaridades (n = 15).	41
Figura 9. Niveles de movilidad (moda) del espermatozoide de puye (<i>G. maculatus</i>) a 10°C en tres distintas osmolaridades (n = 15).	42
Figura 10. Niveles de movilidad (moda) del espermatozoide de puye (<i>G. maculatus</i>) a 15°C en tres distintas osmolaridades (n = 15).	43

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Esquema explicativo del experimento de evaluación de fertilidad para las soluciones de pH. Cada grupo experimental está compuesto por dos réplicas para cada temperatura (n = 3).	25
Tabla 2. Esquema explicativo del experimento de evaluación de fertilidad para las soluciones de osmolaridad. Cada grupo experimental está compuesto por dos réplicas para cada temperatura (n=3).	26
Tabla 3. Escala macroscópica para determinar distintos estados de madurez sexual de <i>G. maculatus</i> según Valdebenito & Vega (2003).	28
Tabla 4. Escala evaluación de movilidad espermática según Sánchez-Rodríguez & Billard (1967).	29
Tabla 5. Porcentajes de fertilidad ($X \pm D. E.$) de ovas de puye (<i>G. maculatus</i>) fertilizadas con soluciones de diferentes valores de pH y temperatura (n = 6). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).	32
Tabla 6. Porcentajes de fertilidad ($X \pm D. E.$) de ovas de puye (<i>G. maculatus</i>) fertilizadas con soluciones de diferente osmolaridad y temperatura (n = 6). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).	34
Tabla 7. Niveles de movilidad (moda) del espermatozoide de puye (<i>G. maculatus</i>) a 5°C en tres distintos valores de pH (N = 15)	36
Tabla 8. Niveles de movilidad (moda) del espermatozoide de puye (<i>G. maculatus</i>) a 10°C en tres distintos valores de pH (N = 15).	38
Tabla 9. Niveles de movilidad (moda) del espermatozoide de puye (<i>G. maculatus</i>) a 15°C en tres distintos valores de pH (N = 15).	39
Tabla 10. Niveles de movilidad (moda) del espermatozoide de puye (<i>G. maculatus</i>) a 5°C en tres distintas osmolaridades (N = 15).	40
Tabla 11. Niveles de movilidad (moda) del espermatozoide de puye (<i>G. maculatus</i>) a 10°C en tres distintas osmolaridades (N = 15).	41
Tabla 12. Niveles de movilidad (moda) del espermatozoide de puye (<i>G. maculatus</i>) a 15°C en tres distintas osmolaridades (N = 15).	43

RESUMEN

Una de las especies que presenta mayor interés para la investigación y desarrollo de tecnologías de cultivo es *Galaxias maculatus*, debido al alto valor comercial de su postlarva cristalina, la actual oferta proveniente de las pesquerías no cubre la creciente demanda por parte de los consumidores, lo que ha llevado a desarrollar experiencias para su cultivo. Esta investigación tuvo como objetivo, determinar si las variaciones de osmolaridad, pH y temperatura afectan la movilidad y fertilidad del espermatozoide de puye, al utilizar distintas soluciones activadoras. Éstas, fueron preparadas con agua des-ionizada con el fin de tener un buen control sobre las variables a evaluar. Los especímenes utilizados en la investigación (14 machos y 10 hembras) nacidos en el “Hatchery” de la Escuela de Acuicultura de la Universidad Católica de Temuco en abril del 2002 se encontraban en maduración sexual plena al momento de la extracción de los gametos. Se determinó número de espermatozoide por ova y densidad espermática utilizados en los experimentos. Para realizar los experimentos de evaluación de niveles movilidad espermática y porcentajes de fertilidad promedio se utilizaron; tres valores de pH (5, 7 y 9), cuatro osmolaridades (0, 147,5; 294,0 y 456,5 mOsmols Kg⁻¹) y tres temperaturas de activación (5, 10 y 15°C). Los resultados arrojaron un número de espermatozoides por ova de $1,12 \pm 0,12 \times 10^6$ y una densidad espermática de $56,20 \pm 5,58 \times 10^9$ espermatozoides ml⁻¹. Los mayores porcentajes de fertilidad promedio se observaron a pH neutros a ácidos (5 y 7) y en soluciones isotónicas (0 mOsmol Kg⁻¹) para el caso de las soluciones de osmolaridad, ambas a una temperatura de activación de 10°C. En las soluciones de pH la mayor duración de la movilidad de los espermatozoides (60 s) se registró a temperaturas de 5°C con pH 5 y 10°C con pH 7. En medios neutros alcanza el nivel 1 de movilidad en un mayor de tiempo (sobre los 20 s) post activación. En los experimentos con soluciones de osmolaridad muestran que el mayor tiempo de movilidad (110 s) se obtuvo a 10°C con la solución activadora a 147,5 mOsmol Kg⁻¹. Siendo capaz de iniciar la actividad flagelar en agua des-ionizada (0 mOsmol Kg⁻¹), soluciones isotónicas e hipertónicas (294,0 y 456,5 mOsmol Kg⁻¹) y temperaturas altas (15°C) afectan negativamente la movilidad y fertilidad del espermatozoide de puye.

ABSTRACT

One of the species that presents major interest for research and development of culturing technologies is *Galaxias maculatus*, “puye”, due to high commercial value of crystalline post larvae, and because the current offer from its fishery does not cover the increasing demand of the consumers, which has led to developing experiences for its culture. The objective of this investigation was to determine if of osmolality, pH and temperature variations, affect the motility and fertility of puye sperm, using different activating solutions. These solutions were prepared with non-ionised water to have a better control to evaluate variables.. Individuals used in the investigation (14 males and 10 females) were born at Aquaculture school hatchery of Temuco Catholic university on April, 2002. At this date, they were at full mature sexual stage to the moment of extraction of gametes. Spermatozoid number, sperm density, spermatozoid motility and fertility percentage were evaluated. Three pH levels (5,7,9), four osmolality levels (0, 147,5; 294,0; 456,5 mOsmols Kg⁻¹) and three temperatures (5, 10, 15°C) were performed. Results of spermatozoid number per egg were $1,12 \pm 0,12 \times 10^6$ and sperm density was $56,20 \pm 5,58 \times 10^9$ spermatozoid per ml. The highest percentage value wer observed at neutral and acid pH (5 and 7) and into isotonic solutions (0 mOsmol Kg⁻¹); both at 10°C. The longer time periods of spermatozoid motility (60 seconds) was registered at 5°C, pH 5 and 10°C, pH 7. At neutral medium, level 1 of motility was reached but in 20 seconds after activated. At 147,5 mOsmol Kg⁻¹ of activating solution and 10°C, the spermatozoid motility was kept up to 110 seconds. Isotonic and hipertonic solutions (294,0 and 456,5 mOsmol Kg⁻¹) with high temperatures (15°C) had negative effect on spermatozoid motility and fertility of puye.

1. INTRODUCCIÓN

La acuicultura en Chile ha experimentado un rápido crecimiento durante las últimas décadas, transformándose en una fuente importante de ingresos para el país, principalmente en el rubro de la salmonicultura. Las empresas nacionales, buscando abrir nuevos mercados, muestran interés en nuevas especies para cultivar y así tener una mayor diversificación en sus productos.

Una de las especies que presenta mayor interés para la investigación y desarrollo de tecnologías de cultivo es el puye (*Galaxias maculatus*) (Jenyns, 1842), debido al alto valor comercial de su postlarva cristalina en el mercado nacional e internacional. El puye es un pequeño pez nativo que pertenece a la familia Galaxiidae (Ferriz, 1987). Su taxonomía fue descrita por Arratia (1981) y posteriormente modificada por Barile *et al.* (2003), su clasificación taxonómica según Barile *et al.* (2003) es:

Superclase	:	Pisces
Clase	:	Actinopterygii
Subclase	:	Neopterygii
Superorden	:	Protacanthopterygii
Orden	:	Osmeriformes
Suborden	:	Osmeroidei
Familia	:	Galaxiidae
Subfamilia	:	Galaxiinae
Género	:	Galaxias
Especie	:	Maculatus
Nombre científico	:	<i>Galaxias maculatus</i> (Jenyns, 1842)

El puye recibe diversos nombres vernaculares dependiendo del país en que se encuentre; conocido como “Puye” en Chile, “Puyen” en Argentina, “Whitebait” e “Inanga” en Nueva Zelanda y Australia, y en Tasmania se conoce como “Jollytail” (Mardones *et al.*, 1999).

En cuanto a su morfología, el adulto de *G. maculatus* posee un cuerpo alargado de sección subcilíndrica y sin escamas. La aleta anal y dorsal se oponen y están desplazadas hacia la región posterior del cuerpo, las aletas pectorales pequeñas se ubican inmediatamente detrás del opérculo y tiene aletas ventrales insertas antes del punto central del cuerpo (Duarte *et al.*, 1971 citado por Vega *et al.*, 1999). La aleta caudal posee dos lóbulos iguales (aleta homocerca), con un pedúnculo relativamente corto. Todas las aletas son traslúcidas con alguna presencia de melanóforos (Barile *et al.*, 2003). La postlarva de esta especie es de característica anguiliforme (Vega, 1999; Mardones *et al.*, 1999) y cristalina, no posee pigmentación y su apariencia es transparente (Barile *et al.*, 2003).

El puye tiene una distribución circun-antártica (Mardones *et al.*, 1999), habita preferentemente en sistemas lacustres, fluviales y estuarinos (Peredo & Sobarzo, 1994). En Chile, habita desde la zona central, a los 32° de Latitud Sur, hasta los 53° de Latitud Sur, en la región patagónica de Tierra del Fuego (Campos, 1970).

Las poblaciones son pequeñas y se agregan por clases de edad. Existen dos poblaciones de puyes que difieren en su morfología. Las diadrómicas se caracterizan

por presentar un número alto de vértebras (59-62) y las dulceacuícolas, las cuales presentan un bajo número de vértebras (52-59). Ambas poblaciones son capaces de adaptarse al agua salobre (Vega *et al.*, 1999).

1.1. Importancia comercial.

La postlarva de puye es el estado de desarrollo que se comercializa y consume como un fino plato de mesa, siendo un recurso muy apetecido por restaurantes y hoteles, alcanzando valores de US\$ 12 la porción de 100 gramos. En playa, el kilogramo fresco se encuentra cerca de US\$ 8,5 (Fletcher, 2000). En el comercio internacional, su precio fluctúa hasta US\$ 100 y no menos de US\$ 25 el kilogramo como producto congelado. Chile, Argentina, Tasmania, Australia y principalmente Nueva Zelanda, son países consumidores de puye (Barile *et al.*, 2003). Además, España es otro potencial país consumidor de puye por ser un similar de la “angula” (Mardones *et al.*, 1999),

En Chile, las poblaciones naturales de puye han sido drásticamente depredadas y afectadas por la sobre explotación por parte de pescadores artesanales. En 1967 la pesca total de puye fue de 2905 Kg y en 1968 de 2089 Kg sólo en la zona de Valdivia (Campos, 1970). Entre 1980-1989 la pesca a nivel nacional alcanzó un total acumulado de 9 ton, en cambio para el periodo entre 1990-1998 el total acumulado alcanzó a las 112 ton (Sernap, 1978-1998) lo que equivale a $3,7 \times 10^8$ individuos. Considerando que el peso de cosecha del puye es de 0,3 g en general, estas

estadísticas no reflejan la realidad de la pesquería nacional ya que en ellas se consideran unas pocas caletas (Mardones, 2003), debido a los pequeños volúmenes de captura que realiza cada pescador y a lo distante que se encuentra un punto de extracción a otro, dificultando los registros estadísticos.

De acuerdo a lo anterior, la oferta actual proveniente de las pesquerías no cubre la creciente demanda por parte de los consumidores, lo que ha llevado a desarrollar experiencias para su cultivo. De concretarse esto, el puye sería el primer pez nativo que podría integrarse a la piscicultura nacional (Bórquez & Dantagnan, 1999).

1.2. Biología reproductiva de *G. maculatus*.

Estos animales son organismos dioicos, la proporción entre machos y hembras es 1:1, los especímenes inmaduros son de pequeño tamaño y muy delgados (Valdebenito, 1999), los que en su madurez se diferencian por el color y forma del abdomen: siendo plano y blanquecino en los machos; abultado y transparente en las hembras, lo que hace posible observar los huevos a simple vista. En la cavidad celómica, los ovarios y testículos pueden llegar al 40% del peso corporal (Mitchell, 1989). Según Ferriz (1987) la maduración gonadal comienza a partir de los 36 mm, la cantidad de huevos varía con la edad y tamaño de las hembras; de 800 a 1200 ovas en su primer año de vida, hasta 7400 ovas en una hembra más longeva (Valdebenito, 1999). Existiendo una relación directa entre el número de ovas y su longitud corporal (Campos, 1970). En el puye los oviductos están ausentes, característica común para Galáxidos y

salmónidos en general, los que presentan el ovario del tipo gimnóario (Hoar, 1969 citado por Peredo & Sobarzo, 1993).

El puye en su ciclo de vida presenta los siguientes estados: ova, ova embrionada (“ova con ojo”), larva (“alevín de saco”), postlarva cristalina, juvenil inmaduro (hasta los 5,8 cm de longitud, aproximadamente) y adultos. Los estados de larva y postlarva, no poseen pigmentación, siendo su cuerpo transparente, por ello se les denomina “puyes cristalinos”. Los adultos están pigmentados con manchas en forma de asteriscos (sic), de ahí su nombre científico *Galaxias maculatus* o “manchados” (Vega *et al.*, 1999), alcanzando una talla máxima de 160 mm como adultos (Campos, 1970).

El ciclo reproductivo de *galaxias maculatus* es anual (McDowall, 1968; Ferriz, 1987; Mitchell, 1989; Peredo & Sobarzo, 1994). Presenta maduración sexual asincrónica, con desove fraccionado (Peredo & sobarzo, 1993). Las poblaciones estuarinas desovan en otoño, ajustándose a las más altas mareas, desovando sobre la vegetación adyacente (McDowall, 1968), manteniéndose los huevos fertilizados en desarrollo casi en seco, las larvas eclosionan en la siguiente marea alta. Las larvas diadrómicas migran al mar y retornan en primavera con una edad de 6 a 8 meses. Las postlarvas de puye son carnívoras y caníbales, se alimentan de zooplancton. En estado adulto se alimentan de artrópodos y otros organismos (Vega *et al.*, 1999).

En poblaciones dulceacuícolas, el periodo de maduración inicial correspondería a inicios de invierno para alcanzar su estado de maduración máxima a fines de

invierno, registrándose el periodo de desove a partir del inicio de la primavera (Peredo & Sobarzo, 1994).

El puye, como la mayoría de los teleósteos, está dentro de las especies con fecundación externa. El espermatozoide no presenta actividad flagelar mientras se encuentra dentro del fluido seminal (Billard, 1988; Levanduski & Cloud, 1988; Goodall *et al.*, 1989; Morisawa, 1994; Perchee *et al.*, 1995; Perchee *et al.*, 1997; Cosson *et al.*, 1999). Sólo al tomar contacto con el agua se “gatilla” su movilidad con notorio desplazamiento por cerca de 10 segundos, para luego decaer en ligeras vibraciones (Valdebenito, 1999). Fletcher (2000) reportó actividad flagelar muy leve hasta 12 minutos después de la activación, datos que no concuerdan con lo descrito por Campos (1970) quien sugiere que los espermatozoides de esta especie permanecen activos durante varias horas.

La duración e intensidad de la movilidad del espermatozoide en peces, varía de acuerdo al tipo de especie que se trate. Por ejemplo en el caso de los peces planos se observa una movilidad de alrededor de 5 minutos (Suquet *et al.*, 1992 citado por Fletcher, 2000), mientras que en el caso de los salmónidos es de 30 a 60 segundos. En general, la movilidad es difícil de analizar debido a que el movimiento es muy rápido inmediatamente después de la dilución y declina gradualmente, hasta detenerse totalmente (Billard & Cosson, 1989).

La densidad espermática del semen de puye es alta comparada con otras especies. Por ejemplo, para la carpa, la densidad espermática fluctúa entre 25,0 y 30,0 x10⁹ espermatozoides ml⁻¹, en la trucha entre 10 y 25 x10⁹ espermatozoides ml⁻¹ y en el salmón entre 12 y 25 x10⁹ espermatozoides ml⁻¹ (Estévez, 1991). Para el puye los valores obtenidos oscilan entre 36,5 y 55,3 x 10⁹ espermatozoides ml⁻¹ (Valdebenito, 1995; Fletcher, 2000; Fernández, 2001).

Datos disponibles concernientes a la biología de teleósteos han demostrado amplias variaciones en la morfología espermática, fisiología y composición del plasma seminal (Lahnsteiner *et al.*, 1995). La morfología espermática de esta especie concuerda con los caracteres generales de la mayoría de los teleósteos, es del tipo primitivo y uniflagelado, diferenciado en cabeza (la cual carece de acrosoma), pieza media y cola, todas estructuras rodeadas de membrana plasmática. Además, presenta una longitud promedio total de 24 µm (Coronado, 2000).

El número de mitocondrias de la pieza media es variable dependiendo de la especie. Coronado (2000) reportó que el puye posee una mitocondria y en el flagelo del espermatozoide observó nueve pares de microtúbulos periféricos y un par de túbulos centrales (9+2).

El sistema de microtúbulos en el flagelo representa el aparato motor de los espermatozoides. En los microtúbulos del flagelo bajo hidrólisis de ATP, la dineína interactúa con la tubulina, también presente en los microtúbulos, causando el proceso

de deslizamiento (Cosson *et al.*, 1999), la interacción de estos elementos crea una tensión que da como resultado la oscilación del flagelo flexible (Satir, 1974 citado por Cosson *et al.*, 1999).

1.3. Factores que regulan la movilidad espermática en peces.

En peces ovíparos, la fecundación externa, está sometida al estrés del medio ambiente. La manipulación del semen “in vitro” para almacenaje y fertilización, requiere la determinación de las condiciones óptimas de temperatura, protones (pH), osmolaridad, cationes y sustratos metabolizables para la iniciación y mantención de la movilidad (Goodall *et al.*, 1989; Billard & Cosson, 1995; Cosson., *et al.*, 1999). Los principales factores que regulan la movilidad espermática son:

1.3.1. Osmolaridad.

Todos los organismos acuáticos se enfrentan con problemas osmóticos en alguna etapa de su ciclo de vida. Por esto, han desarrollado una variedad de mecanismos que emplean para mantener las concentraciones osmóticas internas apropiadas y prevenir el desarrollo de presiones osmóticas que puedan provocar problemas. La osmorregulación implica el mantenimiento de una concentración osmótica interna diferente de la del medio, además de la regulación de la composición y de las concentraciones iónicas en diversos compartimentos para asegurar el funcionamiento correcto de las células y tejidos.

Osmorregulación, es el término acuñado por Höber en 1902 y se refiere a los procesos relacionados con la regulación de la presión osmótica y la concentración de sales. Estos procesos han tenido un efecto importante en la especialización y diversificación de las especies acuáticas a lo largo de la evolución.

Varios estudios han enfatizado los efectos de la osmolaridad en la movilidad espermática en teleósteos marinos, de agua dulce, salmónidos y especies vivíparas (Cosson *et al.*, 1999; Darszon *et al.*, 1999).

La movilidad espermática de la perca es suprimida por altas osmolaridades (Lahnsteiner *et al.*, 1995). Un similar mecanismo de inhibición osmótica de movilidad espermática existe en ciprínidos (Morisawa, 1983, citado por Lahnsteiner *et al.*, 1995) y en la lamprea marina, especie en que la movilidad espermática es inhibida por una osmolaridad alta (80 mmol NaCl o KCl) (Cieresko & Dabrowski, 2002).

Así también, espermatozoides de teleósteos marinos, tales como “puffer fish” y el lenguado, de peces ciprínidos dulceacuícolas, como carpa, dorada, “zebrafish” y pejerrey; son inmóviles en soluciones con o sin electrolitos cuando la osmolaridad es isotónica con el plasma seminal de 300 mOsmol kg⁻¹, la movilidad sólo comienza cuando el semen es diluido en una solución hipotónica para el caso de peces de agua dulce y con una solución hipertónica para peces de agua salada (Morisawa, 1994).

En “catfish” (*Silurus glanis*) la presión osmótica del fluido seminal es de 280 mOsmol Kg⁻¹ y la activación ocurre en agua dulce o en soluciones salinas si la presión osmótica es mas baja que 70 mOsmol Kg⁻¹ (Billard *et al.*, 1997).

En *G. maculatus* la osmolaridad del fluido seminal alcanza a 299 mOsmol Kg⁻¹ (Fernandez, 2001; Muñoz, 2001). McDowall (1968) y McDowall *et al.* (1994) señalan que esta especie realiza su fertilización en ambientes estuarinos, por lo que es considerada como “catádroma marginal”. Mitchell (1989) recomienda condiciones para la fertilización de 6 g/L de salinidad (125 mOsmol Kg⁻¹ aprox.).

1.3.2. pH.

El pH o potencial de hidrógeno, es la concentración de iones hidrógeno en una solución. Se considera una solución ácida a una sustancia que proporciona iones hidrógenos o protones (H⁺) en solución acuosa, y se considera una solución básica toda aquella que sea capaz de unirse con protones. El pH intra o extra celular de teleósteos marinos y dulceacuícolas es reconocido como un importante regulador de la movilidad espermática (Márian *et al.*, 1997).

El pH en las soluciones activadoras de la movilidad espermática también afecta de distintas maneras la actividad flagelar del espermatozoide dependiendo de la especie (Cosson *et al.*, 1999). El espermatozoide de la perca tiene un pH óptimo en el rango de 7,0 a 8,5 (Lahnsteiner *et al.*, 1995).

En salmónidos y ciprínidos, el pH óptimo para la movilidad y fertilidad es de 9,0 (Billard, 1989) y la movilidad puede ser iniciada por la alcalinización (Billard & Cosson, 1993, citado por Lahnsteiner *et al.*, 1995). En trucha arco iris un pH bajo 7,8 no induce la movilidad espermática (Baynes *et al.*, 1981 citado por Cosson *et al.*, 1999). La aplicación de bicarbonato extra celular y alto pH para la adquisición de movilidad espermática en trucha arco iris y salmón “chum”, ha sido sugerida por Morisawa *et al.* (1993).

El pH en el conducto seminal (pH 8) del salmón “chum” es más alto que el pH de los testículos (pH 7,5), haciendo que adquiriera mayor potencial de movilidad en el desplazamiento desde el testículo al conducto seminal (Morisawa, 1994). Para el caso de la lamprea marina la duración de la movilidad espermática disminuye con los aumentos en el pH (Cieresko & Dabrowski, 2002).

Espermatozoides de especies marinas como “mullet” (*Mugil capito*), son activados a pH entre 5,5 y 10,0; siendo el óptimo 7,0 (Hines & Yashouv, 1971 citado por Cosson *et al.*, 1999). En el bacalao de profundidad, la movilidad espermática es activada a pH entre 5 y 10, siendo el óptimo alrededor de 7. En *G. maculatus* no existe información respecto a efectos del pH sobre la movilidad y fertilidad, Muñoz (2001) informa que el valor del fluido seminal es de 7,96.

1.3.3. Composición iónica

Darszon *et al.* (1999), informa de la importante influencia de la composición iónica del medio externo sobre la movilidad espermática y cómo los canales iónicos son un elemento esencial para este proceso celular.

En salmónidos, la dilución del fluido seminal en soluciones con K^+ inhibe la movilidad espermática (Billard, 1988; Cussac & Maggese, 1988; Billard & Cosson, 1995; Darszon *et al.*, 1999; Cosson *et al.*, 1999; He & Woods, 2003).

El efecto del K^+ en la movilidad espermática en otros peces teleósteos es menos claro, pero se ha determinado que no inhibe la movilidad flagelar en algunas especies (Morisawa, 1994). En pez gato (*Rhadmia sapo*) la presencia de K^+ en distintas concentraciones no afecta la movilidad espermática (Cussac & Maggese, 1988). De igual manera ocurre para especies de agua dulce como el pez dorado y “zebrafish” (Darszon *et al.*, 1999).

Por el contrario, la presencia de K^+ es necesaria para la iniciación de la movilidad espermática en la anguila japonesa (Ohta *et al.*, 1997). Cosson *et al.*, (1999) reportan que la presencia del ion K^+ en muy bajas concentraciones, en el rango de 0,01 mM, muestra un control sobre la activación espermática en “padle fish” y esturión (*Acipenser baeri*).

Sheuring (1925 citado por Cosson *et al.*, 1999) fue el primero en reportar que iones como Na^+ , Ca^{++} y Mg^{++} reducían el efecto inhibitor del K^+ . En la actualidad, es conocido que la presencia de Ca^{++} es importante para la iniciación de la movilidad espermática en salmónidos al contrarrestar el efecto inhibitor del K^+ (Billard & Cosson, 1989; 1995; Darszon *et al.*, 1999; Cosson *et al.*, 1999). También en “padle fish” y esturión (*Acipenser baeri*) la presencia de Ca^{++} es importante para la iniciación de la actividad espermática.

En contraste con lo observado en salmónidos, los espermatozoides de carpa presentan una independencia del ion Ca^{++} , similar efecto es observado en varios peces teleósteos como “turbot”, “halibut”, silúridos y las anguilas (Cosson *et al.*, 1999).

Iones de metales pesados en el medio de dilución del semen muestran un deterioro en la movilidad espermática de animales marinos. Como por ejemplo, la presencia Zn^{++} en bajas concentraciones en el agua de mar evita la activación del espermatozoide de “sea urchin”. Los iones Cd^{++} y Zn^{++} afectan la movilidad del espermatozoide del pez gato. Los derivados del mercurio como HgCl_2 afectan al espermatozoide de “turbot” y “sea bass”. En puye no existe información ni antecedentes bibliográficos sobre como afecta la composición iónica del medio a la movilidad y fertilidad del espermatozoide.

1.3.4. Temperatura.

La temperatura es otro factor importante que incide en el metabolismo de los espermatozoides. Bajas temperaturas prolongan la movilidad a través del tiempo y reduce la velocidad de desplazamiento (Billard & Cosson 1988 citado por Cosson *et al.*, 1999). Al evaluar el porcentaje de fertilidad en puye se ha determinado que los mejores valores se obtienen a temperaturas cercanas a 10°C. Además, existe una correlación inversa entre el tiempo de movilidad del espermatozoide y la temperatura (Fletcher, 2000), es decir, que a mayor temperatura la duración de la movilidad espermática es menor. En especies como el salmón del atlántico y en trucha marrón la fertilización puede ocurrir en rangos más amplios de temperatura (2 a 16°C) (Vladic & Järvi, 1997). En “baltic cod” (*Gadus morhua*) la mayor movilidad espermática ocurre a una temperatura de 7°C.

Tomando en cuenta que no existen antecedentes bibliográficos ni estudios científicos sobre la importancia del efecto de la osmolaridad y pH sobre la movilidad y fertilidad del espermatozoide de puye (*G. maculatus*), esta investigación tiene como objetivo determinar si las variaciones de osmolaridad, pH y temperatura afectan la movilidad y fertilidad del espermatozoide de puye, al utilizar distintas soluciones activadoras. Esto permitirá determinar los valores de pH y osmolaridad más adecuados, para un mejor manejo de los gametos durante la fertilización y con esto mejorar los porcentaje de fertilidad obtenidos con el puye en futuros cultivos con fines comerciales, de reproducción, investigación y docentes.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general.

- Estudiar los efectos de la osmolaridad, pH y temperatura, sobre la movilidad y fertilidad del espermatozoide de puye (*Galaxias maculatus*).

2.2. Objetivos específicos.

- Evaluar los efectos de las variaciones de osmolaridad y temperatura en la movilidad y fertilidad del espermatozoide de puye (*Galaxias maculatus*).
- Evaluar los efectos de las variaciones de pH y temperatura en la movilidad y fertilidad del espermatozoide de puye (*Galaxias maculatus*).

3. HIPÓTESIS

3.1. Efecto del pH y temperatura.

Para evaluar el efecto de la variación de pH y temperatura en la movilidad y fertilidad del espermatozoide de puye se plantearon las hipótesis:

H_0 : La movilidad y fertilidad del espermatozoide de puye no es afectada por variaciones de pH entre 5 y 9 a temperaturas entre 5 y 15°C.

H_a : La movilidad y fertilidad del espermatozoide de puye sí es afectada por variaciones de pH entre 5 y 9 a temperaturas entre 5 y 15°C.

3.2. Efecto de la osmolaridad y temperatura.

Para evaluar el efecto de la variación de osmolaridad y temperatura, en la movilidad y fertilidad del espermatozoide de puye, se plantearon las hipótesis:

H₀ : La movilidad y fertilidad del espermatozoide de puye no es afectada por variaciones de osmolaridad entre 0 y 456,5 mOsmol Kg⁻¹ a temperaturas entre 5 y 15°C.

H_a : La movilidad y fertilidad del espermatozoide de puye sí es afectada por variaciones de osmolaridad entre 0 y 456,5 mOsmol Kg⁻¹ a temperaturas entre 5 y 15°C.

4. METODOLOGÍA.

Los experimentos se realizaron en el “Hatchery” de la Escuela de Acuicultura de la Universidad Católica de Temuco durante el primer y segundo semestre del año 2003. Los especímenes de puye utilizados en la investigación nacidos en abril del 2002 (un año de edad) descendientes de una población originaria de Hornopiren, se encontraban en etapa de maduración. Los reproductores fueron inducidos a la maduración sexual plena con baño de hormona LHRH análoga. El nivel de madurez se evaluó según la escala macroscópica de estados de madurez sexual para esta especie determinada por Barile *et al.* (2003) (Tabla 3).

Las soluciones utilizadas para los experimentos fueron preparadas con agua desionizada con el fin de tener un buen control sobre las variables a evaluar. Sólo se agregó NaCl para obtener la osmolaridad experimental y HCl o NaOH para subir o bajar el pH.

4.1. Obtención de Gametos.

Se obtuvieron separadamente semen y ovocitos de ejemplares en maduración máxima (Figura 1By C). Los gametos fueron extraídos mediante masaje abdominal siendo recepcionados en placas petri. Este procedimiento se realizó con elementos secos, para evitar la activación de los gametos (Figura 1D y E). En el caso del semen se

realizó un “pool” con aproximadamente siete machos, ya que cada espécimen produce un pequeño volumen de este fluido. La temperatura ambiente de trabajo para realizar este procedimiento fue de $12,25 \pm 2,75^{\circ}\text{C}$. Posteriormente los gametos fueron almacenados a 4°C .

4.2. Determinación de la densidad espermática.

Una vez obtenido el pool de semen se determinó su densidad espermática. Para ello se tomó una muestra de 0,1 ml de semen con una pipeta de Thoma. Se utilizó como diluyente agua de pozo hasta la marca 101, llegando a una dilución de 1 es a 1000. Después de agitar adecuadamente por 10 segundos, para evitar la aglutinación de los espermatozoides, se cargó con esta solución la cámara de Neubauer para realizar el recuento celular. El conteo se realizó en 5 cuadrantes de la cuadrícula central de la cámara con una profundidad de 0,1 mm (Oppenheim, 1973). Se dejaron sedimentar las células (espermatozoides) y se procedió al recuento total representativo de 1/5 milímetro cuadrado.

El número total de espermatozoides se calculó de la siguiente manera:

$$E \times 5 \times 1000 \times 10 = N$$

Donde:

E: Espermatozoides en 5 cuadrados de tamaño promedio.

N: Numero de espermatozoides por mm^3 .

4.3. Determinación del número de espermatozoides por ova.

En todos los experimentos de fertilidad, se utilizó 1 microlitro (μL) de “pool” de semen sin diluir. Por lo tanto, para calcular el número de espermatozoides por ova se consideró la densidad espermática (células/ mm^3) multiplicada por 0,001 para determinar el número de células por microlitro y posteriormente se dividió por el número de ovas utilizadas en cada tratamiento (50). Con este resultado se determinó el número de espermatozoides por ova.

4.4. Preparación de Soluciones.

Para realizar los experimentos de movilidad y fertilidad, fue necesario preparar soluciones de pH y osmolaridad. Para ello, se utilizaron matraces Erlenmeyer de 500 ml para cada solución, previamente se autoclavó el agua des-ionizada en los respectivos matraces durante 21 minutos a una temperatura de 101°C , en un equipo de autoclave marca HUXLEY, modelo HL – 341, con una capacidad de 72 litros.

4.4.1. Preparación de soluciones de pH.

Para determinar el efecto del pH en la movilidad y fertilidad en los espermatozoides de puye se dispuso de tres soluciones, una para el control y dos para los tratamientos,

las cuales correspondieron a pH 7 para el control y pH 5 y 9 a los tratamientos. Estas soluciones se obtuvieron agregando al agua des-ionizada separadamente hidróxido de sodio al 0,1 N para subir el pH y ácido clorhídrico al 0,025 N para bajarlo, lo cual fue controlado a través de un pH-metro marca Hanna instrument, modelo Hi 9331.

4.4.2. Preparación de soluciones de osmolaridad.

Para los experimentos con osmolaridad se utilizaron cuatro soluciones, una para control y las tres restantes para los tratamientos, las cuales correspondieron a 0 mOsmols Kg⁻¹ (control) y 147,5; 294,0 y 456,5 mOsmols Kg⁻¹ (tratamientos).

Para preparar las soluciones, se utilizó agua des-ionizada, con una osmolaridad de 0 mOsmols Kg⁻¹. La osmolaridad del agua fue modificada agregando NaCl en distintas cantidades, utilizando la relación:

$$300 \text{ mOsmols Kg}^{-1} \text{ ===== } 0.9 \text{ g de NaCl /dL}$$

En una balanza analítica marca “Denver Instrument Company” modelo AA-200, se pesaron y agregaron 2,25; 4,5 y 6,75 gramos de NaCl para las soluciones de 147,5; 294,0 y 456,5 mOsmols Kg⁻¹, respectivamente. Para el caso del control (0 mOsmols Kg⁻¹) se utilizó solamente agua des-ionizada (pura).

Todas las soluciones se homogeneizaron con un agitador magnético del Laboratorio de Calidad de Agua de la Escuela de Acuicultura, además la osmolaridad fue controlada a través de un osmómetro marca Knauer modelo A 300 con un rango de 0 –2000 mOsmols Kg⁻¹ facilitado por el Departamento de Anatomía de la Universidad de la Frontera.

4.5. Experimentos para Evaluación de movilidad espermática.

Para evaluar la movilidad espermática se trabajó con un microscopio óptico invertido con contraste de fase marca Nikon, modelo TMS bajo aumento de 20x. Con una micropipeta se depositó un microlitro de semen en un porta objetos para ser activado inmediatamente con 10 microlitros de solución, al momento que el semen tomó contacto con el agua, se activó la movilidad de los espermatozoides. La movilidad espermática fue evaluada según la escala de Sánchez-Rodríguez & Billard (1967) (Tabla 4), la cual considera 6 niveles de movilidad. El tiempo se registró cada cinco segundos, hasta llegar al nivel de movilidad 0. Se realizaron 15 réplicas para cada control y tratamientos. Este procedimiento se realizó para todos los tratamientos de pH y osmolaridad a tres temperaturas de activación (5, 10 y 15 °C). Estos experimentos se realizaron a una temperatura ambiente $13,5\text{ °C} \pm 2,25$

4.6. Experimentos para la evaluación de fertilidad.

Con el fin de evaluar la fertilidad del espermatozoide de puye bajo los diferentes tratamientos, se fecundó mediante el método húmedo en una placa petri un “pool” de ovas usando como medio de activación las soluciones de pH y osmolaridad a tres temperaturas de activación (5, 10 y 15 °C) (Figura 2A). Se realizaron dos réplicas para cada grupo experimental, cada una formada por 50 ovas provenientes de hembras en máxima maduración. Las ovas fueron fertilizadas con un microlitro del “pool” de semen según se señala en tabla 1 y 2. Este diseño experimental se repitió tres veces ($n = 3$) para cada réplica, con una separación de aproximadamente 4 semanas entre una experiencia y otra.

Tabla 1. Esquema explicativo del experimento de evaluación de fertilidad para las soluciones de pH. Cada grupo experimental está compuesto por dos réplicas para cada temperatura ($n = 3$).

	pH 5 (Tratamiento)		pH 7(control)		pH 9 (Tratamiento)	
Temperatura	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 1	Réplica 2
5°C	50 ovas	50 ovas	50 ovas	50 ovas	50 ovas	50 ovas
10°C	50 ovas	50 ovas	50 ovas	50 ovas	50 ovas	50 ovas
15°C	50 ovas	50 ovas	50 ovas	50 ovas	50 ovas	50 ovas

Tabla 2. Esquema explicativo del experimento de evaluación de fertilidad para las soluciones de osmolaridad. Cada grupo experimental está compuesto por dos réplicas para cada una de las temperaturas (n = 3).

	0 mOsmols Kg ⁻¹ (Control)		294,0 mOsmols Kg ⁻¹ (Tratamiento)		147,5 mOsmols Kg ⁻¹ (Tratamiento)		456,5 mOsmols Kg ⁻¹ (Tratamiento)	
Temperatura	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 1	Réplica 2
5°C	50 ovas	50 ovas	50 ovas	50 ovas	50 ovas	50 ovas	50 ovas	50 ovas
10°C	50 ovas	50 ovas	50 ovas	50 ovas	50 ovas	50 ovas	50 ovas	50 ovas
15°C	50 ovas	50 ovas	50 ovas	50 ovas	50 ovas	50 ovas	50 ovas	50 ovas

Se consideraron fecundadas todas aquellas ovas en las que luego de aproximadamente seis horas de incubación, fue posible observar, bajo lupa estereoscópica, los primeros dos blastómeros claramente delimitados (Benzie, 1968) (Figura 2B). Estos experimentos se realizaron a una temperatura ambiente de $14,5 \pm 2,5^\circ\text{C}$.

4.7. Análisis estadístico.

En los experimentos de movilidad espermática se trabajó con 15 replicas para cada tratamiento de pH y osmolaridad en las tres temperaturas. En los experimentos para determinar fertilidad se realizaron dos réplicas para cada tratamiento de pH y osmolaridad a tres temperaturas ($n = 3$). Se trabajó con los porcentajes promedios de ovas fertilizadas por placa de cada grupo experimental. Los resultados fueron analizados según pruebas para datos no paramétricos con un nivel de significancia de 0,05. Para los experimentos de movilidad espermática se aplicó la prueba de Chi-cuadrado, así como el test de Mann-Whitney para los experimentos de fertilidad.

Tabla 3. Escala macroscópica para determinar distintos estados de madurez sexual de *G. maculatus* según Valdebenito & Vega (2003).

ESTADO	CARACTERISTICAS EXTERNAS
Inmadurez	Los peces presentan la pared abdominal completamente plateada y no es posible diferenciar entre machos y hembras.
Madurez Inicial	<p>Hembras: El abdomen aumenta su tamaño y transparencia, observándose huevos pequeños de color blanco-amarillento. La región anterior del abdomen se ve levemente plateada.</p> <p>Machos: El abdomen aumenta levemente su tamaño y se observa de color plateado. Es posible identificar el testículo de color blanquecino al interior de la pared abdominal.</p>
Madurez Avanzada	<p>Hembras: Presentan un abdomen duro al tacto y mas abultado debido a la presencia de ovocitos más grandes en la gónada de color blanco-amarillento orientados en hileras hacia la región posterior.</p> <p>Machos: Muestran un abultamiento de la región abdominal. Los testículos de color blanco están desarrollados hasta los márgenes laterales del poro genital.</p>
Madurez Máxima	<p>Hembras: Presentan un abdomen distendido y poro genital muy dilatado; los huevos son muy transparente y se encuentran sueltos en la cavidad abdominal y pueden ser liberados mediante un suave masaje abdominal.</p> <p>Machos: Presentan abdomen y testículos muy abultados, el semen sale fácilmente mediante leve presión en la región abdominal y se caracteriza por ser blanco y bien fluido.</p>
Reabsorción	<p>Hembras: Abdomen poco desarrollado y mas delgado en la región del poro genital. La pared abdominal regularmente pierde su transparencia, observándose porciones heterogéneas en forma, textura y color.</p> <p>Machos: Estado de difícil identificación ya que a pesar de observarse por transparencia una gónada bien desarrollada y color blanco, no se produce liberación de gametos maduros.</p>

Tabla. 4. Escala de evaluación de movilidad espermática según Sánchez-Rodríguez & Billard (1967).

VALOR	TIPO DE MOVILIDAD
5	Todos los espermatozoides se desplazan vigorosamente y es imposible fijar la vista en uno de ellos.
4	La mayoría de los espermatozoides se desplaza rápido, algunos lo hacen lento.
3	Los espermatozoides presentan 3 comportamientos: <ul style="list-style-type: none">• Algunos se desplazan vigorosamente.• Algunos se desplazan lentamente.• Algunos están inmóviles.
2	Pocos espermatozoides se desplazan rápidamente, muchos lo hacen lentamente la mayoría está inmóvil.
1	Algunos espermatozoides se agitan ligeramente, la mayoría está inmóvil.
0	Ningún espermatozoide se mueve

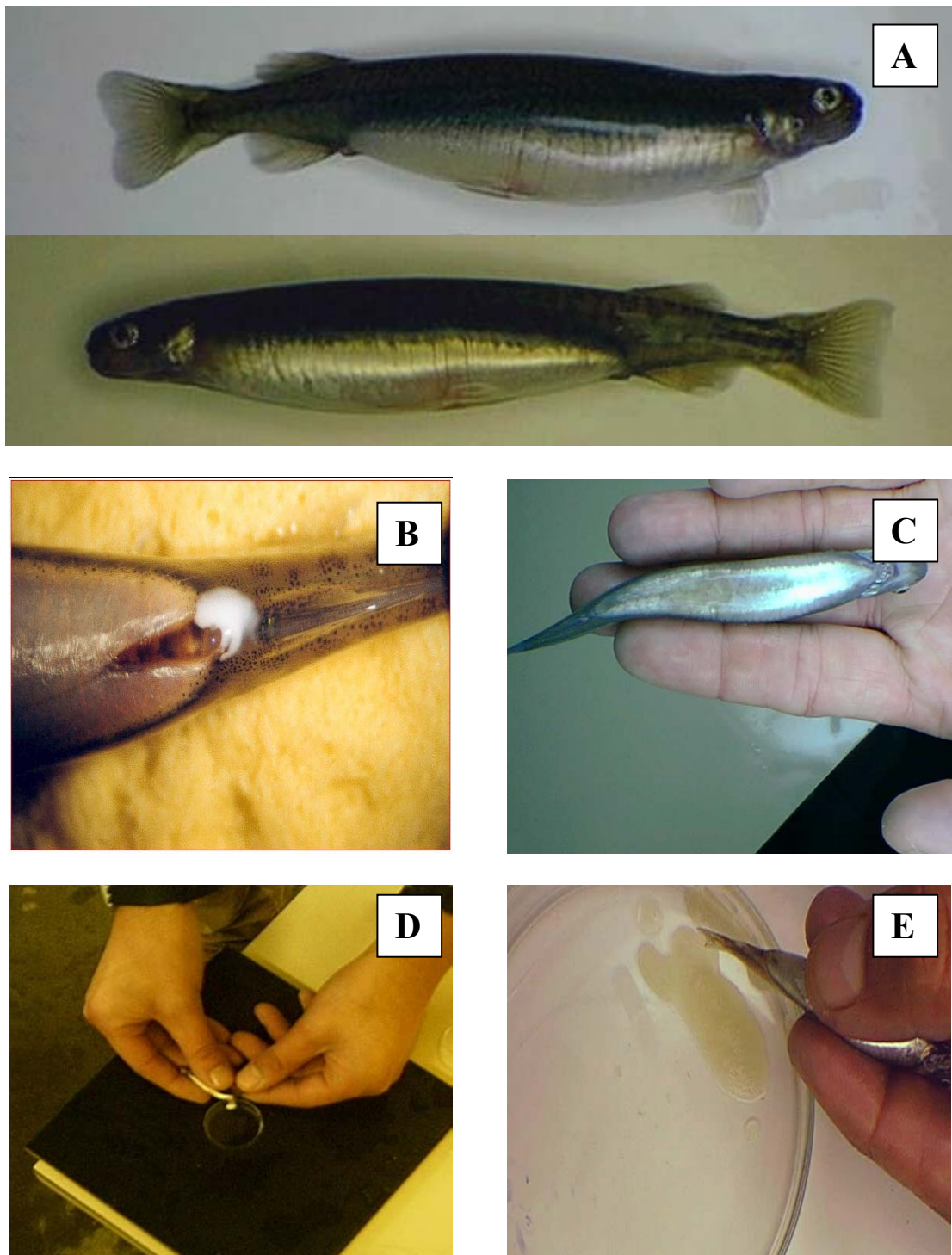


Figura 1. A: Individuos adultos de *G. maculatus*, hembra (superior) y macho (inferior). B: Se observa un macho en maduración máxima. C: Se observa una hembra en maduración máxima. D: Extracción de semen de un macho de puye. E: Desove manual de una hembra de puye.

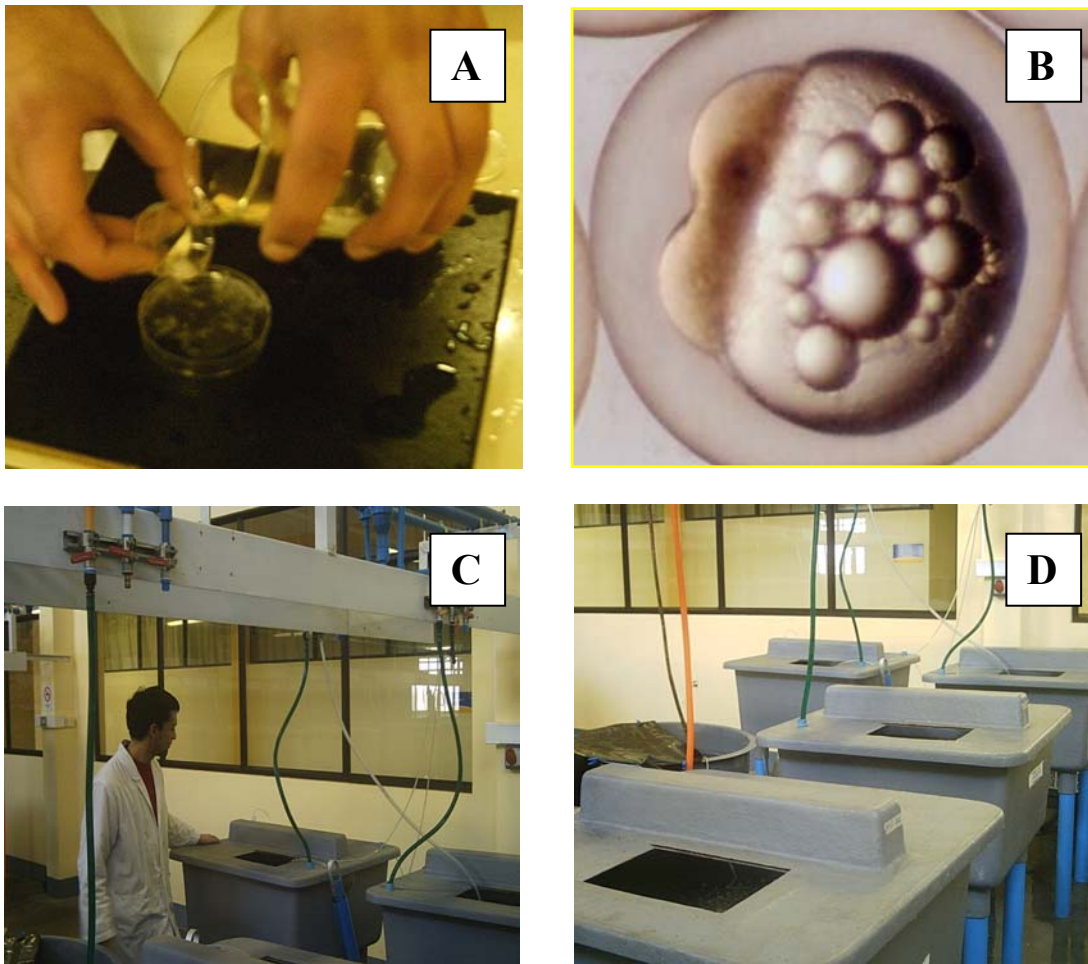


Figura 2. A: Proceso de fertilización húmeda de gametos de puye. B: Microfotografía de ova recién fertilizada en proceso de segmentación. C y D: sistema de cultivo y mantención de reproductores de puye en “hatchery”.

5. RESULTADOS

5.1. Determinación de la densidad espermática

La densidad espermática promedio del semen de puye (*G. maculatus*) utilizada en todos los experimentos de esta investigación arrojó una cifra de $56,20 \pm 5,58 \times 10^9$ espermatozoides ml^{-1} . El número de espermatozoides por ova utilizado en los experimentos de fertilidad fue de $1,12 \pm 0,12 \times 10^6$.

5.2. Efecto del pH y temperatura en la fertilidad.

El mayor porcentaje de fertilidad promedio se observó en el control (pH 7) a una temperatura de 10°C con $80,00 \pm 7,45 \%$, como se observa en la tabla 5 y figura 3.

Tabla 5. Porcentajes de fertilidad ($X \pm D. E.$) de ovas de puye (*G. maculatus*) fertilizadas con soluciones de diferentes pH y temperatura ($n = 6$). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Tratamientos	Temperatura		
	5°C	10°C	15°C
pH 5 (%)	$56,01 \pm 29,46^{be}$	$78,33 \pm 15,20^{ac}$	$71,00 \pm 11,64^{ab}$
pH 7 (%)	$56,22 \pm 27,43^{be}$	$80,00 \pm 7,45^c$	$69,67 \pm 12,86^{abe}$
pH 9 (%)	$60,00 \pm 26,31^{abe}$	$68,67 \pm 19,66^{bc}$	$46,67 \pm 27,03^e$

Los resultados de estos experimentos muestran que para el caso de las fertilizaciones realizadas con soluciones de diferente pH, no existieron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) en el porcentaje de fertilidad promedio del control (pH 7) versus los tratamientos en las distintas temperaturas. Sin embargo, al comparar los tratamientos (pH 5 y pH 9) a 15°C, sí existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los porcentajes de fertilidad promedio.

Al comparar el mayor porcentaje de fertilidad ($80,00 \pm 7,45$ con pH 7 a 10°C) con los porcentajes de fertilidad restantes de todo el experimento, muestran diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) con los porcentajes de fertilidad de todos los grupos experimentales a temperatura de 5°C y 15°C.

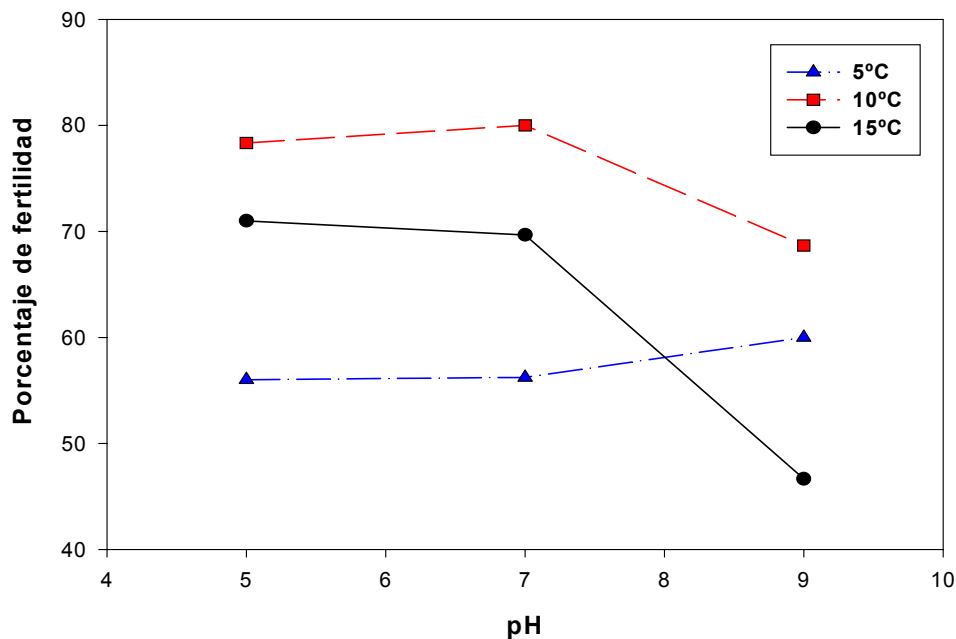


Figura 3. Porcentajes de fertilidad (X) de ovas de puye (*G. maculatus*) fertilizadas con soluciones de diferentes valores de pH y temperatura (n = 6).

5.3. Efecto de la osmolaridad y temperatura en la fertilidad.

El mayor porcentaje de fertilidad promedio se observó en el control (0 mOsmol Kg⁻¹) a una temperatura de 10°C con un 71,00 ± 25,35 % de las ovas fertilizadas, como se observa en la tabla 6 y figura 4.

Tabla 6. Porcentajes de fertilidad (X ± D. E.) de ovas de puye (*G. maculatus*) fertilizadas con soluciones de diferente osmolaridad y temperatura (n = 6). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (p < 0,05).

Tratamientos (mOsmol Kg ⁻¹)	Temperatura		
	5°C	10°C	15°C
0	55,56 ± 37,43 ^{ghi}	71,00 ± 25,35 ^{ai}	40,67 ± 36,17 ^{fgi}
147,5	28,44 ± 25,53 ^{bef}	37,00 ± 9,19 ^{b^h}	32,00 ± 16,15 ^{fh}
294,0	7,01 ± 8,84 ^c	7,00 ± 6,42 ^{ce}	11,33 ± 8,36 ^{ej}
456,5	0,00 ± 0 ^d	0,00 ± 0 ^d	0,00 ± 0 ^d

Los resultados de estos experimentos muestran que al comparar el porcentaje de fertilidad promedio del grupo control (0 mOsmol Kg⁻¹) con sus respectivos tratamientos a una temperatura de 5°C y 10°C, existen diferencias estadísticamente significativas (p < 0,05) en todos los casos.

Sin embargo, a 15°C, al comparar el porcentaje de fertilidad promedio del grupo control (0 mOsmol Kg⁻¹) versus los tratamientos de 294,0 y 147,5 mOsmol Kg⁻¹, no

existen diferencias significativas ($p > 0,05$). Solamente existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre el control y el tratamiento a 456,5 mOsmol Kg⁻¹.

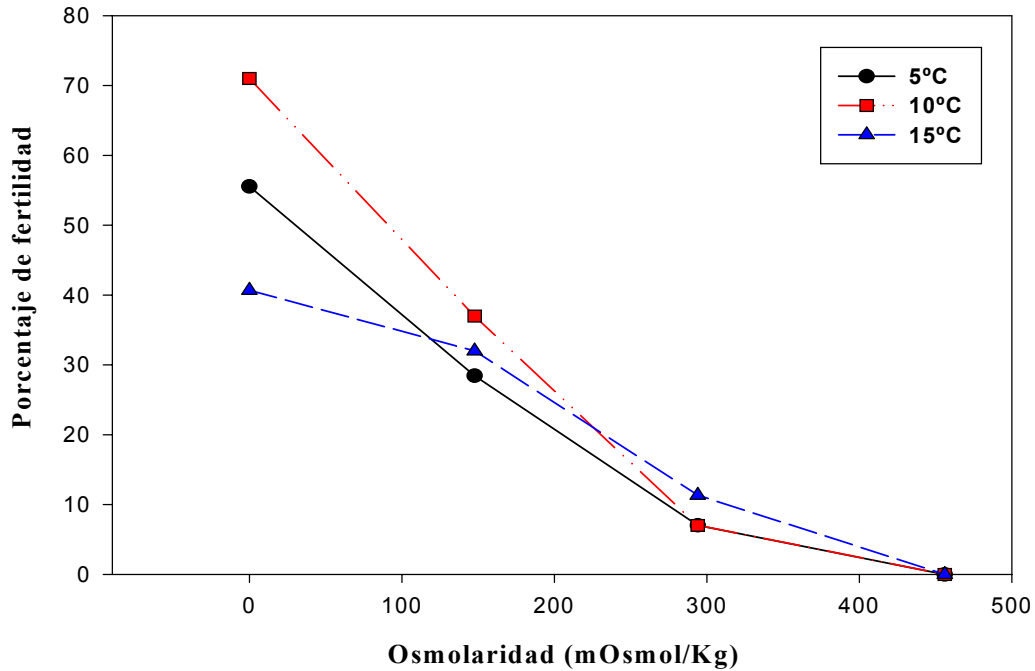


Figura 4. Porcentajes de fertilidad (X) de ovas de puye (*G. maculatus*) fertilizadas con soluciones de diferentes osmolaridad y temperatura (n = 6).

Al comparar los porcentajes de fertilidad promedio de cada tratamiento entre sí (147,5; 294,0 y 456,5 mOsmol Kg⁻¹) en las tres temperaturas de activación (5°C, 10°C y 15°C) no existieron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los porcentajes de fertilidad de los tratamientos. Sólo se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en el control (0 mOsmol Kg⁻¹) entre las temperaturas de 10°C y 15°C (figura 4).

5.4. Evaluación de la movilidad espermática de puye bajo distintas soluciones de pH a tres temperaturas de activación.

Los resultados obtenidos en estos experimentos mostraron que la mayor movilidad de los espermatozoides (60 s) se registró a las temperaturas de 5°C con pH 5 y 10°C con pH 7 (tablas 7 y 8). Los experimentos bajo las tres temperaturas de activación no mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en la movilidad espermática entre el control (pH 7) y los tratamientos. Aunque no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales, al observar las tablas 7, 8 y 9 se aprecia que el control (pH 7) alcanza el nivel 1 de movilidad en un periodo mayor de tiempo (sobre los 20 s) post activación en comparación con los tratamientos (pH 5 y pH 9) bajo las tres temperaturas de activación.

Tabla 7. Niveles de movilidad (moda) del espermatozoide de puye (*G. maculatus*) a 5°C en tres distintos valores de pH (N = 15).

Tiempo(s)	Tratamientos (5°C)		
	pH 5 (n)	pH 7 (n)	pH 9 (n)
0	5 (12)	5 (14)	5 (13)
5	5 (8)	5 (8)	4 (7)
10	4 (7)	4 (6)	3 (5)
15	2 (7)	3 (6)	1 (7)
20	1 (9)	3 (10)	1 (11)
25	1 (12)	1 (12)	1 (12)
30	1 (13)	1 (11)	1 (11)
35	1 (13)	1 (10)	1 (8)
40	1 (10)	1 (9)	0 (9)
45	1 (10)	1 (9)	0 (11)
50	1 (9)	1 (9)	0 (13)
55	1 (9)	0 (8)	0 (13)
60	0 (8)	0 (8)	0 (13)

En la figura 5 y tabla 7 se observa que a los 20 segundos, los espermatozoides activados con una solución con pH 7 a 5°C, mantienen un nivel de movilidad de 3.

En cambio, con pH 5 y 9 la actividad flagelar ya ha bajado a nivel 1.

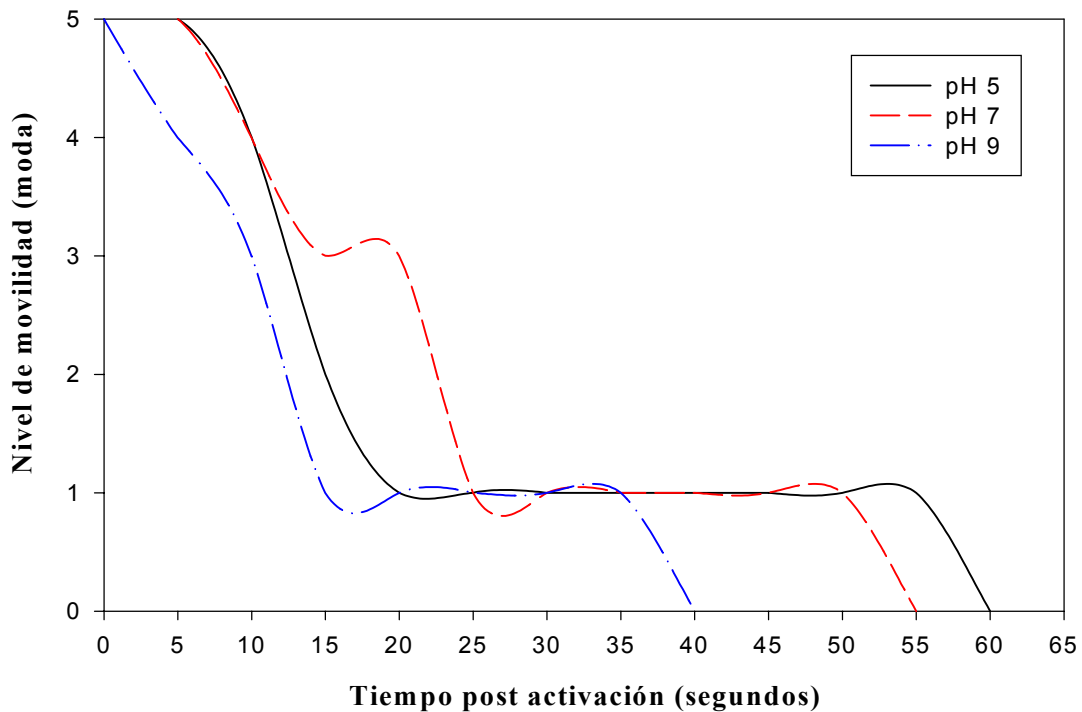


Figura 5. Niveles de movilidad (moda) del espermatozoide de puye (*G. maculatus*) a 5°C en tres distintos valores de pH (n = 15).

De igual forma, a 10 y 15°C los espermatozoides activados a pH 7, mantienen una actividad flagelar más intensa por mayor tiempo, nivel 2 a los 20 segundos y nivel 3 a los 15 segundos, respectivamente. (Tablas 8 y 9; Figuras 6 y 7).

Tabla 8. Niveles de movilidad (moda) del espermatozoide de puye (*G. maculatus*) a 10°C en tres distintos valores de pH (N = 15).

Tiempo(s)	Tratamientos (10°C)		
	pH 5 (n)	pH 7 (n)	pH 9 (n)
0	5 (10)	4 (7)	4 (8)
5	5 (7)	4 (9)	4 (7)
10	4 (6)	3 (9)	3 (10)
15	3 (6)	3 (6)	2 (8)
20	1 (6)	2 (9)	1 (9)
25	1 (9)	1 (12)	1 (13)
30	1 (11)	1 (15)	1 (14)
35	1 (11)	1 (15)	1 (12)
40	1 (10)	1 (13)	1 (10)
45	1 (8)	1 (10)	1 (8)
50	0 (9)	1 (9)	0 (10)
55	0 (9)	1 (9)	0 (10)
60	0 (10)	0 (10)	0 (13)

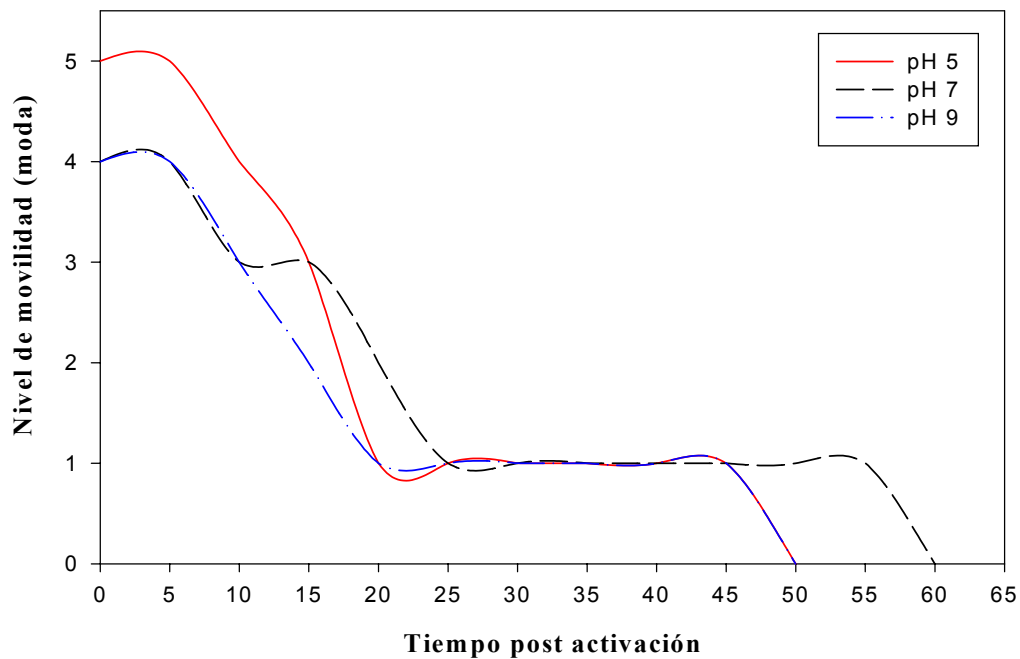


Figura 6. Niveles de movilidad (moda) del espermatozoide de puye (*G. maculatus*) a 10°C en tres distintos valores de pH (n = 15).

Tabla 9. Niveles de movilidad (moda) del espermatozoide de puye (*G. maculatus*) a 15°C en tres distintos valores de pH (N = 15).

Tiempo(s)	Tratamientos (15°C)		
	pH 5 (n)	pH 7 (n)	pH 9 (n)
0	5 (8)	5 (10)	5 (8)
5	5 (7)	5 (6)	5 (7)
10	1 (6)	4 (6)	1 (7)
15	1 (8)	3 (9)	1 (6)
20	1 (7)	1 (6)	1 (7)
25	1 (7)	1 (11)	1 (10)
30	1 (9)	1 (12)	1 (11)
35	1 (10)	1 (12)	1 (8)
40	1 (9)	1 (9)	0 (9)
45	0 (8)	0 (9)	0 (10)

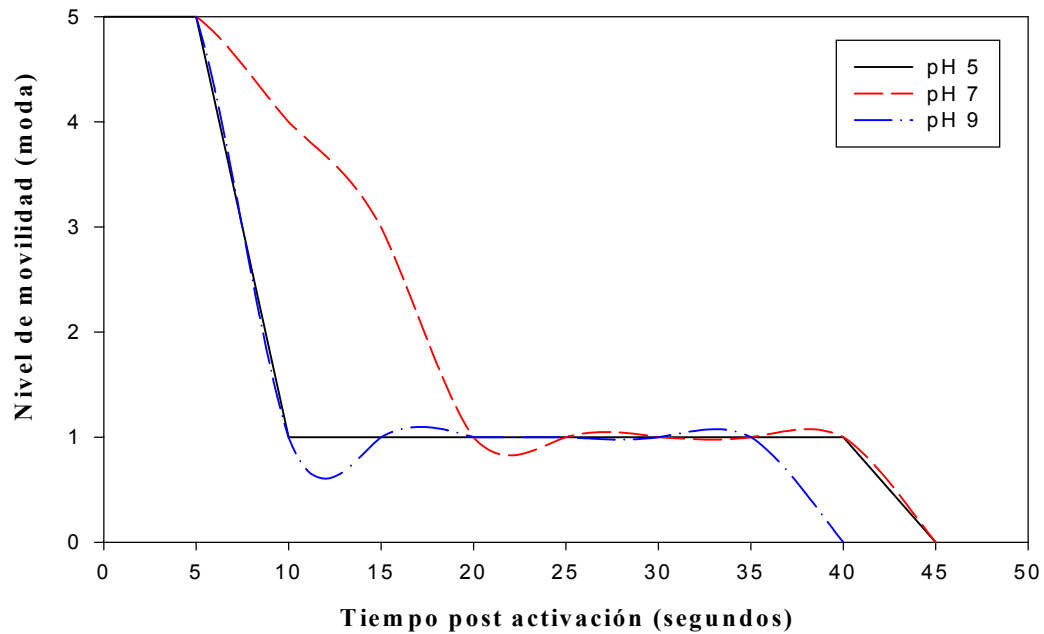


Figura 7. Niveles de movilidad (moda) del espermatozoide de puye (*G. maculatus*) a 15°C en tres distintos valores de pH (n = 15).

5.5. Evaluación de la movilidad espermática de puye bajo distintas soluciones de osmolaridad a tres temperaturas de activación.

Los resultados obtenidos en estos experimentos muestran que el mayor tiempo de movilidad experimentado por los espermatozoides se obtuvo a una temperatura de 10°C con la solución activadora a 147,5 mOsmol Kg⁻¹ con 110 segundos. Al observar la movilidad espermática del puye en 5°C, no mostró diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre el grupo control (0 mOsmol Kg⁻¹) y los tratamientos. Por el contrario, se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) en la movilidad espermática del puye a 10°C entre el control (0 mOsmol Kg⁻¹) y todos los tratamientos, como se observa en las tablas 10 y 11.

Tabla 10. Niveles de movilidad (moda) del espermatozoide de puye (*G. maculatus*) a 5°C en tres distintas osmolaridades (N = 15).

Tiempo (s)	Tratamientos (5°C)			
	0 mOsm/kg (n)	147,5 mOsm/Kg (n)	294,0 mOsm/Kg (n)	456,5 mOsm/kg (n)
0	4 (7)	5 (8)	3 (7)	2 (8)
5	3 (6)	2 (5)	1 (6)	1 (9)
10	2 (8)	1 (8)	1 (7)	1 (9)
15	1 (8)	1 (13)	1 (9)	1 (7)
20	1 (13)	1 (12)	1 (9)	1 (8)
25	1 (14)	1 (12)	0 (10)	0 (8)
30	1 (14)	1 (10)	0 (11)	0 (8)
35	1 (8)	1 (7)	0 (11)	0 (11)
40	1 (8)	0 (9)	0 (11)	0 (12)
45	0 (10)	0 (10)	0 (13)	0 (12)

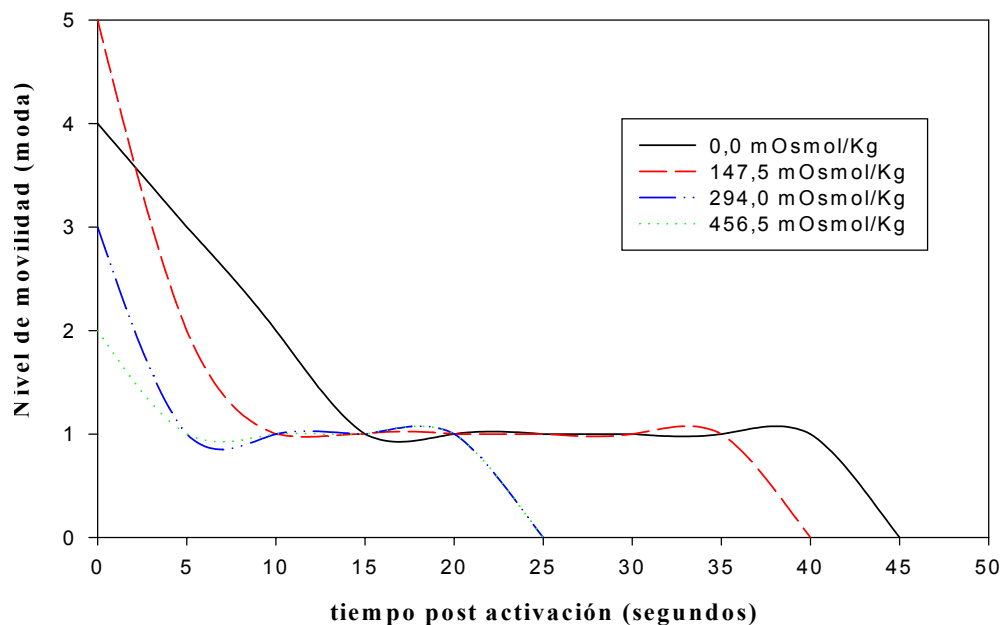


Figura 8. Niveles de movilidad (moda) del espermatozoide de puye (*G. maculatus*) a 5°C en tres distintas osmolaridades (n = 15).

Tabla 11. Niveles de movilidad (moda) del espermatozoide de puye (*G. maculatus*) a 10°C en tres distintas osmolaridades (n = 15).

Tiempo(S)	Tratamientos (10°C)			
	0 mOsm/kg (n)	147,5 mOsm/Kg (n)	294,0 mOsm/Kg (n)	456,5 mOsm/kg (n)
0	5 (8)	5 (13)	4 (5)	4 (6)
5	4 (8)	5 (12)	4 (5)	4 (5)
10	4 (8)	3 (8)	1 (6)	0 (8)
15	3 (9)	3 (8)	1 (9)	0 (9)
20	2 (6)	3 (6)	1 (6)	0 (9)
25	2 (7)	1 (9)	1 (6)	0 (9)
30	2 (7)	1 (12)	0 (8)	0 (9)
35	1 (12)	1 (12)	0 (9)	0 (10)
40	1 (8)	1 (12)	0 (9)	0 (10)
45	0 (9)	1 (11)	0 (10)	0 (10)
...
110	0 (14)	0 (9)	0 (13)	0 (15)

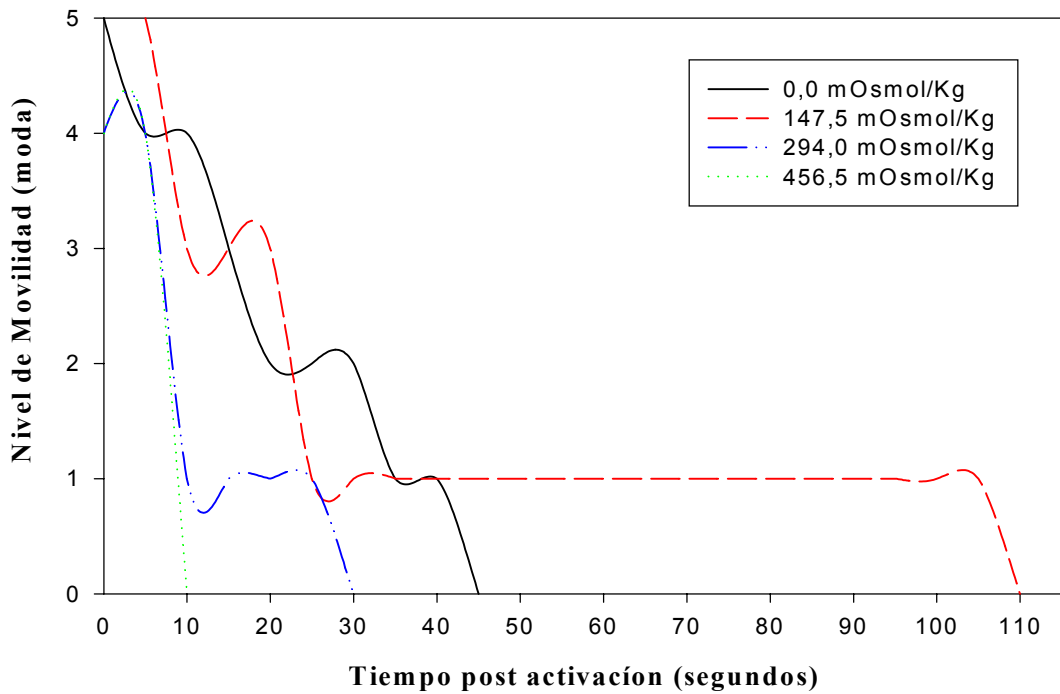


Figura 9. Niveles de movilidad (moda) del espermatozoide de puye (*G. maculatus*) a 10°C en tres distintas osmolaridades (n = 15).

Para 15°C no se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) en la movilidad espermática entre el control (0 mOsmol Kg^{-1}) y los tratamientos a $147,5$ y $294,0 \text{ mOsmol Kg}^{-1}$. Sin embargo, al comparar la movilidad espermática del control versus el tratamiento de $456,5 \text{ mOsmol Kg}^{-1}$ se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$), como se observa en la tabla 10.

Tabla 12. Niveles de movilidad (moda) del espermatozoide de puye (*G. maculatus*) a 15°C en tres distintas osmolaridades (N = 15).

Tiempo (S)	Tratamientos (15°C)			
	0 mOsm/kg (n)	147,5 mOsm/Kg (n)	294,0 mOsm/Kg (n)	456,5 mOsm/kg (n)
0	5 (10)	5 (10)	4 (6)	1 (6)
5	5 (6)	5 (7)	4 (6)	1 (8)
10	3 (7)	3 (5)	1 (6)	1 (9)
15	2 (6)	2 (6)	1 (10)	0 (9)
20	1 (9)	1 (10)	1 (12)	0 (9)
25	1 (10)	1 (10)	1 (12)	0 (10)
30	1 (8)	1 (8)	1 (9)	0 (10)
35	1 (10)	1 (8)	0 (8)	0 (10)
40	1 (9)	1 (8)	0 (8)	0 (11)
45	0 (8)	1 (8)	0 (10)	0 (11)
50	0 (8)	0 (8)	0 (11)	0 (13)

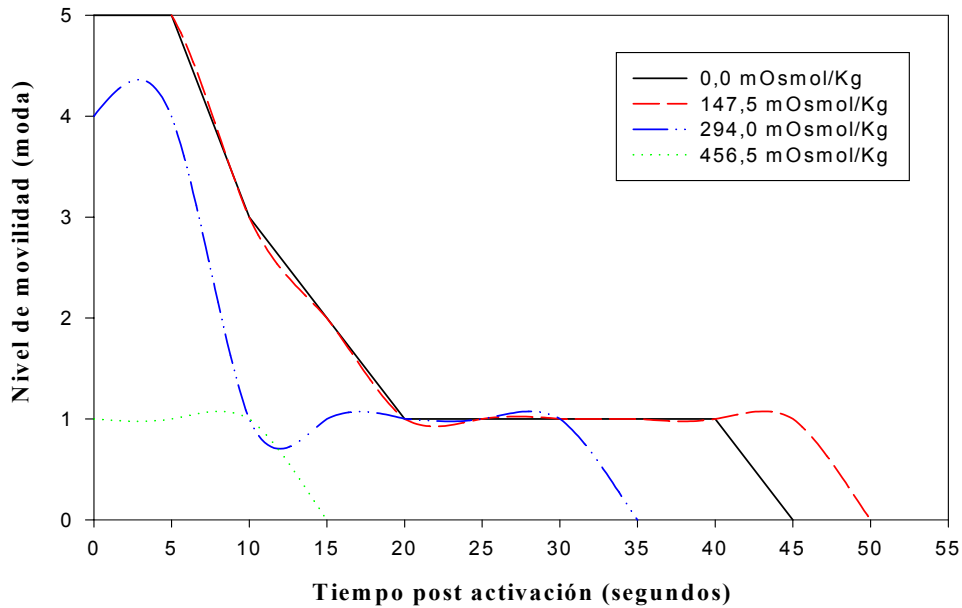


Figura 10. Niveles de movilidad (moda) del espermatozoide de puye (*G. maculatus*) a 15°C en tres distintas osmolaridades (n = 15).

6. DISCUSION.

La densidad espermática del semen de puye (*Galaxias maculatus*) observada en esta investigación fue de $56,20 \pm 5,58 \times 10^9$ espermatozoides ml^{-1} . Esta cifra está dentro del rango determinado por Valdebenito & Vega (2003) que va desde 32,4 a $67,4 \times 10^9$ espermatozoides ml^{-1} .

De igual manera, como lo señalan Fletcher (2000) y Fernández (2001), los valores de densidad espermática del puye son mayores al de otras especies de teleósteos como la carpa (*Ciprinus carpio*) ($25-30 \times 10^9$ espermatozoides ml^{-1}), el salmón ($12-24 \times 10^9$ espermatozoides ml^{-1}) (Estévez, 1991), el “sea bass” (*Dicentrarchus labrax*) ($22-30 \times 10^9$ espermatozoides ml^{-1}) (Dreanno *et al.*, 1999b), la trucha ($10-20 \times 10^9$ espermatozoides ml^{-1}) (Billard, 1988) y el “whitefish” (*Coregonus clupeaformis*) (7×10^9 espermatozoides ml^{-1}) (Billard, 1988; Ciereszko & Dabrowski, 1993).

El número de espermatozoides por ova utilizado para los experimentos de fertilidad de esta investigación fue de $1,12 \pm 0,12 \times 10^6$. Para el puye esta relación no ha sido estandarizada. Billard *et al.* (1974 citado por Fletcher, 2000) sugiere la cantidad mínima de 200.000 espermatozoides por ova en trucha, posteriormente Billard (1975 citado por Billard, 1988) recomienda que el número de espermatozoides necesarios para fertilizar una ova en salmónidos varía entre 10.000 y 300.000, dependiendo de la calidad de los espermatozoides. Este rango también es aplicable en “pike” (*Esox*

lucius). Estas cifras reflejan que el número de espermatozoides por ova utilizado en los experimentos de fertilidad de esta investigación estarían sobre los rangos mínimos de fertilización.

En muchas especies la capacidad oxidativa de la mitocondrias es baja y la energía (ATP) requerida para la movilidad es comúnmente pre-acumulada en el espermatozoide antes de iniciarse la movilidad espermática, reservas que se agotan tempranamente durante la movilidad (Billard & Cosson, 1995). La enzima responsable de este metabolismo espermático es la dineína, principal consumidor de ATP durante el movimiento flagelar (Billard & Cosson, 1990). Fletcher (2000), sugiere que la breve intensidad en la movilidad del espermatozoide es debido a que *G. maculatus* solamente posee una mitocondria (Coronado, 2000), información que fundamenta lo observado en estos experimentos donde la intensidad o vigor del espermatozoide de puye es corta (hasta 20 s aprox.), independiente del tratamiento y la temperatura del diluyente. Lahnsteiner *et al.* (1993), informan que para trucha arco iris un factor limitante en la movilidad espermática es la disminución de ATP, donde la glicólisis no es lo suficientemente rápida para recuperarlo. En trucha arco iris una vez utilizado el contenido de ATP preacumulado, ocurre una reacumulación después de 15 minutos de haberse detenido la movilidad, aunque esto no significa una recuperación de la movilidad (Christen *et al.*, 1987 citado por Billard & Cosson, 1995), Esta situación es diferente en otras especies como el caso del “halibut”, donde el ATP no es pre-acumulado, sino elaborado por la mitocondria mientras el espermatozoide se mantiene en movimiento (Billard & Cosson, 1995).

La temperatura altera el tiempo de la movilidad espermática: bajas temperaturas prolongan la duración de la locomoción, pero reduce la intensidad y velocidad de las células (Billard & Cosson, 1988; Vladic & Järvi, 1997). En puye, esta relación fue corroborada por Fletcher (2000) y Valdebenito (2003) quienes reportaron un mayor tiempo de movilidad a una temperatura de 5°C con 770 segundos, pero con una menor intensidad, señalando una temperatura óptima para la movilidad espermática de puye cercana a 10°C.

Al observar los resultados obtenidos en los experimentos los mayores niveles de movilidad en los gametos de puye se encuentran a 10°C, independiente del tratamiento (figuras 6 y 9), lo que concuerda con los resultados de Fletcher (2000) y Valdebenito (2003).

Los resultados antes mencionados (figuras 6 y 9) están en directa relación con los observados en los experimentos de fertilidad, donde de igual manera los porcentajes mas altos de fertilidad en los gametos de puye se encontraron a una temperatura de 10°C, independiente del grupo experimental al que corresponda (pH y osmolaridad). Estos resultados confirman los obtenidos por Fletcher (2000) y Valdebenito (2003) donde los mayores porcentajes de fertilidad se encuentran en temperaturas cercanas a los 10°C. Esto se contrapone a lo descrito en otras especies como el salmón del Atlántico y en trucha marrón, donde la fertilización ocurre en un rango más amplio

de temperatura (2 a 16°C), no presentando mayores diferencias en el porcentaje de fertilidad promedio (Vladic & Järvi, 1997).

Estos resultados reafirman lo concluido por varios autores (Billard, 1988; Levanduski & Cloud, 1988; Billard & Cosson, 1995; Cosson *et al.*, 1999), quienes reportan que la movilidad de los espermatozoides y la calidad de éstos están en directa relación con la fertilidad.

El pH intra o extra celular de teleósteos marinos y dulceacuícolas es reconocido como un importante regulador de la movilidad espermática (Márian *et al.*, 1997; Cosson *et al.*, 1999). En *G. maculatus*, no existen antecedentes bibliográficos del comportamiento de sus gametos frente al efecto del pH. Solamente existen datos del pH presente en el fluido seminal, Muñoz (2001) señala que éste posee un valor de 7,96.

En la presente investigación, los resultados muestran que los mayores porcentajes de fertilidad se encontraron a pH 7 (10°C) con un $80,00 \pm 7,45$ %, seguido del observado a pH 5 (10°C) con un $78,33 \pm 15,20$ %. Los mayores niveles de intensidad de la movilidad espermática en puye se observaron a pH 7 con temperaturas de 5 y 10°C, ambos llegando al nivel de movilidad “1” a los 25 segundos y alcanzando una duración de 55 y 60 segundos respectivamente (tablas 5, 7 y 8). Es importante señalar que a una temperatura de 5°C y 15°C en todos los tratamientos, la movilidad espermática se inició en nivel “5” (tablas 7 y 9), no así para el caso de los tratamientos a una temperatura de 10°C donde la movilidad espermática se inició en

nivel “4” (tabla 8). Ésto pudo ser provocado debido a que los espermatozoides utilizados en los experimentos a esta temperatura (10°C), permanecieron un mayor tiempo en almacenaje, lo que pudo afectar su calidad para la posterior activación. Fernández (2001) reporta que el almacenamiento afecta negativamente la fertilidad del semen sin diluir del puye, lo cual indica que la movilidad espermática fue afectada.

En general, en esta investigación no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) en la duración de la movilidad espermática en ningún tratamiento de pH, bajo las tres temperaturas de activación, aunque la intensidad es mayor a pH neutro. La fertilidad del semen de puye es mayor en medios relativamente ácidos y neutros a una temperatura de 10°C (tabla 5 y figura 3). Esta tendencia a medios ácidos también se encuentra en “White sucker” (*Catostomus commersoni*) donde la movilidad espermática y los porcentajes de fertilidad son mayores en un rango de pH entre 3 y 7 (Billard, 1988; Cosson *et al.*, 1999). Según Daye & Glebe (1984 citado por Krise *et al.*, 1995) en el salmón del Atlántico los porcentajes de fertilidad no se ven afectados con pH entre 5 y 6,8. Estos resultados no concuerdan con lo descrito para la mayoría de las especies de salmónidos y ciprinidos, donde la mayor fertilidad y movilidad se presenta en medios básicos (alcalinos) cercanos a 9,0.

Billard (1988) señala que para los salmónidos el pH óptimo para la fertilización artificial es 9,0. Billard & Cosson (1989) observaron que para la trucha arco iris la máxima movilidad ocurre a pH 9,0. Morisawa *et al.* (1993) señalan que para el

salmón “chum” el fluido seminal es de pH 7,5 y que el espermatozoide logra su máxima movilidad a valores de pH entre 8,5 y 9,0. En *Parasalmo mykiss*, la mayor movilidad se encuentra a pH 9,0 a una temperatura de 5°C (Billard & Cosson, 1986). En perca el rango óptimo de movilidad fluctúa entre 7 y 8,5. y esta decrece en pH 9 (Lahnsteiner *et al.*, 1995). En general para los salmónidos bajos valores de pH inhiben la movilidad espermática (Ingermann *et al.*, 2002).

Billard (1988), sugiere que en ciprinidos el pH óptimo para la movilidad espermática es sobre 9,0. Además, reporta que este valor es el óptimo para la fertilización. Posteriormente Billard & Cosson (1995) informan que en carpa (*Ciprinus carpio*) el pH óptimo para la fertilización es de 7 a 8.

El pH también es considerado como un importante activador de la movilidad espermática para distintas especies como el “pike” (*Esox lucius*), donde la máxima duración de la movilidad espermática ocurre entre 10 y 13°C a pH 7,9 (Lin & Dabrowsky, 1996). En esturión blanco (*Acipenser transmontanus*) la movilidad espermática es inhibida a bajos pH, mecanismo similar al observado en salmónidos. Esta especie presenta la mayor movilidad espermática a valores de pH entre 7,5 y 8,5 (Ingermann *et al.*, 2002). En “grouper” (*Epinephelus malabaricus*) el pH óptimo para la fertilización artificial se encuentra entre 7,5 y 8,0 (Chao *et al.*, 1992 citado por Billard, 1988), en “mullet” (*Mugil capito*) la mayor movilidad espermática ocurre a pH 7 (Hines & Yashouv, 1971 citado por Cosson *et al.*, 1999), en “sea bass” (*Dicentrarchus labrax*) un pH 9 es el óptimo para la actividad flagelar y esta puede

ocurrir entre pHs de 5 y 10. En “turbot” (*Psetta maxima*) y Halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) la máxima movilidad espermática se observa a pH 9 (Cosson *et al.*, 1999).

Numerosos estudios han enfatizado los efectos de la osmolaridad sobre la movilidad espermática en teleósteos marinos, de agua dulce y especies vivíparas (Cosson *et al.*, 1999; Darszon *et al.*, 1999), ya que el choque osmótico a la estructura celular resulta en una limitación para la duración de la movilidad espermática (Lahnsteiner *et al.*, 1993; Cosson *et al.*, 1999).

Los resultados obtenidos en la presente investigación dejan de manifiesto la influencia de la osmolaridad sobre la fertilidad y movilidad del espermatozoide de *G. maculatus*, donde los mayores porcentajes de fertilidad y niveles de movilidad ocurrieron en las soluciones hipotónicas (menores a 299 mOsmol kg⁻¹).

El mayor porcentaje de fertilidad promedio, a distintas osmolaridades bajo las tres temperaturas de activación, se observó en el tratamiento con una presión osmótica de 0 mOsmol kg⁻¹ a una temperatura de 10°C con un 71,00 ± 25,35 %. Este coincide con el tratamiento que obtuvo el mayor vigor o intensidad en movilidad espermática al llegar a nivel “1” a los 35 segundos. A su vez, al observar el tratamiento que obtuvo la mayor duración de la movilidad espermática, a una osmolaridad de 146,5 mOsmol kg⁻¹ (10°C), sólo obtuvo una fertilidad promedio de 37,00 ± 9,19 % (ver tablas 6 y 11).

De igual forma ocurre con especies de teleósteos dulceacuícolas tales como, la carpa (*Ciprinus carpio*) donde la osmolaridad de su fluido seminal es de 300 mOsmol kg⁻¹ y su movilidad espermática se activa inmediatamente entre 60 y 140 mOsmol kg⁻¹ (Perchec *et al.*, 1997). En “striped bass” (*Morone saxatilis*), la osmolaridad de su fluido seminal es de 350 mOsmol kg⁻¹ y la actividad flagelar se inicia entre 0 y 300 mOsmol kg⁻¹ (He & Woods, 2003). En “muskellunge” (*Esox masquinongy*), solamente se inicia la movilidad espermática cuando se activa con soluciones hipotónicas con respecto al fluido seminal (290 mOsmol kg⁻¹) (Lin & Dabrowski, 1996). La perca (*Perca fluviatilis*) tiene una osmolaridad de 283 mOsmol kg⁻¹ en el fluido seminal y la mayor movilidad espermática se presenta entre 20 y 100 mOsmol kg⁻¹ (Lahnsteiner *et al.*, 1995). En pez gato (*Silurus glanis*), la presión osmótica del fluido seminal es de 280 mOsmols Kg⁻¹ y la activación ocurre si la presión osmótica baja de 70 mOsmol Kg⁻¹ (Billard *et al.*, 1997). El pez dorado (*Carassius auratus*), cuyo fluido seminal presenta una osmolaridad cercana a 300 mOsmol kg⁻¹, presenta su máxima movilidad espermática entre 100 y 200 mOsmol kg⁻¹ (Cosson *et al.*, 1999).

Contrariamente, en especies de teleósteos marinos, la movilidad espermática ocurre bajo soluciones activadoras hipertónicas, tales como; el “sea bass” (*Dicentrarchus labrax*) cuyo fluido seminal presenta una osmolaridad cercana a 300 mOsmol kg⁻¹ y logra iniciar su movilidad espermática hasta con soluciones de 1100 mOsmol kg⁻¹ (Perchec *et al.*, 1997; Dreanno *et al.*, 1999a) y el “puffer marino” (*T. niphobles*)

donde la máxima duración de la movilidad espermática se presenta a 400 mOsmol kg⁻¹ (Takai & Morisawa, 1995; Cosson *et al.*, 1999).

Una revisión bibliográfica realizada por Cosson *et al.* (1999), reporta que la incidencia de medios hipertónicos en la movilidad espermática también ha sido descrita en especies como el “cod” (*Gadus morhua*), lenguados (*Limanda yokohame* y *Kareius bicoloratus*), “sea bream” (*Sparus auratus*), “gray mullet” (*Mugil cephalus*) y “goby” (*Gillichthys mirabilis*).

Goodall *et al.* (1989), reportaron que para el teleósteo estuarino “summer whiting” (*Sillago ciliata*), cuyo fluido seminal presenta una osmolaridad de 300 mOsmol kg⁻¹ y al utilizar un medio hipotónico de 150 mOsmol kg⁻¹ para diluir el semen, no observó actividad flagelar. Sin embargo, al utilizar una solución a 600 mOsmol kg⁻¹ ocurrió la máxima movilidad espermática.

Para el caso de las soluciones activadoras a una osmolaridad de 294,0 (isotónica) y 456,5 (hipertónica) mOsmol kg⁻¹ la movilidad del espermatozoide de puye es prácticamente nula bajo las tres temperaturas, dando como resultado que la fertilidad promedio no supere el 11,33 ± 8,36 % para los tratamientos a 294,0 mOsmol kg⁻¹ y sea de 0,00 ± 0% para el caso a 456,5 mOsmol kg⁻¹.

Resultados similares al de esta investigación obtuvieron Fletcher (2000) y Valdebenito (2003) al evaluar la movilidad y fertilidad del espermatozoide de puye a

distintas concentraciones de salinidad en las soluciones activadoras, Con la obtención de los mayores porcentajes de fertilidad y niveles de movilidad a 0 g/L de salinidad (0 mOsmol kg⁻¹).

Esto sugiere que *G. maculatus* es un pez diadrómico que desova en agua dulce y no en un medio estuarino (catádro marginal) como propone McDowall (1994). De igual manera los resultados obtenidos se contraponen con lo sugerido por Mitchell (1989) que recomienda una salinidad de 6 g/L (126,5 mOsmol kg⁻¹ aprox.) en el medio de fertilización para esta especie, ésto tendría su explicación ya que Mitchell utilizó reproductores diadrómicos silvestres. En cambio, en esta investigación los reproductores utilizados eran especímenes que completaron su ciclo reproductivo en agua dulce.

Es importante señalar que al obtener los mayores niveles de movilidad con 0 mOsmol kg⁻¹ (agua des-ionizada pura), sugiere que para el inicio de la movilidad espermática en puye no es necesaria la adición de ningún ion al medio de activación, como en el caso de los salmónidos donde el ion Ca⁺⁺, juega un rol fundamental en la iniciación de la actividad flagelar (Billard, 1988; Cussac *et al.*, 1988; Billard & Cosson, 1995; Darszon *et al.*, 1999; Cosson *et al.*, 1999; He & Woods, 2003). Esto sugiere que algún o algunos iones que salen desde la célula y al entrar en contacto con el agua, provocan la actividad flagelar, además de la reducción de la osmolaridad.

Los resultados de estos experimentos reafirman y concuerdan con lo descrito por Cosson *et al* (1999) quienes sugieren que al evaluar la movilidad espermática, el vigor es más importante que la duración de ésta. En muchos teleósteos dulceacuícolas el ovocito se activa inmediatamente después de tomar contacto con el agua y la fertilización no ocurre, aunque el espermatozoide se mueva más tiempo, ya que el micropilo está cerrado. Ginzburg (1972) reportó que 3 a 6 segundos eran suficientes para que ocurra la asociación de los gametos en trucha arco iris.

Aunque en esta investigación no se evaluó la interacción entre pH y osmolaridad, Morisawa (1994) reportó que en especies marinas como el lenguado (*Kareius bicoloratus*) y el “puffer fish” (*T. niphobles*) la movilidad espermática fue iniciada en un medio isotónico al aumentar el pH con NH_4Cl o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, por lo que surge la interrogante de cómo se verán afectadas la fertilidad y movilidad espermática de puye (*G. maculatus*) con esta interacción. Nuevas investigaciones son necesarias para determinar los valores reproductivos óptimos para esta especie.

7. CONCLUSIONES.

1. La movilidad y fertilidad del espermatozoide de *G. maculatus* se ve afectada con las variaciones de osmolaridad (0; 147,5; 294,0; 456,5 mOsmols Kg⁻¹). Presentando la mayor movilidad y fertilidad en medios hipotónicos y siendo muy bajas en medios isotónicos e hipertónicos bajo las tres temperaturas de activación (5, 10 y 15°C).
2. La mayor fertilidad promedio para *G. maculatus* se encontró a 0 mOsmols Kg⁻¹ con un 71,00 ± 25,35 % a una temperatura de 10°C. En cambio a una osmolaridad de 456,5 mOsmols Kg⁻¹ bajo las tres temperaturas de activación, la fertilidad promedio fue 0,00 ± 0 %.
3. La mayor duración de la movilidad espermática en *G. maculatus* se presentó a una osmolaridad de 147,5 mOsmol kg⁻¹ con 110 segundos a 10°C. Mientras que la mayor intensidad se observó a una osmolaridad de 0 mOsmol Kg⁻¹ a una temperatura de 10°C. Siendo capaz de iniciar la actividad flagelar en agua des-ionizada.
4. La movilidad espermática y fertilidad de *G. maculatus* se ve afectada con las variaciones de pH (5, 7 y 9), encontrándose las mayores intensidades de la movilidad espermática en medios neutros bajo las tres temperaturas (5, 10 y

15°C), obteniendo los mayores porcentajes de fertilidad promedio en medios neutros y ácidos.

5. los mayores porcentajes de fertilidad promedio en las experiencias con pH se observaron con valores de pH a 5 y 7 a una temperatura de 10°C con $78,33 \pm 15,20$ y $80,00 \pm 7,45$ % respectivamente. Mientras que el porcentaje de fertilidad promedio mas bajo se encontró a a pH 9 a una temperatura de 15°C con $46,67 \pm 27,03$ %

6. No se encontraron diferencias en la duración de la movilidad espermática de puye a distintos pH y temperaturas, pero la intensidad fue mayor a pH 7, bajando a nivel uno después de 20 segundos en las tres temperaturas de activación.

8. BIBLIOGRAFIA.

Arratia, G. 1981. Géneros de peces de aguas continentales de Chile. Museo Nacional de Historia Natural. Publicación Ocasional 34: 3-108.

Barile, J.; Bórquez, A.; Dantagnan, P.; Mardones, A.; Quevedo, J.; Salgado, I., Valdebenito, I. & Vega, R. 2003. Antecedentes para el cultivo del puye *Galaxias maculatus* (Pisces: Galaxiidae). Editorial Graficasur Ltda. Chile. 144pp.

Benzie, V. 1968. Stages in normal development of *Galaxias maculatus attenuatus*. Freshwater Research. 2: 606-627.

Billard, R. 1988. Artificial insemination and gamete management in fish. Marine Behavior Physiology. 14: 3-21.

Billard, R. & Cosson, J. 1995. Sperm physiology and Quality. 1995. In Broodstock Management and egg and larval quality. (Eds.) Bromage, N & Roberts, R. Blackwell Sciences Ltda. Cambridge. 414 pp.

Billard, R. & Cosson, M.P. 1986. Sperm motility in rainbow trout, *Parasalmo mykiss*; effects of pH and temperature. Reproduction in Fish 44: 10-12

Billard, R. & Cosson, M.P. 1989. Measurement of sperm motility in trout and carp. *Aquaculture* 132: 499-503.

Billard, R. & Cosson, M.P. 1990. The energetics of fish sperm motility. In *Controls of sperm motility: biological and clinical aspects*. (Ed.) Gagnon, C. CRS Press. Quebec. 352 pp.

Billard, R.; Linhart, O.; Fierville, F. & Cosson, J. 1997. Motility of european catfish *Silurus glanis* spermatozoa in testes and milt. *Polskie Archiwum Hydrobiologii* 44: 115-122.

Bórquez, A. & Dantagnan, P. 1999. Larvicultura de *Galaxias maculatus* en un sistema intensivo de reproducción. Seminario internacional. Bases para la piscicultura del puye *Galaxias spp.* Universidad católica de Temuco. p 21.

Cieresko, A. & Dabrowski, K. 1993. Estimation of sperm concentration of rainbow trout, whitefish and yellow perch using a spectrophotometric technique. *Aquaculture* 109: 367-373

Cieresko, A. & Dabrowski, K. 2002. Factors affecting motility characteristics and fertilizing ability of sea lamprey spermatozoa. *Transactions of the American Fisheries Society* 131: 193-202.

Campos, H. 1970. *Galaxias maculatus* (Jenyns, 1842) en Chile, con especial referencia a su reproducción. Boletín del Museo Nacional de Historia Natural, Santiago- Chile. 31: 5-20.

Canavos, G. 1994. Probabilidad y estadística: aplicaciones y métodos. Interamericana. Madrid 651pp.

Coronado, J. 2000. Morfología espermática de semen nativo y criopreservado de *Galaxias maculatus* (Salmoniformes:galaxiidae). Tesis de grado para optar al grado de Licenciado en Biología Marina. Universidad Austral de Chile, Valdivia- Chile. 39 pp.

Cosson, J.; Billard, R.; Cibert, C.; Dreanno, C & Suquet, M. 1999. Ionic factors regulating the motility of fish sperm. In The Male Gamete: From Basic Knowledge To Clinical Applications. (Ed.) Cagnon, C. Cache River Press: 161-186.

Cussac, V. & Maggese, M. 1988. Effects of salt solutions on the fertilizing ability and activation of gametes in the catfish, *Rhamdia sapo* (Pisces, pimelodidae). Rev. Brazil. Biological 48: 203-211.

Darszon, A.; Labarca, P.; Takuya, N. & Espinoza, F. 1999. Ion channels in sperm physiology. *Physiological Reviews* 79: 486-502.

Dreanno, C.; Cosson, J.; Suquet, M.; Cibert, C.; Fauvel, C.; Dorange, G. & Billard, R. 1999a. Effects of osmolality, morphology perturbations and intracellular nucleotide content during the movement of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility* 116: 113-125.

Dreanno, C.; Suquet, M.; Fauvel, C.; Le Coz, J.; Dorange, G.; Quemener, L. & Billard, R. 1999b. Effect of the aging process on the quality of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) semen. *Journal of Applied Ichthyology*. 15: 176-180.

Estévez, A. 1991. Reproducción en peces cultivados. Editorial Clave-A Coruña. España. 36 pp.

Fernández, J. 2001. Evaluación de técnicas de almacenamiento de semen en puye (*Galaxias maculatus*) y salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) a bajas temperaturas utilizando distintos medios acuosos para su dilución: su efecto en la fertilidad. Tesis de grado para optar al grado de Licenciado en Cs. de la Acuicultura. Universidad Católica de Temuco, Chile. 69 pp.

Ferriz, R. 1987. Biología del puyen *Galaxias maculatus* (Jenyns) (Teleostei: Galaxiidae) en un embalse norpatagónico. Ciclo de vida, ciclo gonadal y fecundidad. Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales “Bernardino Rivadavia”. Hidrobiología 4 (5): 28-38.

Fletcher, C. 2000. Estudio de los patrones de motilidad y fertilidad del espermatozoide de puye (*Galaxias maculatus*) (Jenyns, 1842) bajo condiciones de cultivo experimental. Tesis de grado para optar al grado de Licenciado en Cs. de la Acuicultura. Universidad Católica de Temuco, Chile. 52 pp.

Ginzburg, A. 1972. Fertilization in fishes and the problem of polyspermy. Academy of Sciences of the URSS. Moscu. 366 pp.

Goodall, J.A.; Blackshaw, A. W. & Capra, M.F. 1989. Factors affecting the activation and duration of motility of the spermatozoa of the summer whiting (*Sillago ciliata*). Aquaculture 77: 243-250.

He, S. & Woods, C. 2003. The effects of osmolality, cryoprotectant and equilibration time on striped bass *Morone saxatilis* sperm motility. Journal of the World Aquaculture Society 34: 255-265.

Ingermann, R.; Holcomb, M.; Robinson, M. & Cloud, J. 2002. Carbon dioxide an pH affect sperm motility of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*). The Journal of Experimental Biology 205: 2885-2890.

Krise, W.; Hendrix, M.; Bonney, W. & Baker-Gordon, S. 1995. Evaluation of sperm-activating solutions in Atlantic salmon *Salmo salar* fertilization Tests. Journal of World Aquaculture Society 20 (4): 384-389.

Lahnsteiner, F.; Patzner, R. & Weismann, T. 1993. Energy of spermatozoa of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Pisces, Teleostei). Reproduction Nutrition Development. 33: 349-360.

Lahnsteiner, F.; Berger, B.; Weismann, T. & Patzner, R. 1995. Fine structure and motility of spermatozoa and composition of the seminal plasma in the perch. Journal of Fish Biology 47: 492-508.

Levanduski, M. & Cloud, J. 1988. Rainbow trout (*Salmo gairdneri*) semen: effect of non-motile sperm on fertility. Aquaculture 75: 171:179.

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

Mardones, A.; Pichara, C. & Salas, X. 1999. Mercado y comercialización del puye y sus símiles (*Galaxias spp*). Seminario internacional, Bases para la piscicultura del puye *Galaxias spp*. Universidad Católica de Temuco. p 10.

Mardones, A. 2003. Pesquera, procesamiento y mercado. En Antecedentes para el cultivo del puye *Galaxias maculatus* (Pisces: Galaxiidae). (Ed.) Barile. Graficasur Ltda. Chile. 144pp.

Márian, T.; Krasznai, Z.; Balkay, L.; Emri, M. & Trón, L. 1997. Role of extra-and intracellular pH in the sperm motility. Hyperosmosis modifies regulation of the Na⁺/H⁺ exchanger. Cytometry 27: 374-382.

McDowall, R. 1968. *Galaxias maculatus* (Jenyns), the New Zealand Whitebait. Fisheries Research Bullentin 2. 59pp.

McDowall, R.; Mitchell, C. & Brothers, E. 1994. Age at migration from the sea of juvenile *Galaxias* in New Zealand (Pisces: Galaxiidae). Bulletin of Marine Science 54: 385-402.

Mitchell, C. 1989. Laboratory culture of *Galaxias maculatus* and potential applications. New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research 23: 325:336.

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

Morisawa, S.; Ishida, K.; Okuno, M. & Morisawa, M. 1993. Roles of pH and cyclic adenosine monophosphate in the acquisition of potential for sperm. Motility during migration from the sea the river in chum salmon. *Molecular Reproduction and Development* 34: 420-426.

Muñoz, A. 2001. Bioensayos preliminares para la criopreservación de semen de puye *Galaxias maculatus* (Jenyns, 1842) (Pisces: Salmoniformes). Tesis de grado para optar al grado de Licenciado en Cs. de la Acuicultura. Universidad Católica de Temuco, Chile. 93 pp.

Ohta, H.; Ikeda, K. & Izawa, T. 1997. Increases in concentrations of potassium and bicarbonate ions promotes acquisition of motility in vitro by japanese eel spermatozoa. *Journal of Experimental Zoology* 277: 171-180.

Oppenheim, I. 1973. Manual para técnicos de laboratorio. Editorial Panamericana. Buenos Aires. 188p.

Perchec, G.; Jeulin, C.; Cosson, J.; Andre, F & Billard, R. 1995. Relationship between sperm ATP content and motility of carp spermatozoa. *Journal of Cell Sciences* 108: 748-753.

Perchee, G.; Gatti, J.; Cosson, J.; Jeulin, C.; Fierville, F. & Billard, R. 1997. Effects of extracellular environment on the osmotic signal transduction involved in activation of motility of carp spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility* 110: 315-327.

Peredo, S. & Sobarzo, C. 1993. Microestructura del ovario y ovogénesis en *Galaxias maculatus* (Jenyns, 1842) (Teleostei: Galaxiidae). *Biología Pesquera* 22: 23-32.

Peredo, S. & Sobarzo, C. 1994. Actividad gonádica estacional de *Galaxias maculatus* (Jenyns, 1842) en el río Cautín. IX Región, Chile. *Boletín de la Sociedad de Biología de Concepción, Chile* 65: 65-70.

Sánchez-Rodríguez, M. & Billard, R. 1967. Conservation de la motilité et du pouvoir fécondant du sperm de truite arc en ciel maintenu á des temperatures voisines de 0°C. *Bulletin Francais de Pisciculture* 265:143-152.

SERNAP. 1997. Anuario estadístico de Pesca 1996. Republica de Chile. Ministerio de Economía, Fomento y Reconstrucción. Chile. 224 pp.

Siegel, S. 1980. Estadística no paramétrica, aplicada a las ciencias de la conducta. Editorial Trillas. México D.F. 281 pp

Takai, H. & Morisawa, M. 1995. Change in intracellular K^+ concentration caused by external osmolality change regulates sperm motility of marine and freshwater teleosts. *Journal of Cell Science* 108: 1175-1181

Valdebenito, I.; Bariles, J.; Vega, R.; Dantagnan, P.; Bórquez, A. & Carreño, E. 1995. Análisis cuantitativo y cualitativo del semen de Puye *Galaxias maculatus* (Jenyns, 1842) (salmoniformes: Galaxiidae). *Biología Pesquera* 24: 17-21

Valdebenito, I. 1999. Manejo reproductivo de *Galaxias maculatus* “Puye”, bajo condiciones de cultivo. Seminario internacional. Bases para la piscicultura del puye *Galaxias spp.* Universidad Católica de Temuco. p 18.

Valdebenito, I. 2003. Estudio de los parámetros reproductivos del puye (*Galaxias maculatus*, Jenyns, 1842) (OSMERIFORMES: GALAXIIDAE) bajo condiciones de cultivo experimental en el sur de Chile. Tesis Doctoral para optar al grado de Doctor en Acuicultura. Universidad de las Palmas de Gran Canaria, España. 192 pp.

Valdebenito, I. & Vega, R. 2003. Reproductores y producción de ovas. En *Antecedentes para el cultivo del puye Galaxias maculatus* (Pisces: Galaxiidae). (Ed.) Barile. Graficasur Ltda. Chile. 144pp

Vega, R., Bariles J.; Borquez A.; Dantagnan, P.; Mardones, A. & Valdebenito, I. 1999. Biología y ecología del puye (*Galaxias maculatus*). Una Revisión. Facultad de

Efecto de la osmolaridad, pH y temperatura, en la movilidad y fertilidad del espermatozoide de puye (*Galaxias maculatus*) (Jenyns, 1842) en condiciones de cultivo experimental.

Acuicultura y CS. Veterinarias, Departamento de Ciencias de la Acuicultura, Universidad Católica de Temuco. Temuco. 19 pp.

Vladic, T. & Järvi, T. 1997. Sperm motility and fertilization time spawn in Atlantic salmon and brown trout: the effect of water temperatura. *Journal of Fish Biology* 50: 1088-1093.