

PRODUCCION DE MONOSEXO DE TRUCHA ARCOIRIS (*Oncorhynchus mykiss*) POR INMERSION E INGESTION DE 17 α -METILTESTOSTERONA¹

Gabriel Dazarola*, Michael Filp*, Humberto Cerisola**,
Gabriel Yany* y Adriana Gamonal**

*Escuela de Ciencias del Mar
Universidad Católica de Valparaíso
Casilla 1020, Valparaíso, Chile

**Instituto de Biología
Universidad Católica de Valparaíso
Avda. Brasil 2950, Valparaíso, Chile

RESUMEN: La madurez sexual tiene un efecto negativo en el crecimiento, la sobrevivencia y en la posterior comercialización de la trucha tamaño porción (12-18 meses).

Estos problemas pueden ser reducidos o eliminados criando poblaciones compuestas únicamente por hembras, las que maduran más tardíamente. Para su obtención, se debe contar con un grupo de neomachos, que son individuos genotípicamente hembras (XX), pero fenotípicamente machos, los que al cruzarse con hembras normales (XX) producirán una generación compuesta solamente por hembras.

El presente trabajo consistió en la reversión de hembras a machos a partir de alevines normales, mediante el suministro de 17 alfa-metiltestosterona en el alimento en concentraciones de 0,5 y 3 mg/Kg, durante 56 y 91 días desde la primera alimentación.

El tratamiento más adecuado resultó aquel que presentó 81% de machos.

Se detectó que los grupos que recibieron los tratamientos hormonales no mostraron diferencias de crecimiento en longitud y peso, ni mayores tasas de mortalidad con relación al grupo control.

ABSTRACT: Sexual maturity exerts a negative effect over growth and survival rates of commercial trouts (12-18 months old), which in turn directly affects their trading potential.

These problems can be reduced and hopefully overcome by breeding only females populations which display a late maturation process. In order to do so, a key requirement is to have a group of genotypically female (XX) newborns, which display a male phenotype. These, when mated with normal females will yield only female offspring.

We present evidence of reversion from females to males starting from normal fish fries after their feeding source was supplemented with 17 α -methyltestosterone at concentrations of 0.5 and 3.0 mg/Kg during 56 and 91 days from the first feeding.

Our best results yielded 81% males. Group that receive hormone treatment did not show significant differences in growth-length, weight, or mortality rates when compared with normal controls.

¹ Trabajo financiado por Proyecto FONDECYT 0678/88.

INTRODUCCION

La crianza de poblaciones de truchas que estén compuestas únicamente por hembras, conduce a mejorar el proceso productivo en las pisciculturas debido a que su maduración sexual es tardía respecto a la de los machos, con el consiguiente ahorro energético y efectos positivos sobre el crecimiento y sobrevivencia de los individuos (YAMAZAKI, 1983).

Un punto de partida para obtener poblaciones de hembras monosexo es la producción de "neomachos", que son individuos genotípicamente hembras (XX), que mediante un tratamiento hormonal apropiado son transformados en machos. Al cruzar estos "neomachos" o hembras masculinizadas con hembras normales (XX), se obtiene una generación compuesta únicamente por hembras, con la ventaja que el tratamiento afecta solamente a los reproductores y no a los peces destinados al consumo.

La producción de una población de neomachos puede lograrse, entre otras técnicas, mediante el cruzamiento de espermatozoides irradiados para eliminar el material genético sin que pierda motilidad, con óvulos normales, sometiendo al huevo a un choque térmico para evitar la expulsión del segundo corpúsculo polar, manteniéndose de esta forma la dotación cromosómica diploide. El resultado de este tratamiento es la obtención de alevines hembras exclusivamente, los cuales al ser tratados con andrógenos resultan en neomachos (CHOURROUT *et al.*, 1987).

Entre los trabajos realizados con trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) se puede citar al de OKADA *et al.*, 1979; SOLAR *et al.*, 1984; JOHNSTONE *et al.*, 1978; y en trucha de arroyo (*Salvelinus fontinalis*) JOHNSTONE *et al.*, 1979. Todos estos estudios fueron ejecutados bajo condiciones de laboratorio; por ello, en este trabajo se compara la eficacia de diferentes tratamientos hormonales en la reversión sexual de hembras a machos de alevines y se determina su efecto sobre la mortalidad y crecimiento en peso y longitud, realizando la experiencia a escala piloto.

MATERIALES Y METODOS

Para la experiencia se contó con 36.000 ovas de trucha arcoiris provenientes de la Piscicultura de Río Blanco, perteneciente a la Universidad Católica de Valparaíso (UCV). En total se instalaron ocho unidades experimentales y una unidad control, cada una con 4 réplicas; con lo cual se obtuvo un conjunto de 36 celdas de experimentación, cada una con 4.000 ovas aproximadamente.

Para la reversión sexual de hembras a machos es necesario el empleo de un andrógeno, el que puede ser de origen natural o sintético. Sin embargo, dado su difundido empleo, fácil obtención, gran estabilidad química y efectividad se optó por la hormona sintética 17alfa-metiltestosterona (YAMAZAKI, 1983).

Las concentraciones de esta hormona fueron elegidas de acuerdo a los resultados obtenidos en experiencias anteriores con la misma especie (JOHNSTONE *et al.*, 1978; OKADA *et al.*, 1979 y 1981; DONALDSON y HUNTER, 1982; SOLAR *et al.*, 1984).

Las ocho unidades experimentales fueron divididas en dos grupos. A cuatro de ellas se les aplicó una inmersión en una solución de 250 μ g/l de 17α metiltestosterona en dos ocasiones con una duración de dos horas: la primera en la etapa de ova con ojo y la segunda en el estado de alevín con saco. A las otras cuatro unidades experimentales no se les aplicó este tratamiento.

A partir de la primera alimentación, todas las unidades experimentales recibieron alimento adicionado con 17α metiltestosterona en concentraciones de 0,5 y 3 mg por kilo de alimento por un lapso de 56 y 91 días (Tabla I).

TABLA I
TRATAMIENTOS DADOS A LOS GRUPOS EXPERIMENTALES

Pileta	inmersión	hormona (mg/kg)	dur. trat. (días)
1	sí	0,5	56
2	sí	3,0	56
3	sí	0,5	91
4	sí	3,0	91
5	no	0,5	56
6	no	3,0	56
7	no	0,5	91
8	no	3,0	91
9	no	no	91

Análisis histológico

A los cinco meses de experimentación, se obtuvo muestras de gónadas de 35 peces por cada réplica para determinar la proporción sexual en cada uno de los 9 grupos en estudio. Las gónadas se fijaron en solución de Bouin, realizándose cortes histológicos de 5 μ m y teñidos con hematoxilina eosina. Los criterios empleados para clasificar los peces de acuerdo al estado histológico de sus gónadas, fueron los siguientes:

- a) Hembra inmadura normal: Ovario con ovocitos previtelogénicos distribuidos uniformemente.
- b) Macho inmaduro normal: Testículo con una alta densidad de cistos con espermatogonias.
- c) Parcialmente estéril: Gónada con tejido formado por elemento no germinativo y con cistos pequeños aislados.
- d) Estéril: Gónada que muestra una ausencia total de tejido germinativo.

Longitud, peso y datos de mortalidad

A objeto de estudiar el crecimiento de los peces en experimentación, se tomaron tres muestras sobre un total de sesenta individuos por tratamiento, para recopilar datos de peso y longitud efectuados a los 91, 126 y 161 días a partir de la primera alimentación.

Para determinar la tasa de mortalidad, semanalmente se contabilizaron los muertos de cada grupo experimental y control.

Métodos de análisis estadístico

Los datos de proporción de sexo se analizaron por medio de un análisis de varianza (ANDEVA) a tres criterios de clasificación, para determinar si hubo diferencias significativas entre los grupos tratados. La longitud y el peso se trataron con un análisis de varianza a tres criterios con un error de muestreo para cada uno de los tres períodos. A las tasas de mortalidad, se les aplicó un análisis de covarianza a tres factores (STELL y TORRIE, 1980). Para comparar los grupos tratados con el grupo control, se procedió a utilizar los modelos de análisis de varianza y de covarianza a un factor. Cuando la hipótesis nula fue rechazada, se procedió a utilizar el test de comparaciones múltiples L.S.D. (Least Significant Difference) para examinar los tratamientos en forma independiente.

RESULTADOS

Proporción sexual

Un total de 35 truchas juveniles de cada grupo fueron muestreadas a la edad de 5 meses.

Se apreció que las gónadas de los grupos tratados eran relativamente más pequeñas que las del grupo control. Este último presentó sólo hembras y machos, mientras que en los grupos tratados se encontró hembras, machos, individuos parcial y totalmente estériles (Tabla II). Además, se observó gónadas de machos con espermatogénesis avanzada (Figura 1a), y en escasos cortes se observó testículos que contenían uno o dos folículos ováricos previtelogénicos (Figura 1b).

En la Tabla II se observa que aquellos grupos que recibieron dosis de 0.5 mg/kg durante 56 y 91 días, con inmersión, fueron los que presentaron el mayor porcentaje de machos, 81 y 80% respectivamente.

Los resultados del análisis de varianza realizado revelan que la concentración hormonal tiene un efecto altamente significativo ($\alpha = 0,7\%$) en la reversión de hembras a machos, no así la inmersión y duración del tratamiento. Si bien las interacciones de primer y segundo orden no fueron significativas, la interacción entre concentración e inmersión fue significativa con $\alpha = 7,1\%$ (Tabla III y IV).

El test de las comparaciones múltiples, indicó que el tratamiento de 0,5 mg/kg durante 56 y 91 días, con inmersión, presentó una diferencia significativa ($\alpha = 5\%$) con el de 3 mg/kg durante 91 días, con inmersión, y altamente significativo ($\alpha = 1\%$) con el grupo tratado con 3 mg/kg durante 56 días, con inmersión y además con el grupo control.

Mortalidad

Para analizar la mortalidad se dividió la experiencia en dos períodos. El primero correspondió desde ovas con ojos hasta la primera alimentación. En este primer



Fig. 1a. Testículo de aspecto normal.
(Pez tratado con inmersión y alimentado
con 0,5 mg MT/kg por 91 días) (x110).

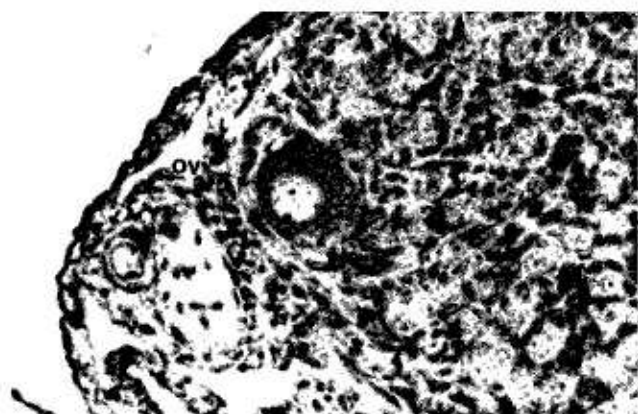


Fig. 1b. Testículo con un ovocito
previtelogénico remanente (OV).
(Pez tratado sin inmersión y alimentación
con 3 mg de 17 α . MT/kg 56 días) (x440).

período se dividieron las ovas en dos grupos, uno que recibió inmersión en hormona y el otro que no la recibió. Los porcentajes de mortalidad resultantes fueron de 5,05% y 4,88% respectivamente, y no presentan diferencias significativas.

El segundo período correspondió desde la primera alimentación hasta el término de la experiencia. En la Tabla V se puede apreciar la mortalidad total observada. Para el grupo control la mortalidad total promedio fue del 22,22%, mientras que los grupos tratados mostraron mortalidades que fluctuaron entre un 32,26% y 44,60%.

En el test de comparaciones múltiples para el segundo período, se observa que todos los grupos tratados con inmersión, excepto el tratado con 0,5 mg/kg durante 56 días, presentaron mortalidades que fueron significativamente mayores con respecto a las observadas en el grupo control (Tabla VI).

Longitud y peso

El análisis de los datos de longitud y peso revela en el primer muestreo, que el grupo control presentó un peso y longitud promedios de 1,64 g y 4,90 cm respectivamente, mientras que los grupos tratados experimentaron variaciones desde 1,12 a 1,61 g y 4,20 a 4,81 cm. En el segundo muestreo, el grupo control presentó en promedio 4,30 g y 6,51 cm, frente a las variaciones de 4,17 a 4,90 g y 6,36 a 6,83 cm de los individuos tratados. Asimismo en el último muestreo, la unidad testigo reveló 5,96 g y 7,57 cm, ante los 5,57 a 7,48 g y 7,67 a 8,12 cm en peso y longitud promedio respectivamente, de las unidades experimentales.

Los análisis de varianza mostraron que en el primer muestreo hubo diferencias altamente significativas para la longitud y el peso; en el segundo y tercer muestreo no hubo diferencias significativas.

El test de comparaciones múltiples, para el primer muestreo de longitudes, muestra que el grupo control tiene promedios significativamente mayores que los grupos tratados, salvo con el grupo alimentado con 0,5 mg/kg durante 56 días, con inmersión y con el grupo alimentado con 3 mg/kg durante 56 días, sin inmersión. Para el peso se observó una situación similar, salvo que tampoco hubo diferencias significativas con el grupo alimentado con 0,5 mg/kg durante 91 días, con inmersión.

DISCUSION

En el estudio de la producción de monosexo mediante la técnica de inmersión e ingestión de 17 alfa-metiltestosterona, se midió la eficacia en conjunto de la dosis, la duración del tratamiento y la inmersión en este andrógeno. En este conjunto de factores se encontró una interacción destacable entre la dosis y la inmersión: a baja dosis de andrógeno (0,5 mg/kg) la eficacia de ésta se ve aumentada al complementarla con inmersión, sucediendo lo contrario con la dosis alta (3 mg/kg). La interacción encontrada podría ser explicada sobre la base que existe una cantidad óptima de andrógeno que produce la mayor reversión sexual, pero sobrepasada esta cantidad, el efecto es negativo (JOHNSTONE *et al.*, 1978; DONALDSON y HUNTER, 1982; OKADA *et al.*, 1981; SOLAR *et al.*, 1984).

Cabe señalar que la dosis aplicada es un factor decisivo, ya que cantidades muy bajas no producen efecto, en cambio si éstas son muy altas producirían esterilidad (JOHNSTONE *et al.*, 1978; OKADA *et al.*, 1981; SOLAR *et al.*, 1984). Es probable que la eficacia de la hormona administrada por vía oral o mediante inmersiones se vea aumentada si se aplica más intensamente en los inicios del período de diferenciación sexual. Este comienza en la trucha arcoiris cuando se ha completado la absorción del saco vitelino (VAN DEN HURK y SLOF, 1981) y dura aproximadamente 48 días (OKADA *et al.*, 1973); pasado este período la hormona al parecer no tendría un efecto sobre la reversión sexual. Estas situaciones explicarían el hecho de no encontrar diferencias entre los tratamientos respecto de su duración, pero sí exista una diferencia atribuible a las diferentes dosis.

En general, el criterio para clasificar a los machos en el presente trabajo fue más severo que el empleado en otros trabajos. Si se aplicara el criterio de otros autores, de incluir a los ejemplares parcial o totalmente estériles entre los machos, se obtendría una reversión completa a machos en 5 de los 8 tratamientos (0,5 mg/kg c/i 56 ds, 0,5 mg/kg c/i 91 ds, 3 mg/kg c/i 51 ds, 3 mg/kg c/i 91 ds, 3 mg s/i 91 ds). Al respecto HUNTER *et al.*, (1983) encontraron que una fracción de peces (salmón chinook) identificados a los 9 meses de edad como estériles, han llegado a ser machos viables, indicando con esto que algún núcleo germinativo no detectado en los cortes histológicos, se desarrolló durante la madurez sexual. Por lo tanto, en este trabajo podría esperarse que los individuos identificados como total o parcialmente estériles, se conviertan en machos viables y por ende, la proporción de éstos aumente cuando se llegue a la madurez sexual.

Con respecto a las mortalidades, no se encontró diferencias entre los individuos tratados con y sin inmersión en andrógeno. Esto mismo fue observado durante el período de la primera alimentación.

Sin embargo, se ha observado que los peces tratados presentan una mayor sensibilidad frente a condiciones adversas, especialmente parecen ser más susceptibles a infecciones bacterianas (JOHNSTONE *et al.*, 1978, 1979).

Pues, se observó que los grupos que poseían una mayor cantidad de individuos total o parcialmente estériles, presentaron una mortalidad más alta en relación al grupo control. Con ello se podría explicar el hecho que el grupo que poseía una mayor proporción de machos y poca cantidad de total y parcialmente estériles (0,5 mg/kg, c/i, 56 ds), no presentaba una mayor mortalidad comparado con el grupo control.

En cuanto al crecimiento en longitud y peso, al realizarse el segundo y tercer muestreo, los promedios de los grupos tratados no presentaron diferencias con respecto al grupo control, situación similar a la señalada por SOLAR *et al.*, (1984).

TABLA II

Porcentaje promedio de machos (M), hembras (H), estériles (E), y parcialmente estériles (PE) de los grupos tratados y del control

Tratamiento	M	H	E	PE
Control	47,94	52,07	0,00	0,00
0.5mg s/i 56d	77,08	5,72	10,76	6,45
0.5mg s/i 91d	65,32	4,37	28,23	2,04
0.5mg c/i 56d	81,55	0,72	6,31	11,43
0.5mg c/i 91d	80,00	0,72	9,29	10,00
3.0mg s/i 56d	68,20	9,19	15,63	6,98
3.0mg s/i 91d	61,79	0,72	28,12	9,38
3.0mg c/i 56d	50,74	0,72	35,72	12,86
3.0mg c/i 91d	54,54	0,00	36,87	8,59

s/i : sin inmersión.
 c/i : con inmersión.
 d : días.

TABLA III

Análisis de varianza a tres criterios para la proporción sexual de machos

Fuente de variación	suma de cuadrados	g.l.	cuadrados medios	F	Sig. de F
Concentración	0.236	1	0.236	8.779 **	0.007
Inmersión	0.002	1	0.002	0.058	0.812
Duración	0.013	1	0.013	0.470	0.500
C*I	0.096	1	0.096	3.582	0.071
C*D	0.006	1	0.006	0.214	0.648
I*D	0.021	1	0.021	0.777	0.387
C*I*D	0.000	1	0.000	0.000	1.000
Error	0.645	24	0.027		

** : 0.01 diferencia altamente significativa

TABLA IV

Análisis de varianza a un criterio
para la proporción sexual de machos**

Fuente de variación	suma de cuadrados	g.l.	cuadrados medios	F	Sig. de F
Tratamiento	0.508	8	0.063	2.622 *	0.029
Error	0.654	27	0.024		

* : 0.05 diferencia significativa

** : En este análisis se incluyó el grupo control.

TABLA V

Porcentaje total de la mortalidad desde la primera
alimentación hasta fin de la experiencia

Tratam./réplica	Réplica				prom.
	I	II	III	IV	
Control	20.73	25.55	19.53	23.06	22.22
0.5mg s/i 56d	33.61	38.41	28.60	28.43	32.26
0.5mg s/i 91d	39.86	56.92	48.28	31.80	44.22
0.5mg c/i 56d	36.64	48.12	35.43	36.40	39.15
0.5mg c/i 91d	48.29	54.25	37.44	30.33	42.58
3.0mg s/i 56d	36.57	47.88	43.59	24.63	38.17
3.0mg s/i 91d	58.20	57.76	39.82	22.59	44.60
3.0mg c/i 56d	50.77	49.49	38.49	33.12	42.97
0.3mg c/i 91d	48.90	36.76	46.43	33.37	41.37

s/i : sin inmersión

c/i : con inmersión

TABLA VI

Test de comparaciones múltiples (L.S.D.) para los log
naturales de las tasas de sobrevivencia

.5 = 0.5 mg/kg 3 = 3 mg/kg 56 = 56 días 91 = 91 días
s = sin inmersión c = con inmersión

	.5s56	.5s91	.5c56	.5c91	3s56	3s91	3c56	3c91
.5s56								
.5s91	.0022							
.5c56	.0040	.0062						
.5c91	.0015	.0037	.0025					
3s56	.0006	.0016	.0046	.0021				
3s91	.0076	.0054	.0116	.0091	.0070			
3c56	.0022	.0044	.0018	.0007	.0028	.0098		
3c91	.0002	.0002	.0060	.0035	.0014	.0056	.0042	
Cont.	.0072	.0094	.0032	.0057	.0078	.0148	.0050	.0092

Región crítica, grupos tratados: = 0.0039 y 0.0056

Región crítica, grupo control: = 0.0043 y 0.0062

Con $\alpha = 0,05$ y $\alpha = 0,01$ respectivamente.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- CHOURROUT, D., B. CHEVASSUS y R. GUYOMARD. 1987. La mejora genética de los peces. *Mundo Científico* 63:1078-1088.
- DONALDSON, E.M., and G.A. HUNTER. 1982. Sex control in fish with particular reference to salmonids. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 39:99-110.
- HUNTER, G., E. DONALDSON, J. STOSS and I. BAKER. 1983. Production of monosex female groups of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) by the fertilization of normal ova with sperm from sex-reversed female. *Aquaculture*, 33:355-364.
- JOHNSTONE, R., T.H. SIMPSON and A.F. YOUNGSON. 1978. Sex reversal in salmonid culture. *Aquaculture*, 13:115-134.
- JOHNSTONE, R., T.H. SIMPSON and A.F. WALKER. 1979a. Sex reversal in salmonid culture. Part III. The production and performance of all-female populations of brook trout. *Aquaculture*, 18:241-252.
- OKADA, H. 1973. Studies on sex. Differentiation of salmoidae. I. Effects of estrone on sex differentiation of the rainbow trout (*Salmo gairdnerii irideus*, Gibbons). *Sci. Rep. Hokkaido Fish Hatch.* 28:11-21.

- OKADA, H., H. MATSUMOTO and F. YAMAZAKI. 1979. Funcional Masculinization of genetic females in rainbow trout. *Bull Jpn. Soc. Sci. Fish.* 45:413-419.
- OKADA, H., H. MATSUMOTO and Y. MURAKAMI. 1981. Ratio of induced males from genetical females at various dietary concentrations of methyltestosterone. *Abstr. Meet. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 33 pp.
- SOLAR, LL, E.M. DONALDSON and G.A. HUNTER. 1984. Optimization of treatment regimes for controlled sex differentiation and sterilization in wild rainbow trout (*Salmo gairdneri*, Richardson) by oral administration of 17 alfa-methyltestosterone. *Aquaculture*, 42:129-139.
- STEEL, R. and J. TORRIE. 1980. Principles and procedures of statistics, a biometrical approach. Mc Graw-Hill, New York, 633 pp.
- VAN DEN HURK, R. and G. SLOF. 1981. A morphological and experimental study of gonadal sex differentiation in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Cell Tissue Res.*, 218:487-497.
- YAMAZAKI, F. 1983. Sex control and manipulation in Fish. *Aquaculture*, 33:329-354.