

Growth of angel fish *Pterophyllum scalare* [Gunther, 1862] juveniles fed inert diets

Crecimiento de juveniles del pez ángel *Pterophyllum scalare* [Gunther, 1862] alimentados con dietas inertes

García-Ulloa, M.* and Gómez-Romero, H. J.

Laboratorio de Ciencias Marinas, Universidad Autónoma de Guadalajara, A. P. 3, Barra de Navidad, Jalisco, C. P. 48987 México. Tel. and fax: + 315 35 55130.

* To whom the correspondence should be addressed.

E-mail: turbotuag@hotmail.com

Abstract

The growth, feed conversion ratio (FCR), survival and stress resistance of angel fish *Pterophyllum scalare* juveniles fed different diets (decapsulated *Artemia* cysts DAC, commercial flakes CF, commercial pellets CP, and a commercial starter diet for tilapia CSDT), were investigated. Diets were studied with three replicates and adjusted at 8% of daily feeding ratio. Fish had an average initial wet weight of 0.44 g. Diets showed a significant effect on fish growth performance from the first sampling day onwards. After 45 culture days, fish fed with the DAC diet showed the highest mean standard length, wet weight and specific growth rate (3.64 ± 0.07 cm, 3.19 ± 0.24 g and 4.36 % body weight/day, respectively), compared with the rest of the treatments. The FCR fluctuated from 1.26 ± 0.01 for the DAC group to 2.01 ± 0.17 for the CP diet, showing significant differences ($P < 0.05$) among treatments. Survival was similar for all diets. Fish fed with the DAC diet displayed higher stress resistance compared with the rest of the treatments. Although DAC seem to improve growth performance of angel fish juveniles, further trials are required to

Resumen

Se investigó el crecimiento, conversión alimenticia (FCR), sobrevivencia y resistencia al estrés de juveniles del pez ángel *Pterophyllum scalare*, alimentados con diferentes dietas inertes (quistes decapsulados de *Artemia* DAC, hojuelas comerciales CF, pelets comerciales CP y una dieta comercial iniciadora para tilapia CSDT). Las dietas fueron estudiadas con tres réplicas y la ración alimenticia fue ajustada al 8% de la biomasa total. Los peces pesaron 0.44 g en promedio, al inicio. Las dietas mostraron un efecto significativo sobre el crecimiento de los peces desde la primera biometría. Después de 45 días de cultivo, los peces alimentados con DAC mostraron los valores promedio más altos en la longitud estándar, peso húmedo y crecimiento específico (3.64 ± 0.07 cm, 3.19 ± 0.24 g y 4.36 % peso corporal/día, respectivamente), comparado con el resto de los tratamientos. El FCR fluctuó desde 1.26 ± 0.01 para el grupo DAC, hasta 2.01 ± 0.17 para la dieta CP, mostrando diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los tratamientos. La sobrevivencia fue similar para todas las dietas. Los peces alimentados con DAC mostraron la

identify other factors (nutritional biology, feeding techniques and strategies) associated with its most economic use.

Key words

Ornamental fish, *Pterophyllum scalare*, nutrition.

mayor resistencia al estrés comparado con el resto de los tratamientos. Aunque la dieta DAC mejoró el crecimiento de los juveniles del pez ángel, se requieren de estudios posteriores para identificar algunos factores (biología nutricional, técnicas y estrategias de alimentación) asociados a su mejor uso económico.

Palabras clave

Pez ornamental, *Pterophyllum scalare*, nutrición.

Introduction

Freshwater ornamental fish trade is a million-dollar industry [Lim and Wong, 1997]. Among the most popular freshwater fish species in the aquarium trade industry, is the angel fish *Pterophyllum scalare* [Gunther, 1862], which is originated from a branch of the Amazonas River [Tapajoz River], at the north of Brazil [Soriano-Salazar and Hernández-Ocampo, 2002]. Due to its body coloration, shape and economical value [Luna-Figueroa, 2003], the angel fish represents one of the most important ornamental cichlid species, but amongst the main constraints to its optimal commercial production, is the lack of knowledge on proper diets for the different life stages [Luna-Figueroa *et al.*, 2000]. *P. scalare* is considered an omnivorous fish since in nature, its feeding is based on the consumption of plankton, larvae of insects and crustaceans, plants and worms [Soriano-Salazar and Hernández-Ocampo, 2002]. In captivity, the common live larval food used for growing of most ornamental fish is limited to macro-zooplankton such as *Moina*, *Daphnia* and *Artemia nauplii* [Lim and Wong, 1997]. Artificial diets, which are normally elaborated with dried live organisms that are processed in different presentations such as flakes, meals or small pellets, are also used. Although it is known that the angel fish accepts artificial diets [Luna-Figueroa *et al.*, 2000], lower growth and survival rates of *P. scalare* are commonly obtained when such diets are used as the sole feed [Luna-Figueroa, 1999], mainly during the fry and juvenile stages [Hofer, 1985].

In general, it is well accepted that fish nutritional requirements vary with some factors such as the relationship between the diet and life stage [Ricker, 1979] and therefore, the dietary content for feeding larvae is different to that needed for repro-



duction or for growth of juveniles. But as a common practice for culturing angel fish, on-growing diets are also used to promote its reproduction [Pérez *et al.*, 2002; Luna-Figueroa, 2003]. Thus, the indiscriminating use of diets for the different live stages of *P. scalare* is normally associated to different biological responses, as pointed out in few nutritional reports [Luna-Figueroa *et al.*, 2000; Soriano-Salazar and Hernández-Ocampo, 2002; Luna-Figueroa, 2003]. Since angel fish is valued by its individual characteristics such as the skin coloration, body shape and size, obtaining of the maximum expression of these phenotype traits by supplying the proper and optimum diet, should be a topic of growing interest and priority to producers. Therefore, the present work evaluates the effect of different commercial diets on growth and survival of *P. scalare* juveniles, under controlled conditions.

Materials and Methods

Juvenile angel fish (250 fish with an average wet weight of 0.30 ± 0.02 g) were obtained from a local supplier (Acuario Arboledas, Guadalajara, Jalisco, México) and transported to the lab in plastic bags filled with oxygen. Fish were acclimated by placing the bags in a 400 l fiber glass container until water temperature was equalized inside the bags at 27 ± 1 C [Axelrod *et al.*, 1997]. The container was supplied with tap water passed through a cartridge filter ($5 \mu\text{m}$ diameter), and gentle aeration was provided by two airstones. Water temperature in the container was kept constant (28°C) by introducing an electrical heater (100 W, Rena Submersible Heater, RH100, Apopka, FL, USA), and photoperiod was adjusted at 12 hours light and 12 hours dark during acclimating time. Fish were divided in four groups and kept in 4 containers for one week feeding them in excess with each experimental diet. Food ration was given three times at day (09:00, 13:00 and 17:00 h). Each day, 50% of the total water volume of the container was exchanged, extracting out feces and food waste by siphoning.

To evaluate the experimental diets, twelve 113 l glass aquaria were used. Each aquarium was provided with a self-filtration bottom system, consisted in a 3/8 inches PVC tubes net perforated at its bottom side with 1/16 inches diameter holes. The tubes net was covered, with a 0.3 cm diameter plastic mesh and then, with an 8 cm layer of small stones (0.5 cm diameter). Dissolved oxygen was maintained by a 3/8 inches PVC airlift standpipe connected to the bottom tubes net. This way, water was forced to flow down through the stones layer where suspended solids (feces and food waste) were retained.

Aquaria were stocked with 15 fish each, randomly selected from the initial group. The initial mean wet weight was 0.44 ± 0.08 g. Four diets were tested with three

replicates: Commercial flakes (CF) with 43% crude protein (wardley total tropical, USA); commercial pellets (CP) with 45% crude protein (azoo, 9 in 1 drawf cichlid pellet, China); decapsulated *Artemia* cysts (DAC) with 54% crude protein (*Artemia* shell-free, inve aquaculture, USA); and a commercial starter diet for tilapia (CSDT) with 40% crude protein (API-ABA, MaltaCleyton de México, S. A de C. V., México, D. F.). The proximal composition of experimental diets is shown in Table 1. Feeding ration was adjusted at 8% of the total biomass/day [García-Ulloa, 2004] and given at same hours than acclimation time. The experimental diets were tested for 45 days.

Table 1. Proximal composition of tested diets (% dry weight) given by the food suppliers.

	DAC	CF
Dry matter	95	91
Crude protein	54	43
Lipid	9	5
Fiber	6	4
Ash	4	—*
Nitrogen-free extract	—	—

DAC = Decapsulated *Artemia* cysts, shell-free inve aquaculture, USA; CF = Commercial flakes, wardley total tropical, USA; CP = Commercial pellets, AZOO, 9 in 1 drawf cichlid pellet, China; CSDT = Commercial starter diet for tilapia, API-ABA, MaltaCleyton de México.

* Information not given by the producer.

All fish from each replicate were individually measured and weighted at the beginning and every two weeks until the end of the experiment. Wet weight (g) and standard length (cm) were determined at each sampling day, with an electronic balance (Navigator, Scout, 100 g x 0.1 g, Apopka, FL, USA) and a domestic scale, respectively. Prior of weighing, fish were placed on absorbent paper to remove excess of water. The total weight gain (TWG) was calculated as final fish weight-initial fish weight. The daily growth rate (DGR) was calculated as $DGR = TWG / \text{culture days}$. The specific

growth rate (SGR, % body weight/d) was calculated as $SGR = 100 (\ln W_f - \ln W_i) / t$, where W_f = mean weight at the end of sampling, W_i = mean weight at the beginning of the sampling, and t = time in days of the sampling period [Ricker, 1979]. The feed conversion ratio (FCR) was calculated as $FCR = \text{total weight of dry feed given} / \text{TWG}$. Survival was obtained by counting total animals per diet at the end of the experiment. All data were tested for normal distribution and homogeneity of variance before ANOVA was performed (Sokal and Rohlf, 1969). An analysis of covariance was used with initial wet weights as covariate to detect possible differences among the diets at the beginning of the experiment [Johnson, 1976].

The percentages of fish survival values were arcsine transformed to make the variance independent of the mean [Reyes, 1982]. Figures present untransformed data of mean percentage \pm standard deviation. A stress test was used to evaluate the stress resistance of the angel fish fed with the different diets, according to the procedure described by Lim *et al.* [2000]. The test consisted in the exposition of the fish to osmotic shock in a saline solution, and the cumulative mortality of the fish was monitored at 3-min intervals over a 2-h period. After a previous test to determine the optimal saline solution for the stress test (30 ‰), five fish from each replicate were exposed to the stress salinity concentration to obtain the cumulative mortality per treatment expressed as stress index. ANOVA analysis was performed and differences between means were compared for significance ($\alpha = 0.05$) using the Tukey's multiple range test [Reyes, 1982]. The statistical analyses were performed using Jandel SigmaStat 2.0 statistical software (Jandel Co., USA).

Results

All experimental diets were eagerly consumed by angel fish. Mean body wet weight and standard length were significantly different ($P < 0.05$) among diets from the first sampling day (day 15) onwards (Figure 1). At the end of the experiment, fish fed with the CP diet obtained the lowest mean standard length (2.71 ± 0.01 cm) and weight (1.49 ± 0.15 g), meanwhile the DAC group showed the highest growth values (3.64 ± 0.07 cm and 3.19 ± 0.24 g, for the standard length and wet weight, respectively). Growth responses were significantly different ($P < 0.05$) for TWG, DGR and SGR among the treatments (Table 2).

Angel fish from the DAC diet obtained the highest mean final TWG (2.75 ± 0.24 g), DGR (0.061 ± 0.005 g/d) and SGR ($4.36 \pm 0.17\%$ BW/d). The FCR among the treatments showed differences, and ranged from 1.26 ± 0.10 for the DAC group to 2.01 ± 0.17 for the CP diet. The mean final survival of juvenile angel fish (Table 2), fluctuated from 88.88% for the DAC treatment, to 97.77 % obtained for

the CF diet, after 45 culture days. After two hours of osmotic stress challenge, there were not significant differences ($P > 0.05$) for the cumulative mortality among the dietary groups (Table 2).

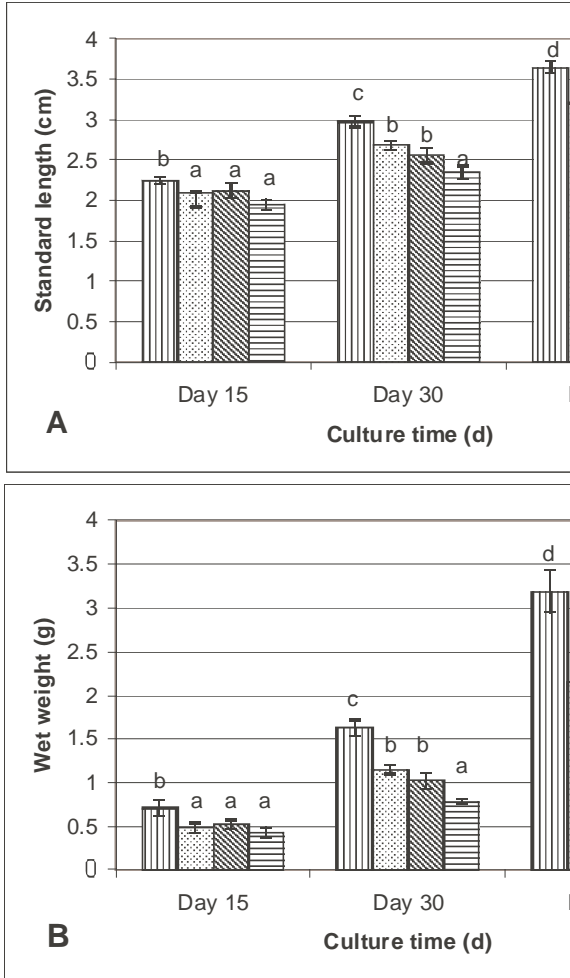
Table 2. Mean final total weight gain (TWG), daily growth rate (DGR), specific growth rate (SGR), food conversion ratio (FCR), survival and cumulative mortality of angel fish juveniles fed with different diets.

	DAC	CF	CP	CSDT
TWG (g)	2.75 (0.24) ^b	1.71 (0.02) ^{ab}	1.71 (0.02) ^{ab}	1.71 (0.02) ^{ab}
DGR (g/d)	0.061 (0.005) ^b	0.037 (0.001) ^{ab}	0.037 (0.001) ^{ab}	0.037 (0.001) ^{ab}
SGR (%BW/d)	4.36 (0.17) ^b	3.50 (0.02) ^{ab}	3.50 (0.02) ^{ab}	3.50 (0.02) ^{ab}
FCR	1.26 (0.01) ^a	1.44 (0.03) ^b	1.44 (0.03) ^b	1.44 (0.03) ^b
Survival (%)	88.88 (6.28)	97.77 (3.14)	97.77 (3.14)	97.77 (3.14)
Cumulative mortality (stress index)	170.00 (1.63) ^a	178.33 (1.69) ^b	178.33 (1.69) ^b	178.33 (1.69) ^b

(DAC = Decapsulated *Artemia* cysts, shell-free invertebrates, USA; CF = Commercial flakes, Wardley total tropical, USA; CP = Commercial pellets, azoo, 9 in 1 drawf cichlid pellet, China; CSDT = Commercial starter diet for tilapia, API-ABA, Malta/Cleyton de México). Values in parenthesis indicate \pm standard deviation. Mean in each line with same superscript are not significantly different ($P > 0.05$).



Figure 1. Mean standard length (A) and wet weight (B) of *Pterophyllum scalare* juveniles (mean \pm standard deviation of three replicates) fed with different diets.



(DAC = Decapsulated *Artemia* cysts, shell-free invertebrate aquaculture, USA; CF = Commercial flakes, Wardley total tropical, USA; CP = Commercial pellets, azoo, 9 in 1 drawf cichlid pellet, China; CSDT = Commercial starter diet for tilapia, API-ABA, MaltaCleyton de México). For each sampling day, different letters at the top of the bars indicate a significant difference ($P < 0.05$) between treatments.

Discussion

For selecting an adequate fish diet, some physical and chemical criteria related to feed intake should be carefully reviewed [Léger *et al.*, 1987]. For the former, the ingestion of food by fish is probably affected by its size and palatability. Size is thereby considered as one of the most important aspect. As food preference is closely related to the match between food and mouth size, the selected food changes with the growth of fish [Verreth, 1994]. In this study, it was observed that despite of the differences in size and presentation, all tested diets were eagerly consumed by fish at the different sampling times registered along the experiment, and consequently, at different growing stages (from 1.65 ± 0.21 mm, to 3.12 ± 0.34 mm of mean initial and final standard lengths, respectively). In the case of the latest, the relationship between digestibility and biochemical composition of diet is considered as a crucial selecting criterion. Due to its high affinity to be metabolized and retained, protein is considered the most important energy component for fish growth [Halver, 1972]. In the case of cultured carnivorous fish, dietary protein requirement usually accounts for 40 to 50% of feed fry matter [NRC, 1993].

Although there is evidence that high protein diets promote good feed utilization and growth in different fish species, mostly in human consumption species [Morais *et al.*, 2001; Ruohonen *et al.*, 2003], information about the protein requirements on angel fish growth rate is scarce. Soriano-Salazar and Hernández-Ocampo [2002], evaluated the use of live food and two inert commercial diets on the growth of *P. scalare*, concluding that live food (*Daphnia pulex*) with the higher protein content, produced better fish growth performance and survival, which coincides with observations made by Luna-Figueroa [2003], who compared two live foods (*D. pulex* and *Culex quinquefasciatus* larvae, with 50.15 and 40.18% crude protein, respectively) and three commercial flakes with different protein levels (45, 43 and 27% crude protein) for on-growing angel fish juveniles. In both cases, there was a direct relationship between the fish growth performance and the dietary protein content. In this experiment, proximal composition of tested diets given by the food suppliers showed comparable protein content (from 40 % for the CSDT group, to 54% for the DAC dietary treatment) with the above mentioned works, but growth of *P. scalare* juveniles did not show a direct relationship with the protein level of the tested diets.

After 45 culture days, angel fish from the DAC group showed the highest TWG and DGR values, and the better FCR compared to the other treatments (Table 2), being similar to those reported by Soriano-Salazar and Hernández-Ocampo [2002] and Luna-Figueroa [2003], feeding *P. scalare* juveniles with live food (*Daphnia pulex* or mosquito larvae) as sole diet. The SGR values obtained for all tested diets in this

experiment fluctuated from 2.67 %BW/d for the CP diet, to 4.36 %BW/d for the DAC group, lower to those reported by Soriano-Salazar and Hernández-Ocampo [2002] and Luna-Figueroa [2003], for the live diets, but similar to the obtained with the inert diets. It has been established that the SGR decreases when the fish size increases [Verreth and Den Bieman, 1987], since fish metabolism is reduced when body size increases. Soriano-Salazar and Hernández-Ocampo [2002] and Luna-Figueroa [2003], used smaller fish at initial stocking (0.1 and 0.058g, respectively) compared to the mean weight at the beginning of the present experiment (0.44 g), which could partially explain the differences in the SGR. For all groups, final survival were above 88.88% (Table 2), similar to the obtained by Luna-Figueroa *et al.* [2000], who fed the angel fish juveniles with *D. pulex*, but higher compared with the values reported with the use of inert diets.

Lim *et al.* [2002] mention that fish resistance to stress can be affected by sub-optimal physiological conditions arising from factors such as infection diseases, poor water quality and nutritional deficiencies, among others. In our study, the higher stress resistance was observed for the fish fed with the DAC diet, suggesting that its nutritional composition covered the physiological requirements at the fish age and salinity concentration evaluated.

Since water parameters (7.2-7.8 pH, $27 \pm 1^\circ\text{C}$ and > 4 mg/L DO) were constants and proper for the angel fish [Axelrod *et al.*, 1997] throughout the experiment, and diets were given at same daily ration and readily consumed by fish, it is suggested that overall results in this study were influenced by the nutritional quality of the tested diets. The nutritional value of one food for a species is related to the degree of correspondence between food biochemical composition and nutritional requirements of that species. This correspondence can change depending on the individual target species, its developmental stage [Walker *et al.*, 1998], or physiological condition, and as a function of the fish growth phase and culture conditions. The better growth results with DAC suggest that its composition is more related to the nutritional requirements of angel fish juveniles, but the gross biochemical composition of the diets tested does not properly explain these results.

Sorgeloos *et al.* [1986] and Vanhaecke *et al.* [1990], mentioned that DAC are suitable as unique food for some fish species at early life stages, because they are able to combine the advantages of live and inert diets, being a more hygienic and highly nutritional feed that can be processed for long-term storage, and compared with the use of live food, direct feeding of DAC would represent a labor saving strategy [Lim *et al.*, 2002]. Besides, Verreth *et al.* [1987], concluded that the differences in physical properties and ingestion of the feed can be eliminated when DAC are used as sole food, which was corroborated in this study since the cyst diet was eagerly consumed by

angel fish juveniles throughout the 45 experimental days. On the other hand, the nutritional value of DAC can be compared with that found for newly-hatched *Artemia*. García-Ortega *et al.* [1998], mentioned that both nauplii larvae and DAC have similar biochemical composition regarding all major nutrients, concluding that there is no difference in feeding *Artemia* cysts or nauplii to fish.

Inferring, DAC seem to improve growth performance of *P. scalare* juveniles, however much research is still required on the fish nutritional biology related to its feeding techniques and strategies using such diet.

Conclusions

The overall results show that the DAC diet improved the angel fish growth performance at the cultured conditions described, nevertheless, much attention should be still paid on its nutrition, as well as economic considerations, in order to optimize the utilization of DAC at commercial level.

Literature

- Axelrod, H. R.; Burgess, W. E.; Pronek, N. and Walls, J. G. 1997. Dr. Axelrod's Atlas of Freshwater Aquarium Fishes. T. F. H. Publications, Inc. New Jersey, USA, 1152 p.
- García-Ortega, A.; Verreth, J. A. J.; Coutteau, P.; Segner, H.; Huisman, E. A. and Sorgeloos, P. 1998. *Biochemical and enzymatic characterization of decapsulated cysts and nauplii of the brine shrimp Artemia at different developmental stages*. Aquaculture. 161:501-514.
- García-Ulloa, M. 2004. *Efecto de la ración alimenticia en el crecimiento de juveniles de tilapia Oreochromis aureus (Steindachner) bajo condiciones experimentales de cultivo*. Avances en Investigación Agropecuaria. 8:55-62.
- Halver, J. E. 1972. Fish Nutrition. Academic Press, Inc. London, UK, 223 p.
- Hofer, R. 1985. *Effects of artificial diets on the digestive process of fish larvae*. Nutrition and Feeding of Fish. In: C. Cowey, A. Mackie and J. Bell, editors. Academic Press, London, UK, pp. 213-216.
- Johnson, R. 1976. Estadística elemental. Editorial Trillas, S. A., México. 284 p.
- Léger, Ph.; Bengston, D. A.; Sorgeloos, P.; Simpson, K. L. and Beck, A. D. 1987. *The nutritional value of Artemia: a review. Artemia research and its applications*. Vol. 3. In: P. Sorgeloos, D. A. Bengston, W. Decleir and E. Jaspers, editors. Universal Press, Wetteren, Belgium. pp. 357-372.
- Lim, L. C. and Wong, C. C. 1997. *Use of the rotifer, Brachionus calyciflorus Pallas, in freshwater ornamental fish larviculture*. Hydrobiología. 358:269-273.
- Lim, L. C.; Wong, C. C.; Koh, C. H.; Dhert, P. and Sorgeloos, P. 2000. *A stress resistance test for quality evaluation of guppy (Poecilia reticulata) (abstract)*. In: Abstract Book of 1st AVA Technical Seminar, 1 September 2000. Agri-Food and Veterinary Authority, Singapore. pp. 4-5.
- Lim, L. C.; Cho, Y. L.; Dhert, P.; Wong, C. C.; Nelis, H. and Sorgeloos, P. 2002. *Use of decapsulated Artemia cysts in ornamental fish culture*. Aquaculture Research. 33:575-589.
- Luna-Figueroa, J. 1999. *Influencia de alimento vivo sobre la reproducción y el crecimiento del pez ángel Pterophyllum scalare (Perciformes: Cichlidae)*. Acta Universitaria. 1:21-29.

- Luna-Figueroa, J. 2003. *Pterophyllum scalare* (Pisces: Cichlidae): Influencia de alimento vivo en la reproducción y el crecimiento. II Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura, CIVA 2003 (<http://www.civa2003.org>), pp.55-65 (20 de julio de 2005).
- Luna-Figueroa, J.; Figueroa-Torres, J. y Hernández de la Rosa, L. P. 2000. Efecto de alimentos con diferente contenido proteico en la reproducción del pez ángel *Pterophyllum scalare* variedad perlada (Pisces: Cichlidae). *Ciencia y Mar*. 4:3-9.
- Morais, S.; Bell, J. G.; Robertson, D. A.; Roy, W. J. and Morris, P. C. 2001. Protein/lipid ratios in extruded diets for Atlantic cod (*Gadus morhua* L.): effects on growth, feed utilization, muscle composition and liver histology. *Aquaculture*. 203:101-119.
- NRC. 1993. Nutrient Requirements of Fish. National Academy Press, Washington, DC, USA, 125 p.
- Pérez, C. E.; Morales, S. I. y Olvera, Q. H. 2002. Frecuencia de desove de diferentes variedades del pez ángel *Pterophyllum scalare* (Pisces: Cichlidae). *AquaTIC2002*. 16:1-7.
- Reyes, C. P. 1982. Bioestadística aplicada. Ed. Trillas, S. A., México. 217 p.
- Ricker, W. E. 1979. Growth rates and models. Fish physiology, Vol. VIII, Bioenergetics and growth. In: W. S. Hoar, D. J. Randall and J. R. Brett, editors. Academic Press, New York, USA. pp. 599-675.
- Ruohonen, K.; Koskela, J.; Vielma, J. and Kettunen, J. 2003. Optimal diet composition for European whitefish (*Coregonus lavaretus*): analysis of growth and nutrient utilization in mixture model trials. *Aquaculture*. 225:27-39.
- Sokal, R. R. and Rohlf, F. J. 1969. Biometry. W.H. Freeman. New York, USA. 675 p.
- Sorgeloos, P.; Lavens, P.; Léger, Ph.; Tackaert, W. and Versichele, D. 1986. Manual for the culture and use of the brine shrimp *Artemia* in Aquaculture. Faculty of Agriculture, State University of Gent, Belgium. 224 p.
- Soriano-Salazar, M. B. y Hernández-Ocampo, D. 2002. Tasa de crecimiento del pez ángel *Pterophyllum scalare* (Perciformes: Cichlidae) en condiciones de laboratorio. *Acta Universitaria*. 12:28-33.
- Vanhaecke, P.; De Vrieze, L.; Tackaert, W. and Sorgeloos, P. 1990. The use of decapsulated cysts of the brine shrimp *Artemia* as direct food for carp *Cyprinus carpio* L. larvae. *Journal of the World Aquaculture Society*. 21:257-262.
- Verreth, J. 1994. Nutrition and related ontogenetic aspects in larvae of the African catfish *Clarias gariepinus*. DSc thesis, Department of Fish Culture and Fisheries, Wageningen Agricultural University, Wageningen, The Netherlands. 205 p.
- Verreth, J. and Den Bieman, H. 1987. Quantitative feed requirements of African catfish (*Clarias gariepinus* Burchell) larvae fed with decapsulated cysts of *Artemia*. I. The effect of temperature and feeding level. *Aquaculture*. 63:251-267.
- Verreth, J.; Storch, V. and Segner, H. 1987. A comparative study on the nutritional quality of decapsulated *Artemia* cysts, microencapsulated egg diets and enriched dry feeds for *Clarias gariepinus* (Burchell) larvae. *Aquaculture*. 63:269-282.
- Walker, R. L.; Hurley, D. H. and Kupfer, R. 1998. Growth and survival of Atlantic surfclam, *Spisula solidissima*, larvae and juveniles fed various microalgal diets. *Journal of Shellfish Research*. 17:211-214.

Recibido: Agosto 12, 2005.

Acceptedo: Octubre 12, 2005.

Aspectos epidemiológicos de *Fusarium moniliforme* causante del tizón de la panoja del sorgo

Epidemiological aspects of *Fusarium moniliforme* caused sorghum head blight

Martínez-Ramírez, J. L.;^{1*} Pescador-Rubio, A.;² Lezama-Gutiérrez, R.;² Rebolledo-Domínguez, O.;² Molina-Ochoa, J.;² López-Lavín, M.² y Betancourt-Vallejo, A.³

¹Departamento de Producción Agrícola, CUCBA, Universidad de Guadalajara, km 15.5, carretera a Guadalajara-Nogales, Las Agujas, Zapopan, Jalisco.

²Centro Universitario de Investigación y Desarrollo Agropecuario, Universidad de Colima, km 39 Autopista Colima-Manzanillo, Crucero Tecomán, Tecomán C. P. 28100, Colima.

³Facultad de Agronomía, Universidad Autónoma de Nayarit, Apartado Postal 49, Xalisco, Nayarit.

* Correspondencia: jlmartin@cucba.udg.mx

Resumen

Durante los años de 1996 y 1997, se llevaron a cabo una serie de experimentos de campo y laboratorio, para estudiar algunos aspectos epidemiológicos del tizón de la panoja del sorgo, causado por el hongo *Fusarium moniliforme*, en la región de la ciénega de Chapala, Jalisco, México. Los resultados obtenidos destacan la identificación del zacate pitillo *Ixophorus unisetus* como hospedero silvestre de *F. moniliforme*, lo que aumenta las probabilidades de supervivencia del hongo y convierte a esta maleza en importante fuente de inóculo primario. Asimismo, el daño por tizón de la panoja está relacionado con la incidencia de la chinche *Oebalus mexicanus* Ailer, cuya presencia es responsable de más del 80% de la variación del daño por tizón. La temperatura y la humedad tienen un impacto importante sobre la emergencia y número de insectos.

Abstract

A series of experiments were conducted during the 1996 and 1997 sorghum growing seasons to determine some epidemiological aspects of the fungus *Fusarium moniliforme* in the Chapala, Jalisco, México area. "Pitillo" grass *Ixophorus unisetus* identified in this study as a wild host of *Fusarium moniliforme*. Apparently, this host increases the probability of survival of the pathogen and it is thus an important source of primary inoculum. The sorghum head stink bug *Oebalus mexicanus* Ailer affects magnitude in which the heads are damaged by *F. moniliforme*. More than 80% of the observed variation in the damaged heads was explained by the number of bugs present in each panicle. Temperature and humidity affected the initial date of emergence and number of insects.

Palabras clave

Ixophorus unisetus, *Oebalus mexicanus*, sorgo, *Fusarium moniliforme*, epidemiología.

Keywords

Ixophorus unisetus, *Oebalus mexicanus*, sorghum, *Fusarium moniliforme*, epidemiology.

Introducción

El cultivo del sorgo en México decreció, desafortunadamente, por diversos factores; entre los que destacan la aparición de enfermedades y plagas. Entre las enfermedades, el tizón de la panoja causado por el hongo *Fusarium moniliforme* Sheldon, ha sobresalido por su virulencia y aumento constante en la última década. En la región de la Ciénega de Chapala, llega a ocasionar pérdidas superiores al 50% [Martínez-Ramírez, 1982].

En la literatura disponible sobre el tizón de la panoja del sorgo y su interacción biológica con *F. moniliforme*, no existen datos precisos que indiquen cuáles son los insectos vectores del hongo. Sin embargo, hay estudios [Henzell *et al.*, 1996; Hepperly *et al.*, 1982; Marley y Malgwi, 1999], quienes señalan que la incidencia de la enfermedad conocida como “moho del grano” del sorgo, también causada por *F. moniliforme*, se incrementa cuando las panojas son atacadas por insectos. En Nigeria, Marley y Malgwi [1999], reportaron la interacción entre la chinche *Eurystylus sp.* (Heteroptera: Miridae) y el hongo *F. moniliforme* en la enfermedad conocida como “moho del grano”. Señalan que el daño del insecto incrementó el número de colonias fúngicas asociadas con el grano. Estos resultados son la primera evidencia clara de interacciones entre chinches de la panoja y moho del grano.

En Puerto Rico se realizaron estudios para determinar por qué las plantas de sorgo asperjadas con Methiocarb, un insecticida de amplio espectro, produjeron semilla con mayor índice de germinación, comparada con semillas procedentes de plantas no tratadas; se encontró que fue controlado parcialmente al hongo *F. moniliforme*. Se observó que el incremento en la calidad de la semilla estuvo asociado con el control del lepidóptero barrenador *Nola sorghiella* y otros insectos [Hepperly *et al.*, 1982].

Otros autores han asociado la incidencia de *F. moniliforme* con el daño causado por insectos barrenadores, o nematodos, o por medios mecánicos para infectar raíces y tallos [Clafin, 1981; Gourley *et al.*, 1977]. En otros cultivos [Burgess y Mckenzie, 1991; Clafin, 1981; D'Arcy y Nault, 1982; Sether *et al.*, 1998], se ha establecido claramente que la presencia de un vector es necesario para que los brotes epidémicos se generen.



Al realizar pruebas de control químico del tizón de la panoja del sorgo, en la Ciénega de Chapala, se detectó que las heridas o el daño causado por insectos que sufre el sorgo en el follaje son más importantes para el desarrollo de la enfermedad que el daño que sufre el sorgo en la parte subterránea. Además, en años con infestaciones altas de chinche, se ha tenido un mayor daño por tizón de la panoja [observaciones del autor].

Específicamente, en sorgo y tizón de la panoja, no se han determinado cuáles insectos están involucrados en el proceso de infección de *F. moniliforme*, ni el papel que juegan la temperatura y la humedad ambiental en el desarrollo de la enfermedad, ni las interacciones que se presentan durante el desarrollo de la misma.

Dados tales antecedentes, se consideró conveniente realizar este trabajo con la finalidad de conocer algunos de los principales componentes epidemiológicos, como son la presencia de hospederos silvestres, y el efecto de la temperatura y humedad ambiental sobre el desarrollo de la enfermedad, así como su relación con la presencia de chinche de la panoja y las interacciones que pueden presentarse entre estos diferentes factores.

Por otro lado, tanto la temperatura como la humedad, han sido mencionadas por varios autores como factores que afectan la epidemiología de enfermedades fungosas [Fravel *et al.*, 1996; Johnson *et al.*, 1994; McLaren y Wehner, 1990; Rاپilly, 1979; Scherm y van Bruggen, 1994].

Materiales y métodos

Para realizar los experimentos de campo del presente estudio, se eligió un terreno en el municipio de Poncitlán, Jalisco, México. Éste es propiedad de la Sociedad de Producción Rural de Santa Cruz El Grande. Dicho municipio se considera representativo de la región conocida como Ciénega de Chapala y que es donde con mayor frecuencia se presenta el tizón de la panoja del sorgo. Poncitlán se encuentra ubicado a los 20° 21' Latitud Norte y 102° 55' Longitud Oeste y a 1,530 msnm. Su clima, durante el periodo junio a octubre, presenta una temperatura media de 18 a 22° C, con una máxima de 22 a 26°C y una mínima de 14 a 19°C. Las unidades-calor varían de 2,400 a 2,800. Las horas-frío, que se presentan durante el periodo de noviembre a febrero, son de 200 a 400. La precipitación pluvial anual es de 600 a 800 mm [Villalpando y García, 1994].

Epidemiología del tizón de la panoja del sorgo. Para determinar la epidemiología de la enfermedad se dividió el trabajo en diferentes aspectos, a saber: determinación de plantas hospederas, determinación e identificación de vectores y medición de parámetros climáticos relacionados.

Plantas hospederas. Asociadas al cultivo de sorgo en la Ciénega de Chapala, se encuentran una gran cantidad de especies vegetales, entre las que figuran algunas gramíneas. Con el fin de elucidar si éstas son hospederas y que mantienen alguna población del hongo, se colectaron 50 individuos de cada una de las cinco especies más abundantes en fase de floración. Las especies encontradas y examinadas fueron: *Ixophorus unisetus*, *Echinochloa colonum*, *Cenchrus echinatus*, *Eleusine indica* y *Cynodon dactylon*.

En cada espécimen se examinó la inflorescencia en busca de síntomas indicadores de la posible presencia de *F. moniliforme*. De todas las plantas colectadas, con o sin la presencia de síntomas, se hicieron aislamientos en “cajas de petri”, con medio de cultivo PDA (Papa Dextrosa Agar). Las cajas de petri fueron conservadas en una incubadora a 24°C durante 8 días. Los aislamientos obtenidos se purificaron y se identificaron mediante el uso de las claves de Barnett y Hunter [1972], para género y de Booth [1971], y de Nelson *et al.* [1983], para determinar la especie.

Influencia del ambiente físico para el desarrollo de *F. moniliforme*. Las condiciones ambientales son factores importantes en el desarrollo de las enfermedades causadas por hongos. Sin embargo, para el caso de tizón de la panoja del sorgo, estos factores no han sido suficientemente estudiados. Para elucidar la influencia que tiene el ambiente físico en la epidemiología del tizón de la panoja del sorgo, se establecieron experimentos de campo durante las temporadas de siembra de 1996 y 1997.

Efecto de las fechas de siembra sobre el grado de enfermedad. Con el objeto de evaluar diferentes condiciones ambientales, se probaron varias fechas de siembra, para tratar de definir el efecto que tienen éstas sobre el desarrollo del tizón de la panoja del sorgo. Durante las temporadas primavera-verano de 1996 y 1997, se eligieron —como tratamientos— cinco fechas de siembra a partir de la segunda quincena de junio a la tercera semana de julio, a intervalos semanales. Se empleó un diseño de bloques al azar con tres repeticiones para 1996 y cuatro repeticiones para 1997. En ambos casos, la parcela estuvo formada por 6 surcos de 10 m de largo y como parcela útil se tomaron 50 plantas al azar de los dos surcos centrales; además, se procuró que cada planta tuviera competencia completa; asimismo, se dejó 0.5 m de surco como cabecera en cada parcela. La variable analizada fue el grado de daño por *F. moniliforme* en la panoja, la cual se midió estableciendo —para este trabajo— una escala arbitraria con cinco niveles, con base en lo siguiente: 1 = planta sana, 2 = de 1 a 25 % de área dañada del raquis de la panoja, 3 = de 26 a 50 % de área dañada, 4 = de 51 a 75 % de área dañada y 5 = más del 75 % de área dañada.

Influencia de las condiciones ambientales sobre la infestación de chinche de la panoja del sorgo *O. mexicanus* y el grado de enfermedad. Los experimentos de fechas de siembra se usaron, además, para evaluar la relación entre la



incidencia de chinche con el grado de la enfermedad. Se tomó nota sobre las condiciones de temperatura y humedad del aire; para esto, se estableció una pequeña estación climatológica dotada de sensores, data logger marca HOBO XT para temperatura, y HOBO RH, para humedad relativa; éstos se colocaron a la altura de la cubierta del sorgo para que fuesen más representativos del microclima de la planta. Además, se colectaron las chinches presentes en 10 panojas tomadas al azar en cada una de las unidades experimentales. Se registraron los datos de temperatura y humedad ambiental, cada hora, durante el día de colecta de los insectos; posteriormente, se analizaron mediante análisis de varianza y regresión.

Material genético. Para este experimento se utilizó semilla del híbrido Dekalb D55, que es susceptible al ataque de *F. moniliforme* y uno de los cultivares que llevan más tiempo sembrándose en la región. La siembra se hizo a mano, colocando 15 g de semilla por surco de 10 m de largo.

Para combatir las plagas del suelo (gallina ciega —*Phyllophaga sp.*—, diabroticas —*Diabrotica sp.*— y nematodos), y evitar infecciones de *F. moniliforme* por medio de heridas en el sistema radicular, se aplicó Carbofuran 3G, a una dosis alta de 80 kg/ha.

Resultados

Epidemiología del tizón de la panoja del sorgo. Plantas hospederas. En las cajas de petri, con medio de cultivo PDA, se aislaron cinco hongos de las muestras de zacate pitillo, *I. unisetus*, con síntomas de tizón en la espiguilla. Uno de los hongos que apareció en un 100% de las cajas, con una coloración que varió desde el blanco hasta el tono violeta, presentó un micelio septado con microconidios unicelulares en cadena y macroconidios septados con forma de canoa. Al identificarlo con las claves taxonómicas de Barnett y Hunter [1972], para género y las de Booth [1971], y las de Nelson *et al.* [1983], para especie, fue determinado como *F. moniliforme*, patógeno causante del tizón de la panoja del sorgo. La frecuencia con que se aisló el hongo fue en 21 de las 50 muestras. Las demás especies de pastos (*E. colonum*, *C. echinatus*, *E. indica*, y *C. dactylon*), no presentaron síntomas ni se aisló al hongo.

Este resultado sugiere que el zacate pitillo es hospedero natural de *F. moniliforme* y que se puede considerar importante como fuente de inóculo primario, ya que es más precoz que el sorgo y también es muy visitado por la chinche de la panoja.

Influencia del medio físico para el desarrollo de *F. moniliforme*

Efecto de las fechas de siembra sobre la enfermedad. El análisis de regresión de daño contra número de chinches para 1996, muestra que, efectivamente, el daño que sufre la panoja está relacionado —en forma positiva— con el número de

chinchas que están presentes ($R^2 = 0.85$, $P < 0.0001$, $F = 33.6$). Esto indica que la enfermedad está fuertemente ligada a la incidencia del insecto.

El análisis de regresión de daño contra número de chinchas, para 1997, indica de nuevo que el número de chinchas es el factor que más influye en la presencia del daño ($R^2 = 0.85$, $P = 0.0001$, Coeficiente = 0.14, $t = 8.8$, $F = 78.49$).

Influencia de las condiciones ambientales sobre la infestación de chinche de la panoja del sorgo *O. mexicanus* y el grado de enfermedad. La regresión múltiple sugiere que el número de chinchas es el factor que más contribuye al daño por tizón de la panoja ($R^2 = 0.87$, $P = 0.0007$, Coeficiente = 0.14, $t = 6.41$) y que de las variables microclimáticas, únicamente la temperatura mínima afecta más el comportamiento de los insectos; de tal manera que, a medida que la temperatura mínima disminuyó, se colectaron menos chinchas ($R^2 = 0.55$, $P = 0.034$, Coeficiente = 1.21, $t = 2.72$).

Discusión

El demostrar que el zacate pitillo, *I. unisetus*, es hospedero silvestre de *F. moniliforme*, es una aportación importante al conocimiento epidemiológico del tizón de la panoja del sorgo y de utilidad para los productores de la Ciénega de Chapala. Aunque no se encontraron antecedentes —en la literatura— que mencionen hospederos silvestres de *F. moniliforme*, se puede considerar el hecho como significativo e inferir su importancia si se compara con otros hongos fitopatógenos que tienen hospederos silvestres, como por ejemplo, la roya del tallo del trigo y el agracejo [Romero, 1988], o con el carbón Karnal del trigo y el zacate ryegrass [Cunfer y Castlebury, 1998].

Se sabe que *F. moniliforme* es patógeno de numerosos cultivos tanto de zonas templadas como tropicales [Booth, 1971]. A pesar de ser un hongo que no forma estructuras de supervivencia, como clamidosporas, esclerocios o hifas de paredes gruesas, éste puede soportar condiciones ambientales muy adversas, pues persiste por seis meses en trozos de tallo de sorgo a temperaturas inferiores a 16°C bajo cero. También puede pasar el invierno con temperaturas de -30°C [Manzo y Clafin, 1984]. Asimismo, en residuos de tallo de maíz incorporado al suelo *F. moniliforme* y otras especies como *F. proliferatum* y *F. subglutinans*, pueden sobrevivir, cuando menos, por 630 días; lo anterior demuestra que los residuos son una importante fuente de inóculo a largo plazo, sobre todo, para infecciones de raíz y tallo [Cotten y Munkvold, 1998]. Tomando en cuenta estos antecedentes y los resultados obtenidos, se puede afirmar que el tener al zacate pitillo como hospedero silvestre, *F. moniliforme* aumenta sus probabilidades de supervivencia y que *I. unisetus* se puede convertir en fuente importante de inóculo primario.



Los análisis de regresión realizados entre daño y número de chinches para los años 1996 y 1997, indican que la incidencia de la enfermedad se explica por la abundancia de *O. mexicanus*. Las variables climáticas, principalmente la temperatura mínima afecta la movilidad de las chinches y en conjunto resultaron significativas reflejando su efecto en el grado de daño por *F. moniliforme*. El hongo, además de poseer una gran capacidad de supervivencia [Cotten y Munkvold, 1998; Manzo y Claflin, 1984], fue favorecido por la interacción con el insecto, que lo coloca en una posición ventajosa para penetrar rápidamente las células del hospedero. Ya dentro de la célula, el hongo no es afectado notoriamente por las condiciones ambientales de manera similar a como pasa con las infecciones por virus, en donde el clima influye más en la dinámica de poblaciones y migración de los vectores, misma que se refleja sobre el desarrollo epidemiológico de la enfermedad [Brown y Poulus, 1990; D'Arcy y Nault, 1982; Sether *et al.*, 1998].

Las interacciones planta-patógeno-vector que se identificaron en el presente estudio, explican algunos de los factores más importantes de la epidemiología del tizón de la panoja del sorgo en la Ciénega de Chapala. El hongo permanece en el suelo en residuos de la cosecha anterior; este inóculo invade plantas de zacate pitillo donde permanece completando su ciclo de vida. En el periodo de siembra de sorgo siguiente, *O. mexicanus* adquiere al hongo, lo transporta y disemina entre las plantas sanas de sorgo, generando epidemias, donde se completa el ciclo nuevamente.

Conclusiones

Los principales componentes epidemiológicos del hongo *F. moniliforme* causante del tizón de la panoja del sorgo que se comprobaron fueron:

1. El zacate pitillo *Ixophorus unisetus* es hospedero silvestre de *F. moniliforme* y puede jugar un papel importante en la epidemiología de la enfermedad como fuente de inóculo.

2. La chinche de la panoja *Oebalus mexicanus*, al actuar como vector o diseminador de *F. moniliforme*, es el principal factor en el desarrollo de epidemias en la Ciénega de Chapala.
3. La temperatura y humedad ambiental afectan la dinámica poblacional de la chinche de la panoja.

Literatura citada

- Barnett, H.L. and Hunter, B.H. 1972. Illustrated genera of imperfect fungi. Burgess Publishing Co. Minneapolis. 241 p.
- Booth, C. 1971. The genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England. 237 p.
- Brown, J. K. and Poulus, B. T. 1990. Serrano golden mosaic virus a newly identified whitefly-transmitted

- geminivirus of pepper and tomato in the United States and México. *Plant disease*. 74:720.
- Burgess, L. and McKenzie, D. L. 1991. Role of the insect *Nysius niger*, and flixweed, *Descurainia sophia*, in infection of Saskatchewan mustard crops with a yeast, *Nematospora sinecauda*. *Canadian Plant Disease Survey*. 71:37-41.
- Clafin, L. E. 1981. *Fusarium* Root and Stalk Rot. Department of plant Pathology. Kansas State University, U.S.A. pp.162-169.
- Cotten, T. K. and Munkvold, G. P. 1998. Survival of *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum* and *F. subglutinans* in maize stalk residue. *Phytopathology*. 88:550-555.
- Cunfer, B. M. and Castlebury, L. A. 1998. Smut fungi associated with ryegrass in wheat fields in the southeastern U. S. and their relation to karnal bunt. *Phytopathology*. 88: S19.
- D'Arcy, C. J. and Nault, L. R. 1982. Insect transmission of plant viruses and mycoplasma-like and rickettsial-like organisms. *Plant Disease*. 66:99-104.
- Fravel, D. R.; Stosz, S. K. and Larkin, R. P. 1996. Effect of temperature, soil type, and matric potential on proliferation and survival of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Erythroxyli* from *Erythroxyllum coca*. *Phytopathology*. 86:236-240.
- Gourley, L.M.; Andrews, C.H.; Singleton, L. L. and Dravjo, L. 1977. Effects of *Fusarium moniliforme* on Seedling Development of Sorghum Cultivars. *Plant Disease Reporter*. 61:616-618.
- Henzell, R.G.; Peterson, G.C.; Teetes, G. L.; Franzmann, B.A.; Sharma, H. C.; Youm, O.; Ratnadass, A.; Toure, A.; Raab, J. and Ajayi, O. 1996. Breeding for resistance to panicle pests of sorghum and pearl millet. Proceedings of international conference on genetic improvement of sorghum and pearl millet, Sponsored by INTSORMIL AND ICRISAT. Lubbock, Texas, 1996.
- Hepperly, P. R.; Feliciano, C. and Sotomayor, A. 1982. Partial control of *Fusarium moniliforme* seed infection in sorghum with application of Methiocarb insecticide. *Phytopathology*. 72:170.
- Johnson, D. A.; Alldredge, J. R. and Allen, J. R. 1994. Weather and downy mildew epidemics of hop in Washington State. *Phytopathology*. 84:524-527.
- Manzo, S. K. and Clafin, L. E. 1984. Survival of *Fusarium moniliforme* hyphae and conidia in grain sorghum stalks. *Plant Disease*. 68:866-867.
- Marley, P. S. and Malgwi, A. M. 1999. Influence of headbugs (*Eurystylus* sp.) on sorghum grain mould in the Nigerian savanna. *Journal of Agriculture Science*. 132:71-73.
- Martínez-Ramírez, J. L. 1982. Enfermedades del maíz, frijol y sorgo en la región sur de Jalisco. Informe interno CAEAJAL, INIA, SARH. 52 p.
- McLaren, N. W. and Wehner, F. C. 1990. Relationship between climatic variables during early flowering of sorghum and the incidence of sugary disease caused by *Sphacelia sorghi*. *Journal of Phytopathology*. 130:82-88.
- Nelson, P. E.; Toussoun, T. A. and Marasas, W. F. O. 1983. *Fusarium* species: An illustrated manual for identification. Pennsylvania State University Press, University Park.
- Rapilly, F. 1979. Yellow rust epidemiology. *Ann. Rev. Phytopathol.* 17:59-73.
- Romero, C. S. 1988. Hongos fitopatógenos. Ed. Universidad Autónoma Chapingo.
- Scherm, H. and van Bruggen, A. H. C. 1994. Weather variables associated with infection of lettuce by downy mildew (*Bremia lactucae*) in coastal California. *Phytopathology*. 84: 860-865.
- Sether, D. M.; Ullman, D. E. and Hu, J. S. 1998. Transmission of pineapple mealybug wilt-associated virus by two species of mealybug (*Dysmicoccus* spp.). *Phytopathology*. 88:1224-1230.
- Villalpando, F. y García, E. 1994. Agroclimatología del estado de Jalisco. Editorial, Universidad de Guadalajara, Guadalajara, Jalisco, México.

Recibido: Febrero 09, 2004.

Aceptado: Agosto 26, 2005.

Boccardia sp. (Polychaete: Spionidae) presence in *Crassostrea gigas* [Thunberg, 1873] oysters reared in the mid coast of the Mexican Pacific♦

Presencia de *Boccardia* sp. (Polychaete: Spionidae) en el ostión *Crassostrea gigas* [Thunberg, 1873] cultivado en la costa media del Pacífico mexicano

Gallo-García, M. C.* and García-Ulloa, M.

Laboratorio de Ciencias Marinas, Facultad de Ciencias Químicas y Biológicas, Universidad Autónoma de Guadalajara, Miguel López de Legazpi 235, C.P. 48987, Barra de Navidad, Jalisco, México. Phone/Fax number: 01 (315) 355-51-30.

* carmengallo@starmedia.com

♦ Nota técnica

Abstract

Several studies on the culture of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* have been carried out since 1997 in the lagoon of Barra de Navidad (Jalisco, México). The presence of mud blisters in the oyster inner valves caused by shell-boring polychaetes has represented one of the main culture problems. *Boccardia* sp. (Polychaete: Spionidae) was identified from the mud blisters of 60 oysters. Despite the commercial significance of this organism to the oyster culture, there is a lack of information about its impact over the Mexican shellfish industry. This paper represents the first report on the presence of this worm in an oyster culture facility located at the mid coast of the Mexican Pacific.

Keywords

Shell-boring worms, *Boccardia* sp., Pacific oyster, Jalisco, México.

Resumen

Desde 1997 se han realizado varios estudios acerca del cultivo del ostión del Pacífico, *Crassostrea gigas*, en la Laguna de Barra de Navidad (Jalisco, México). La presencia de ampollas de lodo en las valvas internas del ostión causadas por gusanos barrenadores de la concha, ha representado uno de los principales problemas en el cultivo. *Boccardia* sp. (Polychaete: Spionidae) fue identificado de una muestra de 60 ostiones estudiados. A pesar del efecto de este gusano en el cultivo de ostión, se carece de información sobre su impacto en la industria ostrícola mexicana. El presente trabajo representa un primer reporte sobre la ocurrencia de este poliqueto en los cultivos de *C. gigas* que se localizan en la costa media del Pacífico mexicano.

Palabras clave

Gusanos barrenadores de concha, *Boccardia* sp., ostión del Pacífico, Jalisco, México.

The polychaete worms represent one of the largest infaunal communities found in benthic environments world-wide. Some species are able to bore into and live inside living and non-living substrates of calcareous nature, including mollusc shells [Blake, 1996; Martin and Britayev, 1998]. Although these organisms do not feed directly from the host, they are considered a nuisance for shellfish industry due to the damage produced to several oyster, mussel, scallop and pearl oyster species. Irritation produced by the worm penetration into the inner shell layers leads to the secretion of nacreous and chitinous material, which isolates it into a “mud blister” [Glasby *et al.*, 2000]. It is believed that the energy expenditure that results from the nacreous secretion leads to a poor growth and meat quality, increasing morbidity and decreasing the ability to accumulate nutritional reserves [Wargo and Ford, 1993]. For bivalves of commercial value, the disgusting appearance of these blisters makes the molluscs less attractive to potential consumers, therefore lowering their market value [Martin and Britayev, 1998].

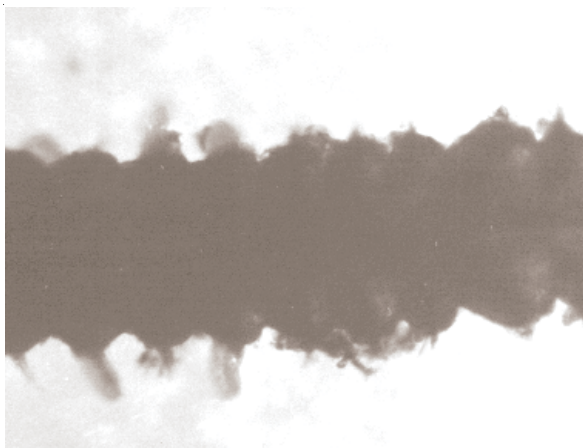
The Pacific oyster *Crassostrea gigas* [Thunberg, 1873] dominates the market as the major mollusc species in the world to be commercially cultured. In México, the Pacific states of Baja California, Baja California Sur, Sonora and Sinaloa are the major oyster producers, and the most common technologies used for production are suspension systems, floating rafts, racks and baskets [Mazón, 1996]. Oyster seed is produced in hatcheries located at the north of México, or imported from other countries. Several attempts have been made to encourage oyster culture in the Pacific state of Jalisco, México. Since 1997, the Laboratorio de Ciencias Marinas (L.C.M.) has developed several experiments with *C. gigas* in the lagoon of Barra de Navidad, Jalisco, in order to evaluate its farming in this region [García-Ulloa *et al.*, 1998; Gallo-García *et al.*, 2001]. However, several significant problems, such as the growing presence of mud blisters related to boring worms, could restrict further commercial cultures. As a part of a general project, the present work was carried out to identify the burrowing worms that affect the L.C.M. oyster stock.

The study was developed with 60 oysters, randomly collected from the culture stock, of an average height of 2.75 ± 0.73 cm and a mean wet weight of 3.55 ± 3.45 g. Bivalves were grown from spat in modules of stack trays (Nestier boxes) suspended with ropes, at a 1.5 m depth, from a floating raft placed in the lagoon. Oysters were sacrificed and polychaetes were collected directly from the mud blisters located on the inner valves surface. To avoid worms dying during collection, valves were kept into containers filled with salt water taken from the lagoon. Nacre from the blister perimeter was carefully broken with a common needle, and salt water was applied by dropping, in order to clear off mud and allow internal inspection. All worms were manipulated, narcotised, fixed and preserved with the techniques proposed by Salazar *et al.* [1988].



From 20 polychaetes isolated from the total oyster sample, three specimens were identified as spionid polychaete worms (Figure 1).

Figure 1. Shell-boring polychaete worm (Family Spionidae, Grube, 1850), found in the oyster *C. gigas* cultured at the mid coast of the Mexican Pacific (50X).



Taxonomical identification to the genus *Boccardia* [Carazzi, 1895] was carried out by means of keys to family and genera published by Salazar *et al.* [1988]. The rest of the polychaetes belonged to other families, and it is believed that they could be opportunistic species. *Boccardia* is member of the family Spionidae and can be found in almost any benthic marine soft bottom sample taken from anywhere in the world [Fauchald, 1977]. A review of symbiotic polychaetes given by Martin and Britayev [1998], showed a list of polydorids related to *C. gigas*. Although, *Boccardia* was not cited as a boring agent for *C. gigas* in their work, four species of this genus (*B. accus*, *B. chilensis*, *B. knoxi* and *B. outakouica*) were recorded as damaging oyster cultures in New Zealand (Handley, 1998).

Despite the commercial significance of these organisms to the oyster farming, there is a lack of information about its presence in México. Cáceres *et al.* [1998], reported *Polydora* sp. infestation in Baja California, which is one of the major producers of *C. gigas* in the country. We should point out that although information about polychaetes has grown enormously in recent years, further research has to be done in order to assess the economical impact of these organisms over the growing Mexican shellfish

industry. This paper represents the first report on the presence of *Boccardia* sp. in an oyster culture facility located at the mid coast of the Mexican Pacific.

Literature

- Blake, J. A. 1996. *Family Spionidae Grube, 1850. Including a Review of the Genera and Species from California and a Revision of the Genus Polydora Bosc, 1802*. In: Taxonomic Atlas of the Benthic Fauna of the Santa María Basin and Western Santa Barbara Channel. Vol. 6. The Annelida. Part 3. Polychaeta Orbinnidae to Cossuridae. Blake, J. A., Hilbig, B. and Scott, P. H. (Eds.). Kinko's Graphics, Goleta California, USA, pp. 81-92.
- Cáceres, M. J.; Macías, O. P. and Vásquez, Y. T. 1998. *Polydora* sp. infestation and health of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* cultured in Baja California, NW México. J. Shellfish Res. 17: 259-264.
- Fauchald, K. 1977. The Polychaete Worms. Definitions and keys to Orders, Family and Genera. Science series 28. Natural History Museum of Los Angeles County, Los Angeles, California, USA. 188 p.
- Gallo-García, M. C.; Godínez, D. E.; García-Ulloa, M. and Rivera, G. K. 2001. *Estudio preliminar sobre el crecimiento y sobrevivencia del ostión del Pacífico Crassostrea gigas (Thunberg, 1873) en la Laguna de Barra de Navidad, Jalisco, México*. Universidad y Ciencia. 17(34):83-91.
- García-Ulloa, M.; Hinojosa, J. A.; Gamboa, D. J. and Godínez, D. E. 1998. *Effect of different diets on the condition index and coliform bacteria content of the Pacific oyster (Crassostrea gigas, Thunberg, 1873) using an experimental depuration system*. Adv. Agri. Res. 7: 9-13.
- Glasby, C. J.; Hutchings, P. A.; Fauchald, K.; Paxton, H.; Rouse, G.; Russell, C. and Wilson, R. 2000. *Class Polychaeta*. In: Polychaetes and Allies: The outhern Synthesis. Fauna of Australia. Vol. 4 A. Polychaeta, Myzostomida, Pogonophora, Echiura, Sipuncula. Beesley, P. L.; Ross, G. and Glasby, C. J. (Eds.). CSIRO Publishers, Melbourne, Australia. pp. 1-296.
- Handley, S. J. 1998. *Power to the oyster: Do spionid-induced shell blisters affect condition in subtidal oysters?* J. Shellfish Res. 17: 1093-1099.
- Martin, D. and Britayev, T. A. 1998. *Symbiotic polychaetes: Review of known species*. In: Oceanography and Marine Biology: an Annual Review. Ansell, A. D.; Gibson, R. N. and Barnes, M. (Eds.), UCL Press, FL, USA. pp. 217-340.
- Mazón, J. M. 1996. *Cultivo del ostión japonés Crassostrea gigas*. In: Estudio del potencial pesquero y acuícola de Baja California Sur. Baja California Sur, México. Casas, V. and Ponce, D. G. (Eds.), Instituto de Acuicultura del Estado de Sonora, Bahía Kino, México. pp. 625-650.
- Salazar, S. L.; León, J. A. y Salaices, H. 1988. *Poliquetos (Annelida: Polychaeta) de México*. Universidad Autónoma de Baja California Sur, La Paz, Baja California Sur, México. 211 p.
- Wargo, R. N. and Ford, S. E. 1993. *The effect of shell infestation by Polydora sp. and infection by Haplosporidium nelsoni (MSX) on the tissue condition of oysters, Crassostrea virginica*. Estuaries. 16: 229-234.

Recibido: Mayo 26, 2005.

Aceptado: Septiembre 7, 2005.

Growth of angel fish *Pterophyllum scalare* [Gunther, 1862] juveniles fed inert diets

Crecimiento de juveniles del pez ángel *Pterophyllum scalare* [Gunther, 1862] alimentados con dietas inertes

García-Ulloa, M.* and Gómez-Romero, H. J.

Laboratorio de Ciencias Marinas, Universidad Autónoma de Guadalajara, A. P. 3, Barra de Navidad, Jalisco, C. P. 48987 México. Tel. and fax: + 315 35 55130.

* To whom the correspondence should be addressed.

E-mail: turbotuag@hotmail.com

Abstract

The growth, feed conversion ratio (FCR), survival and stress resistance of angel fish *Pterophyllum scalare* juveniles fed different diets (decapsulated *Artemia* cysts DAC, commercial flakes CF, commercial pellets CP, and a commercial starter diet for tilapia CSDT), were investigated. Diets were studied with three replicates and adjusted at 8% of daily feeding ratio. Fish had an average initial wet weight of 0.44 g. Diets showed a significant effect on fish growth performance from the first sampling day onwards. After 45 culture days, fish fed with the DAC diet showed the highest mean standard length, wet weight and specific growth rate (3.64 ± 0.07 cm, 3.19 ± 0.24 g and 4.36 % body weight/day, respectively), compared with the rest of the treatments. The FCR fluctuated from 1.26 ± 0.01 for the DAC group to 2.01 ± 0.17 for the CP diet, showing significant differences ($P < 0.05$) among treatments. Survival was similar for all diets. Fish fed with the DAC diet displayed higher stress resistance compared with the rest of the treatments. Although DAC seem to improve growth performance of angel fish juveniles, further trials are required to

Resumen

Se investigó el crecimiento, conversión alimenticia (FCR), sobrevivencia y resistencia al estrés de juveniles del pez ángel *Pterophyllum scalare*, alimentados con diferentes dietas inertes (quistes decapsulados de *Artemia* DAC, hojuelas comerciales CF, pelets comerciales CP y una dieta comercial iniciadora para tilapia CSDT). Las dietas fueron estudiadas con tres réplicas y la ración alimenticia fue ajustada al 8% de la biomasa total. Los peces pesaron 0.44 g en promedio, al inicio. Las dietas mostraron un efecto significativo sobre el crecimiento de los peces desde la primera biometría. Después de 45 días de cultivo, los peces alimentados con DAC mostraron los valores promedio más altos en la longitud estándar, peso húmedo y crecimiento específico (3.64 ± 0.07 cm, 3.19 ± 0.24 g y 4.36 % peso corporal/día, respectivamente), comparado con el resto de los tratamientos. El FCR fluctuó desde 1.26 ± 0.01 para el grupo DAC, hasta 2.01 ± 0.17 para la dieta CP, mostrando diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los tratamientos. La sobrevivencia fue similar para todas las dietas. Los peces alimentados con DAC mostraron la

identify other factors (nutritional biology, feeding techniques and strategies) associated with its most economic use.

Key words

Ornamental fish, *Pterophyllum scalare*, nutrition.

mayor resistencia al estrés comparado con el resto de los tratamientos. Aunque la dieta DAC mejoró el crecimiento de los juveniles del pez ángel, se requieren de estudios posteriores para identificar algunos factores (biología nutricional, técnicas y estrategias de alimentación) asociados a su mejor uso económico.

Palabras clave

Pez ornamental, *Pterophyllum scalare*, nutrición.

Introduction

Freshwater ornamental fish trade is a million-dollar industry [Lim and Wong, 1997]. Among the most popular freshwater fish species in the aquarium trade industry, is the angel fish *Pterophyllum scalare* [Gunther, 1862], which is originated from a branch of the Amazonas River [Tapajoz River], at the north of Brazil [Soriano-Salazar and Hernández-Ocampo, 2002]. Due to its body coloration, shape and economical value [Luna-Figueroa, 2003], the angel fish represents one of the most important ornamental cichlid species, but amongst the main constraints to its optimal commercial production, is the lack of knowledge on proper diets for the different life stages [Luna-Figueroa *et al.*, 2000]. *P. scalare* is considered an omnivorous fish since in nature, its feeding is based on the consumption of plankton, larvae of insects and crustaceans, plants and worms [Soriano-Salazar and Hernández-Ocampo, 2002]. In captivity, the common live larval food used for growing of most ornamental fish is limited to macro-zooplankton such as *Moina*, *Daphnia* and *Artemia nauplii* [Lim and Wong, 1997]. Artificial diets, which are normally elaborated with dried live organisms that are processed in different presentations such as flakes, meals or small pellets, are also used. Although it is known that the angel fish accepts artificial diets [Luna-Figueroa *et al.*, 2000], lower growth and survival rates of *P. scalare* are commonly obtained when such diets are used as the sole feed [Luna-Figueroa, 1999], mainly during the fry and juvenile stages [Hofer, 1985].

In general, it is well accepted that fish nutritional requirements vary with some factors such as the relationship between the diet and life stage [Ricker, 1979] and therefore, the dietary content for feeding larvae is different to that needed for repro-



duction or for growth of juveniles. But as a common practice for culturing angel fish, on-growing diets are also used to promote its reproduction [Pérez *et al.*, 2002; Luna-Figueroa, 2003]. Thus, the indiscriminating use of diets for the different live stages of *P. scalare* is normally associated to different biological responses, as pointed out in few nutritional reports [Luna-Figueroa *et al.*, 2000; Soriano-Salazar and Hernández-Ocampo, 2002; Luna-Figueroa, 2003]. Since angel fish is valued by its individual characteristics such as the skin coloration, body shape and size, obtaining of the maximum expression of these phenotype traits by supplying the proper and optimum diet, should be a topic of growing interest and priority to producers. Therefore, the present work evaluates the effect of different commercial diets on growth and survival of *P. scalare* juveniles, under controlled conditions.

Materials and Methods

Juvenile angel fish (250 fish with an average wet weight of 0.30 ± 0.02 g) were obtained from a local supplier (Acuario Arboledas, Guadalajara, Jalisco, México) and transported to the lab in plastic bags filled with oxygen. Fish were acclimated by placing the bags in a 400 l fiber glass container until water temperature was equalized inside the bags at 27 ± 1 C [Axelrod *et al.*, 1997]. The container was supplied with tap water passed through a cartridge filter ($5 \mu\text{m}$ diameter), and gentle aeration was provided by two airstones. Water temperature in the container was kept constant (28°C) by introducing an electrical heater (100 W, Rena Submersible Heater, RH100, Apopka, FL, USA), and photoperiod was adjusted at 12 hours light and 12 hours dark during acclimating time. Fish were divided in four groups and kept in 4 containers for one week feeding them in excess with each experimental diet. Food ration was given three times at day (09:00, 13:00 and 17:00 h). Each day, 50% of the total water volume of the container was exchanged, extracting out feces and food waste by siphoning.

To evaluate the experimental diets, twelve 113 l glass aquaria were used. Each aquarium was provided with a self-filtration bottom system, consisted in a 3/8 inches PVC tubes net perforated at its bottom side with 1/16 inches diameter holes. The tubes net was covered, with a 0.3 cm diameter plastic mesh and then, with an 8 cm layer of small stones (0.5 cm diameter). Dissolved oxygen was maintained by a 3/8 inches PVC airlift standpipe connected to the bottom tubes net. This way, water was forced to flow down through the stones layer where suspended solids (feces and food waste) were retained.

Aquaria were stocked with 15 fish each, randomly selected from the initial group. The initial mean wet weight was 0.44 ± 0.08 g. Four diets were tested with three

replicates: Commercial flakes (CF) with 43% crude protein (wardley total tropical, USA); commercial pellets (CP) with 45% crude protein (azoo, 9 in 1 drawf cichlid pellet, China); decapsulated *Artemia* cysts (DAC) with 54% crude protein (*Artemia* shell-free, inve aquaculture, USA); and a commercial starter diet for tilapia (CSDT) with 40% crude protein (API-ABA, MaltaCleyton de México, S. A de C. V., México, D. F.). The proximal composition of experimental diets is shown in Table 1. Feeding ration was adjusted at 8% of the total biomass/day [García-Ulloa, 2004] and given at same hours than acclimation time. The experimental diets were tested for 45 days.

Table 1. Proximal composition of tested diets (% dry weight) given by the food suppliers.

	DAC	CF
Dry matter	95	91
Crude protein	54	43
Lipid	9	5
Fiber	6	4
Ash	4	—*
Nitrogen-free extract	—	—

DAC = Decapsulated *Artemia* cysts, shell-free inve aquaculture, USA; CF = Commercial flakes, wardley total tropical, USA; CP = Commercial pellets, AZOO, 9 in 1 drawf cichlid pellet, China; CSDT = Commercial starter diet for tilapia, API-ABA, MaltaCleyton de México.

* Information not given by the producer.

All fish from each replicate were individually measured and weighted at the beginning and every two weeks until the end of the experiment. Wet weight (g) and standard length (cm) were determined at each sampling day, with an electronic balance (Navigator, Scout, 100 g x 0.1 g, Apopka, FL, USA) and a domestic scale, respectively. Prior of weighing, fish were placed on absorbent paper to remove excess of water. The total weight gain (TWG) was calculated as final fish weight-initial fish weight. The daily growth rate (DGR) was calculated as $DGR = TWG / \text{culture days}$. The specific

growth rate (SGR, % body weight/d) was calculated as $SGR = 100 (\ln W_f - \ln W_i) / t$, where W_f = mean weight at the end of sampling, W_i = mean weight at the beginning of the sampling, and t = time in days of the sampling period [Ricker, 1979]. The feed conversion ratio (FCR) was calculated as $FCR = \text{total weight of dry feed given} / \text{TWG}$. Survival was obtained by counting total animals per diet at the end of the experiment. All data were tested for normal distribution and homogeneity of variance before ANOVA was performed (Sokal and Rohlf, 1969). An analysis of covariance was used with initial wet weights as covariate to detect possible differences among the diets at the beginning of the experiment [Johnson, 1976].

The percentages of fish survival values were arcsine transformed to make the variance independent of the mean [Reyes, 1982]. Figures present untransformed data of mean percentage \pm standard deviation. A stress test was used to evaluate the stress resistance of the angel fish fed with the different diets, according to the procedure described by Lim *et al.* [2000]. The test consisted in the exposition of the fish to osmotic shock in a saline solution, and the cumulative mortality of the fish was monitored at 3-min intervals over a 2-h period. After a previous test to determine the optimal saline solution for the stress test (30 ‰), five fish from each replicate were exposed to the stress salinity concentration to obtain the cumulative mortality per treatment expressed as stress index. ANOVA analysis was performed and differences between means were compared for significance ($\alpha = 0.05$) using the Tukey's multiple range test [Reyes, 1982]. The statistical analyses were performed using Jandel SigmaStat 2.0 statistical software (Jandel Co., USA).

Results

All experimental diets were eagerly consumed by angel fish. Mean body wet weight and standard length were significantly different ($P < 0.05$) among diets from the first sampling day (day 15) onwards (Figure 1). At the end of the experiment, fish fed with the CP diet obtained the lowest mean standard length (2.71 ± 0.01 cm) and weight (1.49 ± 0.15 g), meanwhile the DAC group showed the highest growth values (3.64 ± 0.07 cm and 3.19 ± 0.24 g, for the standard length and wet weight, respectively). Growth responses were significantly different ($P < 0.05$) for TWG, DGR and SGR among the treatments (Table 2).

Angel fish from the DAC diet obtained the highest mean final TWG (2.75 ± 0.24 g), DGR (0.061 ± 0.005 g/d) and SGR ($4.36 \pm 0.17\%$ BW/d). The FCR among the treatments showed differences, and ranged from 1.26 ± 0.10 for the DAC group to 2.01 ± 0.17 for the CP diet. The mean final survival of juvenile angel fish (Table 2), fluctuated from 88.88% for the DAC treatment, to 97.77 % obtained for

the CF diet, after 45 culture days. After two hours of osmotic stress challenge, there were not significant differences ($P > 0.05$) for the cumulative mortality among the dietary groups (Table 2).

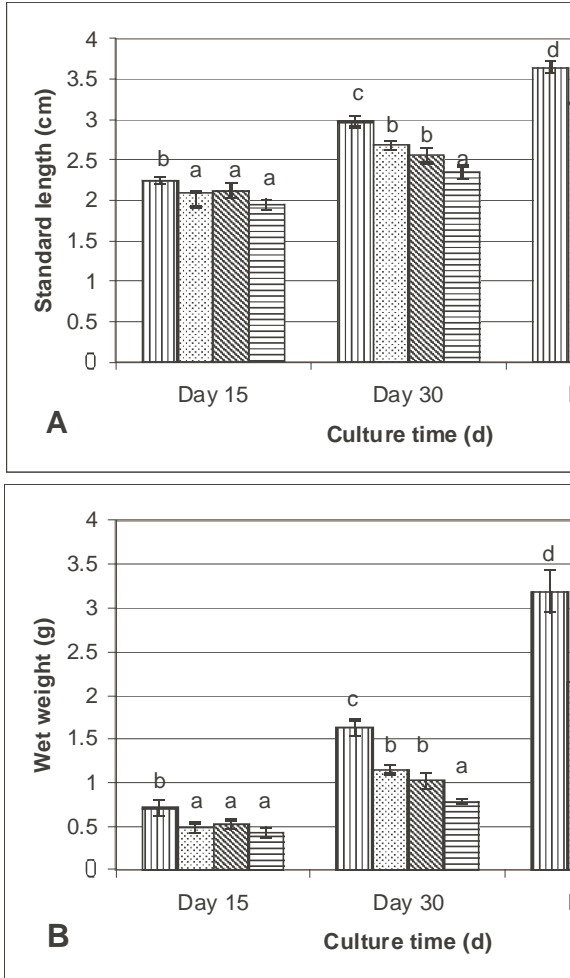
Table 2. Mean final total weight gain (TWG), daily growth rate (DGR), specific growth rate (SGR), food conversion ratio (FCR), survival and cumulative mortality of angel fish juveniles fed with different diets.

	DAC	CF	CP	CSDT
TWG (g)	2.75 (0.24) ^b	1.71 (0.02) ^{ab}	2.15 (0.02) ^{ab}	2.15 (0.02) ^{ab}
DGR (g/d)	0.061 (0.005) ^b	0.037 (0.001) ^{ab}	0.055 (0.001) ^{ab}	0.055 (0.001) ^{ab}
SGR (%BW/d)	4.36 (0.17) ^b	3.50 (0.02) ^{ab}	4.15 (0.02) ^{ab}	4.15 (0.02) ^{ab}
FCR	1.26 (0.01) ^a	1.44 (0.03) ^b	1.35 (0.03) ^b	1.35 (0.03) ^b
Survival (%)	88.88 (6.28)	97.77 (3.14)	97.77 (3.14)	97.77 (3.14)
Cumulative mortality (stress index)	170.00 (1.63) ^a	178.33 (1.69) ^b	178.33 (1.69) ^b	178.33 (1.69) ^b

(DAC = Decapsulated *Artemia* cysts, shell-free inve aquaculture, USA; CF = Commercial flakes, wardley total tropical, USA; CP = Commercial pellets, azoo, 9 in 1 drawf cichlid pellet, China; CSDT = Commercial starter diet for tilapia, API-ABA, MaltaCleyton de México). Values in parenthesis indicate \pm standard deviation. Mean in each line with same superscript are not significantly different ($P > 0.05$).



Figure 1. Mean standard length (A) and wet weight (B) of *Pterophyllum scalare* juveniles (mean \pm standard deviation of three replicates) fed with different diets.



(DAC = Decapsulated *Artemia* cysts, shell-free invertebrate aquaculture, USA; CF = Commercial flakes, Wardley total tropical, USA; CP = Commercial pellets, azoo, 9 in 1 drawf cichlid pellet, China; CSDT = Commercial starter diet for tilapia, API-ABA, MaltaCleyton de México). For each sampling day, different letters at the top of the bars indicate a significant difference ($P < 0.05$) between treatments.

Discussion

For selecting an adequate fish diet, some physical and chemical criteria related to feed intake should be carefully reviewed [Léger *et al.*, 1987]. For the former, the ingestion of food by fish is probably affected by its size and palatability. Size is thereby considered as one of the most important aspect. As food preference is closely related to the match between food and mouth size, the selected food changes with the growth of fish [Verreth, 1994]. In this study, it was observed that despite of the differences in size and presentation, all tested diets were eagerly consumed by fish at the different sampling times registered along the experiment, and consequently, at different growing stages (from 1.65 ± 0.21 mm, to 3.12 ± 0.34 mm of mean initial and final standard lengths, respectively). In the case of the latest, the relationship between digestibility and biochemical composition of diet is considered as a crucial selecting criterion. Due to its high affinity to be metabolized and retained, protein is considered the most important energy component for fish growth [Halver, 1972]. In the case of cultured carnivorous fish, dietary protein requirement usually accounts for 40 to 50% of feed fry matter [NRC, 1993].

Although there is evidence that high protein diets promote good feed utilization and growth in different fish species, mostly in human consumption species [Morais *et al.*, 2001; Ruohonen *et al.*, 2003], information about the protein requirements on angel fish growth rate is scarce. Soriano-Salazar and Hernández-Ocampo [2002], evaluated the use of live food and two inert commercial diets on the growth of *P. scalare*, concluding that live food (*Daphnia pulex*) with the higher protein content, produced better fish growth performance and survival, which coincides with observations made by Luna-Figueroa [2003], who compared two live foods (*D. pulex* and *Culex quinquefasciatus* larvae, with 50.15 and 40.18% crude protein, respectively) and three commercial flakes with different protein levels (45, 43 and 27% crude protein) for on-growing angel fish juveniles. In both cases, there was a direct relationship between the fish growth performance and the dietary protein content. In this experiment, proximal composition of tested diets given by the food suppliers showed comparable protein content (from 40 % for the CSDT group, to 54% for the DAC dietary treatment) with the above mentioned works, but growth of *P. scalare* juveniles did not show a direct relationship with the protein level of the tested diets.

After 45 culture days, angel fish from the DAC group showed the highest TWG and DGR values, and the better FCR compared to the other treatments (Table 2), being similar to those reported by Soriano-Salazar and Hernández-Ocampo [2002] and Luna-Figueroa [2003], feeding *P. scalare* juveniles with live food (*Daphnia pulex* or mosquito larvae) as sole diet. The SGR values obtained for all tested diets in this

experiment fluctuated from 2.67 %BW/d for the CP diet, to 4.36 %BW/d for the DAC group, lower to those reported by Soriano-Salazar and Hernández-Ocampo [2002] and Luna-Figueroa [2003], for the live diets, but similar to the obtained with the inert diets. It has been established that the SGR decreases when the fish size increases [Verreth and Den Bieman, 1987], since fish metabolism is reduced when body size increases. Soriano-Salazar and Hernández-Ocampo [2002] and Luna-Figueroa [2003], used smaller fish at initial stocking (0.1 and 0.058g, respectively) compared to the mean weight at the beginning of the present experiment (0.44 g), which could partially explain the differences in the SGR. For all groups, final survival were above 88.88% (Table 2), similar to the obtained by Luna-Figueroa *et al.* [2000], who fed the angel fish juveniles with *D. pulex*, but higher compared with the values reported with the use of inert diets.

Lim *et al.* [2002] mention that fish resistance to stress can be affected by sub-optimal physiological conditions arising from factors such as infection diseases, poor water quality and nutritional deficiencies, among others. In our study, the higher stress resistance was observed for the fish fed with the DAC diet, suggesting that its nutritional composition covered the physiological requirements at the fish age and salinity concentration evaluated.

Since water parameters (7.2-7.8 pH, $27 \pm 1^\circ\text{C}$ and > 4 mg/L DO) were constants and proper for the angel fish [Axelrod *et al.*, 1997] throughout the experiment, and diets were given at same daily ration and readily consumed by fish, it is suggested that overall results in this study were influenced by the nutritional quality of the tested diets. The nutritional value of one food for a species is related to the degree of correspondence between food biochemical composition and nutritional requirements of that species. This correspondence can change depending on the individual target species, its developmental stage [Walker *et al.*, 1998], or physiological condition, and as a function of the fish growth phase and culture conditions. The better growth results with DAC suggest that its composition is more related to the nutritional requirements of angel fish juveniles, but the gross biochemical composition of the diets tested does not properly explain these results.

Sorgeeloos *et al.* [1986] and Vanhaecke *et al.* [1990], mentioned that DAC are suitable as unique food for some fish species at early life stages, because they are able to combine the advantages of live and inert diets, being a more hygienic and highly nutritional feed that can be processed for long-term storage, and compared with the use of live food, direct feeding of DAC would represent a labor saving strategy [Lim *et al.*, 2002]. Besides, Verreth *et al.* [1987], concluded that the differences in physical properties and ingestion of the feed can be eliminated when DAC are used as sole food, which was corroborated in this study since the cyst diet was eagerly consumed by

angel fish juveniles throughout the 45 experimental days. On the other hand, the nutritional value of DAC can be compared with that found for newly-hatched *Artemia*. García-Ortega *et al.* [1998], mentioned that both nauplii larvae and DAC have similar biochemical composition regarding all major nutrients, concluding that there is no difference in feeding *Artemia* cysts or nauplii to fish.

Inferring, DAC seem to improve growth performance of *P. scalare* juveniles, however much research is still required on the fish nutritional biology related to its feeding techniques and strategies using such diet.

Conclusions

The overall results show that the DAC diet improved the angel fish growth performance at the cultured conditions described, nevertheless, much attention should be still paid on its nutrition, as well as economic considerations, in order to optimize the utilization of DAC at commercial level.

Literature

- Axelrod, H. R.; Burgess, W. E.; Pronek, N. and Walls, J. G. 1997. Dr. Axelrod's Atlas of Freshwater Aquarium Fishes. T. F. H. Publications, Inc. New Jersey, USA, 1152 p.
- García-Ortega, A.; Verreth, J. A. J.; Coutteau, P.; Segner, H.; Huisman, E. A. and Sorgeloos, P. 1998. *Biochemical and enzymatic characterization of decapsulated cysts and nauplii of the brine shrimp Artemia at different developmental stages*. Aquaculture. 161:501-514.
- García-Ulloa, M. 2004. *Efecto de la ración alimenticia en el crecimiento de juveniles de tilapia Oreochromis aureus (Steindachner) bajo condiciones experimentales de cultivo*. Avances en Investigación Agropecuaria. 8:55-62.
- Halver, J. E. 1972. Fish Nutrition. Academic Press, Inc. London, UK, 223 p.
- Hofer, R. 1985. *Effects of artificial diets on the digestive process of fish larvae*. Nutrition and Feeding of Fish. In: C. Cowey, A. Mackie and J. Bell, editors. Academic Press, London, UK, pp. 213-216.
- Johnson, R. 1976. Estadística elemental. Editorial Trillas, S. A., México. 284 p.
- Léger, Ph.; Bengston, D. A.; Sorgeloos, P.; Simpson, K. L. and Beck, A. D. 1987. *The nutritional value of Artemia: a review. Artemia research and its applications*. Vol. 3. In: P. Sorgeloos, D. A. Bengston, W. Decler and E. Jaspers, editors. Universal Press, Wetteren, Belgium. pp. 357-372.
- Lim, L. C. and Wong, C. C. 1997. *Use of the rotifer, Brachionus calyciflorus Pallas, in freshwater ornamental fish larviculture*. Hydrobiología. 358:269-273.
- Lim, L. C.; Wong, C. C.; Koh, C. H.; Dhert, P. and Sorgeloos, P. 2000. *A stress resistance test for quality evaluation of guppy (Poecilia reticulata) (abstract)*. In: Abstract Book of 1st AVA Technical Seminar, 1 September 2000. Agri-Food and Veterinary Authority, Singapore. pp. 4-5.
- Lim, L. C.; Cho, Y. L.; Dhert, P.; Wong, C. C.; Nelis, H. and Sorgeloos, P. 2002. *Use of decapsulated Artemia cysts in ornamental fish culture*. Aquaculture Research. 33:575-589.
- Luna-Figueroa, J. 1999. *Influencia de alimento vivo sobre la reproducción y el crecimiento del pez ángel Pterophyllum scalare (Perciformes: Cichlidae)*. Acta Universitaria. 1:21-29.

- Luna-Figueroa, J. 2003. *Pterophyllum scalare* (Pisces: Cichlidae): Influencia de alimento vivo en la reproducción y el crecimiento. II Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura, CIVA 2003 (<http://www.civa2003.org>), pp.55-65 (20 de julio de 2005).
- Luna-Figueroa, J.; Figueroa-Torres, J. y Hernández de la Rosa, L. P. 2000. Efecto de alimentos con diferente contenido proteico en la reproducción del pez ángel *Pterophyllum scalare* variedad perlada (Pisces: Cichlidae). *Ciencia y Mar*. 4:3-9.
- Morais, S.; Bell, J. G.; Robertson, D. A.; Roy, W. J. and Morris, P. C. 2001. *Protein/lipid ratios in extruded diets for Atlantic cod (Gadus morhua L.): effects on growth, feed utilization, muscle composition and liver histology*. *Aquaculture*. 203:101-119.
- NRC. 1993. *Nutrient Requirements of Fish*. National Academy Press, Washington, DC, USA, 125 p.
- Pérez, C. E.; Morales, S. I. y Olvera, Q. H. 2002. Frecuencia de desove de diferentes variedades del pez ángel *Pterophyllum scalare* (Pisces: Cichlidae). *AquaTIC2002*. 16:1-7.
- Reyes, C. P. 1982. *Bioestadística aplicada*. Ed. Trillas, S. A., México. 217 p.
- Ricker, W. E. 1979. *Growth rates and models*. *Fish physiology*, Vol. VIII, Bioenergetics and growth. In: W. S. Hoar, D. J. Randall and J. R. Brett, editors. Academic Press, New York, USA. pp. 599-675.
- Ruohonen, K.; Koskela, J.; Vielma, J. and Kettunen, J. 2003. *Optimal diet composition for European whitefish (Coregonus lavaretus): analysis of growth and nutrient utilization in mixture model trials*. *Aquaculture*. 225:27-39.
- Sokal, R. R. and Rohlf, F. J. 1969. *Biometry*. W.H. Freeman. New York, USA. 675 p.
- Sorgeloos, P.; Lavens, P.; Léger, Ph.; Tackaert, W. and Versichele, D. 1986. *Manual for the culture and use of the brine shrimp Artemia in Aquaculture*. Faculty of Agriculture, State University of Gent, Belgium. 224 p.
- Soriano-Salazar, M. B. y Hernández-Ocampo, D. 2002. *Tasa de crecimiento del pez ángel Pterophyllum scalare (Perciformes: Cichlidae) en condiciones de laboratorio*. *Acta Universitaria*. 12:28-33.
- Vanhaecke, P.; De Vrieze, L.; Tackaert, W. and Sorgeloos, P. 1990. *The use of decapsulated cysts of the brine shrimp Artemia as direct food for carp Cyprinus carpio L. larvae*. *Journal of the World Aquaculture Society*. 21:257-262.
- Verreth, J. 1994. *Nutrition and related ontogenetic aspects in larvae of the African catfish Clarias gariepinus*. DSc thesis, Department of Fish Culture and Fisheries, Wageningen Agricultural University, Wageningen, The Netherlands. 205 p.
- Verreth, J. and Den Bieman, H. 1987. *Quantitative feed requirements of African catfish (Clarias gariepinus Burchell) larvae fed with decapsulated cysts of Artemia. I. The effect of temperature and feeding level*. *Aquaculture*. 63:251-267.
- Verreth, J.; Storch, V. and Segner, H. 1987. *A comparative study on the nutritional quality of decapsulated Artemia cysts, microencapsulated egg diets and enriched dry feeds for Clarias gariepinus (Burchell) larvae*. *Aquaculture*. 63:269-282.
- Walker, R. L.; Hurley, D. H. and Kupfer, R. 1998. *Growth and survival of Atlantic surfclam, Spisula solidissima, larvae and juveniles fed various microalgal diets*. *Journal of Shellfish Research*. 17:211-214.

Recibido: Agosto 12, 2005.

Acceptedo: Octubre 12, 2005.

Efecto de la selección artificial en el “Chan” (*Hyptis suaveolens* (L.) Poit. (Labiatae) sobre su morfología floral y la floración

Artificial selection effects upon floral morphology and blooming in “Chan” (*Hyptis suaveolens* (L.) Poit. (Labiatae)

Vergara-Santana, M. I.;* Lemus-Juárez, S. y Bayardo-Parra, R.

Centro Universitario de Investigación y Desarrollo Agropecuario (CUIDA).
Universidad de Colima. A.P. 22 C.P. 28000. Colima, Col. México.

* Correspondencia: vergara@cgc.ucol.mx

Resumen

Los mecanismos que favorecen el aislamiento reproductivo es tema de estudio en el proceso de evolución de plantas. Las plantas domesticadas, al ser sometidas a selección artificial, pueden ser consideradas como modelos biológicos en la especiación simpátrica. Se estudió la morfología floral y la etapa fenológica de floración de *Hyptis suaveolens*: formas silvestre, arvense y domesticada. Se observaron diferencias significativas en las estructuras florales ($P < 0.05$): en el tamaño del tubo de la flor (mayor en domesticada), longitud del estilo (mayor en silvestre), filamento de estambres y anteras (mayor en silvestre). Respecto a la duración del periodo de floración, las diferencias también fueron significativas ($P < 0.02$): 19.6 y 24 días en las formas domesticada y silvestre, respectivamente. Las poblaciones arvenses mostraron valores intermedios en la mayoría de los caracteres sugiriendo hibridación silvestre-domesticado e infiltración genética. Se sugiere que la selección artificial produjo cambios que facilitan la autogamia en la variedad domesticada de *H. sua-*

Abstract

The mechanisms that favor reproductive isolation are a topic of study in the evolutionary process of plants. Subjecting domestic plants to artificial selection could be considered as a biological model in sympatric speciation. The morphology of the flower and the phenological stage of blooming of *Hyptis suaveolens*: wild, weed and domesticated forms were studied. Significant differences were observed in the floral structure ($P < 0.05$): in the size of the flower tube (highest in the domesticated form), length of style (highest in the wild form), filament's stamens and anthers (highest in the wild form). There was also a significant difference in respect to length of the blooming period ($P < 0.001$): 20.2 and 24 days in the domestic and wild forms, respectively. The weed population showed intermediate values suggesting wild-domestic hybridizing and genetic infiltration. It was inferred (suggested) that artificial selection produces changes that allows autogamy in the domestic variety of *H. suaveolens*, thus favoring the process towards reproductive isolation.

veolens, favoreciendo con ello el proceso hacia el aislamiento reproductivo.

Palabras clave

Heterocronía, autopolinización, especiación simpátrica, evolución en cultivos.

Key words

Heterocrony, autopolinization, crops evolution, heterogamy, sympatric speciation.

Introducción

Uno de los grandes problemas en biología, es el determinar cómo puede un proceso continuo de evolución producir grupos morfológicamente discontinuos conocidos como especies: el problema de la especiación [Coyne, 1996], que en biología evolutiva es una de sus áreas más activas [Turelli *et al.*, 2001]. En los años recientes se han producido grandes avances relacionados con la especiación genética, tanto en lo conceptual como en lo técnico [Lexer *et al.*, 2005]. En este campo se pretende conocer las causas y mecanismos que contribuyen al aislamiento reproductivo [Barton, 2000], dando énfasis a la identificación de características diferentes, responsables de este aislamiento entre dos taxa cercanamente relacionadas [Howard, 1999], es decir, entre especies simpátricas.

Entre los factores que afectan la velocidad y dirección del proceso de especiación simpátrica en plantas, se encuentra la evolución del sistema reproductivo [Lande y Schemske, 1985; Charlesworth y Charlesworth, 1987; Iwasa y Pomiankowski, 1995]. La morfología floral, como complejo, permite realizar inferencias acerca de su evolución y consecuencias en el sistema de reproducción [Endress, 1992]. La morfología floral también se relaciona con la actividad de los meristemas, sobre los cuales —se infiere— poseen un componente genético sujeto a selección natural [Coen y Meyerowitz, 1991].

El tiempo que una planta permanece en floración también influye en su comportamiento reproductivo. Se ha observado que existe una diferencia en el tiempo de floración entre las poblaciones con tendencia al cruzamiento (alógamas) con respecto a las de autopolinización (autógamas): las alógamas florecen más tarde y permanecen más tiempo en periodo de floración que las flores con tendencia a la autogamia [Wyatt, 1984]. Ambos tipos de reproducción pueden observarse en plantas silvestres.

En el medio natural, las plantas silvestres presentan características diferentes a las plantas de la misma especie sujetas a selección artificial a través del proceso de domesticación; en estas últimas, su constitución morfológica, fisiológica y genética, se altera.



Al conjunto de características diferentes entre el progenitor silvestre y el descendiente cultivado, se le denomina “síndrome de domesticación” [Koinage *et al.*, 1996]. Entre estas características se encuentran: 1) pérdida de mecanismos naturales de dispersión, 2) germinación rápida y simultánea de la semilla, 3) propágulos largos, 4) alargamiento del producto deseado, 5) maduración simultánea de frutos y semillas, 6) pérdida de mecanismos de protección, 7) pérdida de toxicidad o de propiedades gustativas no agradables, 8) cambios de coloración en el fruto o semilla, y 8) cambios en la constitución genética [Harlan, 1992; de Wett y Harlan, 1975].

La selección artificial puede provocar cambios fenológicos en la planta [Wright *et al.*, 2005], que pueden incidir en su sistema de reproducción a través de modificaciones en su morfología floral y etapa de floración. La identificación de características que favorecen estos cambios, permitiría ampliar el conocimiento de la especiación simpátrica [Howard, 1999]. Por este motivo, las plantas domesticadas han sido propuestas como modelos de estudio en el proceso evolutivo [Van-Raamsdonk, 1993, 1995], ya que tienen la ventaja que tanto el ancestro silvestre (o su descendiente inmediato) y el descendiente cultivar, son frecuentemente conocidos y están disponibles para realizar las investigaciones [Koinage *et al.*, 1996], y la escala de tiempo sobre la cual esta evolución ocurre, está frecuentemente bien documentada [Burke *et al.*, 2005].

Entre las plantas silvestres sometidas a proceso de domesticación, se encuentra el *Hyptis suaveolens*, especie de la familia Labiatae, que fue ampliamente cultivada en la época prehispánica de México debido a sus semillas comestibles, y actualmente catalogada como un “pseudocereal”, con probable origen en Mesoamérica y Norte América [Harlan, 1992]. Esta planta presenta una amplia distribución geográfica, y en la mayoría de los lugares donde se encuentra establecida, lo hace como componente de la vegetación natural. En el estado de Colima se localizaron tres formas biológicas de *H. suaveolens*: la que crece dentro de la vegetación natural o forma silvestre, una forma arvense o híbrida, sembrada por el agricultor y poco frecuente en vegetación natural, y la variedad domesticada sólo presente en campos cultivados. Apoyados con la propuesta teórica de Van-Raamsdonk [1993, 1995], Koinage *et al.* [1996] y Burke *et al.* [2005], y con el material biológico de *H. suaveolens*, se infirió que estudios morfológicos y de comportamiento reproductivo en el complejo silvestre-arvense-domesticado, permitirían conocer aspectos sobre la tendencia evolutiva relacionada con el aislamiento reproductivo; para ello, se inició con la determinación del posible efecto de la selección artificial en la morfología floral y tiempo de floración de dicho complejo.

Materiales y métodos

Las semillas de *Hyptis suaveolens*, fueron colectadas de la vegetación natural y en una unidad de producción localizada en la zona central del estado de Colima, México, donde se manejaban como cultivares la arvense y la variedad domesticada [Vergara-Santana, 1994]. Los experimentos se llevaron a cabo en el Instituto Tecnológico de Colima, ubicado entre las coordenadas 19°15' de latitud Norte y 103°43' de longitud Oeste, con temperatura media anual de 25.1°C y promedio de precipitación total anual de 1,026.9 mm; en un clima cálido subhúmedo [INEGI, 1997]. Las observaciones se realizaron en una parcela experimental con un diseño estadístico de bloques al azar con cuatro repeticiones.

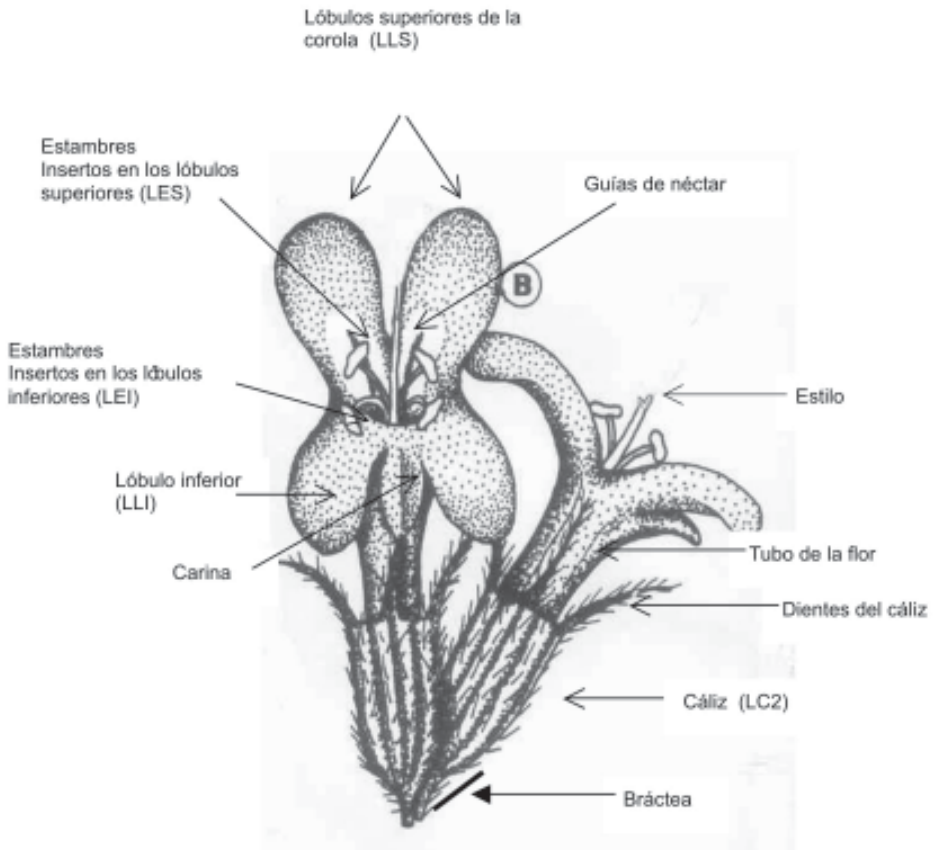
Las observaciones iniciales se centraron en el color de la corola y guías de néctar de cada una de las flores de las tres formas estudiadas. Para la toma de muestra en la medición de las estructuras florales, se siguió el protocolo 1, de "eventos en una flor simple" que propone Dafni [1992]: se marcaron 5 flores en fase de botón floral en cinco plantas, se seleccionaron de manera aleatoria y en diferentes partes de la planta (inferior, media, superior y laterales). En total de 25 flores por variedad. Para las estructuras a medir, se consideraron las sugerencias de Kearn e Intuye [1993], y el trabajo de Wyatt [1984]. Las variables que se observaron con ayuda de un microscopio estereoscópico con lente micrométrica, fueron las siguientes (Cuadro 1, Figura 1).



Cuadro 1. Características que se observaron en las estructuras florales de *Hyptis suaveolens*.

Característica que se observó	Procedimiento para su medición
Cáliz	El cáliz se midió desde su base hasta el inicio de la prolongación de sus dientes LC1= longitud del cáliz, porción ventral. LC2= Longitud del cáliz, porción dorsal
Tubo de la flor	Se extrajo la flor del cáliz, se midió el tubo de la flor considerando éste desde su parte basal hasta donde la corola se divide
Corola	Se midió en uno de los pétalos que lo conforman, desde el punto de bifurcación a su parte apical. LLS. Longitud del lóbulo superior de la corola e inferior (LLI)
Bráctea	Longitud de la bráctea presente en la parte inferior del cáliz
Estambres	Se midió la longitud del filamento desde su parte basal a la apical LES= Longitud de estambres superiores. LEI= Longitud de estambres inferiores
Anteras	Se midió la longitud de las anteras maduras, ya abiertas. LAS = Longitud de anteras de los estambres superiores. LAI= Longitud de las anteras de los estambres inferiores
Estilo	Longitud del Estilo. Se midió desde su parte basal a la apical
Ovario	Longitud del ovario

Figura 1. Esquema de la flor de *Hyptis suaveolens*.



Con los datos obtenidos, se realizó un análisis de varianza, con prueba de Duncan, empleando el paquete estadístico SAS [1992].

Para conocer los tiempos de floración, la toma de datos inició cuando las plantas tenían 63 días de haber sido sembradas (inicio de su floración). Se consideraron las sugerencias de estudios de dinámica de floración que propone Dafni [1992]: selección y marcaje de plantas con cinta durable; en este caso se eligieron al azar 5 plantas por variedad. En cada planta se seleccionó una rama. Los registros fueron todos los días por la mañana (entre las 7:00 y 10:00 h); se inició contabilizando las primeras flores presentes en las ramas marcadas; posteriormente, y día con día, hasta completar



33 días, las flores contabilizadas se desprendían de su inflorescencia para evitar ser consideradas en el conteo del día posterior. Se obtuvo un promedio por día de las flores presentes en las 5 ramas por cada una de las 3 formas de *H. suaveolens* en estudio. Con los datos obtenidos, se realizó un análisis de varianza, con prueba de Tukey, empleando el paquete estadístico SAS [1992].

Resultados

Color de corola y guías de néctar

Las flores de las tres formas de *H. suaveolens* presentan dos guías de néctar, una en cada lóbulo superior. El color de la corola y guías de néctar es diferente. La forma silvestre presenta corola de color violeta con guías de néctar del mismo color pero más intenso. En la arvense la corola es de color blanco con guías de néctar color violeta, en tanto que en la variedad domesticada la corola y guías de néctar son de color blanco, lo que hace poco visible a estas guías, quedando sólo a manera de huellas o marcas presente en los lóbulos.

Morfología floral

Las diferencias morfométricas de estructuras florales entre *Hyptis suaveolens*, silvestre, arvense y domesticada, se centran principalmente en el tamaño de los órganos reproductores de la flor (Cuadro 2). Tomando como patrón de comparación a la forma silvestre, en la domesticada se incrementa el tamaño del cáliz y tubo de la flor, mientras que los lóbulos no presentan diferencia significativa. Se esperaría que en la forma silvestre la desviación estándar fuese mayor debido a su estructura genética, menos sujeta a la selección direccional presente en la condición domesticada; situación que se cumple en la mayoría de los caracteres medidos, con excepción del tubo de la flor. Probablemente se trate de un carácter aún inestable o independiente, no ligado al rendimiento de grano.

En la domesticada se presenta una disminución en el estilo, el tamaño de los filamentos de estambres superiores, así como en las anteras tanto de los estambres superiores como de los inferiores. Estos caracteres tienen relación con la cantidad y el traslado de granos de polen, en donde menor tamaño de anteras puede significar menor cantidad de granos de polen. En el caso del ovario, aumenta pero no con diferencia significativa.

Cuadro 2. Medias, desviación estándar y análisis de varianza que se presentaron en las diferentes estructuras florales del complejo silvestre-arvense-domesticado de *Hyptis suaveolens*.

Variable (longitud)	Silvestre	Arvense
	Media* y desviación estándar (mm)	Media* y desviación estándar (m)
Región ventral del cáliz	2.51 b ± 0.342	2.30 c ± 0.3
Región dorsal del cáliz	2.74 b ± 0.325	2.57 b ± 0.4
Tubo de la flor	4.63 b ± 0.380	4.22 c ± 0.3
Lóbulo superior de la corola	2.99 a ± 0.173	2.93 a ± 0.3
Lóbulo inferior de la corola	2.55 a ± 0.183	2.62 a ± 0.2
Bráctea	1.83 b ± 0.410	2.184 a ± 0.4
Filamento de los estambres superiores	1.40 a ± 0.160	1.18 c ± 0.1
Filamento de los estambres inferiores	1.26 a ± 0.171	1.12 b ± 0.1
Anteras de los estambres superiores	0.56 a ± 0.154	0.58 a ± 0.1
Anteras de los estambres inferiores	0.48 a ± 0.109	0.0.52 a ± 0.1

n = 25 flores. *Valores seguidos por letra diferente dentro de la línea, son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba de Duncan P<0.05.



Aunque no se reporta diferencia significativa entre la silvestre y arvense, las mediciones promedio muestran una tendencia de disminución de tamaño del cáliz y no así en el tubo de la flor en la arvense. No se encontraron cambios en los tamaños de la corola, bráctea, ni longitud del ovario entre la silvestre, arvense y domesticada.

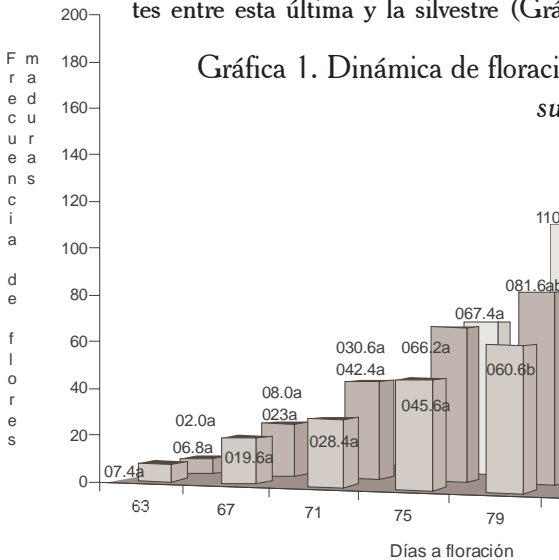
Floración

El registro diario de apertura de flores de cada variedad permitió conocer que el inicio de floración para cada una de ellas es diferente: en la arvense, a los 63 días de haber sido sembrada la semilla; en la domesticada, a los 66 días; y en la silvestre, a los 68 días.

Respecto al periodo floración, se encontraron diferencias significativas ($P < 0.02$) en la forma silvestre (promedio de 24 días), con respecto a la domesticada (19.6 días) y la arvense (20.2 días); estas dos últimas se comportan de manera similar.

En cuanto al periodo de máxima floración, en las formas domesticada y arvense, lo presentaron a los 75 y 79 días después de la siembra, mientras que la silvestre lo fue entre los 79 y los 83 días después de la siembra. Se observa, entonces, un desfase de 8 días (heterocronía) en la presentación del periodo de mayor floración. Es a partir de los 79 días en que se presentan las diferencias estadísticas entre las tres formas, presentando comportamientos similares entre las formas arvenses y domesticadas, y diferentes entre esta última y la silvestre (Gráfica 1).

Gráfica 1. Dinámica de floración de tres formas biológicas de *Hyptis suaveolens*.



La planta silvestre, al permanecer mayor tiempo en floración, puede favorecer la reproducción alogámica.

Discusión

La selección artificial a través del proceso de domesticación en *H. Suaveolens*, al parecer, provocó cambios en la coloración de sus flores, en su morfología y dinámica de floración. El color de las flores es empleado por las plantas como medio de atracción para sus posibles polinizadores: los colores que mayor reflejan la luz ultravioleta pueden incrementar la posibilidad de ser visitadas que las flores con colores que menos la reflejan, como lo es el color blanco [White *et al.*, 1994]. En el *H. suaveolens*, el color de la corola y guías de néctar en la planta silvestre es más llamativo que el color blanco, presente en la variedad domesticada, proporcionándole a la silvestre una ventaja para asegurar su reproducción en el medio natural.

Respecto a la morfología floral de *H. suaveolens*, la domesticada presenta —con relación a la silvestre— una reducción en los órganos reproductores. Pueden observarse ciertos caracteres de hercogamia: de estambres más largos o más cortos que el pistilo, a estambres igual al pistilo; de pistilo exerto a pistilo, incluso. Estas características favorecen la presencia del sistema de reproducción de autogamia [Carr *et al.*, 1997; Karoly, 1994]. Por el contrario, las plantas con estigmas más exerto tienen una mayor tendencia a la reproducción por alogamia, ya que podrían recibir una mayor proporción de visitas de polinizadores, y sus largos estambres podrían donar más polen, preferentemente, a flores con estilos largos; mientras que flores con estambres cortos donan, en forma preponderante, a flores con estilos cortos [Campbell, 1989].

Los cambios en el sistema reproductivo de las plantas no evolucionan independientemente de otros aspectos de su ciclo de vida [Stöcklin y Favre, 1994]; así, en *H. suaveolens* se presentaron cambios en los tiempos de floración (heterocronía), en su inicio y permanencia: la silvestre, inicia su floración más tarde y su permanencia en esta fase es mayor con relación a la domesticada. Un mayor tiempo de permanencia en floración, incrementa la posibilidad de visitas de polinizadores.

Se ha relacionado el inicio de la floración entre especies semejantes, con el sistema de reproducción empleado: en las endogámicas se presenta de manera precoz respecto a las alegamas [Jacquemart y Thompson, 1996; Solbrig y Rollis, 1976], y entre las posibles explicaciones, se sugiere que la maduración del estigma tiene relación con la floración temprana, en donde el estrés hídrico favorece tal condición [Moore y Lewis, 1995; O'neil, 1997].

En el caso de las formas domesticada y arvensis de *Hyptis suaveolens*, que se desarrollan —predominantemente— en campos cultivados (hábitats preparados por el hombre), las condiciones ambientales a las que están sometidos, son diferentes a las



establecidas en ambientes naturales. Los campos de cultivo podrían considerarse también como lugares que presentan disturbio, y en donde las plantas que ahí se desarrollan tienen ambientes similares a las que se desarrollan en ambientes naturales disturbados o marginales. Durante su desarrollo, estas plantas pueden estar sometidas —por causas diversas— a estrés hídrico, favoreciendo, de esta manera, los cambios en los patrones de floración.

Considerar al sistema reproductivo de las plantas como un sistema integrado, facilita, a su vez, la integración de conocimientos para un mejor entendimiento del proceso evolutivo. En el *H. suaveolens*, el conjunto de diferencias morfológicas y fenológicas encontradas en las formas silvestre y domesticadas estudiadas, permitió establecer que el proceso de domesticación (selección dirigida), pudo favorecer los cambios en la planta que le confieren —a esta forma— características claramente distintivas, uniformes y estables, las cuales retiene cuando es propagada. Características todas ellas necesarias para ser considerada como un cultivar [Trehane *et al.*, 1995]. En la forma arvense, los resultados indican que podría ser el resultado de una hibridación o infiltración genética entre las poblaciones silvestres y domesticadas.

Así, los estudios morfológicos y de comportamiento reproductivo en complejos de plantas silvestre-arvense-domesticada, permiten conocer aspectos evolutivos ocurridos durante la domesticación que apoyan la generación de conocimiento para comprender mecanismos de especiación.

Conclusiones

Las plantas domesticadas, al ser sometidas a selección artificial (llamada también selección direccional), a través del proceso de domesticación, pueden ser consideradas como modelos biológicos en estudios evolutivos, como el relacionado con el aislamiento reproductivo en plantas de la misma especie que comparten su hábitat (especiación simpátrica).

Se sugiere que la selección artificial produjo cambios que facilitan la presencia de autogamia en la variedad domesticada de *H. suaveolens*, forma de reproducción que a su vez promueve una tendencia hacia el aislamiento reproductivo entre especies simpátricas. Asimismo se concluye que la forma arvense, podría ser el resultado de una hibridación o infiltración genética entre las poblaciones silvestres y domesticadas de *H. suaveolens*.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Dr. Daniel Zizumbo Villarreal, la paciente revisión y sugerencias al documento. Gracias a su apoyo realizamos una mayor reflexión en el capítulo de resultados y precisión en la redacción.

Proyecto apoyado por CONACYT. Ref. 3302N.

Literatura citada

- Barton, N. 2000. The rapid origin of reproductive isolation. *Science*, 290 (5491), 462.
- Burke, J. M.; Knapp, S. J. y Rieseberg, L. H. (2005). Genetic consequences of selection during the evolution of cultivated sunflower. *Genetics*, doi:1534/genetics. 104.039057.
- Campbell, D. 1989. Measurements of selection in a hermaphroditic plant: variation in male and female pollination success. *Evolution*. 43(2):318-334.
- Carr, D.; Fenster, C. y Dudash, M. 1997. The relationship between mating-system characters and inbreeding depression in *Mimulus guttatus*. *Evolution*. 51(2):363-372.
- Coen, E. y Meyerowitz, E. 1991. The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature*. 353:31-37.
- Coyne, J. A. 1996. Speciation in action. *Science*. 376:726-727.
- Charlesworth, D. y Charlesworth, B. 1987. Inbreeding depression and its evolutionary consequences. *Annual Review Ecology and Systematic*. 18:528-580.
- Dafni, A. 1992. *Pollination ecology. A practical approach*: Oxford University Press.
- Endress, P. 1992. Evolution and floral diversity: the phylogenetic surroundings of *Arabidopsis* and *Antirrhinum*. *International Journal of Plant Science*. 153(3):106-122.
- Harlan, J. R. 1992. *Crops and man* (Second edition ed.). Madison Wisconsin USA: American Society of Agronomy Inc. Crop. Sci. Soc. Am., Inc.
- Howard, D. J. 1999. Conspecific sperm and pollen precedence and speciation. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 1(30):109-132.
- INEGI. 1997. *Anuario estadístico del estado de Colima*. México: Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática.
- Iwasa, Y. and Pomiankowski, A. 1995. A continual change in mate preferences. *Nature*. 377: 420-422.
- Jacquemart, A. y Thompson, J. 1996. Floral and pollination biology of three sympatric *Vaccinium* (Ericaceae) species in the upper Ardennes, Belgium. *Canadian Journal of Botany*. 74:210-221.
- Karoly, K. 1994. The inbreeding effects on mating system traits for two species of *Lupinus* (Leguminosae). *AmJ Bot.* 81 (12):1538-1544.
- Kearns, C. e Inouye, D. 1993. *Techniques for pollination biologist*: Univ Press of Colorado.
- Koinage, E. M. K.; Singh, S. R. and Geps, P. 1996. Genetic control of domestication syndrome in common bean. *Crop Sci.* 36:1037-1045.
- Lande, R. and Schemske, D. 1985. The evolution of self-fertilization and inbreeding depression in plants: I genetic models. *Evolution*. 39(1):24-40.
- Lexer, C.; Rosenthal, D. M.; Raymond, O.; Donovan, L. A. and Rieseberg, L. H. 2005. Genetic of species differences in the wild annual sunflowers, *Helianthus annuus* and *H. petiolaris*. *Genetics*. 169:2225-2239.
- Moore, D. and Lewis, H. 1995. The evolution of self-pollination in *Clarkia xantiana*. *Evolution*. 19:104-114.
- O'neil, P. 1997. Natural selection on genetically correlated phenological characters in *Lythrum salicaria* L (Lythraceae). *Evolution*. 51(1):267-274.
- SAS/SAT. 1992. *User's Guide*: SAS. Institute.
- Solbrig, O. and Rollis, R. 1976. The evolution of autogamy in species of the mustard genus *Leavenworthia*. *Evolution*. 31:265-281.

- Stöcklin, J. and Favre, P. 1994. Effects of plant size and morphological constraints on variation in reproductive components in two related species of *Epilobium*. *Journal Ecology*. 82: 735-746.
- Trehane, P.; Brickell, C. D.; Baum, B. R.; Hettterscheid, W. L. A.; Leslie, A. C.; McNeill, J.; Spongber S.A.; Vrugtman, F., 1995. *International code of nomenclature for cultivated plants-1995*. Wimborne, UK.: Quarterjack Publishing.
- Turelli, M.; Barton, N. H. and Coyne, J. A. 2001. Theory and speciation. *TRENDS in Ecology & Evolution*. 16(7):330-343.
- Van-Raamsdonk, L. W. 1993. Wild and cultivated plant: the parallelism between evolution and domestication. *Evol. Trend Plant*. 7(2):73-84.
- Van-Raamsdonk, L. W. 1995. The effect of domestication on plant evolution. *Acta Bot. Neerl.* 44(4):421-438.
- Vergara-Santana, M. I. 1994. El rescate de un cultivo prehispánico en el occidente de México: el chan (*Hyptis suaveolens*) (L.) Poit. Barro Nuevo. INAH. México 15. pp. 53-56.
- Wett de, J. and Harlan, J. R. 1975. Weeds and domesticates: evolution in the man-made habitat. *Economic Botany*. 129:99-107.
- White, R. H.; Stevenson, R. D.; Bennet, R. R. and Cutler, D. E. 1994. Wavelength discrimination and the role of ultraviolet vision en the feeding behavior of hawkmoths. *Biotropica*. 26(4):427-435.
- Wright, S. I.; Bi, I. V.; Schroeder, S. G.; Yamasaki, M.; Doebley, J. F.; McMullen, M. D.; Gaut, B.S. 2005. The Effects of Artificial Selection on the Maize Genome. *Science*. 308(5726): 1310-1314.
- Wyatt, R. 1984. The evolution of self-pollination in granite autcrops species of *Arenaria* (Caryophyllaceae). I Morphological correlates. *Evolution*. 38(4):804-806.

Recibido: Mayo 24, 2004.

Aceptado: Octubre 18, 2005.

El comportamiento animal como escudo para evitar la enfermedad y remedio hacia la salud (algunas bases fisiológicas) •

Animal behavior as a shield against sickness and a way to healthiness (some physiological basis)

Flores, F. I.; Vázquez, R.; Aguirre, V. y Orihuela, A.*

Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Morelos
Apartado postal 5-78 Cuernavaca, Morelos 62240, México.

* Correspondencia: aorihuela@prodigy.net.mx

• Publicación por invitación

Resumen

Los animales viven en ambientes donde está presente, de manera permanente, la amenaza de enfermar. Para evitarlo, se alimentan lejos de las heces y reconocen las plantas o zonas del potrero que deben evitar. Aprenden, también, a ingerir especies o realizar conductas específicas con fines profilácticos. Si esto falla, entonces el animal manifiesta otras conductas y respuestas fisiológicas como: anorexia, inactividad, dolor y fiebre. El dolor obliga al animal a proteger el área dañada, evitando el apoyar una pata herida o inutilizando un músculo dañado, mientras los tejidos son reparados. La fiebre representa un alto costo energético, y para ahorrar energía, el animal tiende a permanecer inmóvil, estrategia de gran utilidad para controlar el crecimiento y reproducción de bacterias patógenas. En el comportamiento de los animales enfermos se han descubierto sustancias involucradas denominadas citocinas, que juegan un papel muy importante en la inducción de este tipo de conductas; por ejemplo, se puede inducir una disminución del consumo de alimento y

Abstract

Animals live in environments where threaten of sickness is always present. To avoid becoming sick, animals graze away from manure deposits and recognize plants and/or grazing areas that should be avoided. They also learn to eat certain plants or display specific behaviors that might have some prophylactic effects. If this fails, animals display other behaviors and physiological responses like: anorexia, inactivity, pain and fever. Pain induces an animal to protect a damage area, avoiding lean body weight on a hurt leg, or helping in the isolation of an injured muscle while the damaged tissue is repaired. Fever implies a high energy cost and to save energy, animals try to stay immobile, strategy that is useful in the control of growing and reproduction of pathogen bacteria. Substances called cytokines have been discovered involved with the behavior of sick animals. Experimentally, a decrease in food consumption and physical activity can be induced by the injection of substances from the cellular walls of bacteria or toxins. The knowledge on behavior and its physiological basis

en la actividad física inyectando sustancias provenientes de paredes celulares de bacterias o determinadas toxinas. El conocimiento de la conducta y sus bases fisiológicas en la lucha contra la enfermedad ofrecen expectativas prometedoras en la investigación para mejorar el diagnóstico y tratamiento de enfermedades.

Palabras clave

Conducta animal, enfermedad, citocinas.

against sickness offers promising expectative in the future diagnosis and treatment of diseases.

Key words

Animal behavior, Sickness, Cytokines.

Introducción

Los animales, por lo general, viven en un ambiente donde siempre está presente la amenaza de enfermar. Bajo esta situación, las estrategias efectivas para evitar y combatir las enfermedades, se convierten en parte del desarrollo de una selección genética y dentro de ésta, se incluyen ciertos patrones de comportamiento y otros mecanismos propios del organismo, como su sistema inmunológico, los cuales permiten sobrevivir al animal [Hart, 1992].

Para no enfermarse los animales, primeramente, exhiben una serie de conductas encaminadas a disminuir los riesgos de adquisición del patógeno. Dentro de éstas, podemos mencionar estrategias tales como: alimentarse lejos de las heces y orina. Así, un comportamiento típico de los rumiantes es el no pastar cerca de donde existe la presencia de materia fecal [Suárez y Orihuela, 2002], convirtiéndose esto en una estrategia para evitar ingerir —en el forraje— parásitos gastro-entéricos.

Otro ejemplo es la eliminación de heces por parte del cerdo confinado en el extremo opuesto del corral en donde se encuentran los comederos; de esta manera, se evita la contaminación de los alimentos con su propia materia fecal. El macho cabrío se lame el pene después de la cópula [Morga y Orihuela, 2001], disminuyendo la presencia de bacterias tanto por el efecto físico como por propiedades antibióticas de la saliva y reduciendo así la posibilidad de adquirir infecciones genitales.

Como un paso adelante, algunos herbívoros llevan a cabo algo que se puede denominar automedicación, la cual consiste en la ingesta de plantas que pueden tener efecto profiláctico en contra de los parásitos, o aprenden a evitar el consumo de ciertas especies vegetales tóxicas. Desafortunadamente, éstas y otras estrategias no siempre salvan al animal de que enferme, de manera que cuando estas defensas son vencidas, entonces



el individuo manifiesta un comportamiento y respuesta fisiológica que ayuda al sistema inmunológico a entrar en una lucha en contra del agente causal de la enfermedad, y así, facilitar que el enfermo recupere su salud.

El comportamiento de los animales es, sin lugar a duda, la manifestación de los procesos fisiológicos que suceden en su interior, mismos que están determinados genéticamente pero influenciados por diversos factores externos.

El proceder del animal enfermo puede ser una respuesta altamente organizada, caracterizada también por fatiga y debilidad, resultado debido a que el organismo ahorra energía de otros sistemas no relevantes, privilegiando el consumo de ésta por el sistema inmunológico, puesto que éste es el encargado de defenderlo de agentes patógenos, convirtiéndose en una estrategia importante que ayuda a que el animal recupere su salud [Kent *et al.*, 1992; Hart, 1992].

Aunado a los signos anteriores, en el animal enfermo también podemos observar signos característicos de: dolor, depresión, estado letárgico, pérdida de apetito y pérdida del interés en el cuidado corporal, entre otras [Johnson, 2002]. Al parecer, paralelamente con la disminución del apetito también existe una modificación en la aceptación de ciertos alimentos, ya que se ha propuesto que se evitan los alimentos ricos en calorías cuando existe la presencia de citocinas proinflamatorias [Johnson, 2002].

Al analizar las conductas que despliega un animal enfermo, podemos observar diferentes estrategias de las que el animal se vale para restablecer su salud en un tiempo relativamente corto. El dolor obliga al animal a la protección del área dañada, evitando —por ejemplo— mediante la cojera el apoyar una pata herida, o inutilizando un músculo dañado mientras los tejidos son reparados, y así evade el que pueda sufrir mayor daño.

Cuando existe una infección, uno de los mecanismos para combatirla consiste en elevar la temperatura, lo que normalmente se conoce como fiebre. Esto, en términos generales, trae las siguientes consecuencias:

- a) Potencializa la respuesta inmunológica
- b) Favorece y acelera la respuesta de proliferación de linfocitos en respuesta a antígenos
- c) Incrementa la destrucción de bacterias por los neutrófilos y favorece la síntesis de anticuerpos

Como es de suponerse, lo anterior incide de manera directa en el sistema inmunológico, permitiendo que se dé una lucha más eficiente en contra de los agentes que están causando la enfermedad.

Así, cuando el proceso vence sobre la enfermedad, el dolor y/o la fiebre ceden, la depresión se revierte y el individuo adquiere un apetito voraz [Johnson, 1998]. Sin embargo, si la enfermedad continuara por un periodo prolongado, el mismo comportamiento encaminado a restablecer la salud (anorexia e inactividad, entre otros), se convertiría en un arma letal contra el animal [Rothwell, 1999].

El incremento en la temperatura representa un alto costo energético. Veinticinco por ciento de incremento metabólico por cada dos a tres grados centígrados de elevación en la temperatura corporal. Con el fin de ahorrar energía de otros eventos, es por lo que el animal tiende a permanecer inmóvil.

Sumado a lo anterior, el animal deja de comer, aunque esto parezca contradictorio, ayuda a que éste se recupere al evitar la ingesta de hierro, elemento esencial para que las bacterias se multipliquen [Bullen, 1981]. Además, el animal limita su movimiento, ya que al no sentir hambre, no gastará energía al buscar alimento como normalmente sucede [Larson y Dunn, 2001].

Cuando un animal enferma, el pelo es un indicativo de ello. Éste se observa sucio y descuidado. Lo que nuevamente se debe a un ahorro de energía por parte del individuo enfermo al reducir la actividad muscular requerida para su acicalamiento y limitar la pérdida de agua a través del sudor y la saliva.

Lo anterior sugiere que existe una relación funcional entre el sistema inmunológico y el sistema nervioso, que finalmente afecta el consumo de alimento [Larson y Dunn, 2001].

Bases fisiológicas de la conducta

Experimentalmente se puede inducir una disminución del consumo de alimento cuando se inyectan lipopolisacáridos provenientes de las paredes celulares de las bacterias.

De manera general, usando al ratón como modelo experimental, se observa que al inyectar endotoxinas-toxinas secretadas por las bacterias, los ratones disminuyen su actividad física y entran en un proceso depresivo [Danzer *et al.*, 1998]. Recientemente, se ha tratado de asociar una baja expresión de colecistocinina como un mediador químico, que funciona como un intermediario entre la comunicación del sistema inmunológico y nervioso. Esto se ha tratado midiendo las concentraciones séricas de colecistocinina en tejidos como el duodeno e hipotálamo, después de una y 12 horas de la inyección intraperitoneal de lipopolisacáridos [Weiland *et al.*, 2005].

En el comportamiento de los animales enfermos, se ha descubierto que existen sustancias denominadas citocinas, que juegan un papel muy importante en la inducción de este tipo de conductas [Danzer *et al.*, 1999; Bluthé y Danzer, 2000; Danzer, 2001; Danzer, 2004].

En 1980 se dieron a conocer las secuencias nucleotídicas de las interleucinas (IL-1 e IL-2), sustancias que pertenecen a un grupo mayor que se denominan citocinas; las cuales, en general, son compuestos de origen proteico, que poseen la capacidad de actuar de manera local o sistémica, es decir, en el lugar en donde se producen o a distancia.



Las citocinas, por lo regular, poseen efectos sobre la proliferación y diferenciación celular, la inflamación y respuesta inmunológica. También pueden actuar sobre diversos sistemas, pero sobre todo cuando el animal está enfermo [Bluthé y Danzer, 2000; Danzer, 2001].

En respuesta a la sospecha de la existencia de una comunicación entre el sistema inmunológico y el nervioso, se propuso que precisamente estas sustancias funcionaban como un vehículo para alertar a este último de la presencia de microorganismos y modificar la conducta [Kosman *et al.*, 2002].

A su vez, inicialmente las citocinas son producidas por células de la respuesta inmunitaria como son los macrófagos, encargados —principalmente— de fagocitar a los microorganismos. Éstas, de manera general, reciben el nombre de citocinas pro inflamatorias, ya que provocan o facilitan que se lleve a cabo un proceso inflamatorio [De la Garza, 2005]. El entendimiento de estos mecanismos, hoy día es más amplio. Sin embargo, aún no están completamente conocidos.

Si una citocina como la IL-1 β (*interleucina uno beta*) y el interferón son inyectados en el cerebro de roedores, estos últimos modificarán su conducta de una manera radical, presentando falta de apetito, acompañada de los síntomas característicos del animal enfermo, mismos que pueden acentuarse en respuesta a la cantidad del fármaco utilizado.

Las citocinas también pueden afectar al sueño. Un claro ejemplo de este efecto fue evidenciado al administrar dosis bajas de IL-1 β a ratas, favoreciendo la presentación del sueño superficial que es la fase no REM. Sin embargo, la misma citocina administrada en dosis altas inhibe esta fase de sueño [Hutchings *et al.*, 2003].

En el caso del ratones knockout (donde se ha desactivado su IL-6), después de administrar lipopolisacáridos, se observó que induce a la fase no REM, en un periodo más corto con relación a los animales intactos C57 BL/ 6J I, que provoca fiebre en los ratones intactos e hipotermia en los knockout, y que estos efectos son modulados por los ciclos de luz-oscuridad [Morrow y Opp, 2005].

Actualmente el comportamiento asociado a la enfermedad, ha sido bien documentado y estudiado en diversas especies [Warren *et al.*, 2005; Hennessey *et al.*, 2004]. Sin embargo, los mecanismos moleculares involucrados en la interacción de las citocinas con sus receptores en el sistema nervioso central no se conocen completamente. Lo que sí conocemos, es que el comportamiento asociado a la enfermedad es producido por las citocinas que se secretan en respuesta a la presencia de agentes patógenos [Watkins y Maier, 1999], que en este proceso participan otros elementos como el factor común a insulina (IGF -1), hormonas como glucocorticoides y neuropéptidos, la vasopresina y la alfa-melanotropina [Danzer, 2004] y que podemos inducir el comportamiento del animal enfermo mediante la aplicación de estas sustancias.

Implicaciones prácticas

Hoy en día, las citocinas como tal han sido ya empleadas como agentes terapéuticos. Dentro de éstas principalmente aquellas denominadas citocinas anti inflamatorias, cuya función es inhibir el proceso inflamatorio. Tal avance médico se debe, en gran parte, al estudio y conocimientos generados a partir del comportamiento del animal enfermo. Ahora vemos cómo, a partir de aquí, este conocimiento ha evolucionado hasta el diseño de medicamentos basados en el uso de citocinas que pueden ser empleados tanto en animales como en humanos, así como ofrecer posibilidades a futuro para el tratamiento de aquellas enfermedades que son consideradas como graves por el grado de sufrimiento y dolor que inducen al paciente, como el cáncer.

Por otra parte, dentro de la medicina veterinaria y la zootecnia es útil aprender las conductas que indican cuando un animal está enfermo, ya que además del conocimiento en sí, en términos pragmáticos, esto permite darle un tratamiento adecuado y oportuno, lo cual mejora no únicamente la producción de piel, carne, leche y otros subproductos que lo animales nos brindan, sino también el bienestar de los mismos animales.

Literatura citada

- Bluthé, R.; Michaud, B.; Poli, V. and Danzer, R. 2000. *Role of IL-6 in cytokine-induced sickness Behaviour: a study with IL-6 deficient mice*. *Physiol. Behav.* 70:367-373.
- Bullen, J. 1981. *The significance of iron in infection*. *Rev. Infect Dis.* 3:1127-1138.
- Danzer, R.; Bluthé, R.; Gheusi, G.; Cremona, S.; Layé, S.; Parnet, P. and Kelly, K. 1998. *Molecular basis of sickness behaviour*. *Ann NY Acad. Sci.* 856:132-138.
- Danzer, R. 2001. *Cytokine induced sickness behaviour: mechanisms and implications*. *Ann NY Acad. Sci.* 933:222-274.
- Danzer, R. 2004. *Cytokine —induced sickness behaviour: a neuroimmune response to activation of innate immunity*. *Eur. J. Pharmacol.* 500:399-411.
- Danzer, R.; Aubert, A.; Bluthé, R.; Geusi, G.; Cremona, S.; Layé, S.; Kongsman, J.; Parnet, P. and Kelly, K. 1999. *Mechanisms of the behavioural effects of cytokines*. *Adv. Exp. Med. Biol.* 461:83-105.
- De la Garza, E. 2005. *Endoxin or pro-inflammatory cytokine-induced sickness behavior as an animal model of depression: focus on anhedonia*. *Neurosci. Biobehav. R.* 29:761-770.
- Hart, B. 1992. *Behavioral adaptations to parasites: An ethological approach*. *J. Parasitol.* 78:256-265.
- Henessey, M.; Deack, T.; Schiml-weeb, P.; Wilson, S.; Greenlee, T. and McCall, E. 2004. *Responses of guinea pups during insolation in a novel environment may represent stress —induced sickness behaviours*. *Physiol. Behav.* 81:5-13.
- Hutchings, R.; Athanasiadou, S.; Kyriazakis, I. and Gordon, I. 2003. *Can animals use foraging behaviour to combat parasites*. *Proc. Nutr. Soc.* 62:361-370.
- Jhonson, R. 1998. *Immune and Endocrine regulation of food intake in sick animals*. *Domest. Anim. Endocrinol.* 15:309-319.
- Jhonson, R. 2002. *The concept of sickness behaviour: a brief chronological account of four key discoveries*. *Vet Immunol. Immunopathol.* 87:443-450.
- Kent, S.; Bluthé, R.; Nelly, K. and Danzar, R. 1992. *Sickness behaviour as a new target for drug development*. *Trends Pharmacol. Sci.* 13:24-28.



- Kosman, J.; Parnet, P. and Robert. D. 2002. *Cytokine —induced sickness behaviour: mechanisms and implications*. Trends Neurosci. 3:154-158.
- Larson, S. and Dunn, A. 2001. Behavioral effects of cytokines. Brain Behav. Immun. 15:371-387.
- Morga, F. y Orihuela, A. 2001. *Frecuencia del lamido genital post-copulatorio en machos cabríos (Capra hircus) y posible función*. Vet. Mex. 32:301-303.
- Morrow, D. and Opp. M. 2005. Diurnal variation of lipopolysaccharide-induced alterations in sleep and body. Brain Behav. Immun. 19:40-51.
- Rothwell, J. 1999. *Cytokines-Killers in the brain*. J Phys 5:3-17.
- Suárez, E. and Orihuela, A. 2002. *Aversive characteristics of five farm species feces measured under two behavioral tests*. Livest. Prod. Sci. 77:119-125.
- Warren, E.; Finck, B.; Arkins, S.; Kelly, K.; Scamura, R.; Murtaugh, M. and Jhonson, R. 2005. *Coincidental Changes in Behavioural and Plasma Cortisol in Unrestrained Pigs after intracerebroventricular injection of Tumor Necrosis Factor*. Endocrinol. 6:2365-2371.
- Watkins, L. and Maier, S. 1999. *Implications of immune—to-brain communication for sickness and pain*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96:7710-7713.
- Weiland, T.; Kent, S.; Voudouris, N. and Shulkes, A. 2005. *The effect of lipopolysaccharide on cholecystokinin in murine plasma and tissue*. Peptides 26:447-455.

Factores que afectan la producción de dosis de semen en centros de inseminación artificial porcina

Factors affecting production of semen doses in porcine artificial insemination centers

Rocha, G.;^{1*} Castañeda, J.² y Valencia, J. J.³

¹Centro Universitario del Sur. Universidad de Guadalajara.

²Dirección General de Educación Técnica Agropecuaria (SEP).

³CEIEPO. UNAM

* Correo electrónico: gonzalor@cusur.udg.mx

Resumen

Con el fin de determinar los factores que influyen en la producción de dosis de semen de calidad, se llevó a cabo el presente trabajo en centros de producción intensiva de semen. Un total de 8,420 eyaculados provenientes de 97 sementales alojados en dos diferentes postas del centro de la República Mexicana fueron evaluados para determinar sus parámetros de producción. De acuerdo a los datos analizados, la edad máxima en la que un semental puede ser utilizado para la colección de semen es de 36 meses y su ritmo de colección en la edad adulta es de una vez cada 5 días. Se encontró también que existe una moderada correlación negativa, entre temperatura ambiental y número de dosis obtenidas de cada semental ($r = -0.534$, $P < .05$). Por otro lado, se encontró una capacidad de producción dependiente de la línea genética, siendo los híbridos de Seghers los más productivos contra los sementales de la línea PIC, que resultaron con baja producción de semen. Otros parámetros analizados, fueron las causas de desecho de los sementales, siendo la principal la baja calidad de los eyaculados (hasta un 44.11%), seguido por edad avanzada (29%),

Abstract

To determine factors influencing quality of semen doses in boar studs, the present study was carried on at intensive semen production centers. A total of 8,420 ejaculates from 97 boars housed in two commercial boar studs of central México were evaluated to determine some performance parameters. According to the analyzed data, it was found that 36 months is the maximum age on boars to obtain an acceptable performance. Further, an ideal collection schedule to optimize semen doses output from each boar was set at once every five days. It was also found that weather conditions influences semen output with high temperatures reducing semen doses obtained ($r = -0.534$, $P < .05$). Another finding was the relationship between genetics and production performance. Seghers hybrids were the most productive whereas PIC line boars were the less productive in terms of semen doses/boar/week. Lastly, it was determined that the main reason for culling boars was their low performance reflected as low quality ejaculates (up to 41.11%) followed by senility (29%), physical problems on reproductive organs (12%) and leg problems (6%).

problemas varios (atrofia de pene, uretra, entre otros: 12%) y problemas de locomoción (6%). Los datos aquí encontrados permiten establecer estrategias para optimizar la producción de semen en las postas de sementales.

Palabras clave

Verracos, posta, semen, dosis, parámetros.

Key words

Boar, stud, semen, doses, performance.

Introducción

La inseminación artificial de la cerda es una técnica que ha innovado los sistemas de producción porcícolas en todo el mundo [Althouse y Kuster, 2000]. Actualmente, más del 60% de las cerdas en producción en nuestro país son inseminadas artificialmente y esta tendencia va en aumento día con día [Castañeda-Moreno *et al.*, 2000].

Con la modificación de los sistemas de producción porcina, llegaron los métodos de producción en multisitios. Esto hizo que surgiera la necesidad de generar un nuevo sitio para procesar las dosis de una manera eficiente. Este sitio, llamado centro de inseminación artificial (CIA) o posta de sementales, ha modificado de tal forma la manera de alojar y manejar los sementales, que han surgido nuevos problemas a raíz de su implementación [Flowers y Esbenshade, 1993]. Tal situación hizo que surgieran nuevas afecciones en los cerdos para los que el veterinario no estaba preparado [Thacker *et al.*, 1984], como es el caso de problemas de extremidades, disminución de la longevidad y afecciones no identificadas con anterioridad, como el PRRS [Dee y Joo, 1994], el Rubulavirus [Solis *et al.*, 2001] o el Circovirus [Iglesias *et al.*, 2002].

Contrario a otros sitios de producción, las postas de sementales determinan su eficiencia, como la capacidad de dosis producidas por semental por semana. Sin embargo, el costo de producción de cada una de esas dosis también es un tema que preocupa al productor y, por lo tanto, debe optimizarse al máximo [Rozeboom, 2000]. Existen muchos factores que condicionan la calidad de semen de verraco y su consecuente fertilidad potencial al ser utilizado para la inseminación artificial [Claus, 1990]. Algunos de estos son ampliamente conocidos pero no han sido investigados de manera objetiva. Las dudas que aún siguen sin una respuesta científica con relación a las postas de sementales son: ¿Cuál es el porcentaje anual de reemplazos? ¿Cuáles son las causas de baja más comunes y cómo se pueden prevenir? ¿Hasta qué edad un semental



puede ser productivo? ¿Qué tanto influyen las condiciones climáticas o la época del año en la calidad de semen? ¿Cuál es la frecuencia óptima de colección?

Tradicionalmente se ha aceptado, como promedio de vida productiva de un semental, de 3 a 4 años [Althouse y Kuster, 2000]. En la actualidad los productores sostienen que un semental de 5 años puede generar crías suficientes como para justificar su permanencia en la piara; sin embargo, las empresas productoras de pie de cría sostienen que el semental sólo debe usarse de 18 a 24 meses, ya que después de ese tiempo, la calidad del semen disminuye a un punto que pone en peligro la productividad de la empresa [Flowers, 2002]. La frecuencia de colección también es tema de debate. Crabo y Dial [1992], determinaron que la máxima producción de semen se alcanza cuando al semental adulto se le colecta cada 3 días. No obstante, muchos consultores recomiendan un ritmo de colección con intervalos de 7 días. A la fecha, muchas opiniones se han vertido con relación a la capacidad general de producción de una posta porcina bajo estos nuevos esquemas de producción [Rozeboom, 1997]. Sin embargo, muchas de esas opiniones no están basadas en criterios científicos y algunas veces son contradictorias.

El objetivo del presente trabajo fue determinar los factores que influyen en la capacidad de producción semanal de dosis para la inseminación en una posta de sementales porcinos.

Material y métodos

La presente investigación es un trabajo observacional, retrospectivo y longitudinal. Se analizaron 8,420 eyaculaciones provenientes de 97 sementales de dos diferentes postas ubicadas en la región del centro de la república. Los datos fueron recabados desde febrero de 1997 hasta febrero del 2002 en una de las postas; y de abril de 1999 a febrero del 2002, en la otra.

La posta "A" contó con un promedio de 29 sementales activos de las razas York, Landrace, Duroc y dos líneas comerciales Seghers y PIC. Los sementales estuvieron alojados en corrales individuales en naves con ventilación natural. Los animales eran alimentados con 3 kg de una dieta comercial con el 13% de proteína distribuida en dos veces al día. La posta "B" contaba con 22 sementales York, Duroc, Landrace e híbridos terminales de una compañía genética comercial, alojados en jaulas individuales de movimiento restringido y piso con 80% de rejilla. Los sementales también eran alimentados una vez al día con 3 kg de una dieta con el 13% de proteína. Ambos centros están ubicados entre los 18° y 22° de Latitud Norte y 91° y 107° de Longitud Oeste. El clima está clasificado como semiseco-semicálido BS1 hw(w) con temperaturas que fluctúan de los 8° hasta los 30° C, con una media de 19° C. La precipitación anual varía de 450 a 630 mm.

Los eyaculados fueron obtenidos con la técnica de la mano enguantada. A cada uno de ellos se le asignó un número de lote que sirvió para identificarlo durante todo el proceso. Los parámetros estudiados fueron: volumen, motilidad, concentración y morfología, los cuales sirvieron para determinar el número de dosis producidas de cada eyaculado. El volumen fue determinado usando una balanza electrónica, la motilidad se realizó de manera subjetiva con la ayuda de un microscopio; el análisis de concentración se realizó con el método del hemacitómetro y las anormalidades se determinaron con el método de tinción con rosa de bengala. Todas las dosis fueron invariablemente preparadas con 3,000 millones de espermatozoides viables, ajustando de acuerdo al porcentaje de motilidad y anormalidades. Los eyaculados no procesables fueron desechados pero fueron tomados en cuenta para el presente estudio. De cada eyaculado se registró la identificación y raza del verraco así como la frecuencia de colección. Se registró, también, la fecha de colección y la temperatura ambiental media del mes de colección. Se agruparon los eyaculados provenientes de cerdos con seis diferentes categorías de edad: menores de 12 meses, entre 12 y 18 meses, de 18 a 24 meses, de 24 a 30 meses, de 30 a 36 meses y mayores de 36.

La estadística descriptiva fue utilizada para organizar y resumir los datos originales. El programa Statistix® [1993], fue utilizado para determinar las medias y desviaciones estándar de los parámetros estudiados. Las variables estudiadas fueron la edad del semental, frecuencia de colección, raza y las interacciones entre ellas. El coeficiente de correlación de Pearson fue utilizado para establecer la relación entre la temperatura ambiental mensual y las dosis producidas por mes. El análisis de regresión fue utilizado para buscar la relación entre edad de semental y el número de anormalidades en los eyaculados. Valores con una $P < 0.05$ fueron considerados como significativos.

Resultados

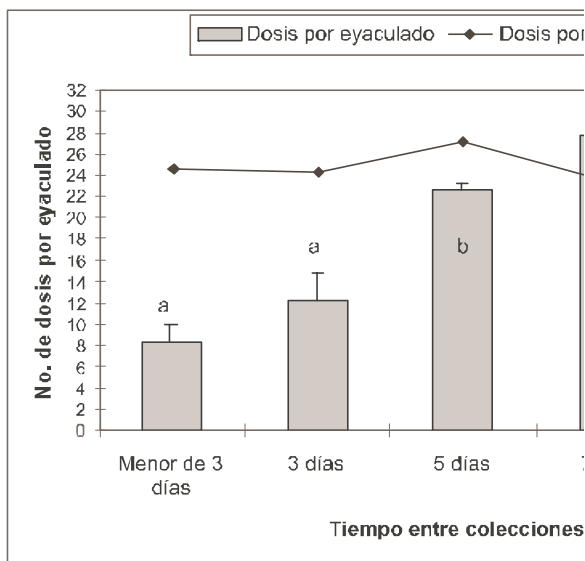
Con relación a la edad óptima para utilizar a un semental, se observó que aunque el volumen del eyaculado tiende a mantenerse conforme la edad avanza, la concentración disminuye y las anormalidades aumentan considerablemente (ver Cuadro 1).

Cuadro 1. Influencia de la edad del semental en los parámetros de calidad del semen y dosis producidas por eyaculado.

EDAD (MESES)	Volumen (ml)	Concentración (millones/ml)
	Media - D. E.	Media - D. E.
Menores de 12	197.72- 72.3 a	322.2- 96.3 a
de 12 a 18	212.32- 81.7 b	405.3- 85.2 b
de 18 a 24	274.28- 56.9 c	386.7- 52.9 b
de 24 a 30	263.25- 69.8 c	358.3- 65.2 bc
de 30 a 36	247.23- 77.5 d	330.2- 87.5 c
Mayores de 36	253.58- 83.8 d	349.5-105.3 bc

En cuanto a la frecuencia óptima de colección, se observó que la mayor producción de dosis mensuales se obtiene cuando se colecta a un semental cada 5 días (Gráfica 1). Para este análisis sólo se tomaron en cuenta los animales en su etapa de máxima producción (12 a 30 meses).

Gráfica 1. Influencia de la frecuencia de recolección en el número de dosis producidas por eyaculado. También se muestran las dosis mensuales por cerdo.



La época del año tuvo un efecto sobre la calidad de semen. Se observó que en los meses de mayor calor, la cantidad de dosis producidas se reduce proporcionalmente. Sin embargo, se observó que esta reducción se manifiesta de 6 a 8 semanas después de iniciada la época de calor (Gráfica 2).

Gráfica 2. Influencia de la temperatura del mes de colección en las dosis producidas de cada eyaculado.

Al aplicar el coeficiente de correlación de Pearson para comparar la temperatura ambiental mensual y las dosis producidas, al tercer mes se encontró que existe una moderada correlación negativa entre ellos ($r = -0.534$, $P < .05$), lo que sugiere que conforme aumenta la temperatura ambiental, disminuyen las dosis producidas.

Se encontró una diferencia en la capacidad de producción dependiente de la raza y línea genética, encontrando la mayor capacidad en los híbridos terminales Seghers y la menor en los terminales PIC (22.39 dosis por eyaculado vs 14.2, $P < 0.05$) (Cuadro 2).



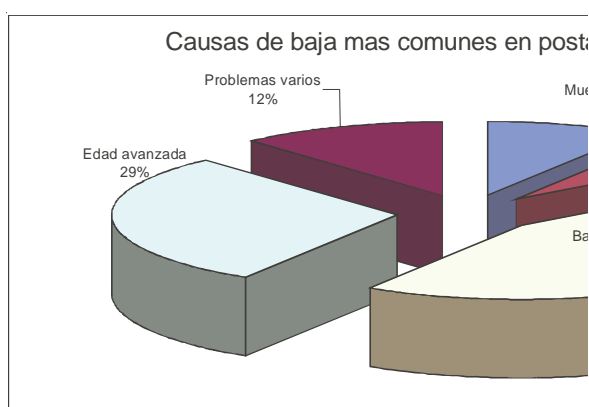
Cuadro 2. Promedio de dosis por eyaculado de acuerdo a la raza y tipo genético.

Tipo	Dosis/eyaculado
York	17.9
Landrace	17.5
Duroc	15.1
Híbrido Terminal PIC	14.6
Híbrido Terminal Seghers	22.39

No se encontró diferencia estadística significativa entre las dosis producidas por sementales York, Landrace y Duroc. Sin embargo, al separar los sementales de las dos diferentes postas, se encontró que existe una marcada diferencia en el promedio de dosis por eyaculado entre las mismas razas. No obstante, la tendencia es la misma. Se cree que esto pueda derivar del criterio de observación del técnico que elabora las dosis o del sistema de conteo de las células para determinar concentración [Rozeboom, 1997].

Independientemente de las tasas de reemplazo que se tengan, las causas de baja más comunes entre los sementales de las postas A y B, se pueden observar en la Gráfica 3.

Gráfica 3. Causas de desecho en dos Postas de sementales en explotación intensiva del centro de la República Mexicana.



Se encontró que la principal causa de desecho de sementales es su incapacidad para cumplir con los estándares de producción (baja fertilidad) en edad temprana. La segunda causa de desecho es la edad avanzada y su consecuente reducción en la calidad de los eyaculados. Esta es la condición de desecho normal y bajo condiciones ideales debería ser la causa de baja más común, pues reflejaría que un semental ha cumplido con las expectativas para lo cual fue desarrollado. En el apartado “problemas varios” se incluyeron sementales que fueron desechados por problemas físicos diversos, como atrofia de pene, problemas en uretra, gen de positividad a estrés o problemas cardiacos. En algunos casos hubo muerte súbita de sementales cuya causa no fue determinada.

Discusión

En ambas explotaciones, las dosis producidas por semental se reducen a partir de los 36 meses de edad. Esto difiere a lo recomendado por la compañía *Pig Improvement Company* (PIC), que considera como máximo periodo productivo los 18 meses. Flowers y Esbenshade [1993], han sugerido mantener los sementales únicamente hasta los 24 meses para poder aprovechar su potencial de producción de semen. Las recomendaciones vertidas por estos autores también difieren, en cierto modo, con lo observado en este estudio, ya que se analizó que hasta los 3 años, los sementales pueden producir dosis viables. En este aspecto, también existe cierta controversia, ya que en el caso de sementales cuyo desempeño y valor genético son excepcionales, se han explotado estos animales hasta un máximo de 5 años, al final de los cuales, su capacidad de producción se reduce considerablemente. Sin embargo, en estos casos no se toma en cuenta el valor productivo de un semental, sino el valor de las crías que se obtengan de él (Rozeboom, comunicación personal).

Hubo una interacción entre raza y calidad de semen en edad avanzada. Se encontró que los sementales Seghers tienden a ser más longevos, pues mantienen su capacidad de producción de dosis de calidad aún después de los 36 meses de edad. Los sementales menos durables resultaron ser los de las líneas de PIC, pues su producción declina a partir de los 24 meses. En la parte intermedia quedaron las razas puras [York, Landrace y Duroc], en las cuales esa capacidad declina después de los 30 meses de edad. Los resultados aquí encontrados también coinciden con los de Wollmann *et al.* [2002], quienes conservaron los sementales hasta por 35 meses, no encontrando una baja en la producción de dosis (sin embargo, las recomendaciones no son válidas para todas las razas).

La producción máxima de semen se logró cuando los sementales eran colectados cada 5 días. Esto difiere considerablemente de las recomendaciones antiguas, cuando se utilizaba monta natural, en las que se recomendaba obtener hasta dos montas en un



día siempre y cuando se dejara descansar al semental durante un periodo de dos días. En ese caso, las montas semanales totales de cada semental podrían sumar hasta 6-8 por semana [Crabo y Dial, 1992]. Rozeboom [2000], recomienda un ritmo de colección más moderado que consiste en una monta por semana. Nuestros resultados coinciden con los de Flowers [2002], quien ha establecido que una optimización del uso de sementales adultos se logra cuando se colectan 3 veces cada 15 días. Langendijk [2001], Soede *et al.* [2002] y Steverink [1999], recomiendan usar el semental cada 6 días, lo que es muy semejante a lo aquí encontrado.

Una reducción importante en la producción de semen se observó después de 6 a 8 semanas de iniciado el tiempo de calor (temperatura ambiental $>22^{\circ}$ C). Esto coincide con Flowers [2002], quien establece que los eventos que le sucedan a un semental un día determinado (estrés calórico, por ejemplo) sólo serán perceptibles cuando el proceso de espermatogénesis llegue a su fin (en 4 a 6 semanas después del estrés). También coincide con los hallazgos de Reicks y Yeske [2002] y los de Yeske y Reicks [2002], quienes estudiaron un brote de PRRS en una posta y no observaron cambios en el semen sino hasta después de 4 semanas de presentados los síntomas.

La observación del efecto retrasado del calor en los sementales es importante, ya que utilizando la ecuación de regresión ($Y = .06743 - .02369 X$ con una $r^2 = 0.25$), es posible predecir, hasta cierto grado, la capacidad de producción semanal en las épocas calurosas y poder prepararse con tiempo para introducir sementales extras. El presente estudio coincide con el de Wollmann *et al.* [2002 b], quienes encontraron diferencias de producción, de acuerdo a la estación del año.

No existen muchos datos publicados que permitan comparar los promedios de producción de dosis por raza. Sin embargo, Althouse y Kuster [2000], determinaron que bajo condiciones de clima controlado, los sementales de razas puras han logrado promedios de hasta 32 dosis por eyaculado. Esto difiere, en gran medida, con los promedios de las razas puras de nuestro estudio, probablemente por lo subjetivo de los métodos empleados en los laboratorios.

Los problemas de locomoción (5.8%) no figuraron como causa importante de desecho en el presente estudio. Esto difiere de lo encontrado por Althouse [1997], quien observó hasta un 32% de sementales desechados por causas de problemas de locomoción. Es importante señalar que dichos sementales eran alojados en jaulas de movimiento restringido con pisos 100% de rejilla, condiciones diferentes a las de este estudio, ya que los sementales fueron alojados en corrales de piso sólido (posta A) o con sólo el 80% de rejilla (posta B).

Conclusiones

Bajo las condiciones del presente estudio, se concluye que:

1. La edad óptima para obtener el máximo beneficio de sementales es entre 24 y 30 meses.
2. El mejor ritmo de colección de un semental es de una vez cada 5 días.
3. El clima caluroso (mayor de 22° C) disminuye la producción de semen 6 semanas después de iniciado el cambio de clima.
4. La principal causa de baja de sementales es la baja producción de dosis de semen debido a la reducción en la calidad de los eyaculados.

Literatura citada

- Althouse, G. C. 1997. *Replacement rates and culling causes in comercial boar studs*. Cont. Educ. Pract. Vet. 18(6):538-542.
- Althouse, G. C. and Kuster, C. E. 2000. *A survey of current boar stud practices in USA production*. Proceedings of the 16th International pig veterinary society congress, Melbourne, Australia. pp. 230-232.
- Castaneda-Moreno, J.; Rocha-Chávez, G. and Orihuela-Trujillo, A. 2000. *The effect of applying synthetic seminal plasma before insemination on the reproductive performance of gilts and sows*. Proceedings of the 16th International pig veterinary society congress. Melbourne, Australia. 1:140.
- Claus, R. 1990. *Physiological role of seminal components in the reproductive tract of the female pig*. J. Rep. Fert. Suppl. 40. pp. 117-131.
- Crabo, B.G. and Dial, G.D. 1992. *AI in swine*. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 8:533.
- Dee, S. A. and Joo, H. S. 1994. *PRRS in the United States: there-education of the swine practitioner*. Swine Health Prod. 3(2):81-84.
- Flowers, W. L. and Esbenshade, K. L. 1993. *Optimizing management of natural and artificial matings in swine*. J. Reprod. Fertil. 48:217-228.
- Flowers, W. L. 2002. *Using reproductive biology to improve suboptimal reproductive performance*. Proceedings of the 17th IPVS Congress. Ames Iowa, USA. Volume 1, pp. 43-48.
- Iglesias, G.; Segalés, J.; Palacios, J. M. y Trujano, M. 2002. *First report of Postweaning multisystemic wasting syndrome in México*. Proceedings of the 17th IPVS Congress. Ames Iowa, USA. Volume 2, 179 p.
- Langendijk, P. 2001. *Is there a future for the boar? The role of boar stimuli in reproductive processes around estrus in the pig*. PhD Thesis. Wageningen University. The Netherlands.
- Reicks, D. and Yeske, P. 2002. *Monitoring fever and semen quality during a PRRS outbreak*. Proceedings of the 17th IPVS Congress. Ames Iowa, USA. Volume 1, 212 p.
- Rozeboom, K. J. 1997. *Managing multiple inseminations*. Proceedings of the 1997 Minnesota Pork Conferences. Minneapolis, Minnesota. USA. pp. 11-22.
- Rozeboom, K. J. 2000. *Guidelines for Boar Semen Processing: Initial Analysis and Sort*. Proceedings of the 2000 North Carolina Pork Conference. North Carolina State University Cooperative Extension Service.
- Soede, N.; Langendijk, P. and Kemp, B. 2002. *Optimum strategies in artificial insemination, with emphasis on the timing relative to ovulation and the role of the boar*. Proceedings of the 17th IPVS Congress. Ames Iowa, USA. Volume 1, pp. 15-23.



- Solis, H. M.; Espinosa, H.S.; Mercado, G. C.; Ramírez, M. H.; Zenteno, E. y Hernández J. 2001. *Evaluación de la calidad de semen de cerdos infectados experimentalmente con el rubulavirus porcino*. Memorias del XXXVI Congreso anual de AMVEC. Querétaro, México.
- Statistix®. 1993. *User's Manual*. Analytical Software, USA.
- Steverink, D.W.B. 1999. *Optimizing insemination strategies in pigs*. PhD Thesis. Wageningen University. The Netherlands.
- Thacker, B.K.; Larsen, R. E.; Joo, J. S. and Leman, A. D. 1984. *Swine disease transmissible with A.I.* J. Am. Vet. Med. Assoc. 15:231-238.
- Wöllmann, E. B.; Bortolozzo, F. P.; Wentz, I.; Benemann, P.; Netto, G. B.; Ferreira, F.M. and Peruzzo, I. 2002. *Differences in sperm output in boars according to boar age in an AI centre*. Proceedings of the 17th IPVS Congress. Ames Iowa, USA. Volume 2, p. 488.
- Wöllmann, E. B.; Bortolozzo, F. P.; Wentz, I.; Benemann, P.; Netto, G. B.; Ferreira, F. M. and Peruzzo, I. 2002 b. *Differences in sperm output in boars according to season*. Proceedings of the 17th IPVS Congress. Ames Iowa, USA. Volume 2, 489 p.
- Yeske, P. and Reicks, D. 2002. *Effect on weekly semen production in a PRRS outbreak in a boar stud*. Proceedings of the 17th IPVS Congress. Ames Iowa, USA. Volume 1, 228 p.

Recibido: Diciembre 09, 2004.

Aceptado: Agosto 24, 2005.



Los mojos • Grabado de Rafael Mesina Polanco