



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE  
HIDALGO**

**Coordinación de Estudios de Posgrado  
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN CIENCIAS  
BIOLÓGICAS**

**PROTOCOLO PARA LA REPRODUCCIÓN, INCUBACIÓN Y  
CRECIMIENTO DE RANA TORO AMERICANA (*Lithobates  
catesbeianus* SHAW, 1802), EN CONDICIONES  
CONTROLADAS EN MÉXICO**

**TESIS**

Presentada por:

**Biól. Martha Teresita Rangel Ramírez**

Como requisito para obtener el título profesional de:

**Maestra en Ciencias Biológicas Área de Ecología y Conservación**

Tutor:

**Dr. Juan Manuel Ortega Rodríguez**

Co-tutora:

**M.C. Tohtli Zubieta Rojas**

**Morelia, Michoacán. Marzo 2017.**



## **DEDICATORIA**

### **Con todo cariño para mi increíble familia:**

A mi padre y mi madre, a Evle, Luis da y turi, por su apoyo incondicional, su comprensión, por darme fuerzas y ánimos cada día y por creer en mí!!!

A mi bebé peludo Duna, quién pese a la falta de atención, siempre me recibe con amor.

A los abuelitos, chinitos y Martitha, por protegerme siempre y estar conmigo en todo momento.

**Muchas gracias familia, los amo!!!**

## AGRADECIMIENTOS

Agradecimiento especial para mis profesores:

Dr. Juan Manuel Ortega Rodríguez, director de tesis, gracias por confiar en mí, por su apoyo y por no dejarme sola en el camino.

Dr. Javier Ponce Saavedra, por su confianza, paciencia y apoyo durante todo el proyecto, sin sus aportaciones no hubiese sido posible desarrollar este proyecto.

Dra. Virginia Segura, por su apoyo y aportaciones al proyecto.

M. en C. Tohtli Zubieta Rojas, muchas gracias por su asesoría, por confiar en mí y ayudarme a emprender camino en esta nueva área de investigación.

Dr. Andre Muniz Afonso, gracias por tu apoyo incondicional, por compartir tus conocimientos y tus aportes en este proyecto; por ti conocí lo apasionante de la ranicultura, también gracias por creer en mí y motivarme a continuar en esta área; ahora tengo un amigo y un profesor para toda la vida.

A la maestra Cecilia Criollo por su colaboración en el diseño del ranario.

También agradezco al CONACyT por la beca otorgada ya que sin ella no hubiese sido posible realizar este aporte a la investigación.

A la Fundación Educación Superior-Empresa (FESE) por el financiamiento para la construcción del “Ranario Experimental Nicolaita” y adquisición de material y equipo.

Al sistema producto Rana, por su confianza y apoyo para desarrollar esta investigación y permitirnos la entrada al sector.

Gracias al equipo “Ranas”, a mi amigo Francisco Silva, por su apoyo incondicional durante todo el proyecto, por sacrificar días de descanso, horas de sueño y de comida para ayudarme en el ranario; a Alicia Ávalos, por permitirme colaborar en su proyecto de investigación y ser parte de este equipo y a Fernando por su disposición y apoyo.

A los amigos incondicionales; Fresia Ramírez, Katia Lemus, Eduardo Venegas, Hesajim de Santiago, Jalil Vargas, Yvonne Herrerías y Virginia León, por estar siempre dispuestos a ayudarme y compartir sus conocimientos, los adoro!!!



**“Nadie puede vivir a dieta. Pero todos podemos vivir más si elegimos mejor lo que comemos”.**

Sou fã da carne de rã...

## ÍNDICE

	<b>Pág.</b>
<b>I. RESUMEN GENERAL</b>	1
<b>II. ABSTRACT</b>	2
<b>III. INTRODUCCIÓN GENERAL</b>	3
<b>IV. OBJETIVOS</b>	15

### **CAPÍTULO 1**

<b>REPRODUCCIÓN ARTIFICIAL DE RANA TORO AMERICANA</b>	16
1.1 RESUMEN	17
1.2 ABSTRACT	18
1.3 INTRODUCCIÓN	19
1.4 MATERIAL Y MÉTODO	21
1.5 RESULTADOS	38
1.6 DISCUSIÓN	41
1.7 CONCLUSIONES	43
1.8 LITERATURA CITADA	44

### **CAPÍTULO 2**

<b>EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO DURANTE LA INCUBACIÓN Y EL DESARROLLO INICIAL DE RENACUAJOS DE RANA TORO</b>	46
2.1 RESUMEN	47
2.2 ABSTRACT	48
2.3 INTRODUCCIÓN	49
2.4 MATERIAL Y MÉTODOS	51
2.5 RESULTADOS DEL CRECIMIENTO Y DESARROLLO DE RENACUAJOS DURANTE LA INCUBACIÓN	69
2.6 RESULTADOS DEL DESARROLLO LARVAL	87

<b>2.7</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	<b>106</b>
<b>2.8</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>108</b>
<b>2.9</b>	<b>LITERATURA CITADA</b>	<b>109</b>
<b>V.</b>	<b>DISCUSIÓN GENERAL</b>	<b>110</b>
<b>VI.</b>	<b>ANEXO I</b>	<b>112</b>
<b>VII.</b>	<b>LITERATURA CITADA</b>	<b>121</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

	<b>Pág.</b>
<b>Cuadro 1.</b> Clasificación taxonómica de rana toro americana, de acuerdo a IUCN (2009).	12
<b>Cuadro 2.</b> Procedencia de los ejemplares de rana toro americana en fase adulta, seleccionados.	24
<b>Cuadro 3.</b> Parámetros físico químicos del agua utilizada en el sector de reproductores.	38
<b>Cuadro 4.</b> Temperatura ambiental, humedad relativa (HR) y temperatura del agua durante la reproducción artificial, al interior del ranario.	40
<b>Cuadro 5.</b> Tratamientos experimentales establecidos durante el desarrollo embrionario.	62
<b>Cuadro 6.</b> Tratamientos experimentales establecidos durante el crecimiento y desarrollo larval.	62
<b>Cuadro 7.</b> Variables morfométricas consideradas en cada evento de medición.	65
<b>Cuadro 8.</b> Variables morfométricas consideradas en cada evento de medición.	66
<b>Cuadro 9.</b> Efectos de los factores de variación.	68
<b>Cuadro 10.</b> Variables ambientales controladas.	69
<b>Cuadro 11.</b> Variables ambientales promedio al interior de las incubadoras.	70
<b>Cuadro 12.</b> Parámetros fisicoquímicos del agua utilizada durante la incubación.	70
<b>Cuadro 13.</b> Coeficiente de correlación entre las variables morfométricas Longitud total (LT) y Longitud cola (LC).	71
<b>Cuadro 14.</b> Valores del ANOVA de cada variable y su medición, permiten identificar los valores significativos ( $Prob>F$ ), los $gl=11$ .	72

<b>Cuadro 15.</b>	Patrón de comportamiento de los factores en función del desarrollo y crecimiento de los organismos, conforme a las variables morfométricas y los tiempos de medición.	86
<b>Cuadro 16.</b>	Variables ambientales controladas al interior del ranario.	87
<b>Cuadro 17.</b>	Parámetros fisicoquímicos.	87
<b>Cuadro 18.</b>	Parámetros fisicoquímicos.	88
<b>Cuadro 19.</b>	Coefficiente de correlación entre las variables morfométricas Longitud total (LT) y Longitud cola (LC).	89
<b>Cuadro 20.</b>	Comportamiento no significativo de la combinación P1-A2 en la interacción Profilaxis y Alimento, para las variables de cada medición.	99
<b>Cuadro 21.</b>	Identificación de patrones de comportamiento de los factores y su efecto en función de las variables morfométricas y el tiempo de medición.	104
<b>Cuadro 22.</b>	Identificación de patrones de comportamiento de la interacción de los factores y su efecto en función de las variables morfométricas y el tiempo de medición.	105
<b>Cuadro 23.</b>	Producción total por año a nivel nacional de Rana toro.	119
<b>Cuadro 24.</b>	Producción total por año a nivel estatal de Rana toro.	120

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1.</b> Macho adulto de <i>Lithobates catesbeianus</i> . Fotografía tomada en “Granja Uanasahuonduranopu”, ubicada en el municipio de Uruapilla, Michoacán, julio del 2014.	9
<b>Figura 2.</b> Ciclo de vida, fases de desarrollo zootécnico de <i>Lithobates catesbeianus</i> : 1.desarrollo embrionario; 2. desarrollo larval “R1-R4”, corresponde todo el desarrollo larval hasta completar la metamorfosis; 3. imago (o ranita) corresponde a pre-engorda y 4. Rana toro adulta, etapa de engorda y reproducción. Imagen propia, elaborada por Martha Rangel.	11
<b>Figura 3.</b> Instalaciones del “Ranario Experimental Nicolaita”, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.	21
<b>Figura 4.</b> Granjas ranícolas, de las cuáles se adquirieron organismos adultos para la reproducción artificial, se observan las condiciones de cultivo de cada unidad de producción y la diversidad de sus organismos. a) Granja “Unión de campesinos del Valle de Tzintzimeo S.P.R. de R.L.”, b) Granja “Uanashuandarhuanapu S. de R.L.” y c) Granja “San José”.	24
<b>Figura 5.</b> Consideraciones generales, previas a la selección de organismos. <b>a.</b> muestra machos en fase adulta con diferencia de edades, en el macho mayor de 3 años se le observa engrosamientos de dedos, piel rugosa y gruesa al tacto, caso contrario de los machos más jóvenes; <b>b.</b> bitácora; <b>c.</b> Proporción adecuada para la reproducción natural; <b>e.</b> presencia de lesiones en organismos; <b>f.</b> Comportamiento anormal, posición irregular; <b>g.</b> organismos en su plena actividad reproductiva.	26
<b>Figura 6.</b> Características físicas de un macho adulto, de izquierda a derecha se observa: tamaño de tímpano, región gular plisada con coloración amarilla, callo nupcial, reflejos de amplexo y presencia de canto (región gular extendida).	27

- Figura 7.** Características físicas de una hembra adulta, de izquierda a derecha se observa: Diámetro de tímpano, región gular de coloración blanca, dedos delgados y sin presencia de callo nupcial y vientre distendido (presencia de doblez entre piernas y vientre). 28
- Figura 8.** Instalaciones y equipo para el mantenimiento de los reproductores: a. tinas independientes para machos y hembras, b. lámparas para control de fotoperiodo, c. renovación de agua, d. tinas de hembras con equipo de medición, e. calentadores sumergibles con termostato y f. equipo de medición para monitoreo de factores abióticos (termómetro, higrómetro, humidificador, data loggers de temp., lámparas y calentador ambiental). 30
- Figura 9.** Método de reproducción artificial, mediante la aplicación de hormona (acetato de buserelina) CONCEPTAL® (a); se utiliza jeringa para insulina de 1 mL (b), se inyecta intraperitoneal en los organismos (c). 32
- Figura 10.** Obtención de semen a través de una pipeta serológica de 1 mL, introducida en la cloaca del macho. 33
- Figura 11.** Verificación del semen en microscopio y colecta en probetas de 10mL. 34
- Figura 12.** Extracción de ovocitos, en hembra inducida para reproducción artificial y colecta en bandeja de plástico previa a la fertilización e hidratación de huevos. 35
- Figura 13.** Fertilización manual, se mezcla el semen diluido en agua con los ovocitos. 36
- Figura 14.** Transferencia de la puesta después de la fertilización; se procedió a la hidratación de ovocitos, durante 20 o 30 minutos, se hacen manualmente movimientos ondulatorios, provocando que los ovocitos se dispersen. 36
- Figura 15.** Instalaciones del Laboratorio de Investigación y de Servicios en Microbiología Acuática. 51

<b>Figura 16.</b>	Instalaciones del “Ranario Experimental Nicolaita”, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.	52
<b>Figura 17.</b>	Prototipos de incubadoras (diseño propio).	53
<b>Figura 18.</b>	Tinas de plástico con capacidad de 100 L, cada tina representa la unidad experimental (UE).	56
<b>Figura 19.</b>	Equipo utilizado para medición de parámetros fisicoquímicos del agua. a) HACH® modelo FF1A, b) multiparamétrico HANNA® modelo HI9828.	59
<b>Figura 20.</b>	Monitoreo de parámetros fisicoquímicos en el agua de las unidades experimentales.	59
<b>Figura 21.</b>	Lámpara UV, medida preventiva de control de calidad del agua de abastecimiento.	60
<b>Figura 22.</b>	Ubicación de las variables morfométricas conforme a la fase de desarrollo embrionario, las flechas indican la secuencia en que fueron medidas dichas variables.	65
<b>Figura 23.</b>	Obtención de las variables morfométricas.	67
<b>Figura 24.</b>	. Efecto de la profilaxis en las variables conforme a las mediciones. La NS (No significativa). En el ANOVA los $gl= 11$ , la prueba de $t$ , $= 0.005$ y $t= 1.9668$ ; las barras representan el error estándar y las letras en las barras la significancia del factor.	73
<b>Figura 25.</b>	Comportamiento en los niveles de profilaxis (P1 y P2) y las variables respuesta de cada medición. En el ANOVA los $gl= 11$ , la prueba de $t = 0.005$ y $t= 1.9668$ ; las barras representan el error estándar y las letras en las barras la significancia del factor.	74
<b>Figura 26.</b>	Efecto de las variables con diferencias significativas y el factor de las láminas de Agua (D1, D2 y D3). En el ANOVA los $gl= 11$ , la prueba de Tukey $= 0.005$ y $Q= 2.35379$ ; las barras representan el error estándar.	75
<b>Figura 27.</b>	Efecto de las láminas de Agua (D1, D2 y D3) y las variables en relación al nivel de significancia. En el ANOVA los $gl= 11$ , la prueba	

- de Tukey = 0.005 y Q= 2.35379; las barras representan el error estándar y las letras en las barras la significancia del factor. 76
- Figura 28.** Efecto de la Interacción profilaxis (P1 y P2) con Láminas de Agua (D1, D2 y D3) en relación al nivel de significancia. En el ANOVA los gl= 11, la prueba de Tukey = 0.005 y Q= 2.86568; las barras representan el error estándar y las letras en las barras la significancia del factor. 77
- Figura 29.** Comportamiento de la interacción Profilaxis y Láminas de agua en las variables significativas durante las mediciones. En el ANOVA los gl= 11, la prueba de Tukey = 0.005 y Q= 2.86568; las barras representan el error estándar. 78
- Figura 30.** Comportamiento del oxígeno (O1 y O2) y las variables durante las mediciones. NS (no significativo). En el ANOVA los gl= 11, la prueba de t, = 0.005 y t=1.9668, las barras representan el error estándar y las letras señalan diferencias significativas. 79
- Figura 31.** Efecto del oxígeno entre las variables y tiempo de medición. En el ANOVA los gl= 11, la prueba de t, = 0.005 y t=1.9668, las barras representan el error estándar y las letras en las barras la significancia del factor. 79
- Figura 32.** Efectos significativos de la interacción profilaxis y oxígeno, en las variables y las mediciones. En el ANOVA los gl= 11, la prueba de Tukey, = 0.005 y Q= 2.58152, las barras representan el error estándar. 80
- Figura 33.** Comportamiento de los niveles de profilaxis y oxígeno para las variables por medición. En el ANOVA los gl= 11, la prueba de Tukey, = 0.005 y Q= 2.58152, las barras representan el error estándar y las letras señalan diferencias significativas. 81
- Figura 34.** Comportamiento de la interacción Láminas de agua y Oxígeno, en las variables por medición. En el ANOVA los gl= 11, la prueba de Tukey, = 0.005 y Q= 2.86568, las barras representan el error estándar y las letras señalan diferencias significativas. 82
- Figura 35.** Comportamiento significativo de la interacción Láminas de agua y Oxígeno en las variables por medición. En el ANOVA los gl= 11, 83

- la prueba de Tukey,  $\alpha = 0.005$  y  $Q = 2.86568$ , las barras representan el error estándar.
- Figura 36.** Patrón de comportamiento en la interacción de Profilaxis, Láminas de agua y Oxígeno, en las variables por cada medición. En el ANOVA los  $gl = 11$ , la prueba de Tukey,  $\alpha = 0.005$  y  $Q = 3.29051$ , las barras representan el error estándar y las letras señalan diferencias significativas. 84
- Figura 37.** Comportamiento significativo en la interacción Profilaxis, Láminas de agua y Oxígeno, en las variables para cada medición. En el ANOVA los  $gl = 11$ , la prueba de Tukey,  $\alpha = 0.005$  y  $Q = 3.29051$ , las barras representan el error estándar. 85
- Figura 38.** Porcentaje de sobrevivencia para cada UE, al finalizar la última medición. 88
- Figura 39.** Efectos significativos de la profilaxis en las variables para cada medición. En el ANOVA la  $P > F = < 0.0001$ ,  $gl = 17$ , las barras representan el error estándar. 90
- Figura 40.** Comportamiento de la profilaxis en las variables para cada medición. En el ANOVA la  $P > F = < 0.0001$ ,  $gl = 17$ , las barras representan el error estándar y las letras señalan diferencias significativas. 91
- Figura 41.** Comportamiento de la densidad en las variables para cada medición. En el ANOVA la  $P > F = < 0.0001$ ,  $gl = 17$ , las barras representan el error estándar y las letras señalan diferencias significativas. 92
- Figura 42.** Efecto significativo en la densidad para las variables de cada medición. En el ANOVA la  $P > F = < 0.0001$ ,  $gl = 17$ , las barras representan el error estándar. 93
- Figura 43.** Efecto significativo en la interacción P2-D2, en las variables de cada medición. En el ANOVA la  $P > F = < 0.0001$ ,  $gl = 17$  (MED 2,3 y 4)  $gl = 16$  (MED 5), las barras representan el error estándar. 94
- Figura 44.** Efecto significativo de la interacción profilaxis y densidad, en las variables de cada medición. En el ANOVA la  $P > F = < 0.0001$ ,  $gl = 17$  95

- (mediciones 2,3 y 4)  $gl=16$  (medición 5), las barras representan el error estándar.
- Figura 45.** Comportamiento de la interacción Alimento, en las variables para cada medición. En el ANOVA la  $P>F= <0.0001$  y  $P>F= 0.0031$  (Boca),  $gl= 17$ , las barras representan el error estándar y las letras señalan diferencias significativas 96
- Figura 46.** Efecto significativo de la interacción alimento, en las variables para cada medición. En el ANOVA la  $P>F= <0.0001$  y  $P>F= 0.0031$  (Boca),  $gl= 17$ , las barras representan el error estándar. 97
- Figura 47.** Efecto significativo de la interacción Profilaxis y Alimento, en las variables para cada medición. En el ANOVA la  $P>F= <0.0001$  y  $P>F= 0.0031$  (Boca),  $gl= 17$  (MED 2,3 y 4)  $gl=16$  (MED 5), las barras representan el error estándar. 98
- Figura 48.** Comportamiento de la combinación P2-A1, en las variables de cada medición. En el ANOVA la  $P>F= <0.0001$  y  $P>F= 0.0031$  (Boca),  $gl= 17$  (MED 2,3 y 4)  $gl=16$  (MED 5), las barras representan el error estándar y las letras señalan diferencias significativas. 99
- Figura 49.** Comportamiento de la combinación D1-A1, en las variables de cada medición. En el ANOVA la  $P>F= <0.0001$  y  $P>F= 0.0031$  (Boca),  $gl= 17$  (MED 2,3 y 4)  $gl=16$  (MED 5), las barras representan el error estándar y las letras señalan diferencias significativas. 100
- Figura 50.** Efecto significativo de la interacción Densidad y Alimento, en las variables para cada medición. En el ANOVA la  $P>F= <0.0001$  y  $P>F= 0.0031$  (Boca),  $gl= 17$  (MED 2,3 y 4)  $gl=16$  (MED 5), las barras representan el error estándar. 101
- Figura 51.** Efecto significativo de la interacción Profilaxis, Densidad y Alimento, en las variables para cada medición. En el ANOVA la  $P>F= <0.0001$  y  $P>F= 0.0031$  (Boca),  $gl= 17$  (MED 2,3 y 4)  $gl=16$  (MED 5), las barras representan el error estándar. 102
- Figura 52.** Comportamiento de la combinación D1-A1, en las variables de cada medición. En el ANOVA la  $P>F= <0.0001$  y  $P>F= 0.0031$  (Boca),  $gl= 17$  (MED 2,3 y 4)  $gl=16$  (MED 5), las barras representan el error estándar y las letras señalan diferencias significativas. 103

**Figura 53.** Mercados de interés económico, que involucran a la ranicultura a nivel mundial. Elaboración propia, de acuerdo a la opinión de Siqueiros (2012).

114

## I. RESUMEN GENERAL

### PROTOCOLO PARA LA REPRODUCCIÓN, INCUBACIÓN Y CRECIMIENTO DE RANA TORO AMERICANA (*Lithobates catesbeianus* SHAW, 1802) EN CONDICIONES CONTROLADAS EN MÉXICO

La ranicultura es una actividad acuícola, dedicada a la crianza de anuros con fines comerciales. La especie de mayor demanda en el mundo, es *Lithobates catesbeianus* (rana toro americana), considerada como una de las especies de mayor importancia económica, debido a que su cultivo está generalmente enfocado a la producción de alimentos. Su popularidad ha ido aumentando a nivel mundial. En años recientes se ha impulsado su desarrollo, tal es el caso de Michoacán, donde a partir del 2010, se establecieron 43 Unidades de Producción Acuícola (UPA). No obstante, no se han documentado estudios de densidad, ni profilaxis en esta área. Por lo tanto, fue necesaria la estandarización de técnicas del cultivo bajo condiciones controladas, con el objetivo de desarrollar un protocolo para la reproducción artificial, incubación y crecimiento inicial de rana toro americana a escala comercial. Se estableció un ranario experimental, en donde se mantuvieron organismos de rana toro americana en etapa adulta, para su reproducción artificial, así como también se crearon prototipos de incubadoras para evaluar el desarrollo y crecimiento de los organismos durante el desarrollo embrionario R0-R1 y desarrollo larval R2-R3, sometidos a diferentes tratamientos (oxígeno, profilaxis, alimento y densidad). En la reproducción artificial, se ajustaron las variables ambientales, se estandarizó la metodología, adecuando los tiempos y dosis de hormona (acetato de buserelina) a la que son sometidos los organismos. En la fase de incubación, los mejores tratamientos para el crecimiento son altura de lámina de agua de 6.5 cm, profilaxis con yodo povidona (0.05ml/L), oxígeno, sin incremento en la concentración. Durante el desarrollo larval, se obtuvo mayor crecimiento cuando no se aplicó profilaxis, densidad de 1 organismo/2L de agua y ración de alimento suministrada una vez al día (*ad libitum*).

Palabras clave: Ranicultura, reproducción artificial, incubación, larvicultura.

## II. ABSTRACT

### PROTOCOL FOR REPRODUCTION, INCUBATION AND GROWTH OF AMERICAN BULLFROG (*Lithobates catesbeianus* SHAW, 1802) IN CONTROLLED CONDITIONS IN MEXICO

Bullfrog farming is an aquaculture activity, dedicated to raising anurans for commercial purposes. The species of greatest demand in the world is *Lithobates catesbeianus* (American bullfrog), considered as one of the species of greater economic importance because its cultivation is generally focused on the production of food. Its popularity has been increasing worldwide. In recent years, its development has been boosted, such as Michoacán, where in the year 2010, 43 aquaculture production units (APU) were established. However, no studies of density or prophylaxis have been documented in this area. Therefore, it was necessary to standardize cultivation techniques under controlled conditions, with the aim of developing a protocol for artificial reproduction, incubation and initial growth of American bullfrog on a commercial scale. An experimental frog farm was established in which adult bullfrog organisms were kept in adult stage for artificial reproduction, as well as incubator prototypes were created to evaluate the development and growth of organisms during the embryonic development R0-R1 and larval development R2-R3, undergoing different treatments (oxygen, prophylaxis, food and density). In artificial reproduction, the environmental variables were adjusted, the methodology was standardized, fitting times and doses of hormone (buserelin acetate) to which the organisms are subjected. In the incubation phase, the best treatments for growth are water sheet height of 6.5 cm, prophylaxis with povidone iodine (0.05 ml / L), oxygen, with no increase in concentration. During larval development, higher growth was obtained when no prophylaxis was applied, the density ratio was of a single organism / 2L of water and food ration supplied once daily (ad libitum).

Keywords: Raniculture, artificial reproduction, incubation, larviculture

### III. INTRODUCCIÓN GENERAL

A nivel mundial, se estima que hay cerca de 7,187 especies de anfibios, de los cuales cerca de 6,333 especies están representadas por el Orden Anura, por lo que es considerado el grupo con mayor diversidad (Frost, 2013; Parra-Olea, *et al.*, 2014). En México, la diversidad total de anfibios se estima en 376 especies, de las cuales 237 están representadas por Anura, es así como se posiciona a México en el quinto país con mayor riqueza de anfibios en el mundo (Parra-Olea, *et al.*, 2014).

Los anfibios son clasificados en tres órdenes, Anura (ranas y sapos), Caudata (salamandras y tritones) y Gymnophiona (cecilias) (Parra-Olea, *et al.*, 2014). La alta diversidad de especies constituye uno de los elementos más importantes de la fauna del país, sin embargo se considera que alrededor de 164 especies, están amenazadas o críticamente amenazadas, esto equivale al 43% de la diversidad total. Las causas principales son los factores antropogénicos, tales como la destrucción de hábitat, efecto del cambio climático, enfermedades infecciosas emergentes, entre otras (Parra-Olea, *et al.*, 2014).

En el caso específico de Rana toro americana (*Lithobates catesbeianus* Shaw, 1802) es una especie exótica, introducida en México a principios de la década de los sesenta, con fines de aprovechamiento acuícola sin embargo, otras especies endémicas ya eran aprovechadas desde épocas anteriores (Casillas, 1999).

La introducción de rana toro en todo el mundo, se debió a su importancia económica como alimento, considerándose como una especie potencial para la acuicultura, dando origen a la ranicultura (FAO, 2005-2013).

Se entiende, que rana toro americana (*Lithobates catesbeianus* Shaw, 1802) representa una gran amenaza para las poblaciones endémicas de anfibios, debido a que es una especie dominante en los hábitats acuáticos en los que se encuentra (AmphibiaWeb, 2015), al grado de provocar interacciones inter-específicas

perjudiciales para otras especies de anfibios y reptiles, tales como depredación, desplazamiento, competencia, disminución de poblaciones, etc. Por lo tanto, se han realizado diversos análisis de correlaciones múltiples para comprobar dichos supuestos. Por ejemplo, se correlacionó a rana toro en la disminución de las ranas de patas rojas del norte en el oeste de Washington; al evaluar tal efecto, se encontró que la causa se debía a la presencia de especies de peces exóticos en el medio y no a la presencia de rana toro. Otros estudios que evalúan si la presencia de renacuajos de rana toro influía en la supervivencia de otros anfibios, se encontró que sí había una disminución en cuanto al número de organismos de otras ranas, pero tal efecto en la supervivencia, no era ocasionado por rana toro, sino por otros factores ajenos a esta especie (Amphibiaweb, 2015).

También, se han visto otras interacciones ecológicas, en las cuales, rana toro se ha reproducido con rana verde, originando híbridos inviables, sin embargo, este fenómeno es poco común en la naturaleza, por lo que no se le considera como una amenaza fuerte para las especies nativas (Ávila, 2007).

En México, aun cuando la distribución de rana toro es amplia, por el momento, no se tienen registros de efectos negativos de su introducción al ambiente (CIDEM, 2010). No obstante, por ser una especie introducida, es necesario llevar a cabo medidas de prevención que eviten la propagación desmedida en medios naturales.

Un caso particular de sobreexplotación de especies endémicas, como *L. megapoda*, *L. montezumae* y *L. pipiens*; es que son también especies aprovechadas en la acuacultura para fines alimenticios, ocasionando la reducción de sus poblaciones naturales. Actualmente *L. megapoda* y *L. montezumae* están sujetas a la categoría de protección especial (Pr), según la NOM-059-SEMARNAT-2010 (2010).

Una de las estrategias de manejo y prevención, encaminadas hacia la protección de las especies endémicas, ha sido la creación de unidades de producción bajo sistemas controlados, que eviten causar graves impactos ambientales, como la

reintroducción de especies exóticas a medios naturales, tal es el caso de especies introducidas con fines alimenticios, como *L. catesbeianus*. De esta forma se busca desviar el interés de las personas a seguir capturando especies endémicas (como: *L. montezumae*, *L. pipiens*, *L. megapoda*) que pongan en riesgo las poblaciones naturales.

El gran reto para México es controlar las amenazas ambientales que ponen en riesgo la riqueza natural del país; al mismo tiempo se trabaja en investigación dirigida a la generación de estrategias de manejo y prevención, que permitan implementar rápidamente los análisis de riesgo (Mendoza y Koleff 2014). Igualmente es necesario la ejecución adecuada de proyectos que minimicen el impacto, siendo así la clave para la supervivencia de muchas especies, no solo de los anfibios (Baillie *et al.*, 2010).

“El aprovechamiento integral de la rana como un recurso biológico, representa un claro ejemplo de una actividad productiva que no afecta al ambiente, coadyuva a la preservación de las especies silvestres y se categoriza como un sistema biotecnológico de alto rendimiento y además ecológico”, ya que permite emplear técnicas a favor del ambiente (Casillas, 1999).

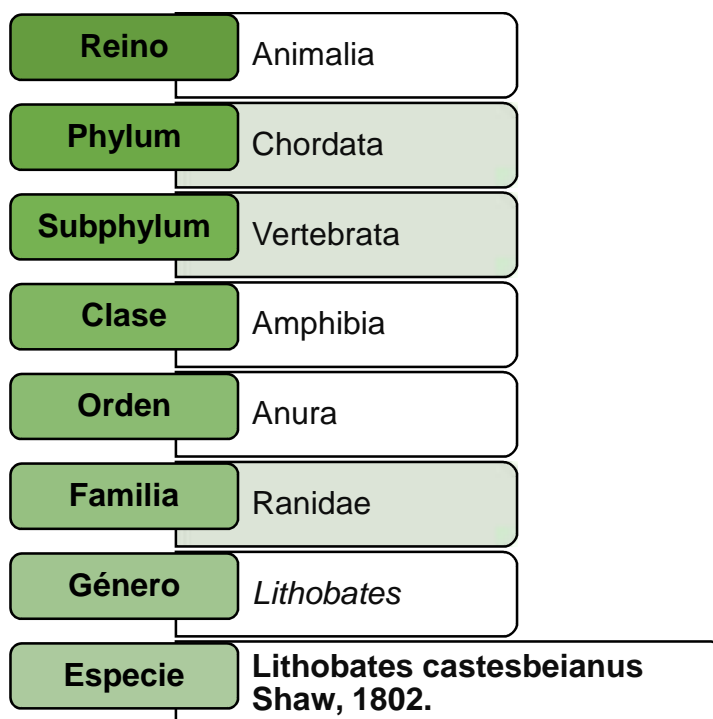
### **3.1 Generalidades de *L. catesbeianus* (Rana toro americana)**

#### **3.1.1 Clasificación taxonómica**

En Estados Unidos es comúnmente conocida como “American Bullfrog”, “Bullfrog” o “Common Bullfrog”, en México se conoce como “Rana toro americana” o “Rana toro”, algunos sinónimos por la que es también conocida: *Rana catesbeiana* Shaw, 1802 (IUCN, 2009).

Fue reclasificada en el 2006, pasando de *Rana catesbeiana* a *Lithobates catesbeianus* (Frost *et al.*, 2006). La clasificación taxonómica es la siguiente:

**Cuadro 1.** Clasificación taxonómica de rana toro americana, de acuerdo a IUCN (2009).



### 3.1.2 Estado de conservación

De acuerdo a la lista roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN por sus siglas en inglés) (2009), *L. catesbeianus*, se encuentra listada bajo la categoría “Least concern” (LC), catalogada como de preocupación menor, en vista de su amplia distribución y la tolerancia a una amplia diversidad de hábitats.

### 3.1.3 Distribución

Rana toro americana es originaria de Canadá (Quebec, Ontario, Nueva Escocia, Nuevo Brunswick) y Estados Unidos (Connecticut, Maine, Massachusetts, Nueva Hampshire, Rhode Island, Vermont, Alabama, Arkansas, Delaware, Florida, Georgia, Illinois, Indiana, Kansas, Kentucky, Louisiana, Maryland, Michigan, Mississippi, Missouri, Nueva Jersey, Nueva York, Carolina del norte, Ohio, Oklahoma,

Pennsylvania, Carolina del Sur, Dakota del Sur, Tennessee, Texas, Virginia, Virginia del Oeste, Wisconsin) (GISD, 2009).

Se ha introducido en más de 40 países y cuatro continentes, durante el último siglo (GISD 2009); tal es el caso de: México; Argentina (Misiones); Bélgica; Brasil; China; Colombia; Cuba; República Dominicana; Ecuador; Francia; Alemania; Grecia; Indonesia; Italia; Jamaica; Japón; Malasia; Países Bajos; Perú; Filipinas; Puerto Rico; Singapur; España; Taiwán, Provincia de China; Tailandia; Reino Unido; Uruguay; Venezuela, República Bolivariana (IUCN, 2009).

Muchas introducciones han sido intencionales con el fin de establecer nuevas fuentes de alimentos para el consumo humano; otras poblaciones se han establecido a partir de fugas de las granjas de rana toro, también, como medida de control biológico de plagas de insectos agrícolas, mascotas de acuario y para mejora de paisajes en estanques ornamentales; por lo general no hay responsabilidad social por mantener a esta especie alejada de los medios naturales (GISD, 2009).

#### **3.1.4 Morfología**

Conforma una de las especies de mayor tamaño en el grupo, ya que los adultos alcanzan tallas (hocico-cloaca) de 10 a 20 cm; su peso varía de 60 hasta 900 g. Para el caso de las larvas, son también grandes, miden de entre 15 y 18 cm de longitud total (FAO, 2005-2013).

Presenta múltiples patrones de coloración, aunque por lo general, su dorso varía de verde olivo a café verdoso, normalmente con manchas verdes o cafés (Ávila, 2007); en ocasiones puede llegar a ser marrón, amarilla, albina o azul. A veces su coloración se torna conforme al medio en el que viven, los factores que influyen son la incidencia de luz, humedad, temperatura y la coloración del ambiente (Cribb, *et al.*, 2013).

La madurez sexual, dependerá del medio en el que se desarrollen, ya que los factores ambientales (fotoperiodo, temperatura y humedad), influyen en el crecimiento. Por lo general las hembras la alcanzan de 2 a 3 años y los machos de 1 a 2 años; se tiene registro de que en hábitats fríos, rana toro alcanza su madurez de 2 a 4 años,

mientras que el climas cálidos alcanzan su talla en 1 año, esta información cambia con respecto a organismos de vida libre y en cautiverio (AmphibiaWeb, 2015).

Las principales características sexuales secundarias, en machos son: coloración amarilla en la región gular, diámetro del tímpano de dos a tres veces más grande que el tamaño de su ojo y presencia de callo nupcial. Mientras que, las hembras, tienen el tímpano del mismo tamaño que su ojo, coloración gular blanca (Alonso, 1997).

Son de hábitos nocturnos, y es común que emitan sonidos que dependerán de la situación en que se encuentren. Los machos emiten un sonido semejante al de un toro (de ahí deriva su nombre “rana toro”), es característico cuando están en periodos de reproducción; la llamada de apareamiento tiene una nota que dura 0,8 segundos a una frecuencia de 1,0 kHz (AmphibiaWeb, 2015). Las hembras emiten sonidos distintos al de los machos, por lo general son sonidos de alerta contra depredadores.

Son animales ectotérmicos o de sangre fría, ya que su temperatura y metabolismo varía con la del ambiente, son especialmente dependientes del agua para reproducirse, para realizar el equilibrio hidro-electrolítico, para eliminar excretas y mudar piel (Cribb, *et al.*, 2013).

Presentan respiración bucofaringea, pulmonar y cutánea. Patas posteriores con membranas interdigitales, robustas y largas (representando hasta 50% de longitud total del cuerpo y hasta 40% del peso total).

Se ha estimado que pueden vivir de 7 a 10 años en vida libre y hasta 16 años en cautiverio (CONABIO 2008) (fig. 1).



**Figura 1.** Macho adulto de *Lithobates catesbeianus*. Fotografía tomada en “Granja Uanasahuonduranopu”, ubicada en el municipio de Uruapilla, Michoacán, julio del 2014.

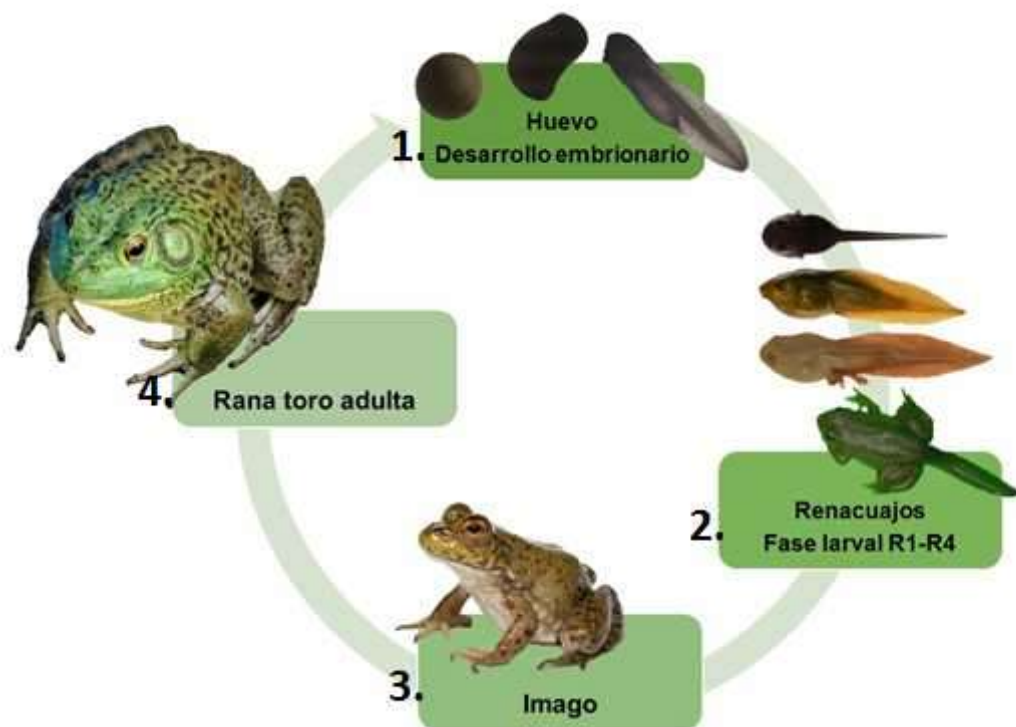
### 3.1.5 Ciclo de vida

Estos anfibios pueden ser definidos como animales que poseen una fase de vida inicial, denominada larval, en la mayor parte del tiempo es acuática, seguida de un proceso metamórfico completo en el que tiende a ser terrestre (fig. 2) (Cribb, *et al.*, 2013). En el caso específico de la fase larval, la literatura la identifica con las siglas “G1, G2, G3 y G4” (derivado de la palabra del portugués “girino”= renacuajo), no obstante, en este trabajo la fase larval se identifica con las siglas “**R1, R2, R3 y R4**”. De acuerdo al ciclo de vida zootécnico, las características de cada fase son:

- ➔ R0 o embrión: durante el desarrollo embrionario, previo a la eclosión.
- ➔ R1 o larva inicial: se le denomina así hasta después de la eclosión, sus características principales es que carecen de aparato digestivo propio, aún no hay absorción de alimentos exógenos y presentan branquias externas
- ➔ R2: ausencia de vitelo (fue consumido totalmente), branquias interiorizada, boca y sistema digestivo bien desarrollado y demanda de alimento del exterior. Se ubican en el sector de larvicultura.

- ➔ R3: comienza a brotar las extremidades inferiores (región próxima a la cola), se da inicio a la metamorfosis. Conforme su desarrollo se recomienda separarse a otro sector.
- ➔ R4 o clímax metamórfico: aquí surgen las extremidades superiores formados al interior del cuerpo, rompen la piel y salen al exterior, la cola comienza a reabsorberse y la boca se alarga; esta fase termina cuando la cola desaparece y la boca se abre.
- ➔ Imago, ranita: metamorfosis completa, los organismos demandan alimento del exterior, sus hábitos alimenticios cambian, será compuesto por la ración comercial. En cuanto los organismos rebasan los 50g de peso, entonces se dejan de denominar imagos y pasan al sector de engorda inicial.
- ➔ Rana: completaron su ciclo metamórfico, se alimentan de ración comercial, rebasan los 50g de peso, abarcan los estadios juvenil y adulto. Se ubican en el sector de reproducción o engorda.

El tiempo entre cada fase de desarrollo, dependerá de las condiciones en que se encuentre y la disponibilidad de alimento, por ejemplo en cautiverio y bajo condiciones controladas, puede alcanzar su ciclo de huevo a adulto en 7 meses, mientras que en vida libre (su hábitat original) completa su ciclo de vida en 4 años (Cribb, *et al.*, 2013).



**Figura 2.** Ciclo de vida, fases de desarrollo zootécnico de *Lithobates catesbeianus*: 1. desarrollo embrionario; 2. desarrollo larval “R1-R4”, corresponde todo el desarrollo larval hasta completar la metamorfosis; 3. imago (o ranita) corresponde a pre-engorda y 4. Rana toro adulta, etapa de engorda y reproducción. Imagen propia, elaborada por Martha Rangel.

### 3.1.6 Hábitat

La rana toro adulta es principalmente acuática y prefiere los hábitats lénticos cálidos, tales como bancos de arena con vegetación, aguas lentas, estanques, embalses, pantanos o humedales, a menudo prefieren sitios con vegetación emergente. También ocupan las orillas de lagos y arroyos (AmphibiaWeb, 2015).

Prefieren temperaturas ambientales relativamente altas ( $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) de cualquier forma son termorreguladores. Los adultos generalmente permanecen inactivos hasta que la temperatura del agua se acerca a  $15^{\circ}\text{C}$ . A diferencia de muchas otras ranas, rana toro puede coexistir con peces depredadores. Los juveniles, son expertos en colonizar estanques de nueva creación y son de fácil dispersión (AmphibiaWeb, 2015).

### 3.1.7 Reproducción

Presentan fertilización externa, en la cual los ovocitos son fecundados a la vez que son depositados en el agua. Las masas de huevos, que varían entre 10,000 y 25,000 huevos, permanecen flotando durante el primer día para posteriormente depositarse al fondo del estanque hasta el nacimiento de los renacuajos, 3 a 5 días después. Se han registrado puestas de hasta 40,000 huevos. El desarrollo de los embriones dependerá de la disponibilidad de oxígeno que haya en el medio. Los renacuajos se desarrollan a diferentes tiempos según los niveles de oxígeno, la disponibilidad de alimento y la temperatura del agua, pudiendo ocurrir la eclosión en solo 3 o 4 días. Para su desarrollo, los renacuajos prefieren aguas cálidas entre 24 y 30°C. Los individuos adquieren la madurez sexual a los 2 años de edad, pero esto varía de acuerdo a la latitud y el clima. La temporada de reproducción es en la primavera e inicios del verano; sin embargo, a menores latitudes ésta inicia más temprano (AmphibiaWeb, 2015; GISD, 2009).

### 3.1.8 Dieta

La alimentación difiere entre cada fase de desarrollo: las larvas después de la eclosión (R1 y R2) son omnívoros, se alimentan de lo que haya disponible en el medio acuático, principalmente, plancton, perifiton, vegetales y musgos (Cribb, *et al.*, 2013). Mientras que en fase adulta son, carnívoros, considerados como depredadores oportunistas voraces, en vida libre se alimentan de todo lo que se encuentran a su paso; puede atacar fácilmente cualquier animal vivo aún más grandes que ellos, sus congéneres y otras ranas. El canibalismo está bien documentado, y sus congéneres pueden comprender hasta el 80% de la dieta (AmphibiaWeb, 2015). En cautiverio, los adultos son alimentados con ración para truchas y algunas veces se les complementa con larvas de mosca (*Musca domestica*) y tenebrios (*Tenebrio molitor*)

En años recientes, se continúa con el aprovechamiento de especies de anuros, que varía en cada región de México, tal es el caso del sureste mexicano en donde el

consumo es bajo, se realiza de manera ocasional y con fines medicinales, mientras que en el centro y norte del país es más común encontrar granjas de rana, en estados como: Querétaro, Sinaloa, Guanajuato, estado de México, Jalisco y Michoacán, siendo *L. catesbeianus*, la de mayor demanda para cultivo con fines alimenticios (Calderón-Mandujano, 2010).

Así mismo, se ha incrementado la promoción del desarrollo de la actividad ranícola en México, a través de centros de investigación y desarrollo de proyectos sobre el cultivo de rana toro americana en el país, considerándose como una actividad nacional potencial de importancia económica para el sector acuícola. En ese sentido, México, representa un terreno fértil para la actividad debido a sus características biológicas y su cercanía con Estados Unidos, que es el principal país consumidor de carne de rana (Casillas, 1999).

En Michoacán partir del 2010 se impulsó el establecimiento de criaderos de Rana toro, alcanzando 21 unidades de producción acuícola (UPA). En el año 2014 el estado representó el 58.53% de la producción total en criadero a nivel nacional y el 96.59% de la producción de captura (CONAPESCA, 2016). Actualmente en el estado hay 45 UPA, con capacidad de producir aproximadamente 240 toneladas por año.

No obstante, en Michoacán no se han documentado los procesos en esta área, ni se han establecido protocolos, medidas o normas necesarias que permitan a los productores replicar las técnicas aprendidas.

Como parte de las estrategias sugeridas, la Facultad de Biología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, inició un “Programa de Investigación sobre rana endémica e introducida en el Estado de Michoacán”, del cual se deriva este proyecto, que tiene como finalidad solucionar los problemas que actualmente atañen a los ranicultores del estado. Es por eso, importante la creación de un protocolo referente a la reproducción artificial y su estandarización en condiciones controladas; además del conocimiento de nuevas técnicas de crianza

durante la incubación y el desarrollo larval, a través de la aplicación de tratamientos de profilaxis, densidad, oxígeno y ración de alimento, que influyan en el crecimiento de los organismos. Así mismo, se espera incrementar la disponibilidad de renacuajos e imagos durante todo el año y con ello disminuir los costos de producción actuales.

## IV. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo general

Elaborar un protocolo para la reproducción artificial, incubación y desarrollo larval de *Lithobates catesbeianus* a escala comercial, en condiciones controladas.

### 4.2 Objetivos particulares

- 4.2.1 Desarrollar la técnica de reproducción artificial conforme a las condiciones ambientales de Morelia y características fenotípicas de los organismos.
- 4.2.2 Conocer el comportamiento de los factores de profilaxis, Lámina de agua, Densidad, oxígeno y Ración de alimento el crecimiento y desarrollo larval en las fases R1-R3.
- 4.2.3 Identificar patrones de comportamiento y definir las condiciones más favorables para la incubación y crecimiento inicial en renacuajos.

## **CAPÍTULO 1**

# **REPRODUCCIÓN ARTIFICIAL DE RANA TORO AMERICANA**

## 1.1 RESUMEN

### REPRODUCCIÓN ARTIFICIAL EN RANA TORO AMERICANA (*Lithobates catesbeianus* SHAW, 1802) BAJO CONDICIONES CONTROLADAS EN LA CIUDAD DE MORELIA, MICHOACÁN, MÉXICO

La reproducción artificial de rana toro americana (*Lithobates catesbeianus* Shaw, 1802) está dirigida a controlar la reproducción durante todo el año en sistemas de producción a escala comercial, la eficacia de la reproducción dependerá del control de factores abióticos (temperatura, humedad relativa y fotoperiodo) en sincronía con la aplicación de hormona (acetato de buserelina) para completar la estimulación de los reproductores. El objetivo fue desarrollar la técnica de reproducción artificial conforme a las condiciones ambientales de la ciudad de Morelia y evaluación de la inducción y ovulación durante la reproducción. Se monitorearon las variables ambientales y se registraron las observaciones de cada inducción. Fue posible estandarizar los parámetros fisicoquímicos del agua y mantener la estimulación constante en los reproductores bajo condiciones controladas de temperatura, humedad relativa y fotoperiodo; además se ajustaron dosis y tiempos de aplicación de hormona sin afectar la eficacia de la reproducción, obteniendo número significativo de ovocitos 19,000 y 82.27% de eclosión.

**Palabras clave:** Reproducción artificial, acetato de buserelina, condiciones controladas.

## 1.2 ABSTRACT

### **ARTIFICIAL REPRODUCTION IN AMERICAN BULLFROG (*Lithobates catesbeianus* SHAW, 1802) UNDER CONTROLLED CONDITIONS IN THE CITY OF MORELIA, MICHOACÁN, MEXICO**

Artificial reproduction of the American bullfrog (*Lithobates catesbeianus* Shaw, 1802) is aimed at controlling year-round reproduction in commercial scale production systems; the effectiveness of reproduction depends on the control of abiotic factors (temperature, relative humidity and photoperiod) in synchrony with the application of hormone (buserelin acetate) to complete the stimulation of the reproducers. The objective was to develop the technique of artificial reproduction according to the environmental conditions of the city of Morelia and evaluation of the induction and ovulation during reproduction. The environmental variables were monitored and observations of each induction were recorded. It was possible to standardize the physicochemical parameters of the water and to maintain constant stimulation in the reproducers under controlled conditions of temperature, relative humidity and photoperiod; In addition, doses and times of hormone application were adjusted without affecting reproduction efficiency, obtaining a significant number of oocytes 19,000 and 82.27% of hatching.

**Keywords:** Artificial reproduction, buserelin acetate, controlled conditions.

### 1.3 INTRODUCCIÓN

El declive en las poblaciones de anfibios, el incremento en número de especies amenazadas y la creciente demanda en la producción de anfibios con fines alimenticios, ha estimulado el desarrollo de nuevas tecnologías, para cada especie en particular; dichas tecnologías, han sido enfocadas en ámbitos como: la ecología y conservación, educación, biomédicas, producción, nutrición, biotecnología, cosmetología, etc. (FAO, 2005-2013).

Las investigaciones se desarrollan principalmente con especies en cautiverio, logrando avances en mejoramiento genético, reproducción asistida, desarrollo embrionario, alimentación, crecimiento, metamorfosis y control de enfermedades.

El desarrollo de tecnología enfocado en la producción, ha viabilizado la ranicultura en el caso particular de *Rana toro*, se han optimizado las técnicas de crianza en cautiverio bajo sistemas controlados, permitiendo establecer protocolos de reproducción asistida (Pereira, *et al.*, 2012).

Dentro de este escenario, los estudios están dirigidos a controlar la reproducción conforme a las necesidades de producción a escala comercial, para ello se han realizado estudios de fisiología en rana para conocer los procesos fisiológicos de maduración, así como también sobre las variables ambientales de las que depende el organismo para la estimulación (Nascimento, *et al.*, 2014).

La reproducción en anfibios es estacional, en México el periodo de reproducción natural en *rana toro* es de marzo a septiembre, se identificó que la temperatura y humedad relativa, son las variables fundamentales para estimular la reproducción e incluso durante los meses de invierno, los estímulos son decisivos en el proceso de maduración final y en la ovulación de los reproductores (Costa, *et al.*, 2011 y Nascimento, *et al.*, 2014).

Las técnicas con el uso de hormonas liberadoras de gonadotropina (GnRH) en la reproducción de anfibios es usada para controlar los desoves en todo el año, evitando atrasos en la producción e incluso sincronizar con los meses más fríos (Costa *et al.*, 2011).

Diversos estudios sobre reproducción artificial, han demostrado que el uso de hormonas, son la alternativa más viable, ya que facilita la obtención de desoves de buena calidad, permite controlar las condiciones climáticas durante la incubación y eclosión de los huevos, para el buen desempeño de las crías (Ribeiro Filho *et al.*, 1998); actualmente la hormona más utilizada en ranarios y de mejor desempeño es el acetato de buselerina (Nascimento, *et al.*, 2014). Sin embargo, aún es necesario mejorar la técnica descrita, ajustando las dosis adecuadas (varían de acuerdo a los técnicos), selección de organismos viables, factores abióticos favorables (temperatura, fotoperiodo, humedad relativa, entre otros), para garantizar el aumento en la producción de renacuajos e imagos de calidad para la ranicultura (Pereira, *et al.*, 2012).

El acetato de buselerina (GnRHa), es una hormona análoga que tiende a reducir los costos y a proporcionar buenos resultados en rana toro, resultando eficaz en la fecundidad, fertilidad y eclosión (Nascimento, *et al.*, 2014).

En este capítulo se describe la técnica de reproducción artificial y su estandarización, en las condiciones ambientales de Morelia.

## 1.4 MATERIAL Y MÉTODOS

### 1.4.1 Área de experimentación

Este proyecto se desarrolló en el “Ranario Experimental Nicolaita”, ubicado en el laboratorio de Biología Acuática “J. Javier Alvarado Díaz”, de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, construido con recursos de la Fundación educación Superior-Empresa (FESE A.C.)



**Figura 3.** Instalaciones del “Ranario Experimental Nicolaita”, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

### 1.4.2 Consideraciones preliminares

Aunque las instalaciones del “Ranario Experimental Nicolaita”, se hicieron para cubrir las necesidades de este trabajo, fue necesario adecuarlas conforme a las recomendaciones descritas por Cribb, *et al.*, (2013), sobre instalaciones, manejo y mantenimiento de reproductores, a modo de asegurar que los organismos se adapten, previo a la reproducción artificial.

Se implementaron los protocolos de sanidad e inocuidad alimentaria, conforme a los procedimientos establecidos en el “Manual de Buenas Prácticas de Producción Acuícola de Trucha para la inocuidad alimentaria (BPPAT) (SENASICA, 2003), ajustándose a las características adecuadas para la especie de estudio (por carecer de un manual específico para rana toro). Lo anterior, tuvo como finalidad, la reducción de riesgos sanitarios al interior de la unidad acuícola y la prevención de posibles problemas con la seguridad e inocuidad de los alimentos.

Para hacer los ajustes necesarios y contar con las condiciones especificadas en el mantenimiento de los reproductores, se realizó lo siguiente:

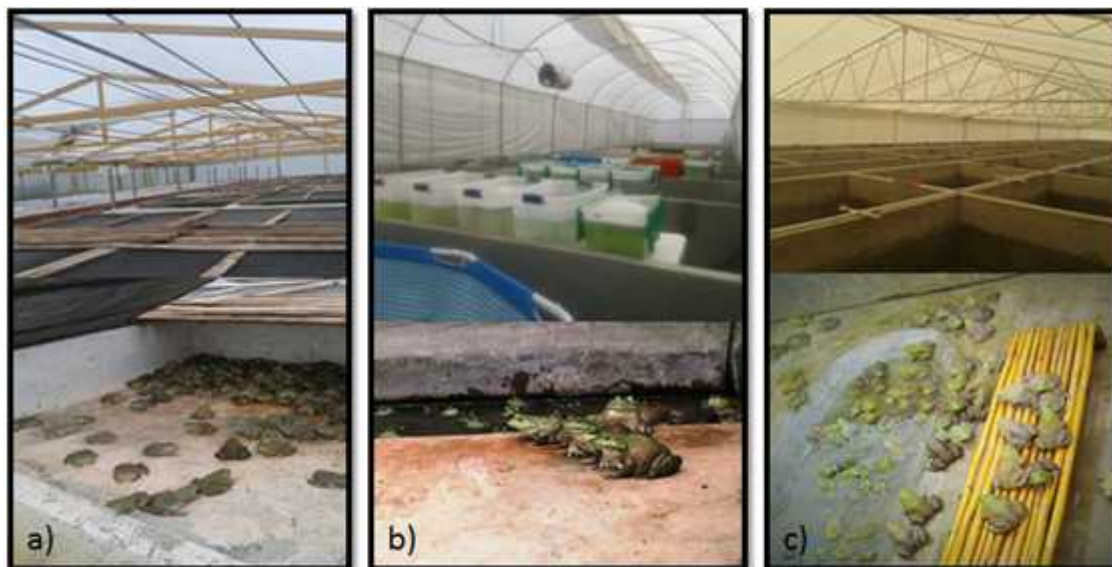
- Acondicionamiento de 2 tinas de plástico, con dimensiones de 1.47m largo X 1.06m ancho X 0.48m profundo (capacidad de 900 L), colocadas con una pendiente de 10°, simulando un sistema semi-inundado (40% área seca y 60% área inundada).
- No se pusieron comederos ni abrigos.
- Se usó malla de tela con abertura de 4mm, para evitar la fuga de organismos y permitiera la entrada de luz natural.
- La humedad relativa (HR) se midió con un higrómetro digital marca Exo-Terra®, el registro de medición se realizó dos veces al día, por la mañana y tarde, durante los periodos de reproducción.
- Los monitoreos de temperatura ambiental, temperatura del agua e intensidad de luz, se registraron con data loggers HOBO®, durante el periodo de incubación las 24 horas del día y con registros en intervalos de una hora al interior de las tinas de reproductores.
- Se colocaron calentadores con termostato sumergibles de 50W, para acuario marca SUNNY®, para mantener la temperatura del agua en intervalos de 23 ±2°C.
- Se incluyeron lámparas de acuario de luz fluorescente (marca SUNNY®) de 25W, intensidad de 64 lux. Asegurando el fotoperiodo de 14 horas luz y 10 horas oscuridad (14:10) (la intensidad de la luz aumentó conforme la hora del día y el clima).

- Debido a que en invierno la temperatura ambiental descendió, se incluyeron calentadores ambientales de cerámica automáticos (marca Lasko®, modelo CT30710), a modo de mantener la temperatura ambiental en intervalo de  $27 \pm 2^\circ\text{C}$  durante la noche.
- Se instaló una lámpara UV, marca BOYU®, modelo UVC-18W, como medida preventiva de calidad del agua, que aseguró que el agua se mantuviera cristalina, eliminando algas, bacterias y microorganismos, evitando que se tornara a verde, generara olor desagradable y mantuviera la calidad del agua, conforme la garantía de la marca.
- Se mantuvo monitoreo de la calidad del agua de la fuente de abastecimiento, a modo de estandarizar los valores adecuados para el mantenimiento de los reproductores, conforme a Cribb, *et al.* (2013): temperatura promedio de  $23^\circ\text{C}$ ; pH 7; oxígeno disuelto 4 mg/L; conductividad eléctrica 150  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ; amonio hasta 0.5mg/L, nitritos 0.5mg/L, cloro 0.02mg/L, dureza y alcalinidad hasta 40mg/L. El monitoreo se realizó con un multiparamétrico HANNA® (modelo HI-9828) y un equipo HACH®, modelo FF1A.
- Se incorporó un humidificador ambiental, marca SUNSHINE®, que fue colocado durante el día, contiguo al sector de reproducción, para mantener la humedad  $>50\%$ , el registro de la humedad relativa se midió con un higrómetro digital de la marca Exoterra®.

### 1.4.3 Selección y obtención de organismos

Los organismos fueron adquiridos de tres granjas del estado de Michoacán (fig. 4), seleccionados con base en las características fenotípicas adecuadas para la reproducción artificial, recomendadas por Afonso (2004) una vez identificados, se eligieron al azar 35 individuos (cuadro 2), estando sujetos a la disponibilidad de organismos aptos y a la información disponible sobre su historia de vida (procedencia, edad, alimentación, etc). La selección de individuos de diferentes sitios, es un método que permite obtener mayor variación genética entre individuos, de tal forma que a mayor diversidad genética en una población, mayor será el desempeño zootécnico

(Prim, *et al.*, 2003), es así como, se espera mejorar genéticamente las generaciones futuras y por ende, el incremento en la producción.



**Figura 4.** Granjas ranícolas, de las cuáles se adquirieron organismos adultos para la reproducción artificial, se observan las condiciones de cultivo de cada unidad de producción y la diversidad de sus organismos. a) Granja “Unión de campesinos del Valle de Tzintzimeo S.P.R. de R.L.”, b) Granja “Uanashuandarhuanapu S. de R.L.” y c) Granja “San José”.

**Cuadro 2.** Procedencia de los ejemplares de rana toro americana en fase adulta, seleccionados.

Unidad de producción	Municipio	Localidad	Número de organismos	
			Hembras	Machos
Granja “Unión de campesinos del Valle de Tzintzimeo S.P.R. de R.L.”	Álvaro Obregón	Tzintzimeo	5	3
Granja “Uanashuandarhuanapu S. de R.L.”	Morelia	Uruapilla	5	5
Granja “San José”	Álvaro Obregón	Chehuayito	8	9
<b>Total</b>			<b>18</b>	<b>17</b>

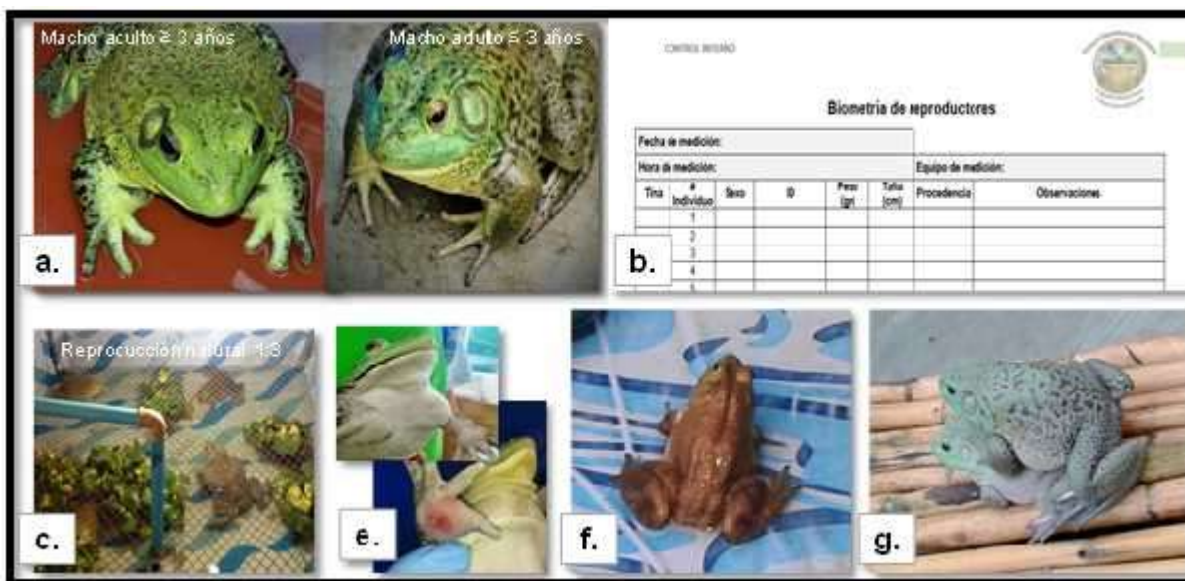
#### 1.4.4 Características generales de los organismos

A continuación se enlistan las consideraciones, previas a la selección de ejemplares en etapa reproductiva y recomendaciones acerca del manejo, descritas por Afonso (2004) y Cribb, *et al.* (2013) en éstas se puntualizan las características principales que deben considerarse, antes de la reproducción artificial:

##### ▪ Puntos a considerar para la selección de organismos

- a. Descartar individuos mayores de 3 años, después de esta edad, ya pasaron por al menos tres periodos de reproducción, disminuyendo la probabilidad de fecundación; por lo tanto, habiendo pasado este tiempo se sugiere descartarlos.
- b. Mantener registro de la edad de cada uno, de esta forma será más fácil asegurar mejores reproductores. Una forma es insertando microchips a cada organismo del sector de reproducción.
- c. La proporción adecuada para la reproducción natural es 1 :2 o 1 :3 , mientras que la proporción de la reproducción artificial es 3 :1 , ya que será necesario asegurar mayor cantidad de semen que incremente la probabilidad de fecundación.
- d. Considerar que el periodo de reproducción natural en México es durante la primavera y verano (marzo a septiembre).
- e. Observar que no presenten heridas, lesiones o algún indicio de maltrato o sufrimiento.
- f. Observar que no haya comportamientos anormales (por ejemplo: nado anormal, posición irregular, mala orientación del cuerpo).
- g. La primera maduración sexual (madurez plena) se da aproximadamente en los 4 meses de edad pos-metamórfica o peso vivo entre 150 y 200 g. Es necesario conocer la historia de vida del animal, tal es el caso de su procedencia, fase en la que adquirió el ejemplar, edad y peso. Los tiempos de maduración dependerán de las condiciones en que se encuentren.

Las figura 5 refiere a las características mencionadas.



**Figura 5.** Consideraciones generales, previas a la selección de organismos. **a.** muestra machos en fase adulta con diferencia de edades, en el macho mayor de 3 años se le observa engrosamientos de dedos, piel rugosa y gruesa al tacto, caso contrario de los machos más jóvenes; **b.** bitácora; **c.** Proporción adecuada para la reproducción natural; **e.** presencia de lesiones en organismos; **f.** Comportamiento anormal, posición irregular; **g.** organismos en su plena actividad reproductiva.

#### ▪ Características fenotípicas en machos

- Tímpano con diámetros de dos a tres veces mayor al tamaño de sus ojos, perceptible a partir de los 80g de peso.
- Región gular con coloración amarilla y plisada
- Callo nupcial pronunciado (o pulgar bien desarrollado)
- Reflejos de amplexo
- Peso vivo mayor a 40g ya se encuentran en proceso de maduración, animales con peso medio de 240g son considerados reproductores potenciales; longitud patrón, a partir de 8.09 cm (Lima, *et al.*, 2008). Para reproducción natural y/o artificial

- Emisión de canto de apareamiento (canto de advertencia), durante el canto, la región gular se extiende.

(fig. 6).



**Figura 6.** Características físicas de un macho adulto, de izquierda a derecha se observa: tamaño de tímpano, región gular plisada con coloración amarilla, callo nupcial, reflejos de amplexo y presencia de canto (región gular extendida).

- **Características fenotípicas en hembras ♀**
- Tímpano con diámetro similar al de los ojos.
- Región gular de coloración blanca lisa y delgada.
- Dedos delgados y sin presencia de callo o pulgar nupcial.
- Peso vivo máximo de 250 g hasta 600 g (para reproducción natural) y no mayor a 450 g, por facilidad de manejo (para reproducción artificial).
- Vientre distendido (ocasionando doblez entre las piernas y el abdomen).
- Consistencia suave al tacto de ovarios y oviducto (ovocitos maduros). Si al tacto se sienten protuberancias duras, es porque los ovocitos no están listos para ser extraídos (esta información cambia en animales en sistemas intensivos). En las hembras no se tiene reportes sobre la talla adecuada. No obstante, lo más importante es identificar el momento propicio para la inducción hormonal.



**Figura 7.** Características físicas de una hembra adulta, de izquierda a derecha se observa: Diámetro de tímpano, región gular de coloración blanca, dedos delgados y sin presencia de callo nupcial y vientre distendido (presencia de doblez entre piernas y vientre).

#### 1.4.5 Manejo de reproductores

Se consideraron las recomendaciones de Afonso (2004), y Cribb, *et al.* (2013) y de los protocolos de buenas Prácticas de Producción Acuícola (BPPA) (SENASICA, 2003). El mantenimiento de los factores bióticos, simuló las condiciones idóneas de primavera y verano incitando a la reproducción (Cribb, *et al.*, 2013), las instalaciones y equipo se observan en la figura 8; los procedimientos fueron los siguientes:

- La densidad mantenida no rebasó los 10 organismos/m<sup>2</sup>.
- Los ejemplares se mantuvieron en tinas separadas, conforme al sexo, para evitar disputas.
- Renovación total de agua, una vez al día, a excepción de los días en que fueron hormonados, en esos casos la renovación de agua fue dos veces al día, después de cada aplicación de hormona. Al remover el agua también se retiró el alimento que no fue aprovechado y las heces.
- Aplicación de yodo povidona, en concentración de 0.05mL/ litro de agua, como medida profiláctica y para la limpieza de tinas.
- Uso de cloruro de benzalconio en solución jabonosa (jabón quirúrgico “Antibenzil”), para limpieza y desinfección de herramientas y equipo de trabajo (cepillos, calentadores, cubetas, etc.).

- Se suministró alimento comercial “Purina Nutripec” para trucha, de 42% de PB y 10% de grasa, pelet de 3.5 mm. La cantidad de alimento suministrada, fue de 3.33 g al día, para cada organismo (100 gr/organismo/mes), ración total/día, dividida en dos partes (mañana y tarde), suministrada a las 10:00 y 16:00 horas. La alimentación fue suspendida 24 horas antes de la reproducción artificial.
- Control de fotoperiodo, 14 horas luz y 10 horas oscuridad, controlados con temporizadores de la marca TORK®, programados en horarios de 06:00 a 20:00 horas.
- Se colocaron calentadores con termostato sumergibles de 50W, para acuario marca SUNNY®, programados para mantener la temperatura del agua en intervalos de  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ .
- Colocación de calentadores ambientales automáticos, marca Lasko®, modelo CT30710, para mantener la temperatura en intervalo de  $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$  por la noche, durante la temporada de invierno. Durante el día, se reguló mediante la apertura de cortinas del ranario.
- Estimulación sonora, por medio de grabaciones de la naturaleza, como factor de estímulo hacia los organismos que serían inducidos a la reproducción artificial, además de eliminar los sonidos del exterior. La grabación se mantuvo con intervalos de frecuencia de 0 a 22.05 kHz y con amplitudes de onda de 0 a 91 decibeles. Los datos anteriores se realizaron con una grabadora profesional Handy Recorder (modelo H4n) con micrófonos unidireccionales, se colocó a 25 cm de distancia entre la grabadora y el equipo emisor, y el sonido se evaluó con el software Raven Pro 1.5 (2014).
- Control de humedad relativa, por medio de un humidificador ultrasónico, marca SUNSHINE®, ubicado junto a las tinas de los reproductores, esperando mantener el mayor porcentaje de humedad posible (mínimo 50%).
- Se realizaron biometrías mensuales, considerando las variables de talla (cm) y peso (g), lo cual permitió mantener registro de cada organismo con respecto a su desarrollo, comportamiento, tiempos de maduración, ciclo de reproducción, edad.

- Monitoreo de parámetros de calidad del agua, los parámetros físicoquímicos fueron conforme a los criterios de Ferreira (2003). Las variables físicas y químicas a considerar fueron las siguientes: pH, porcentaje de saturación de oxígeno (%OD, en mg/L), oxígeno disuelto (OD, mg/L), conductividad eléctrica (CE,  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ), sólidos totales disueltos (TDS, ppm), temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ), alcalinidad, dureza (mg/L), cloro ( $\text{Cl}^-$ ), amoníaco ( $\text{N-NH}_3$ ), amonio ( $\text{N-NH}_4$ ), nitritos ( $\text{N-NO}_2^-$ ), se obtuvieron con un equipo HACH®, modelo FF1A y un medidor multiparamétrico HANNA®, modelo HI9828

Las figura 8 refiere a las adecuaciones del sector de reproductores.



**Figura 8.** Instalaciones y equipo para el mantenimiento de los reproductores: a. tinas independientes para machos y hembras, b. lámparas para control de fotoperiodo, c. renovación de agua, d. tinas de hembras con equipo de medición, e. calentadores sumergibles

con termostato y f. equipo de medición para monitoreo de factores abióticos (termómetro, higrómetro, humidificador, data loggers de temp., lámparas y calentador ambiental).

#### **1.4.6 Técnica de reproducción artificial (procedimientos)**

Para la reproducción artificial, se indujo hormonalmente a los organismos, para secreción hormonal, con la aplicación de la hormona acetato de buserelina 0.0042 mg (fármaco CONCEPTAL®), siguiendo los procedimientos descritos por Afonso (2004):

##### **▪ Mediciones**

Previo a la aplicación de la hormona, se obtuvo el peso vivo de los organismos seleccionados (balanza digital de 5.0 kg-0.1 g) y la longitud patrón (hocico-cloaca) con un vernier digital s/m (150 mm).

Es importante mencionar que estas mediciones se tomaron después de las 24 horas de ayuno.

##### **▪ Inducción a la ovulación y acondicionamiento de las hembras**

Se dejó en ayuno a los organismos por un periodo de 24 horas antes de la inducción, se realizó limpieza de tinas de mantenimiento, recambio de agua (antes de la aplicación de cada dosis), monitoreo y registro de datos de las condiciones ambientales en que se encontraban (temperatura, humedad y calidad del agua) y se obtuvieron las mediciones correspondientes al peso vivo (g) y longitud patrón (cm).

Una vez completado lo anterior, se procedió a la inducción, aplicando dos dosis de hormona (acetato de buserelina), cada una de 1 mL (4 µg), vía intraperitoneal (en el cuadrante superior izquierdo, véase figura 9) la primera dosis es considerada “hora cero”, diez horas después de la hora cero, se aplicó la segunda dosis de hormona (1 mL) (fig.9).



**Figura 9.** Método de reproducción artificial, mediante la aplicación de hormona (acetato de buserelina) CONCEPTAL® (a); se utiliza jeringa para insulina de 1 mL (b), se inyecta intraperitoneal en los organismos (c).

Se hicieron revisiones periódicas (cada dos horas), para verificar si era posible la obtención de huevos y observar el comportamiento y reacción de los organismos.

#### ▪ **Inducción a la espermatización y acondicionamiento de los machos**

Se realizó limpieza en tinas de mantenimiento, recambio de agua (antes de la aplicación de cada dosis), monitoreo y registro de datos de las condiciones ambientales (temperatura, humedad, calidad del agua) y se obtuvieron las mediciones correspondientes al peso (g) y longitud patrón (cm).

La aplicación de hormona en machos, se hizo de 20 a 24 horas después de la primera aplicación (hora cero) de las hembras, sólo una sola aplicación (dosis única), la dosis es de 0.1 mL (0.4 µg) de acetato de buserelina, vía intraperitoneal (véase fig. 9).

En ambos casos (machos y hembras), los organismos fueron alojados en las tinas designadas, cuyas condiciones se mantuvieron controladas. Una vez hormonados, se tuvo cuidado en evitar contacto directo y/o manipulación directa de

los organismos, evitar la emisión de ruidos fuertes, así como otros factores que perturbaran a los organismos y por consiguiente, afectaran la reproducción artificial.

#### ▪ **Colecta de semen**

Transcurridas dos horas de la aplicación de hormona en machos, se procedió a la colecta de semen, con ayuda de una pipeta serológica de 1 mL, que se introdujo (máximo 1 cm) en la cloaca. La pipeta fue colocada de forma horizontal, se giró suavemente y una vez que el líquido seminal comenzó a entrar, se dejó que el líquido subiera por capilaridad (fig. 10).



**Figura 10.** Obtención de semen a través de una pipeta serológica de 1 mL, introducida en la cloaca del macho.

Se verificó la viabilidad del semen, con un microscopio (100x), para cotejar, la presencia o ausencia de espermatozoides y su abundancia. Una vez observada la viabilidad, el semen se colectó en una probeta graduada de 10 mL, para medir la cantidad de semen total obtenido de cada organismo. La colecta y verificación de semen, debió hacerse en el menor tiempo posible, en promedio dos minutos debido a que el espermatozoide requiere cerca de un minuto para penetrar completamente en el huevo (fig. 11).



**Figura 11.** Verificación del semen en microscopio y colecta en probetas de 10mL.

- **Extracción de ovocitos**

El tiempo de extracción de ovocitos fue diferente para cada hembra, puede ocurrir hasta las 26 o 30 horas después de la primera aplicación (hora cero).

El procedimiento de extracción, se realizó, oprimiendo los laterales del abdomen, a la altura de los oviductos, en sentido anteroposterior.

La colecta de ovocitos, se realizó en una bandeja plástica, en el menor tiempo posible, se registró el peso (g) de la puesta total (fig. 12).



**Figura 12.** Extracción de ovocitos, en hembra inducida para reproducción artificial y colecta en bandeja de plástico previa a la fertilización e hidratación de huevos.

- **Fertilización artificial**

El semen adquirido, se diluyó con agua, la cantidad de agua utilizada depende de la cantidad (g) de ovocitos obtenidos, es decir, se utilizan 50 ml de agua cuando el peso de la puesta es 30 g, y 100 ml de agua cuando el peso de la puesta es 30 g. El semen se transfirió a una probeta de mayor capacidad (50 ml), para ser diluido con el agua, después se vertió en la bandeja de los ovocitos e inmediatamente se agitaron, durante 2 minutos. Se diluye el semen con agua, porque ayuda a que los espermatozoides se dispersen más fácilmente entre la puesta y promueve que la fertilización sea más homogénea (fig. 13). El agua utilizada fue la de la fuente de abastecimiento, se recomienda utilizar siempre el agua del mismo origen.



**Figura 13.** Fertilización manual, se mezcla el semen diluido en agua con los ovocitos.

#### ▪ **Hidratación de huevos e incubación**

Al concluir el tiempo de fertilización, la mezcla de la bandeja, se vertió en una cubeta con 20 litros de agua (el agua debe ser del mismo origen que la utilizada en la dilución del semen), y se procedió a la hidratación de huevos, con movimientos ondulatorios, durante 20 o 30 minutos (dependió de la viscosidad de la puesta). La frecuencia de los movimientos ocasionó que haya menor adherencia entre los huevos. Finalmente los huevos fueron transferidos al área de incubación (fig. 14).



**Figura 14.** Transferencia de la puesta después de la fertilización; se procedió a la hidratación de ovocitos, durante 20 o 30 minutos, se hacen manualmente movimientos ondulatorios, provocando que los ovocitos se dispersen.

- **Conteo de huevos**

El conteo se realizó con ayuda de un contador mecánico; al finalizar los procedimientos.

#### **1.4.7 Síntesis de la reproducción artificial**

Se identificaron los intervalos y promedios de los parámetros ambientales registrados en condiciones controladas durante el periodo de reproducción, a través de un análisis de distribución para cada parámetro reportado.

Se describió la técnica de reproducción artificial ajustando las dosis en hembras y los tiempos de aplicación de hormona en machos.

Descripción de los resultados de la última inducción, para la obtención de material biológico para la fase de incubación.

## 1.5 RESULTADOS

### 1.5.1 Variables ambientales en condiciones controladas.

Se mantuvo la temperatura ambiental a 23°C promedio y la humedad relativa  $\pm 60\%$ , durante el periodo de mantenimiento de los reproductores (de marzo a octubre del 2015).

#### 1.5.1.1 Caracterización de variables fisicoquímicas del agua

La calidad del agua de la fuente de abastecimiento, se evaluó continuamente, con el objetivo de prevenir riesgos. Los recambios de agua fueron del 100% todos los días. Por lo tanto, los valores mantenidos durante la reproducción fueron los correspondientes a los valores de la fuente de abastecimiento de agua. Se expresan en promedios y rangos (cuadro 3).

**Cuadro 3:** Parámetros físico químicos del agua utilizada en el sector de reproductores.

	T (°C)	pH	% OD (mg/L)	OD (mg/L)	CE (mS/cm)	SDT (ppm)
<b>Promedio</b>	22.70	7.29	55.75	3.82	557.58	279.17
<b>Desv est. ( )</b>	1.42	0.35	14.37	1.01	46.67	23.25
<b>Rango</b>	25.6-20.47	7.96-6.74	89.9-31.5	5.61-2.04	695-513	347-256
	Alcalinidad (mg/L)	Dureza (mg/L)	Cloro (mg/L)	Amoniaco (mg/L NH <sub>3</sub> )	Amonio (mg/L NH <sub>4</sub> )	Nitritos (mg/L NO <sub>2</sub> )
<b>Promedio</b>	228.00	202.35	140.00	0.00	0.00	0.00
<b>Desv est. ( )</b>	103.55	6.98	15.49	0.00	0.00	0.00
<b>Rango</b>	273.6-17.10	205.2-188.1	150-120	0.00	0.00	0.00

T=Temperatura, pH=potencial de hidrógeno, %OD= porcentaje de saturación de oxígeno, OD= oxígeno disuelto, CE= conductividad eléctrica y SDT= sólidos disueltos totales.

### **1.5.2 Descripción de inducciones mediante reproducción asistida**

Los resultados que se presentan son sólo descriptivos, se basaron en la observación conforme la práctica, las inducciones forman parte de la estandarización de la técnica de reproducción artificial.

Para la estandarización de las técnicas de reproducción artificial, se efectuaron 5 inducciones, las primeras dos se realizaron conforme a lo descrito por Afonso (2004) respetando dosis y horarios de aplicación, los resultados no fueron positivos para la hembras que fueron hormonadas ya que días después de las inducciones, se registró la muerte de 3 hembras, se identificó que los órganos adjuntos al sistema reproductor, en la cavidad celómica, fueron presionados al grado de que su funcionamiento estuvo comprometido. Con base en las observaciones anteriores, se modificaron las dosis en hembras, reduciéndose el 50% de lo normal (1 mL total), la respuesta en las siguientes inducciones fue positiva. En el caso de los machos, el tiempo de respuesta no coincidía con las hembras, por lo tanto, en las siguientes inducciones (4 y 5), se modificaron los horarios de aplicación de hormona, se inyectó la hormona 20 horas después de la hora cero, la respuesta fue positiva, logrando colectar semen y ovocitos en todos los casos hasta la fecundación.

### **1.5.3 Reproducción artificial para la obtención de material biológico**

Durante la última inducción, se obtuvo el material biológico para el desarrollo del experimento.

La fase preparatoria de los organismos comenzó el 19/05/15, la temperatura ambiental, incrementó significativamente ( $>37^{\circ}\text{C}$ ), la humedad relativa y temperatura del agua en las tinas de los reproductores, se mantuvo constante. Los resultados de las variables no afectaron la reproducción (cuadro 4).

**Cuadro 4:** Temperatura ambiental, humedad relativa (HR) y temperatura del agua durante la reproducción artificial, al interior del ranario.

	Temperatura ambiental	HR	Temperatura agua (°C)	
	°C	%	Tina 1	Tina 2
<b>Promedio</b>	25.60	51.71	24.49	24.30
<b>Desv est. ( )</b>	5.99	10.57	1.74	1.71
<b>Intervalo</b>	37.9-17.57	72-19	27.9-21.3	27.7-22.2

Se seleccionaron tres proporciones 1:3 para la inducción, la inducción comenzó a partir del 19/05/15 a las 10:15 horas, 1ª aplicación de hormona en hembras (hora cero), 2ª aplicación 20:15 horas. Se aplicó la mitad de la dosis a 2 hembras (1 mL) y dosis normal (2 mL) en 1 hembra. La inducción en machos fue a las 7:00 horas (21 horas después de la hora cero); el tiempo de respuesta fue de 4 horas para 1 hembra y 4 machos.

La colecta de líquido seminal comenzó a las 11:20 hrs. se obtuvieron 7.2 mL, que fue insuficiente para la reproducción, por lo tanto, se inyectaron nuevamente a los machos 0.1 mL de hormona, la reacción de los organismos fue favorable, debido a que el tiempo de respuesta ocurrió después de 2 horas.

Con respecto a las hembras, únicamente se obtuvo respuesta de un organismo, inducido con 1 mL en total de hormona. Cabe mencionar que este mismo organismo ya había tenido dos ciclos de maduración en la misma temporada, en el primer ciclo fue por reproducción artificial y el segundo natural, la puesta obtenida por reproducción artificial fue significativa con 99% de fecundación y sobrevivencia.

La colecta de líquido seminal y ovocitos, comenzó a las 14:00 hrs. Se lograron 20 mL (6 organismos) de líquido seminal y 95 g de ovocitos. Para la fertilización se requirieron 100 mL de agua. Finalmente la puesta se distribuyó en dos recipientes con 15L, del tratamiento "profilaxis" para la incubación.

Se obtuvieron aproximadamente 19,000 ovocitos, de los cuales el 82.27% eclosionaron.

## 1.6 DISCUSIÓN

Los anfibios presentan patrones cíclicos que están correlacionados entre sí, y se ajustan a los cambios estacionales, la temperatura es el factor más importante en la regulación de los ciclos reproductivos en ranas (Sesso-Cerri, *et al.* 2004, 2006). Lo anterior, coincidió con las variables ambientales incluyendo la temperatura ambiental (25°C-29°C), la humedad relativa ( $\pm 60\%$ ) y el fotoperiodo 14:10, ya que los organismos se mantuvieron estimulados durante todo el periodo de estandarización.

Pereira, *et al.* (2012) enfatizan que la hormona acetato de buserelina es la de mayor aceptación en ranicultura por su eficacia durante la reproducción, fecundación y eclosión. En este trabajo se obtuvieron 19,000 ovocitos y el 82.27% de eclosión de una hembra inducida con 1ml de acetato de buserelina, estando en su tercer ciclo de ovulación durante el mismo periodo (febrero a mayo 2015).

Rugh (1935) menciona que la dosis necesaria para provocar la ovulación de ranas, decrece a medida que se aproxima la época de desova natural. Concuere da con el comportamiento de los reproductores, se obtuvo mejor respuesta de hembras inducidas con menor cantidad de hormona (1 mL), de acuerdo a Pereira, *et al.* (2013) mencionan que se debe a que las condiciones ambientales eran propicias y presentaban características fenotípicas ideales para la reproducción.

Las variables ambientales y fisicoquímicas del agua consideradas para el mantenimiento y reproducción artificial no coincidieron con los valores estandarizados por Cribb, *et al.* (2013), las características del agua, difiere para cada región. No obstante, mediante la manipulación de variables ambientales, la combinación de temperatura, fotoperiodo, pH, OD, SDT, humedad relativa y láminas de agua resultó en 19000 ovocitos y 82.27% de eclosión.

De acuerdo a Agostinho, *et al.* (2000) y Nascimento, *et al.* (2014), la reproducción inducida con acetato de buserelina, garantiza una fertilidad de hasta el

94% y las desovas rebasan los 10,000 ovocitos por hembra para cada ciclo, por lo tanto, los resultados de la reproducción artificial fueron positivos, resultando efectiva en términos de número total de ovocitos y fecundidad.

Se modificaron los tiempos de aplicación de hormona en machos, si se aplica la hormona de 20 a 21 horas después de la hora cero en hembras, los tiempos de extracción coincidan entre hembras y machos.

La técnica de reproducción inducida permite el suministro de ovocitos y semen de buena calidad, además de la incubación y eclosión de huevos en condiciones climáticas favorables para el buen desempeño de las crías. Sin embargo, la falta de conocimientos básicos sobre la reproducción de ranas, dificulta el empleo de esta técnica (Ribeiro Filho, *et al.* 1998), por eso la importancia de este trabajo, que ajustó la técnica, a través de la estandarización de las variables ambientales y de la descripción de procedimientos.

Pereira, *et al.* (2012) Consideraron que es necesario el mejoramiento de las técnicas de manipulación para la reproducción, por medio de la identificación del momento preciso para la inducción hormonal y definir la dosis adecuada. Así como también, la temperatura, fotoperiodo y otros factores abióticos para que se obtenga un aumento en la producción de renacuajos e imagos de buena calidad para la ranicultura y/o programas de repoblamiento.

## 1.7 CONCLUSIONES

- La identificación de las características fenotípicas, permite adecuar las dosis de hormona durante la reproducción, en combinación la estimulación constante; se puede asegurar el mejoramiento de las técnicas de reproducción asistida.
- La estandarización de la reproducción artificial, fue eficaz debido a que presentó porcentajes de fecundidad y número de ovocitos altos, conforme a la sincronización de las variables ambientales y el uso de acetato de buserelina.
- Mantener la temperatura ambiental en 27°C, humedad relativa del 50%, temperatura del agua del 23°C, aseguraron la estimulación de los organismos, en el tiempo que fuese necesario.
- Los valores en las variables fisicoquímicas del agua. Tales como, pH, oxígeno disuelto (OD), porcentaje de saturación de oxígeno (%OD), conductividad eléctrica (CE) y sólidos disueltos totales (SDT), se asemejan a las registradas en Unidades de Producción en el estado, lo que permitirá poner en práctica la técnica desarrollada en el presente trabajo.
- Intervenir en el control de la temperatura, fotoperiodo, lámina de agua. densidad, humedad relativa, representó en porcentajes altos de fecundación, eclosión y sobrevivencia.

## 1.8 LITERATURA CITADA

- Afonso, A. M. 2004. **Efeito do acetato de buserelina na indução a reprodução da rã-touro americana (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802) naturalmente portadora de micobacteriose.** Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) Universidade Federal Fluminense, Niterói. 86pp.
- Agostinho, C. A.; F. S. Weschsler; P. E. O. Nictheroy y D. F. Pinheiro. 2000. **Indução a ovulação pelo uso de LHRH análogo e fertilização artificial em rã touro (*Rana catesbeiana*).** Revista Brasileira de Zootecnia 29, 1261–1265.
- Cribb, A. Y.; A. M. Afonso y C. F. M. Monastério. 2013. **Manual Técnico de Ranicultura.** Rio de Janeiro: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa). 73pp.
- Lima, S. L.; C. L. S. Costa; C. A. Agostinho; D. R. Andrade y H. P. Pereira-Filho. 1998. **Estimativa do tamanho da primeira maturação sexual da rã-touro, *Rana catesbeiana*, no sistema anfigranja de criação intensiva.** Revista Brasileira Zootecnia, v.27, p.416-420.
- Nascimento, N. F.; R. C. da Silva; N.F. Valentin; F. M. C. Paes; V. M. Stéfani y O. L.S Nakaghi. 2014. **Efficacy of buserelin acetate combined with a dopamine antagonista for spawning induction in the bullfrog (*Lithobates catesbeianus*).** Aquaculture Research. doi 10.1111. p. 1-4.
- Organización de las Naciones Unidad para la Alimentación y la Agricultura (FAO). 2005-2013. **Programa de información de especies acuáticas. *Rana catesbeiana*.** Texto de Flores Nava, A.In: Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO [en línea]. Roma. Actualizado 9 February 2005. [Citado 4 September 2013].[http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Rana\\_catesbeiana/es](http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Rana_catesbeiana/es) (Accesada en julio 2016).
- Pereira, M. M.; O. P. Ribeiro Filho y R. D. Navarro. 2012. **Importancia de la Inducción artificial en la reproducción de ranas.** Rev. Bras. Reprod. Animal, Belo Horizonte, v36, n.2, p. 100.104.
- Prim, E. C. P.; J. T. Palma y M. L. A. Bataus. 2003. **Variabilidade genética da rã touro gigante (*Rana catesbeiana*) proveniente de populações dos estados de**

- Goiás, Pará e Paraná, criadas em sistemas intensivo de cultivo.** Ciência Animal Brasileira. V.4, n.1, jan/jun, p 1-6.
- Ribeiro Filho, O. P.; S. L. Lima; D. R. Andrade y J. T. Seixas-Filho. 1998. **Estudio de Desova de Rana toro, Rana catesbeiana, mediante inducción de apareamiento.** Rev Bras Zootec, v.27, p.216-233.
- Rugh R. 1935. **Pituitary - induced sexual reactions in the anura.** Biol Bull, v.68, p.74-81.
- Sasso-Cerri, E.; F. P. Faria; E. Freymüller y S. M. Miraglia. 2004. **Testicular morphological changes during seasonal reproductive cycle in the bullfrog *Rana catesbeiana*.** J Exp Zool, v.301, p.249-260.
- Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA). 2003. **Manual de Buenas Prácticas de Producción Acuícola de Trucha para la Inocuidad Alimentaria.** Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. Mazatlán Sinaloa. 86 pp.

**CAPÍTULO 2**

**EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO DURANTE LA  
INCUBACIÓN Y EL DESARROLLO INICIAL DE  
RENACUAJOS DE RANA TORO**

## 2.1 RESUMEN

### **EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO DURANTE LA INCUBACIÓN Y DESARROLLO INICIAL DE RENACUAJOS DE RANA TORO AMERICANA (*Lithobates catesbeianus* Shaw, 1802)**

Para la ranicultura, una de las principales etapas de crianza de rana toro es durante la incubación y el desarrollo larval, representando porcentajes altos de eclosión y sobrevivencia, del cual dependerá la producción final. Las condiciones de crianza son fundamentales para incrementar el desempeño en los organismos. En este trabajo se evaluó el efecto en el crecimiento de renacuajos durante el desarrollo embrionario y la fase larval R2-R3, se establecieron tres tratamientos, profilaxis, láminas de agua y oxígeno durante la fase de incubación; profilaxis, densidad y ración de alimento, durante desarrollo larval. Se crearon 24 unidades experimentales para cada etapa, posteriormente se realizó un análisis factorial, y se identificaron los patrones de comportamiento entre los tratamientos y variables morfométricas conforme el tiempo. En la fase de incubación, los mejores tratamientos para el crecimiento son altura de lámina de agua de 6.5 cm, profilaxis con yodo povidona (0.05 mL/L), oxígeno, sin incremento en la concentración y durante el desarrollo larval, se obtuvo mayor crecimiento cuando no se aplicó profilaxis, densidad de 1organismo/2L de agua y ración de alimento suministrada una vez al día (*ad libitum*).

Palabras clave: Larvicultura, incubación, profilaxis y densidad.

## 2.2 ABSTRACT

### **EVALUATION OF GROWTH DURING THE INCUBATION AND INITIAL DEVELOPMENT OF AMERICAN BULLFROG TADPOLES (*Lithobates catesbeianus* Shaw, 1802)**

In frog farming one of the main stages of bull frog breeding is during incubation and larval development, representing a high percentage of hatching and survival, on which the final production will depend. Fostering conditions are critical to increasing performance in the organisms. In this work the effect on the growth of tadpoles during the embryonic development and the larval phase R2-R3 was evaluated, three treatments, prophylaxis, water sheets and oxygen were established during the incubation phase; prophylaxis, density and feed ration during larval development. Twenty-four experimental units were created for each stage, after which a factorial analysis was performed, and behaviour patterns between treatments and morphometric variables were identified according to time. In the incubation phase, the best treatments for growth are water leaf height of 6.5 cm, prophylaxis with povidone iodine (0.05 mL/L), oxygen, with no increase in concentration and during larval development, greater growth was obtained when no prophylaxis was applied, density of 1 organism/2L of water and ration of food supplied once a day (*ad libitum*).

**Key words:** Larviculture, incubation, prophylaxis and density.

## 2.3 INTRODUCCIÓN

El crecimiento y desarrollo larval representa una de las fases más importantes para la ranicultura, en esta etapa se define la producción, ya que los animales que no crecen o se desarrollan conforme lo esperado, representan pérdidas significativas, representada por altos índices de mortalidad en la metamorfosis y en la engorda (Cribb, *et al.*, 2013).

Para la ranicultura, una de las principales etapas de la crianza en cautiverio de Rana toro, es mantener porcentajes altos de eclosión y sobrevivencia durante la incubación, además de garantizar un buen desarrollo ontogénico. La fase larval es el sector de mayor importancia debido a que en este se determina la producción de imagos de buena calidad hasta la fase de engorda con buenos índices zootécnicos (Hayashi, *et al.*, 2004).

El alimento es uno de los factores fundamentales para esta especie, sus necesidades nutricionales pueden no estar bien determinadas para algunas regiones, especialmente en áreas fuera de su distribución geográfica, en el que los factores ambientales adversos pueden interferir en la fisiología de los animales, se han realizado diversos trabajos en el que se pretende optimizar la alimentación de rana toro en cautiverio para diferentes sistemas de cultivo (Barbosa, *et al.*, 2005).

Se han realizado estudios referentes al desarrollo y crecimiento de renacuajos, para los cuales se ha considerado la biología de la especie, estudios sobre nutrición, la relación en función del peso y tiempo, variables extrínsecas (como condiciones climáticas), por mencionar algunos. No obstante, no ha sido posible estandarizar las variables precisas que aseguren el crecimiento continuo y la obtención de peso en el menor tiempo posible.

En este trabajo, se espera conocer el comportamiento de tres factores (profilaxis, densidad y oxígeno) durante la incubación y para los factores (profilaxis,

densidad y ración de alimento) en el desarrollo larval R2-R3, bajo condiciones controladas de (temperatura, fotoperiodo y calidad de agua). Identificar patrones de comportamiento y definir las condiciones más favorables para la incubación y crecimiento inicial en renacuajos.

## 2.4 MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.4.1 Área de experimentación

#### 2.4.1.1 Incubación

Este proyecto se desarrolló al interior del “Laboratorio de Investigación y de Servicios en Microbiología Acuática (LISMAC)” de la Facultad de Biología, pertenecientes a la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, en la ciudad de Morelia, Michoacán, México.



**Figura 15.** Instalaciones del Laboratorio de Investigación y de Servicios en Microbiología Acuática.

#### 2.4.1.2 Crecimiento y desarrollo de renacuajos

Este proyecto se desarrolló en el “Ranario Experimental Nicolaita”, ubicado en ciudad universitaria, de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.



**Figura 16.** Instalaciones del “Ranario Experimental Nicolaita”, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

#### **2.4.2 Consideraciones preliminares**

Se realizaron adecuaciones en las dos áreas de experimentación, conforme a las recomendaciones descritas por Cribb, *et al.*, (2013), sobre instalaciones, manejo y mantenimiento de renacuajos, para asegurar un buen desarrollo en los organismos, bajo condiciones controladas.

Como parte de las adecuaciones para desarrollar esta fase de incubación, se diseñó un prototipo de incubadora, que permitió controlar las variables establecidas para el desarrollo embrionario, el diseño de incubadoras fue con base en el sistema de incubación que se desarrolla en la “Granja Toca do Lobo Agroindustrial” por su propietario, el Sr. Luiz Faria, ubicada en la Ciudad de São José dos Campos, Brasil. El prototipo, se ajustó conforme a las necesidades del experimento, sin embargo forman parte de la innovación tecnológica para el sector.

La incubadora, posee un extractor de aire, para control de temperatura y humedad; Iluminación led con intensidad de 32.3 lux, con control remoto y timer automático; sistema de oxigenación para las bandejas de incubación; aberturas (al

interior y exterior) de circulación de aire; capacidad para 12 bandejas de incubación distribuidas en 4 niveles; 12 conexiones eléctricas, material resistente a la humedad y en color oscuro que evite la entrada de luz del exterior (fig.17).

Además, se implementaron los protocolos de sanidad e inocuidad alimentaria, conforme a los procedimientos establecidos en el “Manual de Buenas Prácticas de Producción Acuícola de Trucha para la inocuidad alimentaria (BPPAT) (SENASICA, 2003), ajustándose a las características adecuadas para la especie de estudio, debido a que no se tiene uno específico para rana toro, también se estableció un reglamento de buenas prácticas del laboratorio (BPL) cumpliendo un protocolo de seguridad, con el fin de minimizar los factores de riesgo para el desarrollo de los organismos y las actividades de investigación.



**Figura 17.** Prototipos de incubadoras (diseño propio).

### 2.4.3 Identificación de variables de evaluación

Como primer paso se identificó la problemática de los Ranicultores en el estado de Michoacán.

Las observaciones se cotejaron con especialistas, se establecieron los factores y/o tratamientos a evaluar y se ajustaron las técnicas de manejo.

Se efectuaron tres pruebas piloto, para evaluar la efectividad de los tratamientos y estandarizar las técnicas de experimentación, manejo y verificar el equipo de medición.

Posteriormente, se evaluaron los resultados de las pruebas piloto sometidos a análisis ANOVA factorial para evaluar la funcionalidad del diseño y efectividad del análisis, dichas pruebas fueron analizadas con el paquete estadístico JMP SAS® v6.

#### **2.4.3.1 Incubación**

Los factores establecidos fueron:

- Profilaxis: se manejaron dos condiciones, “con profilaxis” y “sin profilaxis”. Con profilaxis, se basa en la adición de yodo povidona (concentración 0.05mL/L agua) utilizada como medida preventiva para evitar riesgos sanitarios en la producción.
- Láminas de agua (densidad): Se establecieron tres láminas de agua (cm) 3.5 cm de altura, 6.5 cm y 9.5 cm.
- Oxigenación: “con oxígeno”, se refiere a la adición de oxígeno disuelto para incrementar su concentración en el agua (>4mg/L) durante el desarrollo embrionario; “sin oxígeno”, no se adiciona oxígeno disuelto y se mantienen concentraciones en el agua <4mg/L.

#### **2.4.3.2 Crecimiento y desarrollo de renacuajos**

Los factores seleccionados fueron:

- Profilaxis: se manejaron dos condiciones, “con profilaxis” y “sin profilaxis”. Con profilaxis, se basa en la adición de yodo povidona (concentración

0.05mL/L agua) utilizada como medida preventiva para evitar riesgos sanitarios en la producción.

- Densidades: Número de organismos por cada litro de agua, se establecieron tres densidades, “1organismo/L de agua”, “2 organismos/L” y “3 organismos/L”.
- Alimento: Número de raciones de alimento al día, la porción diaria representaba el 10% de la biomasa total de cada unidad experimental (UE) compuesta de ración comercial molida (50%) y salvado de trigo (50%), se establecieron tres tiempos “*ad libitum*”, “3 raciones/día” y “4 raciones/día”

#### **2.4.4 Obtención de material biológico**

El material biológico se adquirió, por medio de reproducción artificial, de los reproductores previamente mantenidos en las instalaciones del “Ranario Experimental Nicolaita” (descripción del procedimiento en el capítulo 1).

Durante la hidratación de los huevos, se aplicó el tratamiento de Profilaxis, distribuyendo la puesta en dos recipientes correspondientes al tratamiento (con profilaxis y sin profilaxis), posteriormente se seleccionaron al azar 1200 huevos (600 de cada tratamiento previo) y se colocaron 50 huevos en cada unidad experimental (UE).

Concluido el desarrollo embrionario y la etapa R1 de la fase larval, los organismos fueron transferidos a las UE (tinajas de plástico con capacidad de 100 L), ubicadas en el interior del ranario (fig. 18).

En estas instalaciones se mantuvieron a los organismos en las fases de desarrollo larval (R2-R4) y pre-engorda (imágenes).



**Figura 18.** Tinas de plástico con capacidad de 100 L, cada tina representa la unidad experimental (UE).

#### **2.4.5 Manejo y estandarización de sectores**

Se consideraron las recomendaciones conforme a Afonso (2004), y Cribb, *et al.* (2013) y de acuerdo a los protocolos de buenas Prácticas de Producción Acuícola (BPPA) (SENASICA, 2003). El mantenimiento de los factores abióticos, simula las condiciones idóneas que influyan en el crecimiento y desarrollo de los organismos (Cribb, *et al.*, 2013), los procedimientos fueron los siguientes:

#### 2.4.5.1 Incubación

- Uso de cloruro de benzalconio en solución jabonosa (jabón quirúrgico “Antibenzil”), para limpieza y desinfección de herramientas y equipo de trabajo (cepillos, calentadores, cubetas, etc.).
- Se mantuvo fotoperiodo 14:10 (14 horas luz y 10 oscuridad), controlado con temporizadores de la marca TORK®, programados en horarios de 6:00 a 20:00 horas.
- Los monitoreos de temperatura ambiental (°C) e intensidad de luz (lux), se registraron con data loggers HOBO®, las 24 horas del día y con registros en intervalos de una hora.
- El porcentaje de humedad relativa (HR) fue monitoreada con higrómetros marca ACURITE®, e higrómetro digital marca Exo-Terra®, el registro de medición se realizó dos veces al día, por la mañana y tarde.
- Para mantener la humedad en los límites recomendados (60%) al interior del ranario, se utilizó un humidificador ultrasónico, marca SUNSHINE®, ubicado al centro del ranario durante el día, en los horarios registrados con la humedad más baja.
- Extractor de aire en incubadoras, funcionando 23 horas al día, con temporizadores de la marca TORK®.
- La adición de oxígeno en el agua, se realizó por medio de bombas de oxígeno marca ELITE® (modelo 802) de dos salidas con capacidad para seis piedras difusoras, se colocaron válvulas de aire independientes para cada manguera y la cantidad de oxígeno disuelto fue medido con el equipo multiparamétrico HANNA® (modelo HI-9828), las bombas funcionaron las 24 horas del día.
- Los parámetros físico químicos que se consideraron fueron: pH, porcentaje de saturación de oxígeno (%OD, mg/L), oxígeno disuelto (OD, mg/L), conductividad eléctrica (CE,  $\mu$ S/cm), sólidos totales disueltos (TDS, ppm) y temperatura (°C). Los registros se realizaron todos los días, considerando

seis UE por día, seleccionadas al azar. El equipo utilizado fue un multiparamétrico HANNA® (modelo HI-9828).

#### 2.4.5.2 Desarrollo larval

- Uso de cloruro de benzalconio en solución jabonosa (jabón quirúrgico “Antibenzil”), para limpieza y desinfección de herramientas y equipo de trabajo.
- Control de fotoperiodo (se emplearon lámparas LED).
- Los monitoreos de temperatura ambiental e intensidad de luz, se registraron con data loggers HOBO®, las 24 horas del día y con registros en intervalos de una hora.
- La humedad relativa (HR) fue monitoreada con higrómetros mecánicos marca ACURITE®, e higrómetro digital marca Exo-Terra®, el registro de medición se realizó dos veces al día, por la mañana y tarde, durante todo el periodo de experimentación.
- Se instalaron calentadores con termostato sumergibles de 50W, para acuario marca SUNNY®, programados para mantener la temperatura del agua en intervalos de  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ . Se utilizó un calentador en cada UE.
- Para mantener la temperatura en intervalo de  $27 \pm 2^\circ\text{C}$  por la noche, durante la temporada de invierno. se colocaron calentadores ambientales de cerámica automáticos, marca Lasko®, modelo CT30710, Durante el día, se reguló mediante la apertura de cortinas del ranario.
- Adición de oxígeno 24 horas, en niveles bajos, se utilizó bomba marca SUNNY® (modelo SHP 12000).
- El monitoreo de parámetros fisicoquímicos y sus estándares para el desarrollo de renacuajos, fueron comparados conforme a los criterios de Cribb, *et al*, (2013). Las variables a considerar fueron: pH, porcentaje de saturación de oxígeno (%OD, en mg/L), oxígeno disuelto (OD, mg/L), amonio (N-NH<sub>3</sub>), nitritos (N-NO<sub>2</sub>-), conductividad eléctrica (CE,  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ), sólidos totales disueltos (TDS, ppm), temperatura ( $^\circ\text{C}$ ), dureza (mg/L), alcalinidad (mg/L), cloro (Cl-), mediante un equipo HACH®, modelo FF1A y un medidor

multiparamétrico HANNA®, modelo HI9828 (fig. 19). Las mediciones se efectuaron dos veces por semana en seis UE. Sólo en casos en que los organismos tuviesen un comportamiento distinto, se monitorearon los parámetros y si alguno de los parámetros rebasaba lo recomendado, se realizaban las medidas de control y manejo adecuadas.



**Figura 19.** Equipo utilizado para medición de parámetros fisicoquímicos del agua. a) HACH® modelo FF1A, b) multiparamétrico HANNA® modelo HI9828.

El monitoreo frecuente de los parámetros mencionados, evita la alteración de los datos en la fase experimental (fig. 20).



**Figura 20.** Monitoreo de parámetros fisicoquímicos en el agua de las unidades experimentales.

- Se utilizó una lámpara UV, marca BOYU®, modelo UVC-18W, como medida preventiva de calidad del agua, bajo los estándares de inocuidad

recomendados. Toda el agua suministrada en las UE, pasó previamente por la lámpara (fig. 21).



**Figura 21.** Lámpara UV, medida preventiva de control de calidad del agua de abastecimiento.

#### 2.4.6 Manejo de los tratamientos experimentales

- Para la profilaxis, se utilizó la solución antiséptica “Yodo povidona” adicionándolo con concentraciones de 0.05mL /1L agua; reposición de yodo con un gotero después de cada recambio de agua.
- Para controlar las láminas de agua, se marcó cada bandeja en su interior. Posteriormente para su manejo, se realizó diariamente reposición de agua en cada unidad experimental, respetando el tratamiento destinado en cada combinación; la reposición de agua no sobrepasó en medio litro de agua por día. No obstante, si las variables se observaban elevadas (principalmente la temperatura) se procedía a hacer otro recambio de agua, no mayor a un litro por día.
- La cantidad de oxígeno disuelto fue medido con el equipo multiparamétrico HANNA® (modelo HI-9828), conservando 1mg/L más alto para el tratamiento con oxígeno.

- Para controlar las densidades, a cada tina se le rotuló el nivel de cada litro, posteriormente se establecieron recambios diarios de agua del 10% al 15% del total del agua contenida en cada UE y se retiró el alimento del fondo.
- Para controlar la ración de alimento, se efectuaron biometrías cada diez días para ajustar la ración de cada UE conforme a la biomasa total; la cantidad de alimento proporcionada fue del 10% de la biomasa, el tipo de alimento suministrado fue a base de ración comercial molida “Purina Nutripec” para trucha, de 42% de PB y 10% de grasa, pelet de 3.5 mm. (50%) y salvado de trigo (50%). para el suministro de ración, los horarios fueron: 11:00, 13:00, 15:00 y 17:00 horas. adecuada a los tiempos del tratamiento.

## **2.4.7 Diseño experimental**

### **2.4.7.1 Incubación**

SE establecieron 24 unidades experimentales (UE) y se distribuyeron 50 huevos en cada UE. Las mediciones se realizaron diariamente, considerando una muestra de 15 individuos por UE (seleccionados al azar), el tamaño de muestra total para el análisis fue de 360 huevos (N).

En las 24 UE, se realizaron 12 combinaciones, balanceadas con respecto a los niveles establecidos para cada tratamiento experimental.

Los niveles de los factores se especifican en el siguiente cuadro:

**Cuadro 5.** Tratamientos experimentales establecidos durante el desarrollo embrionario.

Factores	Acrónimos	Niveles			Descripción de niveles
		P1	P2	-	
Profilaxis	P	P1	P2	-	P1= con profilaxis* P2= sin profilaxis
Lámina de agua (Densidad)	D	D1	D2	D3	D1= 3.5 cm D2= 6.5 cm D3= 9.5 cm
Oxígeno	O	O1	O2	-	O1= con oxígeno** O2= sin oxígeno***

\*Adición de Yodo povidona en concentración de 0.05 ml/L de agua.

\*\* Aumento del OD (mg/L) en el agua, con ayuda de bombas de oxígeno para acuario.

\*\*\* Sin adición de oxígeno, el valor reflejado es el del OD contenido normalmente en el agua.

#### 2.4.7.2 Desarrollo larval

Se diseñaron 24 unidades experimentales (UE), cada una adecuada a diferentes condiciones, conforme los tratamientos a los que se sometieron.

Tamaño de la muestra (N): 720 renacuajos en fase R2, se distribuyeron 30 individuos (n), para cada UE.

Los niveles de los tratamientos se especifican en el siguiente cuadro:

**Cuadro 6.** Tratamientos experimentales establecidos durante el crecimiento y desarrollo larval.

Factores	Acrónimos	Niveles			Descripción de niveles
		P1	P2	-	
Profilaxis	P	P1	P2	-	P1= con profilaxis* P2= sin profilaxis
Densidad	D	D1	D2	D3	D1= 1org/L de agua D2= 2org/L agua D3= 3org/L de agua
Alimento (raciones por día)	A	A1	A2	A3	A1= <i>ad libitum</i> A2= 3 raciones/día A3= 4 raciones/día

\*Adición de Yodo povidona en concentración de 0.05 mL/L de agua.

#### **2.4.8 Fecundación, eclosión y sobrevivencia**

Se hizo la verificación manual del número de huevos fecundados, eclosionados y vivos en cada UE, los datos que se incluyen estuvieron en función de la muestra utilizada para la incubación (1,200 organismos), El número de huevos fecundados se midió 12 horas después de iniciar la incubación, el número de organismos eclosionados se midió tres días después del inicio de incubación y la sobrevivencia se obtuvo siete días después de la eclosión. Los resultados se expresaron en porcentaje (%).

#### **2.4.9 Toma de datos**

- **Desarrollo embrionario**

La incubación comenzó el día 21/05/15 a las 16:00 horas y terminó el 4/06/15 a las 16:00 horas. Se realizaron dos mediciones manuales con un vernier digital (con escala en mm), la primera fue después de las 48 horas (23/05/15) de haber comenzado el desarrollo embrionario y la segunda habiendo cumplido 65 horas (24/05/15) de desarrollo. Para ese tiempo los organismos se encontraban en fase de yema caudal. Posteriormente, se continuó con las mediciones hasta que se completó la eclosión para así evitar que se afectaran los embriones por manipulación.

- **Desarrollo larval**

La frecuencia de la toma de datos se efectuó cada 10 días, la primera medición comenzó a partir del 19/06/15 y finalizó el 17/09/15, resultando 8 mediciones, de las cuales en el análisis se consideraron únicamente 5. Para cada medición se obtuvo manualmente el peso (g) de cada organismo, con una balanza electrónica (precisión analítica, marca SARTORIUS®).

##### **2.4.9.1 Imágenes digitales**

Durante el desarrollo embrionario, comenzó la obtención de imágenes digitales, cuando los organismos habían eclosionado (fase R1 o larva inicial); la obtención de imágenes se realizó diariamente.

Durante el desarrollo larval, las imágenes se obtuvieron desde el primer día de medición 19/06/15, los organismos se encontraban en fase R2.

Las imágenes digitales se obtuvieron con una cámara digital Kodak® Easy Share Z981 de 14 MP, la cual fue colocada sobre un soporte de metal para evitar movimiento, también se colocó una lámpara (foco led de 23w luz blanca) evitando el flash de la cámara y asegurando mayor claridad en la imagen. Se obtuvo una imagen por cada individuo de cada UE. Cada individuo fue colocado en una caja de Petri de vidrio, con aprox. 10mL de agua, indicando con etiquetas la fecha de medición, número de individuo y número de UE, seguido de una hoja milimétrica indicando la escala; después se guardaron en formato JPG identificadas por UE y fecha.

Las imágenes fueron procesadas, mediante el programa Sigma Scan Pro, v. 5.0, el cual se configuró para la obtención de medidas de distancia y se calibró una fotografía por cada UE, conforme a la escala identificada en la imagen (mm), a modo de asegurar precisión en los datos.

#### **2.4.9.2 Variables Morfométricas**

Las variables morfométricas utilizadas durante la incubación, conforme a las mediciones se describen en el cuadro 7. Las variables cambiaron con respecto a la fecha de medición y conforme a la fase de desarrollo en la que se encontraban (fig. 22).

**Cuadro 7.** Variables morfométricas consideradas en cada evento de medición.

Fecha	Acrónimo	Variable morfométricas obtenidas*
23/05	<b>MED 1</b>	DIAM
24/05	<b>MED 2</b>	LT
26/05	<b>MED 3</b>	LT, LM, LV, LCef y A
29/05	<b>MED 4</b>	LT, LA, LCef y A
01/06	<b>MED 5</b>	LT, LA, LCef, A y B
04/06	<b>MED 6</b>	LT, LA, LCef, A y B

\*DIAM (Diámetro de huevo), LT (Longitud Total), LM (Longitud Mandibular), LV (Longitud Vitelo), LA (Longitud Abdomen), LCef (Longitud Cefálica), A (Anchura) y B (Boca).



**Figura 22.** Ubicación de las variables morfométricas conforme a la fase de desarrollo embrionario, las flechas indican la secuencia en que fueron medidas dichas variables.

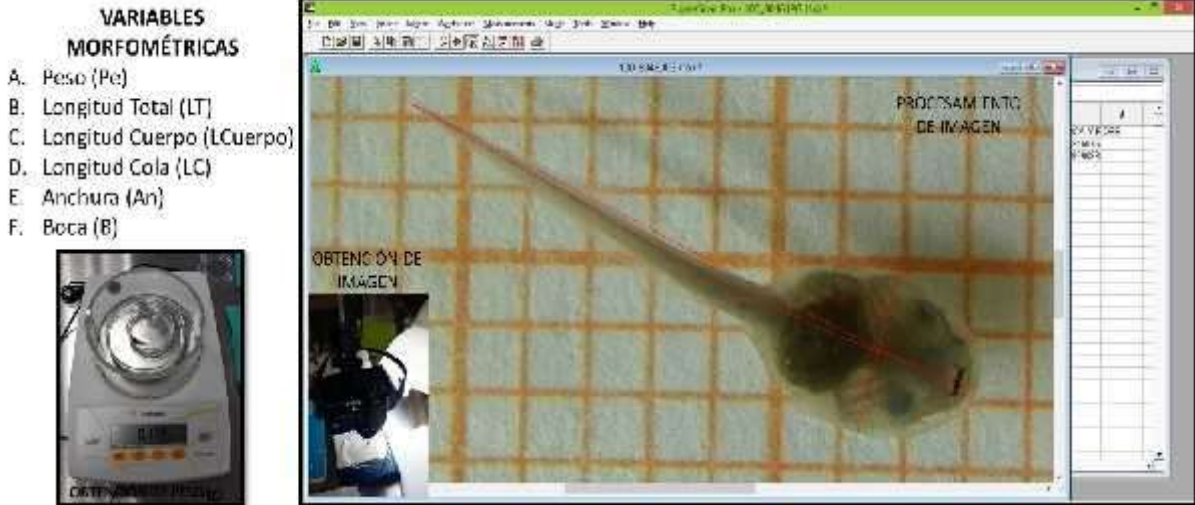
La posición del organismo (dorsal, ventral o lateral) varía en la imagen conforme a la fase de desarrollo, la toma de datos inició 48 horas después de haber comenzado el desarrollo embrionario (hora cero); las dos primeras mediciones se realizaron manualmente con un vernier digital, evitando dañar los embriones, el día 1 se obtuvieron los diámetro de huevo (DIAM) y el día 2 se obtuvo la longitud total (LT). Con las mediciones restantes se procesaron las imágenes digitales.

Las variables morfométricas permanecieron constantes durante la fase larval, el cuadro 8 describe las variables utilizadas durante las mediciones y las figura 23 muestra la ubicación de las variables en el organismo.

**Cuadro 8.** Variables morfométricas consideradas en cada evento de medición.

<b>Fecha</b>	<b>Acrónimo</b>	<b>Variable morfométricas obtenidas*</b>
19-20 jun	<b>MED 1</b>	Pe, LT, LCuerpo, An y B
11-12 jul	<b>MED 2</b>	Pe, LT, LCuerpo y An
3-4 agos	<b>MED 3</b>	Pe, LT, LCuerpo y An
28 agos	<b>MED 4</b>	Pe, LT, LCuerpo y An
17-18 sept	<b>MED 5</b>	Pe, LT, LCuerpo y An

\*Pe (Peso), LT (Longitud Total), LCuerpo (Longitud Cuerpo), LC (Longitud Cola), An (Anchura) y B (Boca).



**Figura 23.** Obtención de las variables morfométricas.

Al finalizar el procesamiento de imágenes, los datos se vaciaron en una matriz de datos en Excel (Microsoft office, v.2013), conjuntando cada variable de respuesta con sus factores de experimentación.

#### 2.4.10 Análisis estadístico

- Se utilizaron los parámetros básicos de estadística descriptiva (media, desviación estándar y rangos) del monitoreo de temperatura, humedad relativa e intensidad de luz, de los parámetros fisicoquímicos del agua en las UE y la fuente de abastecimiento, utilizando el software JMP SAS® v6.
- Se obtuvo el porcentaje de fecundación, eclosión y sobrevivencia, mediante las relaciones:

$$PECUNDACIÓN = \frac{N^{\circ} \text{ de huevos fecundados}}{N^{\circ} \text{ total de huevos}} \cdot 100$$

$$ECLOSIÓN = \frac{N^{\circ} \text{ de larvas}}{N^{\circ} \text{ de huevos fecundados}} \cdot 100$$

$$SOBREVIVENCIA = \frac{N^{\circ} \text{ de larvas vivas en fase R1}}{N^{\circ} \text{ total de larvas eclosionadas}} \cdot 100$$

- **Análisis de correlación** Se aplicó un análisis de correlación con el objetivo de depurar la matriz, para eliminar las variables redundantes. El análisis se efectuó utilizando el software JMP SAS® v6
- **Análisis factorial:** Para identificar patrones de comportamiento y definir las condiciones más favorables durante el crecimiento y desarrollo larval, con las variables morfométricas obtenidas (8 variables en incubación y 6 variables en desarrollo larval) durante las mediciones, se analizaron los datos mediante ANOVA factorial para cada variable respuesta ( $P < 0.05$ ). Posteriormente se realizaron pruebas de comparación de medias, t Student y Tukey, (conforme a número de niveles en cada factor) y se identificaron los efectos significativos para cada factor y sus interacciones (Cuadro 9). El análisis se efectuó utilizando el software JMP SAS® v6.

**Cuadro 9.** Efectos de los factores de variación.

<b>Efecto de los factores</b>	
<b>Incubación</b>	<b>Desarrollo larval</b>
P	P
D	D
O	A
P*D	P*D
P*O	P*A
D*O	D*A
P*D*O	P*D*A

## 2.5 RESULTADOS DEL CRECIMIENTO Y DESARROLLO DE RENACUAJOS DURANTE LA INCUBACIÓN

### 2.5.1 Factores ambientales en condiciones controladas.

#### 2.5.1.1 Temperatura ambiental, intensidad de luz y humedad relativa del área de incubación

Se midió la temperatura ambiental, la intensidad de luz y la humedad relativa (HR) en el área de experimentación, a través del monitoreo durante las 24 horas del día hasta completar el periodo de incubación, los resultados son similares a las recomendaciones reportadas por Cribb, *et. al.* (2013) (cuadro 10).

**Cuadro 10.** Variables ambientales controladas.

	<b>Temperatura</b>	<b>Intensidad de Luz</b>	<b>HR</b>
	<b>°C</b>	<b>lux</b>	<b>%</b>
<b>Promedio</b>	25.38	261.87	49.82
<b>Desv. Estándar ( )</b>	0.80	102.47	7.60
<b>Rango</b>	26.78-23.39	376.7- 10.80	64-36

#### 2.5.1.2 Temperatura ambiental y humedad relativa al interior de las incubadoras

Es fundamental mantener controlados los parámetros de temperatura y humedad relativa al interior de las incubadoras, el promedio ideal para la temperatura es 23°C y la HR >60%, su control evitará interrumpir el desarrollo embrionario en algunas de sus fases. En el siguiente cuadro, se incluyen los promedios, desviación estándar y rangos.

**Cuadro 11.** Variables ambientales promedio al interior de las incubadoras.

	Incubadora 1			Incubadora 2		
	Temp.	HR	Luz	Temp.	HR	Luz
	°C	%	lux	°C	%	lux
<b>Promedio</b>	23.69	<b>66.83</b>	18.62	24.16	<b>76.75</b>	26.75
<b>Desv est. ( )</b>	0.85	10.0	7.76	0.69	7.06	12.23
<b>Rango</b>	25.3 - 22.0	80 - 50	53.8 - 10.8	25.0 - 23.0	88 - 66	75.3 - 10.8

### 2.5.1.3 Parámetros fisicoquímicos del agua en las unidades experimentales

Los promedios expresados en el cuadro 11, incluyen los promedios totales de las unidades experimentales. Los resultados en la muestra de agua de la fuente de abastecimiento permiten observar las diferencias en la calidad del agua antes de ser utilizada.

**Cuadro 12.** Parámetros fisicoquímicos del agua utilizada durante la incubación.

		Temp (°C)	pH	% OD (mg/L)	OD (mg/L)	CE (mS/cm)	SDT (ppm)
<b>UE</b>	<b>Promedio</b>	23.11	8.69	58.77	4.02	634.30	317.05
	<b>Desv est ( )</b>	0.90	0.26	11.91	0.83	90.00	45.06
	<b>Rango</b>	24.5-20.16	9.17-8.06	87.4-30.10	5.89-2.11	1040-517	520-258
<b>Fuente</b>	<b>Promedio</b>	22.12	7.31	58.18	4.05	560.13	279.88
	<b>Desv est ( )</b>	1.04	0.30	14.97	1.03	56.84	28.37
	<b>Rango</b>	23.96 - 20.47	7.67 - 6.74	89.9 - 41.2	5.61 - 2.86	695 - 513	347 - 256

Para el tratamiento con Oxígeno (O1 y O2), la diferencia registrada entre sus niveles fue de  $\pm 0.76$  mg/L, el promedio del "O1" fue de 4.49 mg/L ( $= 0.75$ ), mientras que para "O2", el promedio fue de 3.72 mg/L ( $= 0.78$ ).

### 2.5.2 Porcentaje de fecundación, eclosión y sobrevivencia

El porcentaje de fecundación se calculó 24 horas después de haber iniciado la incubación, el 91.42% de los huevos si fueron fecundados (1,097 huevos). Posteriormente, antes de completarse la eclosión, se registró el 8.66% de mortalidad, el total de huevos eclosionados fue del 91.34%. Finalmente, en un periodo de 10 días (después de la eclosión) se obtuvo el 91.72% de sobrevivencia en larvas en etapa inicial de la fase R2.

### 2.5.3 Análisis de Correlación

Conforme a los valores de correlación entre cada par de variables, la más alta fue entre las variables Longitud total (LT) y Longitud cola (LC). Por consiguiente, la variable “LC” al solo representar una fracción del organismo se descartó del siguiente análisis. El cuadro 13 muestra los valores del coeficiente de correlación entre LT y LC para cada medición.

**Cuadro 13.** Coeficiente de correlación entre las variables morfométricas Longitud total (LT) y Longitud cola (LC).

Mediciones	Coeficiente de correlación (r)
<b>MED 1</b>	NA
<b>MED 2</b>	NA
<b>MED 3</b>	0.8225
<b>MED 4</b>	0.8749
<b>MED 5</b>	0.9177
<b>MED 6</b>	0.9268

NA= no aplica, las mediciones 1 y 2 sólo tuvieron una variable respuesta.

## 2.5.4 Análisis factorial

El siguiente cuadro muestra las probabilidades obtenidas conforme el análisis, por medición y variables utilizadas, respectivamente:

**Cuadro 14.** Valores del ANOVA de cada variable y su medición, permiten identificar los valores significativos (Prob>F), los gl=11.

N° de medición	Variables respuesta							
	DIAM	LT	LM	LV	LA	LCef	A	B
<b>MED 1</b>	0.0003	---	---	---	---	---	---	---
<b>MED 2</b>	---	<.0001	---	---	---	---	---	---
<b>MED 3</b>	---	<.0001	<b>0.0028</b>	<.0001	---	<.0001	<b>0.0003</b>	
<b>MED 4</b>	---	<b>0.0012</b>	---	---	0.159*	<b>0.0005</b>	<.0001	
<b>MED 5</b>	---	0.3023*	---	---	<b>0.0144</b>	<b>0.0087</b>	<b>0.0008</b>	0.0966*
<b>MED 6</b>	---	<.0001	---	---	<b>0.0546</b>	<.0001	0.0138**	0.2805*

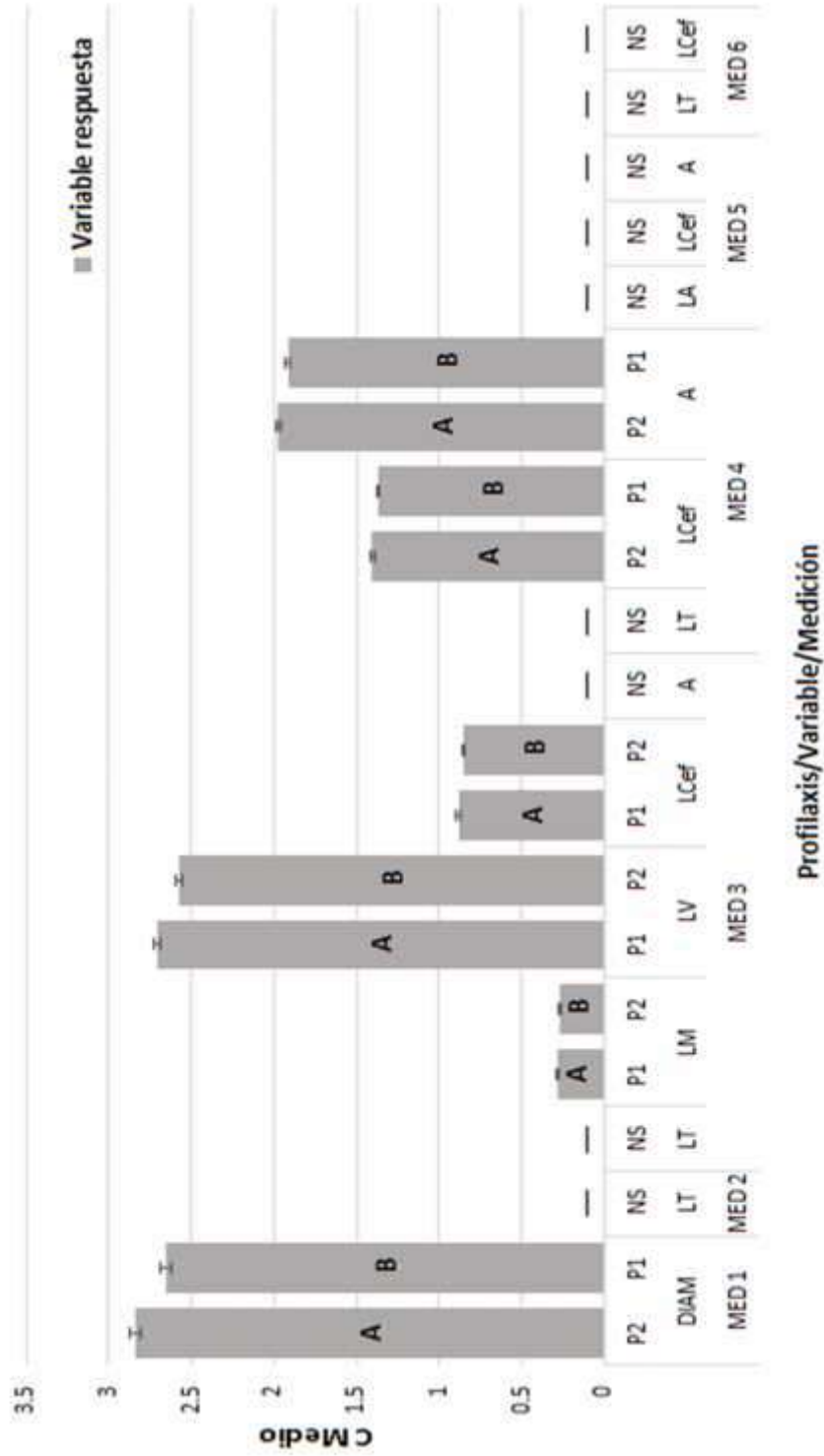
\*No hay diferencias significativas

\*\*Las pruebas de comparación de medias, no detectaron diferencias significativas.

En seguida se ordenan los resultados por factor, seguido de las interacciones, y los valores de cada prueba:

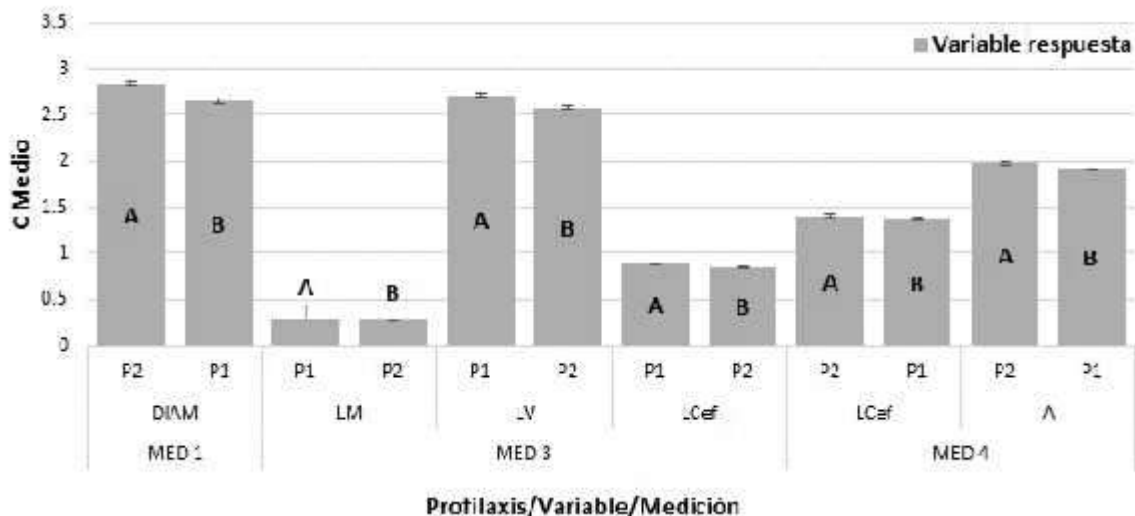
### 1. Profilaxis (P)

No se obtuvieron diferencias significativas en 9 variables entre mediciones, LT no mostró diferencias en ningún momento, Las mediciones 5 y 6 no fueron estadísticamente significativas para ninguna variable (fig. 24).



**Figura 24.** Efecto de la profilaxis en las variables conforme a las mediciones. La NS (No significativa). En el ANOVA los  $gl= 11$ , la prueba de  $t$ ,  $= 0.005$  y  $t= 1.9668$ ; las barras representan el error estándar y las letras en las barras la significancia del factor.

En la MED 3, todas las variables (LM, LV y LCef), obtuvieron longitudes mayores en P1, mientras que MED 1 y 4, las longitudes mayores se presentaron en P2 con las variables DIAM, LCef y A. El patrón de comportamiento no es continuo conforme los tiempos de medición, sólo entre variables de cada medición (fig.25).



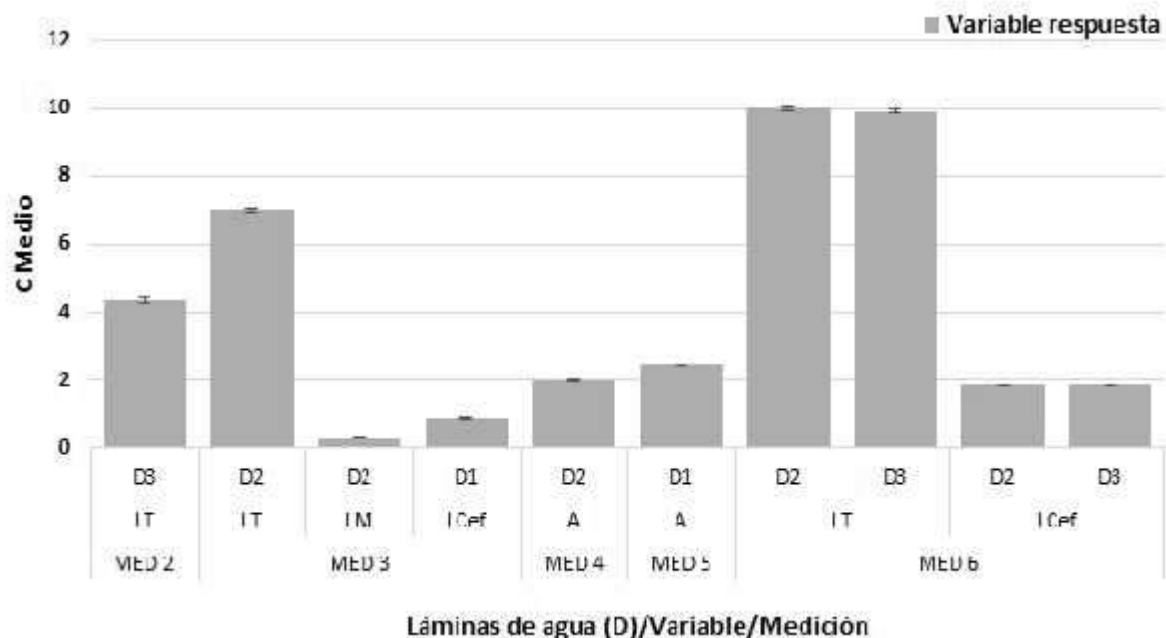
**Figura 25.** Comportamiento en los niveles de profilaxis (P1 y P2) y las variables respuesta de cada medición. En el ANOVA los  $gl= 11$ , la prueba de  $t = 0.005$  y  $t= 1.9668$ ; las barras representan el error estándar y las letras en las barras la significancia del factor.

Finalmente, las diferencias significativas son las mismas para cualquier nivel de profilaxis, P1 P2.

## 2. Láminas de Agua (D)

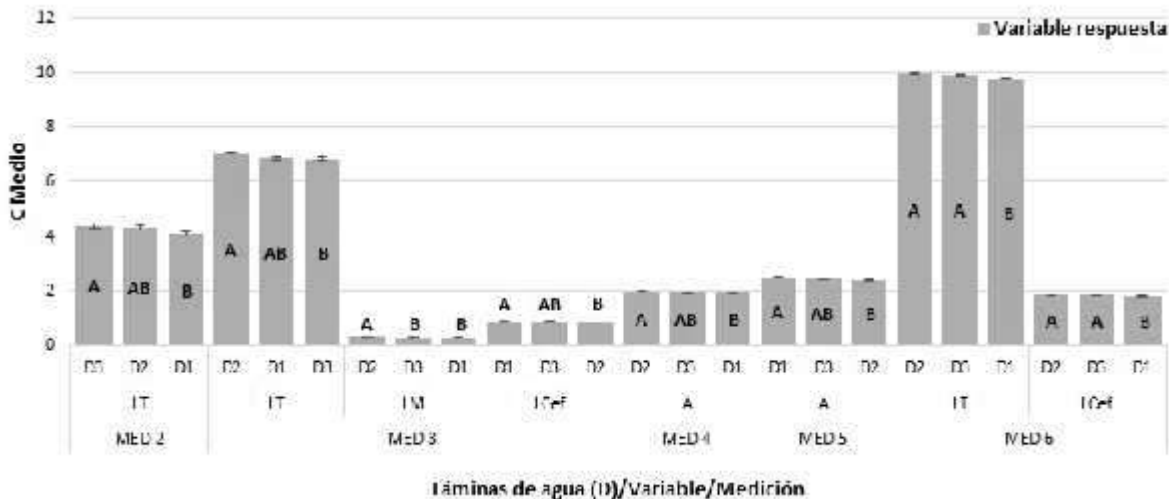
El tratamiento D2 es el que presentó mayor efecto, obtuvo 5 repeticiones de variables significativas, mientras que D1 es el de menor significancia (fig. 28).

En este factor, no se identificaron diferencias significativas en siete variables entre mediciones. No obstante, se identificó un patrón de comportamiento en la variable LT, la cual tuvo diferencias significativas para tres mediciones, siendo mayoría para el nivel D2 (fig. 26).



**Figura 26.** Efecto de las variables con diferencias significativas y el factor de las láminas de Agua (D1, D2 y D3). En el ANOVA los  $gl= 11$ , la prueba de Tukey  $= 0.005$  y  $Q= 2.35379$ ; las barras representan el error estándar.

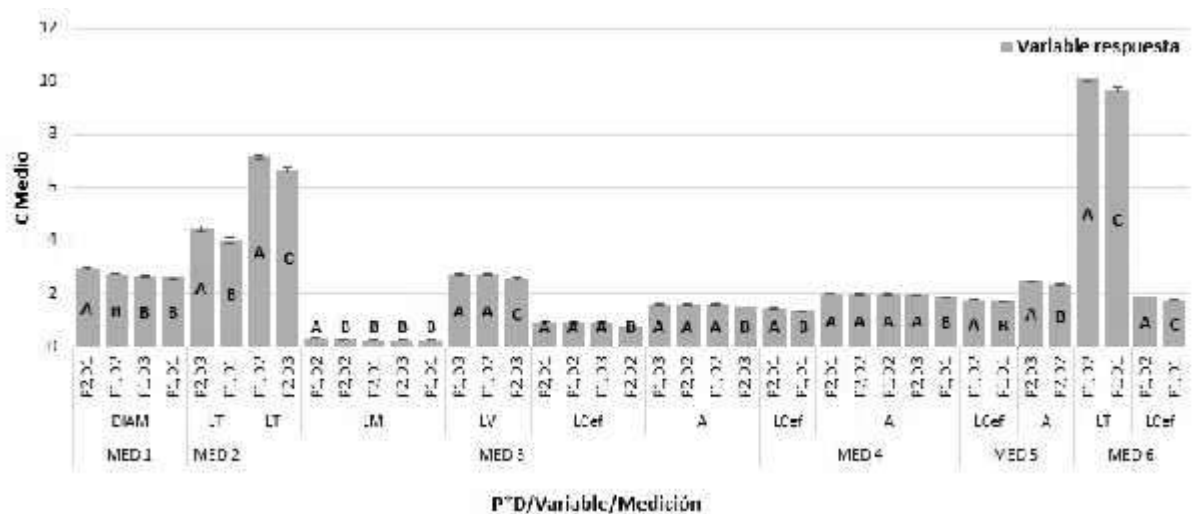
D2 a pesar de ser el mejor tratamiento, en algún momento resultó ser el peor para las variables LCef y A. Contrario a D1 quien resulta ser el peor para la mayoría de las variables. Mientras que D3 es el tratamiento que se mantiene intermedio en los niveles de significancia (fig. 27).



**Figura 27.** Efecto de las láminas de Agua (D1, D2 y D3) y las variables en relación al nivel de significancia. En el ANOVA los  $gl= 11$ , la prueba de Tukey  $= 0.005$  y  $Q= 2.35379$ ; las barras representan el error estándar y las letras en las barras la significancia del factor.

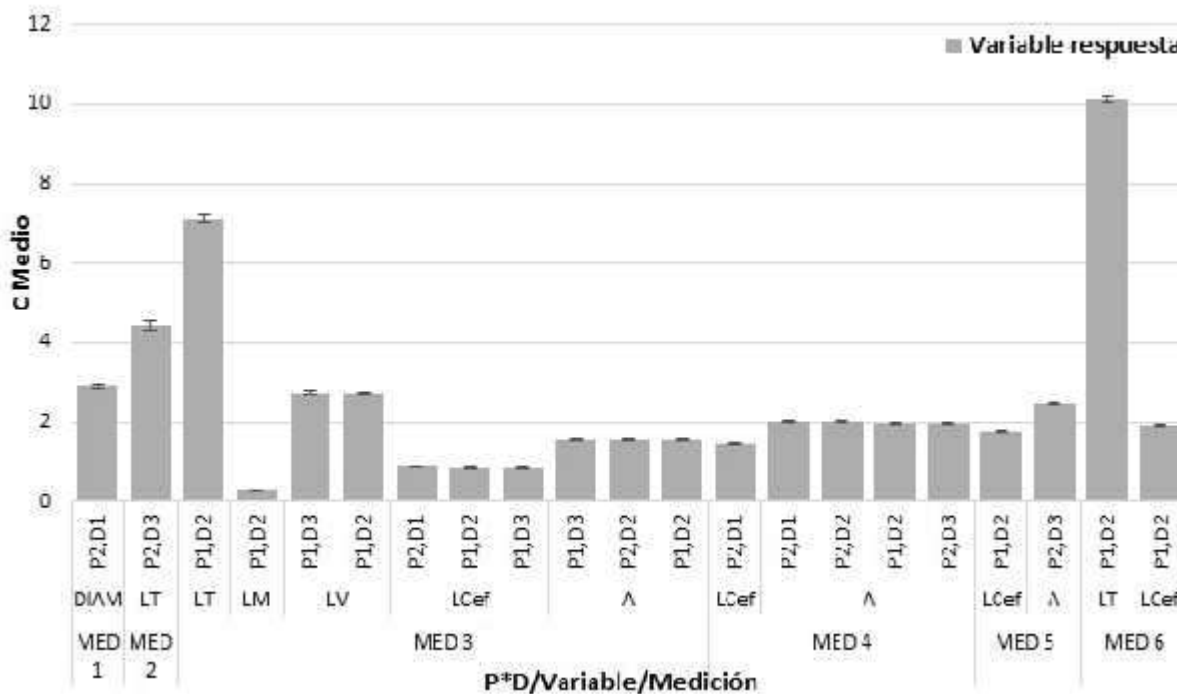
### 3. Interacción Profilaxis (P) y Láminas de Agua (D)

La combinación P1-D2 obtuvo diferencias significativas en 9 variables durante las mediciones. Se identificaron otras cuatro combinaciones con diferencias significativas: P2-D1, P1-D3, P2-D3 y P2-D2, la mayoría de las veces pueden resultar ser las de menor efecto (fig. 30 y 31). En esta interacción, sólo dos variables que no presentaron diferencias significativas.



**Figura 28.** Efecto de la Interacción profilaxis (P1 y P2) con Láminas de Agua (D1, D2 y D3) en relación al nivel de significancia. En el ANOVA los  $gl= 11$ , la prueba de Tukey  $= 0.005$  y  $Q= 2.86568$ ; las barras representan el error estándar y las letras en las barras la significancia del factor.

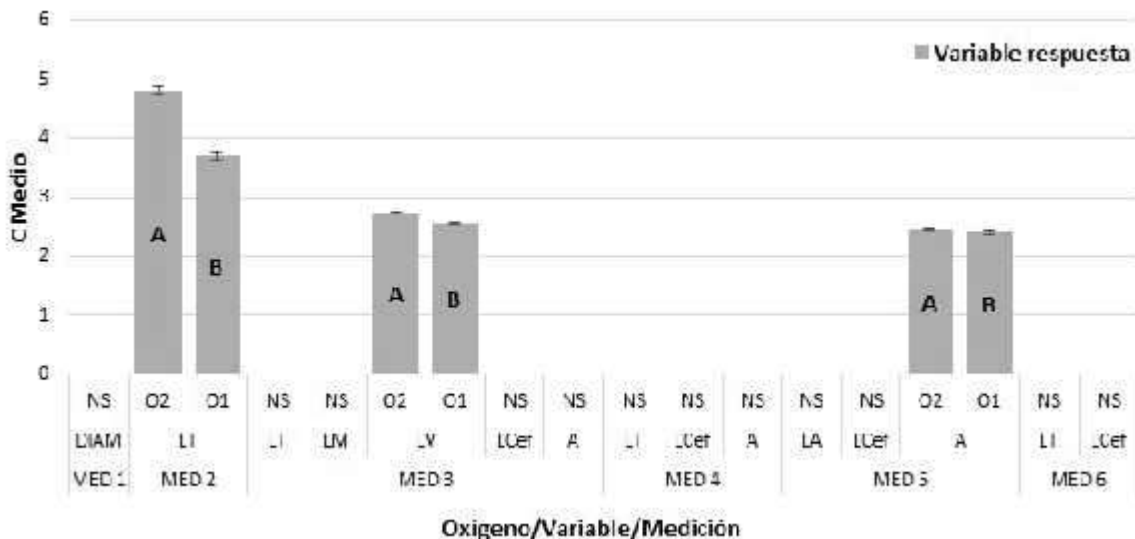
La combinación P1-D2 fue significativa en 5 de 6 variables, para todas las mediciones. Las variables LCef y A, se mantuvieron constantes durante las mediciones, presentaron hasta tres combinaciones significativas en una medición (fig. 29).



**Figura 29.** Comportamiento de la interacción Profilaxis y Láminas de agua en las variables significativas durante las mediciones. En el ANOVA los  $gl= 11$ , la prueba de Tukey  $= 0.005$  y  $Q= 2.86568$ ; las barras representan el error estándar.

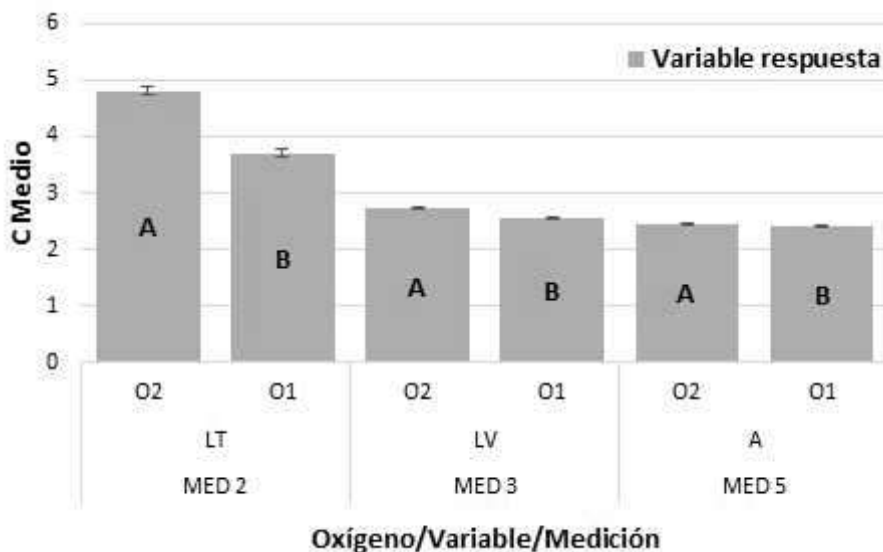
#### 4. Oxígeno (O)

No se presentaron diferencias significativas en al menos 12 combinaciones de las variables respuesta en relación al tiempo, tampoco hubo patrón de comportamiento entre variables (fig 30).



**Figura 30.** Comportamiento del oxígeno (O1 y O2) y las variables durante las mediciones. NS (no significativo). En el ANOVA los  $gl= 11$ , la prueba de  $t, = 0.005$  y  $t=1.9668$ , las barras representan el error estándar y las letras señalan diferencias significativas.

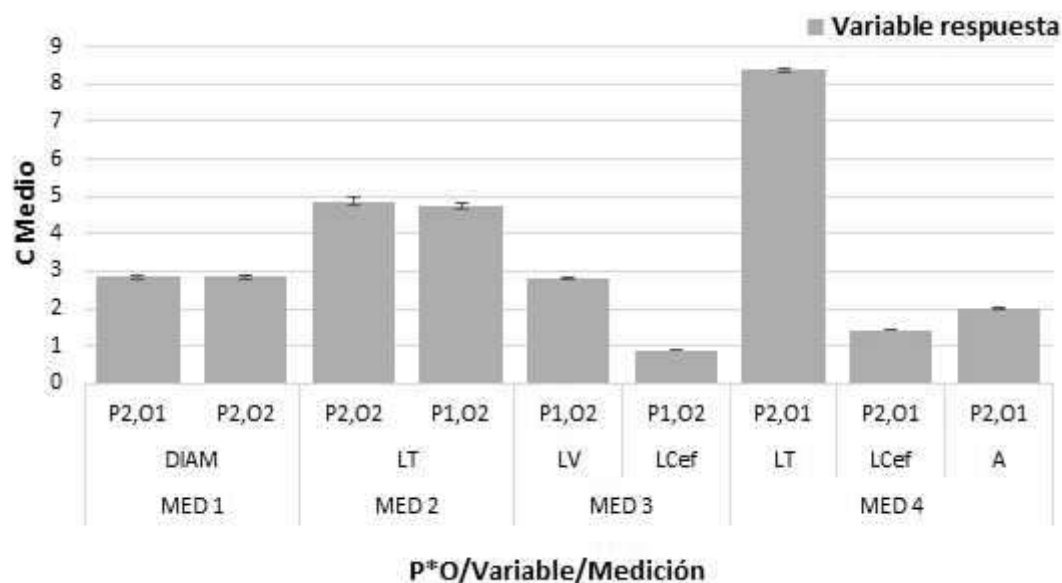
La combinación O2, es significativa para las variables LT, LV y A, en diferentes tiempos de medición, siendo O1 la peor combinación en todos los casos (fig. 31).



**Figura 31.** Efecto del oxígeno entre las variables y tiempo de medición. En el ANOVA los  $gl= 11$ , la prueba de  $t, = 0.005$  y  $t=1.9668$ , las barras representan el error estándar y las letras en las barras la significancia del factor.

## 5. Interacción Profilaxis (P) y Oxígeno (O)

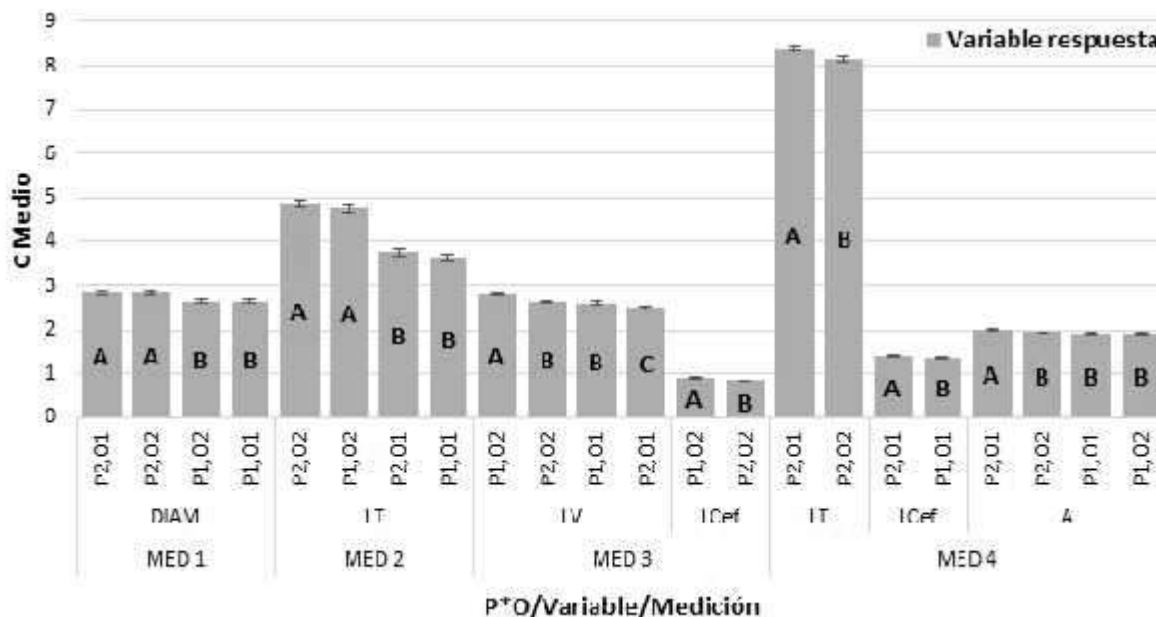
Estadísticamente se identificó a P2-O1 como la mejor combinación, teniendo el mayor número de repeticiones entre las variables (4 repeticiones), en seguida fueron las combinaciones P1-O2 y P2-O2 con tres y dos repeticiones respectivamente (fig.32).



**Figura 32.** Efectos significativos de la interacción profilaxis y oxígeno, en las variables y las mediciones. En el ANOVA los  $gl= 11$ , la prueba de Tukey,  $\alpha = 0.005$  y  $Q= 2.58152$ , las barras representan el error estándar.

No se obtuvieron diferencias significativas en las combinaciones para 8 variables morfométricas en diferentes tiempos (LT-2, LM-1, A-2, LCef-2 y LA-1) y no se observó un patrón entre variables y mediciones.

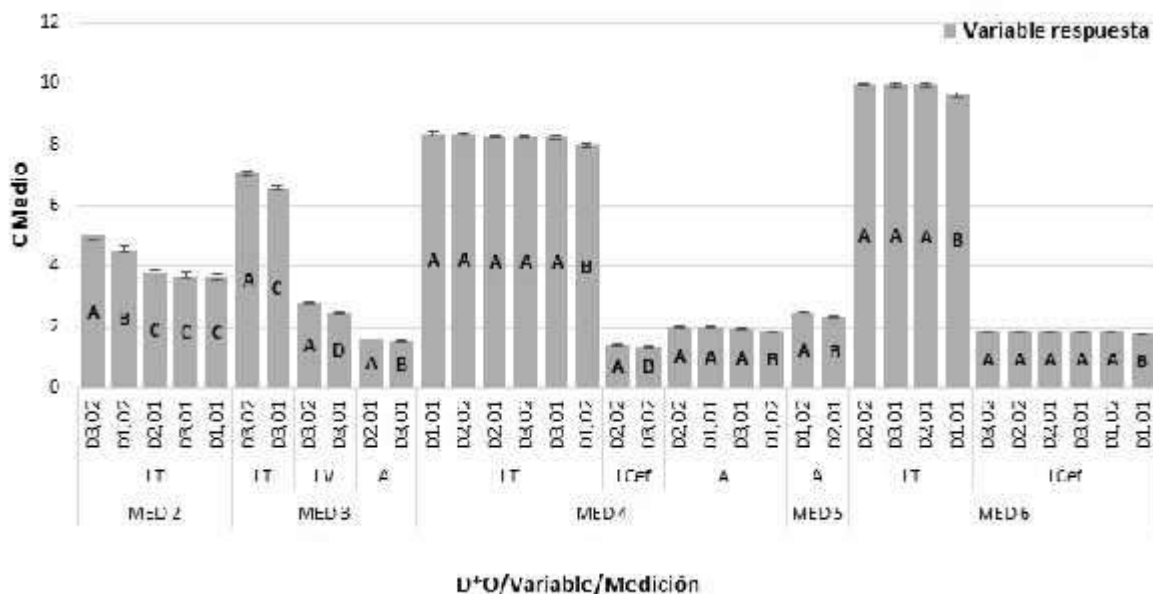
Es posible que P2-O1 pueda ser la peor combinación, aunque hay otras combinaciones con mayores probabilidades. La peor combinación para todos los casos es P1-O1 ya que en ningún momento presentó diferencias significativas (fig. 33).



**Figura 33.** Comportamiento de los niveles de profilaxis y oxígeno para las variables por medición. En el ANOVA los  $gl= 11$ , la prueba de Tukey,  $\alpha = 0.005$  y  $Q= 2.58152$ , las barras representan el error estándar y las letras señalan diferencias significativas.

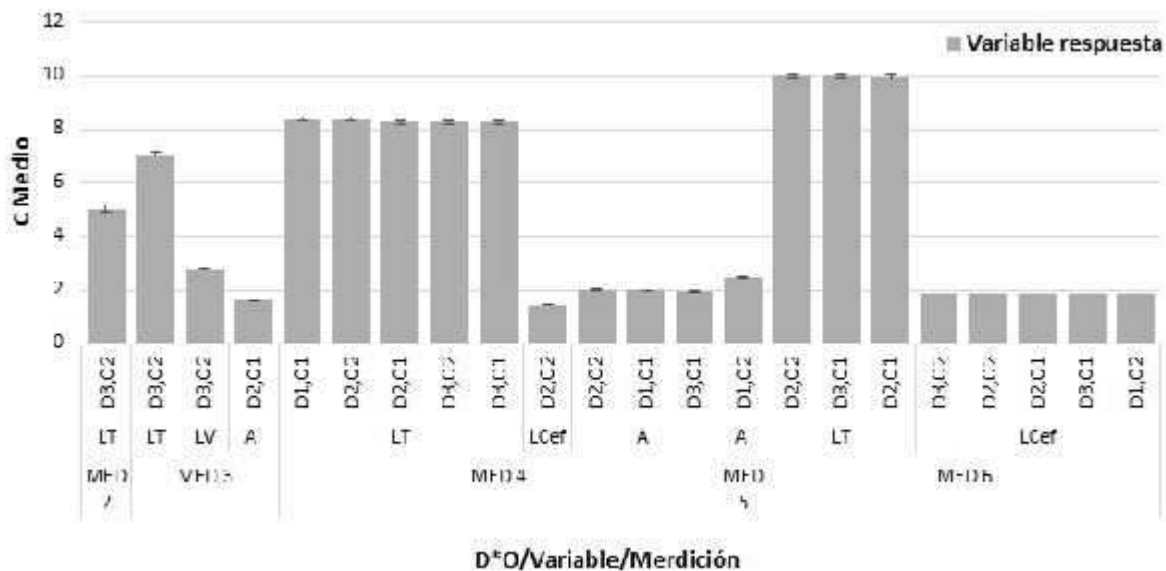
## 6. Interacción Láminas de agua (D) y Oxígeno (O)

No se obtuvieron diferencias significativas en las combinaciones para 5 variables morfométricas en diferentes tiempos (DIAM-1, LM-1, LA-1 y LCef-2). Las variables LT, A y LCef, presentaron patrones de comportamiento continuos, de acuerdo a las mediciones, algunas variables presentaron más de una combinación con diferencias significativas, de las cuales al menos una se repite entre mediciones (fig. 34).



**Figura 34.** Comportamiento de la interacción Láminas de agua y Oxígeno, en las variables por medición. En el ANOVA los  $gl = 11$ , la prueba de Tukey,  $\alpha = 0.005$  y  $Q = 2.86568$ , las barras representan el error estándar y las letras señalan diferencias significativas.

Las combinaciones estadísticamente significativas, en orden de importancia fueron: D2-O2, D3-O2, D3-O1, D2-O1, D1-O2 y D1-O1. La combinación D2-O2 y D3-O2 presentaron el mismo número de diferencias significativas, aunque en D3-O2 se identificó como la peor en una de las variables. Las combinaciones restantes, tienen más posibilidad de ser las peores y o permanecer intermedias (fig. 35).

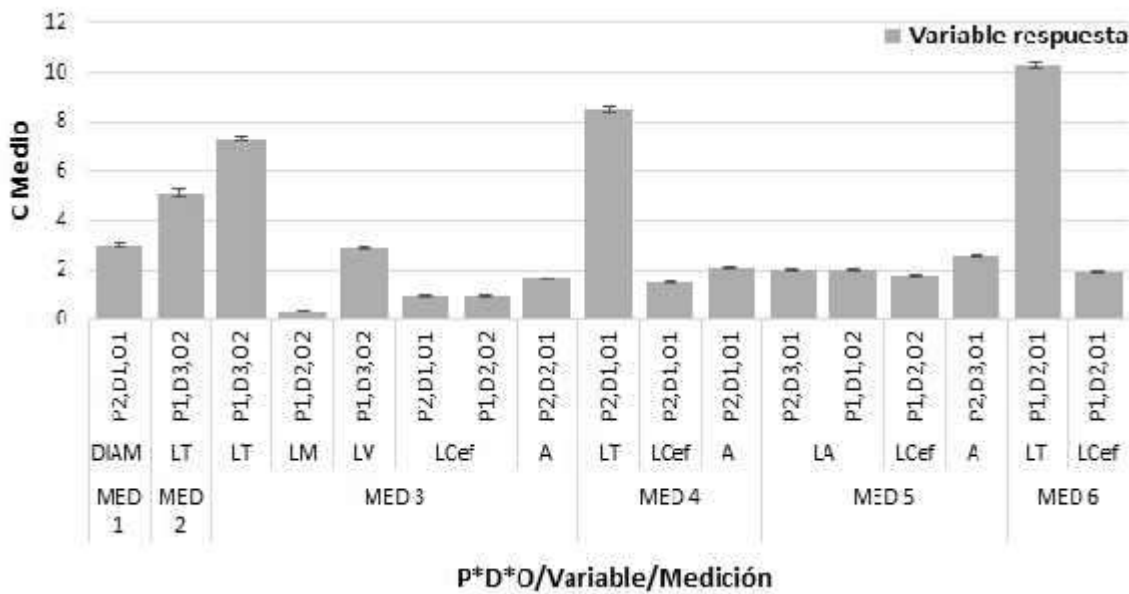


**Figura 35.** Comportamiento significativo de la interacción Láminas de agua y Oxígeno en las variables por medición. En el ANOVA los  $gl= 11$ , la prueba de Tukey,  $\alpha = 0.005$  y  $Q= 2.86568$ , las barras representan el error estándar.

### 7. Interacción Profilaxis (P), Láminas de agua (D) y Oxígeno (O)

Todas las variables con diferencias significativas en el ANOVA, resultaron significativas con la prueba de Tukey. Se identificó patrón continuo entre las variables con respecto a la medición y la frecuencia de las combinaciones entre los factores, cada combinación se repite de dos a tres veces por cada medición en la misma variable (fig. 36) En la misma figura, se observan las peores combinaciones: P1-D1-O1, P1-D3-O1, P2-D1-O2 y P2-D2-O2, en ningún momento fueron significativas.





**Figura 37.** Comportamiento significativo en la interacción Profilaxis, Láminas de agua y Oxígeno, en las variables para cada medición. En el ANOVA los gl= 11, la prueba de Tukey, = 0.005 y Q= 3.29051, las barras representan el error estándar.

Los factores que presentaron patrones de comportamientos que definieron condiciones más favorables para los organismos en función de las variables morfométricas y el tiempo, fueron: Lámina de agua de 6.5 cm (D2), los dos niveles de profilaxis fueron significativos (P1 y P2); oxígeno, el mejor efecto es cuando no se adiciona más oxígeno en el agua (O2); mientras que para las interacciones entre profilaxis y oxígeno, la aplicación de yodo povidona en el agua resulta favorable, P1-O2; en la interacción de profilaxis con densidad la mejor combinación fue P1-D2, seguido de la interacción D2-O2, finalmente durante la triple interacción, la interacción el patrón de comportamiento fue significativa para P1-D1-O2.

Se identificó el patrón de comportamiento de los factores y el efecto de las variables morfométricas conforme el tiempo. Los factores identificados tuvieron diferencias significativas y fueron las combinaciones de mayor frecuencia entre las variable (cuadro 15).

**Cuadro 15.** Patrón de comportamiento de los factores en función del desarrollo y crecimiento de los organismos, conforme a las variables morfométricas y los tiempos de medición.

Factor	Nivel	Variables morfométricas	Tiempo	Cuadrado medio	Error Estandar	gl	P<0.05
P	P1	LM	MED 3	0.2847559	0.0044114	11	<.0001
		LV		2.7102497	0.0178449	11	0.0028
		LCef		0.8827638	0.0093319	11	<.0001
	P2	DIAM	MED 1	2.8433889	0.0312885	11	0.0003
		LCef	MED 4	1.405321	0.0107963	11	0.0005
		A		1.978305	0.0131922	11	<.0001
D	D2	LT	MED 3	7.0103936	0.0525772	11	<.0001
		LM		0.2921378	0.0054028	11	0.0028
		A	MED 4	1.9774634	0.0161571	11	<.0001
		LT	MED 6	9.975023	0.0522363	11	<.0001
		LCef		1.8551699	0.0110917	11	<.0001
O	O2	LT	MED 2	4.8063889	0.0624402	11	<.0001
		LV	MED 3	2.7287181	0.0178449	11	<.0001
		A	MED 5	2.4511507	0.0165411	11	0.0008
P*D	P1-D2	LT	MED 3	7.1352432	0.0743554	11	<.0001
		LM		0.3078882	0.0076408	11	0.0028
		LV		2.7229423	0.0309083	11	<.0001
		Lcef		0.8984665	0.0161632	11	<.0001
		A		1.581164	0.01653	11	0.0003
		A	MED 4	1.9626549	0.0228496	11	<.0001
		LCef	MED 5	1.7600716	0.0177124	11	0.0087
		LT	MED 6	10.11489	0.0738732	11	<.0001
		LCef		1.8976127	0.015686	11	<.0001
P*O	P2-O1	DIAM	MED 1	2.8493333	0.0442486	11	0.0003
		LT	MED 4	8.3797518	0.0521157	11	0.0012
		LCef		1.4285356	0.0152683	11	0.0005
		A		2.012425	0.0186566	11	<.0001
D*O	D2-O2	LT	MED 4	8.3417136	0.0638284	11	0.0012
		LCef		1.4261826	0.0186997	11	0.0005
		A		2.0078389	0.0228496	11	<.0001
		LT	MED 6	9.9997686	0.0738732	11	<.0001
		LCef		1.8572735	0.015686	11	<.0001
P*D*O	P2-D1-O1	DIAM	MED 1	2.9813333	0.0766408	11	0.0003
		LCef	MED 3	0.9425963	0.0228583	11	<.0001
		LT	MED 4	8.4874927	0.090267	11	0.0012
		LCef		1.4708261	0.0264454	11	0.0005
		A		2.0855298	0.0323142	11	<.0001

## 2.6 RESULTADOS DEL DESARROLLO LARVAL

### 2.6.1 Factores ambientales en condiciones controladas.

#### 2.6.1.1 Temperatura ambiental, intensidad de luz y humedad relativa

Las características del ranario y los cambios ambientales repentinos, ocasionaron registros de hasta 41°C. Los registros más altos ocurrieron entre las 13:00 y 17:00 horas, durante la noche se obtuvieron 16.80°C. La HR se midió en tres sitios estratégicos del ranario, se obtuvieron promedios de 43.03% hasta 63.59% (Cuadro 16).

**Cuadro 16.** Variables ambientales controladas al interior del ranario.

	Temperatura	Intensidad de Luz	HR (%)		
	°C	lux	1	2	3
<b>Promedio</b>	25.74	8741.8	43.03	63.59	51.71
<b>Desv. Estándar ( )</b>	5.127	7329.05	11.29	10.28	10.57
<b>Intervalo</b>	41.6-16.80	28934-11	64-16	85-32	72-19

#### 2.6.1.2 Análisis de los parámetros fisicoquímicos del agua

La Temperatura promedio del agua fue de 23.5°C ( = 2.347), máximas de 30.96°C y mínimas de 19.48°C; el promedio fue similar a las mediciones de calidad del agua reportados por el multiparamétrico HANNA®.

Los resultados se expresan en promedio e intervalos de confianza en las UE y la fuente de abastecimiento (cuadro 17 y 18).

**Cuadro 17.** Parámetros fisicoquímicos.

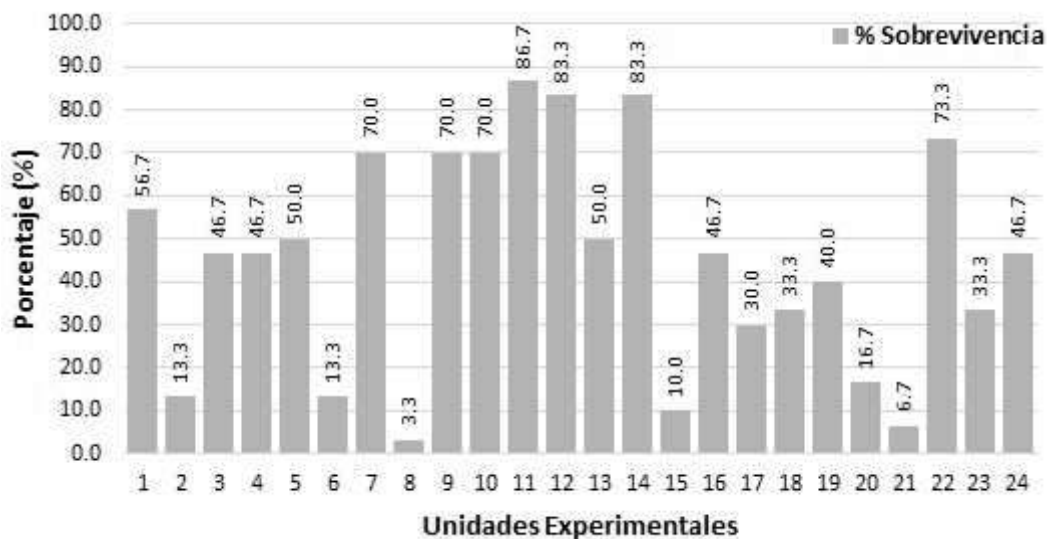
		Temp (°C)	pH	% OD (mg/L)	OD (mg/L)	CE (mS/cm)	SDT (ppm)
<b>UE</b>	<b>Promedio</b>	23.86	8.45	67.22	4.54	525.28	262.58
	<b>Desv est ( )</b>	1.27	0.57	15.14	0.96	51.38	25.85
	<b>Rango</b>	26.9-21.0	9.94-6.86	103.9-13.10	6.95-1.8	612-415	306-208
<b>Fuente</b>	<b>Promedio</b>	23.85	7.26	50.90	3.36	552.50	277.75
	<b>Desv est ( )</b>	1.50	0.50	13.69	0.93	19.94	10.01
	<b>Rango</b>	25.6-22.3	7.96-6.8	63.5-31.5	4.23-2.04	575-528	288-264

**Cuadro 18.** Parámetros fisicoquímicos.

		Alcalinidad	Dureza	Cloro	Amoniaco (NH <sub>3</sub> )	Amonio (NH <sub>4</sub> )	Nitritos
UE	Promedio	84.36	195.52	101.50	0.03	0.03	0.43
	Desv est ( )	108.24	16.77	14.71	0.03	0.03	0.44
	Rango	324.90-17.10	239.4-153.9	120-90	0.51-0	0.163-0	1.65-0
Fuente	Promedio	228.00	202.35	140.00	0.00	0.00	0.00
	Desv est ( )	103.55	6.98	15.49	0.00	0.00	0.00
	Rango	273.6-17.10	205.2-188.1	150-120	0.00	0.00	0.00

### 2.6.2 Supervivencia, estado físico de los organismos y fases de desarrollo alcanzadas.

La supervivencia total al finalizar los experimentos fue del 45%, de los cuales el 77.77% se mantuvieron sanos y el 22.22% presentó malformaciones. El porcentaje de las tres fases desde larva inicial hasta clímax metamórfico (R2, R3 y R4) alcanzado fue del 32.41% en R2, 66.98% en fase R3 y 0.61% en fase R4. Se identificaron diferencias significativas en la supervivencia de cada UE (fig. 38).



**Figura 38.** Porcentaje de supervivencia para cada UE, al finalizar la última medición.

### 2.6.3 Análisis de correlación

Conforme a los valores de correlación entre cada par de variables, la más alta fue entre las variables Longitud total (LT) y Longitud cola (LC). Por consiguiente, la variable “LC” al solo representar una fracción del organismo se descartó del siguiente análisis. El cuadro 19 muestra los valores del coeficiente de correlación entre LT y LC para cada medición.

**Cuadro 19.** Coeficiente de correlación entre las variables morfométricas Longitud total (LT) y Longitud cola (LC).

Mediciones	Coeficiente de correlación (r)
MED 1	0.9800
MED 2	0.9850
MED 3	0.9870
MED 4	0.9950
MED 5	0.9901

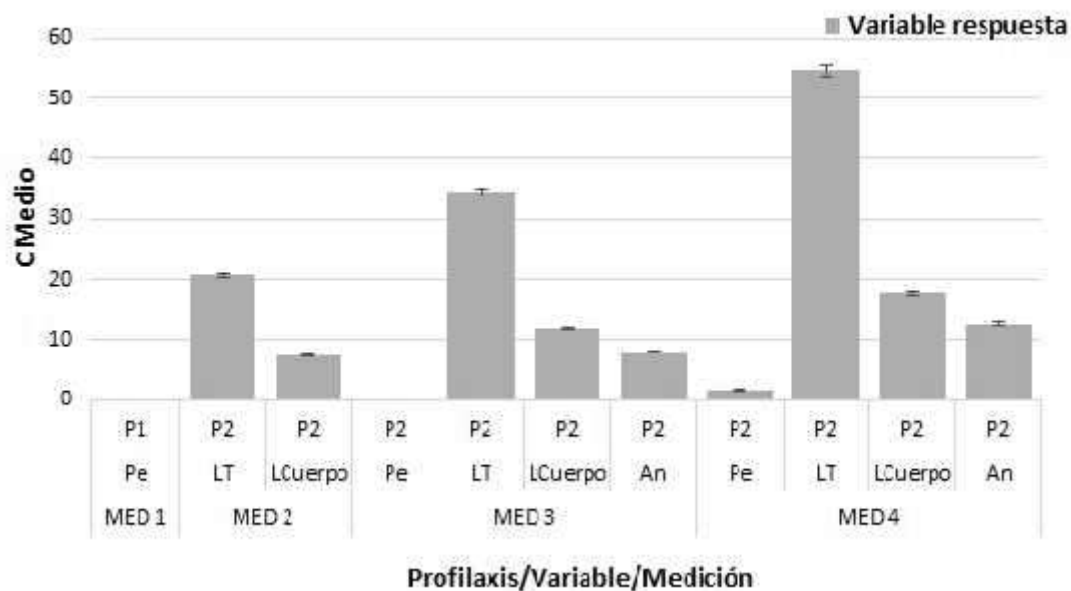
### 2.6.4 Análisis factorial

En el ANOVA se obtuvieron diferencias significativas para todas las variables de cada medición, la  $P > F = < 0.0001$  para las variables Pe, LT, LCuerpo y An, mientras que la variable Boca fue de 0.0031. En las mediciones 1, 2, 3 y 4 los  $gl=17$  y en la medición 5,  $gl=16$ .

En seguida se ordenan los resultados por factor, seguido de las interacciones, y los valores de cada prueba:

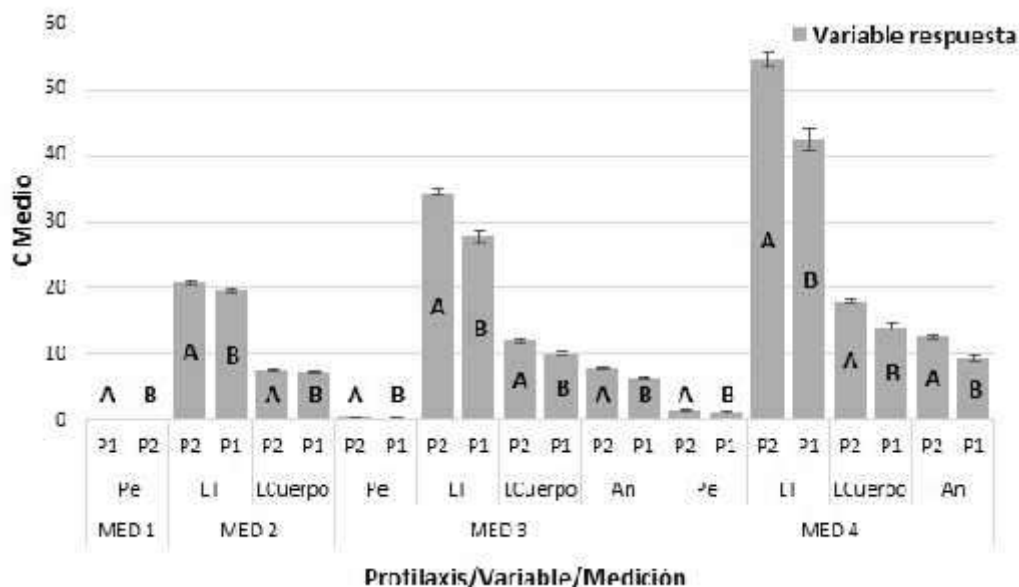
#### 1. Profilaxis (P)

El factor P2, es estadísticamente mejor que P1, fue significativo en 9 de 10 variables, las mediciones 2, 3 y 4 son las más representativas de P2, todas las variables presentaron diferencias significativas. El comportamiento de LT fue continuo conforme las mediciones (fig. 39).



**Figura 39.** Efectos significativos de la profilaxis en las variables para cada medición. En el ANOVA la  $P > F = < 0.0001$ ,  $gl = 17$ , las barras representan el error estándar.

No se presentaron diferencias significativas en 10 variables entre las mediciones 1,2 y 5. Esta última no fue significativa para ninguna de las variables (fig. 40).

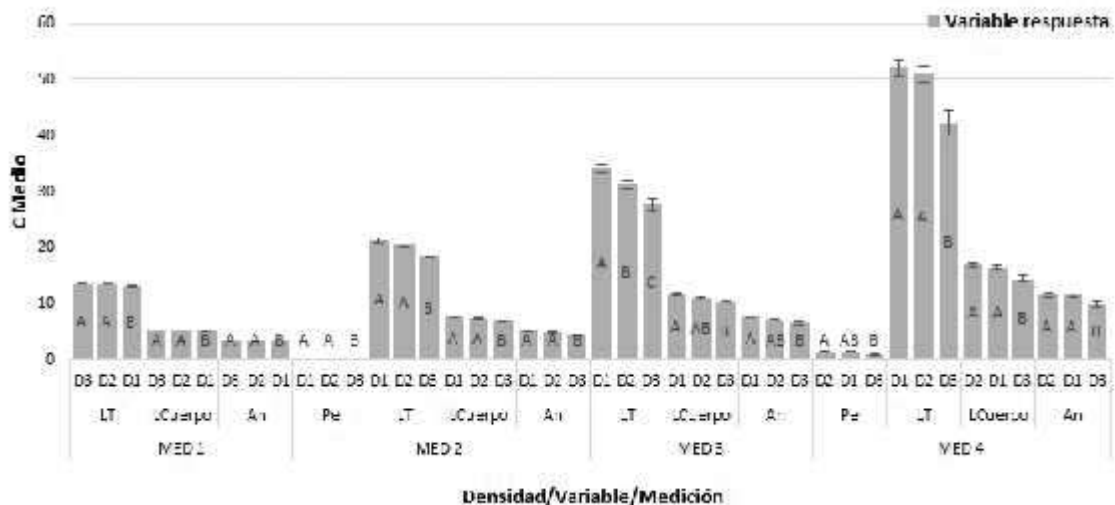


**Figura 40.** Comportamiento de la profilaxis en las variables para cada medición. En el ANOVA la  $P > F = < 0.0001$ ,  $gl = 17$ , las barras representan el error estándar y las letras señalan diferencias significativas.

## 2. Densidad (D)

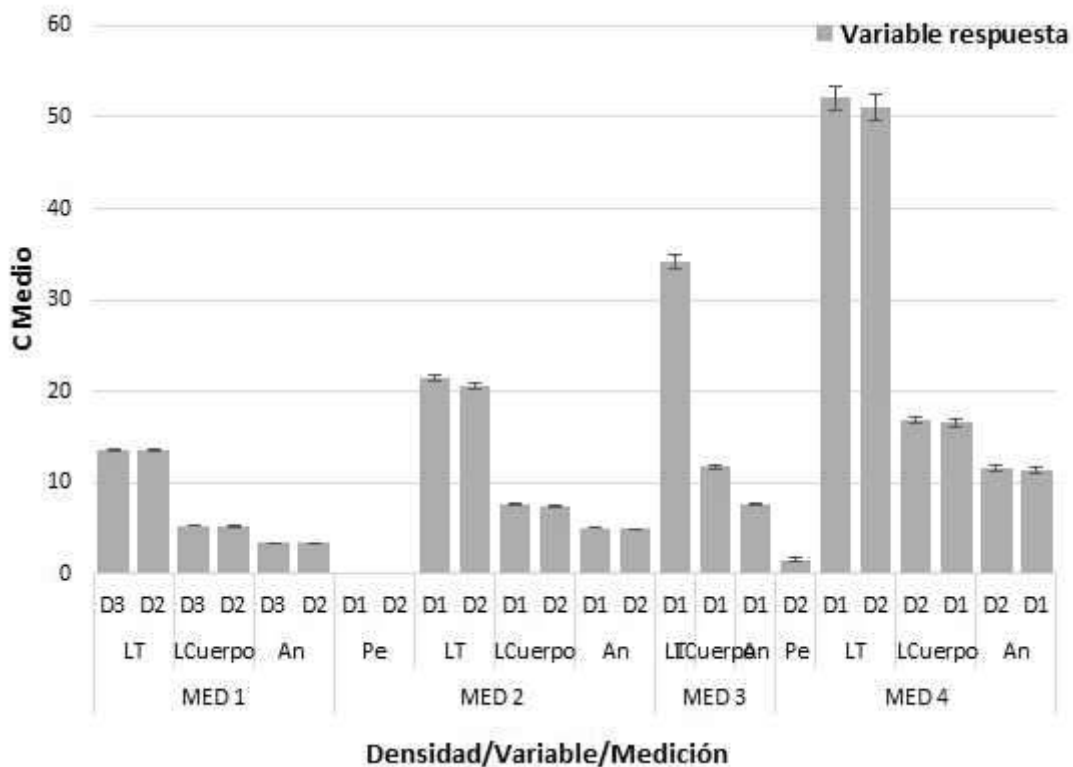
No se identificaron diferencias significativas en 7 variables entre mediciones, la medición 5 no fue significativa para ninguna de las variables.

En las mediciones 2 y 4, todas las variables se comportaron igual en relación a D1 y D2, se obtuvieron diferencias significativas para ambos niveles del factor (fig. 41).



**Figura 41.** Comportamiento de la densidad en las variables para cada medición. En el ANOVA la  $P > F = < 0.0001$ ,  $gl = 17$ , las barras representan el error estándar y las letras señalan diferencias significativas.

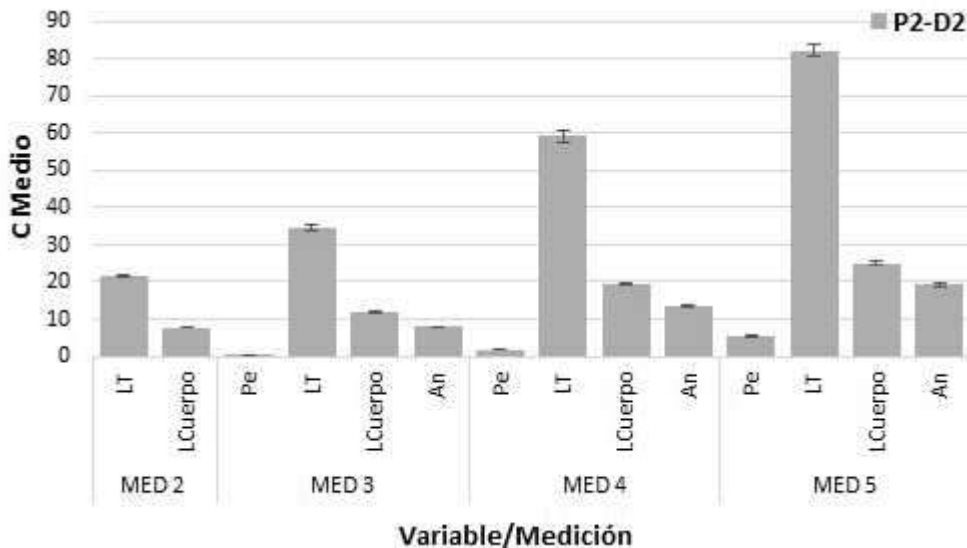
El factor D2 fue el de mayor efecto, presentó 11 variables para cada medición con diferencias significativas, seguido de D1 con 10 variaciones. Mientras tanto, D3 resultó ser el de menor efecto (fig. 42).



**Figura 42.** Efecto significativo en la densidad para las variables de cada medición. En el ANOVA la  $P > F = < 0.0001$ ,  $gl = 17$ , las barras representan el error estándar.

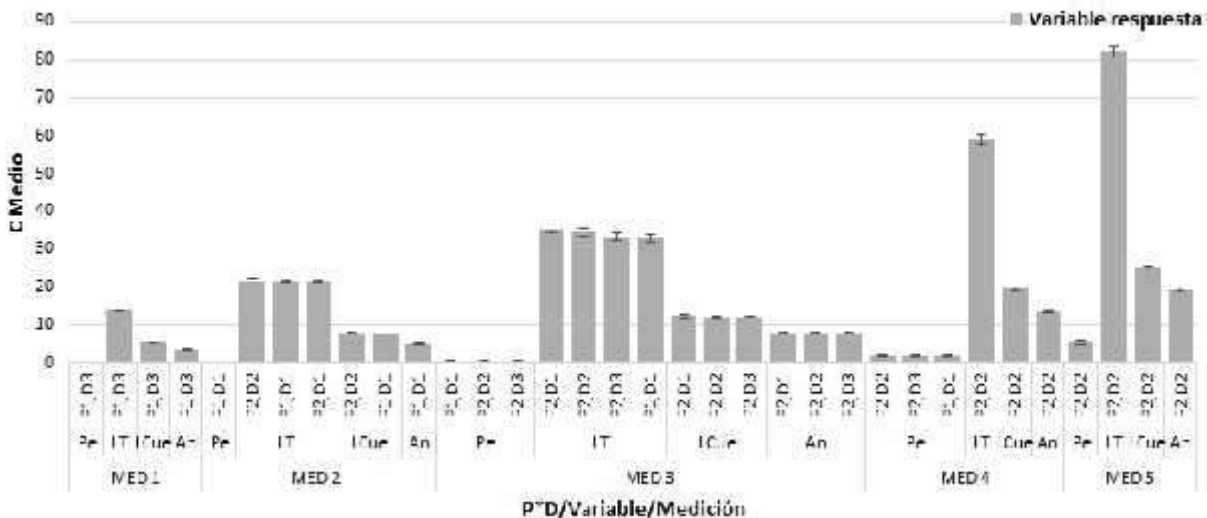
### 3. Interacción Profilaxis (P) y Densidad (D)

La combinación P2-D2 fue significativamente mayor que todas las combinaciones posibles, todas las variables a partir de la medición 2 presentaron diferencias significativas para esta combinación, LT y LCuerpo se mantuvieron constantes desde la medición 2 (fig 43).



**Figura 43.** Efecto significativo en la interacción P2-D2, en las variables de cada medición. En el ANOVA la  $P > F = < 0.0001$ ,  $gl = 17$  (MED 2,3 y 4)  $gl = 16$  (MED 5), las barras representan el error estándar.

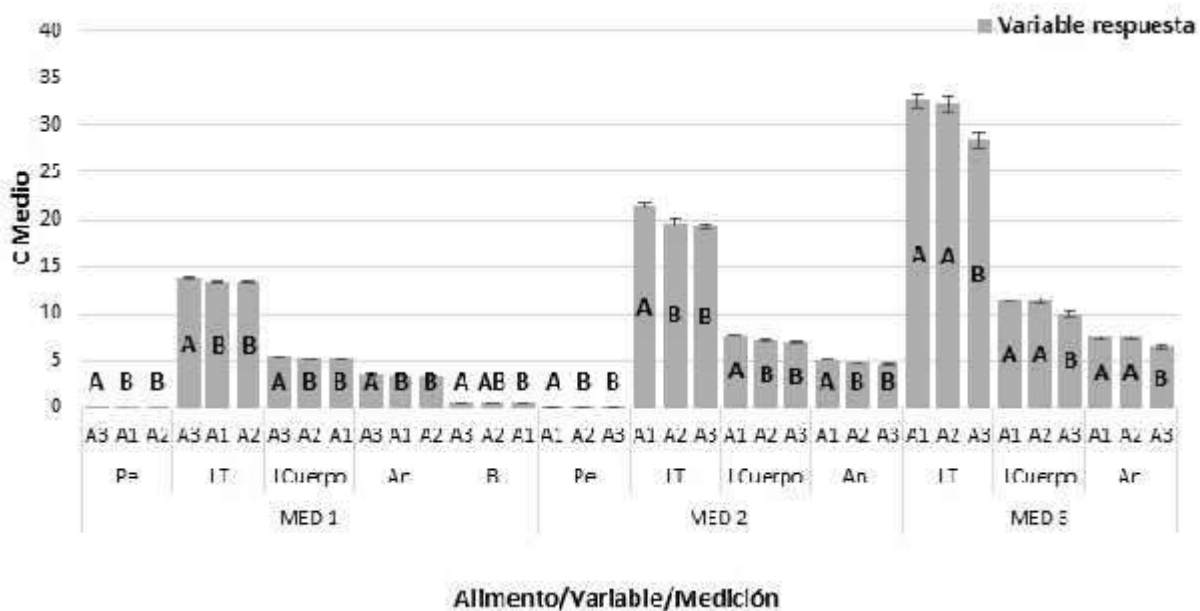
La variable Boca, fue la única que no presentó diferencias significativas. En la medición 5 el patrón de comportamiento fue para P2-D2, con diferencias significativas en todas las variables y exclusivamente para esa combinación. Al igual que LT, LCuerpo y An de la medición 4. No obstante, en las mediciones 1, 2, 3 y 4, cada variable obtuvo diferencias significativas en al menos 3 combinaciones. La medición 1 no presentó diferencias significativas para P2-D2. (fig. 44). P1-D2, resultó ser la peor combinación, al no tener diferencias significativas.



**Figura 44.** Efecto significativo de la interacción profilaxis y densidad, en las variables de cada medición. En el ANOVA la  $P > F = < 0.0001$ ,  $gl = 17$  (mediciones 2,3 y 4)  $gl = 16$  (medición 5), las barras representan el error estándar.

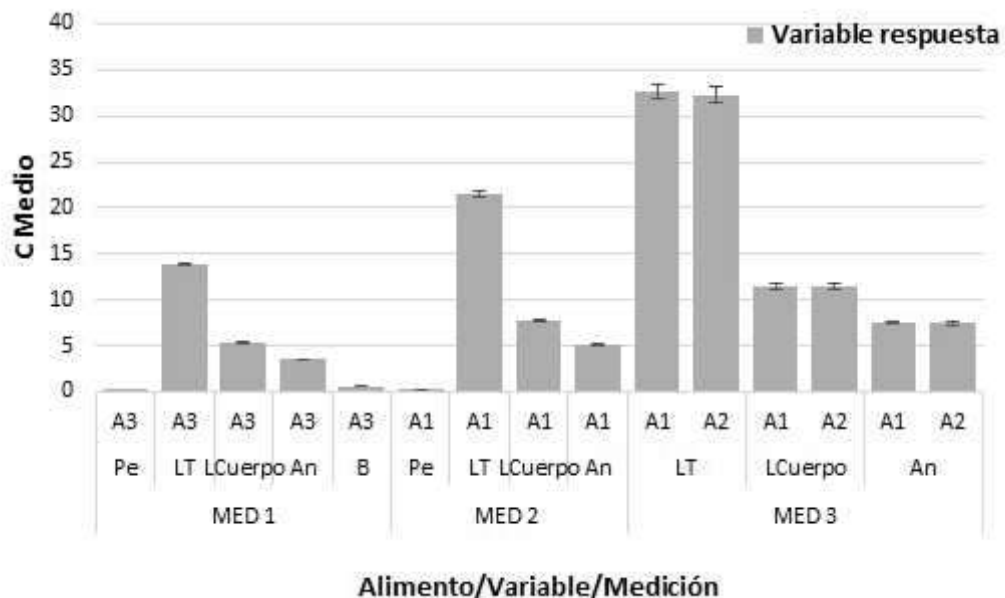
#### 4. Alimento (A)

No se presentaron diferencias significativas en 9 combinaciones, ese comportamiento se presentó en todas las variables de la medición 4 y 5. En este tratamiento, la Boca (B) presentó diferencias significativas. El tratamiento A1 fue la combinación de mayor significancia, además se presenta con menor frecuencia en las variables no significativas en comparación con A2 y A3 (fig. 45).



**Figura 45.** Comportamiento de la interacción Alimento, en las variables para cada medición. En el ANOVA la  $P > F = < 0.0001$  y  $P > F = 0.0031$  (Boca),  $gl = 17$ , las barras representan el error estándar y las letras señalan diferencias significativas

El tratamiento A1 se mantuvo significativa para todas las variables de la medición 2 y 3, en tanto que la medición 1 fue significativa únicamente para A3 (fig. 46).

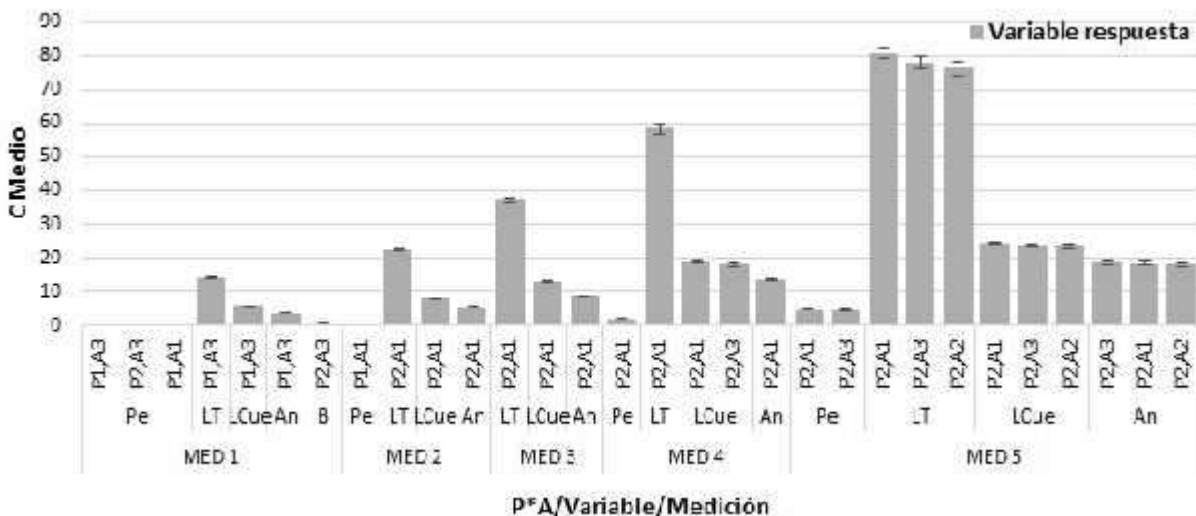


**Figura 46.** Efecto significativo de la interacción alimento, en las variables para cada medición. En el ANOVA la  $P > F = < 0.0001$  y  $P > F = 0.0031$  (Boca),  $gl = 17$ , las barras representan el error estándar.

## 5. Interacción Profilaxis (P) y Alimento (A)

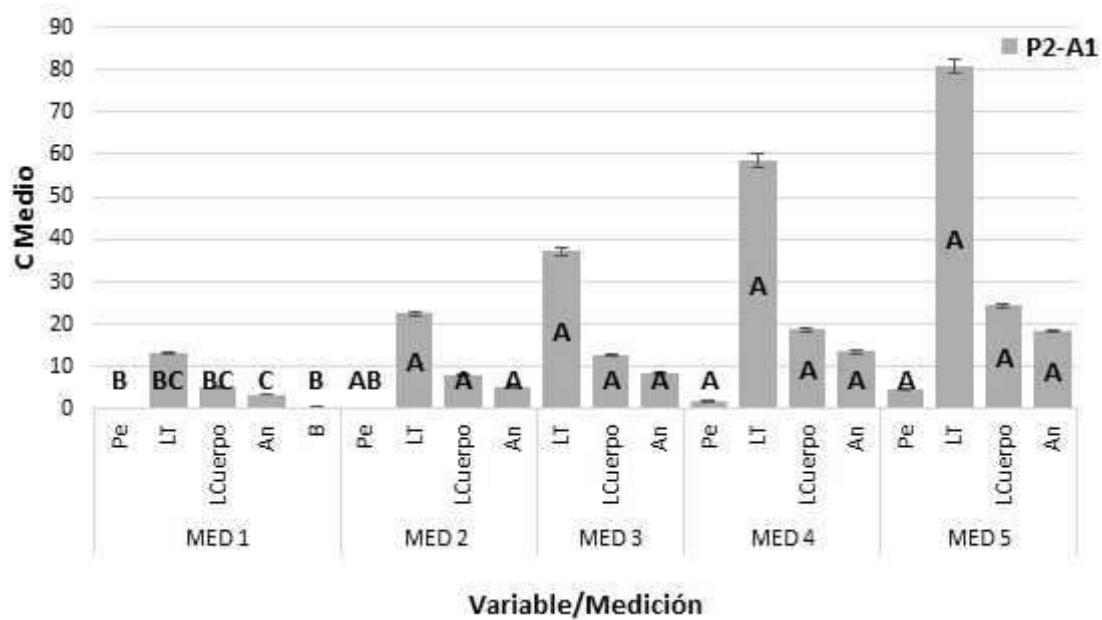
En las mediciones 2, 3, 4 y 5, todas las variables presentaron un patrón de comportamiento significativo en el factor P2-A1, por lo tanto, estadísticamente es la mejor combinación (fig. 47).

No se obtuvo diferencia significativa en la variable Pe de la medición 3. En esta interacción fueron cinco las combinaciones que tuvieron diferencias significativas, ninguna compete con P2-A1.



**Figura 47.** Efecto significativo de la interacción Profilaxis y Alimento, en las variables para cada medición. En el ANOVA la  $P > F = < 0.0001$  y  $P > F = 0.0031$  (Boca),  $gl = 17$  (MED 2,3 y 4)  $gl = 16$  (MED 5), las barras representan el error estándar.

El efecto de la interacción P2-A1, no es significativo en la medición 1, en esta las variables se comportan diferente a todas las demás, no mantuvo el mismo patrón de significancia en ninguna de sus variables (fig. 48).



**Figura 48.** Comportamiento de la combinación P2-A1, en las variables de cada medición. En el ANOVA la  $P > F = < 0.0001$  y  $P > F = 0.0031$  (Boca),  $gl = 17$  (MED 2,3 y 4)  $gl = 16$  (MED 5), las barras representan el error estándar y las letras señalan diferencias significativas.

La combinación con el menor desempeño fue P1-A2, en ningún momento presentó diferencias significativas, sin embargo, se presenta en todas las variables de cada medición y para la medición 5 no fue posible estimar su valor.

**Cuadro 20.** Comportamiento no significativo de la combinación P1-A2 en la interacción Profilaxis y Alimento, para las variables de cada medición.

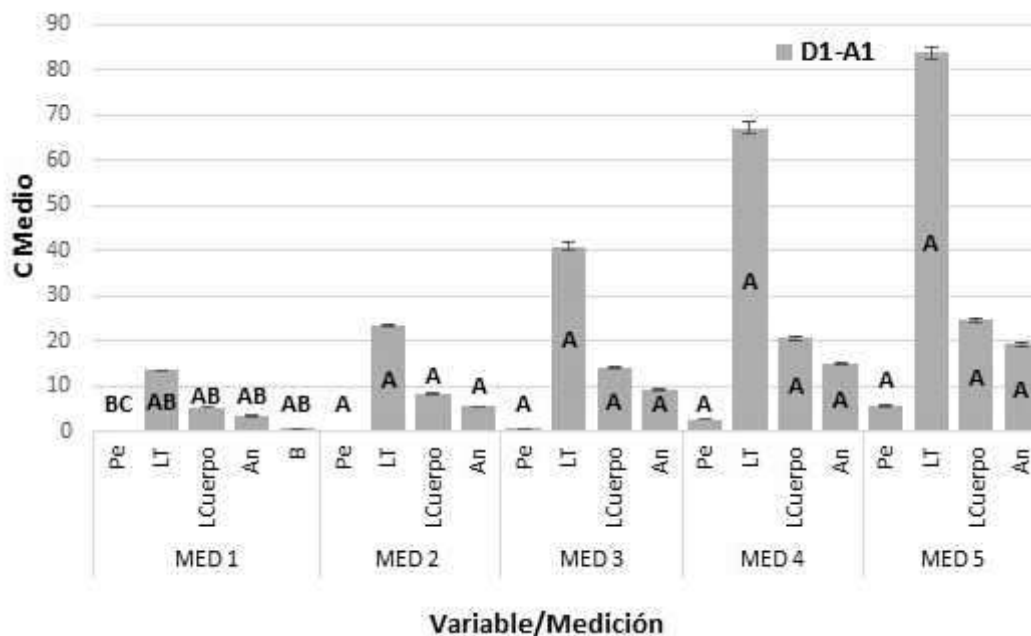
Fecha	Variable	Combinación	Significancia	C Medio*	EE**
MED 1	Pe	P1,A2	AB	0.02515556	0.00068859
	LT	P1,A2	BC	13.374881	0.11668168
	LCuerpo	P1,A2	ABC	5.1994782	0.04282814
	An	P1,A2	ABC	3.3872569	0.03106868
MED 2	Pe	P1,A2	B	0.08207422	0.00626101
	LT	P1,A2	B	19.246607	0.44139584
	LCuerpo	P1,A2	C	6.9113761	0.14739418
	An	P1,A2	BC	4.7041574	0.10041908
MED 3	LT	P1,A2	CD	29.546679	1.2599346
	LCuerpo	P1,A2	C	10.545928	0.42305493

	An	P1,A2	BC	6.9427587	0.27128182
<b>MED 4</b>	Pe	P1,A2	AB	1.330675	0.29325665
	LT	P1,A2	CD	44.180367	3.0404431
	LCuerpo	P1,A2	BC	14.59187	0.8913048
	An	P1,A2	CD	9.970053	0.7293243
<b>MED 5</b>	Pe	P1,A2	AB	N/E	.
	LT	P1,A2	AB	N/E	.
	LCuerpo	P1,A2	AB	N/E	.
	An	P1,A2	AB	N/E	.

N/E= no estimable, \*CMedio= cuadrado medio, \*\*EE= Error Estándar.

## 6. Interacción Densidad (D) y Alimento (A)

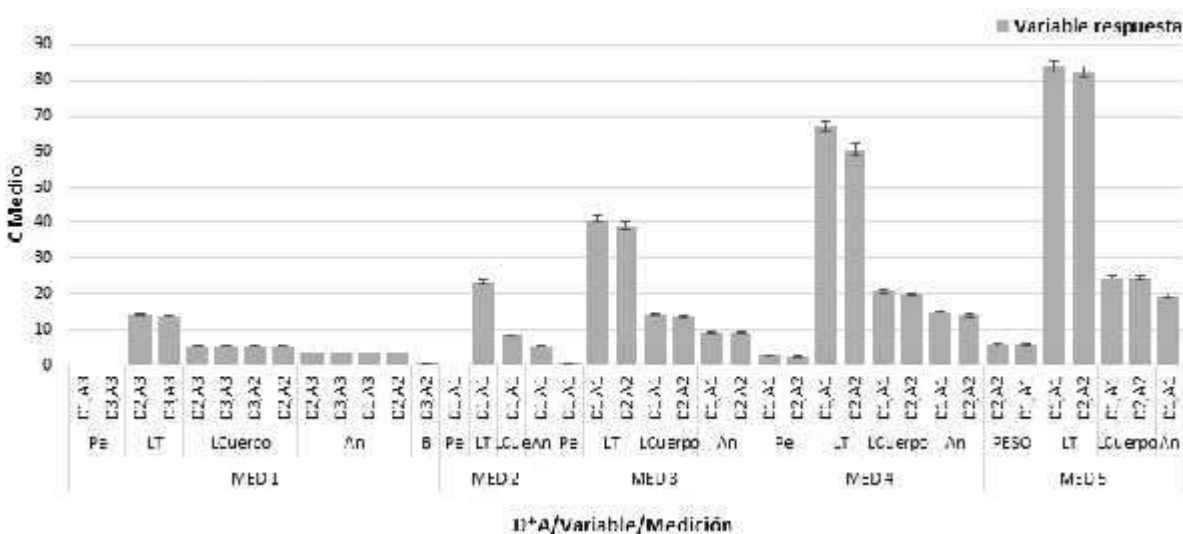
Todas las variables presentaron diferencias significativas. Estadísticamente la combinación D1-A1, fue la más representativa, teniendo el mayor número de repeticiones (16). Presenta un patrón de comportamiento en donde todas las variables de las mediciones 2, 3, 4 y 5 son favorables para esta combinación, en comparación con la medición 1, el efecto de D1-A1 no es significativo (fig. 49).



**Figura 49.** Comportamiento de la combinación D1-A1, en las variables de cada medición. En el ANOVA la  $P > F = < 0.0001$  y  $P > F = 0.0031$  (Boca),  $gl = 17$  (MED 2,3 y 4)  $gl = 16$  (MED 5), las barras representan el error estándar y las letras señalan diferencias significativas.

Las combinaciones D1-A1 y D2-A2, son igual de significativas para todas las variaciones en la medición 3, 4 y 5. Las variables morfométricas de MED 2 son siempre significativas para D1-A1. D2-A2 es la segunda mejor combinación de acuerdo al número de repeticiones entre variables (fig. 50).

La combinación D3-A2, presente en la medición 1, no fue estimable para la medición 5. Las combinaciones restantes, tienen más posibilidad de ser las peores y o permanecer intermedias.

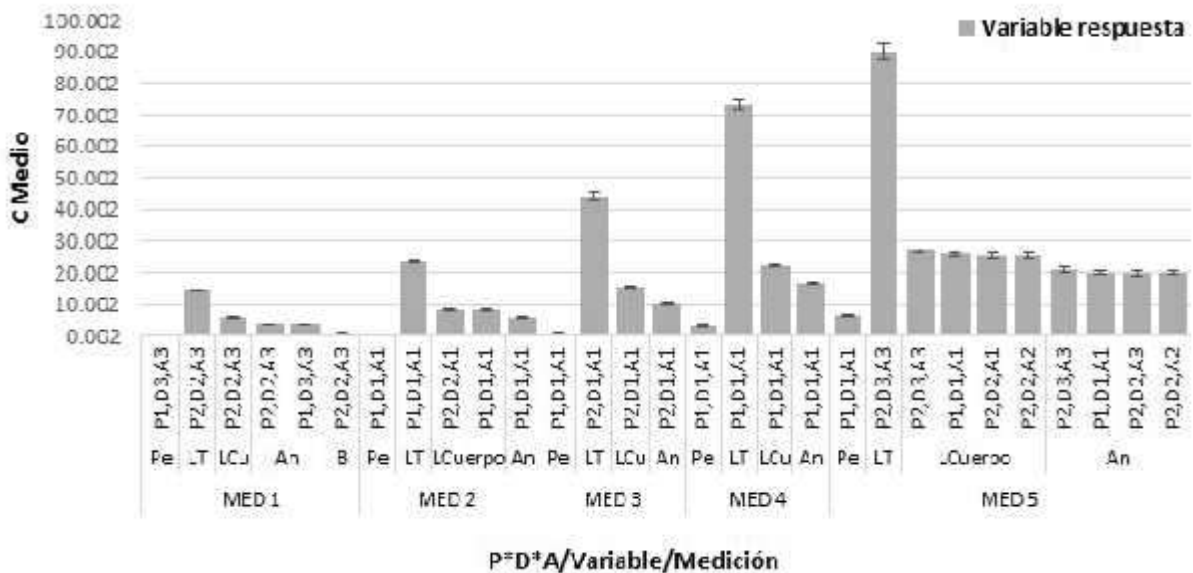


**Figura 50.** Efecto significativo de la interacción Densidad y Alimento, en las variables para cada medición. En el ANOVA la  $P > F = < 0.0001$  y  $P > F = 0.0031$  (Boca),  $gl = 17$  (MED 2,3 y 4)  $gl = 16$  (MED 5), las barras representan el error estándar.

## 7. Interacción Profilaxis (P), Densidad (D) y Alimento (A)

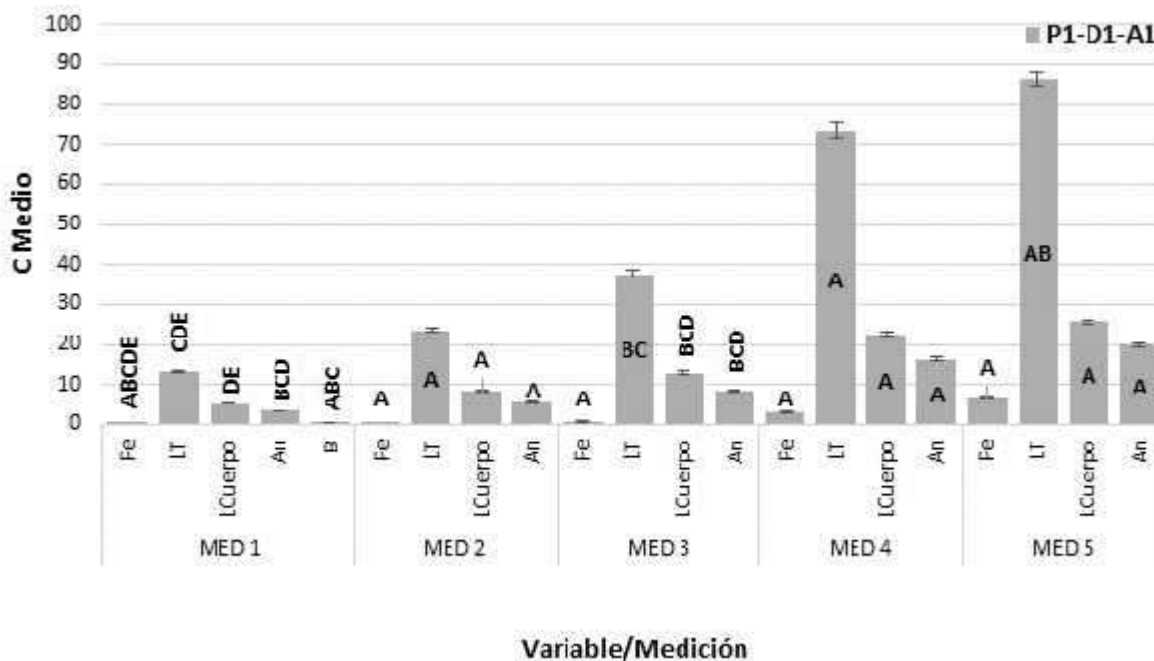
Todas las variables con diferencias significativas en el ANOVA, resultaron significativas con la prueba de Tukey. Se identificaron 18 combinaciones de las cuales 11 no fueron estadísticamente significativas en las variables morfométricas para ninguna medición. Se observaron 7 combinaciones con diferencias significativas, P1-D1-A1 se mantuvo constante a partir de la medición 2 (fig. 51).

Se identificó un patrón de comportamiento entre variables, cada una presentó al menos una combinación con diferencia significativa, seguida de  $\pm 15$  combinaciones intermedias no significativas, a excepción de P1-D1-A1 resultó ser significativa para la mayoría de las variables, las posibilidades de ser intermedia es baja y nunca será la peor. Por lo tanto, estadísticamente es considerada como la mejor combinación. La combinación P1-D3-A3, repetidamente fue la peor en al menos 11 variables.



**Figura 51.** Efecto significativo de la interacción Profilaxis, Densidad y Alimento, en las variables para cada medicación. En el ANOVA la  $P > F = < 0.0001$  y  $P > F = 0.0031$  (Boca),  $gl = 17$  (MED 2,3 y 4)  $gl = 16$  (MED 5), las barras representan el error estándar.

La combinación P1-D1-A1 tuvo 12 repeticiones significativas, se presentó desde la medicación 2, la variable Pe se mantuvo constante en esta combinación (fig. 52).



**Figura 52.** Comportamiento de la combinación D1-A1, en las variables de cada medición. En el ANOVA la  $P > F = < 0.0001$  y  $P > F = 0.0031$  (Boca),  $gl = 17$  (MED 2,3 y 4)  $gl = 16$  (MED 5), las barras representan el error estándar y las letras señalan diferencias significativas.

**Cuadro 21.** Identificación de patrones de comportamiento de los factores y su efecto en función de las variables morfométricas y el tiempo de medición.

Factor	Nivel	Variables morfométricas	Tiempo	Cuadrado medio	Error Estandar	gl	P<0.05		
P	P2	LT	MED 2	20.755442	0.2566501	17	<.0001		
		LCuerpo		7.4607196	0.0857025	17	<.0001		
		Pe	MED 3	0.3711276	0.0235758	17	<.0001		
		LT		34.451284	0.6178585	17	<.0001		
		LCuerpo		11.975483	0.2074616	17	<.0001		
		An	MED 4	7.8809645	0.1330337	17	<.0001		
		Pe		1.6046626	0.1023431	17	<.0001		
		LT		54.473149	1.0610791	17	<.0001		
		LCuerpo		17.867395	0.311055	17	<.0001		
		An		12.60194	0.2545257	17	<.0001		
		D	D2	LT	MED 1	13.565775	0.0825064	17	<.0001
				LCuerpo		5.2440791	0.0302841	17	<.0001
An	3.4074989			0.0219689		17	<.0001		
Pe	MED 2			0.093447	0.0040378	17	<.0001		
LT				20.522831	0.2846638	17	<.0001		
LCuerpo				7.4342026	0.0950571	17	<.0001		
An	MED 4			4.9080654	0.064762	17	<.0001		
Pe				1.5937117	0.135183	17	<.0001		
LT				51.009866	1.4015582	17	<.0001		
LCuerpo				16.876064	0.4108663	17	<.0001		
An				11.541516	0.3361979	17	<.0001		
A	A1			Pe	MED 2	0.1056829	0.0040545	17	<.0001
		LT	21.476287	0.2858405		17	<.0001		
		LCuerpo	7.8079574	0.09545		17	<.0001		
		An	MED 3	5.1208832	0.0650297	17	<.0001		
		LT		32.627831	0.7957635	17	<.0001		
		LCuerpo		11.457947	0.2671977	17	<.0001		
		An		7.5036839	0.1713392	17	<.0001		

**Cuadro 22.** Identificación de patrones de comportamiento de la interacción de los factores y su efecto en función de las variables morfométricas y el tiempo de medición.

Factor	Nivel	Variables morfométricas	Tiempo	Cuadrado medio	Error Estandar	gl	P<0.05
P*D	P2-D2	LT	MED 2	21.702535	0.4019884	17	<.0001
		LCuerpo		7.7917502	0.1342349	17	<.0001
		Pe		0.3943535	0.0355062	17	<.0001
		LT	MED 3	34.568472	0.9305234	17	<.0001
		LCuerpo		11.930208	0.3124468	17	<.0001
		An		7.8651923	0.2003549	17	<.0001
		Pe	MED 4	1.8455166	0.1524436	17	<.0001
		LT		59.12957	1.580513	17	<.0001
		LCuerpo		19.499213	0.4633268	17	<.0001
		An	MED 5	13.547793	0.3791245	17	<.0001
		Pe		5.3336619	0.2528671	16	<.0001
		LT		82.154959	1.5184976	16	<.0001
LCuerpo	MED 5	25.118014	0.4476795	16	<.0001		
An		19.304796	0.3933445	16	<.0001		
P*A	P2-A1	LT	MED 2	22.460505	0.3925407	17	<.0001
		LCuerpo		8.049682	0.1310801	17	<.0001
		An		5.2119521	0.0893044	17	<.0001
		LT	MED 3	37.135674	0.898971	17	<.0001
		LCuerpo		12.811881	0.3018523	17	<.0001
		An		8.520674	0.1935612	17	<.0001
		Pe	MED 4	1.8643254	0.1484487	17	<.0001
		LT		58.473538	1.539095	17	<.0001
		LCuerpo		18.754715	0.4511851	17	<.0001
		An	MED 5	13.447336	0.3691894	17	<.0001
		Pe		4.7659619	0.2476755	16	<.0001
		LT		80.796079	1.4873212	16	<.0001
LCuerpo	MED 5	24.445027	0.4384882	16	<.0001		
An		18.394518	0.3852687	16	<.0001		
D*A	D1-A1	Pe	MED 2	0.1351522	0.0051029	17	<.0001
		LT		23.34377	0.3597499	17	<.0001
		LCuerpo		8.2103663	0.1201304	17	<.0001
		An	MED 3	5.4443244	0.0818444	17	<.0001
		Pe		0.5379712	0.0311459	17	<.0001
		LT		40.933286	0.8162505	17	<.0001
		LCuerpo	MED 4	13.974848	0.2740768	17	<.0001
		An		9.0717586	0.1757503	17	<.0001
		Pe		2.6503963	0.135708	17	<.0001
		LT	MED 5	67.085084	1.4070008	17	<.0001
		LCuerpo		20.622717	0.4124618	17	<.0001
		An		14.909898	0.3375034	17	<.0001
Pe	MED 5	5.5681478	0.2316293	16	<.0001		
LT		83.745522	1.3909621	16	<.0001		
LCuerpo		24.682833	0.4100798	16	<.0001		
An	MED 5	19.214011	0.3603083	16	<.0001		
Pe		0.1474821	0.0068123	17	<.0001		
P*D*A	P1-D1-A1	LT	MED 2	23.566183	0.4802598	17	<.0001
		LCuerpo		8.287108	0.1603719	17	<.0001
		An		5.5030483	0.1092608	17	<.0001
		Pe	MED 4	0.6229423	0.0424278	17	<.0001
		LT		3.1819592	0.1843908	17	<.0001
		LCuerpo		72.319066	1.9117376	17	<.0001
		An	MED 5	23.399131	0.5604252	17	<.0001
		Pe		16.188928	0.4585768	17	<.0001
		LT		6.3526957	0.3159398	16	<.0001
		LCuerpo	MED 5	25.71637	0.5593443	16	<.0001
		An		19.94224	0.4914564	16	<.0001

## 2.7 DISCUSIÓN

En la fase de incubación las variables más representativas del factor, fueron Longitud total (LT), Longitud Cefálica (LCef) y Diámetro (DIAM), se mantuvieron frecuentes durante las mediciones y en general, la tendencia de sus valores fue ascendente. Los factores que presentaron patrones de comportamientos que definieron condiciones más favorables para los organismos en función de las variables morfométricas y el tiempo, fueron: ratamiento más representativo fue Lámina de agua de 6.5 cm (D2), se guido de profilaxis, con yodo povidona (0.05ml/L) (P1); oxígeno, sin incremento en la concentración (O2) y la interacción P1-O2. Mientras tanto, durante la triple interacción, la interacción significativa fue P1-D1-O2.

Durante el desarrollo larval R2-R3, las variables morfométricas más representativas fueron Longitud Total (LT), Longitud Cuerpo (LCuerpo) y Anchura (An), mostraron crecimiento continuo y ascendente conforme el tiempo. Los factores más representativos son, sin profilaxis (P2), densidad de 1 organismos/2L de agua (D2) y ración de alimento *ad libitum* (A1), en la interacción las combinaciones significativas son P2-D2, P2-A1 y D1-A1. En la triple interacción la combinación P1-D1-A1 fue estadísticamente la mejor.

Barbosa, *et al.* (2005) hace énfasis que las necesidades alimenticias de rana toro pueden cambiar conforme a la región y la época del año, esa variación puede ser influenciada por la temperatura, alterando la tasa de digestión de los animales, por eso la importancia de controlar la temperatura evitando variables ambientales que pudieran influir en los efectos de los factores,

El patrón de comportamiento que presentó la densidad de 1 organismo/L de agua, pudo haber influenciado en el tratamiento de alimento *ad libitum*, debido a la competencia de los organismos por tener menos espacio. Hayashi, *et al.* (2004), evaluó el desarrollo de renacuajos criados en diferentes densidades, concluyendo que a menor densidad se obtiene lotes más grandes y uniformes con mejor tasa de sobrevivencia.

Ávalos (2016), analizó los aspectos reproductivos de Rana toro americana, basado en Gosner, donde describió las fases de desarrollo embrionario y los tiempos de duración, sus resultados coinciden con los tiempos alcanzados durante la incubación de esta investigación.

En el mismo trabajo (Ávalos 2016), se monitorearon los parámetros fisicoquímicos del agua, la temperatura y la humedad relativa, durante la incubación, en la cual obtuvo 90.4% de eclosión y 99.9% de sobrevivencia, sus resultados del monitoreo de variables ambientales difieren a las obtenidas en este trabajo, no obstante es una aportación para transferir a este sector.

Los valores de los parámetros de temperatura, humedad relativa y de calidad del agua, inicialmente se implantaron conforme a las recomendaciones descritas por Cribb, *et al.* (2013), en función de mantener controlado el ambiente en el que se desarrolló el experimento y que estos factores no intervinieran en desarrollo de los organismos. No obstante, las características del agua difieren en cada región, Por lo tanto, se realizaron adecuaciones para cada variable y se monitorearon periódicamente, los cambios en las variables no afectaron en el desarrollo de los organismos.

Silva (2016), elaboró un diagnóstico del estado físico en granjas de rana toro ubicada en Michoacán. Reportó los valores de las variables ambientales y de calidad del agua de estanques renacuajos R2-R en cinco granjas. La información recabada aporta nuevos intervalos adecuados a las características del agua reportadas en las granjas, lo cual puede servir como referencia y/o complemento de lo reportado en este trabajo.

El uso de yodo povidona como medida profiláctica sólo ha sido probado como tratamiento para desinfección y fertilización de huevos en diferentes variedades de crustáceos y es recomendado su uso para desinfección de granjas de peces, evitando la propagación de bacterias y virus, en concentración <200g y por periodos cortos (sólo pocos minutos) (FAO, 2005). Por lo anterior, la información reportada en este trabajo con el uso de yodo povidona como tratamiento permanente en el agua, es relevante en esta área, además dar apertura a la realización de investigaciones futuras.

## 2.8 CONCLUSIONES

- Fue posible estandarizar los parámetros fisicoquímicos del agua, para la fase de incubación, que pueden adecuarse a las características del estado.
- La densidad basada en 1 organismo/ 2 L de agua, puede definirse como uno de los tratamientos más recomendables durante la incubación y larvicultura, presentó diferencias significativas en el crecimiento y desarrollo de renacuajos.
- La aplicación de yodo povidona en el agua como medida profiláctica en renacuajos, puede variar con respecto a los tratamientos con lo que interactúe durante la crianza de renacuajos.
- El aumento en la concentración de oxígeno disuelto en el agua, causa efecto significativo cuando se combina con la profilaxis y la densidad (1 organismo/2 L de agua).
- El suministro de alimento una vez al día (ad libitum) tiene efectos significativos por sí sola y al interactuar con densidades de 1 organismo/1L de agua y en presencia o ausencia de profilaxis.

## 2.9 LITERATURA CITADA

- Afonso, A. M. 2004. **Efeito do acetato de buserelina na indução a reprodução da rã-touro americana (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802) naturalmente portadora de micobacteriose.** Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) Universidade Federal Fluminense, Niterói. 86pp.
- Avalos L. A. 2016. **Aspectos reproductivos de *Rana toro americana* (*Lithobates catesbeianus*, shaw 1802).** Morelia Michoacán. Tesis de Licenciatura, Facultad de Biología, UMSNH. 48pp.
- Barbosa, M. J.; A. M. Silveira y C. A. Gomide. 2005. **Crescimento heterogêneo de girinos de rã-touro alimentados com diferentes rações.** Pesq. Agropec. Bras. v. 40. n10.p. 1015-1019.
- Cribb, A. Y.; A. M. Afonso y C. F. M. Monastério. 2013. **Manual Técnico de Ranicultura.** Rio de Janeiro: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa). 73pp.
- Hayashi, C.; C. M. Soares; E. M. Gaidioli; V. Rossetto; B. Furuya y W. R. Boscolo. 2004. **Desenvolvimento de Girinos de Rã-Touro (*Rana catesbeiana*, Shaw, 1802) Cultivados em Diferentes Densidades de Estocagem em Tanques-rede.** R. Bras. Zootec., v.33. n1. P 14-20.
- Organización de las Naciones Unidad para la Alimentación y la Agricultura (FAO). 2005. **Responsible use of antibiotics in aquaculture.** Roma Italy. 97 pp.
- Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA). 2003. **Manual de Buenas Prácticas de Producción Acuícola de Trucha para la Inocuidad Alimentaria.** Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. Mazatlán Sinaloa. 86 pp.
- Silva H. F. 2016. **Diagnóstico del Estado físico y manejo de granjas de *Rana Toro americana* (*Lithobates catesbeianus* Shaw, 1802) en los municipios de Ávaro Obregón y Morelia, Michoacán.** Morelia Michoacán. Tesis de Licenciatura, Facultad de Biología, UMSNH. 91pp.

## V. DISCUSIÓN GENERAL

La técnica de reproducción inducida permite el suministro de desoves de buena calidad, También permite la incubación y eclosión de huevos en condiciones climáticas favorables para el buen desempeño de las crías. Sin embargo, la falta de conocimientos básicos sobre la reproducción de ranas, dificulta el empleo de esta técnica (Ribeiro Filho, *et al.* 1998), por eso la importancia de este trabajo, que ajustó la técnica, a través de la estandarización de las variables ambientales y de la descripción de procedimientos.

Barbosa, *et al.* (2005) hace énfasis que las necesidades alimenticias de rana toro pueden cambiar conforme a la región y la época del año, esa variación puede ser influenciada por la temperatura, alterando la tasa de digestión de los animales, por eso la importancia de controlar la temperatura evitando variables ambientales que pudieran influir en los efectos de los factores,

El patrón de comportamiento que presentó la densidad de 1 organismo/L de agua, pudo haber influenciado en el tratamiento de alimento ad libitum, debido a la competencia de los organismos por tener menos espacio. Hayashi, *et al.* (2004), evaluó el desarrollo de renacuajos criados en diferentes densidades, concluyendo que a menor densidad se obtiene lotes más grandes y uniformes con mejor tasa de sobrevivencia.

Los valores de los parámetros de temperatura, humedad relativa y de calidad del agua, inicialmente se implantaron conforme a las recomendaciones descritas por Cribb, *et al.* (2013), en función de mantener controlado el ambiente en el que se desarrolló el experimento y que estos factores no intervinieran en desarrollo de los organismos. No obstante, las características del agua difieren en cada región, Por lo tanto, se realizaron adecuaciones para cada variable y se monitorearon periódicamente, los cambios en las variables no afectaron en el desarrollo de los organismos.

El uso de yodo povidona como medida profiláctica sólo ha sido probado como tratamiento para desinfección y fertilización de huevos en diferentes variedades de

crustáceos y es recomendado su uso para desinfección de granjas de peces, evitando la propagación de bacterias y virus, en concentración <200g y por periodos cortos (sólo pocos minutos) (FAO, 2005). Por lo anterior, la información reportada en este trabajo con el uso de yodo povidona como tratamiento permanente en el agua, es relevante en esta área, además dar apertura a la realización de investigaciones futuras.

## VI. Anexo I

### 1.1 Generalidades de anfibios

El origen de los anfibios, surge a partir de los peces óseos (Sarcopterigios) durante el periodo Devónico (hace más de 350 millones de años). Se les consideró como los primeros tetrápodos, partiendo de un grupo monofilético integrado por animales que desarrollaron miembros locomotores y perfeccionaron la respiración pulmonar para así poder conquistar el medio terrestre. Se sabe que los primeros anfibios eran animales de cuerpo pesado, pertenecientes al grupo de los Laberintodontos (*Acanthostega* e *Ichthyostega*). El surgimiento de los anfibios ocurre en el periodo Carbonífero, momento en el cual los Leberintodontos (fósiles) convivían con los Lepospóndilos (fósiles), estos dos grupos al igual que los anfibios actuales (y los extintos), pertenecen al grupo de los Lisanfibios, caracterizados por su piel delgada y lisa. De tal forma que actualmente los anfibios vivientes son agrupados en tres órdenes (Siqueiros, 2012).

Se dice que los anfibios modernos son un grupo de vertebrados que se distinguen como un grupo monofilético, debido a que presentan características comunes de morfología externa; tales como: piel lisa, altamente vascularizada y húmeda, que actúa como órgano de respiración (Burnie, 2003), sin protección de escamas, plumas o pelo, lo cual les facilita el intercambio gaseoso dentro y fuera del agua. Incluyen glándulas mucosas y lechosas que humectan la piel cuando se encuentran fuera del agua; secretan sustancias pegajosas útiles en el apareamiento y toxinas que funcionan como mecanismo de defensa; sus huevos no poseen membranas extraembrionarias, los cuales dependen de ambientes húmedos para evitar la desecación (Parra *et al.*, 2014).

El Orden *Anura*, es por mucho el grupo más abundante, se compone de 6,200 especies (Frost, 2013) y 6,323 (AmphibiaWeb, 2015), es tan diversificado que se pueden encontrar en prácticamente todos los continentes.

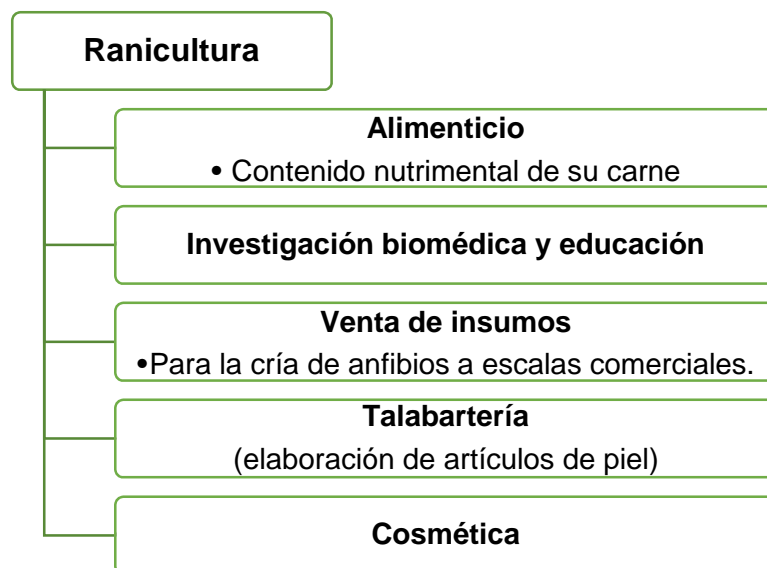
Las especies que componen este grupo, se encuentran en hábitats acuáticos, terrestres, fosoriales y arborícolas; presentan longitudes de hocico-cloaca de 1 hasta 30 cm; carecen totalmente de cola (de ahí el significado de Anura) (Coborn, 2009). Pueden presentar diferencias morfológicas dependiendo de su forma de vida; por ejemplo en México los anuros semiacuáticos del género *Lithobates* tiene la cabeza puntiaguda, cuerpo hidrodinámico y extremidades posteriores muy largas con dígitos largos y palmeados (Parra, *et al.*, 2014).

En cuanto a la reproducción, por lo general, presentan fecundación externa, mediante el amplexo (abrazo nupcial) y ovipositan en charcas sobre la vegetación, en el suelo o en excavaciones y presentan metamorfosis, (Parra, *et al.*, 2014).

De acuerdo a una evaluación sistemática de la familia *Ranidae*, realizada por Siqueiros (2012), las especies que componen esta familia tienen como principales características:

- La presencia de membranas interdigitales en las patas posteriores, facilitándoles la vida acuática, sus extremidades posteriores son largas y potentes, permitiéndoles escapar y saltar cuando se encuentren en peligro o estén siendo agredidos
- Poseen piel lisa
- Tienen membranas timpánicas visibles
- Pupilas elípticas y horizontales
- Es una de las familias más extensas y de mayor distribución
- Llegan a medir de hocico-cloaca a más de 30 cm, tal es el caso de la Rana Goliat
- Depositán sus puestas directamente en el agua y sus renacuajos se desarrollan en charcas, pozas o humedales con poca corriente.

Por otra parte, es importante mencionar, que hay gran variedad de especies de esta familia, que son utilizadas para cultivo en la ranicultura, de acuerdo a Siqueiros (2012), menciona que la ranicultura es una industria que posee cinco mercados de interés económico:



**Figura 53:** Mercados de interés económico, que involucran a la ranicultura a nivel mundial. Elaboración propia, de acuerdo a la opinión de Siqueiros (2012).

No obstante, es importante conocer cuáles especies son aptas para ser aprovechadas por este sector, de modo que no sea un factor más, involucrado en el declive de las mismas.

Los primeros registros en el comienzo del cultivo de ranas, se remontan hacia finales del siglo XIX, en Estados Unidos de América, es cuando se comienza a diseminar *Lithobates catesbeianus* (rana toro), en diversos países del mundo, que abarcan el centro y sur de América, las islas del caribe y el norte y sudeste de Asia (FAO, 2005-2013).

Su introducción comenzó fuertemente en Taiwán, China, Tailandia, Indonesia, Brasil, Cuba, México; comenzando por establecer criaderos para su explotación (CONABIO, 2008). No obstante, desde 1930 hasta 1980, Brasil fue pionero en desarrollar investigación, en cuanto a técnicas e instalaciones de cultivo, al grado de

sobresalir en el 2006, como uno de los principales países productores de rana toro, a nivel mundial (FAO, 2005-2013).

## 1.2 La Ranicultura en México

En México, el uso de los anfibios como un recurso es amplio, nuestros antepasados indígenas, incluían en su dieta, algunas especies silvestres de anfibios, como *L. montezumae*, *L. megapoda* y *L. pipiens*. Casas (2004), hace referencia sobre los habitantes ribereños del Valle de Toluca, Estado de México, quienes aún conservan tradiciones lacustres, tales como, consumir renacuajos (conocidos también como “atotócatl”) y larvas de *L. montezumae* y *L. pipiens*. La explotación de gran variedad de ranas silvestres, datan desde épocas prehispánicas, incluso diversas áreas del país, sobresalieron a nivel nacional por su gran producción de ranas (FAO, 2005-2013).

Pese a lo anterior, la introducción de rana toro comenzó de 1945 a 1950, por medio de la diseminación de organismos adultos, desde Florida (E.U.) hasta canales de riego de los Mochis, Sinaloa; posteriormente de esta zona de llevaron organismos a diversas partes de Sonora, Morelos y Tamaulipas. Durante esa misma época, se introdujeron organismos en Distrito Federal, Morelos, Veracruz, Yucatán y Tabasco (CONABIO, 2008).

Diversas áreas del país llegaron a sobresalir a nivel nacional por su gran producción de rana en la época de los 60's, alcanzando a cubrir el mercado extranjero principalmente, E.U. Sin embargo en esta misma época, la explotación se reduce a causa de la demanda y a la destrucción de las áreas lacustres para el aprovechamiento agrícola e industrial (CONABIO, 2008). A principios de 1960, comienzan los primeros intentos para la crianza de la especie, estableciéndose la primera granja en el país, con el objetivo de satisfacer la demanda del mercado de ranas vivas en Estados Unidos (FAO, 2005-2013).

En 1972, se crea el “Fideicomiso para el Desarrollo de la Fauna Acuática”, por medio de un programa de disseminación de las especies de mayor importancia comercial, a modo de establecer nuevas poblaciones de ranas, susceptibles a la explotación con fines alimenticios. Incluyéndose especies nativas de México como, *L. motezumae* y *L. megapoda*, al igual que especies exóticas como, *L. catesbeianus* y *L. pipiens*. La primera disseminación se realiza en canales de riego de Tehuantepec, Oaxaca (CONABIO, 2008).

En 1973-1974, se hace la disseminación de organismos de rana toro a ocho estados más de la República, incluyendo Michoacán, Nayarit, Jalisco, Nuevo León, San Luis Potosí, Tamaulipas y nuevas localidades del Estado de Tabasco. Para el año de 1980, se dispersó también en el Estado de Hidalgo y Aguascalientes (CONABIO, 2008).

En 1990 se incrementa la popularidad del cultivo en todo el mundo, dando comienzo a las investigaciones en México, mediante un programa de investigación aplicada para su cultivo, creado por el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (Cinvestav). Se obtienen mayores avances en fisiología reproductiva, nutrición, patología y ecofisiología, lo cual condujo al desarrollo de un sistema de cultivo de tipo inundado, que es actualmente utilizado en diversas regiones de México y América central (FAO, 2005-2013).

No obstante, en épocas anteriores, al incrementarse la demanda de rana toro, se favorece la explotación de rana silvestre, ocasionando la disminución de las poblaciones naturales, influida también por contaminación y degradación de su hábitat. Tal es el caso de Michoacán y Sinaloa, que reportaron una captura del 90% de la producción total de rana silvestre del país, ocasionando una reducción del 50% en algunos estados. En contraste con el cultivo de rana, como alternativa potencial para incrementar la producción sin acabar con las poblaciones silvestres (Casillas, 1999).

### 1.3 La Ranicultura en Michoacán

En Michoacán, la captura de rana, es una actividad realizada principalmente en el lago de Cuitzeo, debido a que la rana, forma parte de la dieta de las personas que habitan en la ribera, además representa también una fuente de trabajo; en los últimos años se ha registrado un incremento en la demanda de este producto, lo cual ha llamado la atención de pescadores, comerciantes e instituciones gubernamentales, a considerar esta actividad como una fuente de trabajo e ingresos para 28 organizaciones pesqueras, que integran aproximadamente a 1431 pescadores, residentes de 21 localidades de 5 municipios (CIDEM, 2010).

Actualmente, en Michoacán, a partir del 2010 se impulsó la cría de rana toro, por el Centro de Investigación y Desarrollo del Estado de Michoacán (CIDEM), basándose en el modelo de transferencia de tecnología de producción del “Centro Experimental para el Cultivo de Rana Toro”, que impulsó la creación 21 granjas de producción de rana toro, en los municipios de: Morelia en las localidades de Tiníjaro, Santiago Undameo, Umécuaro, Uruapilla; Álvaro Obregón en las localidades de Palo Blanco, La Purísima, Isla de Tzirio y Tzintzimeo; Huandacareo en la localidad de La Estancia; Cuitzeo y Uruapan en la localidad de Ziracuaretiro (CIDEM, 2010).

Para el año 2012 se tienen registradas 43 unidades de producción acuícola (UPA) en el estado de Michoacán, en las cuales la especie más cultivada es *L. catesbeianus* (rana toro) (Zubieta, *et al.*, 2012).

Hasta el 2013, el CIDEM otorgó apoyo a los productores de Rana, para el abastecimiento de renacuajos y reproductores (principalmente a las granjas del municipio de Álvaro Obregón). Mientras tanto, la nueva administración del gobierno estatal en este mismo año, decidió no llevar a cabo más actividades de apoyo al sector ranícola, afectando directamente a los productores en el abastecimiento de renacuajos e imagos. “Lo anterior, motivó a los productores de Álvaro Obregón y de otros municipios de Michoacán que pertenecen al Sistema Producto Rana Michoacán A. C.

a solicitar apoyo a la Facultad de Biología de la UMSNH para diseñar e implementar un protocolo de investigación, para la reproducción artificial de rana toro americana, que permita eliminar uno de los principales problemas, que han impedido el adecuado desarrollo de esta actividad, en Michoacán” (Zubieta, com. pers., 2013)<sup>1</sup>.

### **1.3.1 Sistema Producto Rana Michoacán A.C.<sup>2</sup>**

En el año 2010, se anunció el reconocimiento de “Sistema Producto Rana”, el primero a nivel nacional, conformado por 15 Unidades de Producción Acuícola (UPA).

Hasta el año 2016, el Estado de Michoacán de Ocampo, ocupa el primer lugar en capacidad instalada para la producción de rana toro, con 45 Unidades de Producción Acuícola (dos de nueva creación en este año) de las cuales 26 UPA están afiliadas al Sistema Producto, distribuidas en los municipios de: Álvaro Obregón, Morelia, Zinapécuaro, Queréndaro, Zitácuaro, Ziracuaretiro, Tzitzio, José Sixto Verduzco y Cojumatlán de Regules, generando alrededor de 90 empleos para producción y procesamiento, en su mayoría de tipo familiar.

Cada UPA tiene capacidad para producir en promedio 5 toneladas por año; de la 45 Unidades totales, 42 completan un ciclo por año y las 3 restantes pueden completar hasta 2 ciclos por año. Por lo tanto, se estima que Michoacán tiene la capacidad de producir aproximadamente 240 toneladas de carne por año.

---

<sup>1</sup> M. en C. Tohtli Zubieta Rojas, coordinadora responsable del proyecto de Rana toro americana en la Facultad de Biología de la UMSNH.

<sup>2</sup> Información proporcionada por el Lic. Edwin Ernesto Radilla Fajardo, Gerente del Sistema Producto Rana Michoacán A.C.

## 1.4 Producción

### 1.4.1 Nacional

De acuerdo a los datos estadísticos de la consulta específica 2010-2014, la producción que reporta CONAPESCA (2016) a nivel nacional, con respecto a la captura y crianza de rana toro, va incrementando significativamente, lo cual indica que esta actividad productiva se ha impulsado, ya que cada año se han incorporado más estados de la República. Los estados de la República Mexicana que desarrollan esta actividad en sistemas de crianza acuícola hasta el año 2014 son: Guanajuato, Hidalgo, México, Michoacán, Morelos, Querétaro y Sinaloa. Los estados de Jalisco, Michoacán, México y Querétaro, son los principales productores de esta especie desde el 2010; Guanajuato, Hidalgo, Morelos y Sinaloa, se incluyen a partir del año 2013. Lo anterior se reporta para la producción de Criadero. Caso contrario a la producción de Captura, en donde los Estados involucrados son únicamente Michoacán (año 2011 y 2014), Tabasco (2010) y Sinaloa (2010-2014). También se incluye información referente a la aportación económica de esta actividad a nivel nacional (cuadro23).

**Cuadro 23.** Producción total por año a nivel nacional de Rana toro.

Año	*Peso vivo (toneladas)		**Peso desembarcado (toneladas)		Valor (MXN)	
	Criadero	Captura	Criadero	Captura	Criadero	Captura
2010	2.17	7.31	2.17	7.08	\$211,632.00	\$421,375.00
2011	45.67	10.84	45.67	10.10	\$4,280,511.73	\$402,732.85
2012	71.84	5.00	71.84	4.62	\$8,872,759.60	\$273,135.00
2013	128.91	8.09	128.91	8.09	\$14,702,217.73	\$485,375.42
2014	228.81	70.84	228.81	65.33	\$9,959,667.18	\$707,258.27

\*Peso vivo: Peso total del producto en el momento de su captura. Se estima mediante factores de conversión aplicados al peso desembarcado, conforme a la metodología empleada por la FAO; tales factores son establecidos por el Instituto Nacional de la Pesca.

\*\*Peso desembarcado: Peso que, al desembarque, conserva el producto en sus distintas modalidades: descabezado, fileteado, eviscerado, en pulpa, rebanado u otras.

**Nota:** No se incluye información del 2015, debido a que en la matriz de datos de este año no se reporta información para esta especie.

### 1.4.2 Estatal

La producción estatal, por cultivo es aportada principalmente por las unidades de producción ubicadas en el municipio de Álvaro Obregón, Morelia, Queréndaro y Zinapécuaro. Mientras que la producción por captura, es por el Lago de Cuitzeo. La información reflejada en el cuadro 2, son los reportados en la consulta específica de CONAPESCA 2010-2014.

**Cuadro 24.** Producción total por año a nivel estatal de Rana toro.

Año	Peso vivo (toneladas)		Peso desembarcado (toneladas)		Valor (MXN)	
	Criadero	Captura	Criadero	Captura	Criadero	Captura
2010	0.20	–	0.20	–	\$12,000.00	–
2011	0.33	4.38	0.33	3.64	\$32,077.50	\$157,663.35
2012	1.57	0.89	1.57	0.51	\$115,500.00	\$31,875.00
2013	4.64	–	4.64	–	\$331,250.37	–
2014	133.93	68.43	133.93	62.92	\$6,143,566.95	\$674,276.23

No obstante, el sistema Producto Rana, menciona que en Michoacán se producen aproximadamente 50 toneladas al año en sistemas controlados (criadero), esta información se registra hasta el 2015 donde se incluye de 23 UPA afiliadas.

Los datos que se incluyen en este apartado, son solo los específicos para esta especie, a pesar de que existe información referente a otras especies de anfibios, denominada como “Rana SE” en la que se desconocen las especies específicas.

## VII. LITERATURA CITADA

- Afonso, A. M. 2004. **Efeito do acetato de buserelina na indução a reprodução da rã-touro americana (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802) naturalmente portadora de micobacteriose.** Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) Universidade Federal Fluminense, Niterói. 86pp.
- Agostinho, C. A.; F. S. Weschsler; P. E. O. Nictheroy y D. F. Pinheiro. 2000. **Indução a ovulação pelo uso de LHRH análogo e fertilização artificial em rã touro (*Rana catesbeiana*).** Revista Brasileira de Zootecnia 29, 1261–1265.
- Alonso M. 1997. **Uso de análogos do GnRH para indução de desova e espermição em rã-touro, *Rana catesbeiana* Shaw, 1802.** 136f. Tese (DS) - Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.
- AmphibiaWeb. 2015. **Información sobre la biología y la conservación de los anfibios.** Berkeley, California: <http://amphibiaweb.org/> (Accesada en julio 2015).
- Avalos L. A. 2016. **Aspectos reproductivos de *Rana toro americana* (*Lithobates catesbeianus*, shaw 1802).** Morelia Michoacán. Tesis de Licenciatura, Facultad de Biología, UMSNH. 48pp.
- Ávila-Villegas, H. 2007. **Ficha de la especie *Rana Toro* (*Lithobates catesbeianus*).** Instituto del Medio Ambiente del Estado de Aguascalientes. Proyecto CONABIO EK001. 15 pp.
- Baillie, J. E. M., J. Griffiths, S. T. Turvey, J. Loh, y B. Collen. 2010. **Evolution Lost: Status and Trends of the World's Vertebrates.** Zoological Society of London, United Kingdom. 72 pp.
- Barbosa, M. J.; A. M. Silveira y C. A. Gomide. 2005. **Crescimento heterogêneo de girinos de rã-touro alimentados com diferentes rações.** Pesq. Agropec. Bras. v. 40. n10.p. 1015-1019.
- Calderón-Mandujano, R. R. 2010. **Estrategia para el Manejo de anfibios sujetos a uso en México.** En Sánchez O. (Ed). Temas sobre Conservación de

- Vertebrados Silvestres en México. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. México. pp. 71-82.
- Casas A. G. 2004. **Nuevas interpretaciones y adiciones a los anfibios y reptiles en la obra del naturalista Francisco Hernández (1517-1584)**. Ciencia Ergo Sum, UNAM. 11(3): 308-312.
- Casillas, T. M. P. 1999. **Nuevas oportunidades de negocios en acuicultura: el cultivo de la rana toro**. FIRA. Boletín Informativo 310(31): 61 pp.
- Centro de Investigación y Desarrollo del Estado de Michoacán (CIDEM). 2010. **Manual de Producción de Rana toro. Centro de Investigación y Desarrollo del Estado de Michoacán**. Morelia, Michoacán, México. 69pp.
- Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). 2008. **Sistema de información sobre especies invasoras en México**. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. [www.conabio.gob.mx/invasoras](http://www.conabio.gob.mx/invasoras) (Accesada en octubre 2013).
- Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca (CONAPESCA). 2016. Consulta específica 2010-2014. <http://www.sagarpa.gob.mx/quienesomos/datosabiertos/conapesca/Paginas> (Accesada en diciembre 2016).
- Cribb, A. Y.; Afonso, A. M.; Monastério, C. F. M. 2013. **Manual Técnico de Ranicultura**. Rio de Janeiro: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa). 73pp.
- Diario Oficial de la Federación (DOF). 2014. <http://www.dof.gob.mx>. (Accesada en Junio 2014).
- Frost D. R.; T. Grant; J. Faivovich; R. H. Bain; A. Haas; C. F.B. Haddad; R. O. Sá; A. Channing; M. Wilkison; S. C. Donellan; C. J. Raxworthy; P. Moler; R. C. Drewes; R. A. Nussbaum; J. D. Lynch; D. M. Green y W. C. Wheeler. 2006. **The Amphiban Tree of life**. Bulletin of the American Museum of Natural History. n 297. 370 pp.

- Frost, D. R. 2013. **Amphibian Species of the World: an Online Reference**. Version 5.6 (julio, 2013). Electronic Database accessible at American Museum of Natural History, New York, USA
- Global Invasive Species Database GISD. 2005. <http://193.206.192.138/gisd/speciesname/Lithobates+catesbeianus> (Accesada en julio 2015).
- Hayashi, C.; C. M. Soares; E. M. Gaidioli; V. Rossetto; B. Furuya y W. R. Boscolo. 2004. **Desenvolvimento de Girinos de Rã-Touro (*Rana catesbeiana*, Shaw, 1802) Cultivados em Diferentes Densidades de Estocagem em Tanques-rede. R. Bras. Zootec., v.33. n1. P 14-20.**
- International Union for Conservation of Nature (IUCN), Conservation International, y Nature Serve. 2006. **Global Amphibian Assessment**. <http://www.globalamphibians.org> (Accessada en julio 2015).
- Lima, S. L.; C. L. S. Costa; C. A. Agostinho; D. R. Andrade y H. P. Pereira-Filho. 1998. **Estimativa do tamanho da primeira maturação sexual da rã-touro, *Rana catesbeiana*, no sistema anfigranja de criação intensiva**. Revista Brasileira Zootecnica, v.27, p.416-420.
- Mendoza R. y P. Koleff (Coord.). 2014. **Especies acuáticas invasoras de México**. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México. 555 p.
- Nascimento, N. F.; R. C. da Silva; N.F. Valentin; F. M. C. Paes; V. M. Stéfani y O. L.S Nakaghi. 2014. **Efficacy of buserelin acetate combined with a dopamine antagonist for spawning induction in the bullfrog (*Lithobates catesbeianus*)**. Aquaculture Research. doi 10.1111. p. 1-4.
- Norma Oficial Mexicana. **NOM-059-SEMARNAT-2010 protección ambiental de especies nativas de flora y fauna silvestres**. <http://www.semarnat.gob.mx/leyesy normas/SEMARNAT.pdf> (Accesada en junio 2015).
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). 2005. **Responsible use of antibiotics in aquaculture**. Roma Italy. 97 pp.

- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). 2005-2013. **Programa de información de especies acuáticas. Rana catesbeiana**. Texto de Flores Nava, A. In: Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO [en línea]. Roma. Actualizado 9 February 2005. [Citado 4 September 2013]. [http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Rana\\_catesbeiana/es](http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Rana_catesbeiana/es) (Accesada en julio 2016).
- Parra-Olea, G., O. Flores-Villela y C. Mendoza-Almeralla. 2014. **Biodiversidad de anfibios en México**. Revista Mexicana de Biodiversidad, Suplo. 85:S460-S466.
- Pereira, M. M.; O. P. Ribeiro Filho y R. D. Navarro. 2012. **Importancia de la inducción artificial en la reproducción de ranas**. Rev. Bras. Reprod. Animal, Belo Horizonte, v36, n.2, p. 100-104.
- Prim, E. C. P.; J. T. Palma y M. L. A. Bataus. 2003. **Variabilidade genética da rã touro gigante (*Rana catesbeiana*) proveniente de populações dos estados de Goiás, Pará e Paraná, criadas em sistemas intensivo de cultivo**. Ciência Animal Brasileira. V.4, n.1, jan/jun, p 1-6.
- Rugh R. 1935. **Pituitary - induced sexual reactions in the anura**. Biol Bull, v.68, p.74-81.
- Santos-Barrera, G., Hammerson, G., Hedges, B., Joglar, R., Inchaustegui, S., Lue Kuangyang, Chou Wenhao, Gu Huiqing, Shi Haitao, Diesmos, A., Iskandar, D., furgoneta Dijk, PP, Masafumi Matsui, Schmidt, B., Miaud, C. y Martínez-Solano, I. 2009. ***Lithobates catesbeianus*. En La Lista Roja de la UICN de Especies Amenazadas. Versión 2015**. [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org) (Accesada en julio 2015).
- Sasso-Cerri, E.; F. P. Faria; E. Freymüller y S. M. Miraglia. 2004. **Testicular morphological changes during seasonal reproductive cycle in the bullfrog *Rana catesbeiana***. J Exp Zool, v.301, p.249-260.
- Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA). 2003. **Manual de Buenas Prácticas de Producción Acuícola de Trucha para la Inocuidad Alimentaria**. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. Mazatlán Sinaloa. 86 pp.
- Siqueiros, D. M. E. 2012. **Evaluación Sistemática de la Familia Ranidae**. Universidad Autónoma de Aguascalientes. Aguascalientes, México. 6pp.

Silva H. F. 2016. **Diagnóstico del Estado físico y manejo de granjas de Rana Toro americana (Lithobates catesbeianus Shaw, 1802) en los municipios de Ávaro Obregón y Morelia, Michoacán.** Morelia Michoacán. Tesis de Licenciatura, Facultad de Biología, UMSNH. 91pp.