

Comparación entre la obtención de crías por cruce natural versus la utilización de un inseminador artificial en el pez ornamental *Xiphophorus helleri* (Heckel, 1848) (Cyprinodontiformes: Poeciliidae)

Carlos Llanos¹, Carlos Scotto¹

¹Laboratorio de Mejora Genética y Reproducción Animal. Facultad de Ciencias Naturales y Matemática. Universidad Nacional Federico Villarreal Calle Río Chepén s/n Cuadra No 1, El Agustino, Lima, Perú.
Email: clvbio87@gmail.com

Resumen

El objetivo de la presente investigación fue comparar la obtención de crías de *Xiphophorus helleri* por dos métodos: (1) cruce natural y (2) inseminación artificial. Se utilizaron 80 individuos maduros sexualmente (40 individuos machos y 40 individuos hembras) por método. El eugenol permitió inducir a la anestesia a las hembras en ambos métodos para la toma de datos biométricos (longitud estándar y peso total) utilizando dosis de 100 mg.L⁻¹. Solo los machos destinados a la inseminación artificial fueron anestesiados para permitir la colecta de semen utilizando dosis de eugenol de 125 mg.L⁻¹. El 95% de hembras destinadas a la inseminación artificial quedaron gestantes, mientras que por cruce natural sólo el 72.5% de hembras quedaron gestantes corroborado por la prueba chi-cuadrado de Pearson ($p < 0,05$). No hubo diferencias en el número promedio de crías obtenidas por cruce natural e inseminación artificial mediante la prueba t de Student ($p > 0,05$). El tiempo requerido para la obtención de crías por cruce natural es mayor al tiempo requerido para la obtención de crías por inseminación artificial mediante la prueba t de Student ($p < 0,05$). Utilizar el inseminador artificial permitió un ahorro de tiempo en la obtención de crías, así como un mayor éxito comparado con la cruce natural, sin embargo la media del número de crías en ambos métodos fue el mismo.

Palabras Claves: *Xiphophorus helleri*, cruce natural, inseminación artificial, número de crías, datos biométricos

Summary

Comparison between the obtaining of offspring by natural reproduction versus the use of artificial insemination equipment in the ornamental fish *Xiphophorus helleri* (Heckel, 1848) (Cyprinodontiformes: Poeciliidae)

The purpose of this investigation was to compare *Xiphophorus helleri*'s offspring by two methods: (1) natural breeding and (2) artificial insemination. 80 sexually mature individuals were used for each method (40 individual males and 40 individual females). Eugenol was used as anesthetic over females of both methods for biometric data collection (standard length and total weight) using eugenol dose of 100 mg.L⁻¹. Only males intended for artificial insemination were anesthetized to allow semen collection using eugenol dose of 125 mg.L⁻¹. 95% of artificial insemination females were pregnant; meanwhile the pregnancy was 72.5% in natural breeding females according to chi-square test ($p < 0,05$). There was no difference in the offspring average number obtained by natural reproduction and artificial insemination using the Student t test ($p > 0,05$). The time required for obtaining offspring by natural reproduction is higher than the time required for the production of offspring by artificial insemination using the Student t test ($p < 0,05$). Use of artificial insemination equipment permitted time savings to obtain offspring, as well as greater success compared to natural reproduction, however the average number of offspring in both methods was the same.

Key words: *Xiphophorus helleri*, natural breeding, artificial insemination, number of offspring, biometric data collection.

Introducción

Xiphophorus helleri "pez espada" (Heckel, 1848) (Cyprinodontiformes: Poeciliidae) es considerado un animal modelo para experimentación, utilizado para estudios sobre reproducción y heredabilidad (Bisazza *y cols.*, 1997; Walter & Kazianis, 2001; McGovern-Hopkins *y cols.*, 2003; Yang *y cols.*, 2008; Dong *y cols.*, 2006), variabilidad genética (Morizot *y cols.*, 1991; Walter *y cols.*, 2006), entre otros. Las hembras del género *Xiphophorus* presentan fecundación interna (Kazianis *y cols.*, 2002; Axelrod & Wischnath, 1991) siendo viable el esperma para la fertilización de ovas por más de dos años, dándole capacidad a la hembra de parir en más de una ocasión (Tyagi & Shukla, 2002).

Para los individuos del género *Xiphophorus*, la inseminación artificial (IA) implica la colecta de esperma de un macho y la inseminación de esta a través del orificio genital de la hembra agilizada por la participación de un operario. Para ello es necesario el uso de anestesia, dado que la lucha de los peces bajo anestesia es menor, reduciéndose la incidencia del trauma (Munday & Wilson, 1997; Ross & Ross, 2008). El desarrollo de esta técnica mediante el uso de un inseminador artificial para poecílidos, nos permitiría innovar y mejorar el manejo de la IA de una manera fácil, económica y exitosa. Además nos brindaría la posibilidad de evitar los índices de mortandad de los progenitores, viabilizar la reproducción de una especie puesta en peligro, obtener peces sanos y adaptables al cautiverio sin menoscabo de las poblaciones naturales, aumentar el número estimado de crías por especie, mejorar genéticamente ciertas variedades, incrementar la producción acuícola ornamental abarcando un mayor mercado interno y externo, así como permitir el desarrollo socioeconómico para los pobladores como tecnológico para muchos investigadores interesados en el estudio de poecílidos.

Se planteó previo a la evaluación, si la obtención de crías mediante el uso de un inseminador artificial para la reproducción asistida de peces de la especie *X. helleri* no posee diferencias significativas con el número de crías obtenidas por cruce natural (H_0) o si esta sí posee diferencias significativas con el número de crías obtenidas por cruce natural (H_1). La presente investigación tiene como objetivo general comparar la obtención de crías por cruce natural y la obtención de crías mediante el uso de un inseminador artificial aplicado en animales hembras "vírgenes" de la variedad "Lira" inseminados con esperma de machos de la variedad "Velífera" del pez ornamental *X. helleri*.

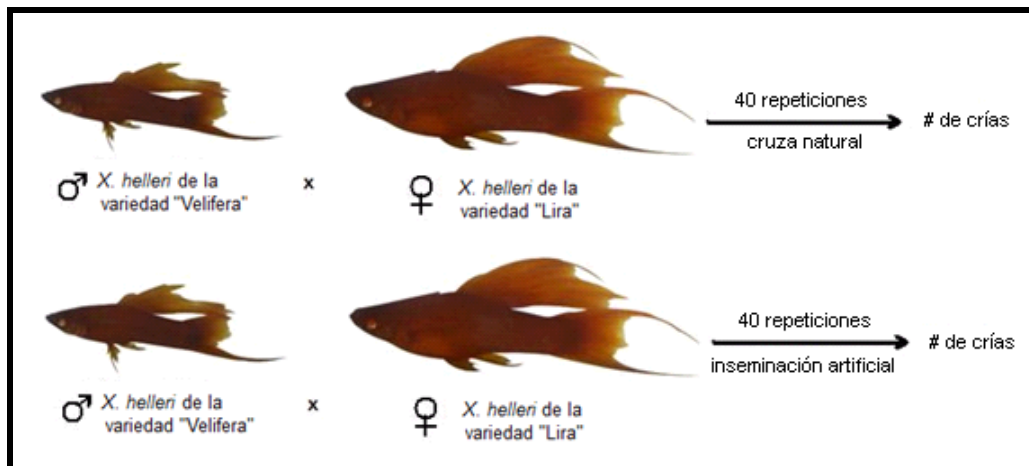
Materiales y métodos

Clasificación de la muestra poblacional de *Xiphophorus helleri* según el método de reproducción.

Se seleccionaron 160 peces juveniles (2 a 3 meses de edad), 80 machos de *X. helleri* de la variedad "Velífera" con gonopodio corto y 80 hembras vírgenes de *X. helleri* de la variedad "Lira", separados por sexo en dos acuarios (100 x 80 x 30 cm) y se realizó el cuidado de estos hasta alcanzar la etapa adulta. Se tuvo en cuenta los siguientes principios básicos: evitar el sufrimiento innecesario de los animales, evitar riesgos del manipulador y fomentar la aplicación de la regla de las 3R (Reducción, Refinamiento y Reemplazo) (OIE, 2010). Se realizó la investigación de acuerdo a los delineamientos propuestos por la European Medicines Agency (2007): (a) se seleccionó a los animales más sanos de igual peso que garanticen la repetición del diseño experimental; (b) se utilizó el mismo número de animales machos y hembras; (c) se aseguró el tamaño del grupo de tratamiento para asegurar la interpretación científica significativa de los datos generados; y (d) se esperó obtener un alto nivel de la cría de animales. Alcanzada la madurez sexual (7 a 8 meses de edad), los individuos fueron divididos en dos grupos para ser utilizados en la cruce natural y la IA. Cada grupo se conformó por 80 individuos: 40 machos de *X. helleri* de la variedad

“Velífera” y 40 hembras vírgenes de *X. helleri* variedad “Lira” (Milton & Arthington, 1983; Dawes, 1991). (Figura 1).

Figura 1. Métodos de reproducción comparados para la obtención de crías de *X. helleri*



Preparación para la toma de datos biométricos e IA en *Xiphophorus helleri*

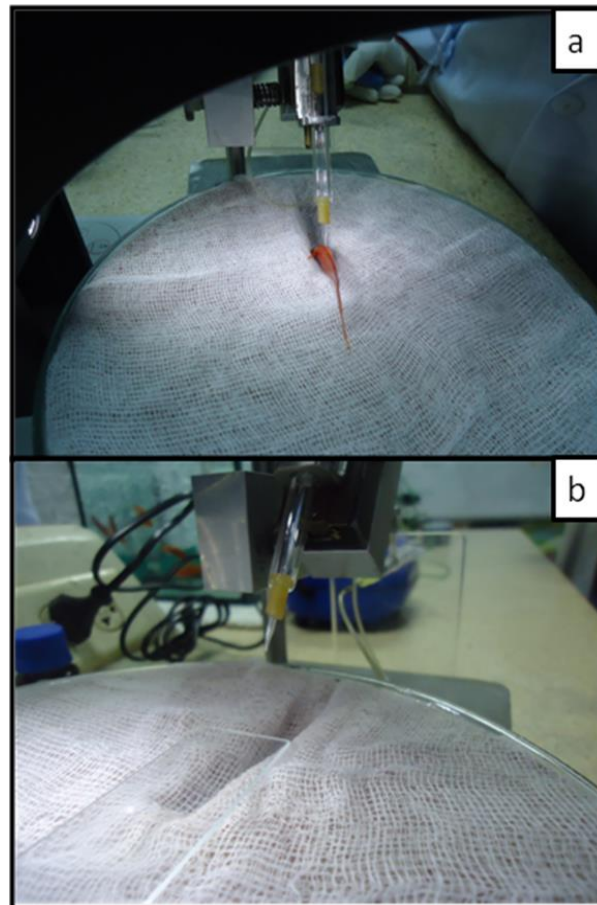
Previo a la fase de inducción a la anestesia, cada grupo fue dividido según su sexo en dos acuarios de 25 x 25 x 25 cm para fines de aclimatación y fácil manipulación, con el fin de evitar la cópula y consecuentemente falsos resultados. Se empleó eugenol como anestésico a dosis de 125 mg·L⁻¹ para anestesiar machos con la finalidad de facilitar la manipulación durante la colecta de semen y 100 mg·L⁻¹ para anestesiar hembras para la toma de los datos biométricos (peso total y longitud estándar) y la IA (McGovern-Hopkins *y cols.*, 2003; Llanos & Scotto 2010; Llanos *y cols.*, 2012). La eficacia del anestésico se evaluó basándose en un tiempo de recuperación promedio de 5 min a menos (Marking & Meyer, 1985). Resultó innecesario tomar la medida de los machos debido a que la madurez sexual es independiente del tamaño corporal en ellos (Arévalo *y cols.*, 2010). Se observó y controló el comportamiento durante las distintas fases de anestesia según lo propuesto por García-Gómez *y cols.* (2002), Llanos & Scotto (2010) y Llanos *y cols.*, 2012. El criterio de eficacia del anestésico fue dado por la pérdida total del equilibrio, sin una visible respuesta o reacción durante su extracción y manipulación (Munday & Wilson, 1997).

Inseminación artificial en *Xiphophorus helleri*

Este procedimiento solo se realizó con el grupo seleccionado a la IA. Se procedió a inducir a la anestesia a un macho de la variedad “Velífera” de *X. helleri* destinado a la IA. Una vez anestesiado, fue retirado del acuario evitando ser estresado así como ser expuesto a posibles riesgos de mortandad (Ross & Ross, 2008). Se procedió a ser colocado sobre la base del inseminador previamente humedecida con agua, exponiendo su zona ventral. Una vez posicionado el pez se limpió con una torunda de algodón humedecido con solución salina al 9% la zona ventral y el área del gonopodio de los posibles residuos del anestésico. Se procedió a estimular el gonopodio con movimientos en un arco de 180° hacia adelante y hacia atrás de 7 a 10 veces. Posterior a la estimulación se sostuvo el gonopodio hacia adelante con un dedo, mientras que simultáneamente se frotó con el pulgar e índice los lados del pez desde la cabeza por lo largo del cuerpo hasta alcanzar la base del gonopodio, hasta la obtención de la muestra de semen (McGovern-Hopkins *y cols.*, 2003; Gasparini *y cols.*, 2010). La muestra fue colectada con el extremo modificado del capilar con 0,05 mL de solución salina isotónica (0,9% NaCl), permitiendo un mayor control del volumen de semen obtenido. Esta operación se realizó en un corto periodo de

tiempo (30 seg), evitándose influir con el tiempo de recuperación de los peces machos (Llanos & Scotto, 2010; Llanos *y cols.*, 2012) (Figura 2).

Figura 2. Fotografías durante la colecta de semen: (a) Posicionamiento del macho de la variedad "Velífera" para la colecta de semen, (b) Muestra de semen colectado en el extremo modificado del capilar



Una vez realizada la colecta de muestra de semen, cada macho fue devuelto al acuario de recuperación (25 x 25 x 25 cm) en un tiempo no mayor de 3 min según los criterios del anestésico ideal (Marking & Meyer, 1985). Cabe mencionar que la movilidad de los espermatozoides se iniciará espontáneamente con la disociación del espermatóforo (Tabares *y cols.*, 2005), resultando viables por un largo periodo de tiempo, característico de peces de fecundación interna (Dong *y cols.*, 2008). Una vez alcanzada la recuperación en el macho, según las fases de recuperación descritas por García-Gómez *y cols.* (2002), Llanos & Scotto (2010) y Llanos *y cols.*, 2012, los peces fueron ubicados en un acuario de 100 x 80 x 30 cm, sólo para machos.

Se procedió a anestesiar a las hembras vírgenes de la variedad "Lira" de *X. helleri* destinadas a la IA para posteriormente ser inseminadas. Una vez anestesiada se procedió a realizar la toma de los datos biométricos sobre una gaza humedecida con agua. El peso fue tomado con una balanza digital marca Kinlee modelo EPS05 de 0.01g a 100g y la longitud tomada con una regla vernier marca Gimexsa de 20 cm desde el extremo supraterminal de la boca hasta la base del pedúnculo caudal. Posterior a este paso, se colocó a la hembra sobre la base del inseminador previamente humedecida con agua, tal como se hizo con los machos, exponiendo la zona ventral con la finalidad de ubicar la abertura genital. Examinamos cuidadosamente la abertura genital e introducimos entre 0.5 a 1 cm del extremo modificado del capilar hasta alcanzar el oviducto procediendo a inseminar 0,1 mL de semen disuelto en solución salina isotónica por cada una de las

hembras (Figura 3). Fue considerado nuevamente el criterio de trabajar con el pez fuera de su medio para no influir con su tiempo de recuperación (30 seg).

Figura 3. Fotografía durante la Inseminación artificial de una hembra virgen de la variedad "Lira" de *X. helleri*



Una vez realizada la IA, cada hembra fue devuelta al acuario de recuperación en un tiempo no mayor de 3 min según los criterios del anestésico ideal (Marking & Meyer, 1985), observándose y controlándose el comportamiento durante las distintas fases de anestesia (García-Gómez *y cols.*, 2002; Llanos & Scotto, 2010 y Llanos *y cols.*, 2012). Esta actividad se realizó de manera repetitiva, obteniendo como resultado 40 emparejamientos (40 repeticiones) como resultado. Es necesario indicar que se hicieron reemplazos de capilares cada vez que fueron utilizados. Una vez alcanzada la recuperación de la hembra, según las fases de recuperación descritas por García-Gómez *y cols.* (2002), Llanos & Scotto (2010) y Llanos *y cols.* (2012), estas fueron colocadas individualmente en un acuario de tipo paridera de 40 x 20 x 30 cm rotulados con la fecha de la IA. Se llevo a cabo el control de los días de gestación y el cuidado de las hembras durante el desarrollo embrionario.

Cruza natural en *Xiphophorus helleri*

Posterior a la IA, se procedió a trabajar con el grupo seleccionado para la craza natural conformado por 40 machos de *X. helleri* de la variedad "Velífera" y 40 hembras vírgenes de *X. helleri* variedad "Lira". Se indujo a la anestesia una a una a las hembras para realizar la toma de los datos biométricos, observándose y controlándose el comportamiento durante las distintas fases de anestesia (García-Gómez *y cols.*, 2002; Llanos & Scotto, 2010 y Llanos *y cols.*, 2012). Una vez anestesiada se procedió a realizar la toma de los datos biométricos sobre una gaza humedecida con agua, tal como se hizo con las hebras destinadas a la IA. Posterior a la toma de los datos biométricos de las hembras, fue ubicada en el acuario de recuperación de 25 x 25 x 25 cm. Una vez alcanzada la recuperación total de la hembra, según las fases de recuperación descritas por García-Gómez *y cols.* (2002), Llanos & Scotto (2010) y Llanos *y cols.*, 2012, fue colocada individualmente en un acuario de 40 x 20 x 30 cm tipo paridera. Cada una de las hembras fue emparejada con uno de los machos destinados a la craza directa con el fin de exponerlos y propiciar la cópula. Estos machos fueron devueltos al tercer día de exposición directa con la hembra al acuario de 100 x 80 x 30 cm, sólo para machos, donde se encontraban los machos utilizados en la IA.

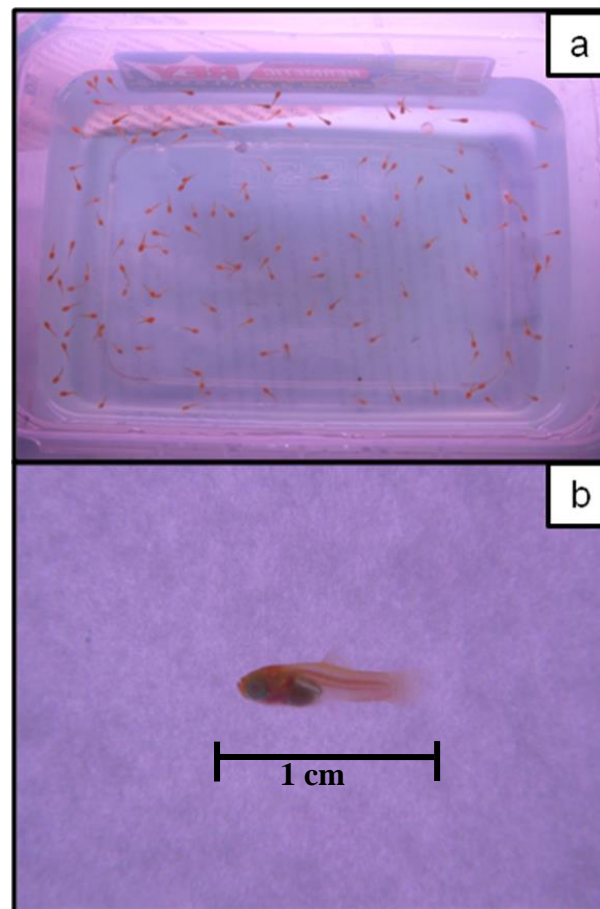
Control de la puesta de crías de *Xiphophorus helleri*

Cada uno de los acuarios parideras contó con agua de grifo disuelto con acondicionador marca Sera® 0,3 mL.L⁻¹. Todos los acuarios estuvieron ubicados en un invernadero donde se realizó el cuidado y seguimiento de las futuras madres. Este ambiente contó con un sistema de calefacción ambiental 28°C día/noche, así como con un sistema de aireación continua para cada uno de los acuario, ideal para la obtención de crías (Tamaru y cols., 2001). Se realizó el control semanal del oxígeno disuelto ($8,2 \pm 0,03$ mg.L⁻¹), el pH ($7,6 \pm 0,18$), conductividad eléctrica ($0,52 \pm 0,04$ mS/cm) y total de solutos disueltos ($262 \pm 17,89$ mg.L⁻¹) de todos los acuarios, con un fotoperiodo 12L/12D aproximadamente. La dieta diaria básica fue a base de dos tipos de alimento de la marca Sera® (Sera San y Sera Flora), alimentándoseles dos veces por día *ad libitum*. Iniciada la tercera semana de gestación, se optó por colocar un atado de rafia con el fin de evitar el canibalismo de las madres hacia las crías una vez nacidas (Jones y cols., 2008). Se realizaron cambios semanales de un 20% del total de agua de cada acuario tipo paridera evitando así cambios drásticos de temperatura que afecten el desarrollo embrionario en las hembras.

Obtención de crías de *Xiphophorus helleri*

Una vez nacidas las crías de *X. helleri*, las madres fueron devueltas al acuario de 100 x 80 x 30 cm inicial. Se procedió a extraer la rafia de los acuarios tipo paridera para contabilizar el número de crías obtenidas por hembra (Figura 4). Se registró el número de crías obtenidas según el método de reproducción (cruza natural e IA).

Figura 4. Fotografía de alevines de *X. helleri* a un día de nacidos: (a) Fotografía grupal, (b) Fotografía individual.



Procesamiento de datos

Los datos de las variables de estudio: longitud estándar de hembras, peso total de hembras, número de crías obtenidas y el tiempo demandado para la obtención de crías fueron presentados mediante tablas de contingencia según el método de reproducción realizado. Se evaluó la distribución de los datos con respecto a la Normal, de cada una de las variables mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Se realizó la prueba de chi-cuadrado de Pearson ($p < 0,05$) para determinar si la obtención de un mayor número de hembras gestantes es independiente al método de reproducción empleado. Además se utilizó la prueba de Levene y la prueba t de Student ($p < 0,05$) para determinar las diferencias significativas entre el número de crías obtenidas por cruce natural y el número de crías obtenidas por reproducción artificial, así como determinar las diferencias significativas entre el tiempo demandado para la obtención de crías por cruce natural y por IA. Se utilizó el paquete estadístico SPSS Statistics, versión 19.00 para el cálculo de los todos los estadísticos descriptivos e inferenciales.

Resultados

Datos biométricos de las hembras y evaluación del número de crías obtenidas de *Xiphophorus helleri*

Se realizó la toma de los datos biométricos de todas las hembras vírgenes *X. helleri* de la variedad "Lira" evaluándose la distribución de los datos con respecto a la distribución normal. El peso total de las 80 hembras registradas tuvo una media de $3,177 \pm 0,268$ ($p = 0,069$), mientras que la longitud de las 80 hembras registradas tuvo una media de $4,848 \pm 0,085$ ($p = 0,603$). Se obtuvo un $p > 0,05$ para ambas variables, comportándose como una distribución normal.

Alcanzada la obtención de crías, se realizó la evaluación de la distribución de los datos con respecto a la distribución normal de las variables número de crías obtenidas y tiempo demandado para la obtención de crías. Estas variables fueron seleccionadas de las hembras que tuvieron éxito de reproducción y obtención de crías (N válidos por cruce natural = 29; N válidos por IA = 38). Ambas variables presentaron una $p > 0,05$ comportándose como una distribución normal en ambos casos (Tabla 1).

Comparación entre el número de hembras gestantes de *Xiphophorus helleri* según el método de reproducción

Se realizó la prueba chi-cuadrado de Pearson para determinar si el uso de un inseminador artificial permite obtener un mayor número de hembras gestantes comparado a la obtención de hembras gestantes por cruce natural. La obtención de hembras gestantes por el método IA obtenido fue de 95% (38 hembras), mientras que la obtención de crías por cruce natural fue de 72.5% (29 hembras). Contrastando la hipótesis nula que plantea que ambas variables son independientes y hipótesis alterna plantea que ambas variables son dependientes, se obtuvo un valor del chi-cuadrado de Pearson = 7,44 ($p < 0,05$), lo cual indica que el éxito de la reproducción y el método de reproducción tienen relación.

Comparación entre el número de crías obtenidas de *Xiphophorus helleri* según el método de reproducción

Cumpléndose la distribución normal de los datos se procedió a determinar las diferencias significativas entre el número de crías obtenidas por cruce natural y el número de crías obtenidas por IA. Se realizó la prueba de Levene asumiéndose varianzas iguales ($p > 0,05$). Mediante la prueba t de Student ($p > 0,05$) se acepta que

las medias son iguales, por lo tanto no hay diferencias significativas entre el número de crías obtenidas por cruce natural y el número de crías obtenidas por IA (Tabla 1).

Comparación entre el tiempo demandado para la obtención de crías de *Xiphophorus helleri* según el método de reproducción

Cumplíendose la distribución normal de los datos se procedió a determinar las diferencias significativas entre el tiempo en días demandado para la obtención de crías por cruce natural y el tiempo demandado para la obtención de crías por IA. Se realizó la prueba de Levene asumiéndose varianzas diferentes ($p < 0,05$). Mediante la prueba t de Student ($p < 0,05$) se acepta que las medias son diferentes, por lo tanto hay diferencias significativas entre el tiempo demandado para la obtención de crías obtenidas por cruce natural y el tiempo demandado para la obtención de crías por IA. Tomamos el valor de la significación asintótica bilateral de la segunda fila (0,000) y el valor de t positivo (11,014), resultando el valor de p igual a 0,000 ($p = \text{sig}/2$), menor a 0,05. De esta manera se acepta que el tiempo demandado para la obtención de crías por cruce natural es mayor al tiempo demandado para la obtención de crías por IA (Tabla 1).

Tabla 1. Estadísticos descriptivos e inferenciales de las variables número de crías y tiempo demandado para la obtención de crías para las hembras de *X. helleri* utilizadas en la cruce natural y en la IA.

Variables		Media ± DEa,b	Sig. asintót. (bilateral)	Prueba de Levene	Prueba t	Prueba de Levene	Prueba t
Número de crías obtenidas	Cruza natural (N=29)	84,860 ± 10,456	0,664	0,456*	0,423		
	Inseminación artificial (N=38)	87,160 ± 12,293	0,512				
Días demandados para la obtención de crías	Cruza natural (N=29)	36,620 ± 1,741	0,476			0,017**	0,00
	Inseminación artificial (N=38)	30,820 ± 2,566	0,554				

*Se asumen varianzas iguales

**No se asumen varianzas iguales

Discusión

Los resultados indican que la media del número de crías obtenido por el método de cruce natural ($84,86 \pm 10,46$ crías/hembra) no posee diferencias significativas con respecto a la media de crías obtenidas mediante el método de IA ($87,16 \pm 12,29$ crías/hembra), sin conocerse registro científico alguno entre la diferencia de crías obtenidas según el método de reproducción empleado, ya sea por cruce natural o por IA. Sin embargo Tamaru *et al.* (2001) indica que por cruce natural obtuvieron aproximadamente de 30 crías/hembra, mientras que Milton & Arthington (1983) indican que por el mismo método obtuvieron $60,15 \pm 3,8$ crías/hembra, registrando entre ocho a nueve partos por hembra durante nueve meses de evaluación.

Además se determinó que el tiempo demandado para la obtención de crías por el método de cruce natural reportó un promedio de $36,62 \pm 1,64$ días y por el método de IA se reportó $30,82 \pm 2,86$ días. Ambos resultados se encontraron dentro del rango de tiempo propuesto por Tamaru *et al.* (2001) que va de 26 a 63 días de fecundación. Sin embargo

no se conoce registro alguno que haga diferencia del tiempo demandado para la obtención de crías, ya sea por cruce natural o por IA.

En la presente investigación se alcanzó un 95% de éxito en la fecundación con la utilización del inseminador artificial y un 75% mediante el cruce directo, sin embargo los resultados obtenidos por Tamaru *et al.* (2001) y McGovern *et al.* (2003) expresan éxito más no indican el porcentaje de éxito alcanzado en fecundar hembra vírgenes mediante el método de IA ni por el método de cruce natural. Este estudio fortalece el uso del inseminador artificial para obtener un mayor éxito en la fecundación de hembras de *X. helleri*.

En la actualidad el desarrollo de nuevas tecnologías como el uso de un inseminador artificial aplicado en especies de interés científico y comercial viene siendo de gran utilidad permitiendo opciones a nivel genético, molecular, fisiológico entre otros. El presente estudio fundamenta la utilización de un inseminador artificial en *X. helleri* con la finalidad de permitir estas ventajas mencionadas como por ejemplo Tamaru *et al.* (2001) y McGovern *et al.* (2003) indican la técnica como de gran éxito para la obtención de crías del mismo género (*Xiphophorus*) y la misma familia (Poeciliidae). McGovern *et al.* (2003), Walter *et al.* (2006) y Rosenthal (2010) mencionan que la IA en *X. helleri* y otras especies de la familia Poeciliidae permite alcanzar resultados notables para la obtención de variedades como resultado por cruces intraespecíficas así como interespecíficas, lo cual se puede adecuar a la obtención de nuevos resultados aplicando la metodología ya descrita en el presente estudio con mayor probabilidad de éxito.

Conclusiones

Se llegó a la conclusión que existe relación directa entre el número de hembras gestantes y el método de reproducción, por lo tanto el uso del inseminador artificial permite tener un mayor número de hembras gestantes de *X. helleri* comparado a la cruce natural. Además se determinó que no existió diferencias entre el número de crías obtenidas por cruce natural comparado con el número de crías obtenidas utilizando un inseminador artificial en el pez ornamental *X. helleri*. Se determinó también que el tiempo demandado para la obtención de crías por cruce natural resultó mayor al tiempo demandado para la obtención de crías por IA, por lo tanto se puede obtener crías de *X. helleri* en menor tiempo mediante el uso del inseminador artificial comparado a la cruce natural. Finalmente concluimos en que el uso del inseminador artificial es una excelente herramienta para la obtención de crías de *X. helleri* sin efectos letales durante y posterior al manejo.

Bibliografía

1. Arévalo, E.; Gómez, I.; Gómez, E.; Rodríguez, D. & Hurtado, H. (2010). Estudio preliminar de la relación del tamaño corporal y la maduración testicular de *Xiphophorus hellerii* (Heckel, 1948). Revista de la Facultad de Ciencias Básicas, 6(2): 226-239.
2. Axelrod, A. & Wischnath, L. (1991). Swordtails and platies. New Jersey, USA: TFH Publications.
3. Bisazza, A.; Grapputo, A. & Nigro, L. (1997). Evolution of reproductive strategies and male sexual ornaments in poeciliid fishes as inferred by mitochondrial 16 rRNA gene phylogeny. Ethology, Ecology & Evolution, 9: 55-67.

4. Dawes, J. (1991). Livebearing fishes. A guide to their aquarium care, biology and classification. (1^a. Ed.). London, England: Blandford Pr.
5. Dong, Q.; Huang, C. & Tiersch, T. (2006). Post-thaw amendment of cryopreserved sperm for use in artificial insemination of a viviparous fish, the green swordtail *Xiphophorus helleri*. *Aquaculture*, 259: 403-414.
6. Dong, Q.; Huang, C.; Hazlewood, L.; Walter, R. & Tiersch, T. (2008). Sperm cryopreservation for live-bearing fishes of the genus *Xiphophorus*. En Cabrita, E; Robles, V. & Herraéz, P. (Eds), *Methods in reproductive aquaculture: marine and freshwater species* (pp. 339-344). España: CRC Press.
7. European Medicines Agency. (2007). Guideline on repeated dose toxicity. London, 21 February 2008. Extraído el 15 de Octubre de 2012 desde http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003103.pdf
8. García-Gómez, A.; De la Gándara, F. & Raja, T. (2002). Utilización del aceite de clavo, *Syzygium aromaticum* L. (Merr. & Perry), como anestésico eficaz y económico para labores rutinarias de manipulación de peces marinos cultivados. *Boletín Instituto Español de Oceanografía*, 18: 21-23.
9. Gasparini, C.; Simmons, W.; Beveridge, M. & Evans, J. (2010). Sperm swimming velocity predicts competitive fertilization success in the green swordtail *Xiphophorus helleri*. *PLoS ONE*, 5(8).
10. Hicks, B. (1989). Anaesthetics: sweet dreams for fragile fish. *Canadian Aquaculture*, 89: 29-31.
11. Jones, C.; Kaiser, H. & Hecht, T. (2008). Intercohort cannibalism and post-partum behaviour of juvenile swordtail *Xiphophorus helleri* Heckel (Pisces: Poeciliidae). *Aquaculture Research*, 39: 111–117.
12. Kazianis, S.; Trono, D. & Woodhead, A. (2002). Artificial insemination of *Xiphophorus*. Extraído el 12 de Agosto de 2012 desde <http://www.xiphophorus.txstate.edu/ai.htm>
13. Llanos, C. & Scotto, C. (2010). Eugenol como anestésico para labores de manipulación de *Xiphophorus helleri* (heckel, 1848) (Cyprinodontiformes: Poeciliidae). *The Biologist* (Lima), 8: 179-188.
14. Llanos, C.; Monteza, C. & Scotto, C. (2012). Determinación de la concentración letal media (CL₅₀) y eficacia del eugenol como anestésico sobre *Xiphophorus helleri* (Heckel, 1848) (Cyprinodontiformes: Poeciliidae). *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 23(4): 429-440
15. Marking, L. & Meyer, F. (1985). Are better anesthetics needed in fisheries?. *Fisheries*, 10: 2-5.
16. McGovern-Hopkins, K.; Tamaru, C.; Takeshita, G. & Yamamoto, M. (2003). Procedural guide for the artificial insemination of the lyretail swordtail, *Xiphophorus helleri*. *Center for Tropical and Subtropical Aquaculture*, 149.
17. Milton, A. & Arthington, A. (1983). Reproductive biology of *Gambusia affinis* holbrooki (Baird & Girard), *Xiphophorus helleri*, (Gunther) and *X. malculatus* (Heckel) (Pisces; Poeciliidae) in Queensland, Australia. *Journal of Fishery Biology*, (23): 23-41.

18. Morizot, D.; Slaugenhaupt, S.; Kallman, K. & Chakravarti, A. (1991). Genetic linkage map of fishes of the genus *Xiphophorus* (Teleostei: Poeciliidae). *Genetics Society of America*, 127: 399-410.
19. Munday, P. & Wilson, S. (1997). Comparative efficacy of clove oil and other chemicals in anaesthetization of *Pomacentrus amboinensis*, a coral reef fish. *Journal of Fish Biology*, 51: 931-938.
20. OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal). (2010). Código sanitario para los animales terrestres. Utilización de animales en la investigación y educación. Cap. 7.8. p. 1-13. Extraído el 13 de Enero de 2011 desde http://www.oie.int/esp/normes/MCode/e_s_chapitre_1.7.8.pdf.
21. Rosenthal, G. (2010). Sperm cryopreservation for live-bearing fishes of the genus *Xiphophorus*. En Elsevier (Ed), *Encyclopedia of Animal Behavior* (pp. 363-367). Oxford: Academic Press.
22. Ross, L. & Ross, B. (2008). *Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals* (3ª. Ed.). Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd.
23. Tabares, C.; Tarazona, A. & Olivera M. (2005). Fisiología de la activación del espermatozoide en peces de agua dulce. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 18(2): 149-161.
24. Tamaru, C., Cole, B., Bailey, R., Brown, C. & Ako, H. (2001). A manual for commercial production of the swordtail, *Xiphophorus helleri*. Center for Tropical and Subtropical Aquaculture, 128.
25. Tyagi, R. & Shukla, A. (2002). *Development of fishes*. New Delhi, India: Jaya Publishing House.
26. Walter, R. & Kazianis, S. (2001). *Xiphophorus* interspecies hybrids as genetic models of Induced neoplasia. *ILAR Journal*, 42(4): 299-321.
27. Walter, R.; Hazlewood, L. & Kazianis, S. (2006). *The Xiphophorus genetic stock center manual*. (1ª. Ed.). Texas, EEUU.
28. Yang, H.; Hazlewood, L.; Walter, R & Tiersch, T. (2008). Sperm cryopreservation of a live-bearing fish, *Xiphophorus couchianus*. Male-to-male variation in post-thaw motility and production of F1 hybrid offspring. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 149(2): 233-239.