

# UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO

## FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS



### CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

“EFECTO DE ALFALFA CONTAMINADA CON *Pseudopeziza medicaginis* SOBRE  
LA CALIDAD DEL SEMEN DE CARNEROS CRIOLLOS”

**PROYECTO DE INVESTIGACIÓN REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO  
DE MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**NOMBRE DE LA AUTORA:**

MARÍA RUBÍ NOVILLO RUEDA

**NOMBRE DEL TUTOR:**

ING. GONZALO ARAGADVAY

**CEVALLOS-ECUADOR**

**Octubre 2016**

## HOJA DE DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

“La suscrita **MARÍA RUBÍ NOVILLO RUEDA**, portadora de la cédula de identidad número: 1500713118, libre y voluntariamente declaro que el Informe Final del Proyecto de investigación titulado: **“EFECTO DE ALFALFA CONTAMINADA CON *Pseudopeziza medicaginis* SOBRE LA CALIDAD DEL SEMEN DE CARNEROS CRIOLLOS”** es original, autentico y personal. En tal virtud, declaro que el contenido es de mi sola responsabilidad legal y académica, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas”



**MARÍA RUBÍ NOVILLO RUEDA**

**C.I. 1500713118**

## HOJA DE DERECHOS DE AUTOR

“Al presentar este Informe Final del Proyecto de Investigación titulado **“EFECTO DE ALFALFA CONTAMINADA CON *Pseudopeziza medicaginis* SOBRE LA CALIDAD DEL SEMEN DE CARNEROS CRIOLLOS”** como uno de los requisitos para la obtención del título de grado de Médico Veterinario Zootecnista, en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato, autorizo a la Biblioteca de la Facultad, para que este documento esté disponible para su lectura, según las normas de la Universidad.

Estoy de acuerdo en que se realice cualquier copia de este Informe Final, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica potencial.

Sin perjuicio de ejercer mi derecho de autor, autorizo a la Universidad Técnica de Ambato la publicación de este Informe Final, o de parte de él.



**MARÍA RUBÍ NOVILLO RUEDA**

**C.I. 1500713118**

**“EFECTO DE ALFALFA CONTAMINADA CON *Pseudopeziza medicaginis*  
SOBRE LA CALIDAD DEL SEMEN DE CARNEROS CRIOLLOS”**

**REVISADO POR:**



Ing. Gonzalo Aragadvay Mg.  
TUTOR



Dr. Ph Marcos Barros  
ASESOR DE BIOMETRÍA



Dr. Marco Rosero Mg.  
ASESOR DE REDACCIÓN TÉCNICA

**APROBADO POR:**



Ing. Giovanni Velástegui Mg.  
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

FECHA



Dr. Gerardo Kelly Mg.  
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

FECHA



Ing. Verónica Rivera Mg.  
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

FECHA

## **AGRADECIMIENTO**

Doy gracias a Dios que me dio la fuerza y fe al permitirme culminar con la realización de este proyecto, gracias de corazón a mi Tutor Ing. Gonzalo Aragadvay por su paciencia, dedicación, motivación y aliento, a mis asesores Dr. Marco Rosero y Dr. Marcos Barros quienes de una u otra manera han hecho fácil lo que fue difícil, siendo un privilegio poder contar con su ayuda y guía en este trabajo.

Un agradecimiento singular les debo a mis profesores, quienes con sus enseñanzas, consejos, apoyo y amistad contribuyeron con mi formación y no dejaron que decaiga en los momentos difíciles.

Finalmente, por encima de todo y con todo mi amor agradezco a los míos, a mi madre Dra. Rubí Rueda y mi querida hermana Pauleth Novillo por ser en quien me he apoyado incondicionalmente para seguir adelante.

## **DEDICATORIA**

Dedico este trabajo a mi abuelo Leonidas Rueda quien sentó en mí las bases de responsabilidad y deseo de superación.

A las mujeres más importantes en mi vida; mi madre Rubí Rueda quien con su tenacidad y lucha insaciable ha hecho de ella el gran ejemplo a seguir y destacar, mi hermana Pauleth Novillo quien me ha ofrecido el amor, compañía y apoyo incondicional en el transcurso de mi vida sin dejar de lado su gran ejemplo como excelente ser humano, finalmente dedico a mi pequeña hija Perla Jiménez quien es el motor para cumplir mis metas y anhelos.

## **ÍNDICE DE CONTENIDO**

### **CAPITULO I**

INTRODUCCIÓN.....	1
-------------------	---

### **CAPITULO II**

REVISIÓN LITERARIA O MARCO TEÓRICO.....	3
---	---

2.1 ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS.....	3
--------------------------------------	---

2.2 CATEGORÍAS FUNDAMENTALES.....	6
-----------------------------------	---

2.2.1 Variable independiente.....	6
-----------------------------------	---

2.2.2 Variable dependiente.....	10
---------------------------------	----

2.2.3 Unidad de análisis.....	12
-------------------------------	----

### **CAPITULO III**

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	15
----------------------------	----

3.1 HIPÓTESIS.....	15
--------------------	----

3.2 OBJETIVOS.....	15
--------------------	----

3.2.1 Objetivo general.....	15
-----------------------------	----

3.2.2 Objetivos específicos.....	15
----------------------------------	----

### **CAPÍTULO IV**

MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
---------------------------	----

4.1 UBICACIÓN DEL EXPERIMENTO.....	16
------------------------------------	----

4.2 CARACTERIZACIÓN DEL LUGAR.....	16
------------------------------------	----

4.3 EQUIPOS Y MATERIALES.....	17
-------------------------------	----

4.4 FACTORES EN ESTUDIO.....	19
------------------------------	----

4.5 TRATAMIENTOS .....	20
4.6 DISEÑO EXPERIMENTAL.....	20
4.7 VARIABLE RESPUESTA.....	21
4.8 PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN.....	25

## **CAPÍTULO V**

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	26
-----------------------------	----

## **CAPÍTULO VI**

CONCLUSIONES, BIBLIOGRAFÍA Y ANEXOS.....	29
6.1 CONCLUSIONES.....	29
6.2 BIBLIOGRAFÍA.....	29
6.3 ANEXOS.....	34

## **CAPÍTULO VII**

PROPUESTA.....	38
7.1 ANTECEDENTES DE LA PROPUESTA.....	38
7.2 JUSTIFICACIÓN.....	38
7.3 OBJETIVOS.....	39
7.4 ANÁLISIS DE FACTIBILIDAD.....	39
7.5 METODOLOGÍA, MODELO OPERATIVO.....	39
7.6 ADMINISTRACIÓN.....	40



## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1</b>	
Requerimientos diarios de nutrientes en ovinos.....	14
<b>Cuadro 2</b>	
Requerimientos diarios de energía en ovinos.....	14
<b>Cuadro 3</b>	
Dieta experimental utilizada en el trabajo de campo con los requerimientos de los animales para mantenimiento.....	19
<b>Cuadro 4</b>	
Tratamientos utilizados en el proyecto de investigación.....	20
<b>Cuadro 5</b>	
Esquema del diseño experimental realizado.....	21
<b>Cuadro 6</b>	
Métodos utilizados para la valoración del líquido seminal recolectado en el trabajo de investigación.....	24
<b>Cuadro 7</b>	
Efecto del consumo de alfalfa contaminada con <i>Pseudopeziza medicaginis</i> sobre la calidad de semen entre tratamientos.....	26

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	
<i>Pseudopeziza medicaginis</i> .....	9
<b>Figura 2</b>	
Mapa de la ubicación del ensayo.....	16
<b>Figura 3</b>	
Recolección del semen.....	34
<b>Figura 4</b>	
Recolección del semen.....	35
<b>Figura 5</b>	
Valoración seminal en el laboratorio.....	35
<b>Figura 6</b>	
Morfología espermática de Tratamiento 1.....	36
<b>Figura 7</b>	
Morfología espermática de Tratamiento 2.....	36
<b>Figura 8</b>	
Morfología espermática de Tratamiento 3.....	36
<b>Figura 9</b>	
Concentración espermática de Tratamiento 1.....	37
<b>Figura 10</b>	
Concentración espermática de Tratamiento 2.....	37
<b>Figura 11</b>	
Concentración espermática de Tratamiento 3.....	37

## RESUMEN

Este trabajo se realizó en la granja de la Universidad Técnica de Ambato; el pastoreo de praderas constituidas en su mayor parte por alfalfa es utilizada en la serranía ecuatoriana en la alimentación de ovinos, sin embargo esta forrajera presenta elevada severidad de *Pseudopeziza medicaginis* relacionada a su vez con niveles altos de fitoestrógenos (coumestrol). El objetivo de la presente investigación fue valorar los efectos sobre la calidad seminal, del coumestrol presente en la alfalfa contaminada con diferentes niveles de *Pseudopeziza medicaginis* incluida en dietas para ovinos. Se probaron en una dieta isoprotéica y isoenergética tres diferentes niveles de contaminación del hongo, evaluándose los siguientes tratamientos: T1: 10%, T2: 40%, y T3: 70% de contaminación en la alfalfa. El trabajo se llevó a cabo bajo un diseño de bloques completos al azar (efecto del bloque edad). Mediante vagina artificial se realizaron extracciones semanales de semen para su evaluación de volumen (VOL), mortalidad (MOR), concentración espermática (CONC), morfología (MRF), movilidad masal (MMSL), y movilidad individual (MIDL). El VOL y la MOR no mostraron diferencia ( $P=0,4856$  y  $P=0,5952$  respectivamente) entre tratamientos. La CONC espermática ( $P=0,0117$ ) mostró diferencia, con una mayor concentración el T1 ( $4,63 \text{ Sp} \times 10^9$ ) con respecto al T2 y T3. Con respecto a la MRF espermática se encontró diferencia ( $P=0,0016$ ) entre tratamientos con un menor porcentaje de alteraciones morfológicas en los animales que fueron alimentados con alfalfa contaminada con 10% de *Pseudopeziza medicaginis* (T1). En cuanto a la MMSL se observó diferencias ( $P=0,0001$ ) entre los tratamientos, siendo la mayor movilidad en el T1 (4,43). La mayor ( $P=0,0007$ ) MIDL se observa para el T1 y T2 frente a T3. Se concluye que la ingesta de alfalfa con 70% de contaminación con *Pseudopeziza medicaginis* tiene efectos nocivos sobre la morfología de los espermatozoides especialmente alteraciones en la cola y como consecuencia baja en la movilidad espermática tanto individual como masal, lo que podrían llegar a ser estos resultados perjudiciales para la reproducción.

## SUMMARY

This work was done on the farm of the Técnica de Ambato University. Grazing meadows formed mostly by alfalfa is used in the Ecuadorian highlands in feeding sheep, however this forage has high severity *Pseudopeziza medicaginis* related turn with high levels of phytoestrogens (coumestrol). The aim of this research was to assess the effects on semen quality, the coumestrol present in contaminated alfalfa with different levels of *Pseudopeziza medicaginis* included in diets for sheep. They were tested in a isoproteic and isoenergetic diet, three different levels of fungal contamination, evaluated the following treatments: T1 10%, T2: 40%, T3: 70% contamination in alfalfa. The experiment was carried out under a design of a randomized complete block. By artificial vagina weekly semen collections were performed for evaluation of volume (VOL), motility (MOT), mortality (MOR), concentration (CONC), morphology (MRF), gross motility (SLMM), and individual mobility (MIDL) . The MOR VOL and showed no difference ( $P = 0.4856$  and  $P = 0.5952$  respectively) between treatments. CONC sperm ( $P = 0.0117$ ) showed no difference, with a higher concentration T1 (Sp  $4.63 \times 10^9$ ) with respect to T2 and T3. With regard to the MRF sperm it showed difference ( $P = 0.0016$ ) between treatments found lower percentages of morphological changes in animals that were fed contaminated alfalfa with 10% *Pseudopeziza medicaginis* (T1). As for MMSL differences ( $P = 0.0001$ ) it was observed between treatments, with the greatest mobility T1 (4.43). The higher ( $P = 0.0007$ ) MIDL is observed for the T1 and T2 T3 off. It is concluded that ingestion of alfalfa with 70% contamination with *Pseudopeziza medicaginis* measurements have harmful effects on sperm morphology especially alterations in the queue and as low result in both individual sperm motility as masal, which could become these results detrimental effects on reproductive performance.

# CAPITULO I

## INTRODUCCIÓN

Ecuador a través de su historia ha venido siendo un país ovejero, las razas de ovejas se dividen en tres grupos: criollas, cruzadas y puras; en la actualidad un 80% de los ovinos de tipo criollo se encuentran en manos de los campesinos, quienes los utilizan para varias finalidades, como la obtención de lana y carne, además son considerados como animales de repelo, con una constitución muy fuerte a pesar de su pequeño tamaño (Stwar, 2012).

En Tungurahua los ovinos son la fuente principal de lana, la misma que es utilizada para la elaboración de trajes típicos siendo una fuente de ingreso para los indígenas de la zona. Uno de los aspectos descuidados en el manejo de los ovinos criollos es el reproductivo, ovinos hembras y machos pueden tener diferentes alteraciones que ocasionen la baja en la reproducción de los mismos; sin embargo entre los principales factores que alteran la reproductividad se engloban en aspectos de salud, edad, manejo y nutrición (Adams et al, 1990).

La mayoría de los pobladores que se dedican a la ovinocultura, optan por tener uno o dos carneros como reproductores en su rebaño es por ello que la buena calidad del semen en estos animales es de gran importancia. Entre uno de los varios aspectos que afectan a la calidad del semen es el nutricional, sin embargo los ovinos son animales de pastoreo y la mayor parte de las praderas están constituidas de alfalfa ya que reúne características que la hacen un cultivo de alto rendimiento con amplia adaptación al clima y suelo, a pesar de ello un gran porcentaje de los pastizales de alfalfa son afectados por diferentes hongos foliares, los mismos que alteran las características de la planta (Romero et al, 1997), como la producción de fitoalexinas de tipo cumestanos estrogénicos.

Por otra parte existen investigaciones en donde se demuestra que este tipo de alimentos altera la reproductividad en las hembras. Es ahí donde radica el objeto de este proyecto

ya que se espera cuantificar el efecto que tiene la inclusión de alfalfa contaminada con diferentes niveles *Pseudopeziza medicaginis* en la dieta sobre la calidad del semen de carneros criollos.

## CAPITULO II

### REVISIÓN LITERARIA O MARCO TEÓRICO

#### 2.1 ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS

Existen diferentes trabajos de investigación realizados sobre el consumo de alfalfa y su alteración sobre el sistema reproductivo, sin embargo un gran porcentaje hace referencia a las hembras como es el caso de Romero et al, 1997 en su investigación sobre Síndrome estrogénico en vacas lecheras por consumo de alfalfa con *Pseudopeziza medicaginis*, con grandes cantidades de coumestrol, donde obtiene como resultado: “De 1264 inseminaciones a lo largo del año de estudio en un hato de 608 vacas, solo se lograron 376 gestaciones, de las cuales 36 resultaron en abortos y 102 se encontró el útero turgente a la palpación al momento del diagnóstico de la gestación y 238 fueron gestaciones normales. Este resultado representa un índice de 3,36 servicios por concepción y solo 27% de éxito sobre el total de inseminaciones” estos resultados se atribuyen al consumo de alfalfa.

Es por ello que Muñoz en el 2002, en su artículo de investigación zootécnico sobre los parámetros reproductivos en vacas Holstein alimentadas con alfalfa concluye que este vegetal produce alteraciones en el aparato reproductor del ganado lechero, entre las principales son al oviducto, útero, cérvix y vagina, además que puede provocar un desequilibrio hormonal, ya que se sospecha que inhibe la producción de FSH y LH. También compara los datos obtenidos del hato estudiado, con los parámetros reproductivos normales, los mismos resultaron en porcentajes elevados de abortos, de repetidoras, de infertilidad y de quistes ováricos. Cita a Lotane y Adler, 1966, donde menciona que uno de los factores que pueden influir en la eficiencia reproductiva del hato puede ser el consumo de alfalfa.

Se dice que fuentes vegetales con fitoestrógenos producen alteraciones sobre la fisiología reproductiva de los animales, ya que el mecanismo de acción de estos es propio de los estrógenos; es por ello que en su artículo de revisión bibliográfica sobre Efectos de los fitoestrógenos en la reproducción animal Denis Yohan, 2010 concluye que: “El consumo de plantas que contienen fitoestrógenos favorece la actividad farmacológica endógena cuyo efecto depende básicamente del tipo, la cantidad y de la especie que lo consuma. Los fitoestrógenos están ampliamente contenidos en gran variedad de plantas y forrajes, destinados al consumo humano y animal, teniendo variabilidad de efectos adversos principalmente en el tracto reproductivo en la mayoría de especies animales. Debido a que muchos fitoestrógenos tienen la posibilidad de ser agonistas o antagonistas estrogénicos, los efectos varían desde la infertilidad hasta una sobre-respuesta estrogénica, aumentando así las secreciones del tracto reproductivo y alterando el comportamiento animal”.

En la actualidad existen vacíos en el conocimiento, por lo que se desconoce si los parámetros reproductivos en los sistemas productivos se han visto afectados por el consumo de forrajes fitoestrogénicos. Dentro de los rumiantes existen pocos reportes de campo de los efectos del consumo de vegetales fitoestrogénicos, lo cual puede ser debido a la dificultad para hacer el seguimiento del caso, el cual en muchas de las oportunidades pueden pasar desapercibido por ser una caso sub-clínico. Además se suma el hecho de desconocer qué tipos de plantas tienen este potencial, qué niveles de concentraciones de fitoestrógenos se manejan dentro del alimento, qué cantidad de alimento consume cada animal (principalmente en sistemas de producción extensiva y semi-intensiva), entre otros factores. En consecuencia la mayoría de reportes son de tipo experimental. En las hembras que consumen Alfalfa, se reporta signología de ninfomanía e infertilidad como: quistes ováricos, crecimiento prematura de la ubre y genitales, entre otros (Vásquez, 2002).



El impacto de la ingestión de fitoestrógenos sobre la industria, puede ejemplificarse con lo que sucede en Australia. Rebaños de ovejas que fueron alimentados con pastura que contenían alfalfa se vieron afectadas en su capacidad reproductiva de tal forma, que cerca de un millón de ovejas no pudieron procrear, lo que disminuyó entre 5 a 8% las ganancias brutas al considerar las pérdidas en inversión, alimentación, cuidados, e incluso compra de ganado, además de la disminución en la producción de lana y la necesidad de comprar e importar animales (Adams, 1990. Citado por García y López en 2012).

Un importante aporte realiza Pérez y Pérez, 2006, sobre los fitoestrógenos y el efecto de su consumo en diferentes órganos y sistemas de animales domésticos; en el sistema reproductivo donde cita a Galey, 1993, Burroughs, 1995 y Branham, 2000, manifiesta que el coumestrol que se encuentra en vegetales causa alteraciones reproductivas en hembras de diferentes especies de ratas, como los ratones hembra prepúberes de la cepa Swiss Webster que han sido alimentados durante cinco días con 20 g de alimento que contenga intencionalmente 90 mg/ kg de coumestrol presentaron edema uterino. Por su parte, la administración de 100µg de coumestrol en ratones hembra de 1 a 5 días de nacidos produce cambios en los ovarios como es la presencia de folículos hemorrágicos y folículos poliovulares. En ratas Sprague Dawleyse encontró que el coumestrol se une con afinidad similar al estradiol a los ER presentes en el útero”.

Muy pocas investigaciones se han realizado en machos, sin embargo un ejemplo de esto es el estudio efectuado en toros, la ingestión de pasturas especialmente alfalfa contaminada con *Pseudopeziza medicaginis* ocasionó metaplasia glandular y epitelial tanto en próstata como glándulas bulbo-uretrales (Romero et al, 1997).

Por otro parte Pérez, 2009, realizó un estudio del Efecto del coumestrol sobre la producción espermática y la conducta de exploración olfatoria de perros estimulados con moco vaginal estral, donde los obtuvo como resultados: “La frecuencia de olfateo del

recipiente con las secreciones vaginales disminuyó significativamente de la primera a la cuarta semanas. Estos valores variaron de  $2.6 \pm 1.95$  veces en la semana cero a  $0.6 \pm 0.55$  en la semana cuatro. De igual manera, la menor frecuencia de marcado de territorio con orina de los perros se observó en la cuarta semana, iniciando en  $2 \pm 0.63$  veces y culminando en  $0.4 \pm 0.49$  ocasiones. El tiempo de latencia de respuesta de los perros hacia las secreciones vaginales aumentó de manera significativa de la semanas uno a la tres y se mantuvo en la semana cuatro. De la misma manera, aumentó la latencia al marcado con orina; al inicio fue de  $0.54 \pm 0.35$  segundos, y en la cuarta semana, de  $2.45 \pm 2.35$  minutos. El número total de espermatozoides eyaculados disminuyó al pasar de  $518.4 \pm 215.4$  la semana cero a  $57.6 \pm 50.4$  hacia la semana cuatro. El porcentaje de espermatozoides que presentaron alteraciones en la morfología espermática pasó de  $14.7 \pm 3.3$  puntos porcentuales en la semana cero a  $60.0 \pm 20.0\%$  en la semana cuatro”.

Además *in vitro*, se probó el uso del coumestrol obtenido de la alfalfa, en donde dio como resultado una inducción a la apoptosis en líneas celulares derivadas de células de Leydig de ratón de manera dependiente de la concentración administrada. Así mismo produce disminución en el número de montas y eyaculaciones en ratones. En ratas macho de 2 días de nacidos a los cuales se les inyectan 4 mg kg de coumestrol por vía subcutánea durante 16 días, se inhibe el desarrollo testicular a corto y largo plazo. Así mismo, cuando llegan a la edad adulta, se afecta el número de crías por camada (Atanassova et al., 2000).

## **2.2 CATEGORÍAS FUNDAMENTALES O MARCO CONCEPTUAL**

### **2.2.1 Variable independiente**

*Alfalfa contaminada con Pseudopeziza medicaginis*

### **Alfalfa (*Medicago sativa*)**

Los campesinos, hombres y mujeres de la sierra ecuatoriana, generalmente han sembrado, cultivado o por lo menos escuchado sobre la existencia de esta especie forrajera la alfalfa (*Medicago sativa*), las alternativas de su uso son amplias, como: forraje verde, heno, alfarina y en comprimidos energéticos y medicinales para los humanos (Dammer, 2013).

Identificación: planta perenne de 10 a 80 cm, herbácea, de pilosidad variable. Hojas trifoliadas, ovaladas, más o menos estrechos, con el margen aserrado en su extremo, el central peciolulado, estípulas subenteras. Flores con corola de violeta a púrpura o amarilla. Inflorescencia con numerosas flores en racimos densos terminales, con pedúnculo más largo que la hoja adyacente (Buendía, 2000).

Adaptación: La alfalfa presenta una adaptabilidad impresionante a varias condiciones climáticas y tipos de suelos, por lo cual tiene una muy amplia adaptación en el ámbito mundial. Las plantas se desarrollan bien en climas secos; en climas húmedos templados puede establecerse pero su producción está determinada por la infestación de enfermedades fúngicas. No se adapta a climas subtropicales y tropicales húmedos. Debido a su sistema radical pivotante y profundo, puede soportar sequías, pero sin riego el crecimiento es marginal bajo (Alarcón, 2012).

Importancia económica: La alfalfa es probablemente el cultivo forrajero más importante dentro de las leguminosas en la alimentación de rumiantes, con una superficie cultivada superior a 23 millones de hectáreas en el mundo, constituye el cuarto forraje en áreas cultivables en el planeta. Los principales países que producen alfalfa son Estados Unidos, Argentina, China y Canadá, entre otros países. El incremento de áreas sembradas a nivel mundial se debe a una mayor disponibilidad de tierras para cultivo y a un incremento en los precios de los granos y subproductos agroindustriales, lo cual ha

provocado que los productores de bovinos busquen fuentes de alimentación más nutritivas y rentables para sus sistemas de producción de ganado (Alarcón, 2012).

La alfalfa contiene pocos fitoestrogénos, excepto cuando sufre de enfermedades foliares. El ataque de áfidos u hongos patógenos puede provocar que la alfalfa produzca fitoalexinas del tipo cumestanos estrogénicos, incluyendo el Cumestrol, y el 4'-metoxi Cumestrol (Romero,1997). Los efectos ambientales, tales como la humedad y la edad de la planta, disminuyen las concentraciones de Cumestrol; mientras que la cantidad de fertilizante o la temperatura, la aumentan. Se conoce que el Cumestrol en la alfalfa es alrededor de 30 veces más efectivo que la Genisteína en los ratones y que causa problemas relacionados con los estrógenos(endógenos) en los animales; además, parece tener un efecto acumulativo (García, 2012).

El criterio apropiado para determinar el momento oportuno del uso de la planta, es la madurez fisiológica de la alfalfa. Este estado se asocia a la aparición de flores o rebrotes de corona. La floración tiene también sus limitaciones ya que sólo sirve como indicador en determinadas épocas del año y se produce después de no menos de 25 a 30 días de crecimiento activo. Altas temperaturas disminuyen el número de días requeridos para alcanzar la floración por lo que durante la estación de crecimiento los intervalos entre cortes resultan muy irregulares. Períodos de sequía en primavera y verano provocan también una floración prematura ya que la planta tiende a completar su ciclo floreciendo como respuesta a una situación adversa, sin haber alcanzado el pleno desarrollo. Los rebrotes de corona también han sido propuestos como indicadores de madurez fisiológica, sin embargo, se concluye que varios factores pueden causar la aparición de rebrotes de corona: como un alto contenido de carbohidratos en las raíces, lluvia posterior a un prolongado período de sequía o cuando la corona recibe una cantidad de luz adicional. En general, la aparición de rebrotes en la corona es un buen indicador. Una combinación de estos indicadores aparece como la decisión más apropiada para el corte de la planta (Comerón, 1995).

## *Pseudopeziza medicaginis*

En Ecuador entre los principales hongos que afectan al follaje se encuentra *Pseudopeziza medicaginis*, este tiene gran importancia porque causa bajas tanto en el rendimiento como en la calidad del forraje, el panorama con relación a este hongo es frecuente en la alfalfa sin embargo de presentarse relativamente sana en primavera y abundante en invierno por las condiciones de humeada (Galdames, 1993)

Morfología y biología: *Pseudopeziza medicaginis* es un hongo que infecta a las plantas. Pequeño, circular, de color marrón oscuro con manchas negras, de 3 mm de diámetro, se desarrolla en las hojas, tallos, o en el desarrollo de las vainas. El hongo es filiformes, incoloro, ampliado en los extremos, de 75 micras de largo. Las ascosporas son ovaladas o elípticas, rectas o ligeramente curvadas y sin color. Grandes cantidades de esporas son liberadas en el aire durante los cambios climáticos, siendo llevado por el flujo del viento y las salpicaduras de lluvia para otras plantas. Por lo tanto, la enfermedad puede propagarse rápidamente a través de un campo.



Fuente: Agricultural Ecological, 2009

**Figura 1:** *Pseudopeziza medicaginis*

Distribución: La enfermedad es común entre las áreas de cultivo de alfalfa en diferentes países de Europa, Asia, África, América y Australia.

Ecología: Se observa la intensidad máxima de la enfermedad durante el tiempo cálido y húmedo. Las ascosporas comienzan a germinar a temperaturas 7-14 °C y la humedad relativa del aire 97 a 100%. La temperatura óptima para la germinación de esporas es 20 °C. Las lluvias, el rocío y las corrientes de aire ascendente promueven la formación de esporas y que la enfermedad se propague.

Importancia económica: Aunque las plantas no son destruidas por la enfermedad, la defoliación provoca la pérdida de vigor y reduce el rendimiento del heno y su calidad. La enfermedad puede causar la abscisión de 35% de hojas que se traduce en disminución de peso heno por 15%. Además de esto, la calidad nutritiva del heno disminuye (Agricultural Ecological, 2009).

Investigaciones en Australia demuestran que la presencia del hongo aumenta la cantidad de fitoestrogenos en la planta como un medio de defensa, y esto a su vez causa daños en la reproducción de los animales (Romero, 1997), produciendo considerables pérdidas económicas para los ganaderos.

### **2.2.2 Variable dependiente**

#### ***Calidad de semen***

El semen puede ser definido como la suspensión celular líquida que contiene los espermatozoides y las secreciones de los órganos accesorios del aparato reproductor masculino (glándulas accesorias, epidídimo, testículo y conductos deferentes). El plasma seminal constituye la porción fluida de esa suspensión, que es liberada en la eyaculación. Los espermatozoides son provenientes de los túbulos seminíferos localizados en el interior de los testículos los cuales contienen una serie de

complejas células germinativas en desarrollo, que dan origen a los gametos masculinos a través de la espermatogénesis (Hafez, 2002).

Los espermatozoides son células especializadas para la fecundación, se forman en los túbulos seminíferos de los testículos a través de una serie de células germinales en desarrollo. Estas células son de forma alargada formadas por cabeza y cola, recubierto por la membrana plasmática además presenta una estructura de doble pared situada entre la membrana plasmática y la porción anterior de la cabeza del espermatozoide conocido como acrosoma. La cola del espermatozoide, en forma de flagelo, le permite desplazarse en los líquidos, consta de tres regiones: pieza proximal, pieza principal o intermedia y pieza terminal. (Hafez, 2002).

Características:

- Volumen del eyaculado: El volumen normal de eyaculado por carnero adulto es de 0,5 a 2ml y en carneros jóvenes de 0,5 a 0,7ml, es decir que por lo general se encuentra entre 0,8 a 1,2ml (Hafez, 2002).
- Concentración: por lo general se encuentra entre  $4,5$  a  $6 \times 10^9$  espermatozoides/ml, con una media de  $5 \times 10^9$  espermatozoides/ml (Valdez, 2013).
- Motilidad espermática: se evalúa el porcentaje de espermatozoides en movimiento que debe estar en un rango de 70 a 90% y el tipo de movimiento que puede ser hiperactivo, circular y oscilatorio, es importante la motilidad masal e individual (Cuento M., 2010).
- Mortalidad: no debe sobrepasar el 20 a 25%, tomando más de este rango como semen no apto para la reproducción (Valdez, 2013).

- **Morfología espermática:** se observan las anormalidades como: sin cola, cola anudada, cola malformada, cabezas anormales, doble cabeza, sin cabeza, entre otras; es importante recalcar que con un porcentaje de anormalidades de 15 % no se utiliza el semen y si excede el 20 % se debe descartar o corregir los posibles factores para las alteraciones (Hafez, 2002).

### **2.2.3 Unidad de análisis**

#### **Carneros criollos**

El ovino es un mamífero cuadrúpedo, ungulado, rumiante, doméstico, usado como ganado. A la hembra se la llama oveja y al macho carnero. Las crías de la oveja son los corderos y los ejemplares jóvenes son conocidos como moruecos. Para determinar las categorías se tienen en cuenta tres aspectos fundamentales; edad, fundamentación productiva y sexo. Las principales categorías son:

- **Sementales.** Machos adultos destinados a la reproducción y con 18 meses de edad.
- **Reproductoras.** Hembras con más de un año de edad, que tienen al menos un parto.
- **Crías.** Hembras y machos desde el nacimiento hasta el destete (Pérez, 2012).

La pubertad en los carneros se asocia a la producción de testosterona, la espermatogénesis y la conducta propia de apareamiento, sin embargo la cópula con eyaculación de espermatozoides viables ocurre entre los 6 meses de edad (Hafez, 2002).

El ovino criollo es descendiente de las ovejas de las razas Churra y Manchega originarias de España introducidas al país en época de la conquista, sin embargo en la actualidad se considera criollo a los cruces entre diferentes razas que tenga características como: pequeño, magro y produce un vellón muy liviano formado



por una mezcla de pelos largos y gruesos con lanilla corta y fina, algo característico de los ovinos antiguos (ANCO, 2012).

La mayoría de los ovinos en nuestro país se hallan ubicadas en la sierra principalmente en las provincias de Chimborazo, Cotopaxi, Bolívar, Tungurahua, Pichincha. En relación a las comunidades indígenas concentradas en dichas provincias (INEC, 1993).

Entre las principales características raciales de los ovinos criollos tenemos:

- **Cuerpo:**
  - Cara: Limpia llena de pelos de varios colores.
  - Mucosa: Varios colores, pigmentada.
  - Labios: pequeños
  - Ollares: delgados
  - Cuello: corto
  - Orejas: Pequeñas recubiertas de pelos.
  - Cuernos: Presentan de uno a varios pares de cuernos en diferentes direcciones, los machos y en las hembras pueden o no tener cuernos.
  - Pezuñas: Variadas y pigmentadas.
  - Patas y manos: sin lana
  - Piel: Gruesa y ligeramente rosada.
  
- **Vellón:**
  - Largo de la mecha: 12.8 cm
  - Peso del vellón sucio: 1.48 Kg
  - Rendimiento: 42 - 44 %
  
- **Lana:** Son de lana gruesa mezclada con pelo, de varios colores desde el negro al blanco. El aspecto del animal con su lana completa debe dar la apariencia

de que esta emponchado, cayendo su vellón con estas características por los costados y hacia el trasero.

- Aspecto general: Son de tamaño pequeño, de temperamento activo y de pie seguro.
- Crianza: Son saludables, longevos, de mala conformación, buenas madres, son animales rústicos tanto al manejo como a las enfermedades, adaptados a las diversas condiciones climáticas del país (ANCO, 2012).

#### CUADRO 1: REQUERIMIENTOS DIARIOS DE NUTRIENTES EN OVINOS

<b>Etapas</b>	<b>Peso vivo Kg.</b>	<b>Consumo materia seca Kg/día</b>	<b>Peso vivo Consumo MS %</b>	<b>Proteína Cruda G/día</b>
Mantenimiento	60	1.1	1.8	130
Semental	80	2.8	3.5	268

*Fuente: nutrients requirements of sheep. NRC.1997*

#### CUADRO 2: REQUERIMIENTOS DIARIOS DE ENERGÍA EN OVINOS

<b>Peso del animal Kg</b>	<b>Energía Metabolizable Kcal</b>
45	2535

*Fuente: nutrients requirements of sheep. NRC.1997*

## CAPITULO III

### HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

#### 3.1 HIPÓTESIS

El consumo de alfalfa contaminada con 10%, 40% y 70% con *Pseudopeziza medicaginis* afecta a la calidad del semen de carneros criollos

#### 3.2 OBJETIVOS

##### 3.2.1 Objetivo general

Evaluar el efecto del consumo de alfalfa contaminada con *Pseudopeziza medicaginis* sobre la calidad del semen en carneros criollos.

##### 3.2.2 Objetivos específicos:

Evaluar la severidad del efecto que produce la inclusión de alfalfa contaminada con el 10, 40 y 70% de *Pseudopeziza medicaginis* utilizada para la alimentación de carneros criollos, sobre la calidad de semen.

Determinar el volumen y densidad del líquido seminal de carneros criollos alimentados con alfalfa contaminada con *Pseudopeziza medicaginis*

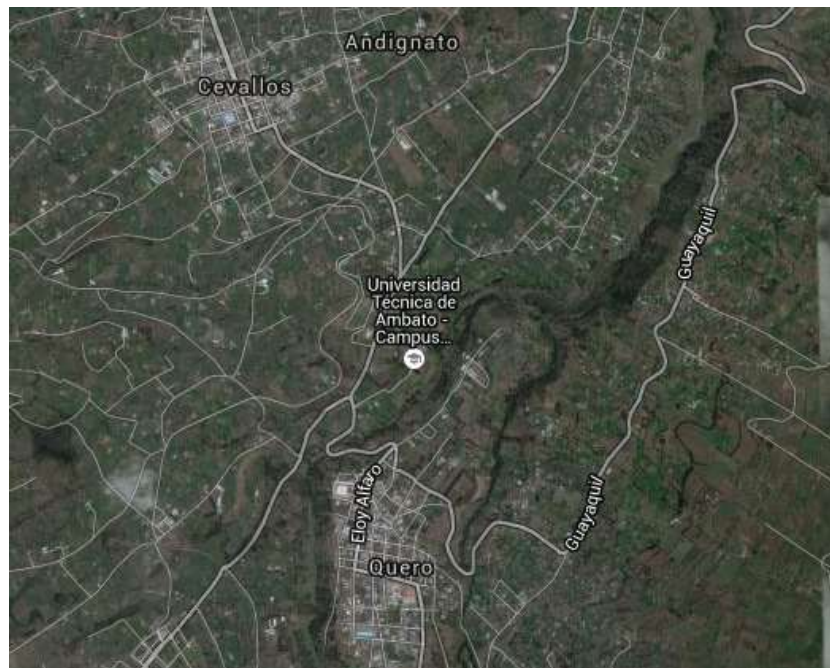
Valorar morfología, movilidad y mortalidad de los espermatozoides de carneros criollos alimentados con la dieta experimental.

## CAPÍTULO IV

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 4.1 UBICACIÓN DEL EXPERIMENTO

El ensayo se llevó a cabo en los predios de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato, sector Querochaca, ubicada en el cantón Cevallos de la provincia de Tungurahua, con una latitud de  $1^{\circ} 22'08''$ , longitud  $78^{\circ} 36'22''$  y una altitud de 2890 msnm.



*Fuente: Google, 2016 datos de mapas*

**Figura 2:** Mapa de la ubicación del ensayo

#### 4.2 CARACTERIZACIÓN DEL LUGAR

Clima: Según el Registro de Observaciones Meteorológicas de la Estación Querochaca 2015, el sector tiene las siguientes características: temperatura media de  $13.4^{\circ}\text{C}$ , precipitación de 699.2 mm/año, humedad relativa del 77%, evaporación de

1095.7 mm/año, heliofanía de 129.3 horas/mes, velocidad del viento de 18.1 Km/h y nubosidad de 7 octas.

Agua: Junta de Agua de Riego 2010, la propiedad cuenta con el agua del canal Ambato – Huachi – Pelileo que tiene un pH de 7.4, temperatura 14 °C, y el caudal de 9.0 l/ sg, la frecuencia de turno son los días martes de cada semana y el tiempo de turno es de ocho horas. El agua es conducida a un reservorio, para ser distribuida en la propiedad mediante el método de riego a goteo en caso de los cultivos.

El Centro Panamericano de Estudios e Investigaciones Geográficos (1997), en su publicación manifiesta que el cantón Cevallos se ubica en el bosque seco Montano Bajo. Se caracteriza por ser un valle estrecho, y corresponde a una zona sub-húmeda (transición a húmedo).

### **4.3 EQUIPOS Y MATERIALES**

#### **Equipos**

- Aretadora
- Microscopio
- Porta objetos
- Cubre objetos
- Autoclave
- Cámara de flujo laminar BIOBASE
- Incubadora red line – by BINDER
- Bomba de fumigar de 25 litros
- Moledora a gasolina
- Olla arrocera

## **Materiales**

- Fundas ziproc
- Cajas petri
- Aretes con respectivos datos
- Mechero
- Agua destilada
- Cuadrado de barrilla 1x1m
- Alfalfa con tres porcentajes de severidad de *Pseudopeziza medicaginis*
- Kikuyo
- Ray grass
- Maiz
- Polvillo
- Afrecho
- Melaza
- Carbonato de calcio
- Fosfato dicalcico
- Corrales
- Comederos
- Bebederos
- 18 Carneros
- 2 Ovejas
- Recolectores de semen (microtubus de centrifucación)
- Vagina artificial
- Balanzas de 5lb, 11lb y 100Kg
- Extensión eléctrica
- Mesa plástica
- Termómetro de agua
- Termómetro común

## Reactivos

- Agar papa dextrosa
- Hormona GnRh
- Hormona progesterona
- Tinción eosina-nigrosina

## 4.4 FACTORES EN ESTUDIO

Se utilizó alfalfa con 10, 40 y 70% de contaminación con *Pseudopeziza medicaginis*, dentro de una dieta establecida (Cuadro N° 3), con los requerimientos nutricionales de proteína 131g/kg MS<sup>-1</sup>, energía 2400Kcal /kg MS<sup>-1</sup>, calcio 2g/kg MS<sup>-1</sup> y fósforo 1,2g/kg MS<sup>-1</sup> (Nutrients requirements of sheep, 1997)

**CUADRO N° 3: DIETA EXPERIMENTAL UTILIZADA EN EL TRABAJO DE CAMPO CON LOS REQUERIMIENTOS PARA MANTENIMIENTO.**

<b>Materia prima</b>	<b>Cantidad (kg)</b>	<b>Proteína Cruda (g/kg MS<sup>-1</sup>)</b>	<b>Energía M (Kcal /kg MS<sup>-1</sup>)</b>	<b>Calcio (g/kg MS<sup>-1</sup>)</b>	<b>Fosforo (g/kg MS<sup>-1</sup>)</b>
Alfalfa	44	80	893,9	0,65	0,28
Kikuyo	9	4,6	162,2	0,0126	0,040
Raygrass	4	2,2	76,2	0,016	0,0064
Maíz	31	24,8	1009,7	0,13	0,62
Polvillo	5	6	136,4	0,003	0,009
Afrecho de trigo	4	4,8	131,1	0,008	0,026
Melaza	1	0,3	29,75	0,11	0,011
Carbonato de calcio	1	0	0	0,38	0
Fosfato dicalcico	1	0	0	0	0,18
<b>TOTAL</b>	<b>100</b>	<b>131</b>	<b>2439,2</b>	<b>2</b>	<b>1,2</b>

**Fuente:** Novillo, 2016

## 4.5 TRATAMIENTOS

Los tratamientos fueron constituidos por la dieta del Cuadro N° 3, con la diferencia en el porcentaje de contaminación de *Pseudopeziza medicaginis* en la alfalfa (CuadroN°4).

### CUADRO N° 4: TRATAMIENTOS UTILIZADOS EN EL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

TRATAMIENTOS	
<b>T1</b>	Alfafa con 10% de <i>Pseudopeziza medicaginis</i>
<b>T2</b>	Alfafa con 40% de <i>Pseudopeziza medicaginis</i>
<b>T3</b>	Alfafa con 70% de <i>Pseudopeziza medicaginis</i>

**Fuente:** Novillo, 2016

## 4.6 DISEÑO EXPERIMENTAL

Se utilizó un diseño de bloques completamente al azar (efecto de bloque, edad de los animales), el esquema del diseño experimental se muestra en el Cuadro N°5. El modelo lineal fue  $Y_{IJ} = \mu + t_i + \beta_j + \varepsilon_{ij}$  en donde  $Y_{ij}$  es la observación en la unidad experimental,  $\mu$  parámetro, efecto medio,  $t_i$  parámetro, efecto del tratamiento,  $\beta_j$  parámetro, efecto del bloque  $j$ ,  $\varepsilon_{ij}$  valor aleatorio, error experimental de la u.e.i.j. Se realizó primero un ADEVA, las diferencias entre medias se sometieron a un análisis estadístico de Tukey al 5%, mediante el programa estadístico infostat. Para evaluar los posibles tendencias líneas o cuadrática en cada una de las variables y debido a los tratamientos, se realizó un análisis de contrastes ortogonales



**CUADRO N°5: ESQUEMA DEL DISEÑO EXPERIMENTAL REALIZADO**

<b>CÓDIGO</b>	<b>TRATAMIENTOS</b>	<b>UNI. EXP.</b>	<b>REPE.</b>	<b>TOTAL</b>
<b>T1</b>	Alfafa + 10% de <i>Pseudopeziza medicaginis</i>	1	6	6
<b>T2</b>	Alfafa + 40% de <i>Pseudopeziza medicaginis</i>	1	6	6
<b>T3</b>	Alfafa + 70% de <i>Pseudopeziza medicaginis</i>	1	6	6
			<b>Total</b>	<b>18</b>

*T1,2,3: Tratamientos, UNI.EXP.: Unidad experimental, REPE.: Repeticiones*

#### **4.7 VARIABLE RESPUESTA**

La primera fase del trabajo de campo fue un análisis en la zona para identificar el género del hongo que afecta a la alfalfa, para ello se realizó un análisis en el laboratorio de Sanidad Vegetal de la Facultad de Ciencias Agropecuarias; se recolectaron hojas de alfalfa con presencia de manchas negras, las mismas permanecieron en cajas Petri con papel absorbente húmedo durante 7 días, tras transcurrir este tiempo, con la ayuda de una cinta adhesiva se tomó una pequeña muestra y se colocó en un porta objetos, con el uso del microscopio a aumento 10X se pudo identificar que efectivamente fue *Pseudopeziza medicaginis*, por sus estructuras filiformes. Una vez identificado se cultivó el hongo en Agar papa dextrosa, para lo cual se dejó en la incubadora (red Line –by BINDER) a 26° C, por 15 días.

Los cantones del Ecuador están agrupados y divididos por distritos para su coordinación estratégica del sector público; Quero, Cevallos, Tisaleo y Mocha corresponden al distrito 7 y es ahí donde se realizó en análisis de campo de la severidad del hongo en la alfalfa, para ello se aplicó el Método propuesto por Harsfall y Barrat 1987, el mismo que se ha venido utilizando por los investigadores en el transcurso del tiempo, consta de un cuadrado de 1x1m, que es lanzado en forma aleatoria en parcelas con cultivos a estudiar. Para este proyecto de investigación se utilizó un cuadrado de barrilla que fue lanzado

con dirección zic zac en diferentes parcelas de 10x20m sembradas con alfalfa con 10% de floración, obteniendo como resultados porcentajes de incidencia que variaron entre 10 y 70%. Basados en estos resultados, se determinó los niveles de contaminación a utilizar en las dietas experimentales, los mismos que fueron de 10, 40 y 70% de severidad de *Pseudopeziza medicaginis*.

Para evitar las variaciones en las dietas se realizó una contaminación controlada en las diferentes parcelas de alfalfa con el hongo cultivado en el Laboratorio de Sanidad Vegetal en Agar papa dextrosa. Se realizó un raspado de las cajas Petri donde se encontraba *Pseudopeziza medicaginis* con la ayuda de una aguja y se colocó en tres botellas con 250ml de agua destilada, las mismas que permanecieron en la incubadora durante tres días, tras este periodo con la ayuda de una bomba de fumigar se aspergió en las parcelas, 5 días después se realizó el corte de la alfalfa y se colocó en mallas expuesto al sol para su secado.

La segunda fase del trabajo de campo comenzó con la adquisición de 18 carneros criollos, para lo cual se determinó que se encuentren entre edades de 1,5 a 3 años basados en su cronometría dentaria y con un peso vivo en promedio de 35 kg, además dos hembras que tuvieron características similares. Luego de llegar a los corrales en los predios de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato se les identificó mediante la colocación de aretes, además se les trasquiló, fueron desparasitados y recibieron vitaminas.

Se inició con un periodo de adaptación, en donde los animales se alojaron en corrales individuales y recibían una alimentación basado en forraje verde y agua, además se realizó la manipulación de los testículos y el pene con la finalidad que se acostumbren al proceso de extracción del semen (Flores, 2003), por otro lado 15 días después, se estimuló el libido sexual de los carneros con la presencia de una hembra a la cual se le

sincronizó utilizando el protocolo OVSYCH, con GnRh y prostaglandina (Día 0 GnRh, día 7 prostaglandina y día 9 GnRh, con dosis de 1ml/SC), con la finalidad que se encuentre en celo los días de recolección de semen para ayudar a la estimulación de los machos (Godoy, 2011), durante el salto se les desvió el pene simulado la extracción seminal, este proceso se realizó con los 18 animales por 15 días, también durante este periodo se les cambio progresivamente el forraje verde por balanceado en polvo con la finalidad que se acostumbren a la presentación de la dieta experimental.

Transcurrido el tiempo de adaptación se comenzó con la administración de los tratamientos experimentales, con la administración del alimento *ad libitum* durante 15 días, luego se regulariza la administración del alimento en dos raciones diarias de 500g en la mañana y 600g en la tarde con agua a voluntad, las muestras del semen fueron extraídas semanalmente.

Para la extracción seminal en carneros se utiliza principalmente dos métodos el del electro eyaculador y el de la vagina artificial, para este proyecto se utilizó vaginas artificiales que fueron realizadas con un tubo PVC de 10, 12, 15cm de largo por 5,5cm de diámetro, con una válvula para la colocación de aire y agua, en su interior forrados con una manga de goma (tubo de bicicleta), con sus extremos doblados sobre el tubo y fijadas con elásticos. Por la válvula se llenó con agua hasta tres cuartos de la capacidad del tubo, y una temperatura de 40°C, se inyectó aire para generar presión extendiendo la goma hacia el centro del tubo de manera que disminuya la luz de este, emulando una vagina. En uno de los extremos se colocó la copa que tenía un microtubo de centrifugación graduado. Para la recolección del semen se identificó por animal el tamaño de vagina a cual se adaptó para el depósito el líquido seminal.

Una vez obtenido el semen, se mantuvo a 37°C en baño María, sin permitir que tenga contacto directo con la luz, en el Cuadro N° 5 se muestra la metodología que se utilizó para valorar la muestra, este proceso se realizó en el Laboratorio de Química de la Facultad de Ciencias Agropecuarias.

**CUADRO 6: MÉTODOS UTILIZADOS PARA LA VALORACIÓN DEL LÍQUIDO SEMINAL RECOLECTADO EN EL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN.**

<b>Muestra</b>	<b>Método</b>
<b>Volumen</b>	Se mide directamente del recolector en ml
<b>Concentración</b>	Se realiza con la muestra diluida a 1:100 en la cámara de Neubauer (Valdez, 2013)
<b>Movilidad</b>	Habiendo homogeneizado el eyaculado por agitación del tubo de recolección (micro-túbulos de centrifugación), se retiró una gota de semen con una pipeta a 37°C y se coloca sobre portaobjetos templado bajo observación microscópica con 40 y 100 aumentos. Se podrá tener una idea de la calidad seminal por la velocidad con que se hacen y deshacen las ondas (motilidad masal). La motilidad se estima por el vigor del movimiento de las ondas en una escala subjetiva entre 0 y 5 (0, mínimo; 5, máximo) (Cuento M., 2010).
<b>Mortalidad</b>	Luego de realizar una dilución 1:100 del semen en solución salina a 37°C, se retira una gota y se coloca en porta objetos templados y se observa con 100 aumentos, donde se contabiliza 200 espermatozoides y de esos el número de espermatozoides muertos, del se saca un porcentaje (Cruz, 2006).
<b>Morfología</b>	Se observó las anormalidades de la cabeza (cabeza grande, cabeza pequeña, sin cabeza, doble cabeza) y de la cola (sin cola, cola pequeña, cola torcida, doble cola, cola enroscada, cola doblada); se tomó el porcentaje de estas, luego de que el semen fue teñido con eosina – nigrosina (Hafez, 2002).

**Fuente:** *Novillo, 2016*

#### **4.8 PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN**

Se realizó mediante el programa INFOSTAT, versión 2015.

## CAPÍTULO V

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El volumen y la mortalidad no mostraron diferencia ( $P=0,4856$  y  $P=0,5952$  respectivamente) entre tratamientos. La concentración espermática ( $P=0,0117$ ) mostró diferencia, con una mayor concentración el T1 ( $4,63 \text{ Sp} \times 10^9$ ) con respecto al T2 y T3. Con respecto a la morfología espermática mostró diferencia ( $P=0,0016$ ) entre tratamientos encontrado menores porcentajes de alteraciones morfológicas en los animales que fueron alimentados con alfalfa contaminada con 10% de *Pseudopeziza medicaginis* (T1). En cuanto a la movilidad masal se observó diferencias ( $P=0,0001$ ) entre los tratamientos, siendo la mayor movilidad en el T1 (4,43). La mayor ( $P=0,0007$ ) movilidad individual se observa para el T1 y T2 frente a T3 (Tabla 1).

**CUADRO 7.** EFECTO DEL CONSUMO DE ALFALFA CONTAMINADA CON *PSEUDOPEZIZA MEDICAGINIS* SOBRE LA CALIDAD DE SEMEN ENTRE LOS TRATAMIENTOS

	T1	T2	T3	TENDENCIA	ESM
	L				
<b>Volumen (ml)</b>	0,71 <sup>a</sup>	0,78 <sup>a</sup>	0,66 <sup>a</sup>		0,04
<b>Mortalidad (%)</b>	15,90 <sup>a</sup>	17,43 <sup>a</sup>	15,93 <sup>a</sup>		0,52
<b>Concentración</b> (Sp x 10 <sup>9</sup> /ml.)	4,63 <sup>a</sup>	4,25 <sup>b</sup>	4,13 <sup>b</sup>	*	0,07
<b>Morfología(%)</b>	18,90 <sup>a</sup>	22,40 <sup>a</sup>	35,23 <sup>b</sup>	**	2,14
<b>Movilidad masal*</b>	4,43 <sup>a</sup>	4,03 <sup>b</sup>	3,47 <sup>c</sup>	***	0,11
<b>Mavilidad individual</b> (%)	78,83 <sup>a</sup>	75,67 <sup>a</sup>	69,87 <sup>b</sup>	***	0,52

*ESM: Errorestandar de la media. abc: Medias con letras distintas entre columnas difieren significativamente ( $P<0,05$ ). T<sub>1,2,3</sub>: tratamientos con 10,40 Y 70% de contaminación de Pseudopeziza medicaginis. TENDENCIA L: Tendencia lineal. Sp: número de espermatozoides. Motilidad masal\*: motilidad masal medida en una escala de 1 a 5*

El no mostrar diferencias estadísticas en el volumen espermático y la mortalidad, se dio debido posiblemente a que la dieta experimental no alteró al correcto funcionamiento de las vesículas seminales y los conductos eyaculadores (Karrol, 2016), estos datos son consistentes con los mencionado por Henao G. et al, (2004) quienes mencionan que la dieta no necesariamente altera el volumen espermático. Los valores encontrados en mortalidad estuvieron dentro del rango normal para esta especie ( $\leq 25\%$ ) (Salomón, 1990), el mantener un rango normal se dio posiblemente al buen manejo del semen pos extracción. Caravaca, et al, (2005), mencionan que la mortalidad de los espermatozoides está relaciona principalmente con factores externos como temperatura o exposición a la luz.

El efecto producido por la alfalfa contaminada con 40 y 70% de *Pseudopeziza medicaginis* causaron alteraciones perjudiciales en la espermiogénesis, especialmente alterando la concentración espermática, morfología de los espermatozoides y su movilidad. Comportamiento similar a lo reportado por Romero et al., 1997 quien menciona que el contenido de coumestrol de la alfalfa contaminada con *Pseudopeziza medicaginis* produce alteraciones reproductivas en hembras bovinas, es por ello, que estos resultados pueden estar asociados a este fenómeno. Las alteraciones morfológicas se encontró terazospermia; (cola enrollada y sin cola), a lo que se le atribuye el efecto que tiene los estrógenos sobre la hormona Luetinizante, afectando especialmente a la amplitud de los picos tónicos de LH (Uribe – Velásquez, 2010), hormona que es la encargada de la espermiogenesis, proceso en el cual las espermátides se convierten en espermatozoides, reduciendo para ello el citoplasma, el núcleo se alarga y queda en la cabeza del espermatozoide, las mitocondrias se colocan en el cuello y los centriolos originan un flagelo o cola (Welsch, 2006).

El flagelo está conformado por las mismas moléculas estructurales responsables del correcto reparto de cromosomas en la mitosis y meiosis, con lo que un flagelo irregular reflejará problemas en el reparto de cromosomas (Hafez, 2002), por ello, no podrá

competir con el bateo de un espermatozoide normoformo. Los cambios en la movilidad masal e individual se dio posiblemente al daño estructural que presenta el espermatozoide especialmente en la cola, la misma que es el órgano locomotor de los espermatozoides, siendo el responsable de la propulsión de los mismos en los líquidos seminales (Salomón, 1990). Estos datos son consistes con lo reportado por Flores et al, 2001 quienes mencionaron que la movilidad se ve afectada por los cambios morfológicos que puedan tener los espermatozoides.

El cumestrol clásicamente se ha clasificado como fitoestrógenos ya que estas sustancias se unen al receptor de estrógeno (ER), dejando a un lado a los estrógenos propios que son útiles en la reproducción (Barry et al, 1995). La presencia de los ER $\alpha$  y ER $\beta$  en las neuronas secretoras de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) abre la posibilidad de que los fitoestrógenos especialmente el coumestrol actúe directamente sobre ellas, afectando la secreción de la misma. Por otra parte, los fitoestrógenos también alteran la expresión de otros receptores celulares importantes en la reproducción como los de la oxitocina, la testosterona, y prolactina. (McGarvey et al., 2001). Los ER $\beta$  se expresan en diferentes tejidos del aparato reproductivo del macho como en testículos, conductos eferentes, epidídimos, conductos deferentes y próstata. Así mismo, se ha demostrado su presencia en las células de Sertoli, las espermatogonias y los espermatozoides (Morito et al., 2002). Como se puede observar, los fitoestrógenos actúan sobre gran diversidad de tejidos alterando múltiples funciones fisiológicas, tanto en machos como en hembras. Sin embargo, el mecanismo de acción aún no está completamente entendido y hacen falta mayores investigaciones sobre los receptores y las rutas intracelulares desencadenadas (Denis et al., 2010).



## CAPÍTULO VI

### CONCLUSIONES, BIBLIOGRAFÍA Y ANEXOS

#### 6.1 CONCLUSIONES

La ingesta de alfalfa con 70% de contaminación con *Pseudopeziza medicaginis* tiene efectos nocivos sobre la morfología de los espermatozoides especialmente alteraciones en la cola y como consecuencia baja en la movilidad espermática tanto individual como masal, lo que podrían llegar a ser estos resultados perjudiciales sobre índices reproductivos.

#### 6.2 BIBLIOGRAFÍA

Adams et al.,1995. Efectos de los fitoestrógenos en la fisiología de la reproducción animal. Tropical and Subtropical Agroecosystems. 15, 129-145

Adams et al., 1990. Permanent infertility in ewes exposed to plant oestrogens. Australian Veterinary Journal . 67, 197-201

Agricultural Ecological, 2009. *Pseudopeziza medicaginis*.  
<http://www.farmstart.ca/about-us/pseudopeziza/ecological-agriculture/>

Agrios G., 1997. Fitopatología. Hongos foliares. Segunda edición. México ISBN 968-18-5184-6.

Alarcón F., 2012. Cultivo de alfalfa. Revista UTA

ANCO, 2012. Características de los ovinos criollos del Ecuador.  
[www.ancoecuadroe.org.ec](http://www.ancoecuadroe.org.ec)

Antanassova et al., 2000. Comparative effects of neonatal exposure of male rats to potent and weak estrogens on spermatogenesis at puberty and the relationship to adult testis: evidence for stimulatory effects of low estrogen levels. *Endocrinology* 141, 3898-3907.

Barry M., Charly E., et al, 1995. Effects of coumestrol on estrogen receptor function and uterine growth in ovariectomized rats. *Environ Health Perspect. Research Article.* 574–581.

Buendia, 2000. Cultivo de *Medicago sativa*. 2000

[http://www.unavarra.es/herbario/pratenses/htm/Medi\\_sati\\_p.htm](http://www.unavarra.es/herbario/pratenses/htm/Medi_sati_p.htm)

Caravaca F., Castel G., Delgado M., et al, 2005. Bases de la producción animal. Ed 1. Sevilla – España. ISBN 84-472-0764-1.

Centro Panamericano de Estudios e Investigación Geográfica, 1997. Atlas de los cantones y provincias de Tungurahua. Quito. 198p.

Cruz, 2006. Fisiología animal. Anatomía y fisiología de la eyaculación. Intervet (Capítulo 80)

Comerón E., 1995. Manejo y producción de la alfalfa. *Revista de Producción animal Argentina.* Ed 15

Cuento M., 2010. Manual de recolección y procesamiento de semen de ovinos. Motilidad de espermatozoides. 6 – 7

Dammer J., 2013. *Medicago sativa*. EduEcu 45.

Denis Yohan, María Gutiérrez, Ariel Torazona, 2010. Efectos de fitoestrógenos en la reproducción animal. Revista de la Facultad Agropecuaria de Medellin. 63, 5555-5565.

Finch, 1985. Atlas Hongos comunes que atacan en América Latina. Hongos foliares y de tallos.

Flores Virginio, Vásquez R. , Orihuela Agustín, 2003. Entrenamiento de carneros para recolección de semen mediante vagina artificial, utilizando como estímulo objetos inanimados. Veterinaria México. 36, 105-111

García E., López O., 2012. Los fitoestrógenos: ¿mito o amenaza para la alimentación animal en el trópico?. Veterinaria México. 52, 32-48

Galdames H, 1993. Enfermedades del cultivo de alfalfa. Pseudopeziza medicaginis. Ecuador.

Godoy Miguel et al., 2011. Protocolo de inseminación con semen fresco. Informativo INIA URARI. 45

Google maps, 2016. Mapa de Ubicación de la Universidad Técnica de Ambato campus Querochaca.

Hafez E., 2002. Reproducción e inseminación artificial en animales. Séptima edición. McGraw-Hill Interamericana. México. ISBN 970-10-3719-7.

Harsfall y Barrat, 1987. Métodos para determinar severidad e incidencia de enfermedades en los cultivos. Agricultura técnica. Mexico.

Henao G., Trujillo E., et al, 2004. Effect of climate on the seminal characteristics of boars in a region of humid tropical forest. Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín vol.57 no.2 Medellín July/Dec. 2004

INEC, 1993. Censo pecuario del Ecuador. Ovinos en el Ecuador. [www.ecuadorencifras.gob.ec](http://www.ecuadorencifras.gob.ec)

Junta Parroquial de Agua de Riego Ambato-Huachi-Pelileo, 2010. Características del agua de Querochaca.

Karrol M, 2016. Infertilidad desde el laboratorio. Buenos Aires Argentina. SYP 396.

McGarvey, C., P.A. Cates., A. Brooks., I.A. Swanson., S.R. Milligan., C.W. Coen and KT. O'Byrne. 2001. Phytoestrogens and gonadotropin-releasing hormone pulse generator activity and pituitary luteinizing hormone release in the rat. Endocrinology 142(3): 1202-1208.

Morito, K., T. Aomori., T. Hirose., J. Kinjo., J. Hasegawa., S. Ogawa., S. Inoue., M. Muramatsu and Y. Masamune. 2002. Interaction of phytoestrogens with estrogen receptors alpha and beta (II). Biological and Pharmaceutical Bulletin 25(1): 48-52

Muños Mendoza et al., 2002. Parámetros reproductivos en vacas Holsteinalimentadas con alfalfa. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 25, 47-62

Pérez José, Mario Pérez, 2006. Fitoestrógenos y el efecto de su consumo sobre diferentes órganos y sistemas de animales domésticos. *Agricultura técnica*. Chile. 63, 325-331

Pérez José, Mario Pérez, 2009. Efecto del coumestrol sobre la producción espermática y la conducta de exploración olfatoria de perros estimulados con moco vaginal estral. *Vetrinaria México*. 40, 9-15

Registro Mensual de Observaciones Meteorológicas - Estación Meteorológica Querochaca, (2010). Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología. Querochaca, Cevallos. 24 p.

Romero Carlos et al., 1997. Síndrome estrogénico en vacas lecheras por consumo de alfalfa con *Pseudopezizamedicaginis*, con grandes cantidades de coumestrol. *Veterinaria México*. 28, 25-30

Salomon S., 2000. Inseminación artificial en ovejas y cabras. Valoración seminal. Zaragoza- España. ISBN 84-200-0675-0

Stwar, 2012. ANCO. <http://www.geocities.ws/ancoec/ovejeria.html>

Uribe - Velasquez L., Velez – Marin M., Correa – Orrozco A., 2010. Concentraciones plasmáticas de las hormonas esteroides y de Lh en

respuesta a la administración de prostaglandinas en ovejas Bergamacia.  
FCV-LUZ/Vol XX, N° 5, 512-518, 2010.

Valdez, 2013. Semen de ovino. <https://prezi.com/7gtj8cjsy83/semen-bovino-ovino>

Vasquez, 2002. Fitoestrógenos en bovinos.  
<http://www.academia.edu/1742068/FITOESTROGENOS-BOVINOS>

Welsch S., 2006. Histología. Espermiogenesis. Primera edición. Madrid – España

### 6.3 ANEXOS



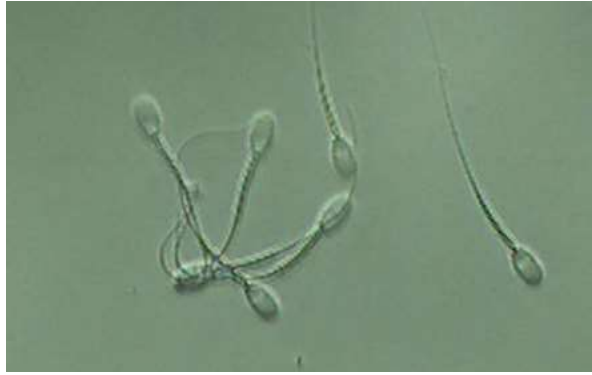
**Figura 3:** Recolección de semen



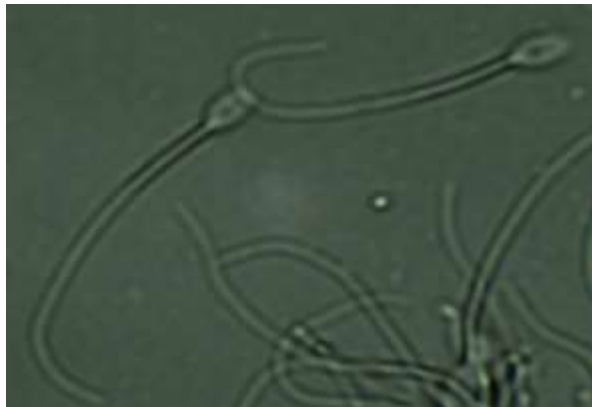
**Figura 4:** Recolección de semen



**Figura 5:** Valoración seminal en el laboratorio



**Figura 6:** Morfología espermática del tratamiento 1

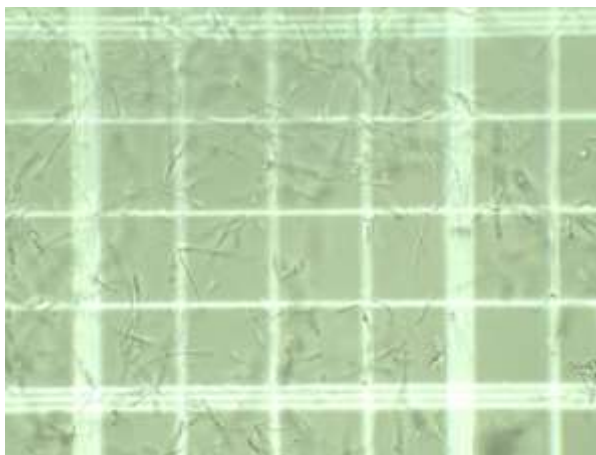


**Figura 7:** Morfología espermática del tratamiento 2

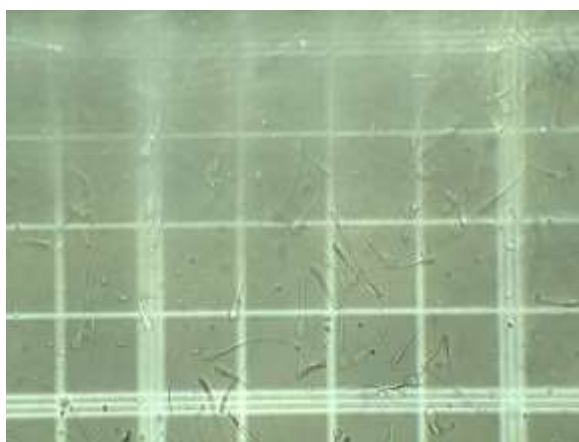


**Figura N 8:** Morfología espermática del tratamiento 3

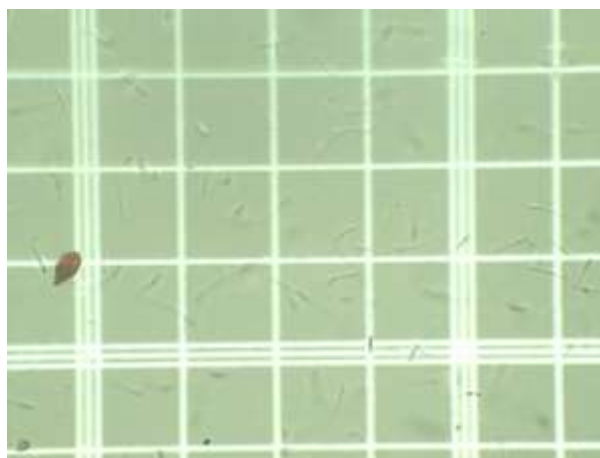




**Figura N 9:** Concentración espermática de tratamiento 1



**Figura N10:** Concentración espermática de tratamiento 2



**Figura N11:** Concentración espermática de tratamiento 3

## CAPÍTULO VII

### PROPUESTA

**Tema:** “Control de *Pseudopeziza medicaginis* en los cultivos de alfalfa para evitar problemas en la calidad del semen”

#### 7.1 ANTECEDENTES DE LA PROPUESTA

En este trabajo de investigación se observó que el consumo de alfalfa contaminada con *Pseudopeziza medicaginis* tiene un efecto nocivo en la calidad seminal especialmente es morfología y por ende en movilidad, siendo alteraciones que conllevan a una baja en los parámetros reproductivos de los carneros criollos; además que otras investigaciones (Romero 1997), nos demuestran problemas reproductivos en hembras.

#### 7.2 JUSTIFICACIÓN

En nuestros cantones Quero y Cevallos, se conoce que los campesinos enfrentan diversos problemas en la reproducción de las diferentes especies animales, sin embargo hay mucho empirismo sobre este tema; con los resultados obtenidos en esta investigación se observa que la alfalfa contaminada con *Pseudopeziza medicaginis* afecta de manera negativa la calidad de semen en carneros criollos, es por ello que se espera dar a conocer a los moradores sobre estos problemas que puede observarse con la alfalfa contaminada con este hongo.

### **7.3 OBJETIVOS**

- Proporcionar métodos para controlar la severidad de *Pseudopeziza medicaginis* en la alfalfa

### **7.4 ANÁLISIS DE FACTIBILIDAD**

En el Ecuador existe alrededor de 3.382.740 hectáreas de sembríos de alfalfa, la mayoría de estas se encuentran en la Provincia de Tungurahua, especialmente en los cantones e Mocha, Tisaleo y Quero, la propuesta es factible aplicar en dichos cantones por las amplias superficies de suelos destinadas a pastizales para la alimentación de los animales, por otro lado los niveles de contaminación de la alfalfa con *Pseudopeziza medicaginis* oscilan entre 10 y 90%, en dependencia al clima, atentando contra la eficiencia reproductiva de los animales.

### **7.5 METODOLOGÍA, MODELO OPERATIVO**

La metodología de esta propuesta está basada en la prevención, el control de la incidencia y severidad de *Pseudopeziza medicaginis*.

Es importante pensar en el control de enfermedades no sólo desde un punto de vista curativo, cuando el daño ya ha sido causado en nuestro cultivo, sino que también desde un punto de vista preventivo, antes de que podamos detectar la presencia del hongo en las plantas. Así es fundamental considerar en las distintas etapas de desarrollo, siembra o trasplante, crecimiento del cultivo, cosecha y post-cosecha, medidas de manejo que permitan reducir las probabilidades de aparición del hongo.

La prevención no debe estar basada únicamente en la aplicación de productos químicos, sino que debe ser un complemento de otras medidas posibles de utilizar.

Esto es lo que se denomina manejo integrado de enfermedades, que considera el empleo de otros métodos de control como:

- Inspecciones reguladoras, que permitan mantener limpios los sembríos, evitando el aumento de maleza alrededor
- Control físico, reducir las posibles fuentes de infección como eliminación de restos de los cortes anteriores y de malezas aledañas, utilización de semilla o plántulas sanas.
- Desde el punto de vista del control cultural debemos evitar condiciones apropiadas para el desarrollo del hongo utilizando densidades de siembra hasta el 75% para que permitan una adecuada aireación (Agrios, 1997).
- Se puede apoyar todas estas labores colocando bio-estimulantes para mejorar la resistencia foliar de la alfalfa contra los hongos Cuadro N°1.

**CUADRO N°1: BIOESTIMULANTES PARA AUMENTAR LA RESISTENCIA FOLIAR**

<b>REPETICIONES</b>	<b>DESCRIPCIÓN</b>
Repetición 1	A los 10 días después del primer corte: 2,5 Litros N-P-K 10-30-10
Repetición 2	A los 10 días después del segundo corte : 2 Litros N-P-K 12-12-6 mas 1 Litro K52
Repetición 3	A los 10 días después del tercer corte : 2 Litros N-P-K 15-15-15 más 1 Litro K52

Fuente: Novillo,2016

Como un método de control se puede recurrir a la aplicación de productos químicos específicos para este hongo como oxiclورو de cobre en polvo (2-4 kg/ha)

## **7.6 ADMINISTRACIÓN**

Universidad Técnica de Ambato, Facultad de Ciencias Agropecuarias

Autora: María Rubí Novillo Rueda

Coordinador: Ing. Gonzalo Aragadvay