



**Instituto Politécnico Nacional**

**Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas  
Maestría en Ciencias en Manejo de Recursos Marinos  
Departamento de desarrollo de Tecnologías**



**Evaluación de tratamientos para inducir la triploidía en la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Percoidae: Serranidae) mediante shock frío.**

**T E S I S**

**Que para obtener el grado de**

**Maestro en Ciencias**

**Con Especialidad en Manejo de Recursos Marinos**

**P r e s e n t a**

**Biol. Mar. Juan Pablo Alcántar Vázquez**



**INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL**  
**COORDINACION GENERAL DE POSGRADO E INVESTIGACION**  
**ACTA DE REVISION DE TESIS**

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., siendo las 12:00 horas del día 25 del mes de Noviembre del 2004 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICIMAR para examinar la tesis de grado titulada:

**"EVALUACIÓN DE TRATAMIENTOS PARA INDUCIR LA TRIPLOIDIA EN LA CABRILLA ARENERA**  
***Paralabrax maculatofasciatus* (PERCOIDEI: SERRANIDAE) MEDIANTE SHOCK FRÍO"**

Presentada por el alumno:

**ALCANTAR**  
Apellido paterno

**VÁZQUEZ**  
materno

**JUAN PABLO**  
nombre(s)

Con registro: 

B	0	2	0	7	4	8
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante al grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

**LA COMISION REVISORA**

Director de tesis  
PRIMER VOCAL

DRA. SILVIE DUMAS

PRESIDENTE

DR. BENJAMIN H. ANGUAS VELEZ

SECRETARIO

DRA. BERTHA PATRICIA CEBALLOS VÁZQUEZ

SEGUNDO VOCAL

MC. SERGIO FRANCISCO MARTINEZ DIAZ

TERCER VOCAL

DR. CÉSAR RUIZ VERDUGO

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO

DR. RAFAEL CERVANTES DUARTE



**I. P. N.**  
**CICIMAR**  
**DIRECCION**



**INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL  
COORDINACION GENERAL DE POSGRADO E INVESTIGACION**

**CARTA CESIÓN DE DERECHOS**

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., el día 13 del mes Diciembre del año 2004, el (la) que suscribe JUAN PABLO ALCANTAR VÁZQUEZ alumno(a) del Programa de MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS con número de registro B020748 adscrito al CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de tesis, bajo la dirección de: DRA. SILVIE DUMAS y cede los derechos del trabajo titulado: "EVALUACIÓN DE TRATAMIENTOS PARA INDUCIR LA TRIPLOIDIA EN LA CABRILLA ARENERA *Paralabrax maculatofasciatus* (PERCOIDEI: SERRANIDAE) MEDIANTE SHOCK FRÍO" al Instituto Politécnico Nacional, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: jupasoul25@hotmail.com

Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

  
.....  
**JUAN PABLO ALCANTAR VÁZQUEZ**

nombre y firma

*Este trabajo esta dedicado a mis padres y mi hermano, una constante fuente de amor y alegría en mi vida*

*Martha Isabel Vázquez Orozco*

*Alfonso Alcántar Ramírez*

*Alfonso Alcántar Vázquez.*

*A mi familia, tan numerosa y sin embargo tan unida*

*Y a mis amigos, los mejores....*

## Agradecimientos

Al centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas (CICIMAR) y al Instituto Politécnico Nacional (IPN) por el apoyo económico ofrecido a través del Programa Institucional de Formación de investigadores (PIFI). De igual forma agradecer al Consejo Nacional de Ciencia y tecnología de México por el apoyo brindado durante los dos años de maestría.

No hubiera sido posible completar este proyecto sin la colaboración de la ayuda brindada por el Laboratorio de Genética y la Técnico Susana Ávila del CIBNOR, así como de la Dra. Ana Maria Ibarra, directora de este laboratorio.

Agradezco de manera particular a la Dra. Silvie Dumas, directora de esta tesis, por todo su apoyo, paciencia y confianza brindados durante la elaboración de este proyecto.

A los amigos del laboratorio UPIMA, M.C. Eleonora Puente Carreón, Biol. Mar. Hugo Skyol Pliego Cortés, M.C. Renato Peña Martínez y a Laura. Por último quisiera agradecer a los ex-compañeros de la universidad por los ratos de diversión; Mauricio (miau), Skyol, Ulises (panda), Tecua y a Heidi por dejarnos jugar fut-bol en su casa.

## INDICE GENERAL

<b>Lista de figuras.....</b>	<b>I</b>
<b>Lista de Tablas.....</b>	<b>II</b>
<b>Glosario.....</b>	<b>III</b>
<b>Resumen.....</b>	<b>VII</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>VIII</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>1</b>
<b>Antecedentes.....</b>	<b>11</b>
<b>Justificación.....</b>	<b>19</b>
<b>Objetivos.....</b>	<b>22</b>
<b>Material y Métodos.....</b>	<b>23</b>
<b>Resultados.....</b>	<b>37</b>
<b>Discusión.....</b>	<b>43</b>
<b>Conclusiones.....</b>	<b>55</b>
<b>Recomendaciones.....</b>	<b>56</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>57</b>
<b>Anexo 1.....</b>	<b>70</b>
<b>Anexo 2.....</b>	<b>72</b>
<b>Anexo 3.....</b>	<b>75</b>

## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b>	Representación de la salida de los cuerpos polares, fertilización y momento de aplicación del shock.....	2
<b>Figura 2.</b>	Vivero con reproductores.....	23
<b>Figura 3.</b>	Unidad piloto de Maricultivo.....	23
<b>Figura 4.</b>	Sistema de mantenimiento de reproductores.....	23
<b>Figura 5.</b>	Canulación de una hembra.....	24
<b>Figura 6.</b>	Inyección intramuscular de LHRH-a.....	24
<b>Figura 7.</b>	Aplicación del shock. a) Recipientes de PVC con fondo de malla, b) Hielera con recipientes de inducción.....	26
<b>Figura 8.</b>	Tipos de incubadores, a) Incubador tipo 1, b) Incubador tipo 2, c) Incubador tipo 3 (flotante), d) Incubador tipo 4 (Puente-Carreón).....	28
<b>Figura 9.</b>	Incubación de huevos de <i>Paralabrax maculatofasciatus</i> .....	32
<b>Figura 10.</b>	Ovocito que presenta el segundo cuerpo polar totalmente fuera.....	38
<b>Figura 11.</b>	Porcentaje de triploidía (promedio $\pm$ error estándar; n = 3) obtenido por duración en los diferentes experimentos. Cuando el tratamiento se aplicó 5 minutos después de la fertilización. 12°C = Exp. 1 y 2, 8°C = Exp. 3, 4 y 5, 4°C = Exp. 6 y 7.....	39
<b>Figura 12.</b>	Porcentaje de sobrevivencia (promedio $\pm$ error estándar; n = 3) obtenido por duración en los diferentes experimentos. Cuando el tratamiento se aplicó 5 minutos después de la fertilización. a) sobrevivencia absoluta, b) sobrevivencia relativa. 12°C = Exp. 1, 8°C = Exp. 2 y 3, 4°C = Exp.4.....	41

## Lista de tablas

- Tabla 1.-** Etapas alcanzadas en los diferentes experimentos realizados empleando el método A de inducción a la triploidía durante el periodo Febrero-Mayo 2003.....37
- Tabla 2.-** Etapas alcanzadas en los diferentes experimentos realizados empleando el método B de inducción a la triploidía durante el periodo Febrero-Mayo 2004.....37
- Tabla 3.-** Observación de la salida del cuerpo polar en los tres experimentos realizados. Porcentaje de ovocitos con el cuerpo polar expulsado (CPE), tiempo en minutos después de la fertilización (TDF).....38
- Tabla 4.-** ANDEVA de tres vías del porcentaje de sobrevivencia en larvas de cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*.....40

## Glosario

**Ácido desoxirribonucleico:** Polímero de naturaleza filamentosa formado por un gran número de unidades, los desoxirribonucleótidos, cada uno de ellos compuesto por una base, un azúcar y un grupo fosfato. Constituye el fundamento molecular de la herencia biológica (Aguado y Cuartero, 2001).

**Aneuploide:** Célula o individuo que contiene un número cromosómico que no es múltiplo exacto del número haploide correspondiente a una determinada especie. Este número se produce durante la segregación cromosómica en individuos híbridos o bien triploides (Zhang y Arai, 1999).

**Célula Diploide:** Célula que tiene el número normal de cromosomas característico del organismo al que pertenece ( $2n$ ) (Fast, 1998).

**Célula Haploide:** Célula de los organismos con reproducción sexual que contiene la mitad del número normal de cromosomas ( $n$ ) (Villem y Dethier, 1976).

**Célula triploide:** Célula que contiene tres juegos de cromosomas, uno proveniente del oocito, uno del segundo cuerpo polar (en peces) y uno producto de la fusión del oocito con un espermatozoide ( $3n$ ) (Fast, 1998; Aguado y Cuartero, 2001).

**Cromosoma:** Material hereditario compuesto por una molécula de ADN lineal asociada con proteínas histonas y no histonas como componentes

químicos mayoritarios. Su función esencial es conservar, transmitir y expresar la información genética que contienen (Sinnot *et al.*, 1977; Klug y Cummings, 1999).

**Fertilización:** Es la combinación de dos células haploides (gametos) para formar una nueva célula diploide (cigoto) (Hoar, 1983).

**Gónada:** Es el órgano animal productor de gametos, en los machos es el testículo, mientras que en las hembras es el ovario (Nagahama, 1983; Grier y Taylor, 1998).

**Hermafroditismo protogínico:** Modalidad del hermafroditismo en el cual las hembras se transforman por reversión sexual en machos funcionales (Sadovy y Shapiro, 1987).

**Hormona gonadotrópica:** Cada una de las hormonas de la hipófisis anterior que controlan los procesos de maduración sexual y la reproducción en el hombre y la mayoría de vertebrados. Son glicoproteínas cuyas dos formas más importantes son la hormona folículo-estimulante y la luteinizante (Nagahama, 1983; Aguado y Cuartero, 2001).

**Huso mitótico:** Disposición de las fibrillas en forma de huso durante la mitosis o la meiosis celulares, con los cromosomas situados en la región ecuatorial y, en las células animales y las de algunos vegetales inferiores, con un centríolo en cada uno de los polos. Ello origina la separación de los cromatidios y el movimiento de los cromosomas resultantes hacia polos opuestos (Vilée y Dethier, 1976; Aguado y Cuartero, 2001).

**Meiosis:** Sucesión de dos divisiones celulares con una sola reproducción cromatídica, lo que da origen a cuatro células, gametos o esporas, con el número de cromosomas reducido a la mitad. En la primera de las dos divisiones tiene lugar la recombinación de la información genética llevada a cabo por los cromosomas homólogos (Villemey y Dethier, 1976; Aguado y Cuartero, 2001).

**Mitosis:** División nuclear en la que cada célula hija recibe el mismo número de cromosomas. En esta división se hacen patentes los cromosomas, ya constituidos por dos cromatidios, que se insertan en el huso acromático y emigran cada uno a un polo, con lo que resultan dos núcleos hijos con el mismo número de cromosomas que el núcleo parental. El proceso suele ir acompañado de la división de la célula o citocinesis (Villemey y Dethier, 1976; Aguado y Cuartero, 2001).

**Mosaico:** Individuo que presenta dos o más líneas celulares provenientes del mismo cigoto, las cuales presentan una constitución cromosómica diferente entre sí (Lou y Purdom, 1984).

**Ovocito:** Célula germinal, constituida por ooplasma rodeado por el oolema, la zona radiata, el folículo y tejido somático (Tyler y Sumpter, 1996).

**Poliploide:** Célula o individuo que contiene tres o más juegos cromosómicos (Benfey y Donaldson, 1988).

**Sinapsis:** Apareamiento de los cromosomas homólogos durante el cigoteno y paquiteno de la profase I (Villemey y Dethier, 1976).

## Resumen

El cultivo de peces presenta problemas relacionados con el crecimiento gonádico, debido a un decremento en la tasa de crecimiento, el deterioro en la calidad de la carne y la ocurrencia de enfermedades. Como solución, la manipulación cromosómica ha sido utilizada para producir individuos triploides (3N) la cual inhibe la maduración causando esterilidad. Existen diferentes métodos para inducir la triploidía: shock físicos (térmico y de presión) y químicos. De estos, el más efectivo, es el shock térmico, ya que no se utilizan drogas ni aparatos costosos y se pueden tratar una gran cantidad de huevos a la vez. El objetivo de este trabajo es determinar el tratamiento óptimo utilizando un shock en frío para inducir la triploidía en la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*. Los reproductores se obtuvieron de la Bahía de La Paz y se colocaron en tanques (600 L) conectados a un sistema de recirculación de agua en la Unidad Piloto de Maricultivo perteneciente al CICIMAR-IPN. Las hembras y machos fueron inyectados intramuscularmente con LHRH-a (12.5 y 25  $\mu\text{g kg/pez}$ , respectivamente). Los huevos fueron obtenidos manualmente y la fertilización se realizó en seco. Los huevos fertilizados se colocaron en recipientes con fondo de malla. Se realizaron 3 replicas por cada combinación de tratamiento además de dos controles. Se probaron 3 temperaturas (4, 8 y 12 °C), 3 tiempos de aplicación del tratamiento (TDF) 5, 10 y 15 minutos y el tratamiento duró 5, 10, 15 y 20 minutos. Se determinó el porcentaje de eclosión y el porcentaje de triploides se analizó mediante citometría de flujo. Se obtuvieron triploides solo con el TDF de 5 min. Sin embargo, el análisis no paramétrico no pudo detectar diferencias en el porcentaje de triploidía entre las tres temperaturas. Se observaron también diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre las diferentes duraciones de tratamiento. En lo que respecta a la sobrevivencia absoluta, se presentaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre las temperaturas, siendo significativamente más bajas en la temperatura de 12°C ( $11.22 \pm 1.11$ ) y 4°C ( $14.01 \pm 2.10$ ), comparado con la temperatura de 8°C (Exp. 2 =  $52.69 \pm 1.75$ , Exp. 3 =  $44.83 \pm 0.90$ ). Se presentaron también diferencias significativas entre las diferentes duraciones del tratamiento ( $p < 0.05$ ), así como una interacción significativa entre temperatura X duración.

El tratamiento óptimo para inducir un 100% de triploidía, con una sobrevivencia alta en la cabrilla arenera empleando shock en frío es; un TDF de 5 min, a una temperatura de 8 °C, con una duración de 20 minutos.

## Abstract

The culture of fish show problems related to the development of the gonad, which is accompanied by a decrease in the growth rate and flesh quality, and the increase in the susceptibility to diseases. The chromosome manipulation is a possible solution to those problems. One of these techniques is the production of triploids (3N); which are sterile due to an inhibition of the gonadal maturation. Several methods are used to induce triploidy; cold shock, heat shock, hydrostatic pressure and chemical shock. The temperature shock is the most effective due to the facility of the process. The objective of the present work was to determine the optimal treatment to induce the triploidy in the spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus*. The broodstock was kept in 600 L circular tanks connected to a recirculated water system, in the Unidad Piloto de Maricultivo of CICIMAR-IPN. Males and females were injected with LHRH-a at 25 and 12.5  $\mu\text{g kg/fish}$  respectively. The fertilization was taken as time zero (T =0). The cold shock was applied at 5, 10 and 15 min after the fertilization (TAF), at 12, 8 and 4 °C for 5, 10, 15 and 20 min duration. Control group received the same manipulation than the treated group except for the cold shock. Each treatment was carried out in triplicate. Incubator consisted in polyvinylchloride (PVC) cylinders with a nylon bottom mesh (200  $\mu$ ) and partially submerged in a small recipient. The percentage of triploidy obtained was analyzed by flow cytometry. Triploids were only obtained 5 min TAF. However, the Kruskal-Wallis analysis was unsuccessful to detect significant differences in the percentage of triploidy between the three temperatures. In the other hand, the duration of the treatment showed significant differences ( $p < 0.05$ ) in the percentage of triploidy. The absolute survival was significant lower ( $p < 0.05$ ) in the temperature of 12 °C ( $11.22 \pm 1.11$ ) and 4°C ( $14.01 \pm 2.10$ ) compared to the temperature of 8 °C (Exp. 2 =  $52.69 \pm 1.75$ , Exp. 3 =  $44.83 \pm 0.90$ ). Finally, the duration of the treatment shown significant differences ( $p < 0.05$ ) and was observed an interaction between temperature and duration.

The optimum treatment parameters for the induction of triploidy in the spotted sand bass was established as follow: TAF, 5 min, shock temperature, 8 °C and 20 min duration.

## INTRODUCCIÓN

La genética ha sido utilizada como una herramienta para mejorar el crecimiento y producción de una gran variedad de especies acuícolas comerciales. Estas técnicas han sido aplicadas principalmente en especies dulceacuícolas a nivel experimental y comercial. Sin embargo, también han sido reportadas en especies marinas (Garrido-Ramos *et al.*, 1996; Felip *et al.*, 1999; Felip *et al.*, 2001). Estas técnicas son de gran importancia ya que pueden ser utilizadas en la planificación de nuevos esquemas de mejoramiento genético para la producción animal (Rodríguez-Gutiérrez, 1992).

La inducción a la poliploidía es una forma simple de ingeniería genética, en la cual, los peces producidos poseen tres o más juegos de cromosomas en comparación con los organismos normales (diploides) que solo contienen dos. Aunque altos niveles de poliploidía son posibles en peces (Ej. Tetraploidía, pentaploidía y hexaploidía) solo la triploidía ha sido desarrollada ampliamente (Benfey y Donaldson, 1988). El término poliploidía en general se refiere a los organismos triploides. Los individuos diploides (2N), reciben al momento de la fecundación un conjunto de cromosomas (1N- haploide) de cada uno de sus padres. Los individuos triploides (3N) contienen un conjunto adicional, proveniente del segundo cuerpo polar (1N) en el caso de los peces, ya que el primer cuerpo polar

ha sido expulsado durante la meiosis I antes de que ocurra el desove. Este cuerpo es básicamente un conjunto materno de cromosomas y normalmente sale del ovocito poco después de la fertilización para mantener el número normal de cromosomas\_(Fig. 1).

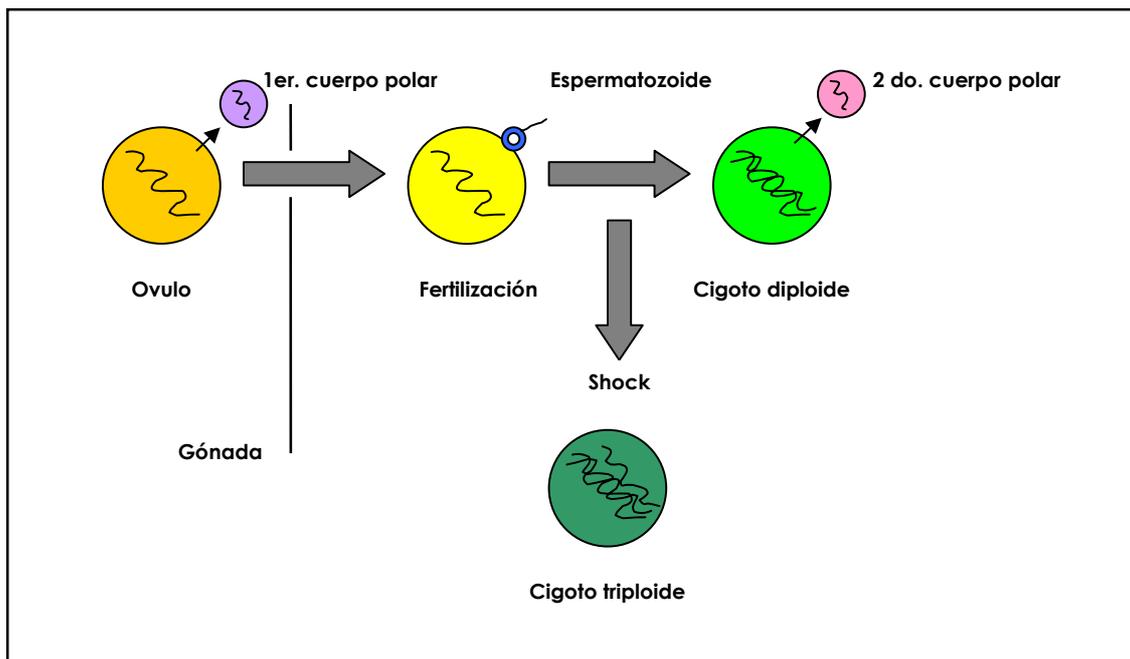


Figura 1. Representación de la salida de los cuerpos polares, fertilización y momento de aplicación del shock.

El cultivo de peces con propósitos comerciales presenta serios problemas relacionados con la maduración gonadal, la cual tiene un efecto negativo debido principalmente a un decremento en la tasa de crecimiento, así como un deterioro en la calidad de la carne. De igual forma se observa también un incremento en la ocurrencia de enfermedades que pueden causar un aumento en la mortalidad

poblacional (Piferrer *et al.*, 2000; Felip *et al.*, 2001). Los organismos triploides son interesantes para la acuicultura debido a que son funcionalmente estériles, resultado de una falla en el movimiento y unión (sinapsis) de los cromosomas homólogos al momento de aparearse durante la meiosis I (Cassani y Caton, 1985; Arai y Wilkins, 1987; Aldridge *et al.*, 1990; Benfey, 2001). En la acuicultura, el mayor interés en la producción de peces estériles reside en que los efectos negativos asociados con la maduración gonadal sobre el crecimiento y sobrevivencia, así como sobre la calidad de la carne son suprimidos. Un beneficio adicional es la supresión de las características sexuales secundarias, que a menudo son consideradas como indeseables por el consumidor (Thomas y Morrison, 1995; Felip *et al.*, 2001). Un ejemplo de esto último se presenta en el salmón triploide, el cual retiene su apariencia "plateada brillante" y es percibido por el consumidor como de más alta calidad (Teskeredzic *et al.*, 1993).

Existen dos formas básicas de producir organismos triploides; directamente, bloqueando la expulsión del segundo cuerpo polar durante la meiosis II de huevos recién fertilizados. Indirectamente, cruzando organismos tetraploides con organismos diploides. Los tetraploides (4N) se producen por la supresión de la primera división mitótica (Thorgaard *et al.*, 1981; Benfey y Donaldson, 1988; Holmerfjord y Refstie, 1997).

Una variedad de técnicas han sido desarrolladas para inducir la triploidía de manera directa, las cuales interfieren con el desarrollo normal

de la meiosis, como ya se mencionó, y son aplicadas inmediatamente después de la fertilización (Rodríguez-Gutiérrez, 1992). Estos tratamientos pueden ser físicos o químicos. Dentro de los tratamientos físicos se encuentra la presión hidrostática y la temperatura. En la presión hidrostática se aplica una presión de 6000 a 10000 psi, empleando una prensa de laboratorio la cual disuelve las fibras del huso separando los cromosomas y filamentos de actina. Este tratamiento solo se puede aplicar a un reducido volumen de huevos al mismo tiempo (Lou y Purdom, 1984; Allen *et al.*, 1989; Brydges y Benfey, 1991). La temperatura puede ser utilizada en forma de shock en caliente (26-36 °C) o de shock en frío (-1-12 °C) (Lincoln *et al.*, 1974; Valenti, 1975; Thorgaard *et al.*, 1981; Utter *et al.*, 1983; Cassani y Caton, 1985; Baldwin *et al.*, 1990; Dubé *et al.*, 1991; Felip *et al.*, 1997; Piferrer *et al.*, 2003). La temperatura inhibe la formación de microfilamentos y microtubulos, lo cual ocasiona que la división celular se detenga, debido a que los cromosomas no pueden desplazarse (Downing y Allen, 1987). Dentro de los tratamientos químicos se encuentra la colchicina, la cual es un alcaloide utilizado principalmente en plantas (Smith y Lemoine, 1979), la citocalacina B, la cual es un antibiótico fuertemente tóxico obtenido del hongo *Helminthosporium dematioideum*, el cual inhibe la polimerización de la actina necesaria para la formación del cuerpo polar (Longo, 1972; Refstie *et al.*, 1977; Allen y Stanley, 1979; Zhenmin *et al.*, 1994), el 6-DMAP, el cual puede ser disuelto en agua e

inhibe la rotación del huso durante la división y por ende la expulsión del cuerpo polar (Desrosiers *et al.*, 1993; Szöllösi *et al.*, 1993), y por último, se encuentra el óxido nitroso, el cual pertenece a un grupo de químicos con una habilidad bien documentada para perturbar de manera reversible la ultraestructura y ciclo celular (Shelton *et al.*, 1986). De los agentes químicos mencionados solo el óxido nitroso ha mostrado cierto potencial para inducir la triploidía en peces (Benfey y Donaldson, 1988), el resto son utilizados principalmente en moluscos (Garrido-Ramos *et al.*, 1996). Inmediatamente después de la fertilización se sumergen los huevos por un tiempo determinado en una mezcla de agua y el químico seleccionado. En algunos casos el tratamiento químico puede ser combinado con rangos de temperatura o presión (Rodríguez-Gutiérrez, 1992).

De los diferentes métodos, el más fácil, barato y efectivo parece ser el shock de temperatura o térmico, ya que no requiere el uso de químicos, tampoco de aparatos costosos y puede ser utilizado para tratar una gran cantidad de huevos a la vez (Lemoine y Smith, 1980; Arai y Wilkins, 1987; Benfey y Donaldson, 1988).

De acuerdo con Benfey (2001), las variables que deben ser controladas para una inducción exitosa a la triploidía son, el tiempo después de la fertilización al cual se inicia el tratamiento, la duración y magnitud del tratamiento.

Diploides y triploides presentan una apariencia externa idéntica, por lo cual varias técnicas han sido desarrolladas para facilitar su identificación, ya que el éxito de un programa de inducción a la triploidía es medido por el número de triploides que se presentan dentro de la población que ha sido tratada. Todas estas técnicas están basadas en el incremento en el número de cromosomas, o bien en el incremento resultante en el tamaño celular o nuclear (Benfey y Donaldson, 1988; Nai-Hsien *et al.*, 1993; Thomas y Morrison, 1995). Algunas de estas técnicas son; análisis de cariotipos (Thorgaard *et al.*, 1981), medición celular y nuclear de eritrocitos (Benfey *et al.*, 1984), método de tinción de nucleolos con plata (Gold y Ellison, 1982), citometría de flujo (Allen, 1983) y citofotometría microscópica (Komen *et al.*, 1988). La citometría de flujo es actualmente la técnica más moderna en la determinación de cantidades de ADN dentro de células, permitiendo una separación precisa entre triploides y diploides. Esta técnica consiste en teñir el ADN con un colorante (DAPI) para que adquiera fluorescencia al ser excitado por el rayo láser. El citómetro de flujo es capaz de medir diferentes niveles de intensidad relativa de fluorescencia y arrojar gráficas con diferentes picos de absorbancia. (Allen y Stanley, 1983; Solar *et al.*, 1984).

El crecimiento de peces triploides es un factor determinante para evaluar su utilidad en la acuicultura (Solar *et al.*, 1984). Los datos recogidos en varias especies, muestran que la tasa de crecimiento, así

como de la conversión alimenticia de organismos triploides supera la de los organismos diploides (Fast, 1998; Qin *et al.*, 1998). Lo anterior se debe a que derivan energía metabolizable proveniente de la producción de gametos hacia el crecimiento somático después de la primera madurez sexual (Carter *et al.*, 1994; Felip *et al.*, 2001). De hecho, los individuos triploides pueden alcanzar pesos 40% más elevados que los de individuos diploides (Garrido-Ramos *et al.*, 1996). Sin embargo, la superioridad de los individuos triploides sobre los diploides no siempre ha sido observada (Fast, 1998). Numerosos estudios se han llevado a cabo para determinar el desempeño de organismos triploides y diploides durante el crecimiento (ver, Galbreath *et al.*, 1994) obteniéndose resultados altamente variables (Felip *et al.*, 2001). Varias hipótesis han tratado de explicar las diferencias en el crecimiento entre triploides y diploides. Una de ellas afirma que los procesos asociados con la inducción a la triploidía pueden tener un efecto negativo sobre el crecimiento debido a aberraciones citogenéticas o bien por acciones bioquímicas provocadas por proteínas intracelulares específicas (Felip *et al.*, 2001). De igual forma, ha sido reportado que la ausencia del efecto anabólico de los esteroides sexuales debido a la reducción de la gónada en organismos triploides puede cancelar cualquier ventaja sobre el crecimiento provocada por la triploidización (Felip *et al.*, 2001).

Además de su efecto sobre el desarrollo gonadal, los organismos triploides difieren de los diploides en; 1) poseen una mayor

heterocigocidad, la cual se deriva del hecho de tener tres juegos de cromosomas, lo cual aumenta la cantidad de alelos dentro del organismo (Leary *et al.*, 1985; Benfey *et al.*, 1997) y 2) tienen células más grandes en la mayoría de los tejidos y órganos pero en menor número. El volumen del núcleo de la célula se incrementa para acomodar el material genético extra, lo cual resulta en un incremento del volumen celular. Los organismos triploides poseen eritrocitos más grandes que los diploides, pero su número es reducido para mantener el hematocrito al nivel de organismos diploides. Debido al mayor tamaño de los eritrocitos, el radio área superficial-volumen se reduce conforme se incrementa el tamaño celular, por ende el área superficial en los eritrocitos disponible para el intercambio gaseoso es menor, lo cual puede limitar la capacidad aeróbica en organismos triploides (Benfey *et al.*, 1997). De igual forma, como resultado de la reducción en el número de eritrocitos el contenido de hemoglobina, así como el radio hemoglobina-oxígeno se ven afectados, lo cual puede resultar, como se mencionó previamente en un decremento de la capacidad aeróbica y finalmente en una limitada habilidad de suministrar oxígeno a los tejidos (Ojolick *et al.*, 1995). Estos mismos autores mencionan que los organismos triploides se desenvuelven pobremente cuando se encuentran sometidos a altas temperaturas por largos periodos. Señalan que aunque son capaces de compensar por cortos periodos de tiempo el incremento en la tasa metabólica y demanda de oxígeno resultado del

aumento de la temperatura, periodos de exposición crónica resultan en un incremento de la mortalidad comparada con sus contrapartes diploides. En contraste, Benfey *et al.* (1997) no encontraron diferencias significativas en la temperatura máxima crítica en la trucha *Salvelinus fontinalis*. De igual forma, Sadler *et al.* (2000) no encontraron diferencias significativas en la capacidad de captación de oxígeno, así como en la respuesta hematológica de organismos triploides del salmón del Atlántico *Salmo salar* expuestos a estrés. Benfey *et al.*, (1997) sugieren que por lo tanto no se puede asumir que los organismos triploides son idénticos a los organismos diploides en sus requerimientos ambientales.

Aunque la superioridad de los organismos triploides no siempre ha sido observada, el uso de peces triploides (estériles) puede evitar las restricciones existentes sobre el cultivo de peces diploides (fértiles) (Galbreath *et al.*, 1994), especialmente cuando se cultivan fuera de su rango natural de crecimiento. Los peces estériles pueden prevenir el cruzamiento de organismos que escapan del cultivo con organismos de poblaciones naturales a través de la hibridación y de esta forma evitar la interferencia en adaptaciones genéticas presentes en los individuos silvestres. Al mismo tiempo se previene el establecimiento de poblaciones no deseadas ajenas al ecosistema y con esto la competencia inter-específica con poblaciones nativas o bien la depredación de estas últimas

(Utter *et al.*, 1983; Thorgaard, 1986; Galbreath *et al.*, 1994; Whithler *et al.*, 1998).

El propósito del presente trabajo es establecer un método efectivo de inducción a la triploidía. El trabajo se orientó en primera instancia a encontrar un método adecuado para obtener altos porcentajes de eclosión por réplica, además de establecer una metodología adecuada para el manejo y procesamiento de larvas de peces que permitieran obtener gráficas de buena calidad en el citómetro de flujo. Al mismo tiempo se identificó el tiempo después de la fertilización óptimo para la aplicación del shock. Posteriormente se estableció la temperatura, así como la duración del tratamiento adecuados para alcanzar un porcentaje de triploidía del 100% en la cabrilla arenosa *P. maculatofasciatus*.

## ANTECEDENTES

### Características de la especie

La cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* se distribuye desde la bahía de Monterrey, California hasta las costas de Mazatlán, México, incluyendo el área del Golfo de California; donde constituye un componente regular de la ictiofauna (Miller y Lea, 1972). Pertenece al orden Perciformes, suborden Percoide, familia Serranidae. Esta familia se encuentra constituida por tres subfamilias que representan un total de 449 especies distribuidas en 62 géneros (Nelson, 1994). El género *Paralabrax* pertenece a la subfamilia Serraninae, la cual está constituida por otras cinco especies *P. auroguttatus*, *P. clathratus*, *P. humeralis*, *P. loro*, y *P. nebulifer* (Heemstra, 1995).

*Paralabrax maculatofasciatus* tiene un comportamiento reproductivo complejo, exhibiendo como modalidad reproductiva el hermafroditismo protogínico. Se comporta como un desovador parcial, debido a que las hembras maduras presentan ovocitos en diferentes etapas de desarrollo, desde pre-vitelogénicos hasta vitelogénicos avanzados (Lluch-Cota, 1995). Los ovocitos de *P. maculatofasciatus* presentan una talla entre 720 y 840 mm de diámetro cuando se encuentran hidratados, y una fecundidad parcial que varía de 10300

huevos por desove (Lluch-Cota, 1995) hasta 45000 huevos por desove (Oda *et al.*, 1993). El análisis histológico realizado por Lluch-Cota (1995) reveló una frecuencia de desove de 2.6 días/desove. Los meses con mayor periodicidad de desoves y producción de huevos son de febrero a mayo, cuando la relación de sexos es de 3:2 (hembras- macho) (Avilés-Quevedo *et al.*, 1995; Lluch-Cota, 1995).

Winkler en 1916 (citado por Valenti, 1975) fue el primero en introducir el término poliploidía para designar a los individuos con tres o más conjuntos completos de cromosomas en lugar de los dos usuales. Numerosas observaciones de un incremento de ploidía han sido investigadas principalmente en plantas, donde es un fenómeno que se presenta frecuentemente. Dentro del reino animal este proceso se presenta raramente, aunque existe la hipótesis de que la poliploidía ocupó un papel relevante en el curso de la evolución y por ende la especiación de algunas especies de salmónidos a través de la poliploidización (probablemente tetraploidización) de su genoma. Esta hipótesis se basa en el hecho de que el número de cromosomas (contenido de ADN) de algunas especies es el doble, que en otras especies relacionadas (Allendorf y Thorgaard, 1984). En especies de interés comercial, como moluscos bivalvos, crustáceos y peces dulceacuícolas o marinos, este proceso requiere ser inducido.

El primer trabajo asociado con la producción de triploides fue realizado por Swarup en 1959, en *Gasterosteus aculeatus* (Chourrout, 1988). A partir de este experimento, la producción de triploides viables ha sido obtenida a través de diferentes métodos.

### Shock químico

Aunque el shock físico (temperatura o presión) es el que predomina actualmente, en lo que a peces se refiere, el shock químico ha sido investigado aunque sin mucho éxito. En este sentido, Refstie *et al.* (1977) aplicaron varios tratamientos con citocalasina B en el salmón del Atlántico *Salmo salar* obteniendo células poliploides a una concentración de 10 µg/ml. En la misma especie, Allen y Stanley (1979) lograron inducir poliploidía en mosaico empleando una concentración de citocalasina B de 10 mg. El tipo celular dominante fue el triploide en lugar del tetraploide, en contraste con el estudio anterior en el cual el tipo celular obtenido fue el tetraploide. Empleando otro clase de químico, Shelton *et al.* (1986) obtuvieron altos porcentajes de triploidía (>90%) en la trucha arcoíris *Salmo gairdneri*, aplicando óxido nítrico a presiones elevadas (11 atmósferas) por un periodo de 30 o 60 minutos después de la Fertilización (DF). El tratamiento más largo resultó en una mortalidad elevada. Tratamientos aplicados a una atmósfera no mostraron ningún efecto sobre el nivel de ploidía.

## Shock de presión

El shock de presión ha sido utilizado de manera exitosa principalmente en salmones. Lou y Purdom (1984) lograron obtener en la trucha arcoíris *Salmo gairdneri*, altos porcentajes de triploidía (80-90%) aplicando una presión de 8000 psi por 10 minutos, 35 min DF. En la misma especie, Chourrout (1984) aplicó un tratamiento similar, 7000 psi, 40 DF durante 4 minutos obteniendo 100% de progenie triploide. En la trucha café *Salmo trutta*, Brydges y Benfey (1991) examinaron tres variables con el shock de presión; la duración, magnitud y su inicio DF., obteniendo porcentajes de triploidía mayores al 90% con un tratamiento iniciado entre 5.5 y 6.5 min DF, a una presión de 9500 a 10500 psi aplicada de 25 a 30 minutos. Con esta combinación los porcentajes de sobrevivencia fueron superiores al 60%.

## Shock en caliente

Thorgaard *et al.* (1981) obtuvieron en la trucha arcoíris *Salmo gairdneri* porcentajes moderados de triploidía (> 40%) aplicando un shock a 36 °C por un minuto, 10 minutos DF. Tratamientos aplicados a mayor temperatura mejoraron ligeramente los porcentajes de triploidía, mientras que el porcentaje de sobrevivencia cayó dramáticamente. Johnstone (1985) expuso ovocitos del salmón del Atlántico *Salmo salar* a diferentes temperaturas (rango 26-32°C), duraciones (4 a 14 min) y tiempos de inicio DF (0 a 20 min) logrando obtener porcentajes del 100% con diferentes

combinaciones. Dependiendo del tratamiento, la sobrevivencia se presentó dentro de un rango aceptable (56 a 76 %). En este caso, el porcentaje de triploidía se incremento conforme lo hacía la temperatura y se reducía el tiempo de exposición a un tiempo de inicio determinado (DF). En un estudio similar, Arai y Wilkins (1987) evaluaron varios tratamientos de shock en caliente en la trucha café, *Salmo trutta*. El tratamiento se inició 5 minutos DF, durante 10 minutos a 29°C, arrojando altas frecuencias de embriones triploides (71-91%). Un shock de 6 minutos de duración, a 32°C mostró un 100% de embriones triploides. Las tasas de eclosión mostraron un decremento casi lineal conforme se incrementaba el porcentaje de embriones triploides. En la misma especie, Quillet *et al.* (1991) optimizaron la producción de triploides combinando tres variables; temperatura, duración y aplicación del shock DF. La mejor combinación fue; 10 a 15 minutos de duración, a 28 °C, aplicado 5 min DF. Esta combinación permitió obtener resultados cercanos al 100% sin provocar una alta mortalidad ligada a dicho proceso. En un estudio reciente, Basavaraju *et al.* (2002) indujeron en la carpa *Cyprinus carpio* altos porcentajes de triploidía (≈100%) aplicando un shock en caliente iniciado entre 1 y 4 min DF, durante 1.5 minutos a una temperatura de 40 °C. La sobrevivencia se mantuvo entre 66 y 76%, en los diferentes experimentos. La variación en la sobrevivencia, a lo largo de los diferentes experimentos, fue más amplia en comparación con el porcentaje de triploidía obtenido.

## Shock en caliente VS Shock en frío

Cassani y Caton (1985) lograron inducir la triploidía en la carpa *Ctenopharyngodon idella* mediante los dos tipos de shock térmico. Sin embargo, la triploidía se observó más frecuentemente (50-100%) aplicando shock en frío en un intervalo de 5 a 7 °C, con una duración de 25 a 30 minutos, iniciado entre 2 y 4.5 min DF. En contraste, el shock en caliente de 40 °C por un minuto, iniciado 4.75 min DF solo arrojó un 8% de triploides. En la misma especie, Thompson *et al.* (1987) aplicaron varios tratamientos tanto de shock en caliente como de shock en frío, obteniendo a diferencia del estudio anterior, un porcentaje más alto de triploides (> 87%) en el shock en caliente comparado con el shock en frío (> 40%). Sin embargo, la sobrevivencia fue significativamente más baja en el shock en caliente. Don y Avtalion (1988) investigaron las condiciones óptimas para la inducción a la triploidía en dos especies de tilapia; *Oreochromis aureus* y *Oreochromis niloticus* con ambos tipos de shock térmico. Los resultados obtenidos mostraron una mejor respuesta en ambas especies al shock en frío, con un porcentaje de triploidía de 50 y 60 %, respectivamente. En adición, mostraron que la ventana de tiempo (minutos) DF dentro de la cual se podía aplicar el shock con resultados favorables era más amplia (0-15 min), en el caso del shock en frío. En un estudio similar, Baldwin *et al.* (1990) probaron tanto shock en caliente como

frío en *Pomoxis annularis* obteniendo porcentajes más altos de triploidía con el shock en frío (72-92%), en comparación con el shock en caliente (0-10%). Holmerfjord y Refstie (1997) compararon la eficiencia de un shock en caliente contra un shock en frío para inducir la triploidía en el pez plano *Hippoglossus hippoglossus*. El shock en caliente de 15-30 min a 24°C resultó en una frecuencia media de triploides del 84%, sin embargo, la sobrevivencia fue de solo el 20% comparado con los grupos control. Por otro lado, el shock en frío de 2-3 horas a -1°C dio un 92-95% de triploides y una sobrevivencia de 50-82% comparado con el grupo control. Ambos tratamientos se iniciaron 15 minutos DF.

### Shock en frío

Lemoine y Smith (1980) aplicaron a la trucha *Salvelinus fontinalis* un tratamiento de shock en frío un minuto después de la fertilización (DF) en una solución al 5% de glicerol a -1.5 °C durante 2 horas. Los resultados arrojaron un incremento significativo de la mortalidad debido a este proceso. No se encontraron exclusivamente triploides en los análisis cromosómicos y la distribución de frecuencias del volumen nuclear de los eritrocitos indicó una alta incidencia de mosaicos. En ese mismo año, Gervai *et al.* (1980) obtuvieron altos porcentajes de triploidía (100%) en la carpa *Cyprinus carpio*, aplicando un shock en frío iniciado entre 3 y 9 min DF, con una temperatura entre 0 y 2 °C, por 45 minutos. Colombo *et al.*

(1995) observaron que la aplicación de un shock en frío de 20 minutos de duración 5 minutos DF a 0-2°C en la lubina, *Dicentrarchus labrax* L. resultó en porcentajes de triploidía de ≈90%. Sin embargo, esto solo se logró observar en pocos lotes tratados. Lo anterior se atribuye al efecto del manejo de una gran cantidad de huevos.

En estudios más recientes sobre especies marinas, Felip *et al.* (1997) investigaron las condiciones óptimas para la inducción a la triploidía en *Dicentrarchus labrax*. Combinaron tres variables, inicio del tratamiento (DF), temperatura y duración, logrando obtener un porcentaje de triploidía del 100 % con una sobrevivencia del 80% comparada con el control, con la siguiente combinación; 5 min DF, 10 minutos de duración a 0 °C. Piferrer *et al.* (2000) determinaron los efectos del shock en frío en el lenguado *Scophthalmus maximus*. Los tratamientos fueron aplicados 5 minutos DF durante 5, 10, 20 y 40 minutos a 0 °C, 2 °C y 4 °C. Los resultados obtenidos mostraron que el porcentaje de triploides se incrementó, conforme descendía la temperatura y aumentaba la duración del shock (5 a 20 minutos). Posteriormente, Piferrer *et al.* (2003) refinaron el método reportado tres años antes y lograron obtener porcentajes de triploidía del 100%, así como llevar el proceso a una escala mayor con un tratamiento aplicado 6.5 min DF., durante 25 minutos a una temperatura de entre -1 y 0 °C. La sobrevivencia fue de un 60% comparada con el control.

## JUSTIFICACIÓN

En los últimos veinte años, los avances que se han logrado en otras ciencias han repercutido de manera sustancial en la creación de nuevas biotecnologías, que se están aplicando en países como Inglaterra, Francia y Canadá, donde el vínculo entre los investigadores y los productores es muy estrecho, lo que ha permitido el financiamiento de la investigación y la incorporación de la manipulación cromosómica en la producción, incrementándola hasta en un 3% (Rodríguez-Gutiérrez y Nava-Bautista, 1992).

En la actualidad, en México, el desarrollo de estas biotecnologías genéticas que permitan una utilización de los recursos marinos se encuentra en desarrollo en diferentes especies (Ruiz-Verdugo, 2000; Puente-Carreón, 2004) incorporándose de esta manera poco a poco a los sistemas de producción del país. En *Paralabrax maculatofasciatus*, si bien no posee una importancia comercial al nivel de otras especies, es un excelente candidato potencial para el cultivo (Matus-Nivón *et al.*, 1989), debido a que presenta ciertas características como; ser altamente tolerante al manejo, exposición al aire y factores ambientales, baja territorialidad en cautiverio, adaptarse al cautiverio con rapidez, no presentar agresividad entre los especímenes aún sometida a hacinamiento, rápida aceptación hacia diferentes tipos de dieta y, por

último, los individuos se muestran tranquilos y no nadan activamente si cuentan con un refugio (Avilés-Quevedo *et al.*, 1995), además de ser abundante en el área.

En el CICIMAR, desde hace 15 años los estudios realizados por diferentes grupos de trabajo se han centrado en los diversos aspectos del cultivo de la cabrilla arenera, abordándolos de manera global contemplando varios puntos entre los que se encuentran la producción de huevos, cría larvaria y engorda de juveniles. Los avances conseguidos pudieran permitir el desarrollo de un paquete tecnológico. Sin embargo, aun existen problemas específicos que deben ser superados con el objetivo de hacer del cultivo una actividad sustentable y rentable. Uno de los principales problemas que se han observado en *P. maculatofasciatus* es su madurez sexual precoz a tallas muy por debajo de la talla comercial (Hasting, 1989; Martínez *et al.*, 2001). De ahí el interés por producir organismos estériles mediante la producción de organismos triploides. Los cuales pueden presentar otras ventajas en términos de producción, como tallas más grandes o mejores índices de conversión alimenticia (Ojolick *et al.*, 1995; Fast, 1998; Qin *et al.*, 1998). Si bien en la actualidad *P. maculatofasciatus* sólo es explotada en forma artesanal, la existencia de volúmenes apreciables y las tendencias al incremento en los precios de los productos marinos pueden hacer que esta situación cambie en el futuro,

con lo que será necesario implementar los diferentes aspectos de su cultivo (Lluch-Cota, 1995).

## OBJETIVOS

### 4.1 General

- Desarrollar una tecnología de producción de triploides en la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* mediante shock en frío.

### 4.2 Particulares

- Identificar el momento de aplicación que permite obtener el mayor porcentaje de huevos triploides y comparar con la salida del cuerpo polar.
- Identificar la temperatura con la cual se obtiene el mayor porcentaje de huevos triploides, así como la mayor sobrevivencia.
- Identificar la duración del shock térmico con la cual se obtiene el mayor porcentaje de huevos triploides, así como la mayor sobrevivencia.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Durante el desarrollo de este trabajo se evaluaron dos métodos generales de inducción a la triploidía con la finalidad de desarrollar y refinar un método adecuado de obtención de organismos triploides. Estos métodos abarcan desde la colecta de reproductores, la inducción al desove, la aplicación del shock y finalmente, el análisis del nivel de ploidía.

### 5.1 Método A.

#### 5.1a Colecta de reproductores.

Los reproductores se obtuvieron de la Bahía y Ensenada de La Paz de Febrero a Mayo de 2003. Los organismos se obtuvieron por medio de pesca con línea, utilizando pescado y calamar como carnada. Los organismos capturados durante el recorrido se mantuvieron en un vivero de 100 L, con recambios de agua frecuentes del 70% (Fig. 2). Los peces se transportaron a la Unidad Piloto de Maricultivo (UPIMA) perteneciente al Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas (CICIMAR) del Instituto Politécnico Nacional (IPN) (Fig. 3). A su llegada fueron sometidos a un baño de agua dulce de aproximadamente 15 minutos como medida profiláctica.

Los reproductores se mantuvieron en un sistema de cultivo de circulación cerrada, compuesto por veintidós tanques de fibra de vidrio de 600 L de capacidad, conectados a un filtro de arena, un filtro biológico de lodo activado y lámparas UV (Fig. 4). Se dejaron aclimatar por un periodo

mínimo de dos semanas, a una temperatura de 23°C, una salinidad de 35 UPS y un fotoperíodo de 13:11 (luz: oscuridad); se alimentaron una vez al día con una dieta basada en calamar y sardina. Sus excretas fueron sifoneadas diariamente y el alimento no ingerido se retiraba después de 10 minutos con ayuda de una pequeña red.



Figura 2. Vivero con reproductores



Figura 3. Unidad Piloto de Maricultivo



Figura 4. Sistema de mantenimiento de reproductores

### 5.1b Inducción al desove mediante LHRH-a

Transcurrido el tiempo de aclimatación, los peces fueron anestesiados con una solución de 2-Fenoxietanol a una concentración de 400 ppm con aeración continua. Las hembras fueron previamente revisadas por

canulación, con ayuda de un catéter de plástico 1.2 mm de diámetro (cánula). Este método consiste en introducir la cánula aproximadamente 2.5 cm por el poro genital hacia el oviducto y realizar una pequeña succión para extraer los ovocitos (Fig. 5). Se evaluó su tamaño y se escogieron solamente a las hembras que presentaban ovocitos con un diámetro de 400  $\mu\text{m}$  o superior; el cual corresponde a las clases de ovocitos con un estadio de madurez avanzado (Ocampo, 2002). A cada organismo se le aplicó una inyección intramuscular de LHRH-a en la aleta pectoral (Fig. 6). En el caso de los machos se aplicaron 25  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de pez en una sola inyección, y en el caso de las hembras 12.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de pez dividido en dos inyecciones. Los experimentos se iniciaron a partir de las 11:00 AM. La segunda inyección en el caso de las hembras se administró 24 horas después de la primera, junto con la única inyección para los machos.



Figura 5. Canulación de una hembra



Figura 6. Inyección intramuscular de LHRH-a

Con base a lo observado por Pliego y Alcántar (2002), una vez inyectados, los peces fueron revisados 36 horas después de la primera

inyección en los primeros dos experimentos, con la finalidad de obtener la mayor cantidad de ovocitos. En experimentos posteriores, los peces se revisaron entre 32 y 33 horas aproximadamente, después de la primera inyección aplicada a las hembras. Lo anterior se llevó a cabo presionando ligeramente el abdomen para verificar si se presentaba el desove. El desove obtenido se recolectó en bandejas plásticas. La fertilización se llevó a cabo en seco y el momento de la fertilización se determinó como el tiempo cero ( $T = 0$ ) con ayuda de un cronómetro digital. Dependiendo del experimento al  $T = 2.5$  min o  $T = 5$  min, los huevos fecundados fueron colocados cuidadosamente en un tamiz de 500 micras con ayuda de una piseta y fueron lavados con agua de mar por 10 segundos, sin separar los huevos viables de los no viables. Posteriormente, los huevos fueron repartidos en recipientes de PVC de 10 centímetros de altura y aproximadamente 6 cm de diámetro con fondo de malla de  $300 \mu\text{m}$  (Fig. 7a), contenidos en una hielera de poliuretano de 35 L de capacidad con agua de mar tomada del sistema donde se encontraban los reproductores (Fig. 7b). Para asegurar una cantidad constante de huevos en cada tratamiento, se utilizó una micropipeta automática, se repartieron 2 ml en cada recipiente.

### **5.1c** Inducción a la triploidía. Diseño experimental

Las temperaturas, tiempos de aplicación del shock a partir del tiempo cero y duración del tratamiento se encuentran incluidos en el Anexo 1. Estas

temperaturas fueron seleccionadas en base a experimentos previos con otras especies marinas. La aplicación del shock y la duración del tratamiento utilizados fueron los reportados como exitosos en trabajos anteriores para otras especies marinas. El shock en frío se aplicó transfiriendo los tamices con los huevos fertilizados a un baño con agua enfriada a la temperatura deseada, empleando bolsas de hielo. En cada experimento se aplicó solamente una temperatura. La temperatura fue monitoreada de manera continua empleando un termómetro digital y se utilizaron bolsas de hielo para regular la temperatura cada vez que era requerido. La temperatura se mantuvo controlada para que no variara más de  $\pm 0.2^{\circ}\text{C}$ . Cada combinación de tratamientos se realizó por triplicado, con dos controles, los cuales recibieron el mismo tratamiento que los huevos tratados a excepción del shock térmico. Una vez aplicado el shock, los tamices fueron trasladados a la hielera inicial.



Figura 7. Aplicación del shock. a) Tamices de PVC con fondo de malla, b) Hielera con recipientes de inducción

Terminado cada tratamiento, los huevos fueron incubados aproximadamente 34 horas. Se emplearon dos métodos de incubación en diferentes experimentos. En el primer método, los huevos fueron transferidos a recipientes de PVC con fondo de malla de 80  $\mu\text{m}$  sujetos a un tanque circular de 600 l. con agua de mar tomada del sistema donde se encontraban los reproductores (Fig. 8a). Los incubadores estaban divididos en dos por medio de una pared de acrílico transparente pegada con silicón (Fig. 8b). Junto con los incubadores anteriores se probaron otro tipo de incubadores de estilo semejante; estos consistían en incubadores hechos de malla de 100  $\mu\text{m}$  de forma circular con divisiones triangulares semejantes a los gajos de una naranja. A diferencia de los incubadores anteriores, estos no se encontraban sujetos al tanque, sino que eran flotantes (Fig. 8c). Lo anterior era posible gracias a dos anillos de manguera, uno inferior lleno con arena y otro superior lleno con aire. Para asegurar que el incubador no se moviera dentro del tanque se sujetaba por medio de un lastre de plomo. El segundo método de incubación probado se basó en un método empleado en el camarón *Litopenaeus vannamei* por Puentes-Carreón en el 2003 (Fig. 8d). Se registró la temperatura ya que esta influye en la velocidad del desarrollo ontogénico.

#### **5.1d** Análisis del nivel de Ploidía

La colecta de las larvas obtenidas se realizó vaciando el contenido de cada incubador en una caja de Petri. Se tomaron 15 larvas de cada

incubador con ayuda de una pipeta Pasteur y se colocaron en tubos Eppendorf de 1.5 ml de capacidad. Las muestras fueron marcadas y transportadas en hielo molido para su análisis.



Figura 8. Tipos de incubadores, a) Incubador tipo 1, b) Incubador tipo 2, c) Incubador tipo 3 (flotante), d) Incubador tipo 4 (Puente-Carreón)

El análisis del nivel de ploidía se llevó a cabo por medio de citometría de flujo, en el laboratorio de genética acuícola del CIBNOR. A las muestras se les agregaron unas gotas de 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) en frío, el cual penetra las células y tiñe el ADN. Posteriormente, las muestras fueron fuertemente machacadas con ayuda de un pistilo y filtradas a través de

una malla de 30  $\mu\text{m}$  colocada en la parte superior de un vial de vidrio previamente marcado. Por último, se agregó aproximadamente 1.5 ml de DAPI a la muestra filtrada para obtener el volumen necesario. Las muestras se dejaron reposar por 5 minutos antes de ser analizadas en el citómetro de flujo (Ploidy Analyzer II PARTEC, Germany).

## **5.2 Método B.**

### **5.2a** Colecta de Reproductores

Para cada experimento los reproductores se obtuvieron de la Bahía de La Paz, B.C.S. durante el Invierno-Primavera de 2004. Se desarrollaron dos experimentos por semana, y por cada experimento se colectaron de 12 a 20 especímenes. Los organismos se colectaron de acuerdo a lo descrito en el método A. Sin embargo, en este caso los organismos fueron anestesiados al momento de su captura utilizando 2-fenoxietanol a una concentración de 400 ppm. Una vez anestesiados, se realizó una revisión preliminar del sexo, mediante canulación como se describió en previamente. Los ovocitos obtenidos se guardaron en tubos Eppendorf (1.5 ml) con agua de mar y se midieron en el laboratorio con la ayuda de un analizador de imágenes conectado a una lupa estereoscópica (Image pro-plus 4.0). Los machos fueron marcados mediante un ligero corte angular en la parte superior de la aleta caudal, para hacer más fácil su

identificación en el laboratorio. Durante el traslado al laboratorio, los peces colectados se mantuvieron bajo las mismas condiciones aplicadas en el método A. En el laboratorio los peces fueron distribuidos en un sistema de circulación cerrada a una proporción de 2:1 (Hembras: Machos). Se eligieron solamente las hembras que presentaban ovocitos con un diámetro de 400  $\mu\text{m}$  o superior (Ocampo, 2002).

### **5.2b** Inducción al desove con LHRH-a

Las hembras y machos se inyectaron a su llegada al laboratorio a la hora señalada y de la forma descrita en el método anterior. Los peces se revisaron aproximadamente 31 horas después de la primera inyección (Aproximadamente 7:00 PM) presionando ligeramente el abdomen para verificar si se presentaba el desove. El desove obtenido fue colectado en una bandeja plástica, la fertilización se llevó a cabo en seco ( $T = 0$ ). Al  $T = 3$  min los huevos fecundados se lavaron con agua de mar por 10 segundos. Posteriormente se colocaron en un vaso de precipitado (1 l) por 30 segundos, donde se les agregó una solución hipersalina en una proporción aproximada de 1:3 (agua marina: sol. hipersalina), con el objetivo de separar los huevos viables de los no viables. Por último, los huevos fueron repartidos en recipientes de PVC de fondo de malla de 200 micras, de las mismas dimensiones descritas en el método A, colocados en una hielera de poliuretano con agua de mar previamente clorada (0.25 g/15 l) y neutralizada con tiosulfato de sodio (0.15 g/15 l) a 23 °C. La repartición de

los huevos se llevó a cabo empleando una caja de Petri de 3 cm de diámetro a manera de cuchara, para asegurarnos de colocar en cada recipiente solo los huevos que se encontraban flotando, característica que solo poseen los huevos vivos.

### **5.2c** Inducción a la triploidía. Diseño experimental

Se probaron 3 temperaturas, 4, 8 y 12 °C ( $\pm 0.2$ ) con tres tiempos de aplicación del choque a partir del tiempo cero, 5, 10 y 15 minutos. La duración del tratamiento fue de 5, 10, 15 y 20 minutos para cada temperatura (Anexo 1). El shock en frío se aplicó utilizando el método anterior. En cada experimento solo se aplicó una temperatura, con las combinaciones mencionadas. Al igual que en experimentos anteriores se realizaron 3 replicas por cada combinación de tratamiento, con dos controles. Una vez aplicado el shock, los tamices fueron transferidos a la hielera inicial y llevados a otra área del laboratorio con aireación continua y temperatura controlada ( $\approx 25$  °C).

Los huevos sometidos al tratamiento experimental, al igual que los controles se dejaron incubar por 35 horas aproximadamente con tres recambios al día del 70 % del volumen total con agua pretratada (clorada y tiosulfatada). Para este método, los huevos se incubaron en los mismos recipientes donde recibieron el shock térmico (Fig. 9). De igual forma se registró la temperatura antes, durante y después de estos recambios, ya que ésta influye en la velocidad del desarrollo ontogénico.



Figura 9. Incubación de huevos de *Paralabrax maculatofasciatus*

### 5.2d Análisis del nivel de Ploidía

La colecta de las larvas se realizó vaciando el contenido del incubador de la misma forma que en el método A. Sin embargo, en este caso la piseta empleada contenía agua de mar pretratada. Se tomaron 10 larvas de cada incubador con ayuda de una pipeta Pasteur conectada a una bomba de plástico (BEL-ART, Products, USA). Para facilitar este proceso, se utilizó un fondo de color negro y una lámpara de mano tipo comercial. Las larvas colectadas se vaciaban suavemente en una caja de Petri adyacente y se retiraba el exceso de agua extraída dejando de esta manera las larvas casi en seco para evitar al máximo acarrear desechos orgánicos en la muestra. Una vez realizado lo anterior se procedió a tomar una por una las 10 larvas con ayuda de unas pequeñas pinzas de punta lisa y cuadrada (Victorinox), y almacenarlas en tubos Eppendorf (1.5 ml), los cuales contenían aproximadamente 0.5 ml de agua pretratada. Las

muestras al igual que en el método A, fueron almacenadas en hielo molido.

Una vez en el CIBNOR, las muestras fueron procesadas siguiendo los pasos descritos en el método A. Excepto que, en este caso, se hicieron dos modificaciones; las muestras fueron solo ligeramente machacadas y procesadas de tres en tres, antes de ser leídas por el citómetro de flujo, para reducir al máximo el tiempo de exposición a la temperatura ambiental, la cual reduce la efectividad del DAPI para teñir el ADN.

### 5.3 Sobrevivencia

La sobrevivencia se evaluó transfiriendo las larvas y huevos tratados a un vial de plástico de 15 ml de capacidad con aproximadamente 7 ml de formol al 4% (por réplica). Lo anterior se llevó a cabo empleando una piseta y un embudo de vidrio. Los viales se colocaron hasta su análisis dentro de un refrigerador. Posteriormente, con ayuda de una micropipeta se retiró aproximadamente la mitad del volumen total contenido en el vial, para agregar aproximadamente el mismo volumen de formol al 4%.

La evaluación de la sobrevivencia se realizó contando el número de larvas eclosionadas y huevos con ayuda de una lupa estereoscópica y de una caja de Petri cuadrículada. El número de larvas colectadas previamente para el análisis de citometría de flujo eran agregadas al número observado. Los porcentajes de sobrevivencia absoluta\* obtenidos

se expresaron también en base a los porcentajes de eclosión obtenidos en los controles, los cuales fueron considerados como el 100% (Sobrevivencia relativa).

\*Sobrevivencia absoluta a la eclosión:  $(\text{Larvas eclosionadas} / \text{Larvas eclosionadas} + \text{huevos}) \times 100$

#### 5.4 Análisis de porcentajes diploidía-triploidía

Las gráficas obtenidas por el citómetro de flujo que presentaron ambos tipos celulares (diploides y triploides), fueron examinadas mediante un análisis de picos, con el objetivo de determinar los porcentajes de cada tipo celular dentro de la muestra. El primer paso consistió en suavizar las curvas de los controles de cada experimento, es decir, calcular para cada control su media y su coeficiente de variación. Esto se llevo a cabo con ayuda del software del citómetro de flujo. En el caso de los organismos triploides, la media obtenida de la suma de ambos controles es multiplicada por 1.5, debido a que como es sabido los organismos triploides contiene 1.5 veces más contenido de ADN. Posteriormente, con los datos obtenidos, se calculó la desviación estándar para cada control y se sacó un promedio entre los dos controles de cada experimento. Una vez realizado lo anterior, se determinaron los límites superior e inferior de cada tipo celular. Por último, los valores obtenidos de las medias y los límites tanto diploides como triploides se ingresaron de nuevo al software del citómetro de flujo, el cual nos proporciono nuevas gráficas con los límites

establecidos y el área perteneciente a cada tipo celular. En base a estas áreas se obtuvieron los porcentajes de triploidía (Anexo2).

### 5.5 Análisis estadístico

Los porcentajes de sobrevivencia absoluta fueron transformados con la función arco-seno de la raíz cuadrada, para poder llevar a cabo el análisis de variancia (ANDEVA) (Sokal y Rohlf, 1998). Se verificó la normalidad y homogeneidad de varianzas, y se aplicó un ANDEVA de tres vías (temperatura, TDF y duración). De igual forma se aplicó una prueba de Tukey, cuando las diferencias fueron significativas ( $p < 0.05$ ). En el caso de los porcentajes de triploidía obtenidos, se transformaron con la función arco seno al igual que en el caso de la sobrevivencia. Sin embargo, en este caso se aplicó un análisis no paramétrico Kruskal-Wallis. Para llevar a cabo lo anterior se utilizó el programa STATISTICA 6.0.

## RESULTADOS

### Ensayos preliminares.

#### Método A.

Este método arrojó pobres resultados, aunque se consiguió obtener desoves en casi todos los experimentos, no se logró un porcentaje de eclosión consistente y en cantidad suficiente en cada una de las replicas de los diferentes tratamientos. Solo se logró llevar a cabo análisis dos veces en el laboratorio de genética acuícola del CIBNOR, sin obtener picos bien definidos, especialmente en los controles (larvas no tratadas). Lo anterior no nos permitió determinar de manera precisa el nivel de ploidía. En la tabla 2, se presenta una lista de los experimentos realizados empleando este método, así como las diferentes etapas que se lograron alcanzar.

#### Método B.

En base a correcciones realizadas al método A, se lograron obtener desoves de manera constante. De igual forma, las modificaciones realizadas en el método de incubación nos permitieron obtener un mayor número de larvas por réplica. En cuanto a las modificaciones en el procesamiento de las larvas, estas nos permitieron obtener picos mejor definidos, tanto en los diferentes tratamientos como en las larvas no tratadas. En la tabla 3 se pueden observar los diferentes experimentos

llevados a cabo con este método, así como las diferentes etapas que se alcanzaron.

Tabla 1.- Etapas alcanzadas en los diferentes experimentos realizados empleando el método A de inducción a la triploidía durante el periodo Febrero-Mayo 2003

Experimento	Etapas					
	Desove <sup>1</sup>	Shock <sup>2</sup>	Incubación <sup>2</sup>	Larvas <sup>2</sup>	Citometría <sup>2</sup>	Triploides <sup>3</sup>
1	NO	NE	NE	NE	NE	NE
2	NO	NE	NE	NE	NE	NE
3	SI	NE	NE	NE	NE	NE
4	SI	NE	NE	NE	NE	NE
5	SI	NE	NE	NE	NE	NE
6	SI	12°C	E	NE	NE	NE
7	SI	12°C	E	E	E	NT
8	SI	12°C	E	NE	NE	NE
9	SI	NE	NE	NE	NE	NE
10	SI	8°C	E	NE	NE	NE
11	SI	8.5°C	E	E	E	NT
12	SI	8°C	E	NE	NE	NE

<sup>1</sup>NO: no desove, SI: desove

<sup>2</sup>NE: no evaluado, E: evaluado

<sup>3</sup>NT: no se encontraron triploides

Tabla 2.- Etapas alcanzadas en los diferentes experimentos realizados empleando el método B de inducción a la triploidía durante el periodo Febrero-Mayo 2004

Experimento	Etapas			
	Fecha	Temperatura	Triploides <sup>1</sup>	Sobrevivencia <sup>2</sup>
1	02/03/04*	8 °C	NE	NE
2	04/03/04	8 °C	NT	NE
3	09/03/04	8 °C	NT	NE
4	12/03/04*	8 °C	NE	NE
5	16/03/04*	8 °C	NE	NE
6	18/03/04	8 °C	NT	NE
7	01/04/04	8 °C	ST	NE
8	15/04/04	4°C	ST	NE
9	19/04/04	12 °C	ST	NE
10	23/04/04	8 °C	ST	E
11	26/04/04**	4 °C	NE	NE
12	30/04/04	4 °C	ST	E
13	03/05/04	12 °C	ST	E
14	17/05/04	8 °C	ST	E

\* Análisis con muestras congeladas

\*\*Desove de mala calidad

<sup>1</sup> NT: no se encontraron triploides, ST: se encontraron triploides

<sup>2</sup> NE: no evaluado, E: evaluado

## Expulsión del 2º Cuerpo Polar.

Los resultados de la observación del segundo cuerpo polar (Fig. 10) se encuentran en la tabla 4. En los experimentos 1 y 2 los tiempos se comportan de manera similar en comparación con los tiempos obtenidos en el experimento 3.

Tabla 3.- Observación de la salida del cuerpo polar en los tres experimentos realizados. Porcentaje de ovocitos con el cuerpo polar expulsado (CPE), tiempo en minutos después de la fertilización (TDF).

Experimento 1		Experimento 2		Experimento 3	
TDF	% CPE	TDF	% CPE	TDF	% CPE
15	5	19	5	21	10
17	15	21	19	23	20
19	25	25	57	28	25
24	45	26	71	35	75
25	50	33	81	39	99
26	55	39	99	<b>1ra. división</b>	50 min
27	60	<b>1ra. división</b>	50 min		
33	80				
38	99				
<b>1ra.división</b>	40 min				

Exp. 1 = 2 hembras – 1 macho

Exp. 2 = 3 hembras – 2 machos

Exp. 3 = 2 hembras – 2 machos

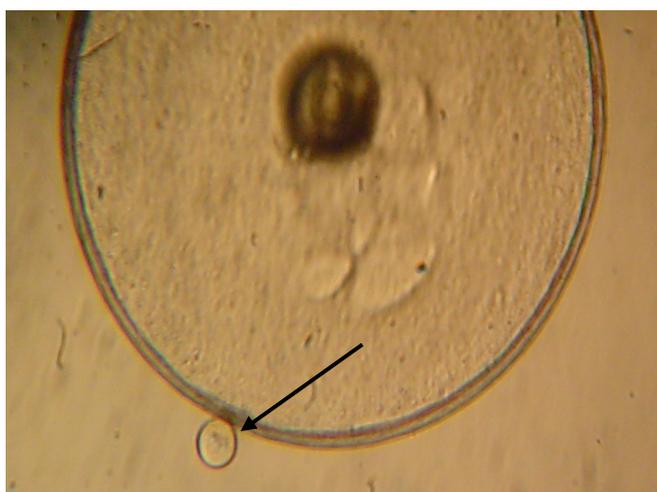


Figura 10. Ovocito que presenta el segundo cuerpo polar expulsado

## Triploidía.

Se observaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) con respecto al TDF, ya que no se observaron triploides cuando el tratamiento se aplicó a los 10 o 15 minutos TDF. No se presentaron diferencias significativas ( $p = 0.6990$ ) en el porcentaje de triploidía entre las diferentes temperaturas (experimentos). No obstante, se observó una tendencia hacia porcentajes menores en la temperatura de 12°C. En la figura 11 se presentan los resultados de triploidía solamente cuando el tratamiento se aplicó 5 minutos DF. La duración mostró diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Sin embargo, el análisis a posteriori no pudo detectar las diferencias entre las cuatro duraciones. Varias combinaciones de tratamientos permitieron arrojar 100% de triploidía de manera constante en las tres replicas (Anexo 3).

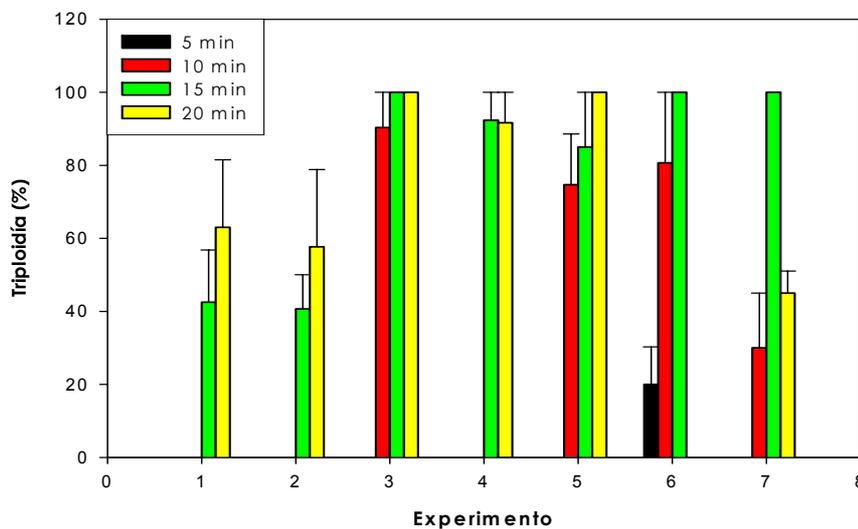


Figura 11.- Porcentaje de triploidía (promedio  $\pm$  error estándar;  $n = 3$ ) obtenido por duración en los diferentes experimentos. Cuando el tratamiento se aplicó 5 minutos después de la fertilización. 12°C = Exp. 1 y 2, 8°C = Exp. 3, 4 y 5, 4°C = Exp. 6 y 7.

## Sobrevivencia.

Los datos de sobrevivencia absoluta y relativa se encuentran en la figura 12 a y b. Se detectaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre las diferentes temperaturas (experimentos). Los porcentajes promedio de sobrevivencia absoluta fueron significativamente menores en las temperaturas de 12°C ( $11.22 \pm 1.11$ ) y 4°C ( $14.01 \pm 2.10$ ) en comparación con los dos experimentos de 8 °C (Exp. 2 =  $52.69 \pm 1.75$ , Exp. 3 =  $44.83 \pm 0.90$ ) ( $p < 0.05$ ). La sobrevivencia promedio fue significativamente más baja en la duración de 15 ( $28.76 \pm 11.25$ ) y 20 minutos ( $26.73 \pm 11.19$ ) ( $p < 0.05$ ) que en las duraciones de 5 ( $33.79 \pm 9.86$ ) y 10 minutos ( $33.47 \pm 10.20$ ), las cuales no mostraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre si (Anexo 3). Sin embargo, la interacción de la temperatura X duración, fue significativa ( $p < 0.05$ ) (Tabla 5). Los análisis estadísticos no se llevaron a cabo con los datos relativos al control, ya que se observaron datos por arriba del 100% (Figura 12b).

Tabla 4.- ANDEVA de tres vías del porcentaje de sobrevivencia en larvas de cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (SS = suma de cuadrados; g.l = grados de libertad; MS = cuadrado medio; F = F de Fisher; p = nivel de significancia).

Efectos	ANDEVA				
	SS	g.l	MS	F	p
<b>Temperatura</b>	7045,63	3	2348,54	265,931	0,000000
<b>Duración</b>	274,89	3	91,63	10,375	0,000063
<b>Temperatura*Duración</b>	182,34	9	20,26	2,294	0,040670
<b>Error</b>	282,60	32	8,83		

\* El análisis se aplicó solamente a los resultados obtenidos a los 5 minutos DF

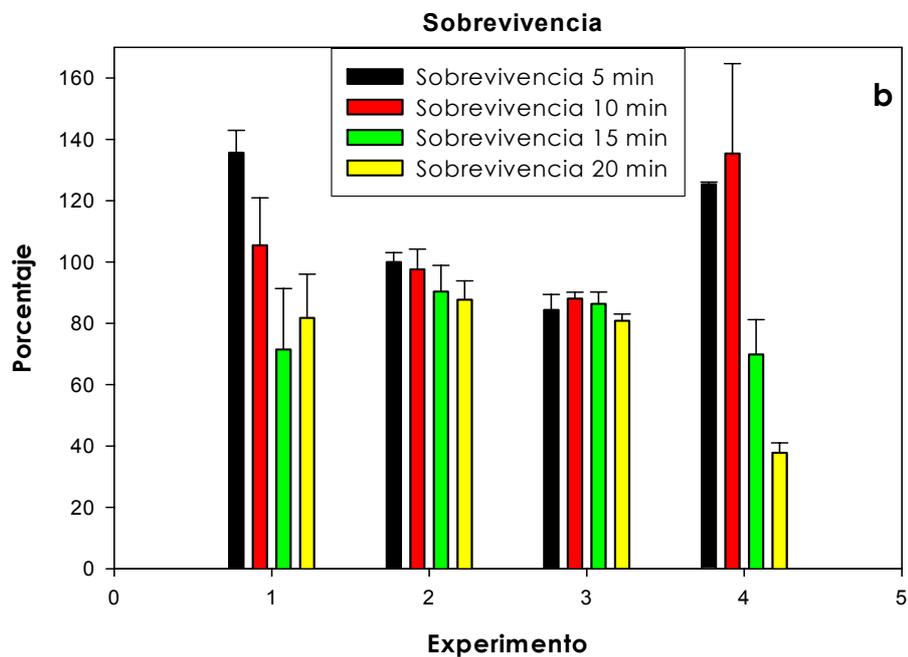
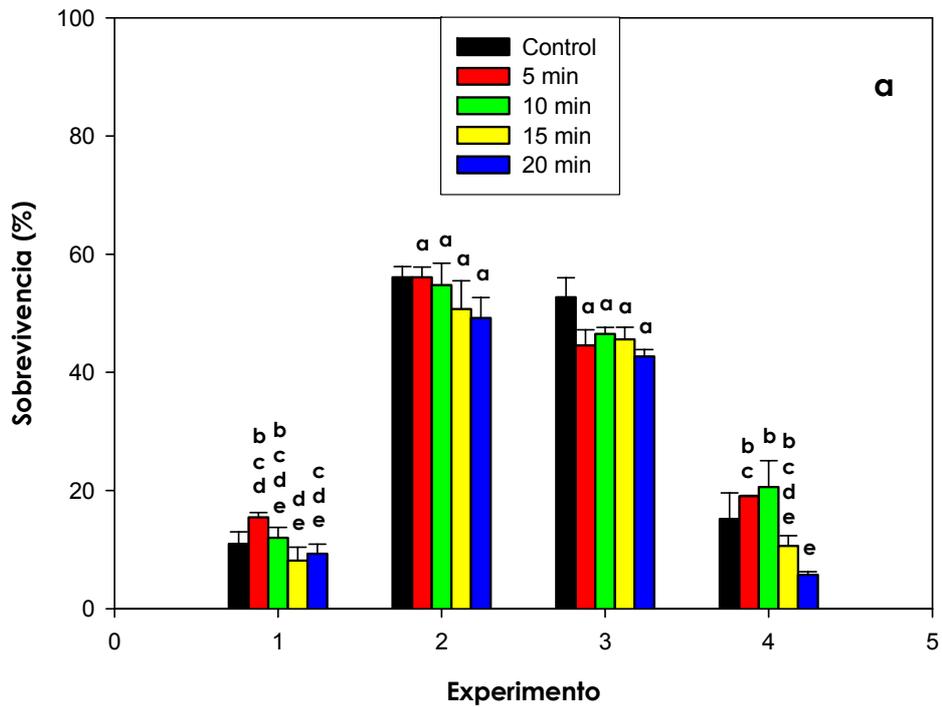


Figura 12. Porcentaje de sobrevivencia (promedio  $\pm$  error estándar; n = 3) obtenido por duración en los diferentes experimentos. Cuando el tratamiento se aplicó 5 minutos después de la fertilización. a) sobrevivencia absoluta, b) sobrevivencia relativa. 12°C = Exp. 1, 8°C = Exp. 2 y 3, 4°C = Exp. 4.

## DISCUSIÓN

### Métodos.

La obtención de un método práctico y efectivo para la inducción a la triploidía es necesario para poder considerar a la triploidía como una tecnología de aplicación comercial. En el presente trabajo, de los dos métodos de inducción, el método B fue el que arrojó los mejores resultados, especialmente en cuanto a la eclosión de larvas por réplica y definición de los picos obtenidos por medio de citometría de flujo. En cuanto al método A, este contaba con errores prácticos: 1) la aclimatación de los peces por un periodo de tiempo no resultó efectiva ya que al juntar muchos peces dentro del sistema por periodos prolongados, se enferman, 2) Es necesario usar un agente que acelere la separación entre los huevos fecundados y no fecundados (solución hipersalina), ya que si la separación no se lleva a cabo, el tratamiento se aplicará tanto a los huevos fecundados como los no fecundados, lo cual no permite evaluar de manera precisa el efecto del shock, así como del manejo (Piferrer *et al.*, 2003). 3) La distribución de los huevos en cada recipiente de inducción fue ineficaz debido al tiempo que se requiere cuando se emplea la pipeta para tomar los huevos. Finalmente, los problemas relacionados con los incubadores grandes fue probablemente el mayor obstáculo en la obtención de resultados favorables, debido principalmente al tamaño de estos incubadores, en relación con la pequeña

cantidad de huevos sembrados, así como el tiempo y espacio que ocupaba la preparación de los incubadores y la recolecta de larvas en cada experimento. Es importante mencionar, que los resultados utilizados en el presente trabajo consistieron solamente de aquellos obtenidos empleando el método B.

### Triploidía y tiempo de aplicación del shock (TDF).

El tiempo de aplicación del shock después de la fertilización o TDF, es, de acuerdo con Felip *et al.* (1997) el factor más importante en un experimento de inducción a la triploidía, ya que los procesos de la meiosis interrumpidos por el shock térmico, ocurren a un tiempo determinado después de la fertilización para cada especie en particular. En este sentido, aun los cambios más pequeños en el TDF pueden aumentar o disminuir significativamente los porcentajes de triploidía obtenidos a una misma temperatura y duración. Lo anterior se observó de manera clara en este trabajo, pues los experimentos en los que se utilizó un TDF de 10 y 15 min a una temperatura y duración determinadas no fueron exitosos en inducir la triploidía. En cambio, un TDF de 5 minutos resultó en 100% de triploidía en diferentes temperaturas y duraciones. Este resultado sugiere que en la cabrilla arenera la ventana de tiempo en la cual el shock es efectivo es muy corta. Varias especies parecen presentar al igual que en la cabrilla arenera una ventana relativamente corta: *Ctenopharyngodon idella*

(Cassani y Caton, 1985), *Oreochromis aureus* y *O. niloticus* (Don y Avtalion, 1988), *Pomoxis annularis* (Baldwin *et al.*, 1990), *Dicentrarchus labrax* (Felip *et al.*, 1997) y *Scophthalmus maximus* (Piferrer *et al.*, 2003).

En algunas especies, no obstante, el TDF no es la variable más importante debido al largo periodo dentro del cual se puede aplicar el shock y obtener altos porcentajes de triploidía. Chernenko (1986) menciona que en los salmones, existe un largo periodo desde el momento de la fertilización y activación del huevo, hasta el final de la segunda división meiotica, hasta más de 3 horas en *Oncorhynchus keta*. Thorgaard *et al.* (1981) en la trucha arcoiris *Salmo gairdneri* encontraron resultados similares. El shock se aplicó exitosamente 10 minutos DF debido a que se creía que la expulsión del cuerpo polar se llevaba a cabo inmediatamente después de la fertilización. Sin embargo, se obtuvieron altos porcentajes de triploidía también con un TDF de 40 min.

Es difícil en peces basarse sobre la salida del cuerpo polar para inducir la triploidía ya que después de la fertilización se puede observar solamente el segundo cuerpo polar. Los resultados exitosos obtenidos en invertebrados consisten en retener el segundo cuerpo polar cuando el 50% de los ovocitos presentan el cuerpo polar I fuera de la membrana de fertilización (Eudeline *et al.*, 2000; Puente-Carreón, 2004). Esta es la razón por la cual en peces los tiempos fijos han sido empleados con éxito.

Cassani y Caton (1985) mencionan que el TDF aplicado debe coincidir aproximadamente con el tiempo en el que se lleva a cabo la segunda división meiotica. De hecho el shock deja de ser efectivo para detener el cuerpo polar mucho antes de que éste se pueda observar fuera del ovocito. En la cabrilla arenera, el proceso ha podido ser detenido solamente cuando se aplicó el shock al TDF de 5 minutos. En cambio a 10 y 15 min el proceso de la meiosis esta demasiado avanzado para ser detenido aun sin haber observado todavía el cuerpo polar fuera del ovocito. El proceso de la meiosis II debe detenerse en una etapa muy temprana para ser efectiva la retención del segundo cuerpo polar. Felip *et al.* (1997) intentaron inferir el tiempo de salida del segundo cuerpo polar en *Dicentrarchus labrax* en base a sus resultados de triploidía. Sugirieron que probablemente se iniciaba 6 minutos DF y tardaba al menos hasta los 10 minutos DF debido a que no encontraron larvas triploides utilizando un TDF de 10 minutos. Cabe mencionar que no reportan la observación de la salida del cuerpo polar. En base a los presentes resultados, es muy probable que el tiempo de 10 minutos DF haya sido subestimado.

En la cabrilla arenera se ha observado una amplia variación en la salida del segundo cuerpo polar, esta variación puede explicarse por haber utilizado el desove de varias hembras. Desafortunadamente, los tiempos obtenidos de la salida del segundo cuerpo polar en la cabrilla

arenera no pueden ser comparados, ya que no se encontraron antecedentes en otras especies de peces.

### Triploidía y temperatura del shock

La temperatura del shock, como se mencionó previamente, es otro factor muy importante en un experimento de inducción a la triploidía. Chernenko (1986) y Holmerfjord y Refstie (1997), sugieren que para que un tratamiento sea efectivo, la temperatura del shock (caliente o frío) debe estar cercana a los niveles letales (temperaturas sub-letales) de cada especie en particular. Lo anterior se puede observar claramente en el trabajo de Johnstone (1985), en el cual, todos los huevos sometidos a 30 °C por 20 min, con un TDF de 10 min murieron, en contraste un cambio de 2 grados (28 °C) con la misma duración y el mismo TDF resultó en un porcentaje de triploidía del 92%.

Se observa muy a menudo una relación significativamente inversa entre la temperatura del shock y el porcentaje de triploides obtenidos. En el presente trabajo se logró obtener un incremento en el porcentaje de larvas triploides en la temperatura de 8 y 4 °C con respecto a la temperatura de 12 °C. Felip *et al.* (1997) observaron diferencias significativas en el porcentaje de larvas triploides entre los grupos tratados a 0 °C ( $\approx$  90%) y los tratados a 2 °C ( $\approx$  50%), con un TDF de 5 min.

Arai y Wilkins (1987) señalan que más que la temperatura absoluta, el diferencial de temperatura que se crea entre la temperatura del shock y la temperatura del pre-shock es más importante que el valor de la temperatura en sí. En nuestro trabajo, un diferencial de 15-19 °C fue efectivo para inducir altos porcentajes de triploidía, mientras que en otros trabajos se han conseguido resultados similares con diferenciales de 10 o 12 °C (Piferrer *et al.*, 2003). Lo anterior puede explicar porqué en algunas especies que se desarrollan a temperaturas frías, como los salmones, el shock en frío no es efectivo para inducir la triploidía (Dubé *et al.*, 1990; Fast, 1998). En este caso el shock de presión (Brydges y Benfey, 1991), el shock en caliente (Utter *et al.*, 1983) o bien ambos (Teskeredzic *et al.*, 1993) han demostrado ser efectivos para inducir altos porcentajes de triploidía. Por otro lado, Felip *et al.* (1997) mencionan que el shock en frío parece ser más exitoso que el shock en caliente o el shock de presión para inducir la triploidía en peces marinos con huevos pelágicos, como es el caso de la cabrilla arenosa. Resultados similares en especies marinas, han sido observados por otros autores (Colombo *et al.*, 1995; Holmerfjord y Refstie, 1997; Piferrer *et al.*, 2000).

### Triploidía y duración de tratamiento

Johnstone (1985) menciona que cuando la temperatura del shock térmico, en este caso frío, se reduce, se incrementan los porcentajes de triploidía

obtenidos a duraciones más cortas. Por lo cual, se puede deducir que dentro de un rango de temperaturas (dependiendo de la especie) existen varias duraciones a un TDF determinado, que podrían resultar en porcentajes de triploidía equivalentes. En el presente trabajo, se observaron porcentajes de triploidía del 100% tanto en la temperatura de 4 °C con una duración de 10 minutos como con la temperatura de 8 °C con una duración de 15 minutos. En el mismo sentido, Felip *et al.* (1997) mencionan que en shocks de corta duración, las tasas de organismos triploides son afectadas marcadamente por la temperatura. Mientras que en shocks de 10 min o más las tasas de organismos triploides son más reproducibles a diferentes temperaturas. Lo anterior se pudo comprobar en el presente trabajo, ya que la temperatura de 4 °C fue la única que presentó larvas triploides con la duración más corta (5 min). Mientras que las tres temperaturas presentaron larvas triploides consistentemente en las duraciones más largas (10, 15 y 20 min).

#### Triploidía y calidad del desove.

En el presente trabajo se observó una variación en los porcentajes de triploidía obtenidos, especialmente en la duración de 10 minutos, en el experimento de 8 °C y en la duración de 15 minutos en el experimento de 4 °C. Varios factores pueden provocar variación en los porcentajes de triploidía obtenidos.

Una fuente de variación muy importante en un experimento de inducción a la triploidía es el desove utilizado, ya que el estatus y origen de éste es determinante para el éxito de este proceso experimental. Diaz *et al.* (1993) no recomiendan usar los desoves de varias hembras ya que el grado de maduración puede variar entre hembras aún cuando han sido obtenidos hormonalmente. Aunque en algunos casos puede utilizarse el desove de una sola hembra (Thorgaard *et al.*, 1981; Fast 1998; Piferrer *et al.*, 2003), por lo general, como en el presente trabajo, se usan desoves provenientes de varias hembras (Chourrout, 1984; Solar *et al.*, 1984; Dubé *et al.*, 1990; Brydges y Benfey, 1991; Teskeredzic *et al.*, 1993; Felip *et al.*, 1997).

Cassani y Caton (1985) sugieren que una tendencia genética hacia la retención del cuerpo polar o bien una susceptibilidad hacia el shock térmico puede ser un factor que contribuye a la inconsistencia de resultados en los porcentajes de triploidía o sobrevivencia observados. Por lo que es importante después de desarrollar una tecnología y se requiere su optimización identificar a las hembras que producen consistentemente huevos que responden positivamente al shock térmico, en este caso al shock en frío. Dubé *et al.* (1990) mencionan que la inconsistencia en los resultados obtenidos con un mismo tratamiento ha sido observada muchas veces por diferentes autores, en diferentes especies (Lincoln *et al.*, 1974; Thorgaard *et al.*, 1981; Cassani y Caton, 1985) y puede estar relacionada con otros factores tales la fragilidad relativa de los huevos utilizados.

Teskeredzic *et al.* (1993) también sugieren que el efecto del shock térmico (frío o caliente) está relacionado íntimamente con el tamaño del huevo. Es decir, el shock afectará de manera diferencial a los huevos de tamaños menores que aquellos huevos de tamaño mayor. La hipótesis anterior se apoya experimentalmente en el hecho de que al aumentar la intensidad del tratamiento y duración del shock, el porcentaje de triploides obtenidos se incrementa. Esta hipótesis puede explicar porqué en el presente trabajo, se obtuvieron triploides en porcentajes mayores en la temperatura de 8 y 4°C, que en la temperatura de 12°C.

Por último, Felip *et al.* (1997) sugieren que pequeñas diferencias en la temperatura, en combinación con las ya mencionadas variaciones en el grado de maduración de los huevos utilizados, pueden ser responsables por las diferencias en los porcentajes de triploidía registradas bajo condiciones similares de shock en frío. Aunque en el presente trabajo, la variación en la temperatura del shock se mantuvo más controlada ( $\pm 0.2$  °C) que en trabajos anteriores ( $\pm 0.5$  °C) (Felip *et al.*, 1997; Piferrer *et al.*, 2003), pequeñas variaciones se pudieron haber presentado debido a una falta de homogeneización del agua dentro de la hielera en ciertos momentos (especialmente al momento de agregar bolsas de hielo).

El uso de la triploidía de manera comercial puede estar comprometido debido a la considerable variabilidad que se presenta en los resultados obtenidos a un tratamiento determinado (Shelton *et al.*,

1986). A este respecto, Piferrer *et al.* (2003) sugieren que en un trabajo de inducción a la triploidía, cada experimento sea repetido al menos tres veces con desoves de diferentes hembras para evaluar la posible variabilidad entre ellos. Desafortunadamente, en el presente trabajo, se logró este número de repeticiones solamente con la temperatura de 8°C. Con las temperaturas de 12°C y 4°C, no se pudo repetir más de dos veces debido a que la temporada reproductiva de *P. maculatofasciatus* llegó a su final en el mes de Mayo (Lluch-Cota, 1995; Avilés-Quevedo *et al.*, 1995) antes de poder completar los últimos experimentos.

### Sobrevivencia y temperatura

El TDF óptimo, así como la temperatura y la duración del tratamiento térmico deben ser determinados para cada especie en particular, ya que no solo el porcentaje de triploidía se ve afectado, sino también el número de larvas viables obtenidas (Cassani y Caton, 1985). En el presente trabajo, se observaron diferencias significativas entre las tres temperaturas siendo la temperatura de 8°C la que resultó en menos mortalidad. No es un resultado típico, ya que en otros trabajos, la sobrevivencia disminuye conforme aumenta la intensidad del tratamiento (Johnstone, 1985; Felip *et al.*, 1997; Piferrer *et al.*, 2003). Sin embargo, la baja sobrevivencia de los tratamientos triploides en la temperatura de 12°C se puede explicar por el hecho de que la sobrevivencia en el control fue también muy baja.

## Sobrevivencia y TDF

En algunos casos, una baja sobrevivencia se observa cuando el shock es aplicado demasiado rápido después de la fertilización (Johnstone, 1985; Piferrer *et al.*, 2003). Se argumenta que el shock puede interferir o perturbar eventos que se llevan a cabo en el ovocito relacionados con el reinicio de la meiosis. Otras razones para explicar este decremento, pueden obedecer a la falta de tiempo, ya sea para permitir una correcta separación entre los huevos fecundados y no fecundados, o bien para asegurar que el espermatozoide entre en contacto con el huevo. En el presente trabajo, la aplicación del tratamiento a los 5 minutos no resultó en altas mortalidades comparado con lo que se obtuvo en los controles de cada experimento.

## Sobrevivencia y duración del tratamiento

La sobrevivencia obtenida en el presente trabajo sufrió un decremento significativo conforme aumentó la duración del tratamiento. Varios autores han reportado esta tendencia en otras especies (Johnstone, 1985; Holmerfjord y Refstie, 1997; Piferrer *et al.*, 1997). Lo anterior se traduce en un decremento de la sobrevivencia conforme el porcentaje de triploides aumenta. Esta disminución probablemente obedece a uno o ambos de los siguientes factores; un grado de endogamia resultado de la retención del segundo cuerpo polar o bien la intensidad del tratamiento,

en este caso la duración. El incremento en el número de embriones abortados, la incidencia relativa de deformidades en los alevines y por ultimo, el lento crecimiento comparativamente de los organismos triploides en algunas especies parecen sustentar la primera opción (Solar *et al.*, 1984). La interacción observada entre la temperatura y la duración proviene del hecho de que a 8°C, no hay diferencias entre las diferentes duraciones. Sin embargo, en las temperaturas de 12°C y particularmente 4°C, la sobrevivencia disminuyó en las duraciones más largas (15 y 20 minutos). La sobrevivencia obtenida en estas temperaturas es muy similar entre si, especialmente es importante recalcar la similitud entre la duración de 20 minutos en la temperatura de 4°C con las duraciones más largas de la temperatura de 12°C, ya que esta fue la más baja observada. No obstante, a 12°C como se menciona previamente, la calidad del desove no fue muy buena, lo cual se reflejó en la baja sobrevivencia observada en el control. Lo anterior sugiere que la similitud entre la sobrevivencia de ambas temperaturas no es debida al efecto de la duración del tratamiento, tanto como a la calidad del desove.

## CONCLUSIONES

- De los tres TDF experimentados, el TDF de 5 minutos es el único efectivo para inducir la triploidía en la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*
- Las temperaturas de 8 y 4 °C son suficientemente bajas para alcanzar 100% de triploidía.
- Conforme la temperatura decrece, se obtienen triploides con tratamientos de corta duración.
- Un diferencial de 15°C entre la temperatura de los tanques de reproductores y la temperatura del shock fue efectivo para inducir altos porcentajes de triploidía.
- La duración del tratamiento provoca un efecto negativo en la sobrevivencia al mismo tiempo que provoca un incremento en los porcentajes de Triploidía.

## RECOMENDACIONES

- Mejorar el sistema de repartición de huevos dentro de los diferentes tratamientos, para evitar la variabilidad en el número de huevos colocados.
- Refinar la calidad de las gráficas obtenidas con el citómetro de flujo, a través de estudios posteriores con organismos triploides.
- Estudiar el tratamiento exitoso en desoves individuales, para confirmar los resultados obtenidos.
- Realizar un estudio sobre el desarrollo de larvas triploides, su crecimiento hasta juveniles y su maduración gonádica.

## BIBLIOGRAFÍA

- **Aguado**, C. y S. C. Cuartero (Eds.) 2001. Diccionario esencial de las ciencias. Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Editorial Espasa Calpe, S. A. Madrid, España. 1122 p.
- **Aldridge**, F. J. Marston, R. Q. y J. V. Shireman. 1990. Induced triploids and tetraploids in bighead carp *Hypophthalmichthys nobilis*, verified by multi-embryo cytofluorometric analysis. *Aquaculture*, 87: 121-131.
- **Alvarez-Gonzales**, C. A. 2003. Actividad enzimática digestiva y evaluación de dietas para el destete de larvas de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Percoidei: Serranidae). Tesis de Doctorado. IPN-CICIMAR. 164 p.
- **Allen**, S. K. Jr. 1983. Flow cytometry: Assaying experimental polyploidy fish and shellfish. *Aquaculture*, 33: 317-328
- **Allen**, S. K., Jr. y J. G. Stanley. 1979. Polyploid mosaics induced by cytochalasin B in landlocked Atlantic Salmon *Salmo salar*. *The American Fisheries Society*, 108: 462-466
- **Allen**, S. K. Jr. y J. G. Stanley. 1983. Ploidy of hybrid grass carp X bighead carp determined by flow cytometry. *The American Fisheries Society*, 112: 431-435.

- **Allen**, S. K. Jr., Downing, S. L. y K. K. Chew. 1989. Hatchery manual for producing triploid oyster. University of Washington Press, 27 p.
- **Allendorf**, F. W. y G. H. Thorgaard. 1984. Tetraploidy and evolution of salmonid fishes. pp. 1-53. En: Evolutionary genetics of fishes (ed. B.J. Turner), Plenum, New York.
- **Arai**, K. y N. Wilkins. 1987. Triploidization of brown trout (*Salmo trutta*) by heat shocks. *Aquaculture*, 64: 97-103.
- **Avilés-Quevedo**, A., U. Macgregor-Pardo, R. Rodríguez-Ramos, O. Hiraes, M. Huerta-Bello y M. Izwa. 1995. Biología y cultivo de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Steindachner, 1876). JICA, SEPESCA, INP. México. 85 p.
- **Baldwin**, N. W., Busack, C. A. y K. O. Meals. 1990. Induction of triploidy in white crappie by temperature shock. *The American Fisheries Society*, 119: 438-444.
- **Basavaraju**, Y., Mair, G. C., Kumar, H. M., Kumar, S. P., Keshavappa, G. Y. y D. J. Penman. 2002. An evaluation of triploidy as a potential solution to the problem of precocious sexual maturation in common carp, *Cyprinus carpio*, in Karnataka, India. *Aquaculture*, 204: 407-418.
- **Benfey**, T. 2001. Use of sterile triploid Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) for aquaculture in New Brunswick, Canada. *Journal of Marine Science*, 58: 525-529.

- **Benfey**, T. J. y E. M. Donaldson. 1988. Triploidy in the culture of Pacific Salmon. pp 549-554. En Proc. Aquaculture International Congress, Vancouver, Canada: Sept. 6-9, 1988.
- **Benfey**, T., McCabe, E. L. y P. Pepin. 1997. Critical thermal maxima of diploid and triploid brook charr, *Salvelinus fontinalis*. Environmental Biology of Fishes, 49: 259-264.
- **Benfey**, T. J., Sutterlin, M. A. y R. J. Thompson. 1984. Use of erythrocyte measurement to identify triploid salmonids. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 41: 980-984.
- **Brydges**, K. y T. J. Benfey. 1991. Triploid brown trout (*Salmo trutta*) produced by hydrostatic pressure shock. Bulletin of the Aquaculture Association of Canada, 91-3.
- **Carter**, C. G., McCarthy, I. D., Houlihan, D. F., Johnstone, R., Walsingham, M. V. y A. I. Mitchell. 1994. Food consumption, feeding behaviour, and growth of triploid and diploid Atlantic salmon, *Salmo salar* L., parr. Canadian Journal of Zoology, 72: 609-617.
- **Cassani**, J. R. y W. E. Caton. 1985. Induced triploidy in grass carp, *Ctenopharyngodon idella* Val. Aquaculture, 46: 37-44.
- **Chernenko**, E. V. 1986. Induction of triploidy in Pacific salmon (salmonidae). Scripta Technica, Inc. 124-130.
- **Chourrouf**, D. 1984. Pressure-induced retention of second polar body and suppression of first cleavage in rainbow trout: production of all-

triploids, all-tetraploids, and heterozygous and homozygous diploid gynogenetics. *Aquaculture*, 36: 111-126.

- **Chourrout**, D. 1988. Induction of gynogenesis, triploidy, and tetraploidy in fish. *Atlas of science: Animal and plant Sciences*, 65-70.
- **Colombo**, L., Barbaro, A., Libertini, A., Benedetti, P., Francescon, A., Y I. Lombardo. 1995. Artificial fertilization and induction of triploidy and meiogynogenesis in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. *Journal of Applied Ichthyology*, 11: 118-125.
- **Desrosiers**, R. R., Gérard, A., Peignon, J. M., Naciri, Y., Dufresne, L., Morasse, J., Ledu, C., Phélipot, P., Guerrier, P. y F. Dubé. 1993. A novel method to produce triploids embryos in bivalve molluscs by the use of 6-Dimethylaminopurine. *Journal of Experimental Biology and Ecology*, 170: 29-43.
- **Don**, J. y R. R. Avtalion. 1988, Comparative study on the induction of triploidy in tilapias, using cold- and heat shock techniques. *Journal of Fish Biology*, 32: 665-672.
- **Downing**, S. L. y Allen, S. K. Jr. 1987. Induced triploidy in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Optimal treatments with cytochalasin B depend on temperature. *Aquaculture*, 61: 1-15.
- **Dubé**, P., Blanc, J. M., Chouinard, M. y J. De la Noüe. 1990. Triploidy induced by heat shock in brook trout (*Salvenilus fontinalis*). *Aquaculture*, 92: 621-624.

- **Eudeline**, B. Allen, S .K. Jr. y X. Guo. 2000. Optimization of tetraploid induction in Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, using first polar body as a natural indicator. *Aquaculture*, 187: 73-84.
- **Fast**, A. W. 1998. Triploid Chinese Catfish. Aquafarmer information sheet. Center for Tropical and Subtropical Aquaculture, 134.
- **Felip**, A., Zanuy, S., Carrillo M., Martínez, G., Ramos, J. y F. Piferrer. 1997. Optimal Conditions for the induction of triploidy in the sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Aquaculture*, 152: 287-298.
- **Felip**, A., Zanuy, S., Carrillo, M. y F. Piferrer. 1999. Growth and gonadal development in triploid sea bass (*Dicentrarchus labrax*) during the first two years of age. *Aquaculture*, 173: 389-399.
- **Felip**, A., Piferrer, F., Zanuy, S. y M. Carrillo. 2001. Comparative growth performance of diploid and triploid European sea bass over the first four spawning seasons. *Journal of Fish Biology*, 58: 76-88.
- **Galbreath**, F. P., St. Jean, W., Anderson, V. y G. H. Thorgaard. 1994. Freshwater performance of all-female diploid and triploid Atlantic salmon. *Aquaculture*, 128: 41-49.
- **Garrido-Ramos**, M., De la Herrán, R., Lozano, R., Cardenas, S., Ruiz-Rejón, C. y M. Ruiz-Rejón. 1996. Induction of triploidy of gilthead seabream (*Sparus aurata*) by means of heat shock. *Journal of Applied Ichthyology*, 12: 53-55.

- **Gervai**, J., S. Péter, A. Nagy, L. Horváth y V. Csányi. 1980. Induced triploidy in carp, *Cyprinus carpio* L. *Journal of Fish Biology*, 17: 667-671.
- **Grier**, H. J. y R. G. Taylor. 1998. Testicular maturation and regression in the common snook. *Journal of Fish Biology*, 53: 521-542.
- **Gold**, J. R. y R. Ellison. 1982. Silver staining for nucleolar organizing regions of vertebrate chromosomes. *Stain Technology*, 58: 51-55.
- **Hasting**, P. A. 1989. Protogynous hermaphroditism in *Paralabrax maculatofasciatus* (Pisces: Serranidae) *Copeia*, 1: 184-188.
- **Heemstra**, P. C. 1995. *Serranidae*. En: (W. Fisher, F. Krupp, W. Schneider, C. Sommer; K. Carpenter y H. Niem. Eds). Guía FAO para la identificación de especies para los fines de pesca. Pacífico Centro-Oriente. Vol. III. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Rome. pp 1565-1613.
- **Hoar**, S. W. 1983. *General & Comparative Physiology*. Ed. Prentice-Hall. 851pp.
- **Holmerfjord**, I. y T. Refstie. 1997. Induction of triploidy in Atlantic halibut by temperature shocks. *Aquaculture international*, 5: 169-173.
- **Johnstone**, R. 1985. Induction of triploidy in Atlantic salmon by heat shock. *Aquaculture*, 49: 133-139.
- **Klug**, S. W. y M. R. Cummings. 1999. *Conceptos de genética*. 5ª Ed. Prentice Hall Iberia. S. R. L. 814 p.

- **Komen**, A., Uchimura, Y., Ieyama, H. y K. T. Wada. 1988. Detection of induced triploid scallop, *Chlamys nobilis*, by DNA microfluorometry with DAPI staining. *Aquaculture*, 69: 201-209.
- **Leary**, R. F., Allendorf, F. W., Knudsen, K. L. y G. H. Thorgaard. 1985. Heterozygosity and developmental stability in gynogenetic diploid and triploid rainbow trout. *Heredity*, 54: 219-225.
- **Lemoine**, Jr. H. L. y L. T. Smith. 1980. polyploidy induced in brook trout by cold shock. *The American Fisheries Society*, 109: 626-631.
- **Lincoln**, R. F., Aulstad, D. y A. Grammeltvedt. 1974. Attempted triploid induction in Atlantic salmon (*Salmo salar*) using cold shocks. *Aquaculture*, 4: 287-297.
- **Longo**, F. K. 1972. The effects of cytochalasin B on the events of fertilization in the surf clam, *Spisula solidissima*. *Journal of Experimental Zoology*, 182: 322-344.
- **Lluch-Cota**, D. 1995. Aspectos reproductivos de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Pisces:Serranidae) en Bahía Magdalena-Almejas, B.C.S., México. Tesis de Maestría. CICIMAR-IPN. 171 p.
- **Lou**, Y. D., y C. E. Purdom. 1984. Polyploidy induced by hydrostatic pressure in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Journal of Fish Biology*, 25: 345-351.

- **Martínez-Díaz**, S. F., Martínez-Pecero, R., Rosales-Velázquez, M. O., Alvarado-Castillo, R., Pérez-España, H. y J. Tucker, Jr.. 2001. Voluntary spawning, early development and completion of the life cycle of spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus* in the laboratory. *Journal of the World Aquaculture Society*, 32: 122-129.
- **Matus-Nivón**, E., R. Ramírez-Sevilla, J. L. Ortiz-Galindo, R. Martínez-Pecero y B. González-Acosta. 1989. Potencial Acuacultural de ocho especies de peces marinos del Pacífico mexicano, con base a su biología temprana. *Revista de Biología Tropical*, 37: 115-125.
- **Miller**, D. J. y R. N. Lea. 1972. Guide to the coastal marine fishes of California. *California Fish Bulletin USA*, 157: 249 pp.
- **Nagahama**, Y. 1983. The functional morphology of teleost gonads, pp. 223-276. En: (W.S. Hoar y D.J. Randall Eds.), *Fish Physiology*. Vol. IXA. Reproduction, Endocrine Tissues and Hormones. Academic Press, Inc.
- **Nai-Hsien**, Ch., Hui-Wen, H., Hung-yu, H., Wen-Hsin, L. y L. Chiu. 1993. Studies on methods of triploidy percentage analysis. *TML conference proceedings*, 3: 203-210.
- **Neal**, W. J., Neal, M. D., Noble, R. L. y M. V. McGee. 2004. Artificial propagation and induction of triploidy in largemouth bass *Micropterus salmoides* and ploidy discrimination using erythrocyte length. *Journal of the World Aquaculture Society*, 35: 46-54.

- **Nelson**, J. S. 1994. *Fishes of the world*. John Wiley & Sons, inc. USA. 600 pp.
- **Ocampo**, C. J. A. 2002. Desarrollo gonádico y actividad reproductiva de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Teleostei: Serranidae) en la Bahía de La Paz, Baja California Sur. Tesis de maestría. IPN-CICIMAR. 78 p.
- **Oda**, D. L., R. J. Lavenverg y M. Rounds. 1993. Reproductive biology of the three California species of *Paralabrax* (Pisces: Serranidae). Californian Cooperative for Oceanic Fish Investigations, 34: 122-132.
- **Ojolick**, E. J., Cusack, R., Benfey, J. T. y S. R. Kerr. 1995. Survival and growth of all-female diploid and triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) reared at chronic high temperature. *Aquaculture*, 131: 177-187.
- **Piferrer**, F., M. Cal, R., Álvarez-Blázquez, B., Sánchez, y P. Martínez. 2000. Induction of triploidy in the turbot (*Scophthalmus maximus*) I. ploidy determination and the effects of cold shocks. *Aquaculture*, 188: 79-90.
- **Piferrer**, F., R. M. Cal, Gomez, C., Bouza, C. y P. Martínez. 2003. Induction of triploidy in the turbot (*Scophthalmus maximus*) II. Effects of cold shock timing and induction of triploidy in a large volume of eggs. *Aquaculture*, 220: 821-831.

- **Pliego-Cortés**, H. S. y J. P. Alcántar-Vázquez. 2002. Inducción al desove en la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* Steindachner, 1868 (Pisces:Serranidae) mediante el análogo del Factor de Liberación de la Hormona Luteinizante (LHRH-a). Tesis de Licenciatura. UABCS. 72 p.
- **Puente-Carreón**, E. 2004. Inducción a la triploidía en el camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). Tesis de Maestría. IPN-CICIMAR. 50 p.
- **Qin**, J. G., Fast, A. W. y H. Ako. 1998. Growout performance of diploid and triploid chinese catfish *Clarias fuscus*. *Aquaculture*, 166: 247-258.
- **Quillet**, E., L. Foisil, B. Chevassus, D. Chourrout y F. G. Liu. 1991. Production of all-triploid and all-female brown trout for Aquaculture. *Aquatic Living Resources*, 4: 27-32.
- **Refslie**, T., V. Vassvik y T. Gjedrem. 1977. Induction of poliploidy in salmonids by Cytochalasin B. *Aquaculture*, 10: 65-74.
- **Rodríguez-Gutiérrez**, M. 1992. Técnicas de evaluación cuantitativa de la madurez gonádica en peces. AGT, México. 79 p.
- **Rodríguez-Gutiérrez**, M. y M. Nava-Bautista. 1992. La manipulación cromosómica y su aplicación en piscicultura. AGT, México. 59-75.
- **Ruiz-Verdugo**, C. A. 2000. Triploidía en almeja catarina (*Argopecten ventricosus*, Sowerby 1842): Inducción, crecimiento, gametogénesis y composición bioquímica. Tesis de Doctorado. CIBNOR. 103 p.

- **Sadler**, J., Wells, R. M. G., Pankhurst, M. P. y N. W. Pankhurst. 2000. Blood oxygen transport, rheology and haematological responses to confinement stress in diploid and triploid Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture*, 184: 349-361.
- **Sadovy**, Y. y D. J. Shapiro. 1987. Criteria for the diagnosis of hermaphroditism in fishes. *Copeia*, 1: 136-156.
- **Shelton**, C. J., MacDonald, A.G., y R. Johnstone. 1986. Induction of triploidy in rainbow trout using Nitrous Oxide. *Aquaculture*, 58: 155-159.
- **Sinnot**, E. W., Duna, L. C. y T. Dobzhansky. 1977. Principios de Genética. Ed. Omega. España. 581 p.
- **Smith**, L. T. y H. L. Lemoine. 1979. Colchicine-induced polyploidy in brook trout. *The progressive Fish-Culturist*, 41: 86-88.
- **Solar**, I. I., Donaldson, E. M. y G. A. Hunter. 1984. Induction of triploidy in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) by heat shock, and investigation of early growth. *Aquaculture*, 42: 57-67.
- **Szöllösi**, M. S., Kubiak, J. Z., Debey, P., De Pennart, H., Szöllösi, D. y B. Maro. 1993. Inhibition of protein kinases by 6-dimethylaminopurine accelerates the transition to interphase in activated mouse oocytes. *Journal of Cell Science*, 104: 861-872.
- **Teskeredzic**, E., Donaldson, M. E., Teskeredzic, Z., Solar, I. I. y E. McLean. 1993. Comparison of hydrostatic pressure and thermal

shocks to induce triploidy in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*).  
Aquaculture, 117: 47-55.

- **Thorgaard**, G. H. 1986. Ploidy manipulation and performance. Aquaculture, 57: 57-64.
- **Thorgaard**, G. H., Jazwin, M. E. y A. R. Stier. 1981. Polyploidy induced by heat shock in rainbow trout. The American Fisheries Society, 110: 546-550.
- **Thomas**, P. y R. Morrison. 1995. A method to asses triploidy in swim-up rainbow trout. Autasia Aquaculture, 9: 62-63.
- **Thompson**, B. Z., Wattendorf, R. J., Hestand, R. S. y J. L. Underwood. 1987. Triploid grass carp production. The progressive Fish-Culturist, 49: 213- 217.
- **Tyler**, C. R. y J. P. Sumpter. 1996. Oocyte growth and development in the teleost. Reviste of Fish Biology and Fisheries, 6: 287-318.
- **Utter**, F. M., Johnson, O. W., Thorgaard, G. H. y P. S. Rabinovitch. 1983. Measurement and potential applications of induced triploidy in Pacific salmon. Aquaculture, 35: 125-135.
- **Valenti**, R. J. 1975. Induced polyploidy in *Tilapia aurea* (Steindachner) by means of temperature shock treatment. Journal of Fish Biology, 7: 519-528.
- **Villee**, C. A. y V. G. Dethier. 1976. Biological principles and processes. W. B. Saunders Company. USA. 999 pp

- **Withler**, R. E., Clarke, C. W., Blackburn, J. y I. Baker. 1998. Effect of triploidy on growth and survival of pre-smolt and post-smolt coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Aquaculture*, 168: 413-422.
- **Zhang**, Q. y K. Arai. 1999. Aberrant meiosis and viable aneuploid progeny of induced triploid loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) when crossed to natural tetraploids. *Aquaculture*, 175: 63-76.
- **Zhenmin**, B., Quanqi, Z., Hai, W. y D. Jixon. 1994. Cytochalasin B induced triploidy in *Penaeus chinensis*. *China Oceanic Press*, 13: 261-267.

## Anexo 1.

Diferentes combinaciones de tratamientos utilizados en los experimentos llevados a cabo con el método A.

12, 8 y 4 °C											
4 TDF			8 TDF			12 TDF			16 TDF		
5	10	15	5	10	15	5	10	15	5	10	15

12, 8 y 4 °C											
10 TDF				15 TDF				20 TDF			
5	10	15	20	5	10	15	20	5	10	15	20

12, 8 y 4 °C											
7 TDF				12 TDF				17 TDF			
5	10	15	20	5	10	15	20	5	10	15	20

\* Tiempo después de la fertilización

Combinación de tratamientos empleados en el método B.

12, 8 y 4 °C											
5 TDF*				10 TDF				15 TDF			
5	10	15	20	5	10	15	20	5	10	15	20

\* Tiempo después de la fertilización

Para explicar de manera más clara las combinaciones utilizadas, se anexa a continuación un ejemplo:

12 °C, 5 min DF., 5 min duración = 12-5-5

12 °C, 5 min DF., 10 min duración = 12-5-10

12 °C, 5 min DF., 15 min duración = 12-5-15

12 °C, 5 min DF., 20 min duración = 12-5-20

8 °C, 10 min DF., 5 min duración = 8-10-5

8 °C, 10 min DF., 10 min duración = 8-10-10

8 °C, 10 min DF., 15 min duración = 8-10-15

8 °C, 10 min DF., 20 min duración = 8-10-20

4 °C, 15 min DF., 5 min duración = 4-15-5

4 °C, 15 min DF., 10 min duración = 4-15-10

4 °C, 15 min DF., 15 min duración = 4-15-15

4 °C, 15 min DF., 20 min duración = 4-15-20

## Anexo 2.

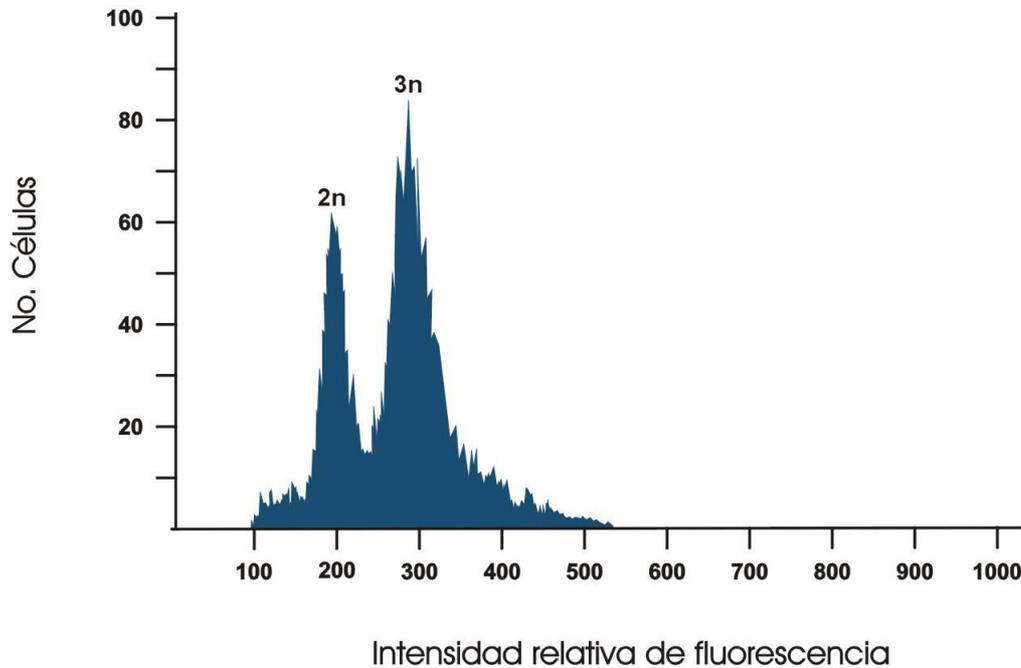


Figura a.- Representación de una grafica de conteo de células obtenida mediante citometría de flujo de la cabrilla arenera *Paratubax maculatofasciatus*. Grupo diploide, 2n; Grupo triploide, 3n

El porcentaje de triploidía se evaluó utilizando un análisis de picos en las gráficas obtenidas previamente con el citómetro de flujo (fig. a). Los límites de cada área se establecen mediante dos desviaciones estándar. Sin embargo, en este caso fue necesario hacer una corrección debido a la presencia de pequeños residuos orgánicos en las gráficas, los cuales no nos permitieron establecer los límites de manera más precisa (tabla a).

Tabla a.- Obtención de los valores en los grupos control y promedio de los triploides calculados a partir del grupo control.

Media (2n)	Coef. Var.	Desv. Std.	Media (3n)	Lim. Inf.	Lim. Sup.
192.32	11.21	22.42	288.48	-42.598	+42.598

\*  $3n = (192,32) \times 1.5$

\*\*Lim =  $1.9 \times (22.42)$ ;  $2n = 149.72 - 234.91$ ,  $3n = 245.88 - 331.07$

Con los datos obtenidos de la tabla anterior se obtienen nuevas gráficas empleando el citómetro de flujo, las cuales cuentan con los límites establecidos y el porcentaje correspondiente a cada tipo celular bajo el área de los picos (fig. b). Empleando estas gráficas se obtiene el porcentaje de triploidía (tabla b).

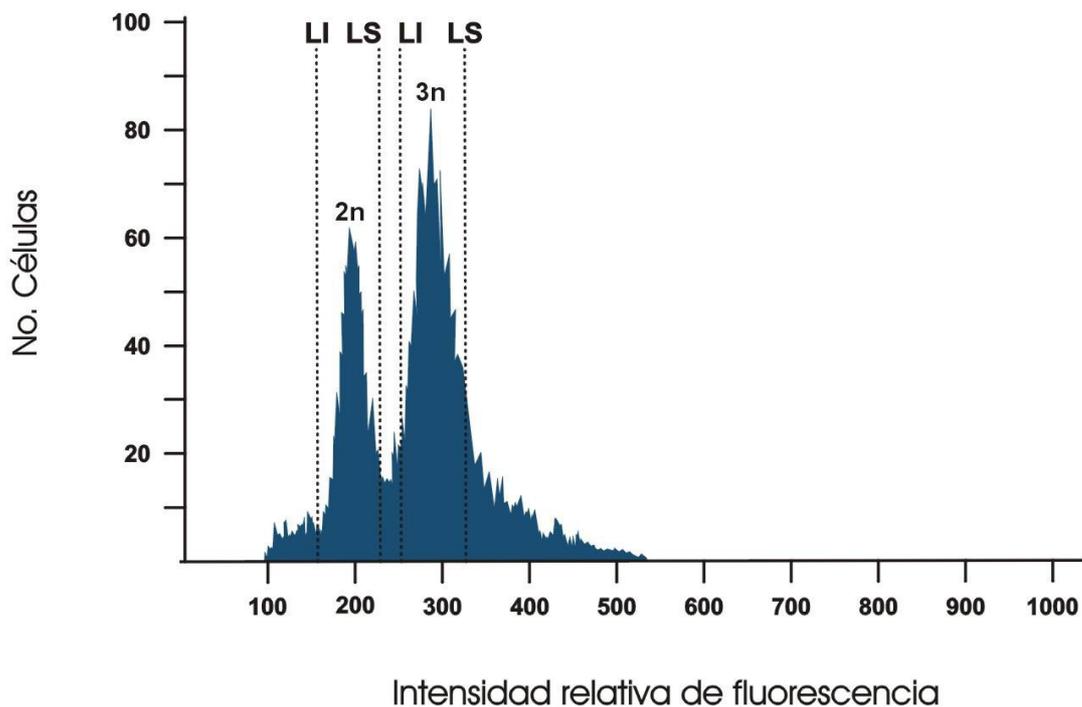


Figura b.- Representación de gráfica del conteo de células con los límites inferior (LI) y superior (LS) establecidos para organismos diploides (2n) y triploides (3n)

Tabla b.- Datos obtenidos con la ayuda del software del citómetro de flujo y determinación de los porcentajes de triploidía.

---

<b>Región</b>	<b>Área</b>	<b>Ploidía (%)*</b>
<b>2n</b>	<b>3893</b>	<b>34</b>
<b>3n</b>	<b>7557</b>	<b>66</b>

**Área Total = 11,450**

---

\* 2n = (3893/11450) X 100, 3n = (7557/11450) X 100

### Anexo 3.

Tabla 1.- Porcentaje de triploidía (T), sobrevivencia absoluta (S) y sobrevivencia relativa (S\*) en los diferentes tiempo de aplicación del tratamiento (TDF); 5, 10 y 15 min, tiempos de duración (D); 5, 10, 15 y 20 min y temperaturas (T°C); 12, 8 y 4 °C.

Exp.	T°C	Control	D	T	T		T	D		T	F	
					S	S*		S	S*		S	S*
1	12°C		5	0	NE	NE	0	NE	NE	0	NE	NE
			10	0	NE	NE	0	NE	NE	0	NE	NE
			15	43±14	NE	NE	0	NE	NE	0	NE	NE
			20	63±18	NE	NE	0	NE	NE	0	NE	NE
			5	0	15.4±0.8	135.6±7.2	0	9.74±2.21	85.5±19.4	0	7.1±0.7	62.7±6.3
2	12°C	11±2	10	0	12±2	105.4±15.5	0	13.36±0.99	117.4±8.7	0	11.4±0.6	100±6
			15	41±9	8.1±2.2	71.4±19.8	0	10.47±1.69	91.9±14.8	0	10.2±1.9	89.6±16.7
			20	58±21	9.3±1.6	81.7±14.2	0	13.49±1.89	118.5±16.6	0	10.4±2.8	91.5±24.9
			5	0	NE	NE	0	NE	NE	0	NE	NE
			10	90±10	NE	NE	0	NE	NE	0	NE	NE
3	8°C		15	100	NE	NE	0	NE	NE	0	NE	NE
			20	100	NE	NE	0	NE	NE	0	NE	NE
			5	0	56.1±1.7	100±3	0	49.63±4.26	88.4±7.5	0	58.2±3.5	103.8±6.2
			10	0	54.7±3.6	97.6±6.5	0	49.52±1.88	88.2±3.3	0	55.2±4.1	98.5±7.3
			15	92±8	50.6±4.7	90.3±8.5	0	55.98±0.96	99.7±1.7	0	53±5	95±9
4	8°C	56,1±1,8	20	92±8	49.2±3.4	87.6±6.1	0	47.19±4.28	84.1±7.6	0	47.7±2.9	85.1±5.3
			5	0	44.5±2.6	84±5	0	54±2	102.5±3.8	0	53.1±0.8	100.6±1.5
			10	75±14	47±1	88±2	0	53.6±0.2	101.5±0.3	0	54.3±1.5	102.9±2.9
			15	85±15	46±2	86.3±3.8	0	47.6±1.6	90.3±3.1	0	47.5±4.4	90.1±8.4
			20	100	42.6±1.1	80.8±2.2	0	39.5±1.5	75±3	0	41.8±1.7	79.2±3.3
5	8°C	52,7±3,3	5	20±10	NE	NE	0	NE	NE	0	NE	NE
			10	81±19	NE	NE	0	NE	NE	0	NE	NE
			15	100	NE	NE	0	NE	NE	0	NE	NE
			20	0	NE	NE	0	NE	NE	0	NE	NE
			5	30±15	19±0.1	125.4±0.7	0	PT	PT	0	PT	PT
6	4°C		10	100	20.6±4.4	35.4±29.3	0	PT	PT	0	PT	PT
			15	45±6	10.6±1.7	69.8±11.3	0	PT	PT	0	PT	PT
			20	0	5.7±0.5	37.8±3.2	0	PT	PT	0	PT	PT
			5	30±15	19±0.1	125.4±0.7	0	PT	PT	0	PT	PT
			10	100	20.6±4.4	35.4±29.3	0	PT	PT	0	PT	PT
7	4°C	15.2±4.4	15	45±6	10.6±1.7	69.8±11.3	0	PT	PT	0	PT	PT
			20	0	5.7±0.5	37.8±3.2	0	PT	PT	0	PT	PT
			5	30±15	19±0.1	125.4±0.7	0	PT	PT	0	PT	PT