



Instituto Politécnico Nacional
Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas
Maestría en Ciencias en Manejo de Recursos Marinos
Departamento de Desarrollo de Tecnologías



**INDUCCIÓN A LA TRIPLOIDÍA EN EL
CAMARÓN BLANCO *Litopenaeus vannamei*
(Boone, 1931).**

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. Eleonora Puente Carreón

La Paz, Baja California Sur, abril del 2004.



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 13:00 horas del día 23 del mes de abril 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:

"INDUCCIÓN A LA TRIPLOIDIA EN EL CAMARÓN BLANCO *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931)"

Presentada por el alumno:

PUENTE

Apellido paterno

CARREÓN

materno

ELEONORA

nombre(s)

Con registro:

B	0	1	1	2	8	3
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante al grado de:

MAESTRA 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

Silvie Dumas

DR. SILVIE DUMAS

PRESIDENTE

Benjamin Anguas Velez

DR. BENJAMIN ANGUAS VELEZ

SECRETARIO

Bertha Patricia Ceballos Vazquez

DRA. BERTHA PATRICIA CEBALLOS VAZQUEZ

SEGUNDO VOCAL

MC. Sergio Martinez Diaz

MC. SERGIO MARTINEZ DIAZ

TERCER VOCAL

DR. Cesar A. Ruiz Verdugo

DR. CESAR A. RUIZ VERDUGO

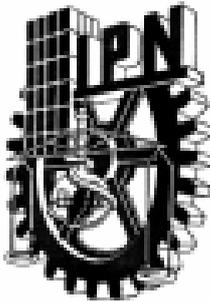
EL PRESIDENTE DEL COLEGIO

Francisco Arreguin Sanchez

DR. FRANCISCO ARREGUIN SANCHEZ



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 23 del mes Abril del año 2004, el (la) que suscribe ELEONORA PUENTE CARREÓN alumno(a) del Programa de MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS con número de registro B011283 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: "INDUCCIÓN A LA TRIPLOIDIA EN EL CAMARÓN BLANCO *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931)"

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: epuentec@ipn.mx

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


ELEONORA PUENTE CARREÓN

nombre y firma

Para los que son la razón de mi existencia a mis hijos:

Isaac Uriel

Uziel Zeraías

Ana Eleonora

A mis padres por su amor y apoyo:

Graciano Puente Moreno

Ana M. Carreón Hernández

A mis hermanos:

Arminda Patricia

Graciano

Ana María Araceli

José Antonio

Oscar David

*Gracias DIOS por todas tus
bendiciones.*

Para los que son la razón de mi existencia a mis hijos:

Isaac Uriel

Uziel Zeraías

Ana Eleonora

A mis padres por su amor y apoyo:

Graciano Puente Moreno

Ana M. Carreón Hernández

A mis hermanos:

Arminda Patricia

Graciano

Ana María Araceli

José Antonio

Oscar David

A G R A D E C I M I E N T O S

Al Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas (CICIMAR) y al Instituto Politécnico Nacional (IPN) por el apoyo económico brindado a través del Programa Institucional de Formación de Investigadores (PIFI) y al programa de becas tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el apoyo económico (No. de registro 165129).

A la empresa Acuacultores de La Paz (APSA) por las donaciones de los desoves del camarón blanco.

A la Dra. Ana María Ibarra directora del Laboratorio de Genética y a la Técnico Susana Ávila del CIBNOR, por todas las facilidades otorgadas en la determinación de la triploidía mediante citometría de flujo.

A mi Directora de Tesis Silvie Dumas por todo el apoyo y confianza que siempre me a otorgado.

A la comisión revisora por sus acertados comentarios: Dra. Bertha Patricia Cevallos V., Dr. Benjamín Anguas V., M. C. Sergio Martínez D. y Dr. César Arturo Ruiz V.

A mis compañeros de laboratorio de UPIMA, Juan Pablo Alcántar, Hugo Skiol y Sergio López, por su invaluable colaboración en la fase experimental del presente trabajo.

ÍNDICE GENERAL

LISTA DE FIGURAS.....	I
LISTA DE TABLAS.....	II
GLOSARIO.....	III
RESUMEN.....	VI
ABSTRACT.....	VI
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	8
JUSTIFICACIÓN.....	12
OBJETIVOS.....	14
MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
RESULTADOS.....	25
DISCUSIÓN.....	35
CONCLUSIONES.....	39
RECOMENDACIONES.....	40
BIBLIOGRAFÍA.....	41
ANEXO.....	48

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representación general de los eventos de la meiosis hasta la primera división en crustáceos.
- Figura 2.** Hembra grávida del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*.
- Figura 3.** Representación de los métodos I y II en la recolecta de los ovocitos del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*.
- Figura 4.** Cuerpos polares expulsados fuera de la membrana de fertilización (MF) en los ovocitos fertilizados del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*.
- Figura 5.** Sistema utilizado en la inducción de triploidía del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*.
- Figura 6.** Método utilizado en la inducción de shock en frío.
- Figura 7.** Cinética de la liberación del primer y segundo cuerpo polar en desoves de 30 hembras (H1-H30) del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*.
- Figura 8.** Tiempos (min) para cada hembra en la cual se presentan 50 y 100% de los ovocitos con el primer cuerpo polar fuera de la membrana de fertilización, así como 25, 50 y 100% con segundo cuerpo polar liberado en las 30 hembras de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*.
- Figura 9.** Porcentaje de sobrevivencia y triploidía de nauplio en el camarón blanco *Litopenaeus vannamei*.

LISTA DE TABLAS

- Tabla 1.** Número de ovocitos recolectados con los dos métodos utilizados en el camarón blanco *Litopenaeus vannamei*.
- Tabla 2.** Resultado de la evaluación del nivel de ploidía ($3n$ = triploide; $2n$ = diploide), obtenido cuando se aplicó el tratamiento al 50 y 100% de los ovocitos con el primer cuerpo polar (CP1), fuera de la membrana de fertilización (MF). La duración del tratamiento corresponde al momento cuando 25, 50 y 100% de los ovocitos presentaron el segundo cuerpo polar (CP2) liberado. La observación de los cuerpos polares se llevó a cabo en el control del desove.
- Tabla 3.** ANOVA de dos vías del porcentaje de triploidía en nauplios del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*.
- Tabla 4.** ANOVA de dos vías de la sobrevivencia de nauplios del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*.
- Tabla 5.** Porcentaje de eclosión, sobrevivencia y triploidía en nauplios del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*.

GLOSARIO

ADN.- Abreviatura de ácido desoxirribonucleico. Es la molécula que contiene y transmite la información genética de los organismos excepto en algunos tipos de virus (retrovirus). Está formada por dos cadenas complementarias de nucleótidos que se enrollan entre sí formando una doble hélice que se mantiene unidas por enlaces de hidrógeno entre bases complementarias. Los cuatro nucleótidos que forman el ADN contienen las bases adenina (A), guanina (G), citosina (C) y timina (T).

Aneuploide.- Célula o individuo con un número de cromosomas que no es múltiplo exacto del número haploide.

Alelo: Cada una de las formas en que puede presentarse un gen en un determinado locus de cromosomas homólogos.

Cariocinesis.- División del núcleo con reparto del material nuclear durante la mitosis y meiosis.

Cariotipo.- Dotación cromosómica completa de un individuo o una especie, que puede observarse durante la mitosis. El término también se refiere a la presentación gráfica de los cromosomas, ordenados en pares de homólogos y que se puede describir conforme a una nomenclatura convencional.

Centrómero.- Región del cromosoma que separa los dos brazos y en la que se unen las dos cromátidas. Es la región de unión a las fibras del huso acromático durante la división celular.

Cigoto.- Ovocito fecundado originado por la unión de dos gametos con fusión de sus núcleos.

Citocinesis.- División del citoplasma durante la mitosis y meiosis.

Citometría de flujo: Técnica de clasificación de células en que los cromosomas son teñidos con un marcador fluorescente que se une

selectivamente al ADN, permitiendo la diferente fluorescencia de cada cromosoma su separación física.

Cromátina: Material formado por ácidos nucleicos y proteínas que se observa en el núcleo de la célula en interfase.

Cromosoma: Estructura filamentosa autorreplicativa constituida por cromátina.

Cromosomas homólogos: Cromosomas que forman un par y se recombinan durante la meiosis. Tienen la misma estructura y los mismos loci pero distinto alelos, ya que cada uno procede de un progenitor.

Diploide: Célula u organismo con dos complementos cromosómicos, de forma que posee un número total de cromosomas que es doble del haploide. El número diploide se representa por $2N$.

División reduccional: Primera división meiótica, en la que el número de cromosomas se reduce de diploide a haploide.

Gameto: Célula germinal madura y funcional que contiene el número haploide de cromosomas de la célula somática. Los gametos provenientes de sexos opuestos (óvulo y espermatozoide) se fusionan para formar el cigoto.

Gen: Unidad de herencia que ocupa una posición concreta en el genoma (locus) y está constituido por una secuencia de ADN que codifica un ARN funcional.

Genoma: Complemento cromosómico básico que contiene toda la información genética del individuo.

Haploide: Célula u organismo con un solo complemento cromosómico, como sucede en los gametos tras la meiosis. El número haploide se simboliza con la letra N .

Heterocigoto: Célula o individuo diploide con alelos diferentes en uno o más loci de cromosomas homólogos.

Homocigoto: Célula o individuo con alelos idénticos en uno o más loci de cromosomas homólogos.

Locus (plural = loci): Posición que ocupa un gen en el genoma.

Meiosis: División celular que tiene lugar durante la formación de los gametos en especies de reproducción sexual, mediante la cual, una célula germinal diploide da lugar a cuatro gametos haploides.

Mosaico: Coexistencia en un individuo de dos o más líneas celulares con distinta constitución cromosómica pero que proceden del mismo cigoto.

Poliploide: Célula o individuo que tiene tres o más complementos cromosómicos (3N, 4N, etc.)

Selección Genética: Propagación preferencial y no aleatoria de los genotipos presentes en una población, debido a la diferente eficacia biológica determinada por cada una de ellos.

Triploide: Célula u organismo con tres complementos cromosómicos, de forma que posee un número total de cromosomas que es triple (3N) del haploide (N).

RESUMEN

En este trabajo se desarrolló una técnica de inducción a la triploidía en el camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, afinando el manejo de los ovocitos y aplicando el tratamiento con base a la salida de los cuerpos polares, en lugar de usar tiempos fijos de aplicación y de duración.

Los ovocitos se obtuvieron a partir de desoves individuales producidos en la empresa Acuacultores de La Paz (APSA). Se emplearon dos métodos de recolecta: 1) Se utilizó un recipiente de plástico de 24 L, con una ventana lateral recubiertas con malla de 100 μm introducida en un recipiente con agua de mar. Posteriormente se recolectaron los ovocitos mediante sifoneo, 2) Se bajó el nivel de agua del tanque de desove aproximadamente el 90%, los ovocitos se recolectaron directamente del agua residual con un recipiente de plástico de 1 L. Se obtuvo un mayor número de ovocitos con el segundo método, y además fue más práctico. Se estudió la cinética de la salida de los cuerpos polares en los desoves de 30 hembras. De cada hembra, se observaron aproximadamente 40 ovocitos al microscopio óptico registrando el número de ovocitos y el tiempo que presentaban el primer cuerpo polar (CP1) y el segundo cuerpo polar (CP2) fuera de la membrana de fertilización (MF). Se observó una gran variabilidad entre los desoves de las hembras en la liberación del CP1 (10 a 19 min) y para el CP2 (18 a 37 min). La inducción a la triploidía se realizó mediante shock en frío de 5, 7 y 10°C. La aplicación del tratamiento se realizó al 50 (CP1-50) y 100 % (CP2-100) de los ovocitos con el CP1 fuera de la MF, y se detuvo (duración), cuando el 25 (CP2-25), 50 (CP2-50) y 100% (CP2-100) de los ovocitos tenían el CP2 liberado. Los ovocitos se incubaron hasta la eclosión. Se cosecharon los nauplios y se preservaron a -4°C para su posterior análisis por citometría de flujo.

Obtuvimos triploides cuando el tratamiento se aplicó al CP1-50. No se obtuvieron triploides cuando se aplicó el tratamiento al CP1-100. Se detectaron diferencias significativas ($p < 0.05$), entre los porcentajes de triploidía en la temperatura (5°C = 7°C; 5°C > 10°C; 7°C = 10 °C). No hubo diferencias significativas ($p > 0.05$) para la duración ni para la interacción de la temperatura por duración en el porcentaje de triploidía. La sobrevivencia obtenida con la temperatura de 5°C y 7°C fue significativamente más baja ($p < 0.05$) que la obtenida a 10°C. La sobrevivencia no presentó diferencias significativas para la duración ni para la interacción de la temperatura por duración.

Para concluir este trabajo estamos proponiendo inducir la triploidía en el camarón blanco aplicando un shock frío de 5 o 7 °C. El shock debe aplicarse cuando el 50% de los ovocitos hayan expulsado el CP1 y pararse cuando el 50% presente el CP2 liberado.

ABSTRACT

The objective of the present study was to develop a protocol to induce triploidy in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Importance has been given to the manipulation of ovocytes and to the treatment application and duration time which has been based on the observation of the polar body extrusion instead of using a fixed time for application and duration.

Ovocytes were obtained from individual spawns produced in the farm Acuacultores de La Paz (APSA). Two methods to collect the eggs were compared 1) A 24-L plastic bucket with a lateral window covered by a 100 micras was introduced in a bigger recipient with seawater. The ovocytes were recolected in this bucket by siphoning. 2) The water level in the spawning tank was decreased in a 90%. The ovocytes were directly collected from the residual water with a 1L recipient. A significant higher number of ovocytes was obtained with the second method ($p = 0.01$), moreover, it was more practical. The kinetics of polar body extrusion was followed in the spawns of thirty females. For each spawn, approximately 40 ovocytes were observed with the optical microscope. The time and the number of ovocytes that presented the first polar body (CP1) and the second one (CP2), out of the fertilization membrane were registered until reaching 100 % of the ovocytes. A great variability between the different spawns was observed for the extrusion of the first polar body (10 to 19 min) and for the second one (18-37 min.). Triploidy induction was achieved by cold shock (5-7- and 10°C). The treatment was applied when 50 (CP1-50) and 100 % (CP1-100) of the ovocytes showed the CP1 out of the fertilization membrane. It lasts until 25 % (CP2-25), 50 % (CP2-50) and 100 % (CP2-100) of the ovocytes showed the CP2 out of the fertilization membrane. These eggs were incubated until hatching. Nauplios were sampled and preserved at -4°C. The triploidy level was analyzed by flow cytometry. Survival was determined using the number of hatched nauplios divided by the number of eggs that has been treated. The number of eggs in a 100 ml sample was evaluated volumetrically for each spawn.

Triploids were obtained when the treatment was applied at CP1-50. No triploid were obtained when the treatment was applied at CP1-100. Significant differences were observed for the triploidy percentage between temperature (5°C = 7°C; 5°C ≥ 10°C; 7°C = 10°C). No significant difference was observed for the duration of treatment for the triploidy percentage neither nor the interaction between temperature and treatment duration was not significant. Significant differences were also detected for the survival

between temperature. The survival obtained at 5 and 7°C were significantly lower than that observed at 10°C. No significant difference was observed for the duration of treatment neither nor the interaction between temperature and treatment duration was not significant. To induce triploidy in the Pacific white shrimp, we are thus proposing the following method: first, ovocytes must be sampled from the spawn and observed for the polar body extrusion. Cold shock of 5-7 °C has to be applied when 50 % of these ovocytes presented the first polar body out of the fertilization membrane. The treatment has to be stopped when 50% of the ovocytes showed the second polar body out of the fertilization membrane.

INTRODUCCIÓN

Los organismos poliploides presentan en sus células más de dos juegos de cromosomas. En la naturaleza en raras ocasiones se pueden presentar individuos poliploides. En acuicultura, tanto en peces (Thorgaard y Jazwin, 1981; Wolters *et al.*, 1982; Lincoln y Scott, 1983; Chrisman *et al.*, 1983; Utter *et al.*, 1983; Benfey y Sutterlin, 1984a; Dubé *et al.*, 1990; Varadaraj y Pandian, 1990; Aldridge *et al.*, 1990), como en moluscos (Beaumont y Fairbrother, 1991; Desrosiers *et al.*, 1993; Jiang *et al.*, 1993; Utting y Child, 1994) se han producido individuos poliploides, generalmente triploides, mediante tratamientos que se aplican a los ovocitos recién fertilizados. Un organismo triploide se vuelve estéril debido a una falla en el apareamiento de los juegos de cromosomas homólogos en el transcurso de la meiosis, provocada por la presencia de un tercer juego de cromosomas. La esterilidad se puede detectar por una falta total de producción de gametos pero también por la producción de gametos no funcionales o funcionales pero en número muy reducido. El interés por producir organismos triploides para acuicultura radica en que los organismos triploides pueden alcanzar tallas más grandes en menor tiempo que un organismo diploide (Stanley *et al.*, 1981; Guo y Allen, 1994a). Sin embargo, previo a la madurez sexual los organismos triploides crecen a la misma tasa que los diploides. Una vez alcanzada la madurez sexual los organismos diploides, especialmente las hembras, canalizan gran parte de la energía asimilada hacia la maduración gonádica y como consecuencia se reduce su tasa de crecimiento. En contraste, los organismos triploides, al ser estériles, canalizan dicha energía hacia la producción de tejido somático, como el músculo, por lo que su tasa de

crecimiento no disminuye. El mayor tamaño que se ha observado en los individuos triploides se puede explicar también, por lo menos en moluscos, por un fenómeno llamado gigantismo poliploide ya que las células triploides son más grandes que las diploides (Guo y Allen, 1994a).

El fundamento de los tratamientos para inducir la poliploidía se basa en el conocimiento de los procesos celulares que se realizan durante la meiosis y se aplican exclusivamente en el caso de las hembras. La meiosis se divide en dos etapas. La meiosis I se conoce como reduccional, los homólogos se aparean pero no se dividen los centrómeros; a cada célula hija es atraída un cromosoma homólogo. La meiosis II se conoce como ecuacional, las cromátidas de cada cromosoma se separan por una división del centrómero y migran cada una hacia una célula hija. Durante la ovogénesis se expulsa un juego de cromosomas en la meiosis I por medio del primer cuerpo polar y un segundo juego en la meiosis II por medio del segundo cuerpo polar, lo que resulta en una célula haploide, el ovocito (De Robertis *et al.*, 1973 ; Dayson, 1977) (Fig. 1).

La inducción a la triploidía se realiza mediante varios métodos, los cuales se pueden aplicar durante ambas fases de la meiosis, inhibiendo la formación del primer o segundo cuerpo polar (Fig. 1). Estas técnicas permiten la cariocinesis (división de los cromosomas) mientras que evitan la citocinesis (división del citoplasma), obteniendo un ovocito diploide, que al unirse con el pronúcleo haploide del esperma da lugar a la formación de un cigoto triploide (Allen *et al.*, 1989).

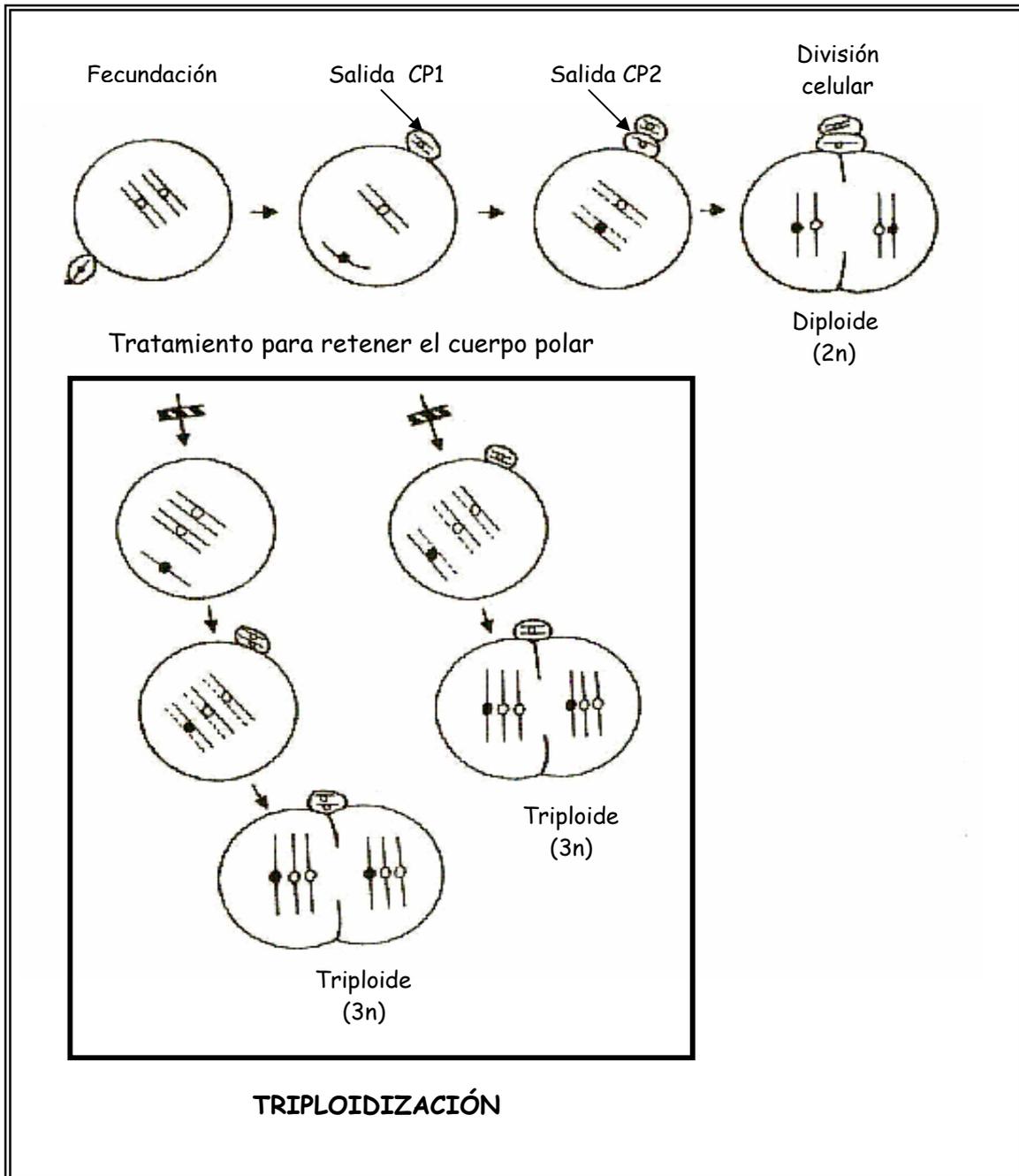


Fig. 1. Representación general de los eventos de la meiosis hasta la primera división celular y secuencias de la manipulación de poliploidía. CP1 = primer cuerpo polar; CP2 = segundo cuerpo polar. (Modificado de Beaumont, 1994)

Para inducir la triploidía se deben considerar algunos factores: a) Tipo de tratamiento y su intensidad, b) Tiempo de aplicación y duración del tratamiento. Los últimos dos factores están determinados por el tiempo que naturalmente toma el proceso meiótico.

a) Tipo de tratamiento.

Existen diversas técnicas:

i).- **Citocalasina B (CB)** es el químico más común utilizado en la inducción a la triploidía. Es un antibiótico extraído del hongo *Helminthosporium dematioideum*. La CB actúa inhibiendo la polimerización de la actina. Normalmente las fibras de actina producen la constricción necesaria para la formación de los cuerpos polares. En presencia de CB, el anillo contráctil no se forma y no hay citocinesis, inhibiendo así la reducción cromosómica durante la conclusión de la meiosis (Longo, 1972). La desventaja de este inductor es que es un compuesto sumamente tóxico (carcinogénico) y no se disuelve en agua de mar.

ii).- **6-dimetilaminopurina (6-DMAP)** actúa inhibiendo la rotación del huso y la expulsión del cuerpo polar (Szöllösi *et al.*, 1993). Tiene la ventaja de no ser carcinogénico y además se puede disolver en el agua de mar (Desrosiers *et al.*, 1993; Gérard *et al.*, 1994).

iii).- **Shock por presión hidrostática**, se utiliza para inducir la triploidía en los peces (Small y Benfey, 1987; Benfey *et al.*, 1988; Stillwell y Benfey, 1996; Wither *et al.*, 1998; Cotter *et al.*, 2000, Friars *et al.*, 2001; Kerby *et al.*, 2002). También se ha usado con éxito en bivalvos (Chaiton y Allen, 1985; Arai *et al.*, 1986). Se aplica una presión de 6000 a 10000 psi, generada por una prensa de laboratorio. El shock de presión disuelve las

fibras del huso que separa los cromosomas dentro de las células así como los filamentos de actina evitando la citocinesis (Allen *et al.*, 1989). Este método presenta la desventaja que solamente se pueden dar tratamiento a un pequeño volumen de ovocitos.

iv).- Shock con temperatura, es otro método para inducir la triploidía, puede ser shock en calor (26-32°C) o en frío (0-12°C). Estos métodos han tenido éxito en varias especies de peces (Lemoine y Smith, 1980; Arai y Wilkins, 1987; Felip *et al.*, 1997; Qin *et al.*, 1998; Bonnet *et al.*, 1999; Piferrer *et al.*, 2003) y crustáceos (ACUACOP, 1993; Dumas y Campos-Ramos, 1999; Li *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2003). El shock con temperatura no permite la formación de microfilamentos y microtúbulos, deteniendo el movimiento de los cromosomas así como la división celular (Downing y Allen, 1987). Este método presenta la ventaja de poder aplicarse a gran escala y no ser tóxico. Sin embargo, su éxito depende justo en el momento de aplicación durante la meiosis I o II.

b) Tiempo de aplicación y duración del tratamiento.

En la mayoría de los estudios de inducción a la triploidía, el tiempo preciso de la aplicación del tratamiento, así como la duración del mismo son el resultado de múltiples experimentos en los que ambos tiempos son modificados con el propósito de obtener el mayor porcentaje de triploides posible (Arai y Wilkins, 1987; Small y Benfey, 1987; Utting y Doyou, 1992; Xiang *et al.*, 1992a,b; Desrosiers *et al.*, 1993; Stillwell y Benfey, 1996; Felip *et al.*, 1997; Dumas y Campos-Ramos, 1999; Felip *et al.*, 1999; Ruiz-Verdugo *et al.*, 2000; Hertzler, 2002). El momento de aplicación y la duración del tratamiento, se puede también determinar basándose en la observación

directa de la salida de los cuerpos polares (Eudeline *et al.*, 2000a; Li *et al.*, 2003). El tiempo de aplicación del tratamiento esta muy relacionado con el desarrollo de los ovocitos ya que se trata de retener los cuerpos polares. Sin embargo, existe una asincronía en el desarrollo de los ovocitos cuando se trabaja con desoves de diferentes hembras el cual puede tener un impacto negativo sobre la retención de estos. Se ha observado que hay mayor éxito en producir triploides si se trabaja con el desove de una sola hembra ya que el desarrollo de los ovocitos tienen una mejor sincronía (Eudeline *et al.*, 2000b).

Determinación de la ploidía.

Para evaluar los niveles de poliploidía se utilizan diferentes técnicas:

i).- **Conteo de cromosomas o cariotipos**, es una forma directa de verificar el éxito del tratamiento. Contar el número de cromosomas se puede llevar a cabo en diferentes estadios del desarrollo de los individuos, desde ovocitos, embriones, juveniles y en adultos. En esta técnica se realizan preparaciones de las células en porta objetos, las cuales se tiñen y se observan al microscopio compuesto. Requiere de mucho tiempo en comparación con otras técnicas, pero es eficaz.

ii).- **Determinación del tamaño del núcleo de ciertas células**, es una técnica que se ha empleado con éxito en algunas especies de peces. Se mide el tamaño del núcleo, ya que en las células de los triploides el núcleo es 1.5 veces más grande en volumen que en las células diploides. Así, se mide directamente el núcleo con la ayuda de un microscopio óptico con micrómetro o con un sistema de análisis de imágenes. Esta técnica se emplea con éxito en eritrocitos de peces (Johnson *et al.*, 1984) y en células de la hemolinfa de

moluscos (Child y Watkins, 1994). Es una técnica económica pero se necesita mucho tiempo para llevarla a cabo. El núcleo de las células también puede ser medido por medio de un Contador de Partículas (Kerby y Harrell, 1990).

iii).- **Citometría de flujo**, es la técnica que se utiliza más en la actualidad en la producción comercial de poliploides. Es una técnica que se desarrolla en las investigaciones biomédicas para medir, el volumen del ADN en las células. Con la técnica de citometría de flujo se realiza la evaluación del contenido de ADN en las células, el cual debe teñirse previamente con DAPI (4, 6-diamidino-2-fenilindol), con lo que el ADN adquiere fluorescencia mediante el paso de un rayo láser. Los resultados obtenidos con esta técnica se grafican obteniendo diferentes picos a diferentes niveles de intensidad relativa de fluorescencia. El valor medio del contenido del ADN en células triploides es de aproximadamente 1.5 veces el de los diploides. El análisis de citometría de flujo es rápido, y requiere de pequeñas cantidades de tejido, se pueden examinar muchos organismos en un corto tiempo y la evaluación de la triploidía se realiza sin sacrificar el animal en estadio adulto.

El presente trabajo se diseñó de establecer un método eficiente de inducción a la triploidía. Se trabajó primero con los métodos de recolecta para obtener un número alto de ovocitos. Luego, se identificó la temperatura adecuada para el shock, así como se estableció el momento de aplicación y la duración del tratamiento a partir de la observación de la cinética de la liberación de los cuerpos polares en el camarón blanco *Litopenaeus vannamei*.

ANTECEDENTES

La producción de organismos triploides mediante shock de temperatura se ha llevado a cabo con mejores resultados en peces y crustáceos de importancia comercial, con la finalidad de obtener organismos estériles.

En peces dulceacuícolas, Lemoine y Smith (1980), indujeron la poliploidía en la trucha, *Salvelinus fontinalis*, aplicando shock en frío a $-1.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 horas en ovocitos recién fertilizados. El 33% de los individuos presentaron poliploidía en mosaico. Utilizando shock caliente ($29\text{ }^{\circ}\text{C}$) Arai y Wilkins (1987), indujeron la triploidía en la trucha café (*Salmo trutta*), aplicaron el tratamiento entre los 5 y 45 minutos postfertilización, con una duración de 10 min, obtuvieron el 77-91% de embriones triploides. Qin *et al.* (1998), indujeron al pez gato chino *Clarias fuscus*, con shock en frío de 4°C durante 20 minutos. Bonnet *et al.* (1999), utilizaron shock caliente para inducir la triploidía en la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) y la trucha café (*Salmo trutta*). Basavaraju *et al.* (2002), indujeron la triploidía en la carpa común (*Cyprinus carpio*), como una solución potencial en el problema de la maduración sexual precoz en esta especie. Aplicaron un shock caliente de 40°C con una duración de 1.5 min e iniciaron el tratamiento de 1 a 4 min., después de fertilizar los ovocitos.

En especies marinas, el shock con temperatura ha tenido también éxito, Felip *et al.* (1997), optimizan las condiciones para inducir la triploidía en la lobina de mar *Dicentrarchus labrax*. Utilizaron tres variables en los tratamientos: tiempo de aplicación, temperatura y duración del choque, factores importantes para el éxito en la inducción de la triploidía. Posteriormente, Felip *et al.* (1999), indujeron la triploidía en la misma especie, aplicaron el shock en frío a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ a los 5 min después de la fertilización, con

una duración de 10 min. Obtuvieron el 95-97% de organismos triploides. Piferrer *et al.* (2000), indujeron a la triploidía y determinan la poliploidía y los efectos del shock en frío en el lenguado (*Scophthalmus maximus*). Aplicaron el tratamiento 5 min, después de la fertilización de los ovocitos, con duraciones de 5, 10, 20 o 40 min, a 0, 2 o 4°C. Posteriormente, Piferrer *et al.* (2003), lograron inducir la triploidía a gran escala en la misma especie y estudiaron los efectos del shock en frío en diferentes momentos de aplicación del tratamiento. Obtuvieron el 100% de triploides cuando aplicaron el tratamiento 6.5 min, después de la fertilización, con una duración de 25 min a 0 y -1°C, con un 60% de sobrevivencia con respecto a los grupos control.

Producción de poliploides en Crustáceos.

Las investigaciones encaminadas a la producción de organismos triploides en crustáceos decápodos, no se encuentran muy desarrolladas como en peces y moluscos, ya que iniciaron solamente hace una década. El primer inductor químico utilizado con base a los éxitos obtenidos en peces y moluscos es la citocalasina B. Xiang *et al.* (1992a), indujeron a la poliploidía al camarón chino (*Penaeus chinensis*), obteniendo el 60% de individuos tetraploides. En 1994, Bao *et al.*, obtuvieron el 62.5% de organismos triploides hasta larva zoea en la misma especie, induciendo con CB (1.0 mg/L). El inicio del tratamiento fue a los 5-10 min, postfertilización con una duración de 15 min. Reportaron que a mayores concentraciones de CB, se producen embriones anormales. Una variante de la CB fue utilizado por Hertzler (2002), quien realizó un trabajo con citocalasina D (CD), para conocer la mínima concentración que permite inhibir la citocinesis en ovocitos de *Sicyonia ingentis*. A concentraciones de 0.5

a 0.8 μM de CD se inhibió por completo la citocinesis, concluyendo que en esta especie se puede inducir a la triploidía con este químico.

Norris *et al.* (2001), produjeron 90% de triploides del camarón Kuruma (*P. japonicus*), mediante el 6-DMAP y evaluaron los niveles de triploidía utilizando el citómetro de flujo en postlarvas de 10 días. Xiang *et al.* (1992b), realizaron un trabajo induciendo la triploidía a camarones peneidos de importancia comercial. Utilizaron el 6-DMAP e indicaron que hay tres factores importantes para el éxito en la inducción a la triploidía: inicio, concentración del inductor y duración, de los cuales, la concentración del inductor es de mayor importancia. Obtuvieron el 90% de triploidía en fase naupliar, el cual fue evaluado directamente por el conteo del número de cromosomas bajo el microscopio y también por citometría de flujo. El tratamiento más efectivo que obtuvieron en *P. chinensis*, fue con 300 μM de 6-DMAP, iniciando el tratamiento a los 20 min después de la fertilización y con una duración del tratamiento de 12 a 16 min.

Algunos autores han realizado la inducción utilizando shock con temperatura, ya que no producen ningún daño al hombre y no afecta al ambiente. El shock caliente se ha utilizado en especies como *P. indicus* (AQUACOP, 1993), para inducir a la triploidía, la temperatura que utilizaron fue de 30-44 °C, iniciando el tratamiento de 6 a 46 min (con intervalo de 2 min) con una duración del tratamiento de 1 a 7 min. El mayor porcentaje obtenido de triploidía al estadio de nauplio fue del 47%. En el camarón chino *P. chinensis*, Li *et al.* (1999) obtuvieron entre el 39 y 75% de triploides aplicando un shock caliente (28-32°C) durante 8 a 16 min e iniciando el tratamiento entre los 8 y 20 min después del desove. Li *et al.* (2003) indujeron la triploidía utilizando un tratamiento de shock caliente en el camarón chino

Fenneropenaeus chinensis, reportando un tratamiento óptimo de 29-32 °C, iniciando el tratamiento a los 18-20 min y con una duración de 10 min. Estos autores demostraron que estas condiciones pueden variar dependiendo de la temperatura del desove. Los niveles de triploidía fueron evaluados en el estadio naupliar mediante citometría de flujo, y se obtuvo más del 90% de triploidía. Concluyeron que el shock caliente es un método eficaz para inducir a la triploidía en esta especie ya que puede ser utilizado a grandes escalas, sin presentar un efecto dañino para el medio ambiente comparado con los inductores químicos.

En el camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, el único trabajo reportado en la inducción de triploides es el realizado por Dumas y Campos-Ramos (1999). Estos autores obtuvieron triploides aplicando un shock en frío a 10 °C, iniciando el tratamiento a 10 y 12 min después del desove, con duraciones de 10, 15 y 20 min. Obtuvieron una sobrevivencia del 62-88% en ovocitos tratados. Sin embargo, la verificación de la triploidía se realizó por conteo de cromosomas en pocos individuos y al estadio morula lo que no asegura que estos embriones se desarrollaran más allá. También utilizaron inductores químicos (CB y 6DMP), con los cuales no obtuvieron éxito.

JUSTIFICACIÓN

El cultivo de camarón del género *Penaeus* es una actividad importante en nuestro país. El camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) es la principal especie que se cultiva en México (Rosenberry, 1997), hasta hace poco, su producción se restringía a las costas del Pacífico, en el límite Norte de su distribución natural. Esta especie también es cultivada en lugares fuera de su distribución natural como Hawaii, Estados Unidos y Golfo de México. En países como Canadá, se exige el uso de organismos estériles cuando se trabaja con especies exóticas. La utilización de organismos estériles en cultivos representa una forma de proteger las poblaciones silvestres, impidiendo modificaciones a la reserva genética de las poblaciones locales. Además, es una forma de proteger las cepas obtenidas por selección genética. De ahí el interés por producir organismos estériles mediante la producción de triploides. Adicionalmente, en términos de producción se ha observado que los organismos triploides pueden alcanzar tallas más grandes que los organismos diploides (Stanley *et al.*, 1981; Guo y Allen, 1994a).

En nuestro laboratorio, Dumas y Campos-Ramos (1999) han producido embriones triploides del camarón blanco *L. vannamei*, usando tiempos fijos de aplicación y de duración del tratamiento. Sin embargo, se requiere volver analizar el método de inducción a la triploidía ya que los resultados obtenidos por estos autores, que utilizaron un tiempo de aplicación de 10 y 12 min a una temperatura de 10 °C y con duraciones de 10, 15 y 20 min, no se han podido repetir en ensayos posteriores. Se requiere también examinar los métodos de cosecha usados ya que no se lograba obtener un número alto de embriones

debido que usaban mallas para recolectar los ovocitos, lo que dañaba la membrana de fertilización y resultaba en altas mortalidades.

OBJETIVO GENERAL

Establecer una técnica de inducción a la triploidía en camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, mediante el tratamiento de choque térmico en frío.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Evaluar dos métodos de manejo de los ovocitos fecundados.
- 2.- Describir en diferentes familias, la cinética de la salida de los cuerpos polares en los ovocitos fecundados.
- 3.- Determinar el momento de inicio y término del tratamiento en relación a la salida de los cuerpos polares.
- 4.- Comparar el efecto de diferentes temperaturas.

MATERIAL Y MÉTODOS

ORIGEN DE LOS DESOVES.

Los ovocitos usados se obtuvieron a partir de desoves producidos en las instalaciones de la Empresa de Acuacultores de La Paz (APSA). Los experimentos se realizaron en las instalaciones de ésta empresa durante los meses de febrero a julio del 2002 y de marzo a junio del 2003.

El procedimiento para obtener los desoves fue el que utilizan comercialmente. Al atardecer se seleccionaron hembras grávidas (con espermátforo colocado en la región del téllico (Fig.2) y entre ellas se seleccionaron las de mayor tamaño y mayor grado de madurez. Las hembras seleccionadas se colocaron individualmente dentro de los tanques de desove, de 100 L de capacidad, previamente llenados con 50 L de agua de mar filtrada a través de un filtro mecánico de arena y de un filtro de carbón activado y desinfectada con lámpara ultra-violeta. La salinidad (32‰) y temperatura (28 °C) fueron constantes. El cuarto donde se obtuvieron los desoves se mantuvo en oscuridad.

Para determinar el inicio del desove, las hembras se mantuvieron en constante observación con la ayuda de una lámpara de mano. Cuando alguna de las hembras iniciaba el comportamiento previo al desove (las hembras se inquietan nadando en círculos en el fondo del tanque, luego suben y nadan en la superficie en círculos para regresar al fondo), se intensificaba la observación de dicha hembra para determinar el momento exacto del inicio del desove. En cada caso, se registraron la hora de inicio designándolo t_0 y la duración del desove. Una vez finalizado el desove, las hembras eran retiradas del tanque.

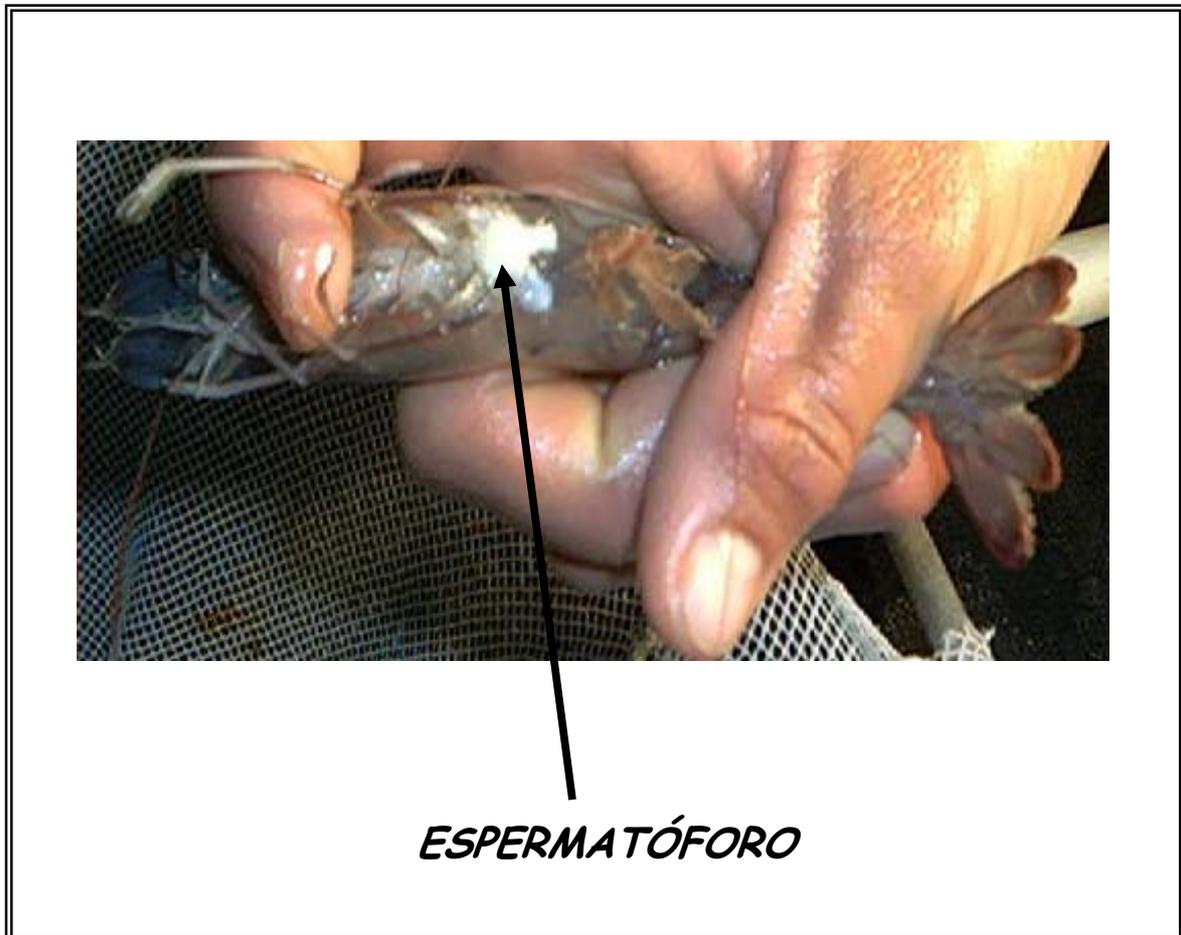


Fig. 2.- Hembra grávida, del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, presentando el espermatóforo colocado por el macho en la región del téllico.

MANEJO DE LOS OVOCITOS.

Se evaluaron dos métodos de recolecta de ovocitos recién desovados. En ambos casos se esperaron aproximadamente 5 min después del fin del desove, para asegurar la fecundación y que los ovocitos se depositaran en el fondo del tanque.

Método I.

Se utilizó un recipiente de plástico de 20 L de capacidad, con una ventana lateral recubierta con malla de 100 μm , introducida en un recipiente con agua marina. En este recipiente se cosecharon los ovocitos por sifoneo con una manguera de plástico de media pulgada. Este procedimiento se realizó cuidadosamente para reducir posibles daños físicos y de exposición al aire (Fig. 3). Se realizó el conteo volumétrico del número de ovocitos y se registró el promedio. Se tomaron tres muestras de 100 mL del recipiente con los ovocitos. De cada muestra, se obtuvieron 10 submuestras de 1 mL con una pipeta de vidrio de 1 mL y se contaron los ovocitos. Posteriormente, se promediaron para estimar el número de ovocitos contenidos en cada uno de los recipientes de inducción. Este método de recolecta se realizó en 5 desoves.

Método II.

Al cabo de uso minutos, los ovocitos se sedimentaban en el fondo del tanque y el nivel de agua de mar se fue bajando lentamente del tanque de desove aproximadamente en un 90%, evitando que se perdieran los ovocitos. Se recolectaron los ovocitos fecundados directamente del agua residual con un recipiente de plástico de 1 L. Durante todo el proceso los ovocitos, se

mantuvieron en agua del desove (Fig. 3). La evaluación del número de ovocitos se realizó como en el método anterior. Este procedimiento se llevo a cabo para los demás desoves.

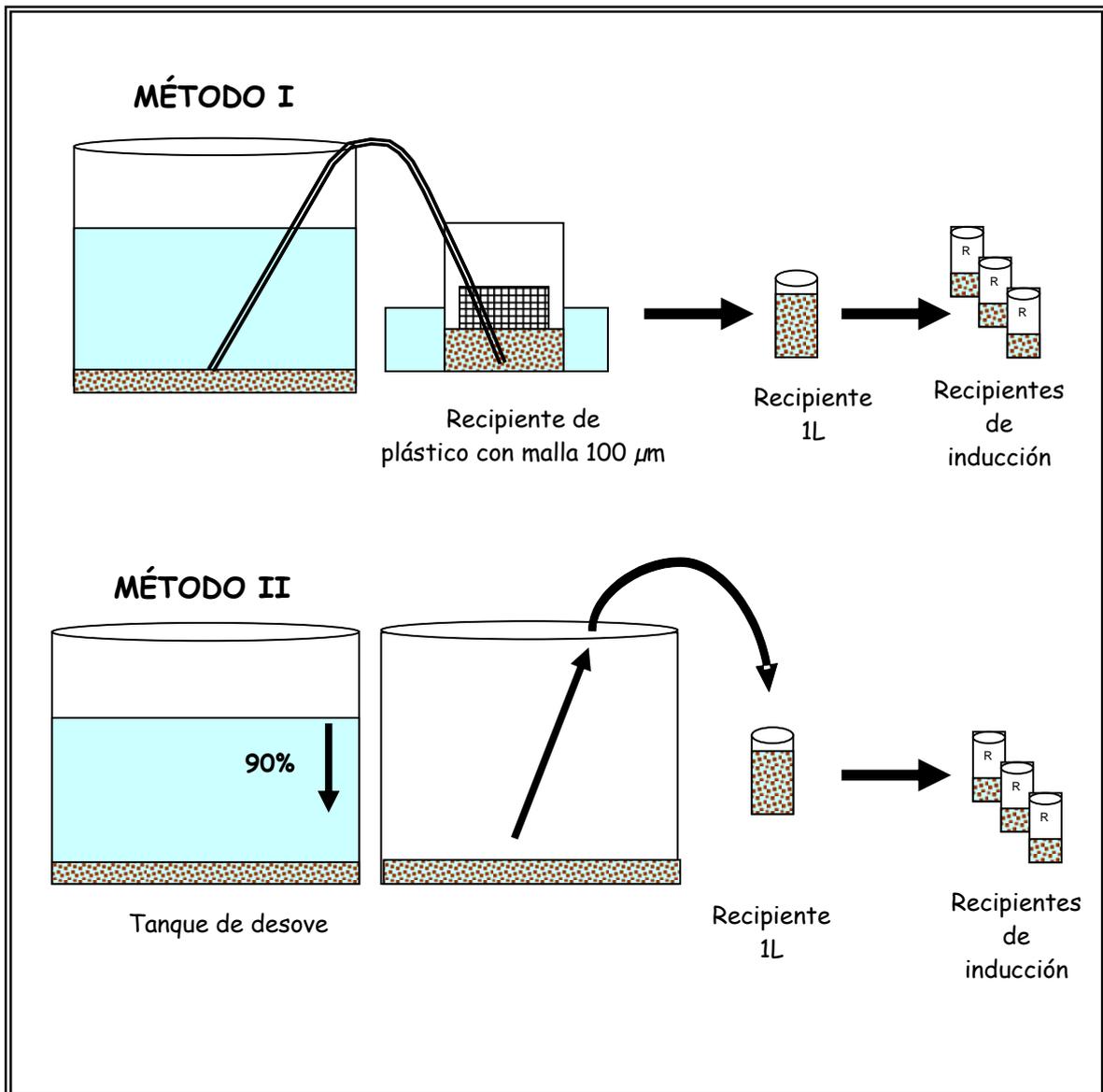


Fig. 3.- Representación de los métodos I y II utilizados en la recolecta de los ovocitos del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. R = replica.

CINÉTICA DE LA SALIDA DE LOS CUERPOS POLARES.

La liberación de los cuerpos polares (CP) se evaluó en un total de 30 desoves, durante los meses de febrero a abril del 2002. Se registró, el inicio del desove y su duración. Después de 8 min a partir del inicio del desove, se tomó una muestra en un recipiente de 1 L del tanque del desove. Se dejaban unos minutos para que los ovocitos fertilizados se precipitaran al fondo del recipiente. Los ovocitos (≈ 40), se depositaban en un portaobjeto excavado para su posterior examinación.

Se monitoreo la salida de los cuerpos polares (CP) con un microscopio óptico en contraste de fases marca Olympus con el objetivo 10X. Llevándose un registro del tiempo en minutos y el número de ovocitos con el primer cuerpo polar (CP1) fuera de la membrana de fertilización (MF) y luego para la liberación del segundo cuerpo polar (CP2) (Fig. 4). En todas las observaciones la iluminación de la lámpara se mantuvo muy tenue para evitar que la temperatura se elevara en las muestras del portaobjetos.

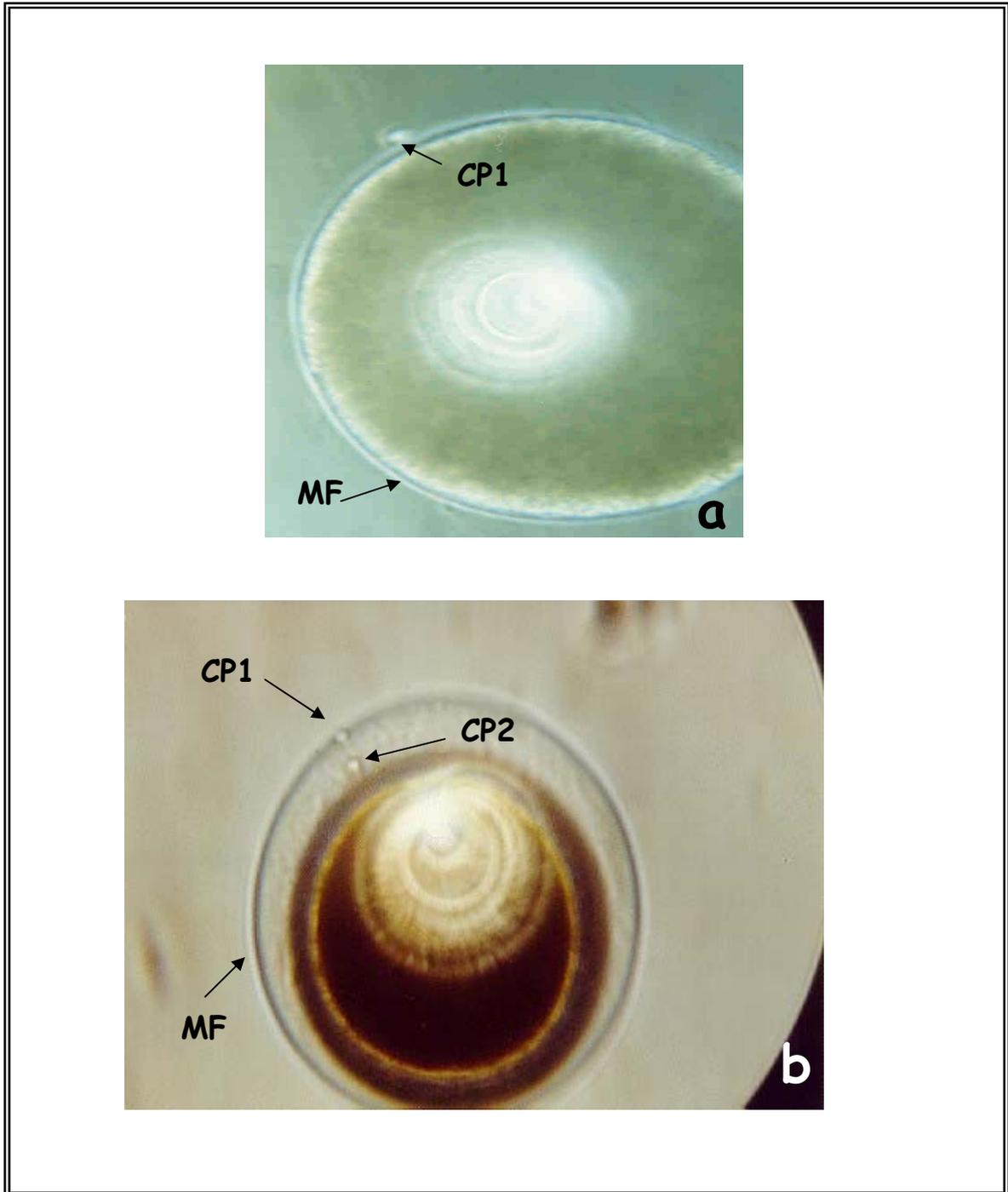


Fig. 4.- Cuerpos polares expulsados fuera de la membrana de fertilización (MF) en los ovocitos fertilizados del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. a).- Primer cuerpo polar (CP1) liberado; b).- Segundo cuerpo polar (CP2) liberado.

INDUCCIÓN A LA TRIPLOIDÍA.

La inducción a la triploidía se realizó en dos periodos usando desoves individuales de hembras del camarón blanco (mayo - agosto del 2002 y abril - mayo del 2003). Para determinar el momento de aplicación y la duración del tratamiento del shock en frío, una muestra de cada desove fue observada al microscopio para detectar en tiempo real la salida de los cuerpos polares. La aplicación de los tratamientos se llevo a cabo cuando el 50% y 100% de los ovocitos presentaron el primer cuerpo polar (CP1) visiblemente fuera de la membrana de fertilización (Fig. 4a). El tratamiento se detuvo cuando el 25, 50 y 100% de los ovocitos presentaron el segundo cuerpo polar liberado (Fig. 4b). Las temperaturas del shock térmico se fijaron en 5, 7 y 10 °C considerando los resultados reportados por Dumas y Campos-Ramos (1999) quienes obtuvieron embriones triploides a 10 °C.

En cada sesión de trabajo en la granja, se podía aplicar el tratamiento a 1 o 3 hembras usando la misma temperatura. Se aplicó el shock en frío mediante un distribuidor de agua fría conectado a un recipiente de 20 L con agua de mar a 0°C. El agua fría se distribuyó a cada recipiente con ovocitos, mediante manguera flexible de 0.5 mm de diámetro. Cuando la temperatura del agua dentro de cada vaso de inducción alcanzaba la establecida para cada tratamiento (5, 7 o 10°C) el flujo de agua se detenía. Los recipientes con ovocitos se mantuvieron en baño frío para mantener la temperatura de inducción (Fig. 5).

Cada experimento se realizó por triplicado. Se tomó un control directamente del tanque del desove para verificar la calidad del desove y de cada tratamiento se llevo un control al que se le aplicó el mismo manejo que a los ovocitos tratados pero sin aplicar el shock en frío con la finalidad de

determinar si hubo un efecto generado por la manipulación de los ovocitos (Fig.6).

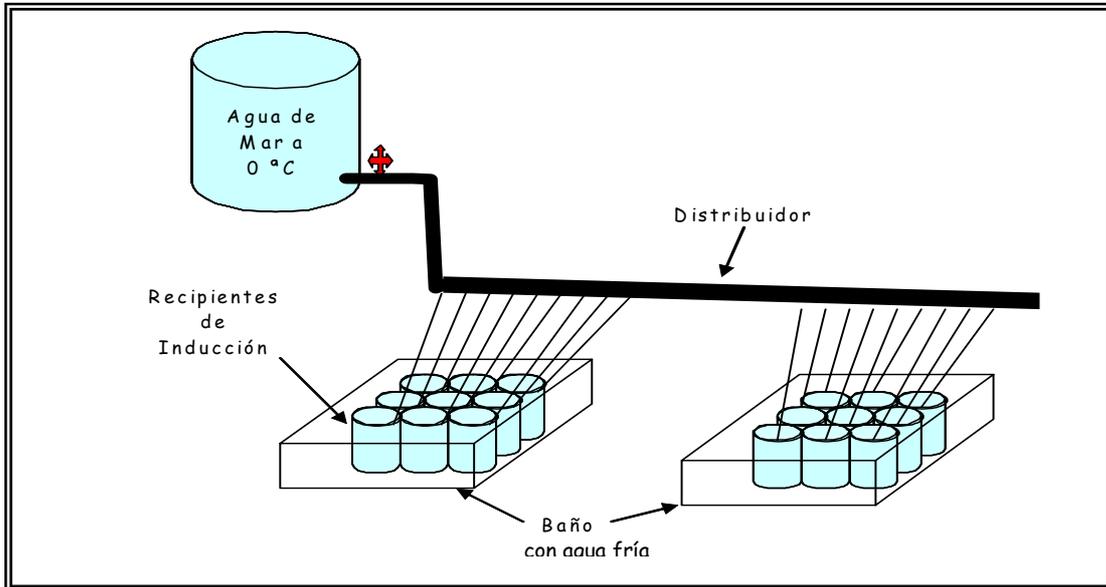


Fig. 5.- Sistema utilizado en la inducción de triploidía del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*.

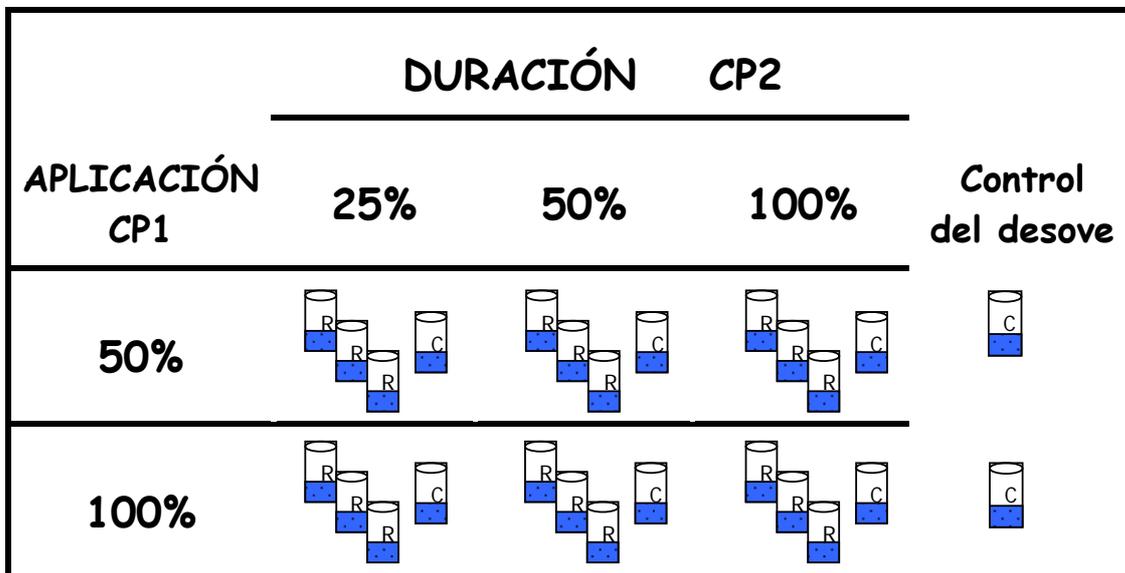


Fig. 6.- Método utilizado en la inducción de shock en frío. Se inicio el shock a 50 y 100% de los ovocitos con el primer cuerpo polar (CP1) fuera de la membrana de fertilización. Se detuvo el shock cuando el 25, 50 y 100% de los ovocitos presentaron el segundo cuerpo polar (CP2). R = Replica; C = Control.

EVALUACIÓN DE LA SOBREVIVENCIA.

Se evaluó el número de ovocitos en las muestras de 100 ml, se determinó mediante el método volumétrico previamente descrito. Se considero que el número de ovocitos sembrados en los recipientes de inducción fue constante y proporcional a la cantidad ya evaluada en el tanque de desove.

El porcentaje de eclosión se obtuvo de la siguiente forma:

$$\frac{\text{Nauplios eclosionados} \times 100}{\text{Número de ovocitos sembrados}}$$

El porcentaje de sobrevivencia de los ovocitos tratados se calculó tomando la sobrevivencia del control como el 100%.

DETERMINACIÓN DE LA TRIPLOIDÍA.

Los ovocitos tratados, así como los controles, se incubaron a 28 °C con aireación moderada en recipientes de plástico de 4 L. Los nauplios se recolectaron al día siguiente, con una pipeta de vidrio, se contaron y se colocaron en tubos Eppendorf. Se conservaron a -4 °C hasta su posterior evaluación del nivel de triploidía que no fue superior a un día.

El análisis de las muestras se realizó en el Laboratorio de Genética del CIBNOR mediante citometría de flujo. Los nauplios fueron centrifugados a 20,000 rpm en una microcentrifuga (Denville modelo 2400). Se retiró el sobrenadante y se agregaron 0.5 ml de la solución 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Se maceró ligeramente la muestra, la cual fué posteriormente filtrada con una malla de 30 µm. Se enjuagó con DAPI hasta obtener 2 ml de

solución. Se analizó el contenido de ADN teñido con DAPI mediante un citómetro de flujo (Ploidy Analyzer II PARTEC, Germany).

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Para el análisis, se consideraron solamente los desoves que presentaron, en el control del desove, un porcentaje de eclosión superior al 20%.

El número de ovocitos en los dos métodos utilizados en el manejo de los ovocitos, se comparó mediante la prueba de T de Student.

De los datos obtenidos durante la cinética de los cuerpos polares se obtuvieron las modas, valores mínimos y máximos.

La determinación del porcentaje de triploidía se realizó a partir de las gráficas obtenidas por el análisis de citometría de flujo (Allen, 1983) (ver anexo).

Los porcentajes de eclosión y de triploidía se transformaron en ARCOSENO, se verificaron la normalidad y homogeneidad de varianza mediante el análisis de Kolmogorov-Smirnov, y se aplicó una ANOVA de dos vías (temperatura y duración del tratamiento) y la prueba de Tukey, cuando se detectaron diferencias significativas ($p < 0.05$) con el programa STATISTICA 6.0.

RESULTADOS

MANEJO DE LOS OVOCITOS.

Los resultados sobre el efecto del manejo en la cantidad de ovocitos cosechados por medio de los dos métodos se presentan en la tabla 1.

Método I

Se obtuvo un máximo de 296 ovocitos y una cantidad mínima de 120 huevos por 100 mL de agua de mar. En promedio se recolectaron 196 huevos por 100 mL. Además, el método resultó dañino para los ovocitos, ya que se observaron deformes, colapsados y con la membrana destruida.

Método II

El mayor número de ovocitos recolectados fue de 2080 y el menor número fue de 420 en 100 mL. En promedio se recolectaron 808 ovocitos por 100 mL. Este método resultó ser el más práctico, ya que se obtuvieron mayores cantidades de ovocitos ($p = 0.01$), que no resultaron maltratados y se tradujo en mayor eficiencia. Se llevó a cabo la inducción a la triploidía usando este método.

Tabla 1.- Número de ovocitos recolectados con los dos métodos utilizados en el camarón blanco *Litopenaeus vannamei*.

<i>Método I</i>		<i>Método II</i>	
<i>Fecha</i>	<i>O/100 mL</i>	<i>Fecha</i>	<i>(O/100 mL)</i>
17/08/ 02	296	08/03/03	656
17/08/02	260	08/03/03	420
19/08/02	120	10/03/03	1157
07/03/03	147	10/03/03	2080
07/03/03	148	17/03/03	746
		17/03/03	930
		26/03/03	633
		26/03/03	507
		29/03/03	484
		29/03/03	710
		05/04/03	680
<i>Promedio</i>	194*		808
<i>Coef. Var.</i>	94		57
<i>Mínimo</i>	120		420
<i>Máximo</i>	296		2080

*Número de ovocitos significativamente más bajos que con el método II ($p = 0.01$).

CINÉTICA DE LOS CUERPOS POLARES.

Primer cuerpo polar.

En la figura 7 se observan la cinética de la liberación del primer cuerpo polar (CP1) en los desoves de 30 hembras demostrando que existe una amplia variación en la liberación del CP1. Se observó que la salida del CP1 inicia en la mayoría de las hembras en un intervalo de 6 a 8 min, pero pueden observarse desde los 5 min (H1, H27) y hasta los 10 min. (H21). El fin de la liberación del CP1 en la mayoría de las hembras fue en un intervalo de 11 a 15 min; sin embargo, se pueden observar a los 10 min (H1,H5 y H7) y 19 min (H13 y H14), también.

Segundo cuerpo polar.

En la figura 7, se observa la cinética de la liberación del segundo cuerpo polar (CP2). La primera hembra (H1) en presentar el CP2 liberado fue a los 11 min. La mayor parte de las hembras iniciaron la liberación del CP2 entre los 16 a 18 min. Sin embargo, en algunas hembras (H13 y H14) se observó a los 20 min. La mayoría de los ovocitos finalizaron la liberación del CP2 en un intervalo de 24 a 27 min, después del desove. Se observan también a los 18 min (H28) y 37 min (H18).

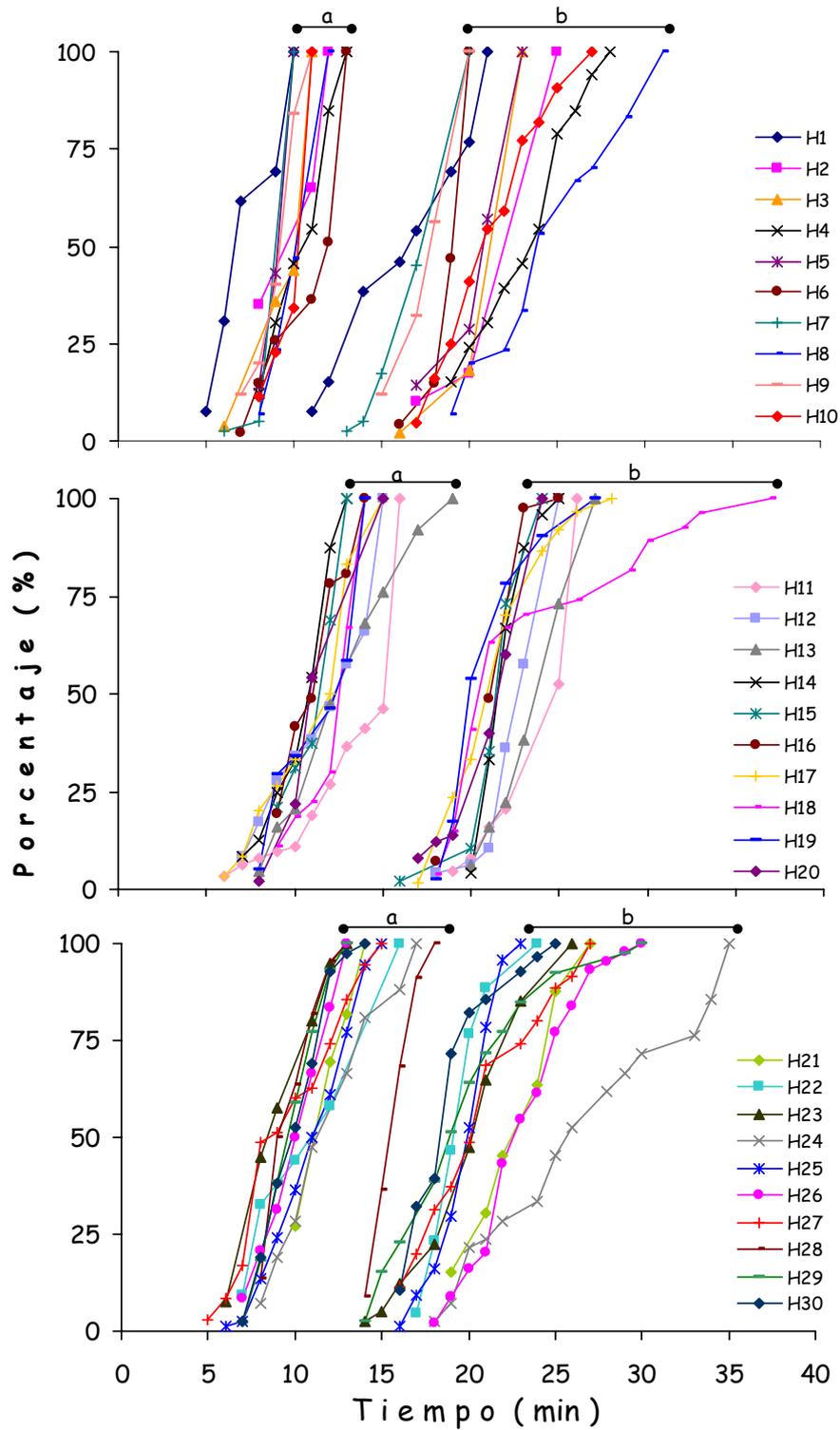


Fig. 7.- Cinéticas de la liberación del primer (a) y segundo cuerpo polar (b) en desoves de 30 hembras (H1-H30) del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, en los meses de febrero a abril del 2002.

Estimación del porcentaje de ovocitos con los cuerpos polares liberados en función del tiempo.

Se estimaron a partir de la figura 7, los tiempos a los cuales el 50 y 100% de los ovocitos presentaron el CP1 y el 25, 50 y 100% con el CP2, con intervalos de 1 min (Fig. 8). Para el 50 % de los ovocitos con CP1 la moda fue de 10 min, se registraron los tiempos mínimos y máximos a 6 y 12 min respectivamente. La moda para el 100% de los ovocitos con el CP1 liberado fue de 13 min. Se registraron los tiempos mínimo y máximo a 10 y 19 min.

El 25% de los ovocitos con el CP2 liberado presentó una moda a 19 min, con el menor tiempo a los 12 min, y el mayor tiempo a los 22 min. Cuando el 50% de los ovocitos presentaron la liberación del CP2, la moda fue de 23 min, con un tiempo mínimo de 15 min y máximo de 26 min. El 100 % de los ovocitos con el CP2 expulsado presentaron una moda de 25 min, con un tiempo mínimo de 18 min y máximo de 37 min.

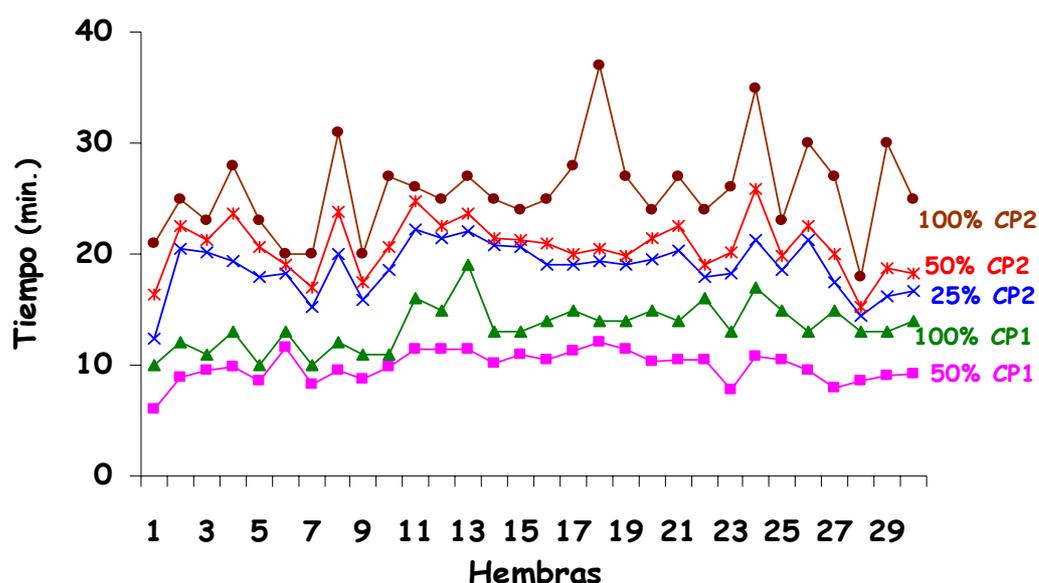


Fig. 8.- Tiempos (min) para cada hembra en la cual se presentan 50 y 100% de los ovocitos con el CP1 fuera de la membrana de fertilización, así como 25, 50 y 100% con CP2 liberado en las 30 hembras de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*.

INDUCCIÓN A LA TRIPLOIDÍA.*Inicio del tratamiento y duración del tratamiento de shock en frío.*

Se obtuvieron individuos triploides, cuando el tratamiento se aplicó a 50% de la salida del primer cuerpo polar y con duración del 25, 50 y 100% de los ovocitos con el segundo cuerpo polar liberado. Cuando se inició el tratamiento al 100% de los ovocitos con el CP1 fuera de la MF, en ninguno de los tratamientos se observaron triploides, resultando todos diploides al igual que en el grupo control (Tabla 2).

Tabla 2.- Resultado de la evaluación del nivel de ploidía ($3n$ = triploide; $2n$ = diploide), obtenido cuando se aplicó el tratamiento al 50 y 100% de los ovocitos con el primer cuerpo polar (CP1), fuera de la membrana de fertilización (MF). La duración del tratamiento corresponde al momento cuando 25, 50 y 100% de los ovocitos presentaron el segundo cuerpo polar (CP2) liberado. La observación de los cuerpos polares se llevó a cabo en el control del desove.

Hembra	Tratamiento °C	Duración (CP2 liberado)	Grupo control	INICIO DEL TRATAMIENTO	
				50% ovocitos con el CP1 fuera MF	100% ovocitos con el CP1 fuera MF
1	8	25%	2n	3n	2n
		50%	2n	3n	2n
		100%	2n	3n	2n
2	7	25%	2n	3n	2n
		50%	2n	3n	2n
		100%	2n	3n	2n
3	7	25%	2n	3n	2n
		50%	2n	3n	2n
		100%	2n	3n	2n

Triploidía.

Los siguientes experimentos se realizaron a un tiempo de aplicación al 50% de los ovocitos con el CP1 fuera de la MF, y con 3 temperaturas (5, 7 y 10 °C) y 3 duraciones de tratamiento (25, 50 y 100%) de CP2 liberado.

En la Tabla 3, se pueden observar los resultados del análisis de variancia de dos vías realizados con los porcentajes obtenidos de triploidía de los nauplios del camarón blanco tratados con shock en frío. Se observó una diferencia ($p < 0.05$) entre las temperaturas (Fig. 9). El porcentaje de triploides obtenidos con la temperatura a 5 °C fue significativamente más alto ($p < 0.05$) que el obtenido a 10 °C. La temperatura a 7 °C presentó resultados intermedios. No hubo diferencia significativa debido a la duración ($p > 0.05$). La interacción de la temperatura con la duración no fue significativa.

Tabla 3.- ANOVA de dos vías del porcentaje de triploidía en nauplios del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. (SS = suma de cuadrados; g.l = grados de libertad; MS = cuadrado medio; F = F de Fisher; p = nivel de significancia).

Efectos	A N O V A				
	SS	g.l	MS	F	p
Temp	8308.5	2	4154.274	7.80	0.001
Duración	415.7	2	207.9	0.39	0.678
Temp*Duración	984.2	4	246.0	0.4619	0.764
Error	50607.6	95	532.7		

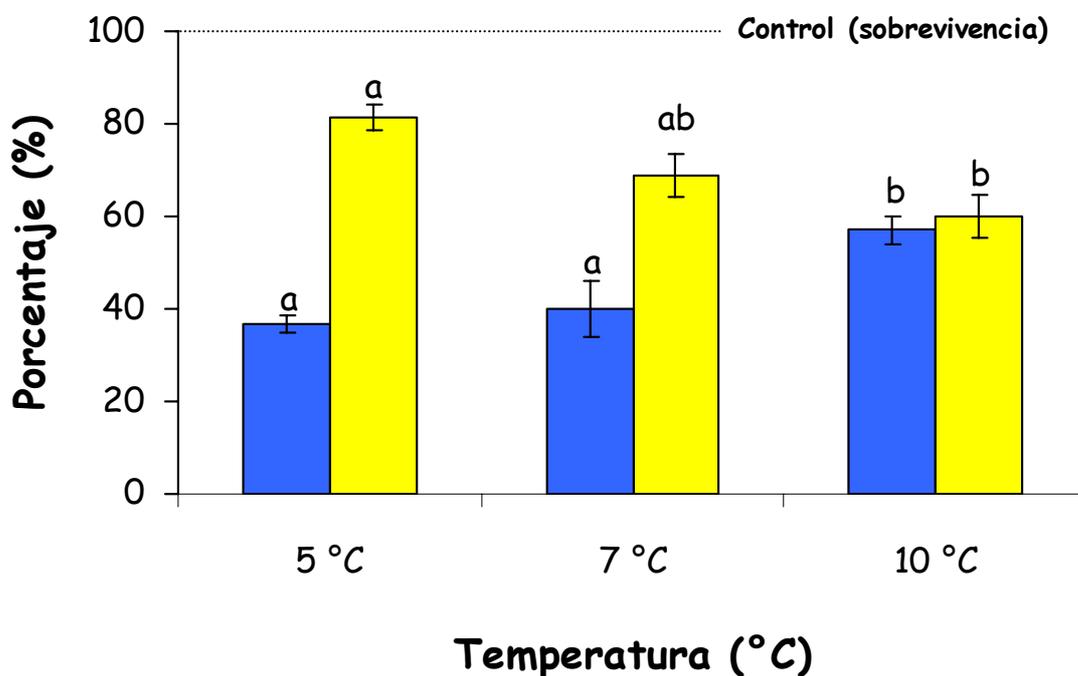


Fig. 9.- Porcentaje de sobrevivencia en los ovucios irruados con respecto al control y porcentaje de triploidía en los nauplio del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Para cada variable, letras iguales indican que no hay diferencias significativas ($p > 0.05$).

Sobrevivencia

En la Tabla 4, se puede observar los resultados del análisis de variancia de dos vías realizados sobre el porcentaje de sobrevivencia de nauplio de camarón blanco a los cuales se les aplicó el tratamiento en frío. Sin embargo, se detectaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las temperaturas (Fig. 9). Los porcentajes de sobrevivencia fueron significativamente menores a 5 y 7 °C que a la temperatura de 10 °C ($p < 0.05$). No hubo diferencia significativa para el factor de duración ($p > 0.05$). La interacción de la temperatura con la duración no fue significativa.

Tabla 4.- ANOVA de dos vías de la sobrevivencia de nauplios del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. (SS = suma de cuadrados; g.l = grados de libertad; MS = cuadrado medio; F = F de Fisher; p = nivel de significancia).

Efectos	A N O V A				
	SS	g.l	MS	F	p
Temperatura	8570.1	2	4285.1	6.35	0.003
Duración	376.9	2	188.4	0.28	0.757
Temp*Duración	1909.8	4	477.4	0.71	0.589
Error	66834.2	99	675.1		

En la Tabla 5, se muestran los resultados obtenidos en el porcentaje de eclosión, sobrevivencia y triploidía, de cada hembra, con sus 3 replicas, tratadas con shock en frío y el grupo control el cual se manejó igual que los tratados sin aplicar el tratamiento. Se observa que el porcentaje de eclosión en el grupo control fue del 33% al 48%. En los ovocitos tratados, el porcentaje de eclosión fue del 12% al 31%. Cabe resaltar que se obtuvo con más frecuencia un resultado de 100% de triploides a 7°C.

Tabla 5.- Porcentaje de eclosión (E), sobrevivencia (S) y triploidía (3n) en nauplios del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Tratados con shock en frío a 5, 7 y 10°C, a 50% de salida del CP1; T = temperatura; H = Hembra; R = replicas.

T °C	H	R	Duración del tratamiento								
			25%			50%			100%		
			E	S	3n	E	S	3n	E	S	3n
5	1	A	7	19	100	20	59	100	21	64	100
		B	12	34	89	10	30	86	17	51	83
		C	4	10	68	15	45	85	16	48	90
	2	A	13	60	82	4	24	53	3	22	51
		B	13	62	61	10	58	82	9	63	82
		C	10	48	74	4	22	76	2	16	68
	3	A	18	41	83	18	44	88	18	42	79
		B	23	54	83	26	63	81	20	47	72
		C	20	45	87	17	41	82	19	45	85
	4	A	8	21	79	8	16	89	11	26	78
		B	4	11	88	5	10	84	10	23	88
		C	9	23	91	8	16	86	12	28	81
Promedio Control			14±4	36±5	82±3	12±2	36±5	83±3	13±2	40±5	80±4
			35±5			36±7			33±7		
7	5	A	3	5	62	2	6		2	5	100
		B	1	3		1	5	70	1	3	79
		C	2	5	21	2	7		4	12	
	6	A	15	53	100	9	46	100	8	22	90
		B	13	46	100	19	99	100	16	45	100
		C	15	53	100	13	69	100	13	37	92
	7	A	20	35	78	33	100	100	29	56	100
		B	17	29	71	24	99	100	43	82	75
		C	33	55	69	20	83	100	41	79	100
	8	A	23	44	22	20	24	23	19	32	26
		B	28	54	23	15	18	21	16	27	22
		C	19	37	19	24	28	19	22	36	21
Promedio Control			16±3	35±6	60±10	15±3	49±11	73±12	18±4	36±7	73±10
			48±7			39±16			46±6		
10	9	A	39	77	42	31	53	52	39	85	49
		B	32	63	51	39	68	46	47	100	53
		C	43	84	48	39	67	61	35	77	58
	10	A	9	30	82	4	17	82	8	53	89
		B	9	31	87	5	21	82	6	39	87
		C	6	21	82	5	19	80	11	71	83
	11	A	65	82	56	71	100	41	64	93	54
		B	74	94	55	56	80	57	66	97	54
		C	66	83	57	44	62	38	66	97	45
	12	A	12	44	53	16	49	63	5	15	51
		B	8	29	58	18	54	79	6	19	69
		C	8	31	57	12	38	63	5	14	0
Promedio Control			31±8	56±8	61±4	28±6	52±7	62±5	30±7	63±10	58±7
			47±12			47±10			41±11		

DISCUSIÓN

En este trabajo, se logró producir triploides en porcentajes variables al iniciar el tratamiento cuando el 50% de los ovocitos observados simultáneamente del grupo control, presentan el primer cuerpo polar fuera de la membrana de fertilización .

Varios autores han observado la salida de los cuerpos polares para determinar un tiempo fijo de aplicación. Sin embargo, la gran variabilidad observada en los desoves de las hembras del presente trabajo demuestra la incertidumbre de resultados al usar tiempos fijos. Guo y Allen (1994b), con el ostión del Pacífico, *Crassostrea gigas* propusieron un método para inducir la poliploidía con tiempos de aplicación y duración fijos. Posteriormente, Eudeline *et al.* (2000 a), al querer producir tetraploides con la misma especie y método no tuvieron éxito. Estos autores, concluyen que es necesario observar simultáneamente la liberación de los cuerpos polares y aplicar el tratamiento cuando el 50% de los ovocitos observados, presenten el primer cuerpo polar liberado. De la misma forma en este trabajo se encontraron los mejores resultados al aplicar este criterio.

En crustáceos, la mayoría de los trabajos publicados reportan el uso de tiempos fijos para la aplicación del tratamiento y se han obtenido organismos triploides utilizando la citocalasina B (CB), 6-DMAP y shock de temperatura (*P. chinensis*, Xiang *et al.*, 1992a,b; Bao, *et al.*, 1994; Li, *et al.*, 1999; *L. vannamei*, Dumas y Campos-Ramos, 1999; *P. japonicus*, Norris *et al.*, 2001; *P. chinensis*; Li *et al.*, 2003). Sin embargo, estos trabajos no mencionan si sus resultados se pudieron repetir y en algunos casos se evaluó la triploidía en embriones, lo que no confirma la obtención de nauplios triploides.

De la misma forma como se aplicó para el ostión del Pacífico (Guo y Allen, 1994b), Dumas y Campos-Ramos (1999) usaron tiempos fijos de aplicación y de duración del tratamiento en el camarón blanco. Obtuvieron triploides a 10 °C aplicando el tratamiento a los 10 y 12 min después del desove y con una duración de 10, 15 y 20 min, pero este resultado no se pudo repetir en intentos posteriores (Dumas com. per.). A la luz de nuestros resultados, es evidente que esta dificultad se debe a las diferencias en la cinética del desarrollo de los ovocitos fecundados entre familias. Entonces, al aplicar el shock a un tiempo fijo no se generaran los mismos resultados entre diferentes desoves.

En este sentido, el momento de aplicación del tratamiento fue el factor más importante ya que determinará si se retiene el primer o el segundo cuerpo polar. El tratamiento se debe aplicar cuando el proceso de la meiosis está en el momento justo para que se pueda retener uno de los cuerpos polares. En nuestro trabajo no se pudieron obtener triploides cuando los ovocitos presentaban el 100% de primer cuerpo polar fuera de la membrana de fertilización, lo que nos permite inferir que la meiosis II estaba en este momento, ya muy adelantada para que se logre la retención del segundo cuerpo polar.

Es muy difícil lograr la retención del primer cuerpo polar en los ovocitos en esta especie ya que la secuencia de la liberación se realiza en un tiempo muy corto, dentro de los primeros 10 min posteriores al desove y en algunos casos es menor como se demostró en este trabajo, lo que limita el tiempo en la manipulación de los ovocitos para aplicar el tratamiento.

Cabe resaltar que se ha demostrado que no existen diferencias en terminos de crecimiento entre organismos triploides de primer o segundo cuerpo polar (Beaumont, 1994). Sin embargo, a nivel teórico se esperaban

diferencias ya que los triploides de primer cuerpo polar por retener los cromosomas homólogos, son más heterocigóticos que los de segundo cuerpo polar (Guo y Allen, 1994a). Además, es más fácil producir triploides durante la meiosis II que de meiosis I.

Por otra parte, la duración del tratamiento es otro factor importante para obtener porcentajes altos de organismos triploides (Felip *et al.*, 1997, 1999; Ruiz-Verdugo *et al.*, 2000; Norris *et al.*, 2001). En este trabajo no se observaron diferencias significativas en las duraciones del tratamiento ni en la interacción con la temperatura. Sin embargo, se recomienda detener el tratamiento cuando el 50% de los ovocitos presenten el segundo cuerpo polar liberado. Ya que si el tratamiento se detiene cuando el 25% o 100% de los ovocitos observados presenten el segundo cuerpo polar liberado, puede interferir con la liberación del primer cuerpo polar y obtener triploides del primer cuerpo polar (en el caso del 25%) o con la primera división celular obteniendo poliploides (en caso del 100%).

El porcentaje de triploidía y el de sobrevivencia presentaron una relación inversa con respecto a la intensidad (temperatura) del tratamiento. El porcentaje de triploidía fue significativamente más alto en las temperaturas de 5 y 7 °C comparado a la de 10 °C. En el caso de la sobrevivencia, se observaron porcentajes significativamente más altos con la temperatura de 10 °C. En otros estudios se reportaron resultados similares (*P. chinensis*, Xiang *et al.*, 1992a,b; Bao *et al.*, 1994; Li *et al.*, 1999; *L. vannamei*, Dumas y Campos-Ramos, 1999; *P. japonicus*, Norris *et al.*, 2001; *P. chinensis*, Li *et al.*, 2003). Sin embargo, el método que se utilizó en el presente trabajo no nos permite llegar a conclusiones definitivas ya que se evaluó el número de ovocitos

solamente en el tanque de desove. Se recomienda repetir utilizando un método más fino para evaluar la sobrevivencia.

Por otra parte, la recolecta de los ovocitos de camarón blanco *L. vannamei*, es un componente muy importante en la inducción a la triploidía. En este trabajo, se obtuvieron mejores resultados cuando se empleó el segundo método, los ovocitos recolectados no sufrieron daño alguno, como membranas rotas, deformaciones por presión o la destrucción total, ya que se mantuvieron siempre dentro del agua y no se usó ningún tipo de malla. El número de ovocitos recolectados fue mayor en un 75% que con el método I, además, la eclosión observada fue la que se espera para esta especie en condiciones normales de producción, con un promedio del 40% o mayor.

Este trabajo representa un logro en la producción de triploides en el camarón blanco *L. vannamei*. Se sugiere realizar la inducción iniciando el tratamiento cuando el 50% de los ovocitos presente el primer cuerpo polar fuera de la membrana de fertilización del grupo control, con una intensidad de shock a 7 °C y una duración del tratamiento cuando el 50% de los ovocitos presenten el segundo cuerpo polar liberado del grupo control.

CONCLUSIONES

- ❖ Es factible lograr la producción de triploides de *Litopenaeus vannamei*, con base en la observación simultánea de la liberación de los cuerpos polares, dado que el proceso es repetible.

- ❖ El tratamiento que resultó idóneo en nuestras condiciones, para obtener triploides es aplicar el tratamiento cuando el 50% de los ovocitos en el control presenten el primer cuerpo polar fuera de la membrana de fertilización y detenerlo cuando el 50% de los ovocitos en el control presente el segundo cuerpo polar liberado. De las temperaturas ensayadas, 5 y 7 °C son las más efectivas. Sin embargo, falta repetir para evaluar si la frecuencia más alta del 100% de triploidía a 7 °C, es efecto del azar o del tratamiento.

- ❖ En cuanto al método de cosecha, los ovocitos recolectados después del desove deben permanecer siempre en el agua y no se debe utilizar ningún tipo de malla.

RECOMENDACIONES

- ❖ Diferentes modificaciones pudieran ser aportadas a nuestro método de inducción. Debido a que el desove es espontáneo es importante determinar el tiempo en el cual la hembra inicia el desove. Esto se puede llevar a cabo mediante la utilización de un detector de turbidez.
- ❖ Éste método debe ser llevado aun a escala más grande para poder aplicarse en condiciones de producción y evaluar su factibilidad económica.
- ❖ Es también primordial verificar en el estadio adultos si la triploidía del camarón blanco conlleva esterilidad en ambos sexos, ya que la ausencia de maduración gonádica dará sustento a cualquier otro tipo de estudio con los camarones triploides.
- ❖ Es necesario, completar el presente estudio con datos de desempeño en cultivo tanto de las larvas, postlarvas, juveniles y adultos comparando diploides y triploides.
- ❖ Se pudiera también considerar la producción de reproductores tetraploides para cruzarlos con diploides y obtener el 100% de triploides sin aplicar tratamiento. Este método permite producir nauplios triploides a gran escala.

BIBLIOGRAFÍA

- Aldridge, F.J., Marston, R.Q., Shireman, J.V. 1990. Induced triploids and tetraploids in bighead carp, *Hypophthalmichthys nobilis*, verified by multi-embryo cytofluorometric analysis. *Aquaculture*, 87:121-131.
- Allen, S.K., Jr. 1983. Flow cytometry: assaying experimental polyploid fish and shellfish. *Aquaculture*, 33:317-328.
- Allen, S.K., Jr., Downing, S.L., Chew, K.K. 1989. Hatchery manual for producing triploid oyster. University of Washington Press. 27 p.
- AQUACOP. 1993. Induction of polyploid nauplii in *Penaeus indicus*. *Aquaculture*, 111:315.
- Arai, K., Fumitala, N., Fujino, K. 1986. Triploidization of the Pacific abalone with temperature and pressure treatments. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 52:417-422.
- Arai, K., Wilkins, N. P. 1987. Triploidization of brown trout (*Salmo trutta*) by heat shock. *Aquaculture*, 64:97-103.
- Bao, Z., Zhang, Q., Wang, H., Dai, J. 1994. Cytochalasin B induced triploidy in *Penaeus chinensis*. *Acta Oceanologica Sinica*, 13:261-267.
- Basavaraju, Y., Mair, G.C., Moham, K. H.M., Pradeep, K.S., Keshavappa, G.R., Penman, D.J. 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.
- Beaumont, A.R. 1994. The application and relevance of genetics in aquaculture. pp 467-486. En: Beaumont A.R. (Eds) Chapman y Hall. *Genetics and evolution of aquatic organisms*. Brounary Row, London.
- Benfey, T.J., Sutterlin, A.M. 1984a. Triploidy induced by heat shock and hydrostatic pressure in landlocked Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 36:359-367.

- Benfey, T.J., Bosa, P.G., Richardson, N.L., Donaldson, E.M. 1988. Effectiveness of a commercial-scale pressure shocking device for producing triploid salmonids. *Aquaculture Engineering*, 7:147-154.
- Benfey, T.J., Donaldson, E.M. 1988. Triploidy in the culture of Pacific salmon. pp. 549-554. En: *Proc. Aquaculture International Congress, Vancouver, Canada: Sept. 6-9, 1988.*
- Bonnet, S., Haffray, H., Blanc, J.M., Vallée, F., Vauchez, C., Fauré, A., Fauconneau, B. 1999. Genetic variation in growth parameters until commercial size in diploid and triploid freshwater rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and seawater brown trout (*Salmo trutta*). *Aquaculture*, 173:359-375.
- Chaiton, J.A., Allen, S.K. Jr. 1985. Early detection of triploidy in the larvae of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, by flow cytometry. *Aquaculture*, 48:35-43.
- Child, A.R., Watkins, H.P. 1994. A simple method to identify triploid molluscan bivalves by the measurement of cell nucleus diameter. *Aquaculture* 125:199-204.
- Chrisman, C.L., Wolters, W.R., Libey, G.S. 1983. Triploidy in channel catfish. *J. World Aquaculture Soc.*, 14:279-293.
- Clark, W.H.Jr., Griffin, Fj. 1993. Acquisition and manipulation of penaeoidean gametes. Pp. 133-151. En: Mc Very, J.P. (Ed.), *CRC Handbook of Mariculture, Vol. I: Crustacean Aquaculture*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- Clark, W.H.Jr., Pillai, M.C. 1991. Egg production, release and activation in the shrimp, *Litopenaeus setiferus*. En: Wenner, A.M., y Kuris, A. (Eds.) *Crustacean Issues*. Balkema Press. Rotterdam, 7:3-8.
- Cotter, D., O'Donovan, V., O'Maoiléidigh, N., Rogan, G., Roche N., Wilkins, N.P. 2000. An evaluation of the use of triploid Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in minimizing the impact of escaped farmed salmon on wild populations. *Aquaculture*, 186:61-75.

- Dayson, R.D. 1977. Principios de biología celular. Fondo Educativo Interamericano, S.A. México. 431 p.
- De Robertis, E.D.P., Nowinski, W.W., Sáez, F.A., 1973. Biología celular. El Ateneo, Buenos Aires, 480 p.
- Desrosiers, R.R., Gérard, A., Peignon, J.M., Naciri, Y., Dufresne, L., Morasse, J., Ledu, C., Phelipot, P., Guerrier, P., Dubé, F. 1993. A novel method to produce triploids embryos in bivalve molluscs by the use of 6-dimethylaminopurine. J. Exp. Biol. Ecol., 170:29-43.
- Downing, S.L., 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., De la Noüe J. 1990. Triploidy induced by heat shock in brook trout (*Salvelinus fontinalis*). Aquaculture, 92:305-311.
- Dumas, S., Campos-Ramos, R. 1999. Triploidy induction in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone). Aquaculture Research, 30:621-624.
- Eudeline, B., Allen, S.K., Jr., Guo, X., 2000a. Optimization of tetraploid induction in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, using first polar body as a natural indicator. Aquaculture, 187:73-84.
- Eudeline, B., Allen, S.K., Jr., Guo, X., 2000b. Delayed meiosis and polar body release in egg of triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in relation to tetraploid production. Aquaculture, 248:151-161.
- Felip, A., Zanuy, S., Carrillo, M., Martínez, G., Ramos, J., Piferrer, F. 1997. Optimal conditions for the induction of triploidy in the sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Aquaculture, 152:287-298.
- Felip, A., Zanuy, S., Carrillo, M., J., Piferrer, F. 1999. Growth and gonadal development in triploid sea bass (*Dicentrarchus labrax*) during the first two years of age. Aquaculture, 173:389-399.

- Friars, G.W., McMillan, I., Quinton, V.M., O'Flynn, F., McGeachy, S.A., Benfey, T.J. 2001. Family differences in relative growth of diploid and triploid Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 192:23-29.
- Gérard, A., Naciri, Y., Peignon, J.-M., Ledu, C., Phelipot, P. 1994. Optimization of triploid induction by the use of 6-DMAP for the oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture Fish. Manage.*, 25:709-719.
- Guo, X., Allen, S.K. Jr. 1994a. Sex determination and polyploid gigantism in the Dwarf surfclam (*Mulinia lateralis* Say). *Genetics*, 138, 1199-1206.
- Guo, X., Allen, S.K. Jr. 1994b. Viable tetraploids in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg) produced by inhibiting polar body 1 in eggs from triploids. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 3:42-50.
- Hertzler, P.L. 2002. Twin meiosis 2 spindles form after suppression of polar body 1 formation in oocytes of the marine shrimp *Sicyonia ingentis*. *Biol. Bull.*, 202:100-103.
- Hudinaga, M. 1942. Reproduction, development and rearing of *Penaeus japonicus* Bate. *Jpn. J. Zool.*, 10:304-393.
- Jiang, W., Li, G., Xu, G., Lin, Y., Qing, N. 1993. Growth of the induced triploid pearl oyster, *Pinctada martensii* (D.). *Aquaculture*, 111:245-253.
- Johnson, O.W., Rabinovitch, P.R., Utter, F.M. 1984. Comparison of the reliability of a Coulter counter with a flow cytometer in determining ploidy levels in Pacific salmon. *Aquaculture*, 43:99-103.
- Kerby, J.H., Harrell, R.M., 1990. Hybridization, genetic manipulation, and gene pool conservation of striped bass. pp. 159-199. En: Harrell, R.M., Kerby, J.H., Minton, R.V. (Eds.). *Culture and Propagation of Striped Bass and its Hybrids*. Striped Bass Committee, Southern Division, American Fisheries Society, Bethesda, M.D.

-
- Kerby, J.H., Everson, J.M., Harrell, R.M., Geiger, J.G., Starling, C.C., Revels, H. 2002. Performance comparisons between diploid and triploid sunshine bass in fresh water ponds. *Aquaculture*, 211:91-108.
- Lemoine, L.H.Jr., Smith T.L. 1980. Polyploidy induced brook trout by cold shock. *Trans. Amer. Fish. Soc.*, 109:626-631.
- Li, F., Zhou, L., Xiang, J., Liu, X., Zhu, J. 1999. Triploidy induction with heat shocks to *Penaeus Chinensis* and their effects on gonad development. *Chi. J. Oceanol. Limnol.*, 17:57-61.
- Li, F., Xiang, J., Zhou, L., Wu, Ch., Zhang, X. 2003. Optimization of triploidy induction by heat shocks in Chinese shrimp *Fenneropenaeus Chinensis*. *Aquaculture*, 219:221-231.
- Lincoln, R.F., Scott, A.P. 1983. Production of all-female triploid rainbow trout. *Aquaculture*, 30:375-380.
- Longo, F.K., 1972. The effects of cytochalasin B on the events of fertilization in the surf clam, *Spisula solidissima*. *J. Exp. Zool.*, 182:322-344.
- Norris, B., Coman, F., Preston, N. 2001. Effect of triploidy on growth and survival of the Kuruma shrimp *Penaeus japonicus*. *Aquaculture* 2001, Book of Abstract. January 21-25. Lake Buena Vista, Florida. 478 p.
- Piferrer, F., Cal, R.M., Álvarez-Blázquez, B., Sánchez, L., Martínez, P. 2000. Induction of triploidy in the turbot (*Scophthalmus maximus*). I. Ploidy determination and the effects of cold shocks. *Aquaculture*, 188:79-90.
- Piferrer, F., Cal, R.M., Gómez, C., Bouza, C., Martínez, P. 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.
- Qin, J.G., Fast, A.W., Ako, H. 1998. Growout performance of diploid and triploid Chinese catfish *Clarias fuscus*. *Aquaculture*, 166:247-258.

- Rosenberry, B. 1997. World Shrimp Farming. Annual report shrimp news international. San Diego CA. 284 p.
- Ruiz-Verdugo, C.A., Ramírez, J.L., Allen, S.K. Jr., Ibarra, A.M. 2000. Triploid catarina scallop (*Argopecten ventricosus* Sowerby II, 1842): growth, gametogenesis, and suppression of functional hermaphroditism. *Aquaculture*, 186:13-32.
- Small, S.A., Benfey T.J. 1987. Cell size in triploid salmon. *J. Exp. Zoology*, 241:339-342.
- Stanley, J.G., Allen, S.K. Jr., Hidu, H. 1981. Polyploidy induced in the american oyster *Crassostrea virginica*, with cytochalasin B. *Aquaculture*, 12:1-10.
- Stillwell, J.E., Benfey, J.T. 1996. The swimming performance of triploid brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Bull. Aquaculture Assoc. Canada*, 2:41-43.
- Szöllosi, M.S., Kubiak, J.Z., Debey, P. De Pennart, H., Szöllösi, D., Maro, B. 1993. Inhibition of protein kinases by 6-dimethylaminopurine accelerates the transition to interphase in activated mouse oocytes. *Journal of Cell Science*, 104:861-872.
- Thorgaard, G.H., Jazwin, M. E. 1981. Polyploidy induced by heat shock in rainbow trout. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 110:546-550.
- Utter, F.M., Johnson, O.W., Thorgaard, G.H., Rabinovitch, P.S. 1983. Measurement and potential applications of induced triploidy in Pacific salmon. *Aquaculture*, 35:125-135.
- Utting, S.D., Doyou, J. 1992. The increased utilization of egg lipid reserves following induction of triploidy in the Manila clam (*Tapes philippinarum*). *Aquaculture*, 103:17-28.
- Utting, S.D., Child, A. R. 1994. Genetic manipulation of the manila clam (*Tapes philippinarum*) using cytochalain B to induce triploidy. *Aquaculture*, 120:271-282.

- Varadaraj, K., Pandian, T.J. 1990. Production of all-female sterile-triploid *Oreochromis mossambicus*. *Aquaculture*, 84:117-123.
- Wither, R.E., Clarke, C., Blackburn, J., Baker, I. 1998. Effect of triploidy on growth and survival of pre-smolt and post-smolt coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Aquaculture*, 168:413-422.
- Xiang, J.H., Zhou, L.H., Liu, R.Y., Zhu, J.Z., Li, F.H., Liu, X.D. 1992a. Induction of the tetraploids of the Chinese shrimp, *Penaeus chinensis*. pp. 847-846. En: Asia Pacific Conference on Agricultural Biotechnology, Beijing 20-24 Aug. 1992 China Science and Technology Press, Beijing.
- Xiang, J.H., Zhou, L.H., Zhu, J.Z., Li, F.H., Zhang, X. 1992b. Triploidy induction in penaeidae shrimps with special reference to a new chemical inducing reagent 6-DMAP (6-dimethylaminopurine). *Aquaculture* 2001, Book of Abstract. January 21-25. Lake Buena Vista, Florida. p 705.

ANEXO

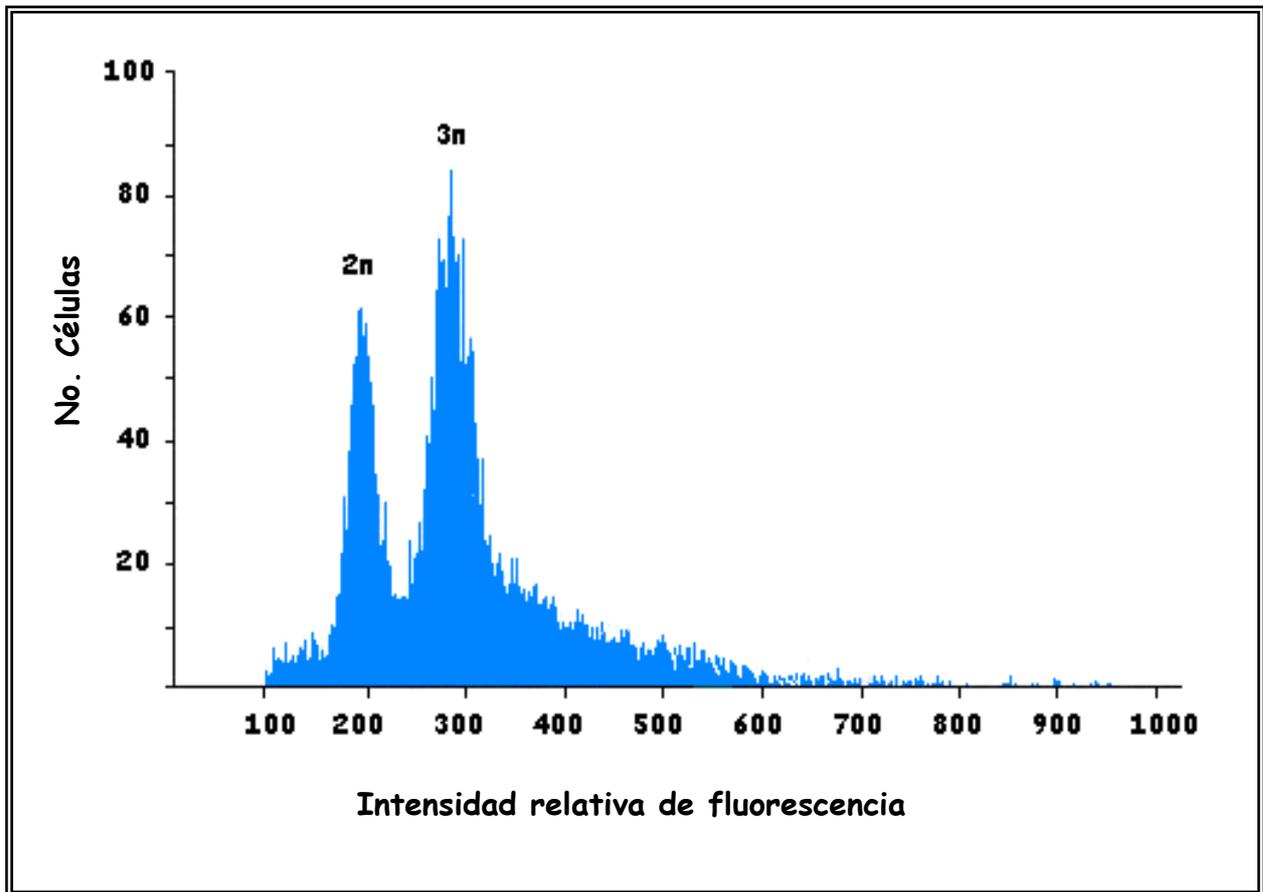


Fig. a.- Ejemplo de una gráfica obtenida mediante la citometría de flujo del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Grupo de diploides (2n); Grupo de triploides (3n).

El porcentaje de triploidía se evaluó mediante un análisis de picos en las gráficas obtenidas con el citómetro de flujo. Para cada temperatura, se calcula un promedio general a partir de las medias de los picos de los tres grupos control. Se calculan las desviaciones estándar a partir del coeficiente de variación y se obtiene el promedio. Con base a que los organismos triploides contienen 1.5 veces más contenido de ADN que los diploides, se suma una mitad

más al promedio general obtenido (tabla b). Los límites del área se establecen a dos desviaciones estándar (Tabla a). Los valores obtenidos para la media general y los límites inferior y superior, para diploides y triploides, se ingresan al programa de la computadora del citómetro de flujo. Se obtienen nuevas gráficas con los límites establecidos y el porcentaje bajo el área de los picos (Fig. b.). Se calcula el porcentaje de triploidía en base a estos datos (Tabla c).

Tabla a.- Obtención de los valores en los grupos control.

	Media (Control)	Coef. Var.	Desv. Est.	2(Desv. Est.)
	193.25	8.54	16.50	33.00
	191.50	9.16	17.54	35.08
	187.77	9.01	16.92	33.84
Prom. Gral.	190.84	8.90	16.99	33.97

Tabla b .- Promedio de los triploides calculados del promedio general del grupo control.

Ploidía	Media	Limite inferior	Limite superior
2n	190.84	156.86	224.83
3n	286.27*	252.28	320.25

*3n = 1.5 X 190.84

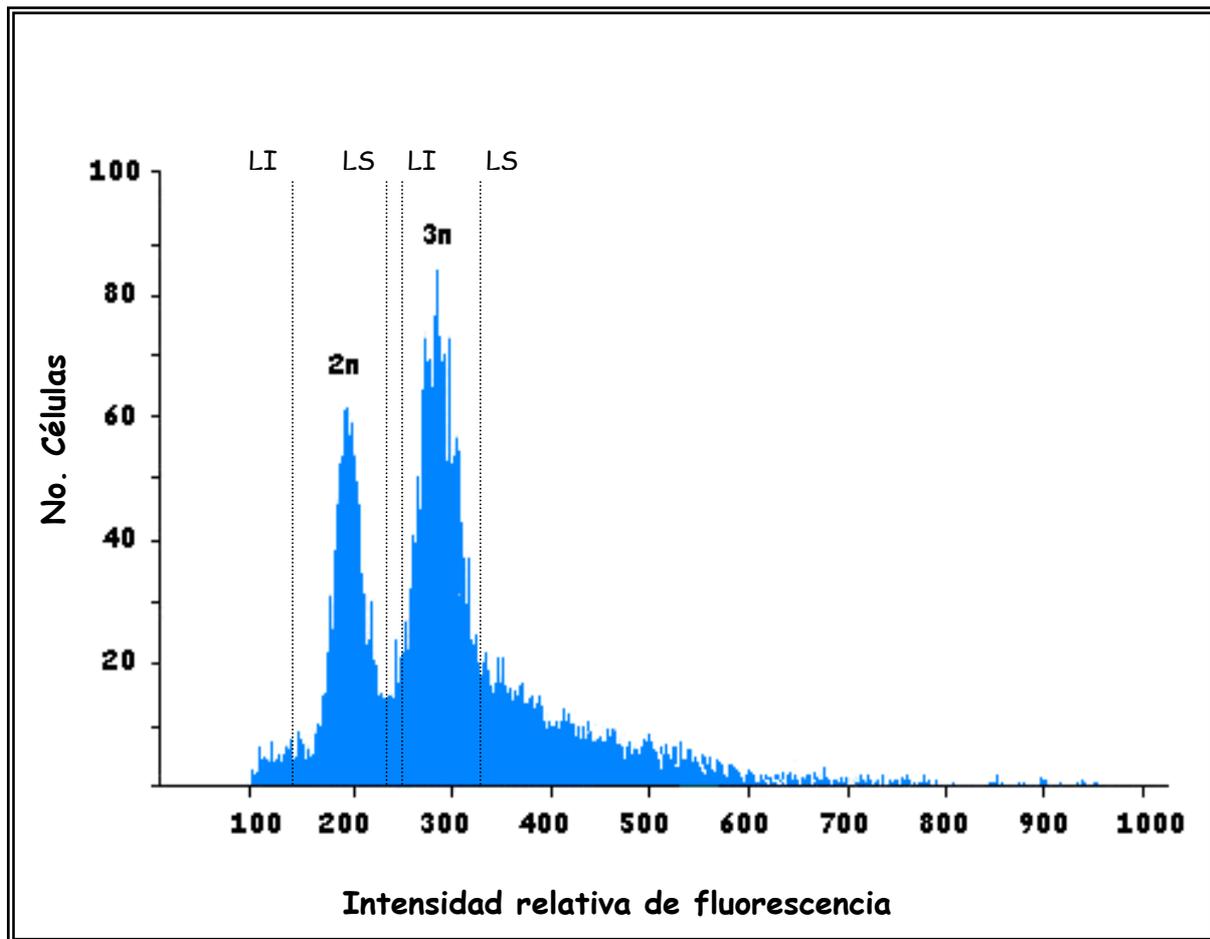


Fig. b.- Gráfica con los límites inferior (LI) y superior (LS)

Tabla c.- Datos obtenidos por medio del programa del citómetro de flujo y cálculo del porcentaje de ploidía.

Región	Área	Área (%)	Ploidía (%)
2n	1894	22.77	44.20 ¹
3n	2389	28.77	55.80 ²
suma	4283	51.54	100.00

$$^1 - (22.77/51.54) \times 100$$

$$^2 - (28.77/51.54) \times 100$$