



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
METROPOLITANA

IZTAPALAPA

DIVISION DE CIENCIAS BIOLOGICAS Y DE LA SALUD

INDUCCION A LA TRIPLOIDIA DEL CAMARON
BLANCO DEL PACIFICO (*Litopenaeus vannamei*,
BOONE, 1931).

MAESTRIA EN BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION ANIMAL

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGIA
DE LA REPRODUCCION ANIMAL
P R E S E N T A :
CLAUDIA GARNICA RIVERA

DIRECTORES DE TESIS:

DOCTOR JOSE LUIS ARREDONDO FIGUEROA
DOCTORA IRENE DE LOS ANGELES BARRIGA SOSA

MEXICO, D.F.

2001

México D.F. a Noviembre del 2001

CONACYT

PRESENTE:

Por medio de la presente deseo agradecer el apoyo brindado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT, para llevar a cabo la realización de mis estudios de maestría en Biología de la Reproducción Animal por medio de la beca número 137892, la cual tuvo una duración de febrero de 1999 a enero del 2001.

ATENTAMENTE



Biol. Claudia Garnica Rivera

INDUCCIÓN A LA TRIPLOIDIA DEL CAMARON BLANCO DEL PACÍFICO (*Litopenaeus vannamei* Boone, 1931).

RESUMEN

El cultivo de camarón a nivel mundial se realiza con especies marinas de la familia Penaeidae, géneros *Litopenaeus* y *Farfantepenaeus*. En México tres especies del género *Litopenaeus* se caracterizan por presentar particularidades apropiadas para el cultivo. La especie *Litopenaeus vannamei* del Pacífico Mexicano es considerada como una de las más adaptables a los sistemas de cultivo por tener una gran adaptación al cautiverio, amplia tolerancia en la calidad del agua, alta sobrevivencia y la mayor tasa de crecimiento observada, además de un alto valor en el mercado. La inducción a la triploidía y obtención de organismos estériles es considerada como una opción que representa grandes ventajas para la producción (incremento en el crecimiento, sabor de la carne, coloración más intensa en algunas especies y reducción en la mortalidad del huevo), lo cual se puede lograr con diferentes técnicas. En el presente trabajo se verificó el tiempo en el cual se llevaba a cabo la liberación del segundo cuerpo polar, observando que la mayor frecuencia se efectúa a los 18 minutos después de haber sido fecundado el huevo. Se realizó la inducción de la triploidia aplicando choques térmicos de temperatura los cuales fluctuaron de los 0 a los 40 °C con una duración entre los 5 y los 30 minutos, aplicándolos a los huevos cuando tenían de 0 a 24 minutos después de haber sido fecundados. Los resultados muestran que la triploidia se obtuvo aplicando el choque a una temperatura de 10 °C durante 15 minutos y a los 20 minutos después de la fecundación del huevo. Se verificó la obtención de organismos triploides (3n) mediante el conteo cromosómico y realizando una comparación con el número cromosómico de un organismo diploide (2n).

Palabras clave: Cultivo de camarón; *Litopenaeus vannamei*; triploidia.

EL JURADO DESIGNADO POR LA DIVISIÓN DE CIENCIAS
BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD DE LA UNIDAD IZTAPALAPA APROBO
LA TESIS QUE PRESENTÓ

CLAUDIA GARNICA RIVERA

NOVIEMBRE DEL 2001

Comité Tutorial:

Director: José Luis Arredondo Figueroa

Codirector: Dra. Irene de los Ángeles Barriga Sosa

Sinodal: Dr. Pablo Arturo Salame Méndez

Sinodal: M. en C. Armando Ferreira Nuño

A MI MADRE:

POR QUE SIEMPRE HAS SIDO MI EJEMPLO A SEGUIR.

A MI ESPOSO:

POR TU GRAN AMOR Y APOYO INCONDICIONAL.

A TI MI AMOR:

QUE AUN ANTES DE NACER ERES LA FUERZA Y ALEGRIA PARA SEGUIR ADELANTE.

AGRADECIMIENTOS

Mi sincero agradecimiento al Dr. José Luis Arredondo Figueroa y a la Dra. Irene de los Ángeles Barriga Sosa por el apoyo que me brindaron para la realización del presente trabajo, así como el haber compartido conmigo sus valiosos conocimientos.

A la empresa Acuacultores de la Paz S.A. de C.V., por permitirme utilizar sus instalaciones y organismos para llevar a cabo la parte experimental de este trabajo; muy en especial al Lic. Jaime Malagamba por brindarme todo el apoyo incondicional, Lic. Jorge Imas, Biol. Ricardo Dubost y al Dr. Oscar Soto por todas las facilidades y atenciones que tuvieron conmigo.

A todo el personal que labora en el área de maduración y reproducción de la empresa Acuacultores de la Paz S.A. de C. V. Por haberme brindado su ayuda y parte de su tiempo, a la Srita. Alma por todas las gentilezas que tuvo conmigo.

También al Ing. Claudio Chávez, por haberme permitido una estancia en las instalaciones de su granja camaronera y todas las facilidades que me brindo, de igual forma al Dr. Claudio Chávez Justo y al Ing. Alejandro Chávez Justo.

Al Dr. Arturo Salame y al M. en C. Armando Ferreira por todas sus valiosas observaciones para este trabajo.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
MARCO TEÓRICO	4
Características generales	4
Taxonomía	4
Morfología	5
Dimorfismo sexual	7
Ciclo de vida	8
Reproducción	12
Desarrollo gonádico	14
Maduración gonadal en las hembras	14
Control hormonal de la maduración	17
Alimentación	19
Factores ambientales	20
Triploidia	23
ANTECEDENTES	26
OBJETIVOS	30
HIPÓTESIS	31
JUSTIFICACIÓN	31
MATERIALES Y MÉTODOS	34
Determinación del número cromosómico para <i>Litopenaeus vannamei</i>	34
Manejo de reproductores	35
Expulsión de los cuerpos polares	38
Inducción de la triploidia	39
Diseño de los experimentos	40
Verificación de la triploidia	41
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45
Número cromosómico de organismos 2n	45

Eventos post-fertilización	46
Triploidia	49
CONCLUSIONES	55
RECOMENDACIONES	56
ANEXO 1	57
BIBLIOGRAFÍA	60

RELACIÓN DE TABLAS Y FIGURAS

- Figura 1.- Morfología de un camarón de la familia Penaeidae.
- Figura 2.- Diferentes estadios larvarios del camarón.
- Figura 3.- Télicum, petasma y espermatóforo de algunos camarones Penaeidos.
- Figura 4.- Estados de madurez de los ovarios de una hembra de camarón de la familia Penaeidae.
- Figura 5.- Proceso de ablación de los camarones Peneidos para inducir la reproducción.
- Figura 6.- Reproductores de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*).
- Figura 7.- Selección de una hembra parchada.
- Figura 8.- Hembra en el momento del desove.
- Figura 9.- Tinajas de plástico de 100 litros de capacidad, utilizadas en el trabajo experimental.
- Figura 10.- Nauplios del camarón blanco.
- Figura 11.- Diagrama que muestra la metodología utilizada en el presente trabajo.
- Figura 12.- Fotografía de los cromosomas de un camarón diploide (2n).
- Figura 13.- Número de células registradas y de cromosomas observados de acuerdo con el conteo de células realizado en la investigación.
- Figura 14.- Fotografías de la expulsión del cuerpo polar.
- Figura 15.- Número de huevos donde se observó la expulsión del segundo cuerpo polar en relación al tiempo.
- Figura 16.- Cromosomas de un camarón triploide (3n).

Tabla 1.- Clasificación taxonómica del camarón blanco (Crustacea: Decapoda) de acuerdo a Martínez (1993).

Tabla 2.- Intervalos óptimos y críticos para el cultivo del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*.

Tabla 3.- Experimentos realizados en la presente investigación para inducir la triploidia.

INTRODUCCIÓN

A nivel mundial los camarones marinos de la familia Penaeidae, están conformados por 60 especies, de las cuales más del 80% han sido cultivadas a diferentes niveles de intensidad tecnológica. En México, contamos con seis especies que presentan características apropiadas para ser cultivadas. Tres de ellas pertenecen al género *Farfantepenaeus* y las tres restantes al género *Litopenaeus*.

Entre las especies que tienen las mejores posibilidades de manejo en sistemas de cultivo destacan en el litoral del Pacífico, el camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*), el camarón azul (*Litopenaeus stylirostris*) y el camarón café (*Farfantepenaeus californiensis*) y en el Golfo de México, el camarón rosado (*Farfantepenaeus duorarum*), el camarón blanco (*Litopenaeus setiferus*) y el camarón café (*Farfantepenaeus aztecus*) (Arredondo, 1990a *vide* : Arredondo y Lozano, en prensa).

De las especies antes mencionadas particularmente el camarón blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*), es considerado como una de las especies más adaptable a los sistemas de cultivo, ya que existen tecnologías que han sido aplicadas y probadas durante más de veinte años a escala mundial y que han arrojado buenos resultados. Además, este organismo presenta una gran facilidad de adaptación al cautiverio, una amplia tolerancia a los cambios de calidad del agua, una alta sobrevivencia, su tasa de crecimiento

es mayor en comparación con otras especies y alcanza un elevado valor económico en los mercados tanto nacional como internacional.

Actualmente, el cultivo de camarón ha alcanzado una gran relevancia en países tales como Tailandia, Indonesia y Ecuador, los cuales en el año de 1998 ocuparon los tres primeros lugares de la producción a nivel mundial, siendo esta de 223,000, 156,000 y 108,000 toneladas respectivamente. En nuestro país la camaronicultura es más reciente y se inicia formalmente en 1985. La producción total obtenida en 1998 que incluye a la pesca y a la acuicultura alcanzó más de 70,000 toneladas, de las cuales 48,000 toneladas fueron extraídas por medio de pesquerías tanto en altamar como en esteros, bahías y lagunas costeras, mientras que 23,000 toneladas fueron obtenidas mediante cultivos en granjas camaroneras, lo que ubica a nuestro país con esta producción en el décimo lugar a nivel mundial (Anuario estadístico de Pesca, 1998).

Debido al enorme potencial que tiene México en ambas costas es necesario promover e impulsar el cultivo de camarón en granjas, para poder satisfacer la necesidad creciente de este producto, sin tener que sobre explotar los recursos marinos.

El cultivo de cualquier especie en cautiverio, conlleva una elevada inversión para producir volúmenes en cantidad y calidad suficiente para hacer

rentable la actividad y competir en los mercados nacional e internacional. Para lograr la rentabilidad económica y/o financiera del cultivo es necesario considerar un gran número de factores que tienen que ser contemplados en los proyectos productivos, entre los cuáles podemos mencionar los insumos básicos de la producción tales como el abastecimiento constante y permanente de postlarvas, de alimentos balanceados, fertilizantes y químicos, el mantenimiento de las instalaciones, la mano de obra y otros más. En particular el cultivo del camarón requiere de una fuerte inversión, ya que si bien este producto tiene una gran aceptación en el mercado nacional e internacional y alcanza buenos precios, la recuperación del capital invertido requiere de varios años, dependiendo de la intensidad tecnológica que se aplique al cultivo. Por esto mismo, es de gran importancia poder ofrecer a los productores tecnologías mediante las cuales se puedan abatir los costos de producción, como por ejemplo la disponibilidad constante de postlarvas resistentes a las enfermedades y a los cambios de la calidad del agua, el manejo eficiente de la densidad, de la nutrición y alimentación de los organismos, y líneas o variedades de camarón que alcancen la talla comercial en un menor tiempo, y que sean más resistentes a las condiciones de manejo, lo cual implicaría una reducción significativa en los costos de operación de las granjas, para que así tanto las grandes como las pequeñas granjas camaroneras puedan tener una producción que satisfaga las demandas del mercado.

MARCO TEÓRICO

Características generales

El camarón blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*) es una especie nativa de la costa oeste del Océano Pacífico. Esta especie se encuentra distribuida a todo lo largo del Pacífico desde Sonora, México, hasta Tumbes en el norte del Perú (Perez-Farfante y Kensley, 1997). Se le puede localizar en la zona costera desde la línea de costa en aguas someras hasta los 72 metros de profundidad, sobre fondos fangosos, con preferencia por las aguas marinas en su vida de adulto y por las estuarinas o salobres en los estadios de postlarva hasta juvenil. Es la especie más cultivada en América, ya que es eurihalina (tolera desde 5 a 40 ‰) y euritérmica (tolera de los 10 a los 34 °C), y se estima que su talla máxima alcanza los 23 cm de longitud corporal total desde la punta del telson hasta el final de los urópodos (Takeda, 1989).

Taxonomía

Como miembros de los crustáceos, los camarones son artrópodos mandibulados con apéndices birrameos articulados, con dos pares de antenas, caparazón, branquias y la presencia de larvas nauplio.

Los camarones penaeidos se clasifican dentro de la clase Crustacea, orden Decapoda, familia Penaeidae (Tabla 1). La familia Penaeidae, está constituida por 14 géneros que incluyen a un total de 120 especies. Dentro de esta familia los camarones de los géneros *Fenneropenaeus*,

Marsupenaeus, *Litopenaeus* y *Farfantepenaeus*, se consideran los de mayor importancia en las industrias pesquera y acuícola. Se han registrado un total de 28 especies en el mundo. Estas especies se encuentran distribuidas principalmente en las zonas tropicales o subtropicales y como característica morfológica poseen de 1 a 4 dientes a lo largo del margen inferior del rostro (Takeda, 1989).

Tabla 1. Clasificación taxonómica del camarón blanco (Crustacea: Decapoda) de acuerdo con Martínez (1993).

Phylum (Subphylum)	Crustacea
Clase	Malacostraca, Latreille, 1806.
Subclase	Eumalacostraca, Grobben, 1892.
Cohorte	Eucarida, Calman, 1904.
Orden	Decapoda, Latreille. 1803.
Suborden	Dendobranquiata, Bate, 1888.
Superfamilia	Penaeidae, Rafinesque. 1805.
Familia	Penaeidae.
Subfamilia	Penaeinae.
Géneros	<i>Litopenaeus</i>
Especie	<i>vannamei</i> (Boone, 1931)

Morfología

El cuerpo de los camarones penaeidos se divide en tres regiones bien definidas y conspicuas: cefalotórax, abdomen y telson. Los apéndices del cefalotórax son: anténulas, antenas, mandíbulas, maxilas, maxilípedos y pereopodos. El abdomen está formado por seis segmentos y seis pares de apéndices llamados pleopodos cuya función es natatoria. En el telson se encuentran los urópodos, que sirven también para la natación. El

exoesqueleto en la región del cefalotórax, presenta diferentes procesos como espinas, suturas y surcos, cuya forma, tamaño y distribución es característica para cada especie (Figura 1).

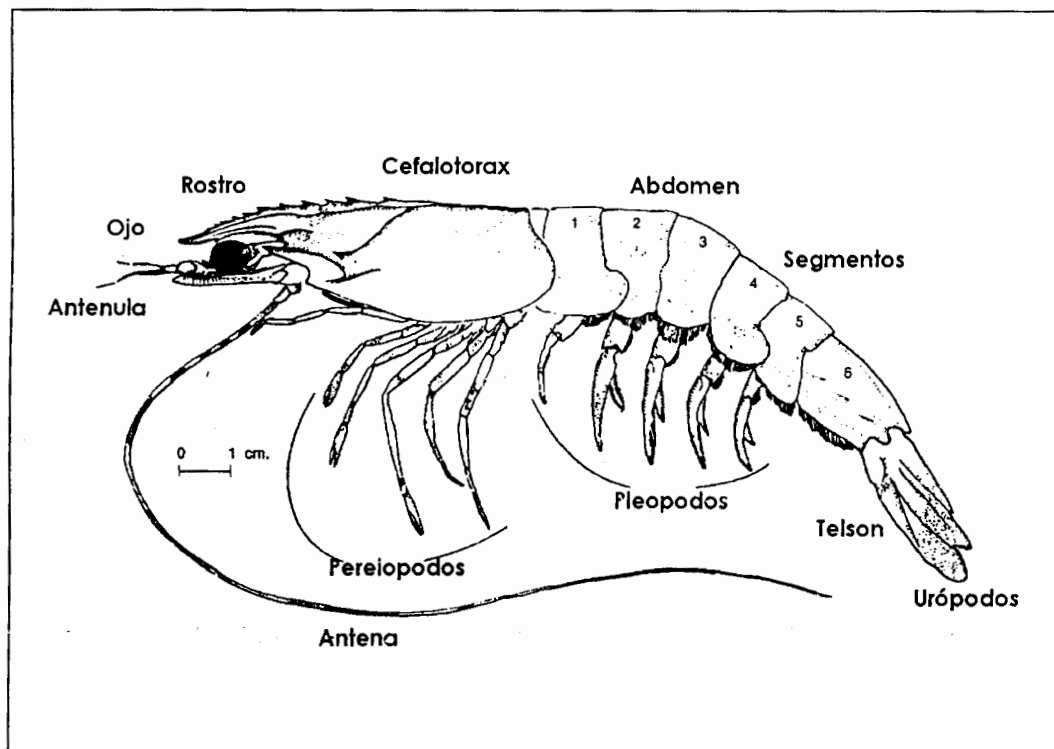


Figura 1. Morfología de un camarón de la familia Penaeidae.

La familia Penaeidae, se caracteriza por tener el cuerpo poco o considerablemente comprimido, rostro por lo general bien desarrollado, comprimido lateralmente y aserrado; pedúnculos oculares de moderados a muy largos, anténulas con dos flagelos, mandíbula con un proceso incisivo y el palpo con uno o dos artejos, primeros tres pares de apéndices similares, quelados, planos, incrementándose posteriormente en longitud; cuarto y quinto par de apéndices bien desarrollados y simples.

La mayoría de los órganos de los camarones se encuentran en la región del cefalotórax. El cerebro es trilobulado y presenta un ganglio supraesofágico. El sistema nervioso es ventral en el tórax y en el abdomen, con los ganglios metamerizados.

El corazón es ventral y se conecta directamente con el hemoceloma a través de arterias abdominales. El sistema digestivo se compone de una boca, estómago y hepatopáncreas situados en el cefalotórax; un intestino, una glándula intestinal en el abdomen y el ano situado ventralmente donde comienza el telson (Martínez, 1993).

Dimorfismo Sexual

El télico es una modificación que tiene la hembra en la parte ventral del cefalotórax a la altura del 3°, 4° y 5° par de pereiópodos, encontrándose las coxas de este último par de apéndices mucho más separadas que el resto, en esta estructura es donde el macho deposita el espermatóforo.

En cuanto a los machos estos presentan una serie de modificaciones; las coxas del quinto par de pereiópodos son de mayor tamaño que el resto debido a que en ellas se forman los espermatóforos, uno en cada coxa. El espermatóforo es una masa de espermatozoides envuelta en una cubierta dura. Otra de las modificaciones es el petasma; el cual está relacionado con la transferencia del espermatóforo, es una modificación en los endopoditos del primer par de pleópodos, ambos se unen por un borde interno

membranoso que tiene una serie de estructuras quitinosas, dando la impresión de un cierre relámpago, y por último la *appendix masculina*, el cual es un anexo del segundo par de pleópodos insertado a la altura del basidopodito, formado por dos ramas una mayor espatulada y otra pequeña delgada y con sedas en el borde interno (Fenucci, 1997).

Ciclo de vida.

Típicamente el ciclo vital de los camarones penaeidos ocurre en dos diferentes tipos de ambientes: 1) ambiente marino, el cual es relativamente profundo e hidrológicamente estable y 2) ambiente estuarino, que es relativamente somero e hidrológicamente inestable (Chávez, 1990). En el ambiente marino ocurre la maduración sexual, la copula, el desove y el desarrollo larval; mientras que en el ambiente estuarino, las postlarvas al haber sido transportadas por las corrientes o haber emigrado, se nutren de los productos ricos del ambiente estuarino, donde se desarrollan a juveniles y crecen hasta el estado subadulto. Este patrón de desplazamiento puede ocurrir estacionalmente en el caso de las especies de hábitat templados, las cuales durante la estación fría migran hacia aguas profundas. Mientras que los camarones penaeidos de hábitat tropicales pueden vivir durante todo el año en el ambiente estuarino, y solo efectuar desplazamientos a aguas profundas al momento de madurar y reproducirse. No obstante, aún en los camarones penaeidos de hábitat tropicales que pueden exhibir actividad reproductora durante todo el año, está limitada ya que todas las especies de

peneidos tiene un máximo de actividad reproductora; este máximo puede estar sincronizado para una cierta especie por factores ambientales cambiantes, tales como la temperatura, el fotoperíodo o la salinidad (Takeda, 1989).

Según Juárez y Palomo (1985, *fide*: Arredondo y Lozano, en prensa), los camarones peneidos son organismos de vida corta, entre uno y dos años; su ciclo de vida comprende distintas fases: huevo, larvas (nauplio, protozoea y mysis), postlarvas, juveniles y adultos. Los camarones penetran al sistema estuarino en estado de postlarva donde permanecen hasta la fase de juvenil para después emigrar hacia el mar abierto donde logran la maduración y se reproducen. La cópula y el desove ocurren en aguas oceánicas profundas. Los huevos miden entre 0.22 y 0.32 mm y eclosionan entre las 11 y 18 horas después del desove a una temperatura entre 27 y 29 °C. Cuando eclosionan, el organismo resultante pasa por tres estadios larvales básicos: nauplio, protozoea y mysis en sucesivas mudas, a la vez que se desplaza hacia la zona costera. La talla de los camarones peneidos va aumentando durante los diferentes estadios larvales, así el nauplio llega a medir hasta 0.58 mm; la protozoea 2.59 mm y la mysis alcanza una talla promedio de 4.3 mm de longitud.

Chávez, (1990), señala que el desarrollo larval de los penaeidos se inicia una vez que los huevos han eclosionado (aproximadamente 14 horas después de

la fertilización, a 28 °C) y termina cuando la larva se ha transformado en postlarva, para lo cual pasa por tres estadios denominados por orden de aparición nauplio, zoea y mysis.

- 1) Nauplio. Este estadio está compuesto por 5 a 6 subestadios (dependiendo de la especie). Durante el mismo las partes bucales de las larvas se muestran sin desarrollo por lo que se alimentan únicamente de su vitelo. El periodo de transición del estadio nauplio puede durar de 36 a 51 h dependiendo de la temperatura, el nado característico del nauplio es “intermitente”.
- 2) Zoea. El estadio de protozoea está compuesto por tres subestadios, la zoea se alimenta básicamente de fitoplancton y su periodo de transición es de aproximadamente 120 h. El nado característico de la zoea es “constante” de dirección delantera o circular.
- 3) Mysis. Constituido por 3 subestadios, esta se alimenta de una amplia variedad de zooplancton y se parece más a la forma de adulto. Su duración es aproximadamente de 72 h. El nado característico es “aleatorio” (Figura 2).

Finalmente, el desarrollo larval que concluye en aproximadamente doce días da lugar al estadio de postlarva que es muy parecida al adulto, aunque no está pigmentada y se alimenta casi exclusivamente de zooplancton.

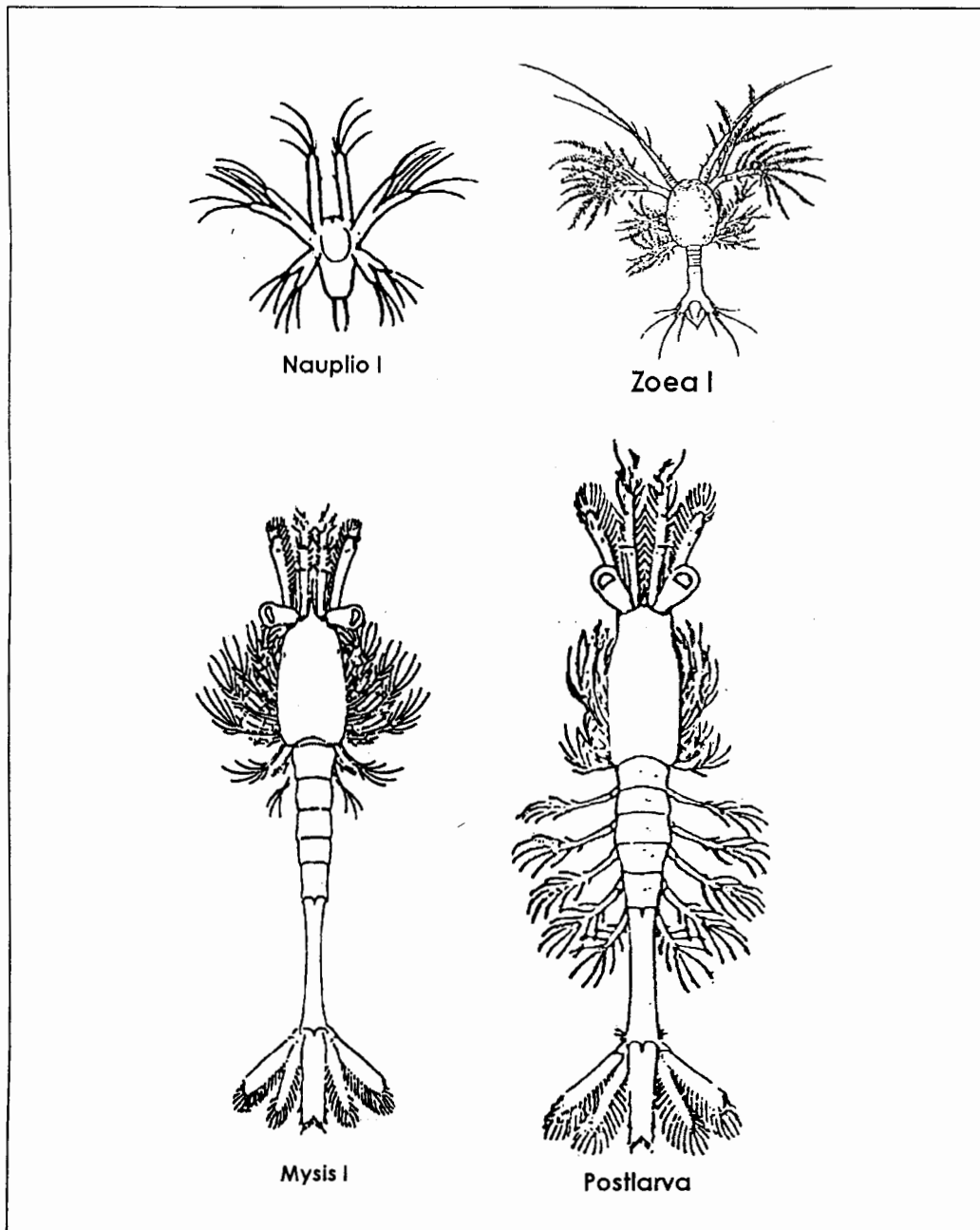


Figura 2.- Diferentes estadios larvarios del camarón (sin escala).

Reproducción.

Existen dos tipos de crustáceos decápodos de la familia Penaeidae, los de télico abierto y los de télico cerrado, los cuales difieren en su morfología y en su estructura. El télico tiene la función de recibir al espermatóforo y se sitúa entre la base del quinto par de pereiópodos. Las especies pertenecientes al género *Farfantepenaeus* presentan un télico cerrado y las del género *Litopenaeus* télico abierto.

El télico cerrado presenta placas laterales que conducen a un receptáculo seminal donde los espermatóforos son insertados. En estas especies los espermatóforos son transferidos poco después de mudar la hembra, cuando los ovarios aún no se encuentran maduros. Por lo que los espermatozoides permanecen viables dentro del télico durante el largo período de intermuda, y además pueden fertilizar varios desoves sucesivos (Martínez, 1993).

Las hembras de télico abierto presentan crestas y protuberancias especializadas para la fijación del espermatóforo, en estos camarones penaeidos los espermatóforos son transferidos a las hembras grávidas pocas horas antes de cada desove.

El par de testículos del macho se extienden a lo largo del cefalotórax, y tienen lóbulos laterales que descienden sobre el hepatopáncreas. El último

lóbulo conduce al vaso deferente, el cual lleva el espermatozoide a la ampolla terminal que se localiza en la base posterior del último periópodo.

El espermatóforo es la estructura que contiene a la masa de espermatozoides y es transferido durante la copulación (Chávez, 1990) (Figura 3).

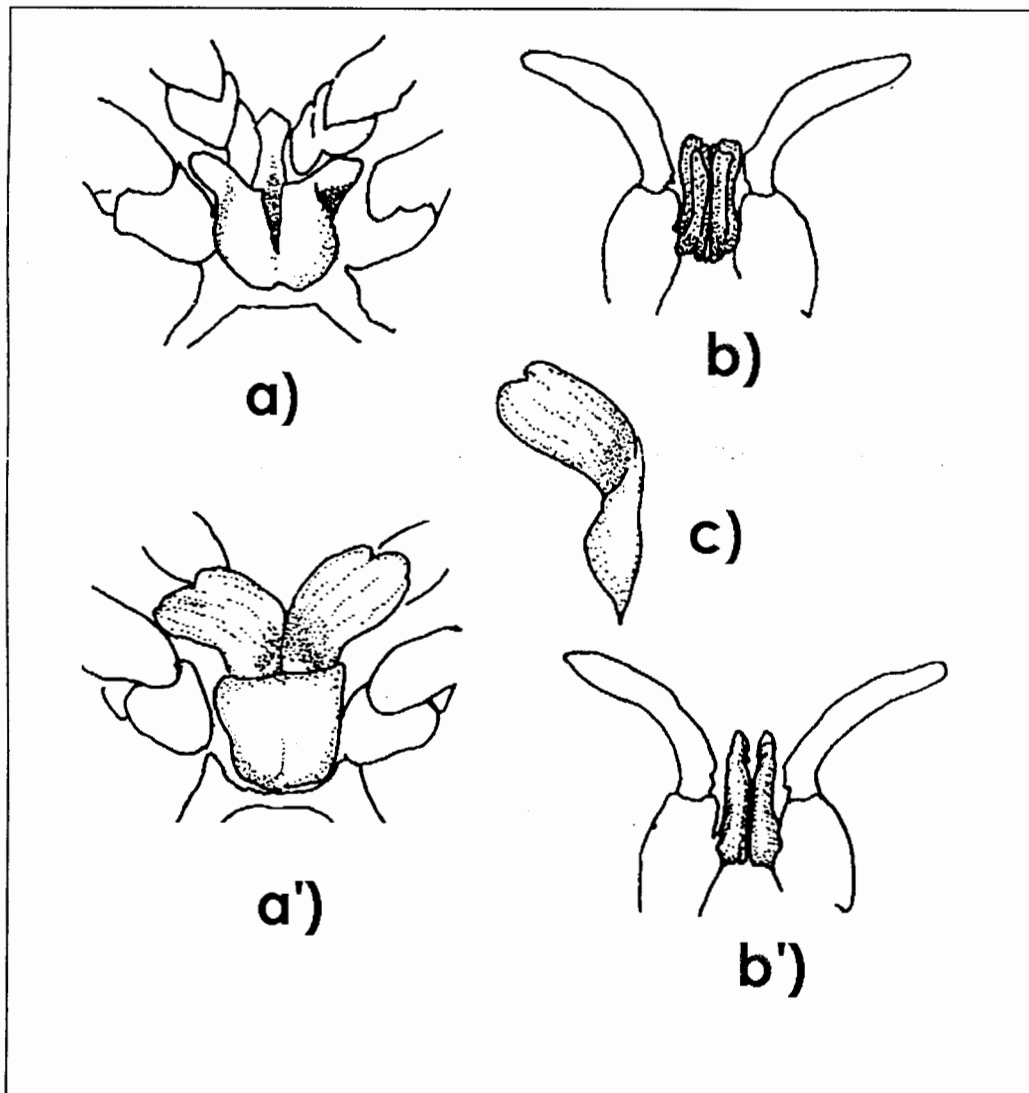


Figura 3. Télum (a y a'); petasma (b y b') y espermatóforo (c) de algunos camarones Penaeidos.

Desarrollo gonádico

Es el proceso por medio del cual los machos y las hembras desarrollan sus órganos reproductores hasta producir óvulos y espermatozoides viables. Los camarones presentan diferentes características externas de maduración.

Maduración gonadal en las hembras

Según Fenucci (1997), los ovarios de acuerdo al estadio de maduración, se extienden de la pared anterior del cefalotórax al telson, dependiendo del tamaño, color y textura; para identificar cada uno de los estados de madurez en los ovarios se han descrito diferentes estadios (Figura 4).

Estadio I.- Gónadas transparentes de aspecto filiforme, pequeñas comparadas con los demás órganos y confinadas al abdomen, flácidas y de color blanco translúcido.

Estadio II.- Gónadas transparentes, con aspecto filiforme pero con un esbozo de desarrollo del lóbulo anterior, y con pocos cromatóforos.

Estadio III.- Gónadas transparentes, hay un alargamiento importante, reconociéndose un lóbulo anterior con lobulaciones digitiformes que cubren

el hepatopáncreas y la región abdominal más engrosada y bien diferenciada del intestino, presentan muchos cromatóforos.

Estadio IV.- Ovarios visibles a través del exoesqueleto, se diferencian tres regiones una anterior con dos lóbulos, una media con varias lobulaciones y una posterior que se continua hasta el telson, el color es verde pálido.

Estadio V.- Ovarios visibles a través del tegumento, color verde oliva, con cromatóforos. La región anterior compuesta por dos lóbulos doblados en forma de gancho que llegan al extremo de la región cefálica. La región media con seis lobulaciones laterales digitiformes y una región posterior abdominal que se extiende hasta el telson.

Estadio VI.- Las mismas características externas que el estadio V, pero la consistencia es flácida y cremosa, deshaciéndose al tratar de removerlo, de color verde rojizo (estos son los ovarios después de desovar).

Una vez que las hembras han alcanzado su madurez se lleva a cabo la cópula, la cual comienza cuando el macho nada repetidamente acercándose a la hembra por detrás, a este se le puede llamar un comportamiento de reconocimiento; posteriormente el macho se aproxima a la hembra por detrás y coloca su cabeza por debajo de la cola de la hembra, esta aproximación a menudo resulta en un escape de la hembra. Simultáneo al

nado del macho por bajo la cola de la hembra, la hembra comienza a nadar rápidamente por delante. La hembra nada en una línea ligeramente curva a lo largo de la pared del estanque y el macho la sigue en una posición de nado paralelo siguiendo los cambios de dirección de la hembra. El macho después de perseguir a la hembra se voltea con el vientre hacia arriba y se prende a la hembra, en este momento es cuando el espermatóforo queda adherido (Takeda, 1989).

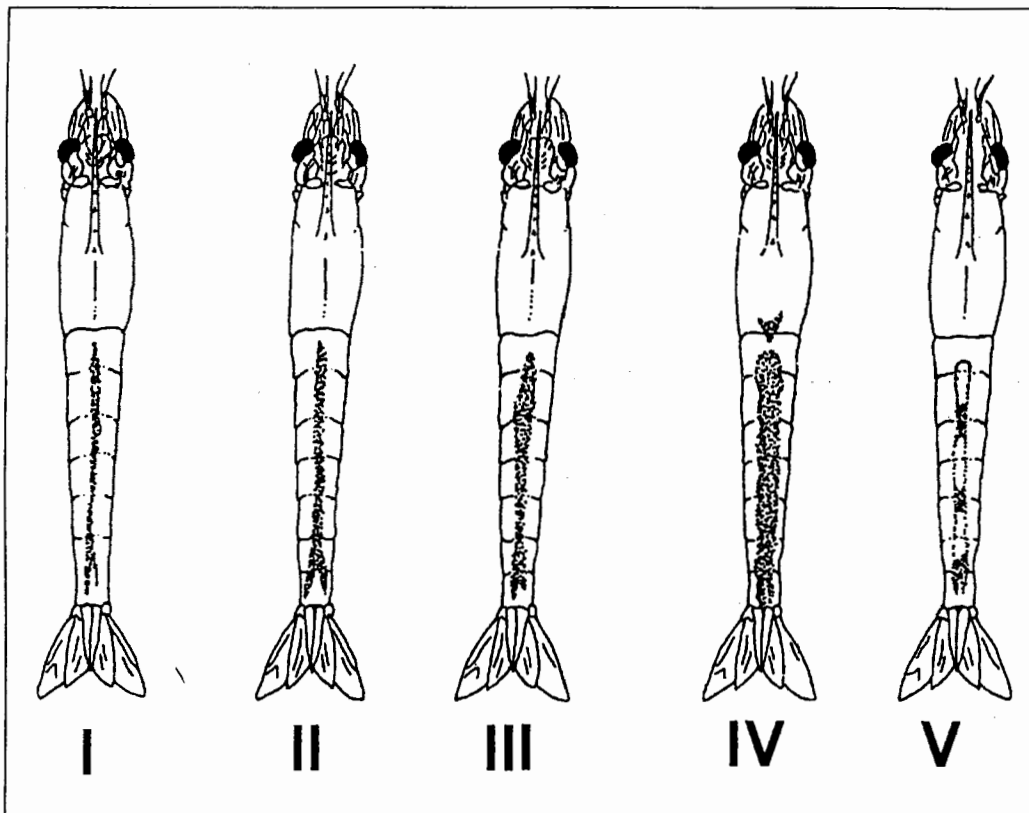


Figura 4. Estados de madurez de los ovarios de una hembra de camarón de la familia Penaeidae.

El desove ocurre regularmente en el transcurso de las siguientes dos horas. La copulación en los camarones penaeidos aunque aparentemente parece

efectuarse con mayor frecuencia durante la noche, también puede ocurrir bajo condiciones de iluminación (Chávez, 1990).

Control hormonal de la maduración

En los crustáceos los pedúnculos oculares contienen una variedad de hormonas que actúan sobre diversas funciones tales como crecimiento, metabolismo en general, muda, equilibrio osmótico, etc. Las hormonas son producidas por células nerviosas (neurosecretoras) que se encuentran en los pedúnculos oculares y el cerebro. Las secreciones son transportadas a lo largo de los axones a la glándula del seno hasta que por un estímulo son descargadas en la hemolinfa.

En el pedúnculo ocular se encuentra el complejo órgano X, glándula del seno que produce una variedad de hormonas, una de las cuales inhibe el desarrollo de las gónadas (ovarios y testículos) y otra la hormona inhibidora de la muda (MIH). Existen además, otro par de glándulas que se encuentran en la proximidad de las mandíbulas (glándulas Y) que segregan la sustancia responsable de la iniciación del proceso de muda (si se extirpa esta glándula el animal es incapaz de mudar). Existe también una glándula androgénica cuya secreción determina los caracteres primarios y secundarios de los machos y el ovario, y cuyas hormonas determinan los caracteres sexuales de las hembras (Chamberlain y Gervais, 1984).

Como es de imaginarse, si a un crustáceo se le extirpa el pedúnculo ocular se produce un aumento en la frecuencia de la muda y un incremento en la vitelogénesis, es decir de la maduración.

Para lograr obtener la reproducción de los camarones en cautiverio es necesario inducir la maduración de las gónadas y existen diferentes métodos que se emplean con la finalidad de acelerar este proceso. Uno de los cuales es la enucleación, la cual se lleva a cabo sujetando a la hembra por la parte dorsal de manera tal que el pedúnculo ocular quede libre, una vez sujeto el organismo se calienta en la flama una aguja. poniéndola al rojo vivo y se realiza una incisión en el pedúnculo ocular “exprimiendo” todo el contenido de éste, teniendo especial cuidado en no dejar nada en el pedúnculo ya que de otra forma no se obtienen los resultados esperados.

Otra técnica muy utilizada es la ablación, ésta se realiza sujetando al organismo como se describió anteriormente, se esterilizan unas tijeras y se corta el pedúnculo ocular en el cual se encuentra el órgano X (Chamberlain y Gervais, 1984) (Figura 5).

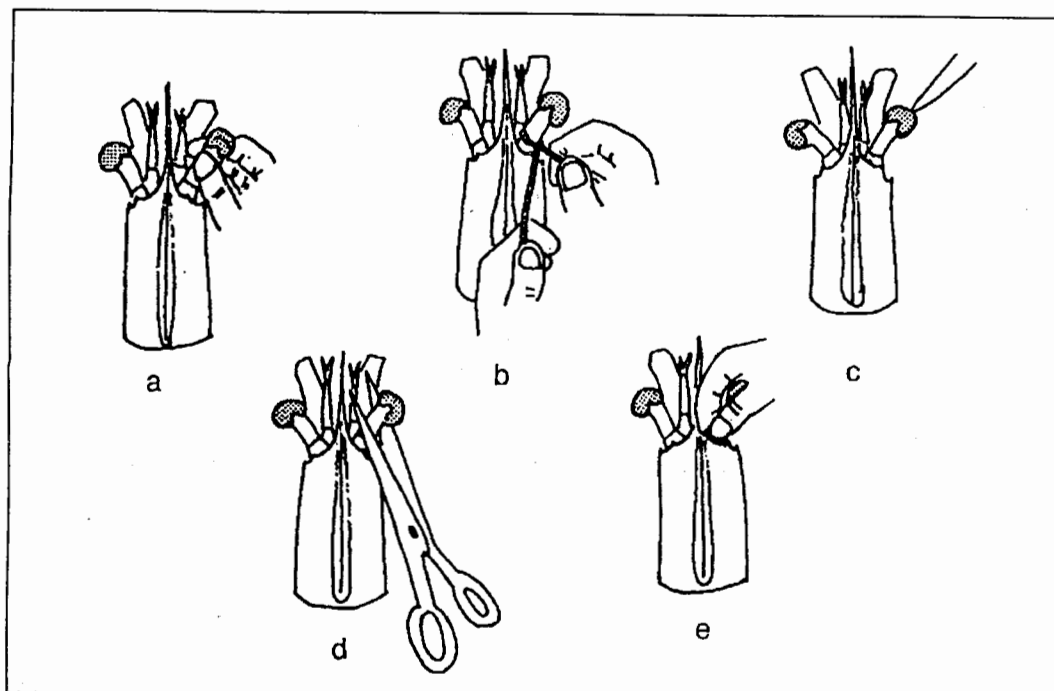


Figura 5. Proceso de ablación de los camarones peneidos para inducir la reproducción. a) reconocimiento; b) ligadura; c) cauterización; d) corte y e) revisión.

Se debe de destacar que si bien la ablación y la enucleación promueven la maduración, para completarla es necesaria la presencia de los machos ya que en la mayoría de las especies el estadio de maduración total se alcanza luego de que las hembras han sido fecundadas (Chamberlain y Gervais, 1984).

Alimentación

La alimentación es de fundamental importancia en el proceso de la maduración, principalmente cuando se trata de efectuar ésta en pequeños estanques. Dentro de los compuestos fundamentales de la dieta se

encuentran las grasas, principalmente los ácidos grasos de la serie linolénica (ω_3 , de origen marino), colesterol y sus derivados.

Es por ello que se utilizan alimentos naturales ricos en estos compuestos, los cuales sumados a la ablación unilateral y a condiciones ambientales favorables, permiten obtener la maduración gonadal.

Entre las dietas más usadas se encuentran combinaciones de anélidos marinos, ostiones, mejillones, calamares, camarones, hueva de pescado, etc. En algunos casos, se utilizan algunos de estos alimentos naturales complementados con dietas balanceadas peletizadas, por lo general el alimento se administra en cantidades que van del 3 al 17% de la biomasa del organismo, repartido de 2 a 4 raciones diarias (Fenucci, 1997).

Factores Ambientales

Los factores fisicoquímicos que determinan la calidad del agua apropiada para el cultivo de camarones penaeidos, básicamente son: la temperatura del agua, la salinidad, la concentración de oxígeno disuelto, la transparencia del agua, el pH y el amonio no ionizado (NH_3).

Cualquier característica del agua que afecte la sobrevivencia, el crecimiento y la producción en cualquier forma, es una variable de la calidad del agua. Algunas de estas variables juegan un papel importante y pueden ser

controladas en algún grado por técnicas apropiadas de manejo (Anónimo, 1988a, *fide*: Arredondo y Lozano, en prensa) (Tabla 2).

Tabla 2. Intervalos óptimos y críticos para el cultivo del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, tomado de FAO, 1991 *fide*: Arredondo y Lozano en prensa).

Parámetros fisicoquímicos	Intervalos óptimos	Intervalos críticos
Temperatura °C	25 a 30	<10 y >34
Salinidad (‰)	15 a 25	<5 y >40
pH	7.2 a 8.2	<5 y >10
Oxígeno disuelto (mg/L)	3 a 5	<2
Amonio no ionizado (mg/L)	0 a 0.20	>0.25

Temperatura.- El camarón es un organismo poiquilotermo, por lo tanto, la temperatura influye de modo directo sobre su metabolismo. El hecho de que el periodo de digestión depende de la temperatura resulta comprensible desde el momento en que intervienen un gran número de reacciones químicas, cuya velocidad se encuentra determinada por la temperatura del agua; a mayor temperatura mayor actividad enzimática y en consecuencia una intensificación en los procesos de digestión. Las temperaturas óptimas del agua para un crecimiento rápido son superiores a los 25 °C y menores a los 30 °C.

Salinidad.- La salinidad es la cantidad de sales disueltas en el agua de mar, se expresa en gramos de sales en un kilogramo de agua en partes por mil (‰). La salinidad del agua de mar se debe a un numeroso conjunto de sales

inorgánicas muy variadas, que se encuentran asociadas a sus respectivos iones. El camarón es un organismo eurihalino, soporta cambios amplios de salinidad, su crecimiento se mantiene más o menos constante en intervalos que van de 10 a 38 ‰.

pH.- El pH es una medida de la concentración de iones de hidrógeno e indica si el agua es ácida o básica. El intervalo óptimo para el camarón fluctúa de 7.2 a 8.2 unidades de pH.

Oxígeno disuelto.- Es probablemente uno de los parámetros más relevantes en la cría de los camarones, el grado de solubilidad de este elemento es una variable dependiente de la temperatura, la salinidad y la materia orgánica e inorgánica, así como del ritmo de producción y consumo característicos para cada ecosistema. La concentración mínima de oxígeno disuelto que puede soportar un organismo depende de la talla y el tiempo de exposición. Intervalos de 3 a 5 mg/L son los recomendables para la sobrevivencia y el buen desarrollo de los camarones.

Amonio no ionizado (NH_3).- Es uno de los principales productos de excreción del camarón y es tóxico para los crustáceos, así como para la mayoría de los organismos acuáticos, aun en pequeñas concentraciones (Alcaráz, 1993 *vide*: Arredondo y Lozano, en prensa).

Triploidia

La producción de plantas poliploides en la agricultura lleva varios años de estudio, sin embargo este tipo de investigaciones son menos frecuentes en la acuicultura. En los últimos años los estudios relacionados con la obtención de organismos acuáticos poliploides ha comenzado a tomar un mayor interés por las beneficios que se obtienen con ellos (Berntsen, 1989).

El contar con organismos triploides representa un gran número de ventajas, tales como el hecho de que estos ocupan la energía que emplearían en la reproducción para su crecimiento. Sin embargo, no todos los organismos poliploides son estériles ya que los organismos tetraploides en comparación con los triploides son fértiles, ya que el número de cromosomas $4N$ sigue siendo viable al multiplicarse y crear un organismo $8N$ (Berntsen, 1989). Otras de las ventajas que se tiene con los organismos estériles es el sabor de la carne que es más agradable e incluso en algunas especies se presenta una coloración más intensa (Bramick *et al.*, 1995) y en algunos organismos se reduce la mortalidad del huevo (Komaru *et al.*, 1988).

Existen varios métodos para producir organismos triploides tales como el tratamiento con Citocalasina B (Stanley *et al.*, 1981). Esta sustancia es un fungicida que altera las propiedades de la membrana plasmática de la célula (Copeland, 1974) y aparentemente destruye los microfilamentos y altera la permeabilidad de la membrana (Longo, 1983). Otro tratamiento es por

medio de presión (Muller *et al.*, 1978), otro es la aplicación de temperaturas altas (Chourrout, 1980; Thorgaard *et al.*, 1981) y temperatura bajas (Lemoine y Smith, 1980; Lincoln *et al.*, 1974). A estos dos últimos procedimientos se les conocen como “choque térmico”.

A pesar de que aparentemente es fácil inducir la triploidia, no obstante, la comprobación de la inducción en los organismos ha resultado ser uno de los mayores problemas. Para verificar este fenómeno se han utilizado diferentes técnicas tales como el conteo de los cuerpos polares, la citometría de flujo, la electroforesis y el análisis del cariotipo. Todas estas técnicas presentan sus ventajas y desventajas.

El conteo de los cuerpos polares es simple y aunque se puede realizar desde la etapa de embrión es necesario repetir la prueba en un estado más avanzado para ratificar la poliploidia; la citometría de flujo es un método rápido y confiable para determinar la poliploidia; en cuanto a la electroforesis a pesar de ofrecer resultados confiables requiere de determinar previamente la variabilidad genética de la especie, por lo que es un método poco usado (Komaru, *et al.*, 1988), por otro lado el análisis del cariotipo, es un método laborioso y complicado, pero sin duda es uno de los más confiables.

La observación o examinación del cariotipo provee la información básica de la estructura física del genoma (Morelli *et al.*, 1998). En crustáceos son pocos los datos del cariotipo de los diversos grupos y es muy amplio el número de cromosomas reportados ya que van desde cuatro cromosomas en copépodos, hasta un excepcional alto número de 376 para el caso de los astácidos. En los camarones penaeidos se reporta una gran variación en el número de cromosomas que va desde 86 hasta 92 (Hedgecock *et al.*, 1982).

ANTECEDENTES

A finales de la década de los 70's se realizaron los primeros trabajos sobre la inducción de poliploidia en organismos acuáticos, desde entonces y hasta la fecha este tipo de investigaciones ha adquirido cada vez mayor importancia por las grandes ventajas que proporcionan los organismos poliploides, como los son: un crecimiento más rápido, mejor sabor de la carne y menor consumo de alimento (Berntsen, 1989; O'Keefe *et al.*, 1997). Los peces como el salmón , así como varios moluscos bivalvos son los organismos en los cuales se han realizado el mayor número de investigaciones a este respecto, debido a la gran importancia que tienen estos organismos en el mercado nacional e internacional.

Myers en 1986 realizó un estudio en dos especies de tilapia (*Oreochromis niloticus* y *O. mossambicus*), y obtuvo organismos tetraploides aplicando un choque térmico con temperaturas de 7.5 °C, aunado a una presión de 4.8 X 10⁴ kilogramos por atmósfera (kpa) durante siete minutos, obteniendo un 60% de organismos tetraploides. Cherfas *et al.* (1994), por medio de choque térmico con temperaturas altas indujo la triploidia en la carpa común (*Cyprinus carpio*) obteniendo del 74.5 al 100% de organismos triploides. Por su parte, Myers y Hershberger en 1991 por medio de choque térmico con una temperatura de 35 °C, aunado a una presión de 7000 (psi) durante 15 minutos obtuvieron organismos triploides de tilapia del Nilo (*O. niloticus*).

Hussain y colaboradores (1995), compararon los cambios en las tasas de crecimiento de organismos diploides y triploides de la tilapia del Nilo tanto hembras como machos, encontrando que no existieron diferencias significativas entre las tasas de crecimiento, ni de comportamiento en las condiciones de cultivo entre ellos. También, Galbreath y Thorgaard (1995), llevaron a cabo una comparación de la sobrevivencia entre hembras triploides de salmón del atlántico (*Salmo salar*) obtenidas por medio de choque térmico a 29 °C durante diez minutos y hembras diploides de la misma especie, teniendo como resultado una sobrevivencia del 65% para las hembras diploides y un 40% para las triploides.

En 1996, McCarthy y colaboradores realizaron un estudio sobre la resistencia y la sobrevivencia de hembras triploides de Salmón del Atlántico (*Salmo salar*) al ser regresadas a aguas salobres, obteniendo una mortalidad del 29% en organismos de 45 días de edad. En 1997, O'Keefe y colaboradores llevaron a cabo un estudio en el cual analizaron la competencia por el alimento entre organismos juveniles de salmones triploides y diploides de la especie *Salvelinus fontinalis*, encontrando que los organismos triploides tuvieron una menor ingesta de alimento en comparación con los organismos diploides y su tasa de crecimiento fue igual. Withler y colaboradores (1998) estudio los efectos de crecimiento y desarrollo embrionario entre organismos triploides y diploides de salmón (*Oncorhynchus kisutch*), encontrando que

los organismos triploides tienen un crecimiento mayor que los organismos diploides y una sobrevivencia mayor en el estado embrionario.

Bonnet y colaboradores (1999), realizaron un estudio comparativo con respecto al crecimiento de dos especies de la familia Salmonidae, una de agua dulce (trucha arco iris, *Oncorhynchus mykiss*) y otra de agua salobre (salmón del atlántico, *Salmo trutta*). En dicho estudio trabajaron con organismos triploides obtenidos aplicando un choque térmico a una temperatura de 26.5 °C por 20 minutos y organismos diploides de ambas especies; analizaron la diferencia de crecimiento entre ambas especies, obteniendo como resultado que tanto los organismos triploides de agua dulce como de agua salobre, presentaron un mejor crecimiento con respecto a los organismos diploides.

Arai y colaboradores (1986), indujeron la triploidia en el abulón (*Haliotis discushannai*) aplicando choque térmico a una temperatura de 3 y 35 °C a los 12, 15 y 32 minutos después de la fecundación del óvulo, con una duración de tres minutos aunado a una presión de 200 kg/cm², obteniendo como resultado hasta del 80% de organismos triploides. En 1992, Xiang y colaboradores indujo la triploidia en el mismo abulón (*Haliotis discushannai*) y verificó la optimización del crecimiento de los organismos encontrando que los triploides presentaron un crecimiento más rápido que los diploides.

En cuanto a los estudios realizados en especies de crustáceos, en 1991 Chávez, indujo la poliploidia en *Macrobrachium rosenbergii*, por medio de choque térmico a 38 °C, a los 4, 5, 6, 22, 24 y 26 minutos después de la fecundación, con una duración de 2, 6 y 10 minutos. Xiang y colaboradores (1992), indujeron la tetraploidia en el camarón (*Penaeus chinensis*) por medio de tratamiento con Citocalacina B obtuvieron 60% de organismos tetraploides. Por su parte Peeters (1996), indujo la tetraploidia en el camarón *Penaeus indicus* utilizando el mismo antibiótico obteniendo similares resultados. En 1998, AQUACOP indujo la poliploidia en el camarón *Penaeus indicus* por medio de choque de temperatura a 30 y 44 °C por 6 y 46 minutos, obteniendo respectivamente 47% de triploides y 93% de tetraploides con una sobrevivencia del 19%.

Como se observa con respecto a la inducción de poliploidia en camarones peneidos en México no se han realizado estudios, los cuales puedan proporcionar bases para establecer una técnica para la inducción de poliploidia en estas especies.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL.

Inducción y confirmación del proceso de triploidia en el camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931).

OBJETIVOS PARTICULARES.

- a) Obtener la reproducción controlada del camarón blanco del Pacífico.
- b) Establecer su número cromosómico (2N).
- c) Observar el proceso de liberación del primero o del segundo cuerpo polar.
- d) Obtener organismos triploides aplicando choque térmico.
- e) Verificar la triploidia por medio del número de cromosomas observados.

HIPÓTESIS

El utilizar un choque térmico de bajas temperaturas a huevos recién fecundados de camarón blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*), generara organismos triploides (3N) con tasas de crecimiento mayores con relación a las de los organismos diploides (2N).

JUSTIFICACIÓN

La obtención de organismos de mejor calidad fenotípica y genotípica así como más resistente a las enfermedades y a los cambios de la calidad del agua y con una tasa de crecimiento más alta, es una de las finalidades de la acuicultura. Es decir, alcanzar u optimizar una mayor rentabilidad económica y financiera. Sin embargo, las diferentes técnicas que se utilizan en la actualidad tales como la selección genética o la hibridación no siempre arrojan los resultados deseados, por lo que cada vez es mayor el número de investigaciones enfocadas a lograr organismos que representen una mejor opción para el productor.

Una de las opciones para lograr esto es la triploidia, la cual ha despertado un gran interés tanto en la acuicultura como en la maricultura, por los beneficios económicos y productivos que se pueden obtener con organismos estériles. El aprovechamiento de organismos triploides implica grandes

ventajas, entre ellas, una mejor conversión de alimento (O'Keefe *et al.*, 1997), una mayor tasa de crecimiento en menor tiempo (Withler *et al.*, 1998) y en algunas especies una mayor resistencia a las enfermedades (McCarthy *et al.*, 1996). La inducción a la poliploidia es una de las técnicas que proporcionan organismos estériles parcial o totalmente y está siendo utilizada con gran éxito en un gran número de especies tales como el salmón, la tilapia, la carpa y algunos moluscos entre otros.

La esterilidad provocada por la triploidia se debe a que no existen juegos pares de cromosomas en el proceso de la formación del embrión, sin embargo esta esterilidad es benéfica para los productores ya que el crecimiento de los organismos es mayor comparado con los organismos fértiles. Estudios sobre triploidia indican que el desarrollo de las gónadas es inhibido y que esto es más notorio en las hembras que en los machos; también, se ha demostrado que el crecimiento es mucho mayor en comparación con los organismos diploides, ya que la energía empleada en el proceso de la reproducción es destinada totalmente al crecimiento (Rottman *et al.*, 1991), por lo cual, siendo el camarón una de las especies de mayor importancia económica a nivel mundial y en nuestro país, ya que tan sólo en 1999 se produjeron cerca de 30,000 toneladas, (Anuario Estadístico de Pesca, 1999), es de vital relevancia el contar con los conocimientos necesarios que nos proporcionen las herramientas para obtener organismos con las características antes mencionadas, y así poder desarrollar técnicas que nos permitan alcanzar

una mayor producción en las granjas camaroneras de nuestro país, para que de esta manera se establezca un balance entre la producción y el consumo.

MATERIALES Y METODOS

La parte experimental fue realizada en las instalaciones de la Empresa Acuacultores de la Paz S.A. de C.V., ubicada en el Km. 10.5 de la carretera a Bahía de Pichilingüe, cercana a la Ciudad de la Paz, Baja California. El trabajo de laboratorio y gabinete se realizó en la Planta Experimental de Producción Acuícola, de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.

Determinación del número cromosómico para *Litopenaeus vannamei*

Para determinar el número de cromosomas del camarón blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*) se emplearon 30 organismos con un peso total húmedo de 1 a 10 gramos a los cuales se les administró intramuscularmente colchicina en una dosis de 1.0 a 2.0 µg/gr de peso corporal; la colchicina se preparó utilizando 5 mg de la misma y 90 mg de cloruro de sodio (NaCl) disuelto en 10 ml de agua destilada. Una vez administradas las dosis, los organismos se mantuvieron por un periodo de 8 a 12 horas a 28 °C antes de ser matados.

Transcurrido el tiempo antes mencionado, se mataron los organismos cortándoles la cabeza de un solo corte, y se tomaron muestras de tejidos (glándula antenal, testículo, pleópodo y branquias) de aproximadamente 2 mm de diferentes partes del cuerpo. El tejido se colocó en una solución hipotónica de cloruro de potasio (KCl) 0.01 M, conservándolo entre 12 y 15

minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se agregó una solución fijadora de metanol y ácido acético (3:1) por 40 minutos y se conservó a 4 °C.

Después el tejido se colocó en un portaobjetos previamente mantenido en alcohol etílico a 4 °C, y se secó con un mechero para ser teñido con Giemsa al 2 % diluida en buffer de fosfatos (40 mM Na_2HPO_4 y 26.6 mM KH_2PO_4 a pH de 6.8) por 40 minutos (Chávez, 1991).

Una vez transcurrido el tiempo se lavaron los portaobjetos con agua destilada y se dejaron secar por 24 horas a temperatura ambiente, para posteriormente ser observados con un microscopio Nikkon y fotografiados con un microscopio Carl Zeiss con video cámara Sony a color modelo DXC-151A.

Manejo de los reproductores.

Los reproductores fueron seleccionados y aclimatados en la sala de maduración de la empresa, en donde se indujo el desarrollo gonadal por medio del control del fotoperíodo y la alimentación (Figura 6). Para lo cual las hembras maduras, se mantuvieron vigiladas para verificar el momento exacto en el cual resultaran parchadas, es decir cuando las hembras presentaran el espermátóforo adherido al télico (Figura 7).

Esta actividad se realizó todos los días que duro el experimento entre las 17:00 y las 19:00 horas. En el momento que se verificaba que la hembra ya

estaba parchada, se tomó y se colocó en un estanque de plástico de alta resistencia con capacidad de 2,500 litros, el cual se mantuvo tapado y completamente en oscuridad y con una temperatura de 29 °C para que se realizara el desove.



Figura 6. Reproductores de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) en la sala de maduración utilizados para el presente experimento.

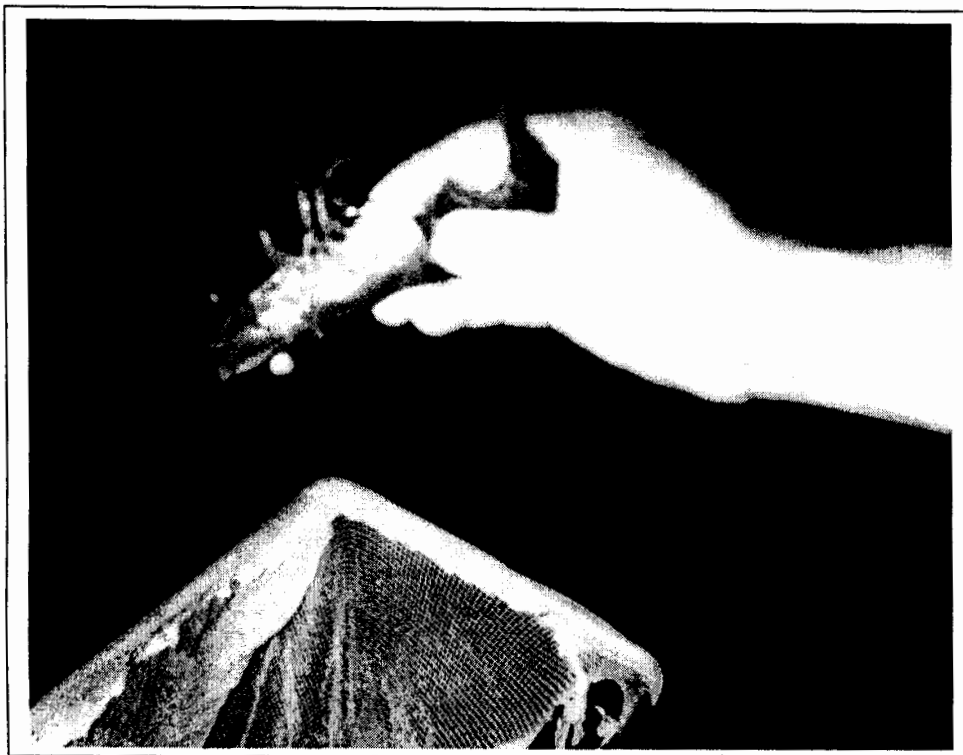


Figura 7. Selección de una hembra parchada.

La hembra se mantuvo en observación para detectar el momento preciso en el cual se llevó a cabo el desove (Figura 8). La recolecta de los huevos se realizó inmediatamente después de que la hembra desovó, tomando los huevos en una red previamente diseñada, con una abertura de malla de 50 micras. La recolección de los huevos se llevó a cabo con el mayor cuidado posible ya que los huevos recién fecundados no contienen aún su capa coriónica, lo cual los vuelve frágiles (Lim *et al.*, 1987). Cuando se obtuvieron los huevos en la red, sin sacarlos del agua se introdujeron en un recipiente lo suficientemente grande para que entrara la red; el recipiente se puso

debajo de ésta y se fue sacando lentamente para evitar que los huevos se destruyeran.



Figura 8. Hembra en el momento del desove.

Expulsión de los cuerpos polares

Una vez que se obtuvieron los huevos recién fecundados, éstos fueron colocados en una tina de plástico con capacidad de cinco litros, la cual fue llenada con agua de mar filtrada a través de un filtro de arena y pasada por luz ultravioleta. El agua se mantuvo a una temperatura de 29 °C con la ayuda de un termostato, para conservar a los huevos bajo las condiciones en las cuales fueron fecundados. Posteriormente se tomaron muestras de éstos cada dos minutos durante una hora, colocando las muestras en frascos de plástico con capacidad de 20 ml y se fijaron en buffer de formalina fosfato al 10% (pH 7.4) y se conservaron a 4 °C. Posteriormente, las muestras fueron revisadas en el Laboratorio de Genética Aplicada de la Universidad

Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa, en donde fueron teñidos durante 15 minutos con DAPI (4', 6-diamidino-2-fenilindole) en una solución Tris buffer (10 mM Tris, 10 mM EDTA-2 Na, 1,000 mM NaCl, pH 7.4) que contenía 10 mM de EDTA 2 –mercapto-etilamina-hidroclorada para una solución final de DAPI 50 ng/ml de acuerdo con Chávez (1991), para ser observados bajo el microscopio de fluorescencia y esclarecer los elementos post-fertilización relacionados con la liberación del primero y segundo cuerpo polar. Una vez establecidos los tiempos de la liberación de los cuerpos polares se obtuvo la moda de estos datos para disponer del momento conveniente para aplicar el choque térmico.

Inducción de la triploidia

Establecido el momento en el cual se llevó a cabo la liberación de los cuerpos polares en los huevos se realizó el mismo procedimiento descrito anteriormente para la obtención de los huevos. Una vez obtenidos los huevos, se les aplicó el “choque térmico” para inducir triploidia de la manera siguiente.

Se llevó a cabo la recolecta de 3,000 a 4,000 huevos en promedio por desove, dividiéndose en tres grupos y siendo colocados en recipientes de plástico de 100 litros cada uno (Figura 9), los cuales contenían agua de mar filtrada y desinfectada con radiación ultravioleta. El primer grupo se mantuvo a 29 °C, temperatura a la cual se encontraban en el momento en que fueron

desovados y este fue considerado como el grupo control. Al segundo grupo, se le aplicó el “choque térmico” antes de que se llevara a cabo la liberación del primer cuerpo polar y al tercer grupo, se le aplicó el choque antes de la liberación del segundo cuerpo polar.

Diseño de los Experimentos

Utilizando las tinas descritas anteriormente, se llevaron a cabo 110 experimentos en los cuales se usaron diferentes temperaturas del agua para aplicar el choque térmico e inducir la triploidia. Estas variaron desde los 9 hasta los 40 °C. En cada una de las tinas se colocó un termómetro para registrar la temperatura. También en cada uno de los experimentos se colocaron los huevos seleccionados en el momento en el que habían sido fecundados para aplicar el “choque térmico”, los tiempos manejados variaron de los dos hasta los 22 minutos, después de haber sido fertilizado el huevo. De igual forma se manejaron diferentes tiempos de duración del “choque térmico” que fueron de cinco a treinta minutos.

Una vez aplicado el choque térmico los huevos fueron colocados en tinas de plástico de 70 litros de capacidad cada una por separado, colocando el mismo volumen de agua de mar filtrada y manteniendo una misma temperatura de 29 °C, de esta manera se aseguró que cada uno de los grupos contara con las mismas condiciones tanto de luz, temperatura y aireación. En estos estanques se mantuvieron los huevos por un lapso de 24 horas para verificar el porcentaje de eclosión y el tiempo en el cual pasaban de un estadio a otro.

Verificación de la triploidia

Una vez transcurridas las 24 horas, se mataron los organismos a los que se les aplicó el choque térmico para verificar si en realidad se estaban obteniendo organismos triploides, para lo cual se realizó el siguiente procedimiento, empleando una técnica en la cual se fusionó de Chávez (1991) y la de Campos (1996).

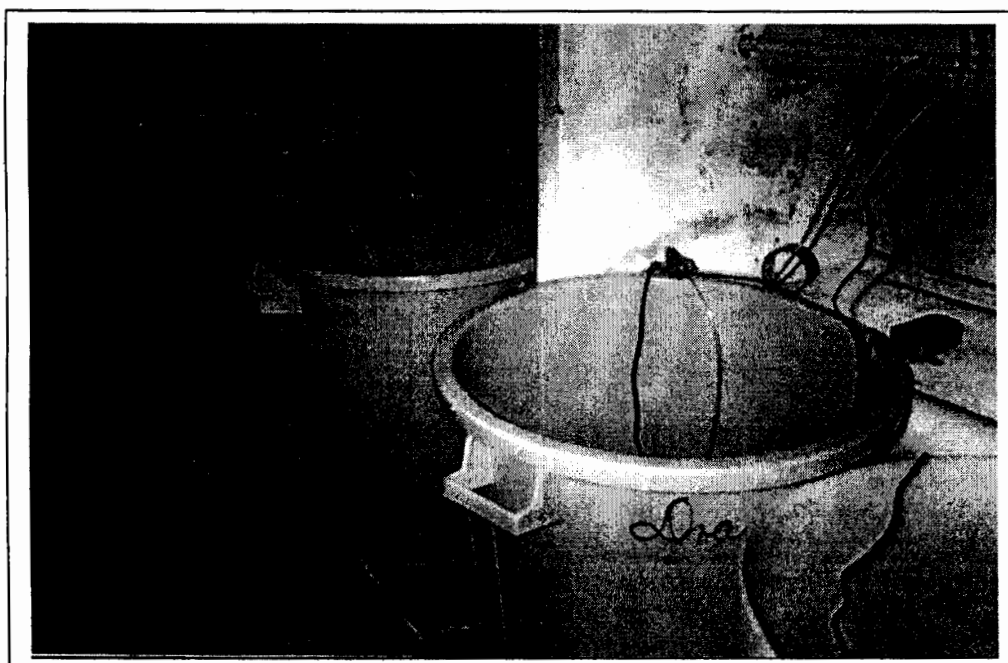


Figura 9. Tinas de plástico de 100 litros de capacidad, utilizadas en el trabajo experimental.

Se colocaron los nauplios (Figura 10), en un recipiente con 50 ml de agua de mar y 0.05% de colchicina durante 60 minutos en la oscuridad. Una vez transcurrido este tiempo se recolectaron los nauplios en un tubo Eppendorf de 50 ml y se maceró el tejido, después se agregó una solución hipotónica de

KCl 0.01 M por 30 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 1,000 revoluciones por minuto (rpm) durante 5 minutos. A continuación se añadió una solución fijadora de metanol-ácido acético 3:1, centrifugándose por 10 minutos a 1,000 rpm desechando el sobrenadante y agregando más solución fijadora, repitiendo la operación tres veces más. Después se agregó 10 ml de ácido acético al 50% a 37 °C y se sacudió la muestra durante 15 minutos y posteriormente se centrifugó a 1,000 rpm durante cinco minutos y se decantó. Posteriormente, se agregaron cinco mililitros de la solución fijadora de metanol-ácido acético y se resuspendió el pellet que se formó, para finalmente colocar el tejido en los portaobjetos previamente conservado en alcohol etílico, dejando caer gotas del tejido resuspendido a una altura aproximada de 15 cm y secando con un mechero para ser teñido con 2% de Gomori diluida en buffer de fosfatos (40 mM Na_2HPO_4 y 26.6 mM KH_2PO_4 a pH 6.8) por 60 minutos. Se lavaron los portaobjetos con agua destilada y se dejaron secar por 24 horas a temperatura ambiente, para ser observados se utilizó un microscopio Nikkon y fueron fotografiados con un microscopio Carl Zeiss con video cámara Sony a color modelo DXC-151A.

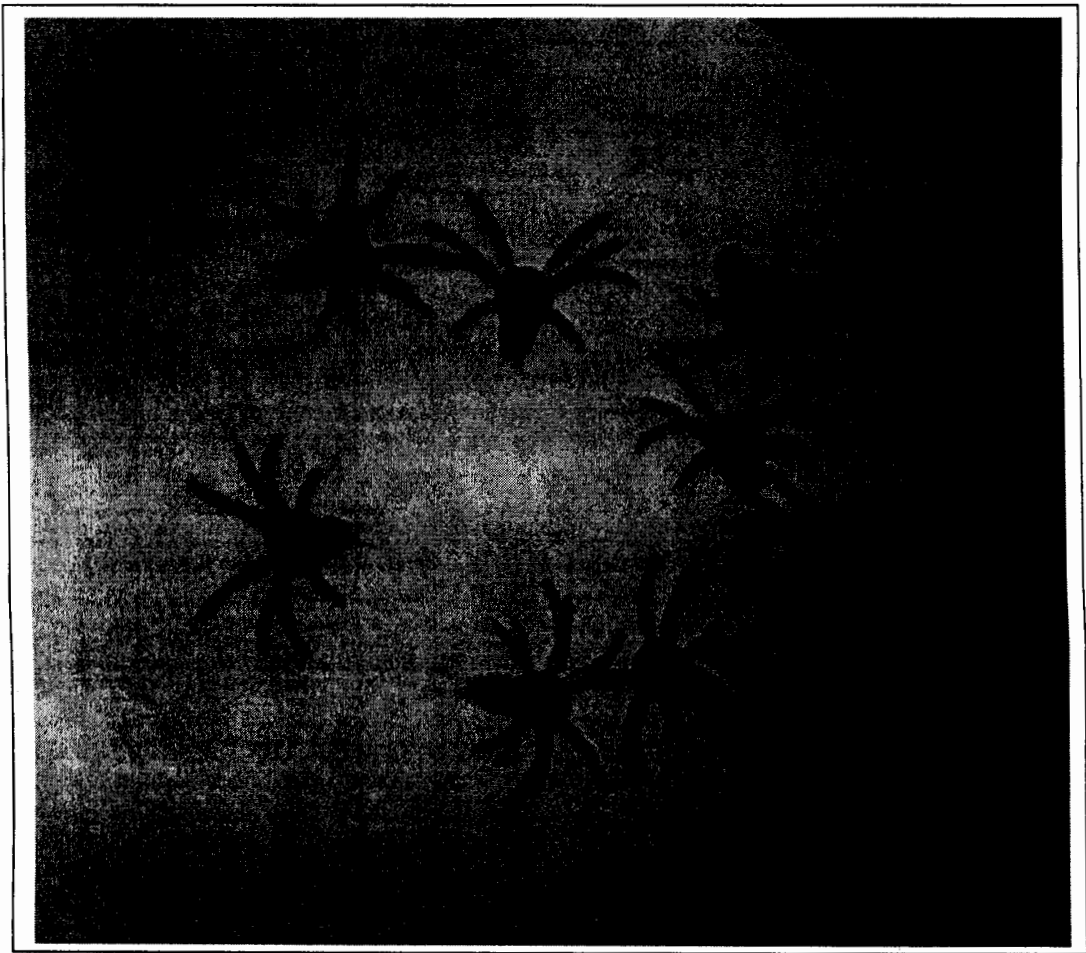


Figura 10. Nauplios del camarón blanco.

Una vez obtenidos los cromosomas, se realizó el conteo del número de cromosomas obtenidos para hacer una comparación con los cromosomas de los organismos diploides trabajados anteriormente y de esta forma verificar la obtención de organismos triploides.

La metodología utilizada en el presente trabajo se resume en la figura 11.

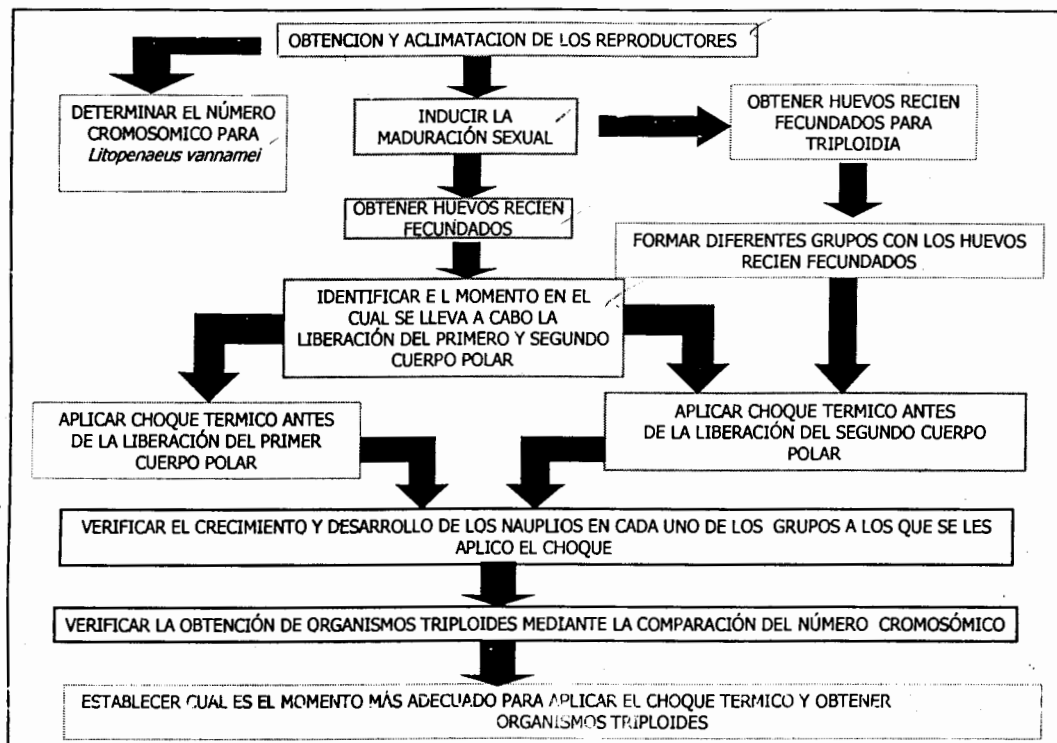


Figura 11. Diagrama que muestra la metodología utilizada en el presente trabajo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Número cromosómico de organismos $2n$

Los tejidos con los que se obtuvieron los mejores resultados para la determinación del número cromosómico del camarón blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*) fueron las branquias y la glándula antenal. Con éstos se consiguió un buen número de campos celulares (40) adecuados para la verificación del número de cromosomas. También, en estos tejidos resultó ser más efectivo el tratamiento de 2.0 $\mu\text{g/g}$ de colchicina por peso corporal, manteniendo al organismo a una temperatura de 28 °C por un lapso de 10 horas, antes de ser matados y posteriormente colocando el tejido en una solución hipotónica por 30 minutos a la temperatura ambiente.

De los resultados obtenidos con el tejido de glándula antenal y branquias se concluye que el número diploide ($2n$) para el camarón blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*) correspondió a 88, lo cual concuerda con lo observado por Chow y colaboradores (1990), quienes mencionan que el número haploide para esta especie es de 44 y el diploide es de 88 cromosomas (Figura 12).

De 40 células revisadas bajo el microscopio, el 42.5% de ellas presentaron un total de 88 cromosomas, siendo este el número cromosómico diploide reportado para el camarón blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*); el

17.5% mostró 89 cromosomas; el 15% 87; el 10% 80; el 7.5% con 90 y el 2.5% con 81, 93, 86 cromosomas respectivamente (Figura 13).

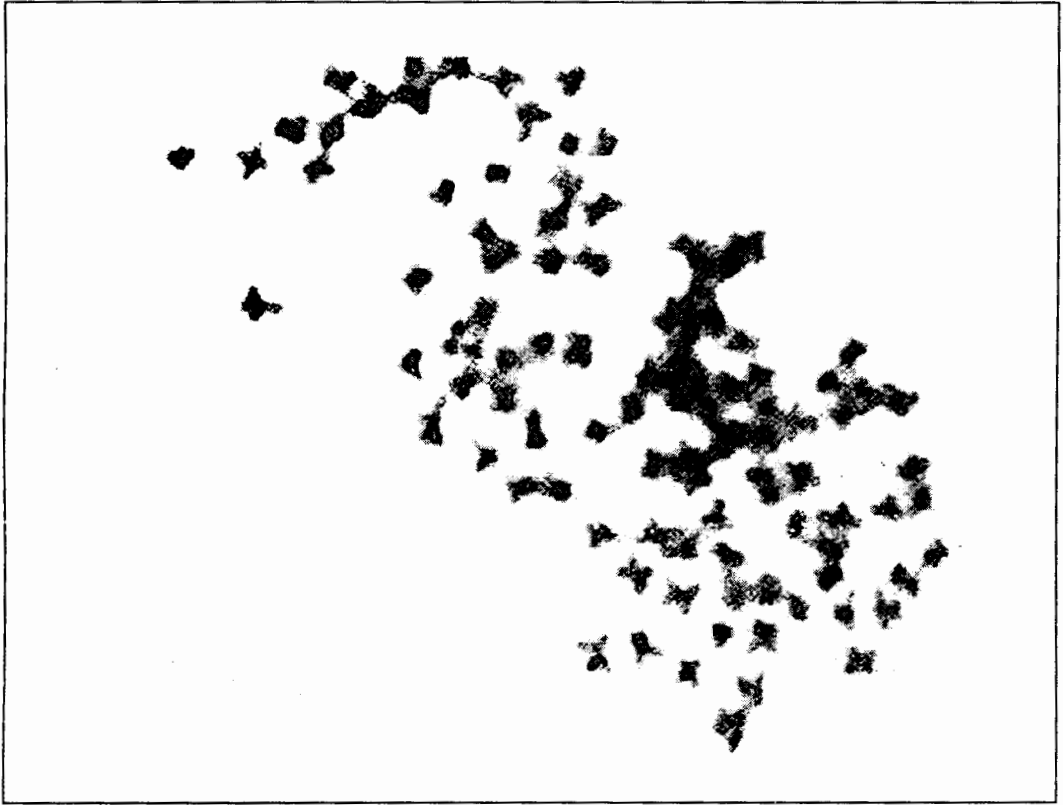


Figura 12. Fotografía de los cromosomas de un camarón diploide ($n = 88$).

Eventos post-fertilización

De los huevos fijados para verificar el momento en el cual se llevó a cabo la liberación de los cuerpos polares, se pudo observar que al ser teñidos con DAPI a una concentración final de 50 ng/ml de solución de mercapto etilamina hidroclicada, y ser observados bajo el microscopio de fluorescencia, la tinción de DAPI presentó algunos problemas para penetrar al citoplasma del huevo. No obstante, la inmersión del huevo en una

solución 3:1 resultó en una mejor observación de los eventos, sin embargo pese a las dificultades que presentó el DAPI al penetrar el huevo, se obtuvieron buenos resultados, ya que en los huevos que tienen menos de cinco minutos de haber sido fecundados, solo es posible apreciar la membrana externa del huevo sin poder observar alguna otra estructura interna en el mismo.

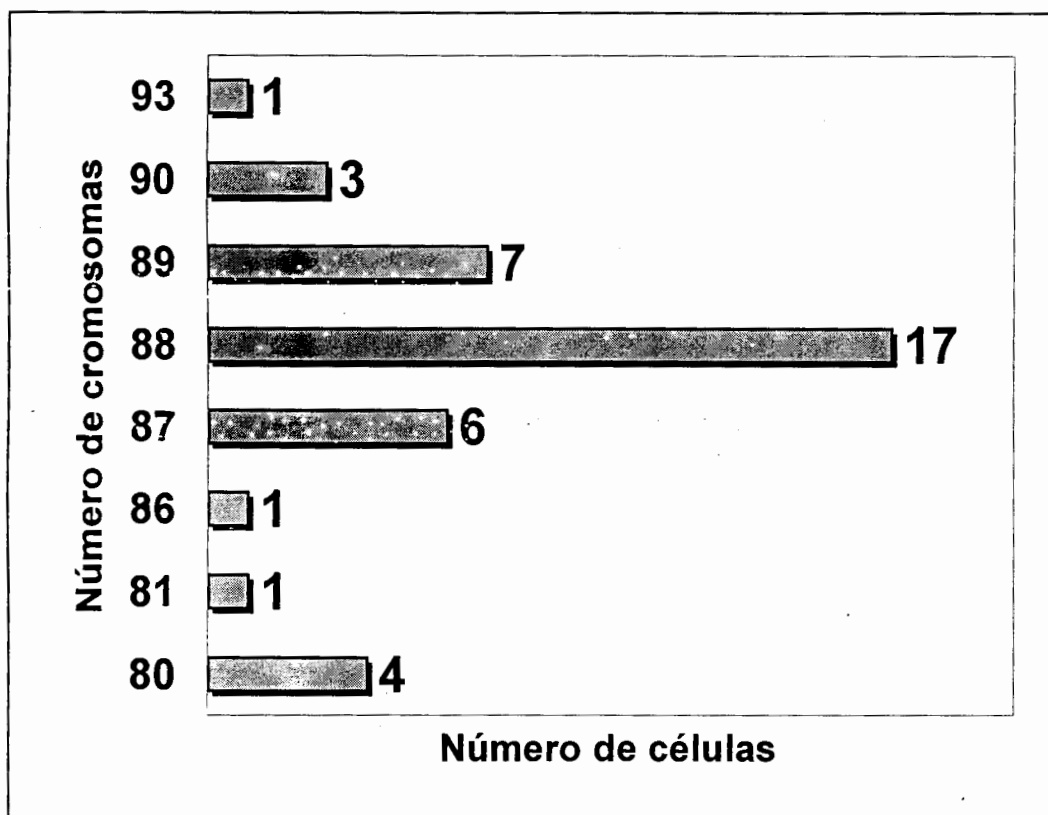
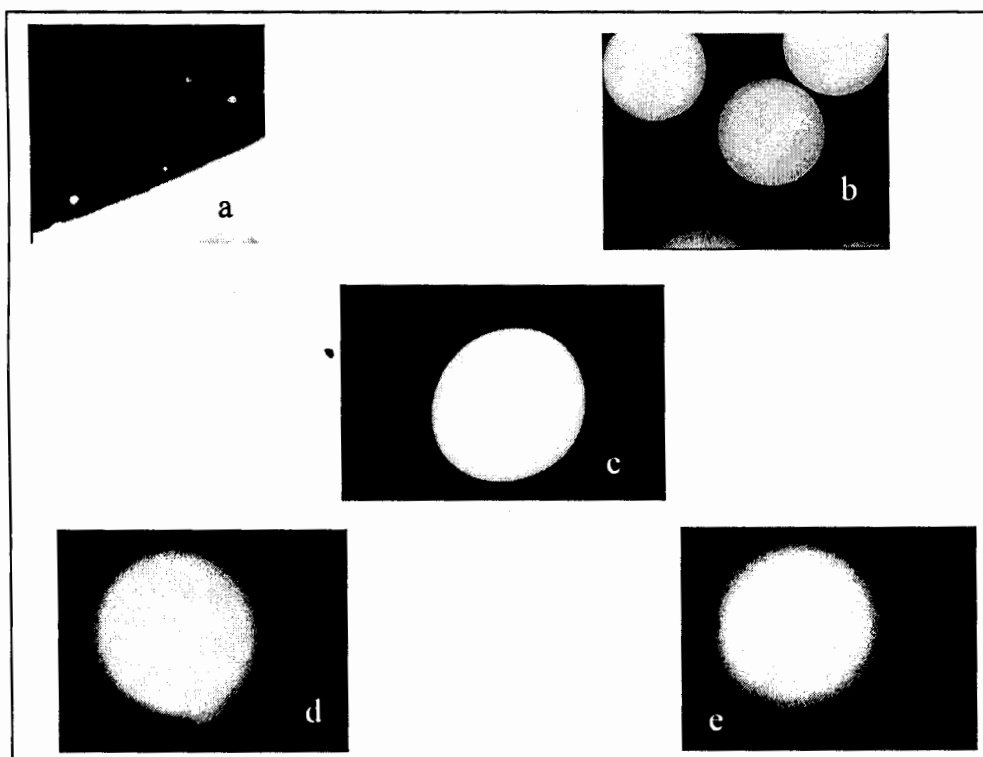


Figura 13. Número de células registradas y número de cromosomas observados, de acuerdo con el conteo de células realizado en esta investigación.

Por otro lado en los huevos que tenían entre 16 y 20 minutos de haber sido fecundados, los cuales fueron mantenidos durante su recolección a una temperatura de 29 °C, fue posible apreciar la liberación del segundo cuerpo polar. Encontrando una mayor

frecuencia de expulsión en los huevos con 18 minutos después de realizada la fertilización (Figura 14). No obstante, entre los 16 y 18 minutos, se observaron huevos en los cuales se podía observar la expulsión del cuerpo polar, pero en un menor porcentaje.

La expulsión del cuerpo polar ocurre a partir de los 16 minutos después de la fecundación. La mayor frecuencia se da a los 18 minutos, aunque a los 20 minutos también continua (Figura 15).



Figuras 14. a) Huevos recién fecundados; b) Huevos 10 minutos después de la fecundación, donde se observa una ligera evaginación en la membrana externa; c) Huevo ovalado justo antes de la expulsión del cuerpo polar; d) Inicia el proceso de expulsión entre los 16 y 18 minutos; e) Momento de la expulsión del cuerpo polar y segundos después de la expulsión.

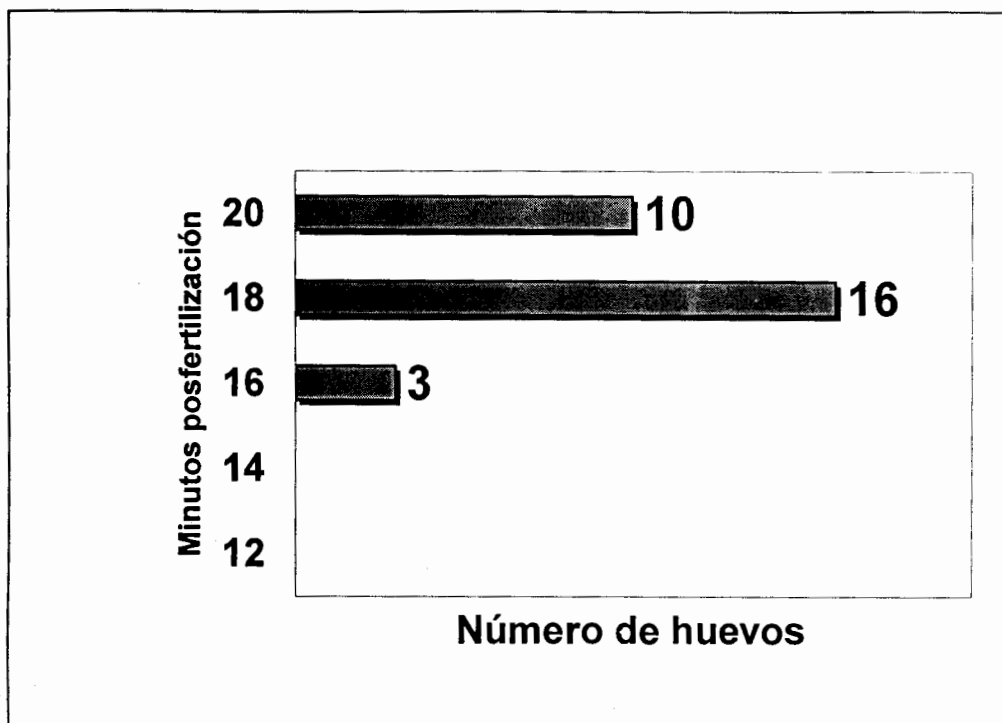


Figura 15. Número de los huevos donde se observó la expulsión del segundo cuerpo polar en relación al tiempo.

Triploidia.

En la tabla 3, se presentan los resultados obtenidos después de efectuar 110 experimentos para inducir la triploidia en huevos recién fecundados de camarón blanco, en los que se varió la temperatura del choque, el tiempo de exposición al choque y el tiempo posfertilización del huevo para aplicar el choque. Estos indican que la aplicación del choque de temperatura a 40 °C en huevos con menos de 15 minutos post-fertilización provocó una tasa de eclosión menor del 40% sin lograr la triploidia. Las temperaturas arriba de los 30 °C por un tiempo mayor a los 10 minutos, provocó por otra parte una tasa de eclosión por debajo del 50% y tampoco se obtuvo la triploidia.

Aplicando el choque térmico con una temperatura a 10 °C en huevos con menos de 5 minutos después de la fecundación, se obtiene una tasa de eclosión del 0%; con la misma temperatura en huevos con menos de 15 minutos después de haber sido fecundados se obtiene una eclosión por arriba del 60%, sin obtener en ninguno de los casos la triploidia.

Con temperaturas de 9 °C en huevos de 0 a 3 minutos después de haber sido fecundados no se obtiene eclosión; con temperaturas entre los 20 y 28 °C, en los huevos de más de 10 minutos después de la fecundación, las tasas de eclosión que se obtienen son mayores al 70%, pero no se obtiene la triploidia.

El aplicar el “choque térmico” utilizando agua dulce ya sea con temperaturas bajas o altas y con una duración del choque de más de 5 minutos provocó la muerte de todos los organismos.

Después de efectuar todas las variaciones que se ilustran en la tabla 3. Se pudo comprobar que cuando se aplica un choque térmico a los huevos con una duración de 15 minutos a una temperatura de 10 °C, a huevos con 20 minutos después de haber sido fecundados, se logró una tasa de eclosión por arriba del 79%, y los organismos que se obtuvieron fueron triploides (Figura 16).

Se emplearon un total de 30 organismos para la observación del número cromosómico, a partir de los cuales se obtuvo un total de 10 portaobjetos con tejido, permitiendo la observación de 40 células completamente abiertas y los cromosomas expuestos.

Para la verificación de la triploidia en los organismos a los cuales se les había inducido la misma, la modificación que se le hizo a la técnica que describe Campos (1996), dio buenos resultados en comparación con la técnica descrita por Chávez (1991), proporcionando con mayor facilidad los campos celulares necesarios para la observación del número cromosómico de los organismos, con este método se obtuvieron las muestras necesarias para poder comprobar la triploidia.

AQUACOP y colaboradores (1998), lograron sólo un 19% de sobrevivencia en organismos a los cuales indujeron poliploidia por “choque térmico” con temperaturas altas, mientras en el presente trabajo se obtuvo una sobrevivencia por arriba del 79% de los organismos a los cuales se les indujo la triploidia.

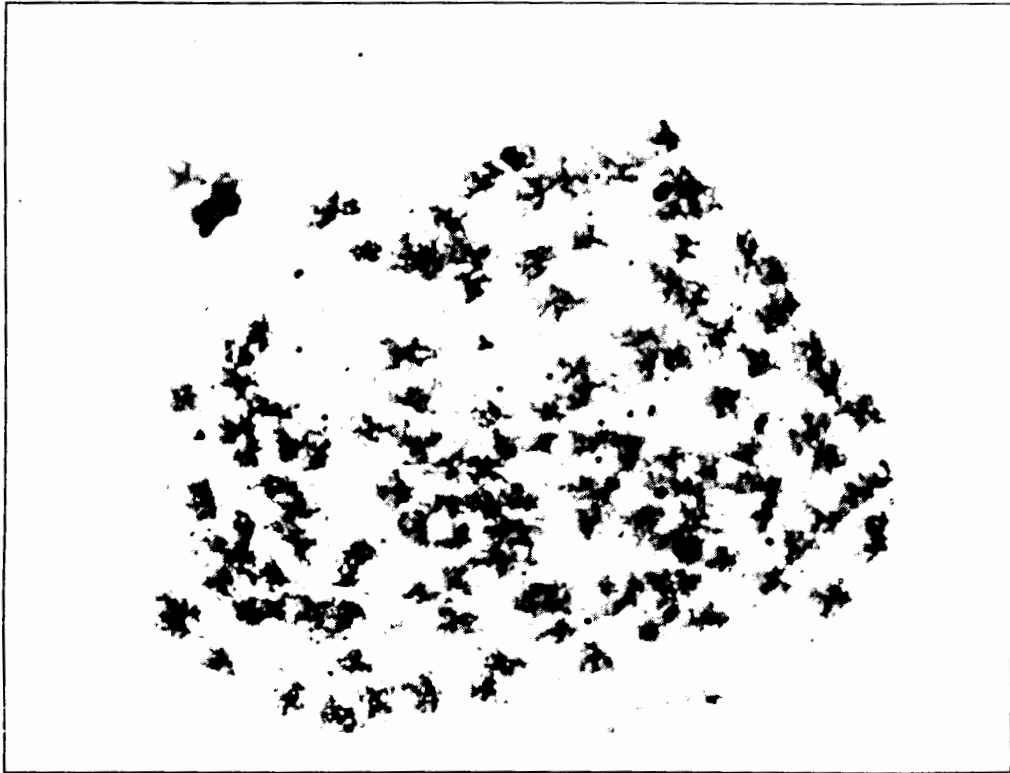


Figura 16. Cromosomas de un camarón triploide ($3n=264$).

Por otro lado se pudo constatar que a los organismos a los cuales se les aplicó el “choque térmico” para inducir la triploidia, al menos en los primeros estadios del desarrollo larvario (huevo, nauplio I y nauplio II), el tiempo que tardan en pasar de un estadio a otro era menor en comparación con el grupo control, lo cual, nos permite apoyar la hipótesis de que los organismos triploides tienen una tasa de crecimiento mayor en comparación con los diploides. Lo anterior ha sido también comprobado en diferentes especies como el salmón. Ojolic y colaboradores (1995), encontraron resultados significativos de crecimiento y sobrevivencia en *Oncorhynchus mykiss* al realizar una comparación entre los organismo diploides y los

organismos triploides de esta especie obtenidos por medio de “choque térmico” de temperatura alta, obteniendo como resultado que los organismos triploides presentan una mayor sobrevivencia y una tasa de crecimiento más alta en comparación con los organismos diploides.

Tabla 3. Experimentos realizados en la presente investigación para inducir la triploidia.

Número de experimentos	Temperatura (°C)	Duración en minutos	Minutos p-fertilización	Eclosión (%)
3	9	5	0-20	17.3
3	9	10	0-22	16.3
3	9	15	0-20	9.33
3	9	20	0-22	15
6	9	30	0-22	11.1
5	10	5	0-20	44.6
19	10	10	4-24	65.05
16	10	15	0-24	61.7
3	10	15	20	79.6*
11	10	20	2-24	60
4	10	30	0-20	25.2
1	20	20	20	70
1	28	15	20	80
1	28	20	20	80
1	35	15	20	60
3	40	5	0-20	23.6
5	40	10	0-22	18
5	40	15	0-20	24
7	40	20	0-22	22.4
6	40	30	0-20	3.3

*Se obtuvo la triploidia.

Nota: Para mayor información recurrir al Anexo 1.

Por otro lado Myers y Hershberger (1991), demostraron que al obtener organismos triploides por medio de “choque térmico” de temperatura alta y comparar el crecimiento con el grupo control de organismos diploides de *Oncorhynchus mykiss*, los organismos triploides presentaron una mayor resistencia a las condiciones de calidad del agua y un crecimiento más rápido en contraste con los organismos diploides. Otro tipo de experimentos

en organismos triploides de salmón, nos mencionan que la ingesta de alimento es menor en comparación con la cantidad de alimento que requieren los organismos diploides de la misma especie (*Salvelinus fontinalis*) y que el crecimiento no presenta diferencias significativas tal como lo mencionan O'Keefe y Benfey, (1997).

Este tipo de experimentos también se han llevado a cabo en bivalvos, en los cuales se han obtenido buenos resultados en el crecimiento, como demostraron Wang y colaboradores (1999), un crecimiento mayor en ostras triploides de la especie *Crassostrea gigas* obtenidas mediante la aplicación de Citocalacina B, comparándolas con organismos diploides en las mismas condiciones de cultivo. Sin embargo, también hay trabajos en los cuales se menciona que no existen diferencia significativa en la tasa de crecimiento entre los organismos diploides y los organismos triploides, como es el caso de Felip y colaboradores (1999) los cuales realizaron un estudio con la lubina *Dicentrarchus labrax* en donde se comparó el crecimiento de organismos diploides y triploides y no se encontraron diferencias significativas.

CONCLUSIONES

1. De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente trabajo el 42.5% de las células observadas presentan un total de 88 cromosomas totales en esta especie, que es el número reportado en la literatura
2. . La expulsión del cuerpo polar ocurre a partir de los 16 minutos después de la fecundación y la mayor frecuencia se presenta a los 18 minutos, aunque continua hasta los veinte minutos.
3. Cuando se aplica un choque térmico a los huevos de camarón fecundados después de 20 minutos, con una duración de 15 minutos y una temperatura de 10 °C, se logra inducir la triploidia y se logra una tasa de eclosión del huevo del 79%.
4. Mediante la comparación del número de cromosomas de los organismos a los cuales se les aplico el choque térmico se constato la obtención de organismos triploides.

RECOMENDACIONES

1. Para estudios posteriores, se recomienda utilizar los tejidos de las branquias y la glándula antenal, para observar los cromosomas del camarón blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*).
2. Para observar el momento en el que el huevo de camarón expulsa el cuerpo polar, se recomienda utilizar una solución de DAPI más Mercapto etilamina hidrociorada en una relación 3:1.

Anexo 1.- Resultados de los experimentos realizados en la presente investigación para inducir la triploidia

Experimento	Temperatura (°C)	Duración en minutos	Minutos p-fertilización	% eclosión	Resultado
1	9	10	0	0	Diploide
2	9	20	0	0	Diploide
3	9	30	0	0	Diploide
4	9	10	3	0	Diploide
5	9	20	3	0	Diploide
6	9	30	3	0	Diploide
7	9	10	22	50	Diploide
8	9	20	22	45	Diploide
9	9	30	22	40	Diploide
10	9	5	0	0	Diploide
11	9	5	5	2	Diploide
12	9	5	20	50	Diploide
13	9	15	0	0	Diploide
14	9	15	5	3	Diploide
15	9	15	20	25	Diploide
16	9	30	0	0	Diploide
17	9	30	5	12	Diploide
18	9	30	20	15	Diploide
19	10	30	18	0	Diploide
20	10	10	4	0	Diploide
21	10	20	4	0	Diploide
22	10	30	4	0	Diploide
23	10	20	4	65	Diploide
24	10	10	4	65	Diploide
25	10	20	20	60	Diploide
26	10	10	20	72	Diploide
27	10	15	2	41	Diploide
28	10	15	15	60	Diploide
29	10	20	2	43	Diploide
30	10	20	15	56	Diploide
31	10	5	0	0	Diploide
32	10	5	5	60	Diploide
33	10	5	20	50	Diploide
34	10	15	0	0	Diploide
35	10	15	5	40	Diploide
36	10	15	20	80	Triploide✓
37	10	30	0	0	Diploide
38	10	30	5	36	Diploide
39	10	30	20	65	Diploide
40	10	10	12	50	Diploide
41	10	10	10	56	Diploide
42	10	10	10	50	Diploide
43	10	15	10	60	Diploide

Experimento	Temperatura (°C)	Duración en minutos	Minutos p-fertilización	% eclosión	Resultado
44	10	10	12	60	Diploide
45	10	15	12	65	Diploide
46	10	10	10	70	Diploide
47	10	10	12	60	Diploide
48	10	10	20	72	Diploide
49	10	15	10	65	Diploide
50	10	15	12	60	Diploide
51	10	15	20	80	Triploide ✓
52	10	10	10	60	Diploide
53	10	10	12	65	Diploide
54	10	10	24	86	Diploide
55	10	15	10	70	Diploide
56	10	15	12	75	Diploide
57	10	15	24	80	Diploide
58	10	18	10	60	Diploide
59	10	18	12	61	Diploide
60	10	18	24	75	Diploide
61	10	10	12	50	Diploide
62	10	10	20	70	Diploide
63	10	10	24	75	Diploide
64	10	15	12	60	Diploide
65	10	15	20	83	Diploide
66	10	15	24	88	Diploide
67	10	20	12	70	Diploide
68	10	20	20	72	Diploide
69	10	20	24	70	Diploide
70	10	10	12	60	Diploide
71	10	10	20	70	Diploide
72	10	10	24	80	Diploide
73	10	15	12	70	Diploide
74	10	15	20	79	Triploide ✓
75	10	15	24	82	Diploide
76	10	20	12	80	Diploide
77	10	20	20	65	Diploide
78	10	20	24	76	Diploide
79	10	5	10	50	Diploide
80	10	5	12	63	Diploide
81	20	20	20	70	Diploide
82	28	15	20	80	Diploide
83	28	20	20	80	Diploide
84	35	15	20	60	Diploide
85	40	20	4	35	Diploide
86	40	10	4	35	Diploide
87	40	20	20	40	Diploide
88	40	10	20	40	Diploide

Experimento	Temperatura (°C)	Duración en minutos	Minutos p-fertilización	% eclosión	Resultado
89	40	15	2	40	Diploide
90	40	15	15	40	Diploide
91	40	20	2	32	Diploide
92	40	20	15	38	Diploide
93	40	10	0	0	Diploide
94	40	20	0	0	Diploide
95	40	30	0	0	Diploide
96	40	10	3	0	Diploide
97	40	20	3	0	Diploide
98	40	30	3	0	Diploide
99	40	10	22	15	Diploide
100	40	20	22	12	Diploide
101	40	30	22	0	Diploide
102	40	5	0	0	Diploide
103	40	5	5	15	Diploide
104	40	5	20	56	Diploide
105	40	15	0	0	Diploide
106	40	15	5	10	Diploide
107	40	15	20	30	Diploide
108	40	30	0	0	Diploide
109	40	30	5	5	Diploide
110	40	30	20	15	Diploide

BIBLIOGRAFÍA

- AQUACOP, C. Ledu and A. Diter. 1998. Induction of Polyploid Nauplii in *Penaeus indicus*. *Aquaculture*, 168:315.
- Arai, K., F. Naito and K. Fujino. 1986. Triploidization of the Pacific abalone with temperature and pressure treatments. *Bulletin of the Society of Scientific Fisheries*, 53(3): 417-422.
- Arredondo F.J.L. y G.D.S. Lozano. (En prensa). *La acuicultura en México*. AGT Editor, México, D. F. 265 p.
- Ayala, F.J. y J.A. Jr. Kiger. 1984. *Modern Genetics*. Segunda Edición. Benjamín/Cummings Publishing Co. Menlo Park, CA 450 p.
- Báez D.M.C., E.J.E. López,, A.L. Bringas y M.S. Galavíz. 1993. Nutrición. En: Martínez, L. R. C. 1993. *Camaronicultura bases técnicas y científicas para el cultivo de camarones peneidos*. Ed. AGT Editor, primera edición, México, D. F., 233 p.
- Berntsen, L.S. 1989. Inhibition of first polar body formation in *Crassostrea gigas* produces tetraploides, not meiotic I triploids. Tesis de Maestría de la Universidad de Washington, D. C. 40 p.
- Bonnet, S., P. Haffray, J.M. Blanc, F. Vallée, C. Vauchez, A. Fauré and B. Fauconneau. 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.

- Bramick, U., B. Puckhaber, H.J. Langholz and G. Herstgen-Schwark. 1995. Testing of triploid tilapia *Oreochromis niloticus* under tropical pond conditions. *Aquaculture*, 142:121-130.
- Campos, R.R. 1996. Técnicas de obtención de cromosomas de camarones del genero *Penaeus*. Tesis de Maestría de la Universidad Nacional Autónoma de México, México, D. F. 50 p.
- Copeland, M. 1974. The cellular response to cytochalasin B: A critical overview. *Cytologia*, 39: 709-727.
- Chamberlain, G.W. and N.P. Gervais. 1984. Comparison of unilateral eyestalk ablation with enviromental control for ovarian maturation of *Penaeus stylirostris*. *J. World Maricul. Soc.*, 15: 29-33.
- Chávez, J.C., 1991. Basic studies on the induction of polyploidy in the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. Tesis de Maestría de la Universidad de Tokio, Tokio, Japón. 85 p.
- Chávez, J.C., M. Murofushi, K. Aida and I. Hanyu. 1991. Karyological Studies on the Freshwater Prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture*, 97: 327-334.
- Chávez, J.C. 1990. The aquaculture of shrimp, prawn and crawfish in the world: Basic and technologies, Midori Shobo Co., Tokyo, Japan, 480 p.
- Cherfas, N.B., B. Gomelsky, N. Ben-Dom, Y. Peretz and G. Hulata. 1994. Assessment of triploid common carp (*Cyprinus carpio* L.) for culture. *Aquaculture*, 127: 11-18.

- Chourrout, D. 1980. Thermal induction of diploid gynogenesis y triploidy if the eggs of the rainbow trout (*Salmo gairdneri* , Richardson). *Repro. Nutr. Develop.*, 20: 727-733.
- Chow, S., J.D. William and P.A. Sandifer. 1990. Meiotic Chromosome Complements and Nuclear DNA Contents of Four Species of Shrimps of the Genus *Penaeus*. *Journal Of Crustacean Biology*, 10(1): 29-36.
- Felip, A., Zanuy, S. and Carrillo, M. 1999. Growth and gonadal development in triploid sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) during the first two years of age. *Aquaculture*, 173: 389-399.
- Fenucci, L.J. 1997. *Manual para la cría de los camarones Peneidos*. FAO-Italia, Brasilia, Brasil, 89 p.
- Galbreath, P.F. and G.H. Thorgaard. 1995. Saltwater performance of all-female triploid Atlantic salmon. *Aquaculture*, 138: 77-85.
- Hedgecock, D., M.L. Tracey and K. Nelson. 1982. Genetics. En: L. G. Abele (Ed.): *The Biology of Crustacea*. Vol. 2. Embryology, morphology and genetics, pp. 283-403. Academic Press. New York.
- Hussain, M.G., G.P.S. Rao, N.M. Humayun, C.F. Randall, D.J. Penman, D. Kime, N.R. Bromage, J.M. Myers and B.J. McAndrew. 1995. Comparative performance of growth, biochemical composition and endocrine profiles in diploid and triploid tilapia *Oreochromis niloticus* L. *Aquaculture*, 138: 87-97.
- Komaru, A., Y. Uchimura, H. Ieyama and K.T. Wada. 1988. Detection of Induced Triploid Scallop, *Chlamys nobilis*, by DNAS Microfluorometry With DAPI. *Aquaculture*, 69:201-209.

- Komaru, A., H. Matsuda, T. Yamakawa and K.T. Wada. 1990. Meiosis and Fertilization of the Japanese Pearl Oyster Eggs at Different Temperature Observed with a Fluorescence Microscope. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 56(3) 425-430.
- Lemoine, A.L., Jr. and L.T. Smith. 1980. Polyploidy induced in brook trout by cold shock. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 109: 626-631.
- Lincolno, R.F., D. Aulstad and A. Grammeltredt. 1974. Attempted triploid induction in Atlantic salmon (*Salmo salar*) using cold shocks. *Aquaculture*, 4: 287-297.
- Longo, F.J. 1983. Meiotic maturation and fertilization. En: *The Mollusca* Vol. 3" Academic Press Inc. 380 p.
- Martínez, L.R.C. 1993. *Camaronicultura bases técnicas y científicas para el cultivo de camarones peneidos*. AGT Editor, primera edición, México, D. F., 233 pp.
- McCarthy, I.D., C.G. Carter, D.F. Houlihan, R. Johnstone and A.I. Mitchell. 1996. The performance of all-female diploid and triploid Atlantic salmon smolts on transfer together to sea water. *Journal of Fish Biology*, 48: 545-548.
- Morelli, M., L. Le Déan, V. Vonau and A. Diter. 1998. Karyotype of the Marine Shrimp *Penaeus indicus* (Crustacea: Decapoda) Established by Using an Image Analysis System. *Noelia*, 49 (2): 83-95.
- Muller, W.P., C.H. Thiebaud, L. Ricard and M. Fischberg. 1978. The induction of triploidy by pressure in *Xenopus laevis*. *Revue Suisse Zool.*, 85: 20-26.

- Myers, J.M. 1986. Tetraploid induction in *Oreochromis* spp. *Aquaculture*, 57: 281-287.
- Myers, J.M. and W.K. Hershberger. 1991. Early growth and survival of heat-shocked and tetraploid-derive triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 96:97-107.
- Ojolick, E.J., Cusack, R. Benfey, T.J. and Kerr, S.R. 1995. Survival and growth of all-female diploid and triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) reared at chronic high temperature. *Aquaculture*, 131:177-187.
- O'Keefe, R.A. and T.J. Benfey. 1997. The Feeding Response of Diploid and Triploid Atlantic Salmon and Brook Trout. *Journal of Fish Biology*, 51: 989-997.
- Peeters, L. 1996. *Genetic manipulation performed on warm water fish*. Center Universities the Polynesian Francaise, Tahiti. 146 p.
- Perez Farfante, I. and B. Kensley. 1997. Penaeoid and Sergestoid Shrimps and Prawns of the World. Keys and Diagnoses for the Families and Genera. *Memories du Museum National D'Histoire Naturelle*, Paris, France. 233 pp.
- Rottmann, R.W., J.V. Shiroeman and F.A. Chapman. 1991. Induction and verification of triploidy in fish. *Southern Regional Aquaculture Center*, No. 427: 142-143.
- Stanley, J.G., S.K. Jr. Allen and H. Diu. 1981. Polyploidy induced in the American oyster, *Crassostrea virginica*, with cytochalasin B. *Aquaculture*, 23: 1-10.

- Takeda, N., 1989. Biología de los Peneidos, 56-98. In: Chávez, J.C. 1990. *The aquaculture of shrimp, prawn and crawfish in the world: Basic and technologies*. Midori Shobo Co., Tokyo, Japan, 480 p.
- Thorgaard, G.H., M.E. Jazwin and A.R. Stier. 1981. Polyploidy induced by heat shock in rainbow trout. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 110: 546-550.
- Wang, Z., Gue, X., Allen, Jr. S.K. and R. Wang. 1999. Aneuploid Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) as incidental from triploid production. *Aquaculture*, 173:347-357.
- Withler, R.E., W.C. Clarke, J. Blackburn and I. Baker. 1998. Effect of Triploidy on Growth and Survival of Pre-smolt and post-smolt Coho Salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Aquaculture*, 168: 413-422.
- Xiang, J., L. Zhou, L. Ruiyu, Z. Jinzhao, L. Fuhua, L. Xiaohong, W. Hongfa and L. Xudong. 1992. Induction of the Tetraploids of the Chinese shrimp, *Penaeus chinensis*. *Marine sciences/Haiyang Kexue*, 4: 55-61.