



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS



EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DE LA TRIPLOIDÍA EN LAS DIFERENTES ETAPAS DEL DESARROLLO DE LA CABRILLA ARENERA

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO
DE DOCTOR
EN
CIENCIAS MARINAS**

PRESENTA

JUAN PABLO ALCÁNTAR VÁZQUEZ

LA PAZ, B. C. S., JUNIO DE 2010



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., siendo las 14 horas del día 26 del mes de Mayo del 2010 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 titulada:

“EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DE LA TRIPLOIDÍA EN LAS DIFERENTES ETAPAS DEL DESARROLLO DE LA CABRILLA ARENERA”

Presentada por el alumno:

ALCÁNTAR
Apellido paterno

VÁZQUEZ
materno

JUAN PABLO
nombre(s)

Con registro:

A	0	7	0	3	6	5
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante de:

DOCTORADO EN CIENCIAS MARINAS

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

LA COMISION REVISORA

Directores de Tesis

DRA. SILVE DUMAS
Director de Tesis

DR. ANA MARÍA IBARRA HUMPHRIES
Director de Tesis

DR. JESÚS IVÁN MURILLO ÁLVAREZ

DR. RENATOL PEÑA MARTÍNEZ

DR. BENJAMÍN H. ANGUÁS VÉLEZ

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

DR. RAFAEL CERVANTES DUARTE



IPN
CICIMAR
DIRECCION



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., el día 31 del mes Mayo del año 2010
el (la) que suscribe MC. JUAN PABLO ALCÁNTAR VÁZQUEZ alumno(a) del
Programa de DOCTORADO EN CIENCIAS MARINAS
con número de registro A070365 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 ANA MARÍA IBARRA HUMPHRIES
y cede los derechos del trabajo titulado:

"EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DE LA TRIPLOIDÍA EN LAS DIFERENTES
ETAPAS DEL DESARROLLO DE LA CABRILLA ARENERA"

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. Éste, puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: jupasoul@hotmail.mx - sdumas@ipn.mx - ana.ibarra.humphries@gmail.com

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


MC. JUAN PABLO ALCÁNTAR VÁZQUEZ

nombre y firma

Este trabajo está dedicado a la razón detrás de mi sonrisa matutina, el milagro parlanchín, mi corazón caminante...mi hija;

Regina Isabella Alcántar Franco

Tu existencia me prueba que existe algo mágico en este mundo...te amo mi milagrito.

De igual forma este trabajo esta dedicado a mi amiga, novia, amante, y madre de mi hija...gracias por nuestro solecito y por tu empuje...no lo habría logrado sin ti;

María Dolores Franco Colin

Te amo...

Así mismo dedicó este trabajo a mis padres, ***Martha J.***

Vázquez Orozco y Alfonso Alcántar Ramírez, gracias por todo

su apoyo incondicional y comprensión...no puedo pensar en cómo comenzar a agradecerles todo su apoyo. Mi hermano, **Alfonso Alcántar Vázquez** y por supuesto al resto de mi amorosa y alegre familia, en especial a mi abuela **Angélica Orozco Cervantes**.

Por último dedico con mucho cariño este trabajo a la familia Franco Colin. A Sra. **Aurora, Dr. Guillermo y Memo**. En especial a **Salome y Michael, Renatita y Andrea Sofía** (por adelantado) por su calurosa bienvenida y apoyo en momentos difíciles.

Agradecimientos

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

No hubiera sido posible completar este proyecto sin el apoyo brindado por el Laboratorio de Genética y Mejoramiento Animal y el M.C. José Luis Ramírez del CIBNOR, así como de la Dra. Ana María Ibarra H., directora de este laboratorio. Gracias por su tiempo, paciencia y comentarios que permitieron hacer esta tesis realidad.

Agradezco de manera particular a la Dra. Silvie Dumas, directora de esta tesis, por todo su apoyo, paciencia y confianza brindados durante la elaboración de la misma. En realidad, esta tesis con todo y sus particularidades es tan suya como mía. Su empuje en los momentos finales fue el ingrediente necesario para compensar mis momentos de flaqueza. Gracias por sus correcciones...finalmente se acabo.

A los amigos del laboratorio UPIMA, al M.C. Iram Zavala leal, por su gran apoyo en la parte experimental de esta tesis, por sus ideas y amistad, al Dr. Penat..digo Renato Peña (técnico de treinta) por su apoyo en la parte experimental, cómica y escrita de esta tesis. A la M.C. Ivette Moguel H. por su amistad, apoyo y chistes involuntarios...ya falta poco. A la M.C. Elin Pérez Ponce, por su amistad y apoyo en los experimentos de la tesis. A M.C. Mauricio Contreras por la ayuda y tiempo brindado en los experimentos de cultivo. A la Maestra Doris (bájale 20 litros) y Biol. Laura Montijo por su ayuda y apoyo durante los largos cultivos de rotíferos.

De igual forma quisiera agradecer a Martin Cuevas Alias *El Cone*...por su valiosa ayuda durante las colectas de las cabrillas...siempre dispuesto a dar el extra con tal de lograr

la cantidad que necesitábamos. Así mismo se agradece los ratos de diversión durante las salidas en compañía de buenos amigos.

Por último se agradece aunque en ausencia a algunos a los amigos de la universidad que todavía estamos en contacto...aunque sea por facebook. Siempre se les recuerda. En especial a los carnales que todavía andan cerca, Luis, Mau, Gigio (Jorge) Panda (Ulises), Perla, Chio, Adriana, Natalia, Alván, Skyol, TQA, Cheko y a todos los que me faltan que se les aprecia aunque me falle la memoria.

Índice

Glosario	I
Lista de tablas	VIII
Lista de Figuras	X
Resumen	XI
Abstract	XIII
Introducción	1
<i>Inducción a la triploidía</i>	2
<i>Determinación del nivel de ploidía</i>	3
Efectos de la inducción a la triploidía	
<i>Etapas tempranas</i>	3
<i>Desarrollo gonadal</i>	5
<i>Proporción de sexos</i>	7
<i>Crecimiento</i>	7
<i>Incremento del tamaño celular y desempeño en condiciones sub-óptimas</i>	9
Uso potencial de triploides para el control reproductivo y genético de peces cultivados.....	11
Características de la especie.....	12
Antecedentes	16
Justificación	25
Objetivo General	27
Objetivos Particulares	27
Materiales y Métodos	29
Método general.....	29

<i>Colecta de reproductores</i>	29
<i>Obtención de desoves</i>	29
<i>Aplicación del Shock</i>	30
<i>Incubación</i>	31
<i>Análisis del nivel de ploidía</i>	31
<i>Porcentaje de supervivencia</i>	32
Material y métodos por objetivo.....	33
<i>Mejorar el método de inducción a la triploidía</i>	33
<i>Evaluar los efectos de la triploidía en las etapas embrionaria y larvaria</i>	34
<i>Evaluar los efectos de la triploidía en la etapa juvenil y adulta, y comparar con los diploides</i>	38
Resultados	42
Discusión	64
Conclusiones	85
Literatura citada	87
Anexo	101

Glosario

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

Ácido ribonucleico (ARN): Ácido nucleico que se encuentra principalmente en el citoplasma y que participa en la síntesis proteica. El ARN es sintetizado a partir del ADN nuclear. Existe bajo 3 formas: el ARN mensajero, de transferencia y ribosomal (Aguado & Cuartero, 2001).

Alvéolo cortical: Estructura citoplasmática, sintetizada por el oocito y compuesta principalmente por glicoproteínas de alto peso molecular. Estas estructuras liberan su contenido al momento de la fertilización, originando la reacción cortical y evitando con esto la polispermia (Tyler & Sumpter, 1996).

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

Atresia: Proceso mediante el cual se reabsorben los gametos no desovados. En los oocitos, las células foliculares adquieren propiedades fagocitarias, reabsorbiendo el contenido del oocito. En el caso de los machos, la atresia se manifiesta como centros de melanomacrofagos que reabsorben los gametos no desovados (Rodríguez-Gutierrez, 1992).

Autosoma: Cromosoma no sexual (Ayala & Kiger, 1984).

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

Células esteroideogénicas: Se encuentran en los machos de vertebrados y se componen por dos tipos de células, las Células de Leydig, productoras de andrógenos (testosterona) y las células de Sertoli, localizadas en el epitelio germinal de la gónada, y cuya función principal es apoyar y nutrir a los espermatozoides en desarrollo (Aguado & Cuartero, 2001).

Célula haploide: Célula de los organismos con reproducción sexual (ver gametos) que contiene la mitad del número normal de cromosomas (n) (Villem & Dethier, 1976).

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

Centrómero: Región cromosómica que se asocia con las fibras del huso durante la mitosis y meiosis (Ayala & Kiger, 1984).

Citotipo: Individuo con un nivel particular de ploidía (Mable, 2003).

Cromátida: Cada una de las subunidades longitudinales que se hacen visibles durante la mitosis o la meiosis en todos los cromosomas duplicados (Ayala & Kiger, 1984).

Cromosoma: Material hereditario con distintos niveles de organización, cuya estructura adquiere complejidad creciente en función de la evolución, pasando de simples moléculas de ácidos nucleicos en algunos procariontes, a asociaciones de ácidos nucleicos con proteínas histonas y no histonas como componentes químicos mayoritarios, en eucariontes. Su función esencial es conservar, transmitir y expresar la información genética que contienen (Sinnot *et al.*, 1977; Aguado & Cuartero, 2001).

Cromosoma sexual: Cromosoma especialmente implicado en la determinación genética del sexo en organismos animales bisexuales. Contiene genes vinculados al carácter sexo (Aguado & Cuartero, 2001).

Destete: Proceso de sustitución de presas vivas por alimento inerte, también conocida como deshabitación (Álvarez-Gonzales, 2003).

Eclosión: Proceso a través del cual el embrión emerge de las envolturas que componen al huevo (Balon, 1981).

Epistático: Gen que enmascara la acción o efecto de un gen en otro locus (Winchester, 1981; Ayala & Kiger, 1984).

Espermatogénesis: Proliferación de células germinales masculinas a partir de la división mitótica de las espermatogonias. La proliferación de estas células provoca el crecimiento del testículo (Nagahama, 1983).

Embrión: (eleuteroembrión) Fase dentro del periodo embrionario de los peces que comienza desde el momento de la eclosión hasta que son absorbidos completamente el saco vitelino y el glóbulo de aceite (Balon, 1981).

Folículo: Tejido somático que rodea al oocito, compuesto principalmente por las células de la granulosa y de la teca (Tyler & Sumpter, 1986).

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

Genoma: Contenido genético de una célula o virus (Ayala & Kiger, 1984).

Genotipo: Suma total de la información genética contenida en un organismo; la constitución genética de un organismo con respecto a un locus o algunos loci génicos en consideración (Ayala & Kiger, 1984).

Heterocigoto: Célula u organismo que contiene dos alelos diferentes en un locus dado en cromosomas homólogos (Winchester, 1981; Ayala & Kiger, 1984).

Heterogamético: Organismo que posee dos cromosomas sexuales diferentes (en la mayoría de las especies son los machos, e.g. XY) (Winchester, 1981; Ayala & Kiger, 1984).

Hermafroditismo: Condición mediante la cual una proporción de individuos de una población funciona con ambos sexos, de manera simultánea o secuencial en cualquier etapa de su vida (Sadovy & Shapiro, 1987).

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

Homogamético: Organismo que posee dos cromosomas sexuales iguales (en la mayoría de las especies son las hembras, e.g. XX) (Winchester, 1981; Ayala & Kiger, 1984).

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

Homólogo: Cada uno de los pares de cromosomas que contiene un organismo eucariota diploide y que se empareja entre si durante la meiosis (Winchester, 1981).

Huso mitótico: Disposición de las fibrillas en forma de huso durante la mitosis o la meiosis celulares, con los cromosomas situados en la región ecuatorial y, en las células animales y las de algunos vegetales inferiores, con un centríolo en cada uno de los polos. Ello origina la separación de los cromatidios y el movimiento de

los cromosomas resultantes hacia polos opuestos (Villem & Dethier, 1976; Aguado & Cuartero, 2001).

Índice gonadosomático o gonadal (IGS): También llamado coeficiente de madurez. Es el peso de la gónada expresado como porcentaje del peso corporal eviscerado y sin ovario. En la mayoría de las especies con puesta estacional este índice cambia muy notoriamente en las sucesivas etapas del desarrollo gonadal. En cambio en peces sin estacionalidad en la puesta este índice apenas varía a nivel poblacional. Los índices gónadales pueden ser una herramienta útil para la identificación del momento de la puesta, pero no suele permitir la clasificación en estados de madurez, por lo que tiene que usarse junto con otros métodos de diagnóstico (Tyler & Sumpter, 1996; Aguado & Cuartero, 2001).

Locus: (plural loci) Es una posición fija sobre un cromosoma, como la posición de un gen. Una variante de la secuencia de ADN en un determinado locus se llama alelo. Las células diploides y poliploides cuyos cromosomas contienen el mismo alelo en algún locus se llaman homocigotos, mientras que los que tienen diferentes alelos en un locus se llaman heterocigotos (Winchester, 1981; Aguado & Cuartero, 2001).

Membrana: Barrera de permeabilidad que delimita a una célula. La membrana celular sirve para diferenciar regiones del interior de la célula, tales como el retículo endoplásmico, el aparato de Golgi, las vesículas secretoras, etc. su estructura fundamental descansa en la bicapa Lipídica, en la que se insertan distintos tipos de lípidos y proteínas (Aguado & Cuartero, 2001).

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

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

Oocito hidratado: Oocito que está listo para ser liberado y en el que los gránulos de vitelo se han fusionado, ha aumentado considerablemente de tamaño debido a la absorción del agua (Tyler & Sumpter, 1996).

Oogonia: Célula germinal femenina que, por sucesivas divisiones mitóticas y meióticas, origina nuevas células – ovogonias secundarias - , las cuales se transforman en oocitos de primer orden y luego en óvulos (Barnabé, 1994).

Período juvenil: Se caracteriza en peces por la presencia de dos fases, la fase prejuvenil, la cual inicia cuando se han formado todos los elementos de las aletas pares e impares y termina cuando se inicia el patrón de escamación. La fase juvenil es considerada cuando los peces han completado su patrón de escamación y termina cuando se inicia la formación de la gónada (Ortiz-Galindo, 1991).

Período larvario: Período presente en peces, compuesto por tres fases. La fase de preflexión, la cual inicia en el momento de la absorción del saco vitelino, la apertura del ano y la boca y la pigmentación de los ojos, y en la que se observa un notocordio recto y termina cuando se inicia la flexión del notocordio. La fase flexión, la cual se inicia en el momento en el que comienza la flexión de la notocorda y termina antes de la formación de la placa hipúrica. Finalmente, la fase postflexión, la cual se da posterior a la completa flexión de la notocordia, iniciando cuando se ha concluido con la osificación de la placa hipúrica y termina antes de que se complete el número de elementos (radios y espinas) de las aletas pares e 4 impares (Kendall et al., 1984; Ortiz-Galindo, 1991).

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

Recombinación: Formación de una nueva asociación de moléculas de ADN (cromosomas) o partes de moléculas de ADN (cromosomas) (Ayala & Kiger, 1984).

Segregación: Separación de entidades genéticas equivalentes y su distribución a diferentes polos celulares en las divisiones mitóticas o meióticas, células, gametos o individuos (Aguado & Cuartero, 2001).

Segregación cromosómica: Fenómeno por el que, al no producirse en los tetraploides la recombinación entre un locus determinado y el centrómero, van juntos a cada polo, en anafase, cromátidas hermanas (Aguado & Cuartero, 2001).

Siembra: Proceso de introducción de los organismos en un sistema de cultivo, para ser criados durante un período de tiempo (Álvarez-González, 1999).

Sistema de circulación cerrada: Es un sistema en el cual el agua se recicla con la utilización de diversos filtros y se reutiliza (Álvarez-González, 1999).

Sinapsis: Apareamiento de los cromosomas homólogos durante el cigoteno y paquíteno de la profase I (Ville & Dethier, 1976).

Sustentable: Recurso que puede mantenerse en el tiempo por sí mismo, sin ayuda del exterior y si que se produzca la escases de los recursos existentes (Ville & Dethier, 1976; Aguado & Cuartero, 2001).

Transición sexual (reversión sexual): Transformación de un individuo de un sexo en uno del sexo opuesto (Chan & Yeung, 1983).

Vitelo: Reservas del oocito formadas de lipoproteínas y fosfoproteínas, derivadas principalmente de la vitelogenina (Tyler & Sumpter, 1996).

Vitelogénesis: Periodo de crecimiento del oocito durante el cual las proteínas de origen extraovárico, principalmente la vitelogenina sintetizada en el hígado, son acumuladas en el oocito (Tyler & Sumpter, 1996).

Zona radiata: Membrana del oocito de apariencia estriada, compuesta de una capa interna y otra externa, y que se forma cuando las primeras inclusiones lipídicas aparecen en el citoplasma (Tyler & Sumpter, 1996).

Lista de Tablas.

Tabla 1. Porcentaje de triploidía y supervivencia obtenido a diferentes tiempos de inicio del shock en frío (Pág. 43).

Tabla 2. Porcentajes de triploidía y supervivencia a la eclosión obtenidos en desoves individuales de cabrilla arenera (Pág. 44).

Tabla 3. Primer factorial. Porcentajes de supervivencia de las larvas expuestas al shock (ST), supervivencia de las larvas del grupo control (SC) y de triploidía (T) (Pág. 44).

Tabla 4. Primer factorial de los Porcentajes de supervivencia a la eclosión de los grupos expuestos al shock. Resultados obtenidos mediante el análisis de modelo general lineal (Pág. 45).

Tabla 5. Primer factorial de los porcentajes de triploidía. Resultados obtenidos mediante el análisis de modelo general lineal (Pág. 45).

Tabla 6. Segundo factorial. Porcentajes de supervivencia de las larvas expuestas al shock (ST) supervivencia de las larvas del grupo control (SC), y de triploidía (T) (Pág. 46).

Tabla 7. Segundo factorial de los porcentajes de supervivencia a la eclosión de los grupos expuestos al shock. Resultados obtenidos mediante el análisis de modelo general lineal (Pág. 46).

Tabla 8. Segundo factorial de los porcentajes de triploidía. Resultados obtenidos mediante el análisis de modelo general lineal (Pág. 46).

Tabla 9. Tiempo transcurrido entre la fertilización y la aparición de las principales etapas del desarrollo embrionario en organismos diploides y expuestos al shock de cabrilla arenera (Pág. 49).

Tabla 10. Porcentajes de divisiones anormales, eclosión y larvas vivas obtenidos en el grupo control y expuesto al shock durante las temporadas de 2008 y 2009 en desoves de cabrilla arenera (Pág. 50).

Tabla 11. Porcentajes de eclosión y larvas vivas obtenidos en huevos normales y anormales de cabrilla arenera (Pág. 51).

Tabla 12. Porcentajes de triploidía obtenidos en desoves mixtos de cabrilla arenera durante el periodo larvario de la temporada 2008 (Pág. 53).

Tabla 13. Porcentajes de triploidía obtenidos en desoves individuales de cabrilla arenera durante el periodo larvario de la temporada 2009 (Pág. 54).

Tabla 14. Valores de longitud patrón obtenidos en la temporada 2008 en larvas diploides ($2n$) y triploides ($3n$) de cabrilla arenera (Pág. 55).

Tabla 15. Valores de longitud patrón obtenidos en la temporada 2009 en larvas diploides ($2n$) y triploides ($3n$) de cabrilla arenera (Pág. 55).

Tabla 16. Peso (g) (P), longitud patrón (cm) (LP) y porcentaje de triploidía final (T) obtenidos a 8 meses de cultivo en las replicas de juveniles diploides control, diploides expuestos al shock y triploides (Pág. 57).

Tabla 17. Medias del ANOVA obtenidas para el Peso (P) y la Longitud patrón (LP) (Pág. 57).

Tabla 18. Valores obtenidos para peso (P), longitud patrón (cm) (LP), peso de la gónada (PG), índice gonadosomático (IG) y proporción de sexos (PS) en diploides y triploides de cabrilla arenera (Pág. 57).

Lista de Figuras.

Figura 1. Fotografía de eritrocitos a) diploides, b) triploides. Aumento 10X (Pág. 47).

Figura 2. Rangos de distribución del eje mayor (a) y el eje menor (b) de eritrocitos diploides y triploides de cabrilla arenera (Pág. 48).

Figura 3. A) Supervivencia a la eclosión en los grupos control y expuestos al shock (ES) por experimento. B) Supervivencia a la eclosión y a las 24 horas después de la eclosión por experimento (Pág. 52).

Figura 4. Número total de hembras, machos e individuos en transición sexual, observados en diploides y triploides de cabrilla arenera (Pág. 58).

Figura 5. Micrografía del ovario de *Paralabrax maculatofasciatus* diploide (Pág. 59).

Figura 6. Micrografía del ovario de *Paralabrax maculatofasciatus* triploide (Pág. 61).

Figura 7. Micrografía del testículo de *Paralabrax maculatofasciatus*; A,B diploide y C,D, triploide (Pág. 62).

Figura 8. Micrografía de gónadas de *Paralabrax maculatofasciatus* en transición sexual (Pág. 63).

Resumen

La inducción a la triploidía se ha convertido en una herramienta promisoría para la acuicultura, ya que los problemas asociados con la maduración gonadal pueden ser evitados o bien reducidos mediante la producción de peces triploides, los cuales son estériles. El objetivo del presente trabajo es evaluar y comparar el efecto de la inducción a la triploidía en la cabrilla arenera, así como el desempeño en las etapas iniciales de desarrollo, el desempeño en estadios larvarios y juveniles de los triploides obtenidos para posteriormente intentar establecer los parámetros del uso de animales triploides en el cultivo de esta especie. Se obtuvieron desoves individuales y mixtos mediante inducción hormonal (LHRH-a) En ambos casos la fertilización se llevó a cabo manualmente, utilizando el esperma de varios machos. Los experimentos realizados se dividieron en tres etapas, en la primera etapa se intentó mejorar el método de inducción a la triploidía; a) Se compararon los porcentajes de triploidía obtenidos a 5, 6, 7, 8, 9 y 10 de inicio del shock en frío, b) Se evaluó la variación en el porcentaje de triploidía obtenido en desoves individuales de hembras silvestres, c) Se compararon los métodos de verificación de triploidía (análisis de eritrocitos y citometría de flujo). En la segunda etapa se evaluaron los efectos de la inducción en las etapas embrionaria y larvaria; a) Se comparó la velocidad del desarrollo embrionario en individuos diploides y expuestos al shock en frío (ESF), b) Se comparó el porcentaje de divisiones anormales, eclosión y larvas vivas en individuos diploides y ESF de cabrilla arenera, c) Se evaluó el efecto del shock en el porcentaje de supervivencia a la eclosión y a las 24 horas posteriores en larvas diploides y ESF, d) Se determinaron los cambios en el porcentaje de triploidía durante el periodo larvario y e) Se comparó el crecimiento entre diploides y triploides durante el periodo larvario. Finalmente, en la tercera etapa se evaluaron los efectos de la triploidía en las etapas juvenil y adulta; a) Se evaluó el crecimiento y supervivencia durante el periodo de pre-engorda, b) Se determinó la madurez gonádica en individuos triploides. Los resultados obtenidos arrojaron en la etapa uno; a) Diferencias significativas ($P < 0.05$), entre los tiempos evaluados, el mejor tiempo para inducir la triploidía fue el de 5 minutos, seguido del tiempo de 6 minutos. b) Se observó una gran variación en el porcentaje de triploidía entre las hembras. Sin embargo, debido a la variación obtenida entre replicas no se encontraron diferencias significativas, c) El método de análisis de eritrocitos es 100% eficaz para separar entre diploides y triploides, utilizando el eje mayor. Etapa 2; a) El desarrollo embrionario de las larvas ESF mostró un retraso comparado con las larvas control, principalmente durante las etapas tempranas, este retraso fue disminuyendo conforme avanzó el desarrollo del embrión. b) Se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre las larvas expuestas al shock y larvas control en el porcentaje de larvas muertas, y huevos muertos, así como una correlación negativa entre el porcentaje de divisiones anormales y la eclosión, c) Los grupos ESF mostraron de manera general, una reducción en el porcentaje de supervivencia a la eclosión y a las 24 horas posteriores, sin embargo, este fue significativo ($P < 0.05$) solo en algunos experimentos d) Se observó un decremento significativo ($P < 0.05$) en los porcentajes de triploidía a través del periodo larvario,

indicando una mayor mortalidad de las larvas triploides e) se detectaron diferencias significativas ($P < 0.05$) a los 30 días de cultivo, las larvas diploides ESF, mostraron el mayor crecimiento, seguidas de las larvas triploides y por último las larvas diploides del control. Para la última etapa; a) Al igual que durante el periodo larvario, el mayor crecimiento ($P < 0.05$) se observó en las larvas diploides ESF, seguidas de las larvas triploides y por último las larvas diploides del control. Los resultados de citometría de flujo llevados a cabo al final del periodo de cultivo mostraron un descenso significativo del porcentaje de triploidía, b) Se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) en el peso de la gónada entre ambos tipos de ploidía, con los triploides presentando un índice gonadosomático mucho menor que los diploides. Los cortes histológicos llevados a cabo en las gónadas, demostraron un desarrollo interrumpido en triploides. Asimismo, fue posible observar en los triploides una proporción de sexo diferente de los diploides. La inducción a la triploidía en la cabrilla arenera tiene efectos significativos en la supervivencia y crecimiento de los individuos resultantes, principalmente durante las etapas iniciales. El desempeño de los individuos triploides en la cabrilla arenera requiere de más estudios durante las etapas tempranas del desarrollo, en especial, durante el periodo larvario, el cual de acuerdo a las observaciones, es uno de los periodos más críticos para la supervivencia y crecimiento de individuos triploides. La maduración gonádica fue reducida en los triploides pero no fue acompañada de un incremento significativo en peso.

Abstract

The induction and production of triploids is a promising tool for aquaculture since the problems associated with gonad maturation can be avoided or reduced through the production of triploid fish, which are sterile. The aim of this study was to evaluate, in spotted sand bass, the effects of inducing triploidy during the early stages of development, and also during the larval and juvenile stages. Spawns were obtained by hormonal induction (LHRH-a). Fertilization was carried out manually, using sperm of several males. The experiments can be divided into three parts. In the first part we tried to optimize the method of induction of triploidy by evaluating: a) triploidy percentages obtained after cold shocks applied at 5, 6, 7, 8, 9 and 10 min after fertilization; and, b) triploidy percentages obtained between spawns of different females cross-fertilized with the same males. Additionally in the first part triploidy verification methods were compared (analysis of erythrocytes and flow cytometry). The second part of the experiments aimed to understand the effects of the cold-shock treatment in embryonic and larval stages, contrasted with embryonic and larval stages under no treatment, and evaluating: a) time or velocity of embryonic development; b) percentages of abnormal embryonic divisions, hatching percentages, and live larvae percentages; c) survival percentages at hatching and 24 hours later; d) percentages of triploidy at sequential times during the larval period; and, e) growth during the larval period. Finally, the third part of the experiments was centered on evaluating the effects of triploidy in juvenile and adult stages, for: a) growth and survival during the pre-outgrowth period; and, b) gonad maturation. The results for the experiment in Part 1 indicated: A) significant higher percentages ($P < 0.05$) of triploidy were obtained when the treatment was applied at 5 minutes post-fertilization; B) there is large variation in the percentage of triploidy obtained between spawns of different females, as well as between spawns fertilized with different males, although no significant results were seen because of high replicate variability; C) the alternative method for analysis of ploidy utilizing erythrocyte sizes was 100% effective to separate between diploid and triploid when the major axis was used. Results for the experiments in Part 2 indicated: A) the embryonic development of larvae exposed to shock is delayed when compared with the control larvae, especially during the early stages; B) significant differences ($P < 0.05$) between diploid larvae and larvae exposed to shock were observed for the percentage of dead larvae and dead embryos, and a negative correlation between the percentage of abnormal embryo divisions and hatching was observed; C) the shock-exposed groups generally showed a reduction in the percentage of survival at hatching and 24 hours later, however, this was significant ($P < 0.05$) only in some experiments; D) a significant decrease ($P < 0.05$) in the percentage of triploidy through the larval period was observed, especially during the 2009 experimental season, indicating a higher mortality in triploid larvae; E) larval growth during the 30 days of culture was significantly different ($P < 0.05$) between groups, with the diploid larvae exposed to shock showing the highest growth, followed by the triploid larvae, and with the least growth the diploid control group. Finally, the results found for the experiments in Part 3 indicated that: A) a significant higher

weight ($P < 0.05$) occurred in the diploid larvae exposed to shock, followed by the triploid larvae, and with the least growth the diploid control larvae; and, B) the gonadosomatic index was significantly lower in triploids ($P < 0.05$). The histological sections performed in the gonads, showed that gonad maturation was less advanced in triploid than in diploid, but this did not translated into a higher gain in weight. Sex ratio was also different in triploids. To conclude, we observed that the induction of triploidy in spotted sand bass has significant effects on survival and growth especially during the initial developmental period, indicating that the early stages of embryonic development are one of the most critical periods for survival and growth in spotted sand bass induced to triploidy.

Introducción

La poliploidía consiste en el incremento del tamaño del genoma causado por la presencia de tres o más juegos adicionales de cromosomas dentro de un organismo (3, triploides; 4, tetraploide; 5, pentaploide; 6, hexaploide; etc.) (Winchester, 1981; Futuyma, 2005; Thorpe *et al.*, 2007; Hegarty & Hiscock, 2008). Los beneficios producidos por la poliploidía en plantas y en las últimas décadas, en especies de peces dulceacuícolas, han hecho que durante el final del siglo pasado, el hombre busque transferir esos beneficios a animales marinos (crustáceos, moluscos o peces) mediante la inducción experimental de la poliploidía. Los beneficios aparentes de la poliploidía, en especial de la triploidía, la han hecho una materia relevante para el hombre, no solo por sus posibles repercusiones dentro de la acuicultura, donde poseen un gran potencial para explotación comercial, especialmente en la producción de peces de gran tamaño, sino como modelos para la investigación básica sobre procesos genéticos, fisiológicos y evolutivos dentro de muchos grupos de invertebrados y vertebrados marinos (Tiwary *et al.*, 2004).

Dentro de la acuicultura, el cultivo de peces con propósitos comerciales, enfrenta serios problemas relacionados con la maduración gonadal, la cual ocurre frecuentemente a expensas del crecimiento somático, debido principalmente a un decremento en la tasa de crecimiento, así como un deterioro en la calidad de la carne (Piferrer *et al.*, 2000; Felip *et al.*, 2001; Piferrer *et al.*, 2009). Además, la aportación de alimento de alta calidad junto con rápidas tasas de crecimiento, a menudo reduce la edad a la cual la maduración sexual se inicia en peces cultivados comparada con peces silvestres de la misma especie. La maduración temprana representa un problema potencial para el cultivo de una especie ya que se produce una gran proporción de individuos maduros pero de pequeño tamaño y además, con un pobre potencial de crecimiento (Basavaraju *et al.*, 2002; Manning *et al.*, 2004; Piferrer *et al.*, 2009). La inducción a la triploidía se ha convertido en una herramienta promisorio para la acuicultura, debido a que en muchas de las especies que han sido inducidas a la triploidía, los triploides son funcionalmente estériles. Debido a esta característica, la triploidía en peces ha sido útil en algunas especies para control de sobrepoblación, para

incrementar el crecimiento y para mejorar la supervivencia ya que en peces diploides se observan mortalidades relacionadas con la maduración gonádica. (Tiwary *et al.*, 2004). Los individuos triploides poseen un conjunto adicional de cromosomas, proveniente del segundo cuerpo polar en el caso de los peces, ya que el primer cuerpo ha sido expulsado durante la meiosis I antes de que ocurra el desove. El cuerpo polar es básicamente un conjunto materno de cromosomas y normalmente es expulsado del oocito poco después de la fusión de los pronúcleos maternal y paternal para que se mantenga el número de cromosomas a un nivel diploide.

Inducción a la triploidía.

La triploidía ha sido inducida en muchas especies de peces, bloqueando la segunda división meiótica a través de tratamientos físicos o químicos. Dentro de los tratamientos físicos se encuentra la presión hidrostática y la temperatura. La presión hidrostática es un método efectivo ya que todos los huevos reciben un tratamiento uniforme, sin embargo, este tratamiento solo se puede aplicar a un reducido volumen de huevos al mismo tiempo (Benfey *et al.* 1988). La temperatura puede ser utilizada en forma de shock en caliente (26-36 °C) o de shock en frío (-1–12 °C) (Lincoln *et al.*, 1974; Valenti, 1975; Thorgaard *et al.*, 1981; Utter *et al.*, 1983; Cassani & Caton, 1985; Baldwin *et al.*, 1990; Dubé *et al.*, 1990; Felip *et al.*, 1997; Piferrer *et al.*, 2003). Dentro de los tratamientos químicos se encuentra la colchicina, la cual es un alcaloide utilizado principalmente en plantas (Smith & Lemoine, 1979), la citocalacina B, la cual es un antibiótico fuertemente tóxico (Longo, 1972; Refstie *et al.*, 1977; Allen & Stanley, 1979; Zhenmin *et al.*, 1994), la 6-dimetilaminopurina o 6-DMAP, la cual es un compuesto químico que puede ser disuelto en agua (Desrosiers *et al.*, 1993; Szöllösi *et al.*, 1993), y por último, el óxido nitroso (Shelton *et al.*, 1986). De los agentes químicos mencionados solo el óxido nitroso ha mostrado cierto potencial para inducir la triploidía en peces (Benfey & Donaldson, 1988), el resto son utilizados principalmente en moluscos (Garrido-Ramos *et al.*, 1996). De los diferentes métodos, el más fácil, barato y efectivo parece ser el shock de temperatura o térmico, ya que no requiere el uso de químicos, tampoco de aparatos costosos y puede ser utilizado para tratar una gran cantidad de huevos a la vez (Lemoine & Smith, 1980; Arai & Wilkins, 1987; Benfey & Donaldson,

1988; Piferrer *et al.*, 2009). Adicionalmente, el shock en frío en general, ha sido altamente exitoso en especies de aguas templadas a cálidas, como es el caso de una gran cantidad de especies marinas explotadas actualmente (Wolters *et al.*, 1982; Holmerfjord & Refstie, 1997; Piferrer *et al.*, 2003; Alcántar-Vázquez *et al.*, 2008).

Determinación del nivel de ploidía.

El éxito de un programa de inducción a la triploidía es medido por la proporción de triploides que se presentan dentro de la población que ha sido expuesta al tratamiento. Debido a que diploides y triploides presentan una apariencia externa idéntica en un gran número de especies, varias técnicas han sido empleadas para facilitar su identificación. Estas técnicas están basadas en el incremento en el número de cromosomas, o bien en el incremento resultante en el tamaño celular o nuclear (Benfey & Donaldson, 1988; Nai-Hsien *et al.*, 1993; Thomas & Morrison, 1995). Algunas de estas técnicas incluyen; análisis de cariotipos (Thorgaard *et al.*, 1981), medición celular y nuclear de eritrocitos (Benfey *et al.*, 1984), método de tinción de nucléolos con plata (Gold & Ellison, 1982), citometría de flujo (Allen, 1983), electroforesis de proteínas (Liu *et al.*, 1978), examinación de rasgos morfológicos (Thorgaard, 1983; Maxime, 2008) y por último, citofotometría microscópica (Komen *et al.*, 1988). La citometría de flujo es actualmente la técnica más moderna en la determinación de cantidades de ADN dentro de células, permitiendo una separación precisa entre triploides y diploides. Sin embargo, la medición nuclear y celular de eritrocitos es una de las técnicas más utilizadas para identificar entre diploides y triploides cuando no se cuenta a la mano con un citómetro de flujo.

Efectos de la inducción a la triploidía.

Etapas tempranas

Aunque la mayoría de los estudios realizados en individuos triploides se concentran en el crecimiento durante las etapas juvenil y adulta, la dinámica hematológica, el desempeño durante situaciones de estrés y el desarrollo gonadal (Benfey & Sutterlin, 1984; Piferrer *et al.*, 2000), es necesario estudiar otros aspectos; en especial los relacionados con el desempeño durante las etapas tempranas de

desarrollo, como son el desarrollo embrionario y el periodo larvario. Estos aspectos son igualmente determinantes para evaluar su utilidad en la acuicultura (Solar *et al.*, 1984), ya que pueden predecir, al menos de manera parcial, los efectos a largo plazo de la triploidización (Quillet *et al.*, 1988).

La variación observada en los porcentajes de triploidía y supervivencia obtenidos en una misma especie y bajo un mismo tratamiento es un aspecto a considerar. Esta variación ha sido observada muchas veces por diferentes autores y en varias especies (Lincoln *et al.*, 1974; Thorgaard *et al.*, 1981; Cassani & Caton, 1985; Dubé *et al.*, 1990). Las causas detrás esta variación pueden incluir factores genéticos relacionados con el tiempo de salida del segundo cuerpo polar, una susceptibilidad diferencial hacia el shock térmico, diferencias en el grado de maduración entre las hembras, o bien pequeñas variaciones en la intensidad del shock aplicado (Cassani & Caton, 1985; Dubé *et al.*, 1990; Felip *et al.*, 1997). La calidad relativa de los oocitos utilizados es otro aspecto importante, el cual puede constituir una de las principales fuentes de variación dentro de un experimento de inducción a la triploidía, ya que el estatus (tamaño, composición química) y origen de los oocitos utilizados es determinante para el éxito de este proceso experimental (Díaz *et al.*, 1993; Kjørsvik *et al.*, 2003). Todos los factores que generan variabilidad en los resultados pueden comprometer el uso comercial de los triploides (Shelton *et al.*, 1986).

Adicionalmente, un incremento en el número de embriones y larvas muertas ha sido documentado por varios autores como un efecto negativo de la inducción a la triploidía (Solar *et al.*, 1984; Cassani & Caton, 1985). Este incremento probablemente está relacionado con dos factores; el tratamiento aplicado y el aumento en el número de cromosomas. El tratamiento aplicado envuelve tres variables; La primera y probablemente la más importante en la mayoría de las especies, es el tiempo de entrada al shock de los huevos recién fertilizados. Ha sido reportada una baja supervivencia cuando el shock es aplicado demasiado rápido después de la fertilización (Johnstone, 1985; Piferrer *et al.*, 2003). La segunda variable es la intensidad del shock (en este caso la temperatura), la cual de acuerdo a varios autores debe estar cercana a los niveles letales (temperaturas sub-letales) de cada especie en particular para que sea efectivo (Chernenko, 1986; Holmerfjord & Refstie, 1997). Por último, la tercera

variable es la duración del tratamiento, la cual está ligada íntimamente a la temperatura, ya que cuando está se reduce (en el caso de shock en frío), se incrementan los porcentajes de triploidía obtenidos a duraciones más cortas. Asimismo, los porcentajes de supervivencia pueden reducirse significativamente al aumentar la duración del tratamiento. El segundo factor que debe ser tomado en cuenta, es la adición de un tercer juego de cromosomas producto de la triploidización. De manera general, se reporta un decremento de la supervivencia conforme el porcentaje de triploides aumenta (Johnstone, 1985; Holmerfjord & Refstie, 1997; Piferrer *et al.*, 2000; Maxime, 2008).

Estos factores pueden afectar negativamente, ya sea de manera individual o sinérgicamente, el funcionamiento del huso mitótico y/o la dinámica de los microtubulos durante las primeras etapas de la división celular provocando un incremento en la proporción de divisiones anormales (anormalidades de los blastoméricas en la segmentación), las cuales pueden ser responsables de la alta mortalidad observada en varios estudios (Johnstone 1985; Felip *et al.* 1997; Holmerfjord & Refstie 1997). Sin embargo, existen pocos reportes en especies marinas acerca del efecto de la triploidía en las primeras divisiones y su relación con la proporción de divisiones anormales, la supervivencia a la eclosión y la ocurrencia de mortalidad larvaria (Sultana, 2005).

Desarrollo gonadal.

El desarrollo gonadal a menudo es un tema complejo en individuos triploides, ya que durante un evento de inducción a la triploidía no todos los componentes de la célula aumentan de tamaño conforme lo hace el nivel de ploidía, alterando las relaciones geométricas entre componentes claves de la maquinaria utilizada para segregar los cromosomas durante la meiosis (Turner, 1984; Mable, 2004; Otto, 2007). A este respecto, varios autores han reportado que las hembras y machos triploides son funcionalmente estériles, resultado de una falla en el movimiento y sinapsis de los tres cromosomas homólogos al momento de aparearse durante la meiosis I (Cassani & Caton, 1985; Arai & Wilkins, 1987; Aldridge *et al.*, 1990; Benfey, 2001; Piferrer *et al.*, 2009). En este caso, los gametos son el único tipo de células afectadas, ya que todos los tipos celulares restantes se dividen por mitosis en lugar de meiosis. La diferencia

entre estos dos tipos de división celular es que solo en la meiosis los cromosomas homólogos se unen sinápticamente antes de llevar a cabo la división (Benfey & Donaldson, 1988).

Con base en estudios realizados en los últimos años, ha sido posible determinar en gran medida las razones detrás de los diferentes grados de disfunción reproductiva observados en organismos triploides. Cal *et al.* (2005) mencionan que la triploidía altera el desarrollo gonadal, especialmente en las hembras, donde la meiosis ocurre muy temprano en el desarrollo de los oocitos, por lo tanto, los ovarios de las hembras triploides permanecen en un estado primario (Benfey & Donaldson, 1988; Felip *et al.*, 1999). De manera general, la producción de la hormona gonadotropina descendiente (GnRH), causada ya sea por los bajos niveles de retroalimentación positiva de los esteroides sexuales o bien por un descenso en la respuesta de las células sensoriales a factores ambientales requeridos para la maduración gonadal (Manning *et al.*, 2004; Maxime, 2008). Por último, los bajos niveles de esteroides sexuales observados en algunas especies de hembras triploides, en particular el estradiol 17- β , se reflejan a su vez en una baja bio-síntesis de vitelogenina por parte del hígado (Manning *et al.*, 2004). En contraste, el desarrollo gonadal y los niveles de andrógenos en machos triploides pueden alcanzar niveles comparables con aquellos de machos diploides. Lo anterior se debe probablemente a que la división de las espermatogonias por mitosis, la formación de cistos y la división de células esteroidogénicas son eventos pre-meióticos en los machos, lo cual permite un desarrollo normal hasta este punto. Adicionalmente, ha sido reportada actividad meiótica en machos triploides, incluyendo procesos espermatogénicos activos con la subsiguiente producción de espermatozoides funcionales pero aneuploides, los cuales producen por consiguiente embriones aneuploides cuando son usados para fertilizar huevos haploides. Estos embriones por lo general solo sobreviven hasta la eclosión (Benfey & Donaldson, 1988; Felip *et al.*, 1999). Chourrout (1988), señala que los machos triploides son fisiológicamente fértiles, pero genéticamente estériles. Mientras que las hembras son estériles, y retienen la apariencia y tasa de crecimiento de un pez en estadio juvenil (Galbreath *et al.*, 1994).

Proporción de sexos.

En algunos peces, variables ambientales, tales como la temperatura y el pH han demostrado tener un efecto en la determinación del sexo (Devlin & Nagahama, 2002). Adicionalmente, se han detectado muchos tipos de determinación sexual en peces que son controlados por factores genéticos, algunos de estos tipos incluyen, XX-XY, XX-XO, X₁X₂X₁X₂, XX-XY₁Y₂ (macho heterogamético) y ZW-ZZ (hembra heterogamética) (Devlin & Nagahama, 2002). La adición de un tercer juego de cromosomas, producto de la triploidización puede alterar el patrón de determinación sexual de la especie en particular y con esto cambiar la proporción de sexos dentro de la población triploide. Lo anterior es causado probablemente por la alteración de factores sexuales epistáticos o autosómicos (Devlin & Nagahama, 2002; Piferrer *et al.*, 2009). Si las hembras son el sexo homogamético XX y los machos el sexo heterogamético, XY, solo dos tipos de triploides podrán producirse, XXX y XXY. Ambos tipos estarían representados en una proporción de 1:1. En cambio, si la hembra es el sexo heterogamético, WZ, y el macho el sexo homogamético, ZZ, la descendencia resultante será completamente WZZ, es decir hembra. Este tipo de alteraciones en el patrón normal de determinación sexual han sido reportadas previamente por diferentes autores en varias especies (Wolters *et al.*, 1982; Haffray *et al.*, 2005; Omoto *et al.*, 2005) y pueden arrojar luz sobre el tipo de determinación del sexo presente en dichas especies.

Crecimiento.

El crecimiento es uno de los procesos más importantes para un organismo, ya que determina la velocidad con la cual un individuo alcanza su etapa reproductiva y por lo tanto su habilidad para persistir como especie. Los animales, incluyendo los peces, en general, pueden emplear estrategias diferentes para lidiar con el incremento de tamaño celular que acompaña a la triploidía (Mable, 2003). Aunque el tamaño celular típicamente es mayor en organismos triploides, el tamaño corporal de estos puede no ser alterado. Observaciones realizadas en especies de peces, reptiles y mamíferos, indican que el incremento de tamaño en las células triploides (o de nivel de ploidía superior) no necesariamente resulta en tamaños corporales mayores. En estos casos, se reporta que probablemente existen mecanismos de desarrollo que regulan el

crecimiento para compensar el tamaño celular (Mable, 2004; Comai, 2006). Como una generalización, es más probable que la triploidización produzca un incremento en el tamaño corporal de invertebrados (crustáceos y moluscos), comparado con el de vertebrados, incluyendo a los peces (Comai, 2006; Otto, 2007).

Cuando el desarrollo es controlado por gradientes morfogénos (sustancias o elementos que controlan el patrón de desarrollo de un tejido o bien la posición de células especializadas dentro de un tejido), la triploidía no afecta el tamaño corporal, debido a que la triploidía no afecta la densidad global de material celular, es decir el número de células por unidad de área, solo como éste se ordena (en células que son 1.5 veces más grandes y que contienen 1.5 veces más ADN). En contraste, cuando el crecimiento es determinado por interacciones célula-célula o donde existen un número fijo de células en el adulto, la triploidía, debería directamente influenciar el tamaño corporal (Otto, 2007).

Ha sido sugerido que probablemente existe un límite inferior en el número de células necesarias para formar tejidos y órganos en los vertebrados, incluyendo los peces (Otto, 2007). Esto hace posible que los peces puedan regular el número de células y de esta forma lidiar de mejor manera con los cambios en la regulación de la proporción de la expresión genética y los patrones de desarrollo acarreados por la triploidización (Mable, 2004; Otto, 2007).

Células más grandes tienden a presentar un área superficial más pequeña en relación al volumen, un fenómeno que puede ocasionar el crecimiento más lento de las células triploides (Molnar, 2000; Mable, 2004). Este crecimiento más lento puede ser observado a etapas muy tempranas asumiendo que la tasa de división mitótica es afectada por la triploidía. Sin embargo, en algunas ocasiones se ha observado una tasa más rápida de desarrollo embrionario en individuos triploides (Happe *et al.*, 1988). Lo anterior se esperaría, dado que el transporte a través de la membrana limita el crecimiento bajo ciertas circunstancias (Oliva-Teles & Kaushik, 1990; Mable, 2004) Si la geometría celular afecta o no la tasa de crecimiento, depende de las características biológicas de la especie cultivada, de las condiciones ambientales (especialmente la temperatura) en las cuales se desarrolla y la calidad del alimento suministrado (Qin *et al.*, 1998). Quizá como una consecuencia de un decremento de las tasas metabólicas,

los individuos triploides puedan exhibir un desarrollo más lento, sin embargo, este patrón no es siempre cierto y puede ser revertido, ya que existen especies donde los organismos triploides alcanzan tallas más grandes que los diploides (Mable, 2003; Otto, 2007; Fast, 1998). Varias hipótesis han sido emitidas para explicar estas diferencias en el crecimiento entre diploides y triploides. Estas incluyen; reducción en el desempeño debido al estrés generado por el proceso de inducción a la triploidía (Piferrer *et al.*, 2003), una reducción en la agresividad y la habilidad competitiva cuando son cultivados junto con individuos diploides (Cassani & Caton, 1985), diferencias entre diploides y triploides en el tamaño celular, número de células o morfología (Small & Benfey, 1987), la ausencia del efecto anabólico de los esteroides sexuales debido a la reducción de la gónada en organismos triploides (Felip *et al.*, 2001). Por último, en el caso de presentarse un mejor desempeño por parte de los individuos triploides, se señala la aparición de ventajas energéticas generadas por la reducción en el desarrollo gonadal (esterilidad) comparado con individuos diploides, cuando estos últimos inician la maduración gonádica (Wolters *et al.*, 1982).

En los últimos años numerosos estudios se han llevado a cabo para evaluar el desempeño de organismos triploides y diploides (Galbreath *et al.*, 1994), obteniéndose resultados altamente variables, incluso entre individuos de la misma especie, bajo condiciones de cultivo similares (Felip *et al.*, 2001; Maxime, 2008). Los datos recogidos en diversas especies muestran que la tasa de crecimiento, así como la conversión alimenticia en organismos triploides, supera en varias especies, la de los organismos diploides después de la maduración gonádica (Fast, 1998; Qin *et al.*, 1998). Lo anterior se atribuye a que derivan energía metabolizable hacia el crecimiento somático en lugar de utilizarla para la producción de gametos (Carter *et al.*, 1994; Saddler *et al.*, 2000; Felip *et al.*, 2001). De hecho, en algunas especies, los individuos triploides pueden alcanzar pesos 40% más elevados que los de individuos diploides (Garrido-Ramos *et al.*, 1996).

Incremento del tamaño celular y desempeño en condiciones sub-óptimas.

Los eritrocitos de los peces son nucleados y contienen una proteína que se une al oxígeno, llamada hemoglobina, la cual es crítica para la entrega de oxígeno a los

tejidos que desarrollan procesos metabólicos (Saddler *et al.*, 2000). Los organismos triploides poseen eritrocitos más grandes que los diploides, pero el número total de eritrocitos se reduce para mantener el hematocrito al nivel de organismos diploides. De manera general, se reporta que los individuos triploides difieren de los diploides en que poseen un menor número de células en la mayoría de los tejidos y órganos, como consecuencia del incremento en el tamaño celular (Benfey *et al.*, 1997; Benfey, 2001). El volumen del núcleo de la célula se incrementa para acomodar el material genético extra, lo cual resulta en un incremento del volumen celular. Debido al mayor tamaño de los eritrocitos, la proporción área superficial-volumen se reduce conforme se incrementa el tamaño celular y por ende el área superficial disponible para el intercambio gaseoso es menor, lo cual en algunas especies puede limitar la capacidad aeróbica y metabólica de los organismos triploides (Benfey *et al.*, 1997; Tiwary *et al.*, 2004; Maxime, 2008). De igual forma, como resultado de la reducción en el número de eritrocitos, el contenido de hemoglobina, así como la proporción hemoglobina-oxígeno se ven afectados, lo cual puede resultar, como se mencionó previamente en un decremento de la capacidad aeróbica y finalmente en una limitada capacidad de suministrar oxígeno a los tejidos (Ojolick *et al.*, 1995). Estos mismos autores mencionan que debido a estas características, los organismos triploides se desenvuelven pobremente cuando se encuentran sometidos a altas temperaturas por largos periodos. Esto se debe a que, además de reducir la solubilidad del oxígeno en el agua, el incremento en la temperatura produce un incremento de la demanda metabólica de oxígeno por parte del pez y un decremento en la afinidad hemoglobina-oxígeno (Benfey *et al.*, 1997; Maxime, 2008). Por lo tanto, periodos de exposición crónica a condiciones sub-óptimas resultan en un incremento de la mortalidad comparado con los diploides.

Adicionalmente, existen otros factores que afectan el transporte de oxígeno y que se encuentran directamente relacionados con las dimensiones de los eritrocitos triploides, entre los que se encuentran; las características de la sangre y los procesos relacionados con la membrana plasmática. Las características de la sangre a su vez incluyen; la viscosidad, la capacidad de deformación (deformatibilidad) de los eritrocitos y la regulación de la afinidad de la sangre por el oxígeno a través del pH y el ATP de los eritrocitos. Los procesos relacionados con la membrana plasmática que son afectados

por la triploidía involucran principalmente el llevar a cabo procesos metabólicos básicos en células de mayor tamaño, incluyendo el intercambio ya sea a través de difusión o intercambio activo (afectando la química de unión de los receptores celulares), la transducción de señales y las actividades enzimáticas relacionadas con la membrana celular. Estos factores todavía se encuentran pobremente comprendidos en organismos triploides y siguen siendo principalmente teóricos ya que no han podido comprobarse totalmente de manera experimental (Saddler *et al.*, 2000; Ballarin *et al.*, 2004; Maxime, 2008). Sin embargo, pueden ser importantes para un suministro eficiente del oxígeno durante situaciones de estrés ambientales, como cambios de temperatura u oxígeno (Saddler *et al.*, 2000).

Uso potencial de triploides para el control reproductivo y genético de peces cultivados.

La triploidía tiene una gran variedad de aplicaciones dentro de la acuicultura, ya que de acuerdo a las regulaciones de E.U. y la comunidad europea (Directiva 90/220/CEE del 23 de Abril de 1990) los especímenes poliploides, incluyendo triploides y los híbridos no son considerados organismos genéticamente modificados (OGMs), por lo tanto están exentos de las estrictas regulaciones actualmente aplicadas para el uso y resguardo de OGMs en las granjas acuícolas (Piferrer *et al.*, 2009). Aunque la superioridad (crecimiento o supervivencia) de los organismos triploides no siempre ha sido observada, el uso de peces triploides puede ser una solución cuando existen restricciones sobre el cultivo de peces diploides (Galbreath *et al.*, 1994), especialmente, cuando estos se cultivan fuera de su área natural de distribución. La triploidización es comúnmente reconocida como la forma más práctica y costo efectiva de producir peces estériles a gran escala (Maxime, 2008). Los peces estériles pueden prevenir el cruzamiento entre organismos que escapan del cultivo con organismos de poblaciones naturales, de la misma especie o bien a través de la hibridación y de esta forma evitar la interferencia con adaptaciones evolutivas presentes en el pool genético de poblaciones silvestres, las cuales pueden ocasionar la pérdida de diversidad genética natural (alterar frecuencias alélicas, interrupción del flujo genético inter-poblacional, ruptura de complejos genéticos localmente co-adaptados). Al mismo tiempo, se previene el establecimiento de poblaciones no deseadas ajenas al ecosistema, y con esto, la

competencia inter-específica con poblaciones nativas o bien la depredación de estas últimas (Utter *et al.*, 1983; Thorgaard, 1986; Galbreath *et al.*, 1994; Withler *et al.*, 1998; Piferrer *et al.*, 2009). El valor de los peces triploides para reducir o evitar interacciones genéticas entre peces cultivados y silvestres requiere una evaluación de su comportamiento y desempeño en el ambiente natural. Sin embargo, existe poca información disponible acerca de peces triploides en el ambiente natural (Piferrer *et al.*, 2009).

Características de la especie.

Paralabrax maculatofasciatus está incluido dentro del orden Perciformes, suborden Percoide, familia Serranidae. Esta familia está constituida por tres subfamilias representando un total de 449 especies que se distribuyen en 62 géneros (Nelson, 1994). Perteneciente a la subfamilia Serraninae, el género *Paralabrax* se constituye por seis especies *P. auroguttatus*, *P. clathratus*, *P. humeralis*, *P. loro*, *P. nebulifer* y *P. maculatofasciatus* (Heemstra, 1995).

La cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* se distribuye desde la bahía de Monterey, California hasta las costas de Mazatlán, México, incluyendo el Golfo de California; en donde constituye un componente regular en la ictiofauna (Miller & Lea, 1972). Es un habitante regular en bahías y zonas costeras en fondos arenosos cercanos a rocas y praderas de plantas marinas, en donde actúa como un carnívoro activo que se alimenta durante el día, básicamente de crustáceos bentónicos y peces pequeños (Heemstra, 1995).

Paralabrax maculatofasciatus tiene un comportamiento reproductivo complejo, exhibiendo como modalidad reproductiva el hermafroditismo protogínico, Oda *et al.* (1993) mencionan que en las costas de California se presenta como un gonocórico secundario. Mostrando una alta proporción de hembras entre los organismos jóvenes (21-23 cm) y una mayor proporción de machos entre los organismos adultos (23-29 cm) (Heemstra, 1995).

Esta especie se comporta como un desovador parcial, debido a que las hembras maduras exhiben ovocitos en diferentes etapas de desarrollo, desde previtelogénicos hasta vitelogénicos avanzados (Lluch-Cota, 1995). Los huevos de *Paralabrax*

maculatofasciatus presentan una talla entre 720 y 840 mm de diámetro cuando están hidratados, y una fecundidad parcial que varía de 10300 huevos por desove (Lluch-Cota, 1995) hasta 45000 huevos por desove (Oda *et al.*, 1993). El análisis histológico realizado por Lluch-Cota (1995) reveló una frecuencia de desove de 2.6 días/desove, además la presencia de ovarios con folículos postovulatorios del Día 0 y 1, indican que son capaces de realizar desoves diarios.

Los meses con mayor frecuencia de desoves y producción de huevos son de febrero a mayo, cuando la relación de sexos es de 3:2 (hembras por macho). Cuando se incrementa la temperatura a partir de julio y hay presencia de ejemplares en transición sexual, disminuye la producción de huevos (Lluch-Cota, 1995).

Antecedentes en la cabrilla arenera.

Hace más de una década varias instituciones incluyendo el CICIMAR comenzaron a mostrar interés en investigar y proponer el desarrollo de sistemas y tecnologías de cultivo aplicables a especies locales de importancia comercial. Dentro de este grupo, destaca en particular la cabrilla arenera, ya que en es una de las especies con mayor esfuerzo de investigación en México en los últimos diez años (Civera *et al.*, 2003). Los estudios para desarrollar la tecnología de cultivo de la cabrilla iniciaron con Matus-Nivón *et al.* (1990), al señalarla como una especie con potencial acuacultural, debido al crecimiento obtenido en sus primeros dos meses de vida y su resistencia al manejo. Posteriormente Avilés-Quevedo *et al.* (1995) desarrollan un proyecto teórico en el que establecen la obtención de organismos de talla comercial (25-30 cm LT) entre los 8-11 meses de edad. Adicionalmente, señalan que esta especie presenta ciertas características como; ser altamente tolerante al manejo, a la exposición al aire y a varios factores ambientales, presentar baja territorialidad en cautiverio, adaptarse al cautiverio con rapidez, no presentar agresividad entre los especímenes aún sometida a hacinamiento, aceptar rápidamente diferentes tipos de dieta y, por último, los individuos se muestran tranquilos y no nadan activamente si cuentan con un refugio, lo que refuerza su potencial de cultivo. En lo que respecta al grupo de trabajo del CICIMAR, aquí se desarrolla un esquema integral para obtener un paquete tecnológico de la cabrilla arenera, incluyendo 5 etapas; producción de alimento vivo; producción de

huevos; cría larvaria; calidad del agua y enfermedades, y engorda de juveniles. En lo que respecta a la producción de alimento vivo, con el trabajo de Galindo (1998) se busca un alimento intermedio entre el rotífero y la Artemia, así se establecen las condiciones para la producción intensiva de un copépodo marino *Pseudodiaptomus*. Lo anterior permite su incorporación al esquema de alimentación para la cabrilla arenosa utilizado por Álvarez- González (2001), junto con el enriquecimiento de los rotíferos, nauplios y metanauplios de Artemia con emulsificantes comerciales. Por otro lado, los resultados de la producción de huevos, permiten establecer las condiciones óptimas de fotoperíodo (13L: 11D) y temperatura (23 °C) en un sistema de circulación cerrada, lo cual en última instancia permite inducir a la maduración gonádica y obtener el desove espontáneo en diferentes estaciones a lo largo del año (Rosales-Velázquez, 1997), con lo que se obtienen huevos de la calidad y cantidad necesaria para los procesos experimentales requeridos. A este respecto, Martínez-Brown (2007) probó diferentes alimentos balanceados, incluyendo dos niveles de proteína, tres niveles de ácidos grasos esenciales y dos alimentos frescos. Los resultados indicaron que la mayor calidad se presenta en los embriones obtenidos de reproductores alimentados con mojarra (alimento fresco). La cría larvaria, se logró llevar hasta el período juvenil en sistemas de circulación cerrada, probando diferentes densidades de siembra se alcanzó una supervivencia del 11.1 % a los dos meses de edad (Álvarez-González *et al.*, 2001). Adicionalmente, se logró el seguimiento de los parámetros de calidad del agua (físicoquímicos y microbiológicos) durante la cría de larvas y el estudio de enfermedades en adultos (Martínez-Díaz, 1995). Por último, se determinó la mejor densidad de siembra para la preengorda y la engorda en jaulas flotantes (Grayeb del Álamo, 2001), logrando una talla por debajo del esperado en el esquema teórico de Avilés-Quevedo *et al.* (1995), debido en parte a la maduración temprana de los organismos bajo cultivo.

La maduración precoz de la cabrilla limita su potencial de cultivo, ya que al presentarse la maduración en etapas tempranas, el crecimiento se detiene, lo cual extiende el periodo de tiempo necesario para alcanzar la talla comercial. Por lo anterior, utilizando la información generada por los trabajos mencionados, se ha iniciado la implementación de algunas técnicas genéticas que permitan evitar o al menos reducir

esta maduración precoz. Estas técnicas incluyen la Inducción a la triploidía, la cual fue desarrollada por Alcántar-Vázquez et al. (2008), el cual reporta un tratamiento que permite alcanzar un 100% de triploides utilizando un shock en frío con un tiempo de inicio después de la fertilización de 5 min, una temperatura de 8° C, y una duración de 20 minutos. Siguiendo la misma línea de investigación, con el presente trabajo, se propone mejorar el protocolo de inducción a la triploidía ya anteriormente desarrollado, en particular la supervivencia, así como evaluar los efectos del proceso de inducción a la triploidía y la adición de un tercer juego de cromosomas, sobre las etapas iniciales de desarrollo, el periodo larvario, juvenil y el proceso reproductivo. Lo anterior con el propósito de determinar si la triploidía puede traer ventajas al cultivo de la cabrilla y ser incluida dentro del paquete tecnológico de esta especie.

Antecedentes.

Aunque la domesticación de peces inició hace siglos, la aplicación de técnicas de triploidización fue investigada inicialmente por Swarup en 1959, en el pez espinoso, *Gasterosteus aculeatus* (Chourrout, 1988). A partir de este experimento, la producción de triploides viables inició con la introducción de especies explotadas por la acuicultura en los 70's y 80's en el Reino Unido, E.U. y Canadá. Esta investigación inicial fue posteriormente seguida por una gran investigación realizada en salmónidos, principalmente la trucha arcoíris en Francia, E.U. y el Reino Unido, y el salmón del Atlántico en el Reino Unido y Noruega. A mediados de los 90's se inició la aplicación de estas técnicas en peces marinos, como el mero, el rodaballo, la dorada y el pez plano fletán en España, Francia, Italia, Israel y Canadá. Actualmente, las especies de peces en las cuales la triploidía es comercialmente utilizada incluyen, la trucha arcoíris en E.U., Canadá, Francia, Japón, Reino Unido, Corea, Irán, Turquía, Polonia y Chile, la Trucha café en Reino Unido y Francia, la Trucha de río en Francia, Canadá, Islandia y Austria, el salmón Chinook en Canadá, varias especies de salmón y ciprinidos en Japón y la carpa herbívora en E.U. (Arai, 2001; Piferrer *et al.*, 2009). En los últimos años, la producción total de trucha triploide en la comunidad europea es estimada en 15,000 toneladas, las cuales son comercializadas en forma de filetes de alta calidad durante todo el año (Piferrer *et al.*, 2009).

Inducción a la triploidía.

Efectos de la triploidía en etapas tempranas

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

indicó una alta incidencia de mosaicos (picos multimodales) poliploides. Colombo *et al.* (1995) reportan que la aplicación de un shock frío de 20 minutos de duración, 5 minutos DF a 0-2 °C en la lubina, *Dicentrarchus labrax* L. resultaba en porcentajes de triploidía de ≈90%. Sin embargo, se observa una gran variación en los resultados obtenidos, pues solo en pocos lotes tratados se obtuvieron estos altos porcentajes. Este resultado fue atribuido al efecto del manejo de una gran cantidad de huevos.

Felip *et al.* (1997) hacen referencia a las condiciones óptimas para la inducción a la triploidía en *Dicentrarchus labrax*. Combinan tres variables, inicio del tratamiento (DF), temperatura y duración, logrando obtener un porcentaje de triploidía del 100 % con una supervivencia del 80% comparada con el control con la siguiente combinación; 5 min. DF, 10 minutos de duración a 0 °C. Piferrer *et al.* (2000) reportan los efectos del shock frío en el lenguado *Scophthalmus maximus*. Los tratamientos se aplicaron 5 minutos DF durante 5, 10, 20 y 40 minutos a 0, 2 y 4 °C. Los resultados que se presentan indican que el porcentaje de triploides se incrementa, conforme desciende la temperatura y aumenta la duración del shock (5 a 20 minutos). Posteriormente Piferrer *et al.* (2003) optimizan el método obtenido, evaluando los porcentajes de triploidía y supervivencia obtenidos iniciando el shock a 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 y 20 minutos después de la fertilización. Logran obtener porcentajes de triploidía del 100% con una supervivencia del 80% comparada con el control, así como llevar el proceso a una escala mayor con un tratamiento que inició a los 6 min DF durante 25 minutos y a una temperatura de entre 0 y -1 °C. Al igual que en experimentos anteriores, la tasa de supervivencia a la eclosión de los individuos triploides es menor comparada con la de los diploides. En lo que respecta al desempeño de las larvas triploides, éstas no registraron diferencias significativas en el crecimiento (peso y longitud) o supervivencia comparadas con los diploides.

Felip *et al.* (2001) en la lubina *Dicentrarchus labrax*, no reportan diferencias significativas en la supervivencia de diploides y triploides durante el periodo larvario, incluyendo el destete, aunque ambos grupos presentan una mortalidad relativamente alta. Lo anterior lo atribuyen a la naturaleza crítica de esta etapa y a la presencia de canibalismo. Una vez terminada esta etapa, la supervivencia de ambos tipos de ploidía

se incrementa y permanece igual durante el periodo subsecuente, el cual duró aproximadamente 4 años.

El desarrollo embrionario es una etapa importante para el desarrollo de una especie, cuya duración y cantidad de energía utilizada depende de variables ambientales, principalmente la temperatura. Happe *et al.*, (1988) mencionan varios aspectos del desarrollo embrionario y la eclosión en diploides y triploides de la trucha arcoíris *Salmo gairdneri*. Los resultados obtenidos arrojaron un tiempo promedio para el desarrollo embrionario significativamente más corto en embriones triploides con respecto a embriones diploides. Sin embargo, no se observan diferencias en la tasa de eclosión o bien la velocidad de ésta. Los autores sugieren que estos resultados están relacionados a la aplicación del shock térmico, en este caso, el shock caliente. En lo que respecta a la absorción del vitelo, no observan diferencias significativas durante las primeras etapas del desarrollo embrionario entre niveles de ploidía. La supervivencia es menor en las larvas triploides durante todo el desarrollo embrionario, sin embargo, solamente fue significativamente menor en la etapa de pigmentación de los ojos. En la misma especie, Oliva-Teles & Kaushik (1990) comparan la utilización de las reservas energéticas durante el desarrollo embrionario de individuos diploides y triploides, incubados a diferentes temperaturas (5, 10 y 12°C). En general, no observan diferencias significativas entre niveles de ploidía para las características metabólicas evaluadas, como el consumo de oxígeno y la excreción de urea nitrogenada. Estos dos valores son utilizados para representar la contribución de proteínas al catabolismo con propósitos energéticos. Se presenta la misma respuesta a la temperatura en diploides y triploides, en lo que respecta a la utilización de las reservas endógenas y el consumo de oxígeno. Por último, no reportan diferencias significativas en la velocidad del desarrollo embrionario entre niveles de ploidía a ninguna temperatura.

El desarrollo inicial de los embriones sigue una serie de divisiones mitóticas, las cuales producen células del mismo tamaño y forma conocidas como blastómeros (Shields *et al.*, 1997; Avery & Brown, 2005). Los embriones son transparentes en muchas especies de peces marinos, permitiendo la observación de los patrones de división (Rideout *et al.*, 2004; Sultana, 2005). La aparición de divisiones anormales durante la embriogénesis es generalmente considerada perjudicial y puede indicar una

baja viabilidad de los huevos empleados. Por lo tanto, puede representar una importante herramienta para análisis cualitativos rápidos dentro de condiciones experimentales o bien comerciales dentro de la acuicultura. Sultana (2005) reporta en el bacalao *Gadus morhua* una proporción más elevada de anomalías durante la primeras divisiones en los grupos expuestos al shock en frío comparativamente con los huevos del grupo control. Sin embargo, no observa diferencias significativas en la supervivencia a la eclosión en ninguno de los desoves analizados. Solo la supervivencia al día uno muestra una correlación negativa con la proporción de divisiones anormales. La autora concluye que la aplicación del shock incrementa la proporción de divisiones anormales, pero sin afectar la supervivencia a la eclosión.

Avery & Brown (2005) reportan en el lenguado *Limanda ferruginea*, diferencias significativas en la supervivencia durante las primeras etapas de la embriogénesis entre embriones normales (simétricos) y anormales (asimétricos). En este caso, los huevos fertilizados provenientes de cuatro desoves se incubaron separando los normales de los anormales. La proporción de embriones muertos se incrementó significativamente durante los primeros días del desarrollo embrionario (0-3), sin embargo, en los días posteriores (4-9) no se observan diferencias en el porcentaje de supervivencia entre huevos normales y anormales. Por último, no se observan diferencias morfológicas entre los dos tipos de embriones, aunque las larvas provenientes de embriones normales presentan una longitud significativamente mayor.

Efectos de la triploidía en etapas posteriores.

El incremento del tamaño celular en organismos triploides repercute en casi todos los órganos y sistemas. Sin embargo, uno de los que ha recibido mayor atención es el incremento del tamaño de los eritrocitos y sus consecuencias bajo situaciones de cultivo y de estrés. Benfey *et al.* (1997) no encuentran diferencias significativas en la temperatura máxima crítica comparando diploides contra triploides de la trucha de río *Salvelinus fontinalis*. De igual forma, Saddler *et al.* (2000) no reportan diferencias significativas en la capacidad de captación de oxígeno, así como en la respuesta hematológica de organismos triploides del salmón del Atlántico *Salmo salar* expuestos a estrés. A este respecto, Saddler *et al.* (2000) mencionan que los eritrocitos de los

individuos triploides son más grandes a lo largo (eje longitudinal) y a lo ancho (eje transversal) comparados con los de sus homólogos diploides, sin embargo, no tienen más altura (profundidad), lo cual hace factible que la difusión de oxígeno a través de la superficie del eritrocito no se vea comprometida tanto en las branquias como en los tejidos. Esto concuerda con lo que mencionan Cal *et al.* (2005), los cuales indican que el incremento del tamaño celular no afecta de igual forma todos los ejes celulares. El eje que más se ve afectado es el eje longitudinal (eje mayor). De esta forma, la célula se vuelve más elipsoidal. Este incremento en el tamaño de los eritrocitos puede servir para diferenciar entre diploides y triploides en algunas especies. Wolters *et al.*, (1982) reportan mediciones del eje mayor, eje menor y el volumen de eritrocitos en 50 individuos diploides y 50 triploides del pez gato *Ictalurus punctatus* con la finalidad de determinar cuál de estas variables predice mejor el nivel de ploidía, utilizando para ello análisis discriminantes. Aunque los valores medios de las tres variables analizadas fueron significativamente mayores en los individuos triploides, el rango de cada valor es lo suficientemente amplio para permitir cierto traslape entre niveles de ploidía. El porcentaje más alto para una correcta clasificación es para el eje mayor, con 92.36%, seguido del volumen de eritrocitos con 86.21% y por último el eje menor con 81.33%. Las tres variables combinadas muestran un porcentaje de correcta clasificación de 92.65%. Los autores afirman que la media del eje menor no predice de manera precisa el nivel de ploidía, debido a los cambios en la forma del núcleo entre diploides y triploides. En un estudio más reciente, Espinosa *et al.*, (2005) reportan mediciones del tamaño nuclear y celular (eje mayor) de los eritrocitos de 26 individuos diploides y 26 triploides en la trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss* para evaluar su utilidad para separar entre ambos niveles de ploidía. La clasificación se lleva a cabo por medio de un sistema asistido por computadora (software analizador de imágenes) y un análisis discriminante. Para confirmar el nivel de ploidía de cada individuo se emplea citometría de flujo. Los triploides muestran medias para el núcleo y el tamaño celular significativamente mayores que los diploides. Sin embargo, solo el tamaño celular es 100% efectivo para separar entre ambos tipos de ploidía. El tamaño nuclear, aunque también muestra una alta eficacia en separar niveles de ploidía, falló en clasificar correctamente 2 individuos dentro del grupo diploide o triploide. Estos resultados

confirman el uso potencial de la medición de eritrocitos como un método viable y barato para separar entre niveles de ploidía.

El crecimiento somático es un factor determinante para evaluar las ventajas de los peces triploides en la acuicultura. Numerosos estudios se han llevado a cabo para comparar el crecimiento de organismos triploides y diploides (Galbreath *et al.*, 1994), obteniéndose resultados altamente variables (Felip *et al.*, 2001). Cassani & Caton (1985) reportan el crecimiento de juveniles diploides y triploides de la carpa herbívora *Ctenopharyngodon idella*, bajo una variedad de situaciones experimentales, incluyendo alta y baja densidad de cultivo, alta y baja disponibilidad de alimento, tanto en cultivo comunal como separado. Cultivados comunalmente, los juveniles diploides muestran un peso y longitud total significativamente mayores comparado con los juveniles triploides. Sin embargo, cuando los juveniles diploides fueron cultivados separadamente con respecto a los juveniles triploides y alimentados a saciedad, no se presentan diferencias significativas en peso, longitud total, tasa de conversión alimenticia o bien en la tasa de consumo de alimento. A este respecto, Galbreath *et al.* (1994) reportan en el salmón del Atlántico *Salmo salar*, diferencias en el crecimiento entre diploides y triploides cuando están cultivados juntos o por separado. Mientras que cultivados por separado, las hembras triploides muestran un crecimiento mayor de forma significativa, durante el cultivo comunal, los diploides muestran una gran ventaja en peso comparado con los triploides. Con base en observaciones del comportamiento, estos autores sugieren que los individuos diploides son más agresivos (activos) a la hora de alimentarse.

En la tilapia del Nilo, *Oreochromis niloticus*, el crecimiento de juveniles fue similar entre diploides y triploides, hasta la edad de la primera maduración. Para el tiempo de la cosecha, los machos triploides presentan un peso aproximadamente 66% más grande que los diploides. Mientras que para las hembras, los triploides presentan un peso del doble de aquel alcanzado por los diploides (Brämick *et al.*, 1995). Felip *et al.* (2001) en la lubina *Dicentrarchus labrax*, reportan que los individuos diploides y triploides tuvieron un crecimiento similar durante los primeros 2 años de cultivo, sin embargo, para el tercer año, los juveniles diploides ya tenían un peso 9% menor al de los triploides. Diferencia que para el cuarto año se incrementa hasta alcanzar un 12%. En contraste, la longitud patrón fue muy similar entre ambos tipos de ploidía durante la duración del

experimento. De manera similar, Haffray *et al.* (2005) en la dorada *Sparus aurata* demuestran que hasta la talla comercial (480 g), los individuos triploides presentan la misma tasa de crecimiento que los individuos diploides, sin ninguna diferencia en la supervivencia y rendimiento durante el procesado (peso eviscerado). Sin embargo, en tallas más grandes, los individuos triploides presentan un crecimiento inferior al de individuos diploides, no obstante, son más fusiformes y tienen mejores rendimientos en peso, una vez eviscerados. Estas diferencias en el crecimiento entre triploides y diploides dependen de varios factores, incluyendo la especie.

De manera general, se reporta un menor desarrollo de las gónadas en peces triploides siendo casi siempre más marcado en hembras. Sin embargo, en algunas especies, aún observándose una reducción en el desarrollo de la gónada, se observa principalmente en los machos, cierto grado de maduración sexual a nivel fisiológico con niveles de hormonas sexuales bajos y muy variables (Felip *et al.*, 2001; Manning *et al.*, 2004).

Johnstone (1985) menciona que en los salmones del Atlántico (*Salmo salar*) los machos triploides exhiben elevados niveles de andrógenos durante la temporada reproductiva. Sin embargo, los pocos espermatozoides producidos son aneuploides, lo cual significa que son funcionalmente estériles. A este respecto, Thompson *et al.* (1987) reportan en la carpa herbívora *Ctenopharyngodon idella* que los machos triploides presentan espermatozoides secundarios en los testículos, siendo sin embargo, irregulares y sin desarrollar flagelo. En estudios posteriores se menciona que solo el 0.00002% del espermatozoide total era euploide. De igual forma la densidad espermática de los machos triploides es 1/50 comparado con la de un macho diploide. Los autores sugieren que el macho triploide de la carpa herbívora, al igual que en otras especies, es funcionalmente estéril. Esto concuerda con lo que reporta Linhart *et al.* (2006) en la tenca *Tinca tinca*, donde los testículos de los machos triploides presentan un desarrollo menor comparado con el de los machos diploides, un menor índice gonadosomático y una producción más baja de espermatozoides. Sin embargo, el porcentaje de espermatozoides vivos es igual en los diploides que en los triploides.

Cal *et al.* (2005) reportan en el pez plano *Scophthalmus maximus* hasta los 48 meses de edad un desarrollo gonadal muy reducido en hembras triploides, presentando

principalmente oogonías, y de manera esporádica oocitos en estadio perinucleolar y en los primeros estadios de vitelogénesis. Mientras que las hembras diploides presentan ovarios con gran cantidad de oocitos en diferentes estadios vitelogénicos. Como ya se ha observado en otras especies, los machos triploides presentan gónadas en estadios de desarrollo al nivel de los machos diploides sin llegar a la producción de esperma. En contraste, Tiwary *et al.* (2000) en el bagre *Heteropneustes fossilis* mencionan un menor desarrollo gonadal en machos triploides comparado con las hembras. Los machos triploides muestran bajos índices gonadosomáticos con lóbulos en regresión conteniendo pocas espermatogonias, espermatocitos y espermatozoides en el área circundante, así como tejido conectivo ocupando el resto de los lóbulos. Las hembras triploides, no muestran diferencias con las diploides en el desarrollo gonadal hasta la etapa vitelogénica. Las gónadas triploides están formadas principalmente de oocitos en alveolo cortical que no siguen su desarrollo y se vuelven atrésicos. A este respecto, Tiwary *et al.* (2004) mencionan que estos resultados, son consistentes con lo observado en otras especies, especialmente salmónidos. El desarrollo gonadal en hembras triploides de diferentes especies presenta un desarrollo menor comparado con diploides, por lo tanto, los autores sugieren que la falta de desarrollo más allá de la etapa de vitelogénesis puede ser ocasionada por bajos niveles, ya sea de gonadotropinas (GtH) o bien esteroides sexuales.

En especies que presentan inversión sexual, como es el caso de la cabrilla arenosa, se han llevado a cabo pocos estudios sobre el efecto de la triploidía en este proceso. Haffray *et al.* (2005) en la dorada *Sparus aurata*, una especie protándrica, reportan que a los 42 meses de edad, el 70% de la población inicial de machos diploides presenta inversión sexual para convertirse en hembras funcionales, mientras que la población de machos triploides permanece sin cambio alguno. Lo anterior se le atribuye en parte al papel que juegan las hormonas sexuales en este proceso, las cuales permanecieron en niveles muy bajos en individuos triploides. Esto parece confirmar las observaciones realizadas en algunas otras especies de esparidos en las cuales se observa, que los machos triploides no llevan a cabo inversión sexual y permanecen como machos (Haffray *et al.*, 2005).

Una alteración en la proporción de sexos se considera en algunas especies como otra consecuencia de la triploidización. La triploidización se ha usado en algunas especies como una herramienta más en los estudios sobre el mecanismo de determinación sexual. Omoto *et al.* (2005) evalúan la proporción de sexos (radio sexual) en triploides y diploides ginogenéticos en el híbrido del esturión (*Huso huso* X *Acipenser ruthenus*) con la finalidad de confirmar la posibilidad del control del sexo a través de la manipulación cromosómica en este híbrido. La triploidía y la ginogénesis fueron inducidas mediante shock caliente. Los resultados obtenidos arrojan una proporción de hembras en los grupos diploides de 40 a 55%, de 60 a 73% en los grupos triploides y finalmente de 70 a 80% en los grupos ginogenéticos. Debido a que todos los peces fueron cultivados bajo las mismas condiciones experimentales, el aumento en la proporción de hembras en el grupo triploides y la presencia de varios machos en el grupo ginogenético sugiere un sistema de determinación sexual basado en una hembra heterogamética (ZW, Hembra) y un macho homogamético (ZZ, Macho). El porcentaje de machos en cada uno de los grupos es muy similar a los porcentajes esperados cuando el elemento determinante del sexo en el cromosoma W se segrega independientemente del centrómero durante la meiosis en hembras.

Justificación

El desarrollo de nuevas biotecnologías ha hecho grandes contribuciones en todas las disciplinas de la ciencia, incluyendo biomedicina, agricultura y las industrias farmacéuticas, lo cual posibilita en las últimas décadas su aplicación en la acuicultura. Debido al éxito que ha tenido la aparición de estas nuevas biotecnologías dentro del panorama de la acuicultura, incluyendo la producción de peces poliploides, el vínculo entre investigadores y productores se ha hecho más amplio permitiendo la cooperación en el desarrollo de nuevas técnicas de manejo, así como la utilización de nuevas especies, ya sea endémicas o exóticas en áreas donde originalmente no eran aprovechadas. Tales programas de vinculación e investigación se han llevado con gran éxito en países como Estados Unidos, Inglaterra, Francia, Canadá y Japón entre otros. Esto repercute en última instancia, en un incremento en la cantidad de estudios e investigación que permiten la incorporación de la manipulación cromosómica de manera más rápida y extensa en la producción obtenida a través de la acuicultura. En México, el desarrollo de biotecnologías genéticas, en particular la manipulación cromosómica, ha permitido una utilización de recursos marinos a través de los avances realizados en ginogénesis, androgénesis, reversión sexual, tetraploidía y triploidía (Ruiz-Verdugo, 2000; Puente-Carreón, 2004; Alcántar-Vázquez, 2005; Rosales-Velázquez, 2009).

Aunque la cabrilla arenera, *Paralabrax maculatofasciatus*, no posee una importancia comercial al nivel de otras especies, es un candidato potencial para el cultivo, principalmente debido a la gran cantidad de estudios que se han realizado en el CICIMAR desde hace 15 años por diferentes grupos de trabajo, los cuales han permitido el desarrollo de un paquete tecnológico que sirve como plataforma para la aplicación de técnicas de manipulación cromosómica (Matus-Nivón *et al.*, 1990; Álvarez-González *et al.*, 2000; Álvarez-González *et al.*, 2001). Adicionalmente, posee ciertas características como; ser altamente tolerante al manejo y factores ambientales, baja territorialidad en cautiverio, adaptarse al cautiverio con rapidez, poca agresividad entre individuos y rápida aceptación hacia diferentes tipos de dieta. Sin embargo, aun existen problemas específicos que deben ser superados con el objetivo de hacer del cultivo una actividad sustentable y rentable.

Si bien en la actualidad, la cabrilla arenera sólo es explotada en forma artesanal, la existencia de volúmenes apreciables (Avilés-Quevedo, 1995) y las tendencias al incremento en los precios de los productos marinos pueden hacer que esta situación cambie en el futuro, con lo que será necesario considerar los diferentes aspectos del cultivo larvario y juvenil (Lluch-Cota, 1995). Uno de los principales problemas que se han observado en *P. maculatofasciatus* es su madurez sexual precoz a tallas muy por debajo de la talla comercial (Hasting, 1989; Martínez-Díaz *et al.*, 2001). De ahí surgió el interés por producir organismos estériles mediante la producción de organismos triploides, los cuales pueden presentar otras ventajas en términos de producción, como tallas más grandes y/o mejores índices de conversión alimenticia (Ojolick *et al.*, 1995; Fast, 1998; Qin *et al.*, 1998). La inducción a la triploidía fue lograda en laboratorio por Alcántar-Vázquez *et al.* (2008), obteniendo 100% de porcentajes de triploidía, con una supervivencia a la eclosión superior al 60%. Sin embargo, es necesario optimizar (mejorar) el proceso de inducción a la triploidía y determinar sus efectos en las etapas iniciales del desarrollo, el periodo larvario, el crecimiento y el desarrollo de la gónada en organismos triploides *P. maculatofasciatus*. Lo anterior es fundamental, ya que si los acuicultores están siendo estimulados a usar peces triploides, el desempeño de éstos debe ser igual o superior al de organismos diploides bajo condiciones de cultivo comercial (Oppedal *et al.*, 2003).

Objetivo general.

Evaluar el efecto de la inducción a la triploidía en la cabrilla arenera durante las etapas iniciales de desarrollo, así como comparar el desempeño en los periodos larvario, juvenil y adulto de los triploides obtenidos para posteriormente intentar establecer los parámetros del uso de individuos triploides en el cultivo de esta especie.

Objetivos particulares.

1) *Mejorar el método de inducción a la triploidía a través de la;*

- a) Comparación del porcentaje de triploidía y supervivencia obtenido en desoves individuales de hembras silvestres cuando el shock en frío se inicia a 5, 6, 7, 8, 9 y 10 después de la fertilización.
- b) Evaluación de la variación en el porcentaje de triploidía obtenido en desoves individuales de hembras silvestres de cabrilla arenera
- c) Comparación de los métodos de verificación de los porcentajes de triploidía en la cabrilla arenera

2) *Evaluar los efectos de la inducción a la triploidía en los periodos embrionario y larvario a través de la;*

- a) Evaluación de la velocidad del desarrollo en individuos diploides y expuestos al shock en frío de cabrilla arenera.
- b) Comparación del porcentaje de divisiones anormales, eclosión y larvas vivas en individuos diploides y expuestos a shock en frío de cabrilla arenera.
- c) Evaluación del porcentaje de supervivencia a la eclosión y a las 24 horas posteriores en larvas diploides y expuestas al shock en frío de cabrilla arenera.
- d) Seguimiento de los porcentajes de triploidía durante la crianza larvaria y hasta 30 días de edad.

- e) Comparación del crecimiento entre diploides y triploides de cabrilla arenera durante el periodo larvario.
- 3) *Evaluar los efectos de la triploidia en las etapas juvenil y adulta, y comparar con los individuos diploides para;*
- a) Crecimiento y supervivencia durante el periodo de pre-engorda de triploides de cabrilla arenera.
 - b) Madurez gonádica en triploides de cabrilla arenera.

Material y Métodos

Método general

En este apartado se presentará el material y método común a todos los experimentos que se desarrollaron para cada objetivo. Más adelante se presentarán los detalles que son específicos a cada experimento.

Colecta de reproductores

Para cada experimento realizado los reproductores fueron obtenidos de la Bahía de La Paz, B.C.S. Por cada experimento, se colectaron de 4 a 12 machos y de 3 a 18 hembras. Los organismos capturados fueron anestesiados al momento de su captura utilizando 2-fenoxietanol a una concentración de 400 ppm para realizar una revisión preliminar del sexo, mediante canulación con ayuda de un catéter de plástico 1.2 mm de diámetro. Del total de las hembras capturadas se seleccionaron solamente las hembras que presentaron oocitos de color blanco a contraluz. Este color, por experiencia (Alcántar-Vázquez, 2005) indica oocitos del tamaño adecuado para inducción hormonal. Las hembras que no presentaban tales oocitos o los machos sin esperma fluyente se regresaron al agua. Durante el recorrido hacia el laboratorio, los organismos capturados se mantuvieron en un tanque de 100 L, con recambios de agua frecuentes del 50%. Para los últimos experimentos se utilizó el tanque de aproximadamente 40 L que se encuentra dentro de la lancha y el recambio de agua se suministró con una bomba sumergible conectada a la batería de la embarcación. Los machos fueron marcados mediante un ligero corte angular en la parte superior de la aleta caudal, para hacer más fácil su identificación entre sexos en el laboratorio. Los peces fueron distribuidos en tanques de 600 L organizados en un sistema de recirculación en una proporción aproximada de 2:1 (Hembras: Machos).

Obtención de desoves

Las hembras y machos seleccionados fueron inyectados intramuscularmente en la aleta pectoral con LHRH-a (análogo del factor liberador de la hormona luteinizante). En el caso de las hembras se aplicaron 12.5 µg/kg de pez, dividido en dos inyecciones y 25 µg/kg de pez en una sola inyección en el caso de los machos. La segunda

inyección en el caso de las hembras se administró 24 horas después de la primera, junto con la única dosis para los machos. Los peces se revisaron entre 32 y 33 horas aproximadamente, después de la primera inyección aplicada a las hembras. Lo anterior se llevó a cabo presionando ligeramente el abdomen de las hembras para verificar si se presentaba el desove. El desove se colectó en bandejas de plástico. En el caso de los machos, el esperma se colectó aproximadamente 30 minutos antes de la iniciar la colecta de los huevos. Para esto se utilizó una jeringa plástica de 3 ml de capacidad, el esperma obtenido fue depositado en un tubo Eppendorf de 2 ml antes de ser refrigerado a 4 °C hasta su utilización. Cabe mencionar que solo se utilizó el esperma de aquellos machos que durante el proceso de extracción no se contaminó con orina y que presentó un porcentaje de motilidad inicial superior al 90%. Para evaluar el porcentaje de motilidad, se tomó una muestra del esperma de cada macho inmediatamente después de ser recolectado, se colocó una muestra en un porta-objeto debajo de la luz de un microscopio y se agregó una gota de agua de mar tratada (clorada a 0.25 g/15 L y neutralizada con tiosulfato de sodio a 0.15 g/15 L) antes de ser cubierto por un cubre-objetos. La motilidad inicial se registró bajo el objetivo de 40X. La fertilización se llevó a cabo agregando un poco de agua de mar tratada y el momento de la fertilización se determinó como el tiempo cero ($T = 0$) con ayuda de un cronómetro digital.

Aplicación del Shock

Dependiendo del experimento se utilizaron recipientes (tamices) de PVC con fondo de malla de 200 μm , de 10 cm de altura y 6 cm de diámetro (pequeños) o bien de 7 cm de altura y 26 cm de diámetro (grandes). Los huevos fertilizados fueron repartidos en 2 o 3 tamices (replicas) por cada nivel de tratamiento, más el grupo control (2 o 3 tamices) que recibieron el mismo manejo a excepción del shock térmico. Los tamices con los huevos fertilizados se mantuvieron previo a la inducción al shock en una hielera de poliuretano de 35 L de capacidad con agua de mar tratada a 23 °C. El shock se aplicó transfiriendo el tamiz o tamices con los huevos fertilizados a un baño con agua enfriada a la temperatura deseada. La temperatura fue monitoreada de manera continua empleando un termómetro digital y se utilizaron bolsas de hielo para regular la

temperatura cada vez que era requerido. La temperatura se mantuvo controlada para que no variara más de ± 0.3 °C.

Incubación

Una vez aplicado el shock, los tamices conteniendo los embriones del grupo control y los expuestos al shock, fueron transferidos a un contenedor de aproximadamente 35 L de capacidad con agua de mar tratada. La temperatura se mantuvo a 25°C y se agregaron tres aireadores distribuidos de manera uniforme. Por último, durante la incubación se realizaron tres recambios (aprox. cada 12 horas) de aproximadamente un 70%, con agua de mar tratada previamente calentada a 25 °C.

Análisis del nivel de ploidía

Por cada tratamiento se colectaron de 10 a 30 larvas al azar por replica dependiendo del experimento en particular, con ayuda de una pipeta Pasteur conectada a una bomba de plástico (BEL-ART, Products, USA). Las larvas obtenidas se colocaron en tubos Eppendorf de 1.5 mL de capacidad. Posteriormente, se marcaron y transportaron en hielo molido al laboratorio de genética y mejoramiento animal del CIBNOR. El análisis del nivel de ploidía se llevó a cabo por medio de citometría de flujo agregando a las muestras unas gotas de 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) en frío, el cual penetra las células y tiñe el ADN. Posteriormente, las muestras se maceraron gentilmente con ayuda de un pistilo y las células obtenidas se filtraron a través de una malla de 30 μ m colocada en la parte superior de un vial de vidrio previamente marcado. Se agregó aproximadamente 1.5 mL de DAPI a la muestra filtrada para obtener el volumen necesario. Por último, las muestras se dejaron reposar 5 minutos antes de ser analizadas por el citómetro de flujo (Ploidy Analyzer II PARTEC, Germany). Las gráficas obtenidas que presentaron ambos tipos celulares (diploides y triploides), fueron examinadas mediante el software del citómetro de flujo, con el objetivo de determinar los porcentajes de cada tipo celular dentro de la muestra.

Porcentaje de supervivencia

En los experimentos en los cuales se evaluó el porcentaje de supervivencia, los huevos y larvas obtenidas después de la eclosión fueron recolectados de los tamices y fijados en formol al 4% y guardados en viales de plástico hasta el momento de su análisis. La evaluación se realizó contabilizando el número de larvas y huevos con ayuda de un microscopio estereoscópico y de una caja de Petri cuadrículada. El número de larvas colectadas previamente para el análisis de citometría de flujo fue agregado al número de las larvas eclosionadas observado. El porcentaje de supervivencia a la eclosión (SE) se obtuvo con la siguiente fórmula:

$$SE: (Larvas\ eclosionadas \times 100) / (Larvas\ eclosionadas + \text{huevos no eclosionados})$$

Material y métodos por objetivo

1) Mejorar el método de inducción a la triploidía.

1a) Porcentajes de triploidía y supervivencia aplicando el shock a los 5, 6, 7, 8, 9 y 10 minutos después de la fertilización (DF). Cada desove fue fecundado individualmente por el esperma de 3 a 4 machos por un total de 8 desoves (hembras). Los huevos se pasaron directamente al agua fría sin enjuagarlos como se hace normalmente en el protocolo de fecundación. El shock en frío se aplicó 5, 6, 7, 8, 9 y 10 minutos después de la fecundación. Al tener el esperma en contacto con los huevos por más tiempo, se estimó si podía aumentarse el porcentaje de supervivencia, aumentando el porcentaje de fertilización. La temperatura y duración del shock utilizado fueron las reportadas como exitosas por Alcántar-Vázquez (2005), 8 °C, durante 20 minutos. Cada tiempo de aplicación del shock se realizó por duplicado (utilizando los tamices pequeños), incluyendo los controles. Una vez aplicado el shock, los huevos fueron incubados aproximadamente a 25 ± 0.5 °C hasta la eclosión. El porcentaje de supervivencia se evaluó siguiendo el método descrito previamente.

1b) Variación en el porcentaje de triploidía obtenido en desoves individuales.

Para la primera serie de experimentos se utilizaron 7 desoves individuales para determinar el grado de variación en los porcentajes de triploidía obtenidos. Dependiendo del número de hembras maduras obtenidas a través de inducción hormonal, se llevaron a cabo de 2 a 3 desoves simultáneamente. Para fertilizar los desoves obtenidos de manera simultánea, se empleó el mismo esperma proveniente de 4 machos. Una vez fertilizados cada uno de los desoves, se dividió en cinco tamices pequeños, tres para el tratamiento y dos controles que recibieron el mismo manejo excepto por el shock frío. El tratamiento de inducción a la triploidía utilizado fue el que arrojó los porcentajes de triploidía más altos de acuerdo al objetivo anterior, 5 minutos después de la fertilización (MDF), 8 °C, durante 20 minutos. Una vez aplicado el shock los tamices se incubaron a 25 °C hasta la eclosión. La supervivencia a la eclosión y los porcentajes de triploidía se evaluaron de acuerdo al método descrito.

Para la segunda serie de experimentos se realizaron 2 experimentos de fertilización cruzada o factoriales, utilizando en cada uno 3 hembras y 3 machos. Para llevar a cabo lo anterior, el desove obtenido de cada hembra fue pesado utilizando una balanza digital para dividirlo en 3 muestras iguales. Cada muestra fue fecundada por el esperma de 1 macho y dividida a su vez en 5 sub-muestras, de las cuales se aplicó el tratamiento a 3, mientras que 2 fueron considerados como control diploide. Para el primer factorial se usaron tres muestras de 1.2 g, mientras que para el segundo factorial se usaron tres muestras de 0.5 g. El esperma seleccionado se diluyó utilizando solución de Hanks (NaCl, KCl, KH₂PO₄, glucosa, fenol, Na₂HPO₄, MgSO₄, CaCl y bicarbonato de sodio) y para llevar a cabo la fertilización se utilizaron, dependiendo del desove, de 300 a 400 µL por macho con ayuda de una micropipeta. Se utilizó el mismo tratamiento de inducción a la triploidía reportado como exitoso previamente. Una vez aplicado el shock, los huevos se incubaron hasta la eclosión de acuerdo a lo reportado. Los porcentajes de triploidía se obtuvieron y analizaron tal como fue descrito anteriormente.

1c) Métodos de verificación de triploidía. Se tomaron 30 individuos de 8 meses de edad expuestos al shock (ES) en frío para determinar su nivel de ploidía por medio

de análisis del eje mayor y menor de eritrocitos. Para llevar a cabo lo anterior, cada individuo fue anestesiado con fenoxietanol (350 ppm), posteriormente, se tomó una muestra de sangre con una jeringa heparinizada y se realizó un frotis sanguíneo. El frotis obtenido se sumergió en alcohol etílico al 100% por 5 minutos, previo a su tinción. Una vez seco se procedió a teñirlo con solución Giemsa durante dos horas. Posteriormente, la muestra fue lavada con agua destilada para retirar el exceso de colorante. Para tomar las fotografías de los eritrocitos teñidos se utilizó un microscopio del laboratorio de histología del CIBNOR. De cada frotis (uno por individuo) se tomaron de 4 a 6 fotografías. Las mediciones se tomaron con ayuda del programa SigmaScan Pro 5. Por cada frotis se midieron 50 núcleos, de cada núcleo se tomó el eje mayor y el eje menor. Adicionalmente, se tomó una muestra de músculo para confirmar el nivel de ploidía de cada individuo por medio de citometría de flujo.

2) Evaluar los efectos de la triploidía en las etapas embrionaria y larvaria.

2a) Velocidad del desarrollo embrionario. A partir de dos desoves mixtos, se tomó una muestra de aproximadamente 300 huevos tanto diploides como expuestos al shock en frío. Las muestras se tomaron con ayuda de una pipeta Pasteur y fueron incubadas a 25.5 ± 0.3 °C hasta la eclosión. A diferentes tiempos se tomó una muestra de aproximadamente 20 huevos y se colocó en una caja de Petri con el objetivo de identificar el tiempo de aparición de las principales etapas del desarrollo embrionario de la cabrilla arenera, las cuales incluyen; blástula tardía, gástrula, neurulación, vesícula óptica, melanóforos, aleta caudal y eclosión. Se llevaron a cabo revisiones aproximadamente cada 30 a 60 minutos, colocando una muestra de 20 embriones bajo una lupa estereoscópica conectada a una cámara digital. El tiempo de aparición de cada una de las etapas se registró con ayuda de un cronometro digital y se tomaron de 3 a 6 fotografías por cada etapa. Las fotografías fueron tomadas con una cámara utilizando el programa Image Pro-plus V. 5.

2b) Divisiones anormales, eclosión y larvas vivas en individuos diploides y expuestos a shock en frío de cabrilla arenera. Dependiendo del número de hembras

maduras obtenidas por medio de inducción hormonal, 2 o 3 desoves eran realizados de manera simultánea, hasta alcanzar 11 desoves. Siete desoves fueron obtenidos durante la temporada Febrero-Mayo de 2008, y cuatro más durante la temporada Febrero-Mayo de 2009. Dos desoves adicionales provenientes de hembras capturadas al final de la primera temporada y mantenidas en nuestras instalaciones fueron utilizadas durante la segunda temporada. Las hembras en cautiverio se colocaron en tanques de 600 L y se alimentaron una vez al día con una mezcla de calamar, sardina y al acercarse la etapa reproductiva, con trozos de camarón. El fotoperíodo utilizado fue de 13L:11D, a una temperatura aproximada de 23.5 °C.

Los desoves fueron colectados y fertilizados de acuerdo a lo descrito previamente. Después de aplicar el shock en frío (en los tamices pequeños), una muestra de aproximadamente 50 huevos diploides y 50 expuestos al shock en frío fueron colocados en 12 pocillos dentro de microplacas llenos con agua de mar tratada. Dependiendo del desove, las observaciones en busca de divisiones anormales se realizaron entre los estadios de 8 a 32 células de desarrollo, utilizando un estereoscopio conectado a una cámara digital. Cualquier embrión que no estuviera dividido en una forma de “caja” era considerado anormal. Una vez hecho lo anterior, las muestras tomadas de cada desove se incubaron a 25 °C durante 24 horas en un incubador. Una vez eclosionadas las larvas, se registró bajo el estereoscopio la cantidad de huevos sin división, larvas normales y larvas muertas. Las larvas muertas se consideraban como tales si presentaban una forma arqueada. La proporción de larvas vivas se obtuvo dividiendo el número de larvas vivas sobre el número total de larvas eclosionadas. Para registrar las fotos se utilizó el programa Image Pro-plus V. 5. Adicionalmente, para los primeros cuatro desoves (provenientes de hembras silvestres) de la temporada 2009, los huevos normales fueron separados de los huevos anormales en los pocillos de las microplacas, con el propósito de evaluar de manera más precisa el efecto de las divisiones anormales en el porcentaje de eclosión y el número final de larvas vivas.

2c) Porcentaje de supervivencia a la eclosión y a las 24 horas posteriores en larvas diploides y expuestas al shock en frío. Se llevaron a cabo ocho experimentos utilizando desoves mixtos provenientes de tres a seis hembras fecundadas con el

esperma de 3 a 4 machos. En los primeros cinco experimentos se evaluó únicamente la supervivencia a la eclosión, mientras que en los últimos tres se evaluó la supervivencia a la eclosión y a las 24 horas posteriores. Una vez aplicado el shock (5 MDF, 8 °C, 20 minutos de duración), de cada desove se tomó una pequeña cantidad de huevos (tanto del grupo control como expuestos al shock), los cuales fueron sembrados en bolsas de marca Ziploc de 2 lts. de capacidad llenadas con agua de mar tratada y luego llenadas con aire para asegurar su flotabilidad. Cada tratamiento se sembró en 2 bolsas para la evaluación de la supervivencia a la eclosión y en 4 para la evaluación de la supervivencia a la eclosión y a las 24 horas posteriores. Lo mismo se repitió para los controles. Las bolsas se incubaron a 25 °C en baño María. Una vez alcanzada la eclosión o bien a las 24 horas después de ésta, los huevos y larvas obtenidos se recolectaron sobre un tamiz, se almacenaron en un vial de plástico con formol al 4% y se refrigeraron a 4 °C. Por último se realizó la estimación de supervivencia de acuerdo al método descrito previamente.

2d) Seguimiento de los porcentajes de triploidía durante la crianza larvaria y hasta 30 días de edad. Se llevaron a cabo dos series de experimentos con la finalidad de evaluar la mortalidad de organismos triploides durante el estadio larvario. La totalidad de los desoves fueron obtenidos a partir de hembras silvestres siguiendo el método antes descrito. De igual forma, la fertilización y aplicación del shock se realizó de acuerdo al método antes descrito. Para estos experimentos, debido a la mayor cantidad de huevos obtenidos se utilizaron los tamices grandes. Durante la primera serie (temporada Febrero-Mayo 2008) se obtuvieron cuatro desoves mixtos provenientes de 7 a 11 hembras. Cada desove se fertilizó con el esperma de 4 a 6 machos. Una vez eclosionadas, las larvas fueron transferidas al sistema de crianza larvaria II en la UPIMA, compuesto de 12 tanques cónicos de aproximadamente 200 litros de capacidad. Este sistema es de circulación cerrada y cuenta con un filtro de arena, un filtro de tierra de diatomeas y lámparas UV. Previo a la siembra, se realizó un conteo volumétrico para determinar el número de larvas eclosionadas. Dependiendo del número de larvas obtenidas, las larvas fueron sembradas en uno o dos tanques del sistema de crianza. Las larvas se alimentaron con rotíferos *Brachionus plicatilis*, y

nauplios y adultos de *Artemia* sp., siguiendo el siguiente calendario: el mismo día de siembra las larvas se alimentaron con una densidad aproximada de 4 rot/mL. La densidad de alimentación de rotíferos se elevó conforme pasaron los días hasta llegar a una densidad máxima de 15 rot/mL. La larva se alimentó con rotífero hasta el día 18 aproximadamente. Sin embargo, 3 días antes se inició la co-alimentación con nauplios de *Artemia* sp., los cuales se proporcionaron hasta el día 30. Por último, a partir del día 25 de cultivo se proporcionó adulto de *Artemia*, la cual se cultivó en tanques de 600 L, alimentada diariamente con una mezcla de microalgas verdes (*Nannochloropsis* sp.) y cafés (*Tetraselmis* sp.).

Los porcentajes de triploidía se evaluaron al momento de la eclosión con 80-100 larvas y posteriormente, después de la primera alimentación (DPA), a los 15 días de edad (dde) y por último a los 30 dde. En cada muestreo se separó entre larvas triploides y larvas diploides expuestas al shock (que se encontraba en los tanques triploides y fueron verificadas por citometría de flujo). Para el segundo y tercer muestreo se recolectaron de 15 a 30 larvas por nivel de ploidía, mientras que para el último muestreo se recolectó el total de larvas restantes. Las larvas fueron colectadas utilizando un tamiz de 300 micras para después ser enjuagadas con agua destilada. Una vez removido el exceso de agua, las larvas fueron separadas y contadas bajo un microscopio estereoscópico, antes de colocarlas en viales de 2 mL, los cuales se congelaron a -80 °C hasta el momento de su análisis por medio de citometría de flujo.

En la segunda serie de experimentos (temporada Febrero-Mayo 2009), se trabajó con tres desoves individuales que fueron sembrados en el sistema de crianza larvaria I, el cual cuenta con 18 tanques de 100 l de capacidad. Este sistema es de circulación cerrada y cuenta con un filtro de arena, un filtro de lodo activado y lámparas UV. El calendario general de alimentación fue el mismo utilizado la temporada anterior, excepto que en este caso se proporcionaron los rotíferos en dos dosis, una en la mañana y otra por la tarde. Adicionalmente, la cantidad de alimento proporcionado en todas las etapas se incrementó aproximadamente en un 10% para intentar aumentar la supervivencia final. Para la evaluación de la triploidía se colectaron a la eclosión 30 larvas que fueron colocadas de manera individual, para el resto de los muestreos se colectaron entre 20 y 30 larvas, dependiendo de la disponibilidad, también colocadas de

manera individual. De la misma forma, se separó entre larvas triploides y larvas diploides Expuestas al shock (ES). El método de colecta utilizado fue el descrito en la sección anterior. Las larvas colectadas se congelaron a -80 °C hasta el momento de su análisis por medio de citometría de flujo.

2e) Crecimiento de diploides y triploides durante la crianza larvaria y hasta 30 días de edad. De los cuatro desoves mixtos obtenidos en la temporada Febrero-Mayo 2008 para la evaluación de los cambios en el porcentaje de triploidía, se seleccionaron tres desoves para evaluar y comparar el crecimiento en larvas diploides y triploides durante el periodo larvario. Para realizar lo anterior, se utilizaron las larvas recolectadas a los 15 dde y los 30 dde en el objetivo anterior. Cada larva recolectada fue anestesiada con tricaina (MS-222) y fotografiada utilizando un estereoscopio conectado a una cámara digital. Luego cada larva se almacenó en un vial de 1.5 mL de capacidad de manera individual y se congeló a -80 °C. El estatus de ploidía de cada una de las larvas se analizó por medio del citómetro de flujo y una vez concluido se procedió a llevar a cabo las mediciones de la longitud patrón utilizando el programa Image Pro-plus V. 5.

Para la segunda temporada (Febrero-Mayo 2009) se utilizaron los tres desoves individuales obtenidos en el objetivo anterior. Se siguió el mismo protocolo de colecta, fotografiado y almacenamiento de las larvas descrito en el párrafo anterior. Sin embargo, en este caso, para el último muestreo (30 dde) no se recolectó el resto de las larvas, solo se colectaron de 20 a 30 larvas.

3) Evaluar los efectos de la triploidia en la etapa juvenil y adulta, y comparar con los diploides.

3a) Crecimiento y supervivencia durante el periodo de pre-engorda. Se contó con un desove mixto proveniente de 12 hembras y 4 machos. Una vez eclosionadas, las larvas fueron transferidas a un sistema de crianza larvaria previamente descrito. Al igual que en experimentos anteriores, se realizó un conteo volumétrico para determinar el número de larvas eclosionadas. Las larvas se alimentaron siguiendo el calendario que a continuación se describe: El mismo día de siembra se alimentaron con una densidad de

aproximada de 3 a 4 rot/mL. Esta concentración de rotíferos se elevó conforme pasaron los días hasta llegar a una densidad máxima de 12 rot/mL que se proporcionaron hasta el día 18. Tres días antes se co-alimentaron con una mezcla de rotífero con nauplios de *Artemia* sp que se proporcionó hasta el día 34. Se proporcionaron adultos de *Artemia* desde el día 31 hasta el día 40. La dieta con la que se llevó a cabo el destete consistió de 57% de proteína, 14% de grasa, 12% de ceniza, 1% de fibra, 1.2% de fósforo, 30.000 IU/kg de vitamina A, 2,500 IU/kg de vitamina D3, 400IU/kg de vitamina, 2,000 IU/kg de vitamina C y una humedad del 7% (EPAC CW 8/12, INVE Aquaculture, Bélgica). El tamaño de la partícula fue de 800 a 1200 μm .

A los 60 días de edad, los juveniles fueron medidos (longitud total), y se registró el peso húmedo. Se formó un grupo de diploides y otro de individuos expuestos al shock con un peso de 1.3 a 1.9 g, el cual a su vez fue dividido en tres replicas para cada nivel de ploidía. Posteriormente, todos los juveniles fueron transferidos a un sistema cerrado compuesto por 6 tanques de 600 L de fibra de vidrio, con un filtro de arena, tierra de diatomeas y lámparas UV, mantenidos bajo condiciones naturales de fotoperiodo y temperatura.

Los juveniles fueron alimentados con una dieta compuesta por 44% de proteína cruda, (Burriss Marine, USA). Esta dieta se proporcionó aproximadamente en un porcentaje del 10% del peso corporal de manera inicial para después de 3 meses bajar al 5%. Cada cuatro a cinco semanas, se llevaron a cabo biometrías mediante mediciones de la longitud patrón con ayuda de un Vernier electrónico (± 0.01) y del peso húmedo utilizando una balanza digital (± 0.02). Para llevar a cabo la biometría los peces fueron anestesiados con 2-fenoxietanol (Eter Monofenílico de Etilen Glicol) a una concentración de 350 ppm. En total, la duración del cultivo fue de 8 meses.

3b) Evaluación de la madurez gonádica. En total se analizaron 77 peces de aproximadamente 10 a 11 meses de edad, 41 diploides y 36 expuestos al shock. Fueron anestesiados utilizando fenoxietanol a una concentración de 350 ppm, se registró su peso húmedo y longitud patrón tal como se describió en el objetivo anterior. Se procedió a tomar una muestra de sangre por punción caudal con una jeringa de 1 ml (tipo insulina) heparinizada. Una vez tomada la muestra de sangre, se disectaron para

obtener la gónada, la cual fue pesada y fijada en solución Davidson por 48 horas y posteriormente colocada en formaldehído al 4%. Con los datos que se obtuvieron del peso de los organismos y el de las gónadas, se calcularon los índices gonadosomáticos (IGS) (Erickson *et al.*, 1985), utilizando la siguiente fórmula;

$$\text{IGS} = (\text{Pg}/\text{Pt}) \times 100$$

Donde;

IGS = índice gonadosomático

Pg = peso de la gónada

Pt = peso total del organismo

De cada gónada, se tomó una porción de 6 mm de longitud de la parte media-anterior. Las piezas fueron lavadas cuidadosamente con agua corriente para eliminar el exceso de fijador y posteriormente se procedió a la deshidratación con alcohol etílico en concentraciones crecientes (80°, 96° y 100°) y en una solución 1:1 de alcohol absoluto-amerclar. Posteriormente se pasó a parafina a 56 °C, realizando la inclusión definitiva con parafina a 60 °C. Las inclusiones se cortaron a 5 µm aproximadamente en un micrótopo rotatorio American optical modelo 820. Los cortes fueron teñidos utilizando la técnica de hematoxilina-eosina y montados de manera definitiva con Cytoseal (Stephensen Scientific). Esta parte del experimento se realizó en las instalaciones del laboratorio de Histología perteneciente al CIBNOR, bajo la supervisión de la M.C. Carmen Rodríguez. Los cortes histológicos se observaron en un microscopio con los objetivos de 4X, 10X, 20X, 40X y 100X, para tratar de diferenciar las principales fases de desarrollo reportadas para la cabrilla arenosa. En cada gónada, se identificó el estadio de desarrollo más avanzado de los oocitos.

Análisis estadísticos.

Todos los porcentajes de supervivencia y triploidía fueron transformados con la función arco-seno de la raíz cuadrada (Sokal & Rohlf, 1998). Se verificó la normalidad y homogeneidad de varianzas. Se aplicó un ANDEVA en los experimentos en los cuales

se determinó que era el análisis más apropiado. De igual forma, se aplicó una prueba de Tukey, cuando las diferencias fueron significativas ($p < 0.05$ & $p < 0.1$). En los casos en los cuales no se observó una distribución normal, se aplicaron análisis no paramétricos de Kruskal-Wallis. Para los experimentos donde era necesario utilizar un análisis paramétrico que involucrará más de un factor, se empleó un modelo lineal general. Por último, un análisis de correlación fue utilizado para determinar la relación entre las variables independientes, proporción de divisiones anormales, eclosión y larvas vivas. Para llevar a cabo lo anterior se utilizó el programa STATISTICA 6.0.

Resultados

1) Mejorar el método de inducción a la triploidía.

1a) Porcentajes de triploidía y supervivencia aplicando el shock a los 5, 6, 7, 8, 9 y 10 minutos después de la fertilización (DF). Se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los diferentes tiempos de entrada al shock en frío. Sin embargo, los análisis *a posteriori* no permitieron identificar el mejor tiempo de entrada. Sin embargo, el tiempo de 5 minutos DF presentó los porcentajes de triploidía más altos en todos los desoves (Tabla 1). Conforme el momento de entrada al shock en frío se aplazó, se observó un decremento en el porcentaje de triploidía obtenido. De manera general, a partir de los 7 minutos después de la fertilización, no se presentaron larvas triploides, con excepción del primer desove. Se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) en la supervivencia de los grupos diploides y los grupos expuestos al shock en los diferentes tiempos de entrada al shock, siendo los diploides los que registraron la supervivencia más alta. Por último, en los grupos expuestos al shock, la supervivencia fue significativamente más alta ($P < 0.05$) a los 10 minutos de entrada al shock, comparado con los tiempos de entrada de 5 y 6 minutos.

1b) Variación en el porcentaje de triploidía obtenido en desoves individuales. Los porcentajes de triploidía obtenidos mostraron variación entre las siete hembras evaluadas (tabla 2). Sin embargo, no se presentaron diferencias significativas para el porcentaje de triploidía entre las hembras. En cuanto a la supervivencia, ésta fue significativamente más baja ($P < 0.05$) en los grupos expuestos al shock comparado con el control, solo en las hembras 6 y 7. Por último, se observó una correlación inversa entre los porcentajes de triploidía y supervivencia obtenidos ($R = - 0.56$).

Los resultados obtenidos para el primer factorial se encuentran contenidos en la tabla 3. Los porcentajes de triploidía y supervivencia obtenidos arrojaron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los diferentes machos utilizados.

Tabla 1. Porcentaje de triploidía y supervivencia obtenido a diferentes tiempos de inicio del shock en frío. T = porcentaje de triploidía, ST = supervivencia de los huevos expuestos al shock, SC = supervivencia del grupo control. (Promedio \pm E. Std.).

Desove	Tiempo de entrada al shock en frío						
		5	6	7	8	9	10
1	T	64 \pm 2.0	15 \pm 7.0	10.6 \pm 11.0	7 \pm 7.0	0	0
	ST	63 \pm 5.7	64 \pm 1.8	71 \pm 1.1	59 \pm 3.5	66 \pm 7.5	66 \pm 4.9
	SC	73 \pm 6.4	-	-	-	-	-
2	T	55 \pm 2.5	13.1 \pm 7.0	0	0	0	0
	ST	81 \pm 2.8	76 \pm 2.1	85 \pm 0.9	80 \pm 7.2	78 \pm 1.6	67 \pm 1.7
	SC	65 \pm 1.0	-	-	-	-	-
3	T	51 \pm 0.5	0	0	0	0	0
	ST	42 \pm 7.8	38 \pm 6.8	49 \pm 11.1	59 \pm 6.9	74 \pm 2.5	86 \pm 3.7
	SC	38 \pm 12.0	-	48 \pm 4.8	60 \pm 3.4	55 \pm 5.3	87 \pm 0.5
4	T	28 \pm 17.4	10 \pm 4.9	0	0	0	0
	ST	70 \pm 4.7	54 \pm 2.8	69 \pm 2.5	74 \pm 1.9	67 \pm 3.8	78 \pm 12.4
	SC	81 \pm 1.8	-	73 \pm 4.2	69 \pm 2.3	80 \pm 1.5	84 \pm 5.3
5	T	43 \pm 2.5	20 \pm 9.8	0	0	0	0
	ST	21 \pm 3.8	26 \pm 5.7	20 \pm 3.5	20 \pm 8.5	11 \pm 1.6	33 \pm 26.1
	SC	49 \pm 14.8	-	19 \pm 0.5	32 \pm 1.9	25 \pm 0.2	35 \pm 4.0
6	T	60 \pm 10.0	25 \pm 4.5	0	0	0	0
	ST	20 \pm 3.9	46 \pm 0.4	49 \pm 1.6	44 \pm 4.5	42 \pm 6.2	56 \pm 2.3
	SC	94 \pm 1.1	-	87 \pm 2.1	81 \pm 5.9	90 \pm 2.6	52 \pm 1.6
7	T	28 \pm 7.5	5 \pm 2.0	0	0	0	0
	ST	67 \pm 12.0	66 \pm 3.3	69 \pm 16.0	61 \pm 5.4	70 \pm 9.6	74 \pm 5.5
	SC	77 \pm 6.3	-	54 \pm 1.8	60 \pm 3.3	65 \pm 8.5	81 \pm 12.0
8	T	42.5 \pm 2.1	28 \pm 3.5	0	0	0	0
	ST	64 \pm 8.5	67 \pm 2.7	70 \pm 5.0	72 \pm 2.5	78 \pm 9.6	84 \pm 1.6
	SC	79 \pm 2.9	-	66 \pm 2.5	70 \pm 1.9	80 \pm 5.7	88 \pm 6.4

El macho 2 en su combinación con las tres hembras, fue el que arrojó los porcentajes más bajos de triploidía y supervivencia. Los porcentajes de triploidía fueron significativamente más altos ($P < 0.05$) en el macho 1 para las tres hembras. Sin embargo, la mayor supervivencia a la eclosión se observó en los desoves fecundados

por el macho 3. No se observaron diferencias significativas entre las tres hembras utilizadas. No se observó una interacción entre el efecto de los machos y hembras analizados. Los resultados de los análisis estadísticos de la supervivencia y triploidía se encuentran contenidos en las tablas 4 y 5 respectivamente.

Tabla 2. Porcentajes de triploidía y supervivencia a la eclosión (Promedio \pm E. Std) obtenidos en desoves individuales de cabrilla arenera.

Hembra	Supervivencia					Triploidía			
	Control	R ₁	R ₂	R ₃	Prom.	R ₁	R ₂	R ₃	Promedio
1	4.4 \pm 2.5 ^a	2.5	5.0	9.0	5.5 \pm 1.9 ^a	80	75	74	76.3 \pm 1.8
2	53.06 ^a	57.2	38.7	29.5	41.8 \pm 8.1 ^a	58	75	76	69.7 \pm 5.8
3	35.2 \pm 8.8 ^a	37.2	15.7	35.2	29.3 \pm 6.8 ^a	49	100	81	76.7 \pm 14.9
4	56.5 \pm 21.5 ^a	32.5	42.5	37.1	37.3 \pm 3 ^a	75	69	70	71.3 \pm 1.8
5	53.6 \pm 25.5 ^a	58.1	70.7	55.3	61.3 \pm 4.7 ^a	39	23	100	54 \pm 23.4
6	89.1 \pm 8.7 ^a	42.8	52.5	—	47.6 \pm 4.8 ^b	100	100	—	100
7	15.34 ^a	4.2	4.9	1.8	3.6 \pm 0.1 ^b	100	100	100	100

En cada renglón, las letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre el control y el grupo expuesto al shock. R = réplica

Tabla 3. Primer factorial. Porcentajes de supervivencia de las larvas expuestas al shock (ST), supervivencia de las larvas del grupo control (SC) y de triploidía (T) (Promedio \pm E. Std).

		ST	SC	T
Hembra 1	Macho 1	46.9 \pm 4.6 ^b	55.8 \pm 1.4	90 ^a
	Macho 2	13 \pm 2 ^c	31.6 \pm 13.4	27 ^c
	Macho 3	63 \pm 4.7 ^a	65 \pm 2.5	63 ^b
Hembra 2	Macho 1	41.2 \pm 2.9 ^b	33.2 \pm 2.9	94 ^a
	Macho 2	21.8 \pm 1.8 ^c	33.3 \pm 0.6	7 ^c
	Macho 3	76 \pm 6.4 ^a	66.7 \pm 8.9	63 ^b
Hembra 2	Macho 1	39.7 \pm 3.1 ^b	34.7 \pm 4.3	91 ^a
	Macho 2	19 \pm 3.5 ^c	34.2 \pm 7.8	14 ^c
	Macho 3	74.4 \pm 5 ^a	86.2 \pm 0.7	73 ^b

Para cada hembra y para las variables ST y T, las letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los machos.

Tabla 4. Primer factorial de los Porcentajes de supervivencia a la eclosión de los grupos expuestos al shock. Resultados obtenidos mediante el análisis de modelo general lineal. SS = suma de cuadrados; g.l = grados de libertad; MS = cuadrado medio; F = F de Fisher; p = nivel de significancia.

Efectos	Modelo Lineal				
	SS	g.l	MS	F	P
Hembra	0.01849	2	0.00924	0.01869	0.831148
Macho	4.42044	2	2.21022	44.6849	0.000000
Hembra*Macho	0.16766	4	0.04192	0.8474	0.513510
Error	0.89032	18	0.04946		

Tabla 5. Primer factorial de los porcentajes de triploidía. Resultados obtenidos mediante el análisis de modelo general lineal. SS = suma de cuadrados; g.l = grados de libertad; MS = cuadrado medio; F = F de Fisher; p = nivel de significancia.

Efectos	Modelo Lineal				
	SS	g.l	MS	F	P
Hembra	0.02215	2	0.01108	1.817	0.191009
Macho	1.49310	2	0.74655	122.503	0.000000
Hembra*Macho	0.046647	4	0.01162	1.907	0.153092
Error	0.10969	18	0.00609		

En el segundo factorial no se observaron efectos significativos en la supervivencia en ninguna de las combinaciones producidas entre los tres machos y tres hembras utilizados (Tabla 4). Sin embargo, los porcentajes de triploidía observados en la hembra 1 fueron significativamente más bajos ($P < 0.05$) que en la hembra 3. Al igual que en caso del primer factorial, no se observó interacción entre los efectos de las hembras y machos analizados. Los resultados de los análisis estadísticos de la supervivencia y triploidía se encuentran contenidos en la tabla 7 y 8 respectivamente.

Tabla 6. Segundo factorial. Porcentajes de supervivencia de las larvas expuestas al shock (ST) supervivencia de las larvas del grupo control (SC), y de triploidía (T). (Promedio \pm E. Std).

		ST	SC	T
Hembra 1	<i>Macho 1</i>	71.4 \pm 1.3 ^a	74.5 \pm 4.9	60 ^b
	<i>Macho 2</i>	67.6 \pm 4.5 ^a	78.3 \pm 2.4	60 ^b
	<i>Macho 3</i>	70.3 \pm 2.6 ^a	73.4 \pm 0.5	56 ^b
Hembra 2	<i>Macho 1</i>	71.2 \pm 3.3 ^a	64.2 \pm 5.1	63 ^{ab}
	<i>Macho 2</i>	66.4 \pm 0.9 ^a	70.6 \pm 5.8	62 ^{ab}
	<i>Macho 3</i>	65 \pm 5.2 ^a	79.7 \pm 2.3	69 ^{ab}
Hembra 3	<i>Macho 1</i>	68.3 \pm 2.3 ^a	68.9 \pm 1.4	64 ^a
	<i>Macho 2</i>	68.4 \pm 5 ^a	69.8 \pm 4.1	85 ^a
	<i>Macho 3</i>	66.9 \pm 2.2 ^a	68.4 \pm 1.2	76 ^a

Para cada hembra y para las variables ST y T, las letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los machos.

Tabla 7. Segundo factorial de los porcentajes de supervivencia a la eclosión de los grupos expuestos al shock. Resultados obtenidos mediante el análisis de modelo general lineal. SS = suma de cuadrados; g.l = grados de libertad; MS = cuadrado medio; F = F de Fisher; p = nivel de significancia.

Efectos	Modelo Lineal				
	SS	g.l	MS	F	P
Hembra	0.00613	2	0.00306	0.793	0.467613
Macho	0.01014	2	0.00507	1.312	0.293748
Hembra*Macho	0.00335	4	0.00084	0.217	0.925503
Error	0.06951	18	0.00386		

Tabla 8. Segundo factorial de los porcentajes de triploidía. Resultados obtenidos mediante el análisis de modelo general lineal. SS = suma de cuadrados; g.l = grados de libertad; MS = cuadrado medio; F = F de Fisher; p = nivel de significancia.

Efectos	Modelo Lineal				
	SS	g.l	MS	F	P
Hembra	0.12169	2	0.06084	5.070	0.017933
Macho	0.04445	2	0.02222	1.852	0.185662
Hembra*Macho	0.10848	4	0.02712	2.260	0.102947
Error	0.21603	18	0.01200		

1c) Métodos de verificación de triploidía. De los 30 individuos analizados, solo 10 fueron identificados como triploides por el análisis de eritrocitos. La longitud del eje mayor fue de $5.36 \pm 0.04 \mu\text{m}$ (Promedio \pm E. Std.) en los diploides y de $6.76 \pm 0.1 \mu\text{m}$ en los triploides mientras que la longitud del eje menor fue de $3.41 \pm 0.03 \mu\text{m}$ y $3.96 \pm 0.1 \mu\text{m}$, respectivamente (Fig. 1a,b). El nivel de ploidía fue confirmado por medio de citometría de flujo para cada individuo. El porcentaje de eficacia para una correcta clasificación fue de 100% para el eje mayor, mientras que para el eje menor fue de solo un 80%. Los rangos de distribución para el eje mayor y eje menor de diploides y triploides se encuentran contenidos en la figura 2.

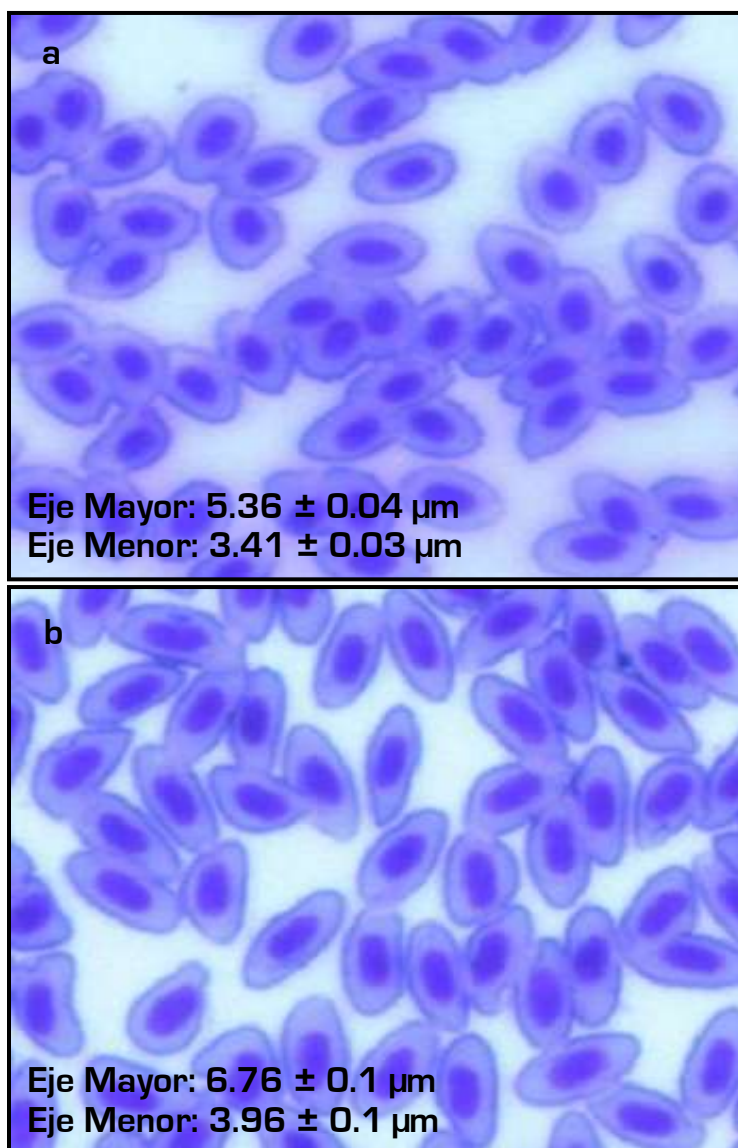


Figura 1. Fotografía de eritrocitos ($\mu\text{m} \pm \text{E.Std.}$). a) diploides, b) triploides. Aumento 10X.

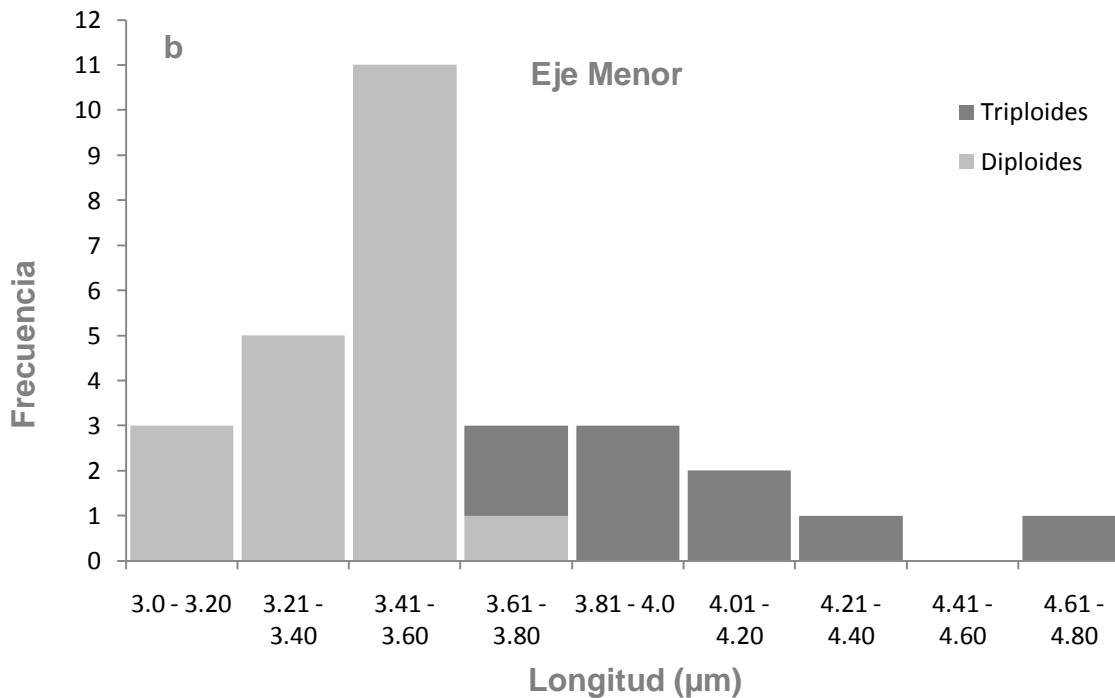
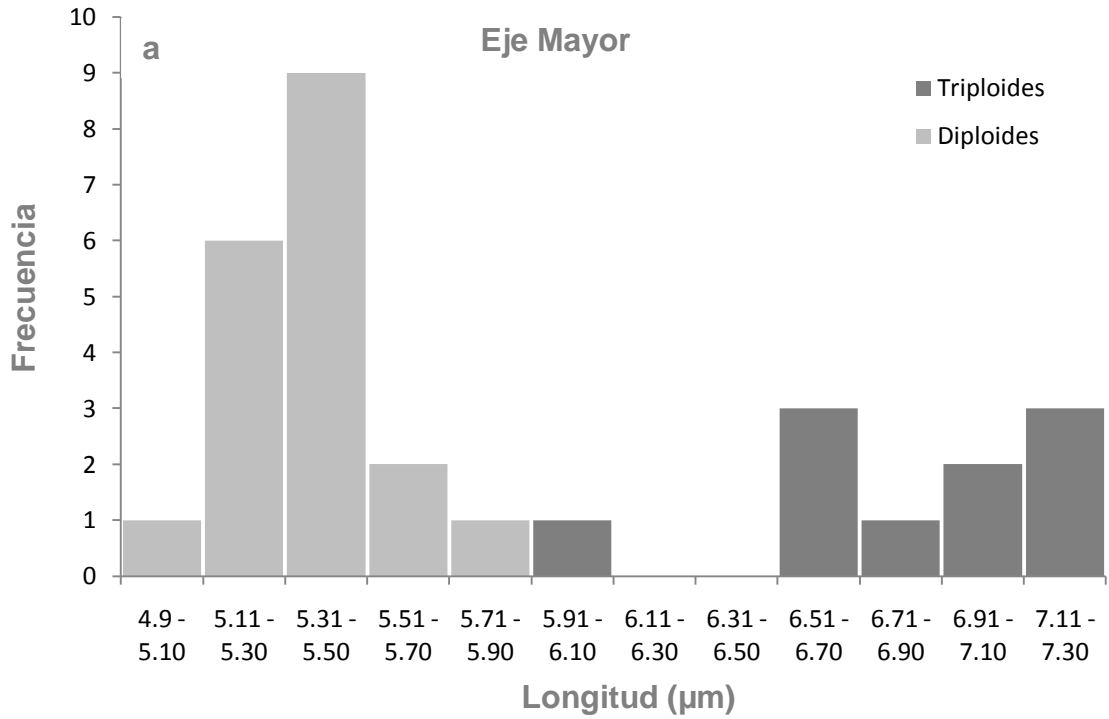


Figura 2. Rangos de distribución del eje mayor (a) y el eje menor (b) en μm de eritrocitos diploides y triploides de cabrilla arenera.

2) *Evaluar los efectos de la inducción a la triploidía en las etapas embrionaria y larvaria, y comparar con los diploides.*

2a) Velocidad del desarrollo embrionario. La tabla 9 muestra los tiempos de inicio de los principales estadios del desarrollo embrionario en diploides y triploides de cabrilla arenera. De manera general fue posible observar un retraso en la aparición de las diferentes etapas de desarrollo en los embriones expuestos al shock en comparación con los diploides. Este retraso es más marcado durante las etapas iniciales del desarrollo embrionario y disminuye conforme avanza el desarrollo. Sin embargo, la eclosión de los huevos expuestos al shock muestra un retraso de aproximadamente una hora con respecto a los diploides.

Tabla 9. Tiempo transcurrido (horas:minutos) entre la fecundación y la aparición de las principales etapas del desarrollo embrionario en organismos diploides y expuestos al shock de cabrilla arenera.

Estadio	Control	Expuesto al Shock
	<i>Desove 1</i>	
	Tiempo	Tiempo
<i>Blástula tardía</i>	04:33	06:16
<i>Gástrula</i>	06:18	07:36
<i>Neurulación</i>	08:49	08:52
<i>Melanóforos</i>	13:43	13:48
<i>Aleta caudal</i>	15:46	15:58
<i>100% eclosión</i>	22:39	23:43
	<i>Desove 2</i>	
<i>Blástula tardía</i>	04:36	05:40
<i>Gástrula</i>	05:46	07:27
<i>Neurulación</i>	09:04	08:51
<i>Vesícula óptica</i>	10:56	11:01
<i>Melanóforos</i>	13:40	13:46
<i>Aleta caudal</i>	15:52	16:00
<i>100% eclosión</i>	22:42	23:30

2b) Divisiones anormales, eclosión y larvas vivas en individuos diploides y expuestos a shock en frío de cabrilla arenera. En ambas temporadas, el porcentaje de

eclosión y la proporción de larvas vivas fue significativamente menor ($P < 0.05$) en el grupo expuesto al shock comparado con el grupo control, mientras que la proporción de divisiones anormales fue significativamente más alta ($P < 0.05$) en los huevos expuestos al shock (Tabla 10). No se observaron diferencias significativas entre ambas temporadas para ninguna de las variables analizadas, excepto para el porcentaje de divisiones anormales, el cual fue significativamente más alto ($P < 0.05$) en la primera temporada comparado con la segunda temporada (Tabla 10).

Se registraron dos correlaciones lineales negativas entre el porcentaje de divisiones anormales y la supervivencia a la eclosión ($R = - 0.63$), y entre el porcentaje de divisiones anormales y la proporción de larvas vivas ($R = - 0.58$). Sin embargo, el porcentaje de triploidía no mostró ninguna relación con los porcentajes finales de divisiones anormales, eclosión o larvas vivas (Tabla 10).

Tabla 10. Porcentajes de divisiones anormales, eclosión y larvas vivas (Promedio \pm E. Std.) obtenidos en el grupo control y expuesto al shock durante las temporadas de 2008 y 2009 en desoves de cabrilla arenera.

Temporada	Desoves (n)	Tratamiento	<i>División anormal</i>	<i>Eclosión</i>	<i>Larvas vivas</i>	<i>Triploidía</i>
2008	7	Control	24.6 \pm 1.0 ^a	76.8 \pm 5.8 ^a	87.5 \pm 3.5 ^a	-
		Expuesto al shock	45.7 \pm 2.1 ^b	37.7 \pm 2.5 ^b	70.4 \pm 6.6 ^b	78 \pm 6.3 ^a
2009	6	Control	16.4 \pm 1.6 ^c	75.1 \pm 3.8 ^a	92.2 \pm 1.9 ^a	-
		Expuesto al shock	34.2 \pm 4.2 ^d	57.5 \pm 7.8 ^c	67.63 \pm 6.5 ^b	50 \pm 5.3 ^b
Promedio 2008			35.2 \pm 3.1 ^a	57.3 \pm 5.6 ^a	78.9 \pm 2.4 ^a	
Promedio 2009			25.3 \pm 3.4 ^b	66.3 \pm 6.6 ^a	79.9 \pm 3.1 ^a	

Para cada variable y cada temporada, las letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre el grupo control y el grupo expuesto al shock en los porcentajes de divisiones anormales, eclosión y larvas vivas obtenidos.

Se presentaron diferencias significativas en los porcentajes de eclosión y en la proporción de larvas vivas entre los huevos divididos normalmente y los que presentaron anomalías en las divisiones ($P < 0.05$). Los embriones con división anormal mostraron un porcentaje de eclosión y una proporción de larvas vivas significativamente menores ($P < 0.05$) que los embriones con divisiones normales (Tabla 11). Además los embriones anormales del grupo expuesto al shock presentaron porcentajes significativamente menores ($P < 0.05$) de eclosión y larvas vivas

comparado con los embriones anormales del grupo control. En cuanto al grupo control, no se observaron diferencias significativas entre los embriones normales y anormales en el porcentaje de eclosión. Sin embargo, la proporción de larvas vivas fue significativamente más alta ($P < 0.05$) en los huevos normales (Tabla 11).

Tabla 11. Porcentajes de eclosión y larvas vivas (Promedio \pm E. Std.) obtenidos en embriones normales y anormales de cabrilla arenera.

	<i>Eclosión</i>	<i>Larvas Vivas</i>
Control		
Anormales	95.3 \pm 3 ^a	78.5 \pm 6.2 ^b
Normales	98.8 \pm 0.8 ^a	93.3 \pm 1.5 ^a
Expuestos al Shock		
Anormales	43.9 \pm 12.3 ^b	54.5 \pm 10 ^d
Normales	83.9 \pm 5.1 ^c	73.5 \pm 5.5 ^c

En cada columna, las letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

2c) Porcentaje de supervivencia a la eclosión y a las 24 horas posteriores en larvas diploides y expuestas al shock en frío. Los grupos expuestos al shock mostraron de manera general porcentajes de supervivencia menores comparado con los grupos diploides. En los experimentos en los cuales se evaluó la supervivencia solo a la eclosión, esta reducción fue significativamente menor ($P < 0.1$) solo para los experimentos 2, 4 y 5 (Fig. 3a). En experimentos en los que se evaluó tanto la supervivencia a la eclosión como a las 24 después de la eclosión, se detectaron diferencias significativas ($P < 0.1$) solo en el octavo experimento donde, la supervivencia de los grupos expuestos al shock fue menor tanto a la eclosión como a las 24 horas posteriores. En este mismo experimento, la supervivencia a la eclosión fue significativamente más alta ($P < 0.1$) en el grupo diploide y expuesto al shock comparada con la supervivencia obtenida a las 24 horas después de la eclosión. En el séptimo experimento, la supervivencia del grupo expuesto al shock fue significativamente menor ($P < 0.1$) tanto a la eclosión como a las 24 horas posteriores comparado con la de los diploides a la eclosión (Fig. 3b). Los porcentajes de triploidía

obtenidos a la eclosión para cada experimento, se muestran al lado de la columna de supervivencia.

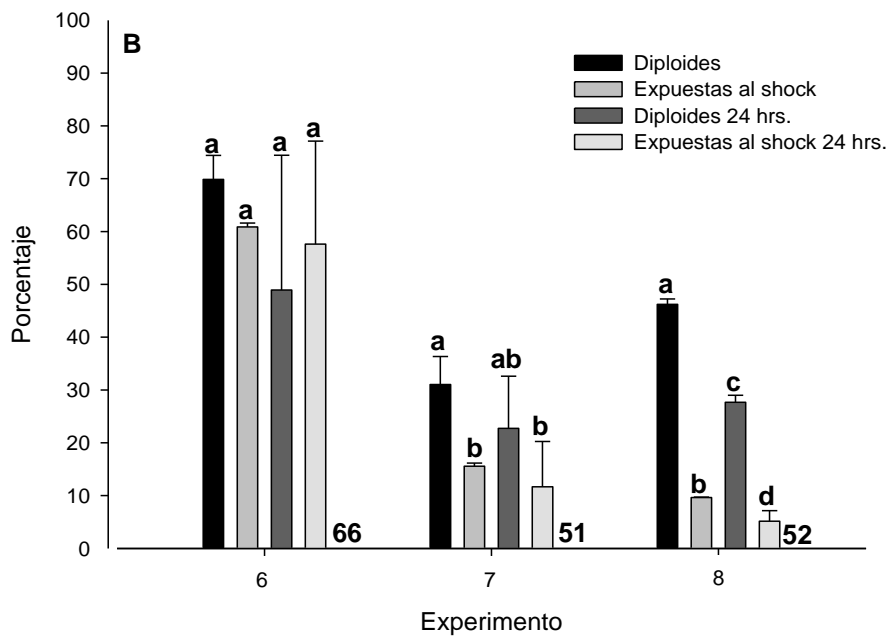
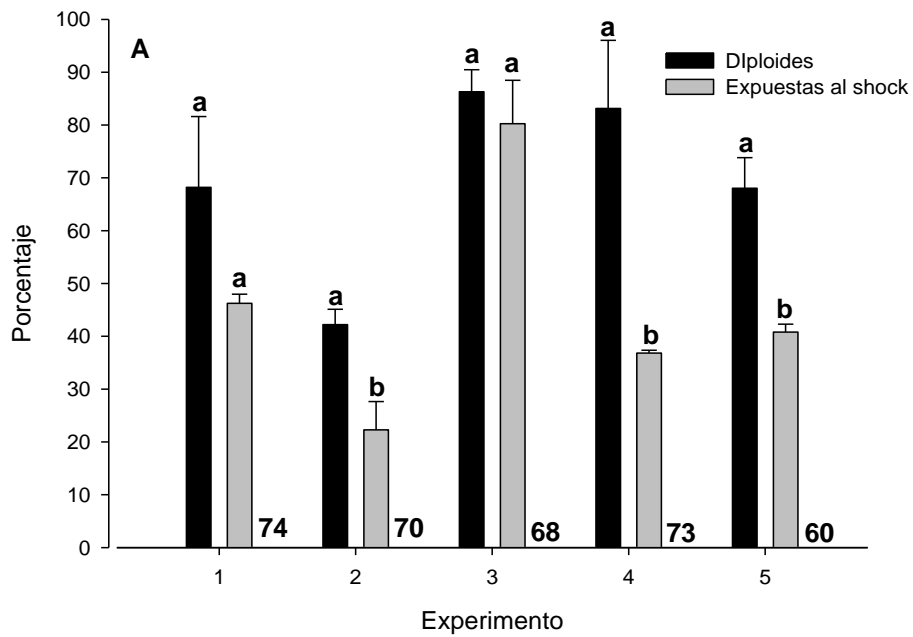


Figura 3. A) Supervivencia a la eclosión en los grupos control y expuestas al shock (ES) por experimento (Promedio \pm Desv. Std.). B) Supervivencia a la eclosión y a las 24 horas después de la eclosión por experimento. En cada experimento, las letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$). Los números indican el porcentaje de triploidía obtenidos en cada experimento.

2d) Seguimiento de los porcentajes de triploidía durante la crianza larvaria y hasta 30 días de edad. En los siete desoves analizados durante las temporadas 2008 y 2009, fue posible observar un decremento significativo ($P < 0.05$) de los porcentajes de triploidía durante el periodo larvario. Para la temporada 2008, este decremento fue significativo ($P < 0.05$) al comparar los porcentajes obtenidos a la eclosión, con aquellos obtenidos a los 15 días de cultivo (Tabla 12). Adicionalmente, los porcentajes obtenidos después de la primera alimentación (DPA) fueron significativamente más altos ($P < 0.05$) que a los 15 y 30 días de cultivo. Mientras que para la temporada 2009, los porcentajes de triploidía a la primera alimentación fueron significativamente menores ($P < 0.05$) a los observados a la eclosión. Este decremento fue también significativamente más bajo ($P < 0.05$) que a los 15 y a los 30 días de cultivo (Tabla 13). Por último, en ambas temporadas se presentaron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los diferentes desoves en las diferentes etapas analizadas

El descenso en el porcentaje de triploidía se observó independientemente de la densidad utilizada. Sin embargo, fue posible observar que el segundo desove (03/04/08) de la temporada 2008, el cual tiene la densidad de siembra más baja, presentó el porcentaje final de triploidía más alto, mientras que el segundo desove (14/04/09) de la temporada 2009 que presentó la densidad de siembra más alta, registró el porcentaje de triploidía más bajo al final del cultivo.

Tabla 12. Porcentajes de triploidía obtenidos en desoves mixtos de cabrilla arenera durante los diferentes muestreos del periodo larvario de la temporada 2008.

Desove				
Fecha	02/04/08	03/04/08	04/04/08	05/04/08
Densidad de cultivo	22 L/l	16 L/l	37 L/l	24 L/l
% 3n a eclosión	75 ^a	80 ^a	63 ^a	78 ^a
% 3n DPA*	73 ^{ab}	53 ^{ab}	48 ^{ab}	51 ^{ab}
% 3n 15 dde**	43 ^{bc}	47 ^{bc}	40 ^{bc}	27 ^{bc}
% 3n 30 dde	13 ^c	36 ^c	20 ^c	22 ^c

*DPA = después de primera alimentación, **dde = días después de la eclosión. En cada columna, las letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

Tabla 13. Porcentajes de triploidía obtenidos en desoves individuales de cabrilla arenera durante los diferentes muestreos del periodo larvario de la temporada 2009.

Desove			
Fecha	14/04/09	14/04/09	18/04/09
Densidad	29 L/l	70 L/l	35 L/l
% 3n a eclosión	62 ^a	54 ^a	77 ^a
% 3n DPA	45 ^b	41 ^b	55 ^b
% 3n 15 dde	26 ^c	19 ^c	43 ^c
% 3n 30 dde	14 ^d	10 ^d	28 ^d

En cada columna, las letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$)

2e) Crecimiento de diploides y triploides durante la crianza larvaria y hasta 30 días de edad. Los datos de crecimiento obtenidos de la temporada Febrero-Mayo 2008 se encuentran contenidos en la tabla 14. A los 15 días de cultivo se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) solamente entre las larvas diploides del control y las larvas triploides del primer desove. Las larvas diploides ES no mostraron diferencias significativas comparadas con los diploides-control y con los triploides. En contraste, para el final del cultivo fue posible observar diferencias significativas ($P < 0.05$) en los tres desoves analizados. En el primer (03/04/08) y tercer desove (05/04/08) los valores más altos de longitud patrón correspondieron a las larvas triploides y a las larvas diploides ES. No se observaron diferencias significativas entre larvas triploides y diploides ES. Mientras que en el segundo desove (04/04/08) las larvas diploides ES mostraron los valores de longitud patrón significativamente más altos ($P < 0.05$) que los triploides y diploides-control.

Para la temporada 2009 (Tabla 15) no se registraron diferencias significativas en la longitud patrón a los 15 días de cultivo para ninguno de los tres desoves analizados. En contraste, a los 30 días de cultivo, las larvas diploides ES mostraron los valores significativamente más altos ($P < 0.05$) en el primer (14/04/09a) y segundo desove (14/04/09b). No se observaron diferencias significativas entre las larvas diploides-control y triploides para ninguno de los tres desoves analizados.

Tabla 14. Valores de longitud patrón (Promedio \pm E. Std.) obtenidos en la temporada 2008 en larvas diploides (2n) y triploides (3n) de cabrilla arenera. LP = Longitud patrón. L/l = Larvas por litro.

	Desove								
Fecha	03/04/2008			04/04/2008			05/04/2008		
Ploidía	2n	3n	2n*	2n	3n	2n*	2n	3n	2n*
Densidad	42 L/l	16 L/l	16 L/l	22 L/l	37 L/l	37 L/l	32 L/l	24 L/l	24 L/l
LP 15 dde (mm)	4.8 \pm 0.07 ^a	5.4 \pm 0.2 ^b	5 \pm 0.3 ^{ab}	5.3 \pm 0.07 ^a	5.2 \pm 0.1 ^a	5.3 \pm 0.3 ^a	5.1 \pm 0.1 ^a	5.5 \pm 0.2 ^a	5.3 \pm 0.3 ^a
LP 30 dde (mm)	10.2 \pm 0.2 ^a	17.1 \pm 0.4 ^b	18.1 \pm 0.3 ^b	17.0 \pm 0.6 ^a	16.0 \pm 0.7 ^a	19.5 \pm 0.6 ^b	15.5 \pm 1.7 ^a	21.9 \pm 1 ^b	20.5 \pm 0.7 ^b

* Larvas diploides expuestas al shock. dde = Días de edad. Para cada desove, las letras diferentes en cada renglón indican diferencias significativas ($P < 0.05$)

Tabla 15. Valores de longitud patrón (Promedio \pm E. Std.) obtenidos en la temporada 2009 en larvas diploides (2n) y triploides (3n) de cabrilla arenera. LP = Longitud patrón. L/l = Larvas por litro.

	Desove								
Fecha	14/04/2009a			14/04/2009b			15/04/2009		
Ploidía	2n	3n	2n*	2n	3n	2n*	2n	3n	2n*
Densidad	29 L/l	29 L/l	29 L/l	70 L/l	70 L/l	70 L/l	35 L/l	35 L/l	35 L/l
LP 15 dde (mm)	5.6 \pm 0.1 ^a	5.5 \pm 0.1 ^a	5.5 \pm 0.1 ^a	5.2 \pm 0.1 ^a	5.1 \pm 0.1 ^a	5.3 \pm 0.1 ^a	5.5 \pm 0.1 ^a	5.5 \pm 0.2 ^a	5.6 \pm 0.2 ^a
LP 30 dde (mm)	24.8 \pm 0.9 ^{ab}	21.7 \pm 0.8 ^a	26.6 \pm 0.8 ^b	19.9 \pm 0.7 ^a	18.6 \pm 1 ^a	23.1 \pm 0.7 ^b	22.8 \pm 0.8 ^a	22.3 \pm 0.9 ^a	24.2 \pm 0.8 ^a

* Larvas diploides expuestas al shock. dde = Días de edad. Para cada desove, las letras diferentes en cada renglón indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

3) *Evaluar los efectos de la triploidía en las etapas juvenil y adulta, y comparar con los individuos diploides.*

3a) Crecimiento y supervivencia durante el periodo de pre-engorda. Se contó con un desove mixto proveniente de 12 hembras y 4 machos. Los resultados obtenidos se encuentran contenidos en la tabla 16. El porcentaje de triploidía a la eclosión fue de 90%. Sin embargo, la revisión del nivel de ploidía de todos los juveniles cultivados a los ocho meses, reveló una reducción importante del porcentaje de triploidía. El mayor crecimiento (peso y longitud patrón) se observó tanto en los diploides expuestos al shock como en los triploides, seguidos por los diploides del control. Sin embargo, no se detectaron diferencias significativas tanto en el peso como en la longitud patrón final entre ninguno de los tres grupos. Por último, es interesante observar que el mayor crecimiento de los juveniles triploides se presentó en la réplica en la cual se obtuvo el porcentaje más bajo de triploidía (12%), mientras que el menor crecimiento se registró en la réplica con el mayor porcentaje de triploidía (24%). Los resultados del ANOVA realizado se encuentran contenidos en la Tabla 17.

3b) Evaluación de la madurez gonádica. Los resultados obtenidos sobre la madurez gonádica se encuentran contenidos en la tabla 18. No se observaron diferencias significativas en el peso o bien en la longitud patrón entre diploides y triploides. Sin embargo, el peso de la gónada y particularmente, el índice gonadosomático de los organismos triploides fueron significativamente menores ($P < 0.05$) comparados con el de organismos diploides. Otra observación interesante fue el cambio en la proporción de sexos observada entre ambos tipos de ploidía. En los individuos diploides se presentó una mayor proporción de hembras, mientras que en los individuos triploides se presentó una mayor proporción de machos. El número total de individuos por nivel de ploidía se encuentra contenido en la figura 4.

Tabla 16. Peso (g) (P), longitud patrón (cm) (LP) y porcentaje de triploidía final (T) obtenidos a 8 meses de cultivo en las replicas de juveniles diploides control, diploides expuestos al shock (ES) y triploides. (Promedio \pm E. Std.). REP = replica.

REP	Tratamiento						T
	Diploides		Diploides ES		Triploides		
	P	LP	P	LP	P	LP	
1	36.4 \pm 2.6	10.8 \pm 0.2	56.0 \pm 7.3	11.9 \pm 0.3	39.0 \pm 4.5	11.1 \pm 0.3	24
2	41.1 \pm 3.0	11.1 \pm 0.2	50.0 \pm 4.0	11.7 \pm 0.2	47.9 \pm 11.7	11.6 \pm 0.7	15
3	30.0 \pm 1.6	10.6 \pm 0.3	59.0 \pm 5.6	12.2 \pm 0.3	88.6 \pm 12.9	14.1 \pm 0.5	12

Tabla 17. Medias del ANOVA obtenidas para el Peso (P) y la Longitud patrón (LP). Intervalo de confianza del 95%. (Media \pm Intervalo de confianza, mínimo – máximo)

	Tratamiento		
	Diploides	Diploides ES	Triploides
P	35.8 \pm 13.1 – 58.5	51.6 \pm 29.0 – 74.3	58.5 \pm 35.7 – 81.2
LP	10.8 \pm 9.5 – 12.2	11.9 \pm 10.6 – 13.3	12.3 \pm 10.9 – 13.6

Tabla 18. Valores obtenidos para peso (g) (P), longitud patrón (cm) (LP), peso de la gónada (g) (PG), índice gonadosomático (IG) y proporción de sexos (PS) en diploides y triploides de cabrilla arenera.

Ploidía	P	LP	PG	IG	PS
Diploides	46.8 \pm 3.4 ^a	11.5 \pm 0.3 ^a	1.6 \pm 0.05 ^a	3.6 \pm 0.4 ^a	2.8 H - 1 M
Triploides	39.8 \pm 4.2 ^a	10.9 \pm 0.3 ^a	0.2 \pm 0.03 ^b	0.5 \pm 0.1 ^b	1H - 7.6 M

* Valor promedio \pm error estándar. H = hembra, M= macho. Para cada columna, las letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

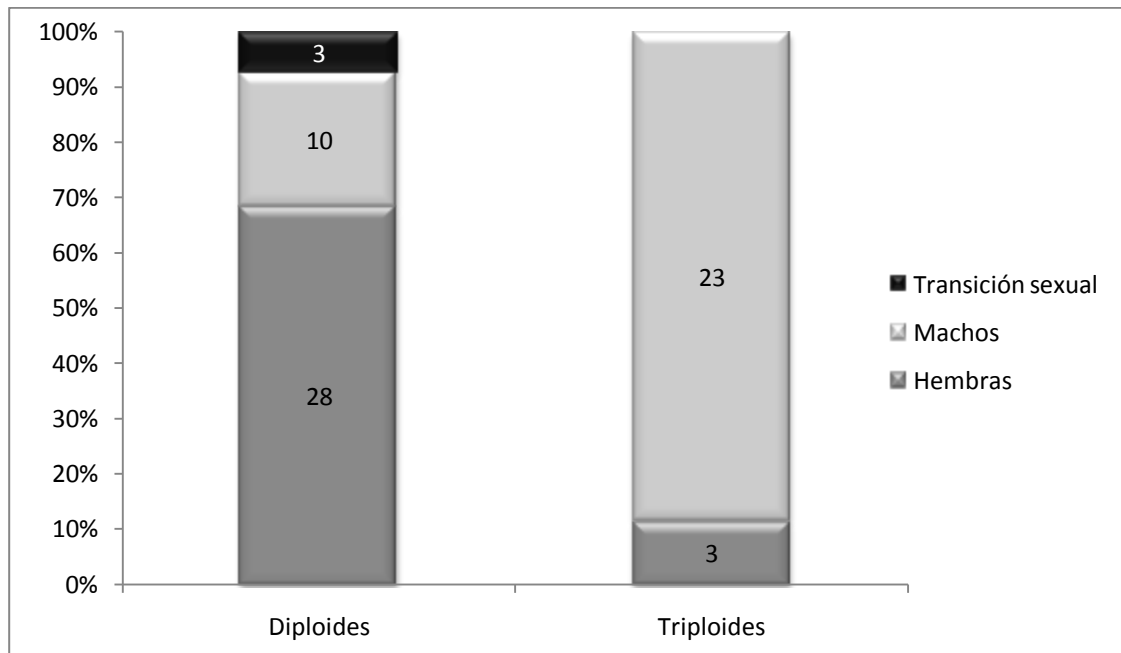


Figura 4. Porcentajes y número total de hembras, machos e individuos en transición sexual, observados en diploides y triploides de cabrilla arenera.

Cortes histológicos.

En total, de las 71 gónadas disponibles, se analizaron 67 gónadas, 41 diploides (10 machos y 28 hembras) y 26 triploides (23 machos y 3 hembras).

Hembras diploides.

En todas las gónadas se pudieron observar oocitos en todos los estadios de desarrollo. Sin embargo, el estadio de desarrollo más avanzado en 93% de las gónadas analizadas fue la etapa de vitelogénesis avanzada. También fue posible observar oocitos en proceso de hidratación y oocitos atrésicos (Fig. 5).

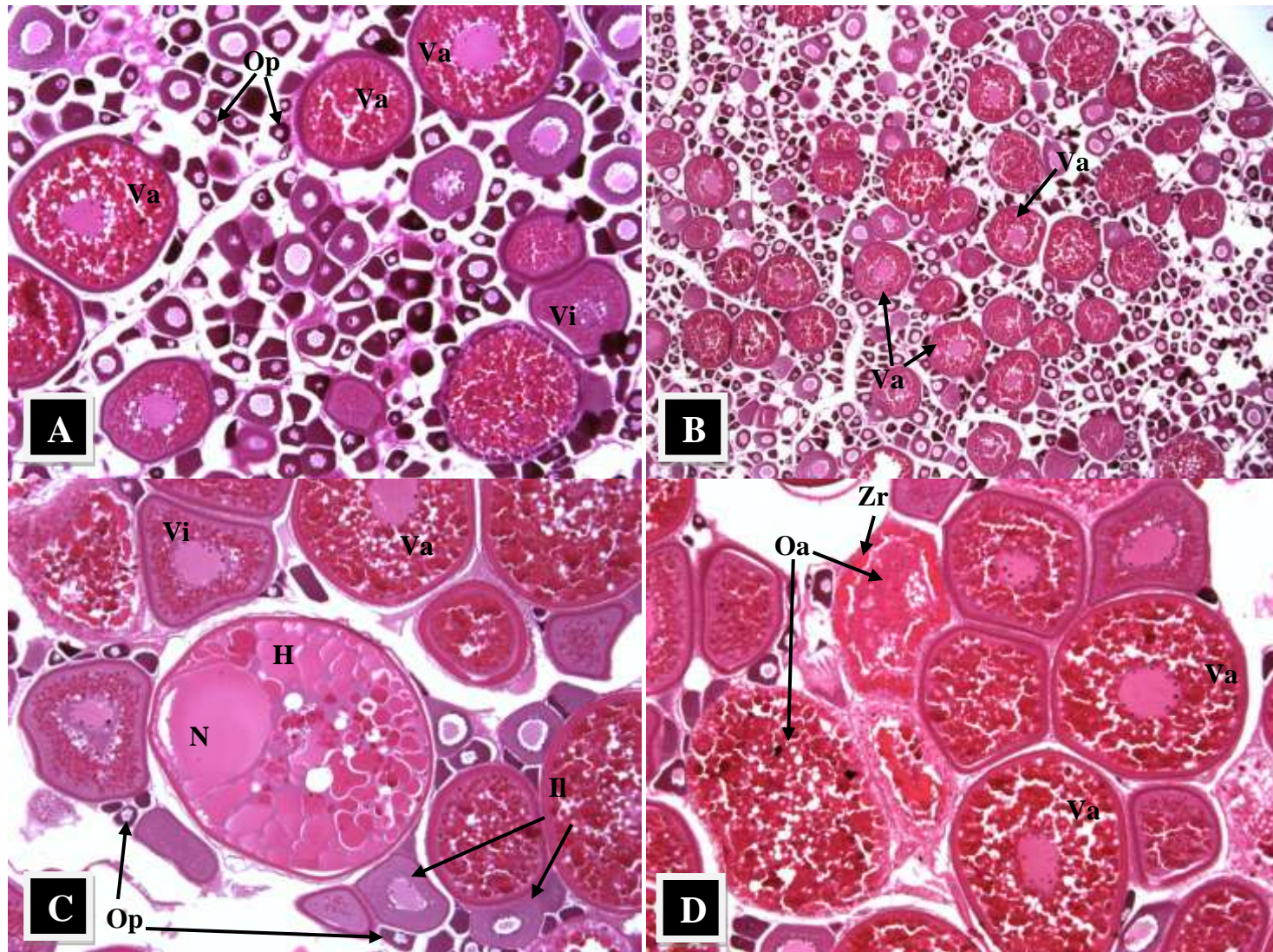


Figura 5. Micrografía del ovario de *Parabrax maculatofasciatus* diploide. A) Se observan oocitos perinucleolares (Op), y Vitelogénicos avanzados(Va). 10X. B) Se observan varios oocitos en vitelogénesis avanzada(Va), 10X.C) es posible observar oocitos en diferentes estadios de vitelogénesis ; Vitelogénesis inicial (Vi); Vitelogénesis avanzada (Va), y oocitos perinucleolares (Op), oocito en estadio de hidratación (H), se observa la migración del núcleo hacia el polo animal (N), 20X. D) Oocitos vitelogénicos en diferentes grados de atresia (Oa) en los cuales no se observa el núcleo, pero si la zona radiata con un aspecto discontinuo (Zr), oocitos vitelogénicos avanzados (Va). 10X. Técnica de Hematoxilina-Eosina.

Hembras triploides.

Las gónadas de las únicas tres hembras triploides encontradas y analizadas estaban formadas en su mayor parte de oocitos en fase perinúcleolar de diferente tamaño y de forma ovoide. Se observaron también en número pequeño oocitos en inclusiones lipídicas. (Fig. 6A, B). En las tres hembras analizadas, la etapa de desarrollo más avanzada vitelogénesis inicial (Fig. 6C,D).

Machos diploides

Las gónadas mostraron gametos en todas las etapas de desarrollo. El estadio más avanzado alcanzado fue el de espermatozoide. Asimismo se observaron células de Sértoli distribuidas en la periferia y en la unión de las lámelas, alrededor de grupos más grandes de espermatocitos primarios y secundarios, así como espermatides. En algunas gónadas se observaron también espermatozoides distribuidos en la parte interna, cerca de conductos espermáticos y en la periferia de la gónada (Fig. 7A,B).

Machos triploides.

La fase más avanzada encontrada correspondió a la de espermatocito secundario. En general, se observaron espermatocitos primarios ocupando junto con secundarios la totalidad del epitelio gonadal. Las células de Sértoli y las espermatogonias se observaron en pequeños números en la periferia y en la unión de las lámelas, así como de manera aislada rodeadas por un gran número de espermatocitos primarios y secundarios (Fig. 7C,D).

Organismos en transición sexual.

En total se identificaron tres individuos en diferentes estadios de transición sexual dentro de los diploides. La determinación se realizó identificando la presencia de tejido ovárico en particular oocitos en alveolo perinúcleolares y testicular incluyendo células de Sértoli, espermatogonias y espermatocitos primarios (Fig. 8).

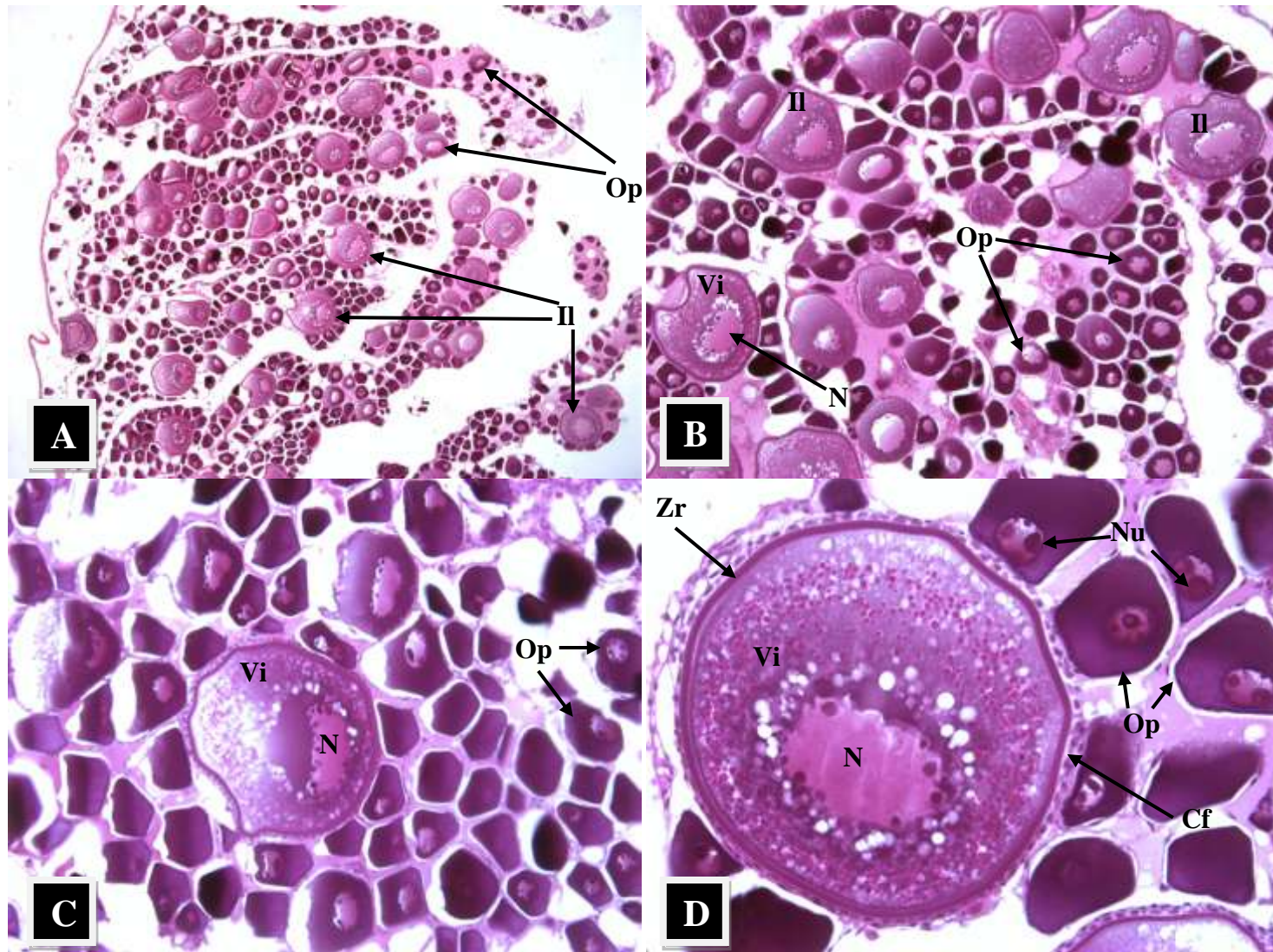


Figura 6. Micrografía del ovario de *Paralabrax maculatofasciatus* triploide. A) oocitos en estadio perinúcleolar (Op) ocupan la mayor parte del tejido ovarico, se observan también oocitos en inclusiones lipídicas (II). 4X. B) Se observa una porción del tejido ovárico con oocitos en estadio perinúcleolar (Op), Oocitos en inclusiones lipídicas (II) y Oocitos en vitelogénesis inicial (Vi), se aprecia el núcleo (N). 10x. C) Grupo de oocitos perinúcleolares (Op), oocito en vitelogénesis inicial (Vi), núcleo (N). 20X. D) Oocito en vitelogénesis inicial (Vi), núcleo (N), Células foliculares (Cf), oocitos perinúcleolares (Op), se pueden observar los nucléolos dentro del núcleo de los oocitos perinúcleolares (Nu), Zona radiata (Zr) 40X. Técnica de Hematoxilina-Eosina.

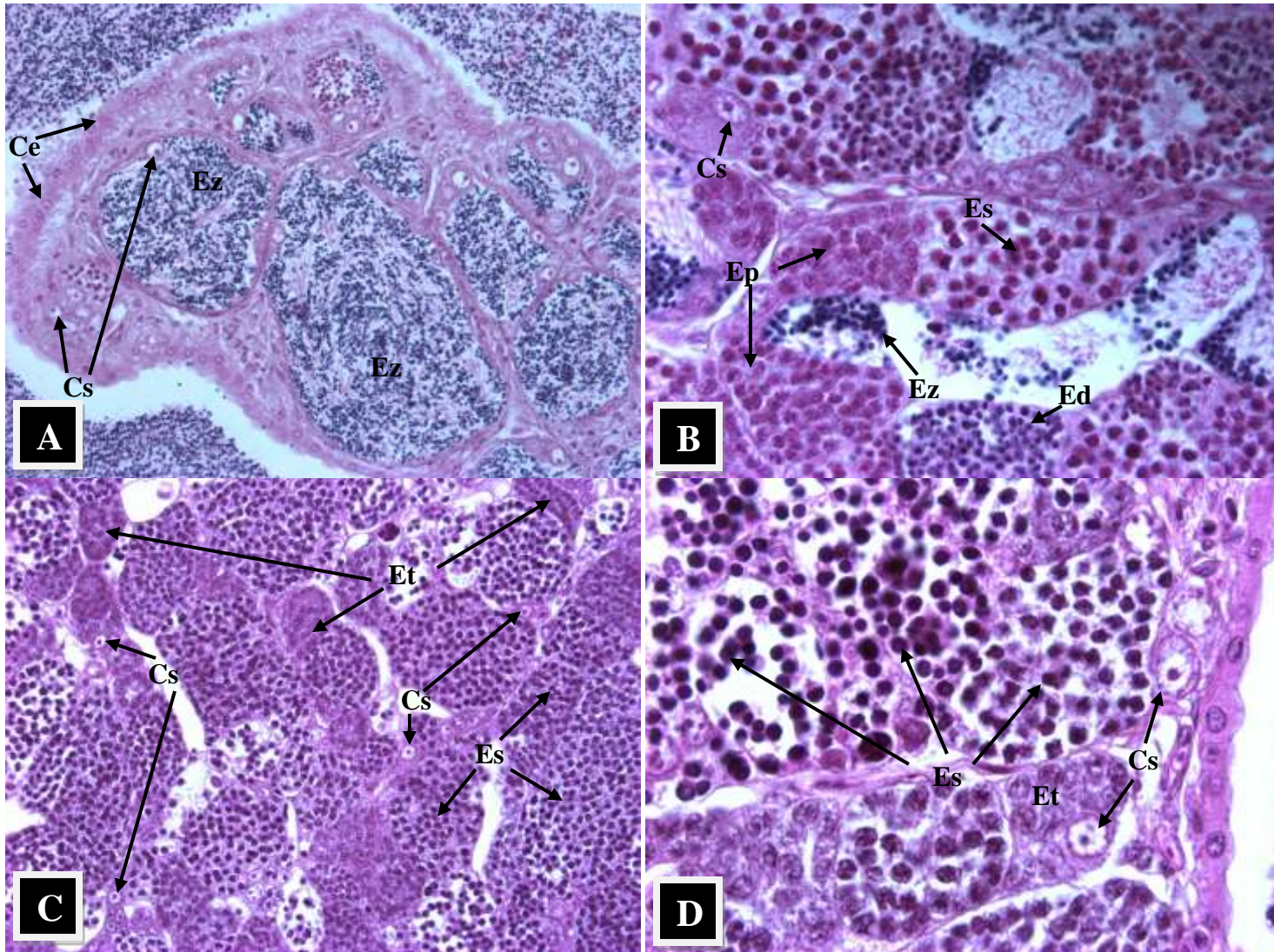


Figura 7. Micrografía del testículo de *Paralabrax maculatofasciatus*; Diploide, A) Epitelio cúbico que compone las lámelas (Ce), espermatozoides en el interior de túbulos seminíferos (Ez). 40X. B)) grupo de espermatocitos primarios (Ep), espermatocitos secundarios (Es), espermatidas (Ed), grupos de espermatozoides con su cola distintiva en el centro de los túbulos seminíferos (Ez), Células de Sertoli(Cs). 100X. Triploide C) Espermatogonias (Et), Espermatocitos primarios (Ep) y secundarios (Es) ocupando el total de la gónada. 40X. D) Espermatogonias (Et), espermatocitos secundarios (Es). 100X. Técnica de Hematoxilina-Eosina.

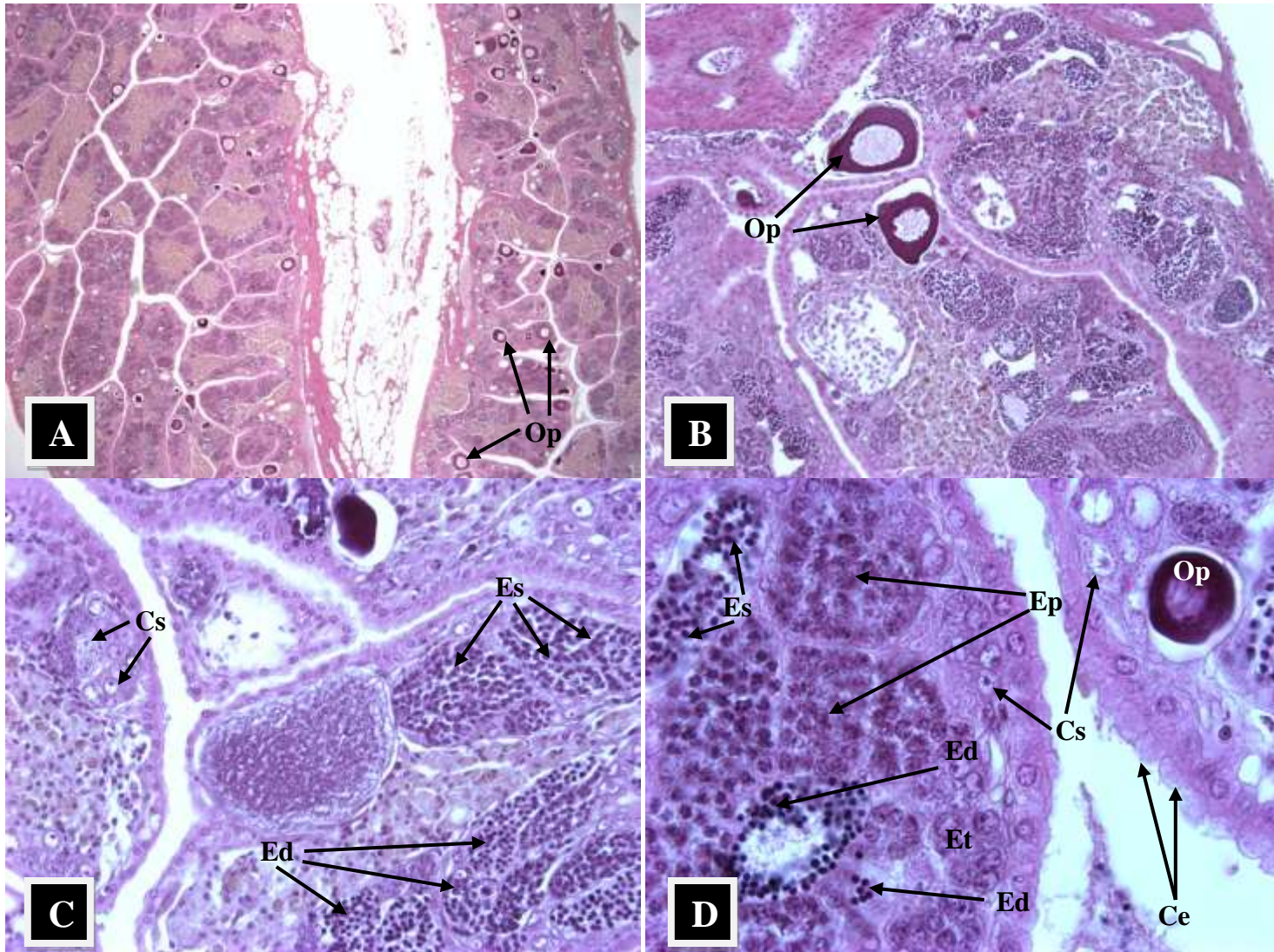


Figura 8. Micrografía de gónadas de *Paralabrax maculatofasciatus* en transición sexual. A) se observan oocitos perinúcleolares (Op). 10X. B) Porción del tejido testicular con oocitos en estadio perinúcleolar (Op) C) Espermatoцитos secundarios (Es); espermátidas (Ed), Células de Sertoli(Cs) 40X. D) Grupo de espermátogonias (Et), grupo de espermatoцитos primarios (Ep), espermátidas (Ed), Células epiteliales cúbicas que compone las lámelas (Ce), se puede apreciar un oocito perinúcleolar (Op)). 100X. Técnica de Hematoxilina-Eosina.

Discusión.

La triploidía es una de las técnicas más prometedoras para esterilizar una gran cantidad de peces y con esto reducir los efectos negativos de la maduración sexual en varias especies de interés comercial. Sin embargo, los recién formados individuos triploides, llevan a cabo rápidos y extensivos cambios en el genoma que tienen consecuencias a nivel fisiológico. Estos cambios son la primera consecuencia medible de la triploidía dentro del organismo, ya que se presentan inmediatamente después del evento de triploidización. El tipo y magnitud de dichos cambios, determinan si el recién formado individuo triploide es capaz de soportar la inestabilidad inicial producto de su nuevo genoma y lograr mantener una supervivencia y crecimiento superior o al menos similar a la de los diploides.

Diferentes tiempos de aplicación del shock en frío.

Para obtener un porcentaje del 100% de triploidía, es necesario la aplicación de un protocolo preciso, el cual involucra las tres variables previamente mencionadas, el tiempo o momento de aplicación del shock, la temperatura y la duración. Los valores críticos para cada variable son específicos para cada especie y una determinación fina de las tres variables es aconsejable para obtener los porcentajes más elevados de triploidía y supervivencia (Piferrer *et al.*, 2003). De las tres variables, el tiempo o momento de aplicación del shock después de la fertilización es el factor más importante en un experimento de inducción a la triploidía, ya que los procesos interrumpidos durante la anafase de la meiosis II por el shock en frío, ocurren a un tiempo determinado después de la fertilización para cada especie en particular. Cassani & Caton (1985) mencionan que el tiempo de entrada al shock aplicado debe coincidir aproximadamente con el tiempo en el que se lleva a cabo la profase durante la segunda división meiotica. En este sentido, aun los cambios más pequeños en el tiempo de entrada al shock pueden aumentar o disminuir significativamente los porcentajes de triploidía obtenidos a una misma temperatura y duración (Felip *et al.*, 1997; Maxime, 2008). Lo anterior se observó de manera clara en este trabajo, pues aunque los tiempos de 5 y 6 minutos después de la fertilización produjeron triploides de manera consistente, el tiempo de 5 minutos arrojó porcentajes mucho más elevados que los porcentajes de

triploidía observados a 6 minutos. El resto de los tiempos evaluados no fueron exitosos en inducir la triploidía, excepto por un muy bajo porcentaje a los 7 minutos en una sola hembra 1. Estos resultados sugieren que en la cabrilla arenera la ventana de tiempo en la cual el shock es efectivo es muy corta. Varias especies parecen presentar al igual que en la cabrilla arenera una ventana relativamente corta: *Ctenopharyngodon idella* (Cassani & Caton, 1985), *Oreochromis aureus* y *O. niloticus* (Don & Avtalion, 1988), *Pomoxis annularis* (Baldwin *et al.*, 1990), *Dicentrarchus labrax* (Felip *et al.*, 1997) y *Scophthalmus maximus* (Piferrer *et al.*, 2003). Esto se observó en el trabajo de Alcántar-Vázquez *et al.*, (2008) en la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*, donde la triploidización fue conseguida solamente cuando se aplicó el shock 5 minutos después de la fertilización. Sin embargo, el cuerpo polar se observó físicamente siendo extruido del huevo fecundado (en controles diploides) hasta casi 20 minutos después de la fertilización.

El propósito de aplicar el shock a diferentes tiempos fue también para permitir que el esperma permaneciera más tiempo en contacto con los huevos de manera que esto permitiera a aumentar la fertilización y por ende la supervivencia estimada. Se observaron diferencias significativas entre los diferentes tiempos evaluados, siendo el tiempo de entrada de 10 minutos el que presentó la mayor supervivencia, comparado con el de 5 y 6 minutos. Esta diferencia puede explicarse en parte por un aumento en la fertilización, pero también por la ausencia de triploidización, ya que una vez que la ventana de tiempo para detener la meiosis II ha sido cerrada, la aplicación de un shock térmico no provoca tantos efectos negativos como cuando se aplica durante las etapas iniciales de desarrollo después de la fertilización (Piferrer *et al.*, 2003).

A este respecto, en algunas especies, ha sido reportada una baja supervivencia cuando el shock es aplicado demasiado rápido después de la fertilización (Johnstone, 1985; Piferrer *et al.*, 2003). Se argumenta que el shock puede interferir o perturbar eventos relacionados con el reinicio de la meiosis. Otras razones para explicar este decremento pueden obedecer a la falta de tiempo, ya sea para permitir una correcta separación entre los huevos fecundados (que flotan) y no fecundados (que se van al fondo). Sin embargo debido a que obtuvieron triploides de manera constante solamente

con el tiempo de 5 minutos después de la fertilización, no es recomendable posponer la entrada de los huevos al shock.

Variación de los porcentajes de triploidía.

Adaptar protocolos de inducción a la triploidía a nuevas especies no representa mucha dificultad, debido a que los protocolos de inducción para una gran cantidad de especies se encuentran disponibles. Sin embargo, se ha observado una gran variación en los porcentajes de triploidía y supervivencia obtenidos en una misma especie y bajo un mismo tratamiento (Lincoln *et al.*, 1974; Thorgaard *et al.*, 1981; Cassani & Caton, 1985; Dubé *et al.*, 1990). En efecto, en el presente trabajo se observó una variación en los porcentajes de triploidía obtenidos, tanto entre desoves individuales como entre desoves mixtos, aunque no en todos los casos fue posible detectar diferencias significativas entre los desoves debido a la amplia variación que se observó en las replicas de un mismo desove. Ha sido reportado que los principales factores generadores de la variación entre desoves son diferencias controladas por factores genéticos en el tiempo de salida del cuerpo polar o bien una susceptibilidad diferencial hacia el shock en frío (Cassani & Caton, 1985; Dubé *et al.*, 1990; Felip *et al.*, 1997). Otro factor importante es el grado de maduración de las hembras utilizadas. Diaz *et al.* (1993) reportan que el grado de maduración puede variar entre hembras aún cuando los desoves se obtienen hormonalmente. Adicionalmente, ha sido reportado que los huevos sobre-maduros pueden presentar desestabilización del huso meiótico, lo cual puede conducir a la interrupción de la segunda división de manera más frecuente (Diaz *et al.*, 1993; Aegerter & Jalabert, 2004). Si bien estos factores no pueden explicar por si solos la variación observada entre réplicas, su relación con el manejo de los huevos y en las variables que participan en la aplicación del shock (temperatura, duración e inicio) pueden explicar en gran parte las variaciones observadas. Lo anterior ha sido observado previamente por otros autores, Utter *et al.* (1983) en salmón plateado *Oncorhynchus kisutch*, reportan que una de las tres réplicas analizadas mostró una reducción significativa del porcentaje de supervivencia, mientras que el resto de las réplicas, mantuvo el porcentaje inicial.

Otro factor a considerar son las pequeñas diferencias que pueden presentarse durante un experimento en cualquiera de las tres variables involucradas en el tratamiento de inducción a la triploidía y las cuales pueden resultar en cambios significativos en los porcentajes de triploidía obtenidos (Cassani & Caton, 1985; Dubé *et al.*, 1990; Felip *et al.*, 1997; Piferrer *et al.*, 2009). Aunque en el presente trabajo la variación en la temperatura del shock se mantuvo más controlada (± 0.3 °C) que en trabajos anteriores (± 0.5 °C) (Felip *et al.*, 1997; Piferrer *et al.*, 2003), pequeñas variaciones se pudieron haber presentado debido a una falta de homogeneización del agua dentro de la hielera en ciertos momentos (especialmente al momento de agregar bolsas de hielo). Así mismo, es posible que una falta de homogeneización de los oocitos pueda haberse presentado en los desoves mixtos, al agregar el esperma. Debido al poco tiempo que se tiene para fertilizar los huevos manualmente e inducir el shock, la homogeneización de los desoves es muy corta, lo cual en última instancia pudo haber causado que los huevos utilizados en los experimentos pertenecieran principalmente a una o pocas hembras del total colectado. Sin embargo, es posible que estas pequeñas variaciones no sean suficientes para explicar la amplia variación observada entre réplicas en algunas hembras.

La calidad de los huevos es importante para optimizar los porcentajes de triploidía obtenidos. En este trabajo, no se ha analizado la calidad de los desoves pero se reportan que factores que afectan la fertilización y la supervivencia, también pueden afectar la supervivencia después de un shock térmico, como por ejemplo, la composición química, mas particularmente se ha señalado a los ácidos grasos (Komen & Thorgaard, 2007; Piferrer *et al.*, 2009). Otros factores que pueden afectar los porcentajes de triploidía obtenidos son el tamaño del huevo (principalmente en especies con huevos de gran tamaño, como los salmónidos) y el origen de éstos (silvestres o de hembras en cautiverio) (Díaz *et al.*, 1993; Kjørsvik *et al.*, 2003; Piferrer *et al.*, 2009). Sin embargo, Komen & Thorgaard (2007) concluyeron que la calidad de los huevos es un conjunto de factores que actualmente se encuentra comprendido solo de manera superficial por lo que no se puede en esta etapa identificar de manera clara si la calidad de los desoves obtenidos de la cabrilla arenosa pudo haber afectado los resultados.

La mayoría de los trabajos desarrollados con hembras silvestres reportan que estos son de mayor tamaño y en general de mejor calidad que los desoves de hembras mantenidas en laboratorio (Turner, 1998; Zohar & Mylonas, 2001). Sin embargo, aún en hembras silvestres es posible observar un descenso en la calidad de los desoves conforme va avanzando y concluyendo la temporada de reproducción natural.

El manejo de los desoves puede también tener un efecto en los porcentajes de triploidía obtenidos. Al manejar en un mismo experimento varios desoves, como se realizó en el presente trabajo, el tiempo transcurrido entre la obtención del desove y su fertilización puede variar desde un par de minutos hasta diez minutos. Lo cual puede conducir en algunos casos a que desoves originalmente en óptimas condiciones, sobremaduren parcial o totalmente por un tiempo excesivo de espera. A este respecto, Flajshans *et al.* (2008) observaron en la tenca *Tinca tinca*, una reducción significativa en la supervivencia después de tres horas de posponer la fertilización. Así mismo, observaron un incremento en el número de triploides espontáneos conforme se pospuso el momento de la fertilización, sin necesidad de algún tipo de shock. Lo anterior lo atribuyen a una diploidización del juego de cromosomas materno, causado por endoreduplicación cromosómica durante la pre-meiosis y retención del segundo cuerpo polar. Adicionalmente, por el número de variables y desoves que se manejaron fue necesario trabajar entre varias personas y aunque se tuvo un máximo de cuidado, algunas desviaciones en el manejo de alguna de las variables utilizadas para inducir a la triploidía pudo haber sido causado por la presencia de más de una persona controlando estas variables.

Un factor que pocas veces recibe la atención necesaria y que en el presente trabajo se manejó como otro componente más, fue la calidad del esperma utilizado. Para esto se realizó previo a la fertilización una serie de pruebas, que incluyeron selección de esperma sin presencia de orina, cantidad y porcentaje de motilidad inicial del esperma utilizado. Aunque solo se seleccionaron machos que cumplieron con estos requisitos, fue posible observar diferencias en la supervivencia que pudieron ser ocasionadas por el esperma utilizado. Esto se observó en los experimentos realizados, principalmente en el primer factorial. A este respecto, es probable que el esperma posea una buena motilidad y sin embargo, su capacidad de fertilización sea baja. Esta

baja capacidad de fertilización puede estar relacionada con la composición química del esperma, la cual incluye la cantidad de AMPc (adenosín monofosfato cíclico), que permite equilibrar y extender la motilidad después de los segundos iniciales y por lo tanto permitir mayores tasas de fertilización (Nagahama, 1994; Flajshans *et al.*, 2008). Una baja fertilización provocada por esperma de baja calidad, puede producir variaciones en el porcentaje de triploidía, al reducir el número de huevos fertilizados disponibles para que la triploidización actuara. Adicionalmente, un huevo fertilizado por esperma de baja calidad, puede poseer una reducida probabilidad de sobrevivir después de la aplicación del shock, debido a una mayor frecuencia de divisiones anormales o malformaciones que pueden causar la muerte del embrión. Estas deficiencias químicas y por lo tanto la variación observada, pueden evitarse o reducirse al seleccionar machos con una alta tasa de motilidad inicial, ya que en el segundo factorial realizado y en un tercero (Anexo 1.) no presentado debido a que no se cuenta con los porcentajes de triploidía, no se presentaron diferencias significativas entre los machos utilizados.

Además de la calidad del esperma utilizado, otro factor que puede ser responsable de la variación observada, es el efecto del genotipo, en este caso el del macho. Este efecto genético está determinado por factores intrínsecos del individuo utilizado, localizados a nivel del ADN. Entre éstos factores se encuentran efectos epistáticos, mutaciones deletéreas, re-arreglos a nivel cromosómico y finalmente sobre-expresión o inactivación de genes. Todos estos factores pueden ocasionar un decremento en la cantidad y calidad de los gametos producidos por el individuo. Debido a lo anterior es importante seleccionar machos que de manera constante den altos rendimientos de triploidía y supervivencia (Johnson *et al.*, 2004; Comai, 2006; Otto, 2007; Hegarty & Hiscock, 2008).

Verificación de la triploidía – tamaño de los eritrocitos

Un factor que puede afectar la supervivencia de larvas y juveniles triploides es el mayor tamaño de los eritrocitos triploides, el cual produce una reducción en el radio área superficial-volumen disponible para el intercambio gaseoso, lo cual en última instancia puede resultar en una menor capacidad aeróbica a bajas concentraciones de

oxígeno en triploides. En el presente trabajo, fue posible demostrar que los eritrocitos de individuos triploides son significativamente más grandes que los eritrocitos diploides, permitiendo una clara separación entre ambos niveles de ploidía. En consecuencia, esto hace posible que los efectos negativos de la reducción del área superficial en triploides reduzcan su desempeño bajo situaciones sub-óptimas. Sin embargo, ha sido reportado que la lamela branquial de algunas especies de triploides presentan un epitelio respiratorio más delgado que los diploides permitiendo una mayor difusión, lo cual puede ser una adaptación potencial a la reducción del área superficial para el intercambio gaseoso. Adicionalmente, Saddler *et al.* (2000) mencionan que los eritrocitos de los individuos triploides son más grandes a lo largo (eje longitudinal) y a lo ancho (eje transversal) comparados con los de individuos diploides, no obstante, no tienen más altura (profundidad), lo cual hace factible que la difusión de oxígeno a través de la superficie del eritrocito no se vea comprometida tanto en las branquias como en los tejidos. Esto concuerda con lo mencionado por Cal *et al.* (2005), los cuales mencionan que el incremento del tamaño celular no afecta de igual forma todos los ejes celulares. El eje que más se ve afectado es el eje longitudinal (eje mayor). Lo anterior se pudo observar claramente en el presente trabajo, ya que el eje longitudinal fué el que mostró una separación más clara entre diploides y triploides, comparado con el eje transversal (eje menor). Sin embargo, a pesar de que pueden existir estas diferencias en la capacidad respiratoria, difícilmente se puede explicar en nuestro trabajo la baja supervivencia observada de los triploides en el periodo larvario ya que el oxígeno disuelto durante la crianza larvaria se mantuvo dentro del rango 4 a 6.5 mg/ml, recomendados para larvas (Tucker, 1998).

Velocidad del desarrollo embrionario.

En los peces, la velocidad del desarrollo embrionario es específica para cada especie, no obstante, depende de la temperatura. El estudio de la velocidad del desarrollo embrionario puede ser importante, ya que de acuerdo a Quillet *et al.* (1988), está depende de la tasa de división mitótica al igual que el crecimiento y por lo tanto puede darnos una idea de los efectos de la triploidía, al menos parcialmente, en etapas posteriores, principalmente durante la etapa juvenil. Pocos estudios han evaluado el

desarrollo embrionario en diploides y triploides. Happe *et al.* (1988) observaron una reducción significativa en el tiempo de desarrollo embrionario después de aplicar un shock caliente en la trucha arcoíris. A este respecto, Quillet *et al.* (1988) en la misma especie reportan que conforme se incrementa el nivel de ploidía, la duración del periodo embrionario se hace más corta. En contraste, Oliva-Teles & Kaushik (1990) utilizando tres temperaturas no reportan diferencias en la misma especie en cuanto a la velocidad del desarrollo embrionario (tiempo transcurrido hasta la eclosión) o bien la respuesta metabólica. En el presente trabajo se observó un retraso en la velocidad de desarrollo embrionario después de aplicar un shock en frío, principalmente en las primeras etapas, el cual de acuerdo a Quillet *et al.* (1988) podría explicar, al menos en parte el crecimiento observado en los juveniles triploides. Por otro lado se ha comentado antes que varios factores pueden contribuir a los resultados observados; la adición de un tercer juego de cromosomas, la estructura genética de los triploides y el shock térmico aplicado. La adición de un tercer juego de cromosomas puede modificar la duración del desarrollo embrionario, ya que células más grandes y con un mayor contenido de ADN pueden disminuir la velocidad del ciclo mitótico durante el desarrollo embrionario. Por el contrario, de existir una compensación en el número de células en respuesta al mayor tamaño celular puede resultar en una reducción en el número de ciclos mitóticos requeridos para completar la embriogénesis. La falta de balance entre estos dos fenómenos opuestos puede provocar, ya sea una aceleración o una disminución de la velocidad del desarrollo embrionario en triploides (Quillet *et al.*, 1988; Mable, 2003; Otto, 2007).

La estructura genética de los triploides puede también modificar la tasa de desarrollo. Una relación positiva entre la heterocigocidad y la tasa de desarrollo ha sido reportado (Quillet *et al.*, 1988; Leary *et al.*, 1985). Es decir, a mayor heterocigocidad, mayor velocidad de desarrollo. Probablemente la velocidad de desarrollo observada en triploides de cabrilla arenosa podría estar relacionado con un bajo incremento de la heterocigocidad, ya que ha sido reportado que la retención del segundo cuerpo polar no resulta en tanta heterocigocidad como la retención del primer cuerpo polar. A este respecto, Leary *et al.*, (1985) mencionan en la trucha arcoíris que los diploides y triploides no deberían presentar grandes diferencias en la velocidad de desarrollo. Lo

anterior lo sugieren en base a observaciones indirectas de la heterocigocidad, medida por la reducción de la fluctuación de la asimetría en caracteres merísticos, Se ha sugerido que los triploides producidos por la retención del segundo cuerpo polar presentan menos heterocigocidad que aquellos producidos por la retención del primer cuerpo polar, ya que los últimos provienen de la duplicación de uno de los homólogos. Cabe mencionar que en el caso de los peces, los triploides pueden producirse solamente por la retención del segundo cuerpo polar, ya que el primero se expulsa durante la meiosis I, la cual ocurre en el transcurso del desarrollo del oocito dentro de la gónada.

El shock térmico también puede influenciar la cinética del desarrollo embrionario, es probable que la aplicación del shock caliente en la trucha arcoíris tenga un efecto acelerador, ya que esta especie habita aguas frías y presenta un lento desarrollo embrionario. En contraste, la cabrilla arenera es una especie de aguas tropicales con una rápida embriogénesis, por lo tanto, el retraso observado puede ser consecuencia simplemente de la intensidad del tratamiento y no una consecuencia de la triploidización en sí, ya que la diferencia observada es más marcada durante las primeras etapas después de la aplicación del shock en frío y esta se reduce conforme se acerca la eclosión, lo cual puede ser causado por el tiempo que le toma a la célula reiniciar los procesos de división una vez aplicado el shock.

Por último, el marcado retraso observado al momento de la eclosión en los individuos triploides, probablemente obedece a uno de dos factores, las condiciones del cultivo, en especial la temperatura o bien a un efecto de la triploidización durante la etapa final del ciclo embrionario relacionada con la ruptura del huevo por parte del embrión. Sin embargo no existe información disponible para sustentar estos argumentos. Por el contrario, Happe *et al.*, (1988) mencionan que la eclosión representa un final muy arbitrario para el desarrollo embrionario y no constituye una etapa fisiológica como tal.

Divisiones anormales durante el desarrollo embrionario en triploides.

Las divisiones mitóticas durante la embriogénesis temprana consisten en una serie de pasos que incluyen la polarización de la célula, la alineación del huso mitótico

con respecto al eje de polaridad de la célula, a través de la interacción de micro-túbulos (filamentos de proteína) con el cortex celular, y en el caso de la diferenciación celular, la distribución diferencial de determinantes citoplasmáticos (proteínas específicas) en las dos mitades de la célula (Voronina & Wessel, 2006). El porcentaje significativamente más alto de divisiones anormales observado en los grupos expuestos al shock comparado con los grupos control, sugiere que la inducción a la triploidía afecta negativamente los procesos iniciales en el desarrollo del embrión. De hecho, en los grupos expuestos al shock se observaron tanto un porcentaje de supervivencia como una proporción de larvas vivas más baja comparado con los grupos control. La presencia de divisiones anormales producto del tratamiento de inducción a la triploidía, puede ser consecuencia de la adición del tercer juego de cromosomas, la intensidad del shock en frío o bien la interacción de ambos factores. La intensidad del tratamiento de inducción puede alterar la formación de los micro-túbulos necesarios para el movimiento de los cromosomas y/o perturbar la acción y distribución de proteínas específicas en cada una de las mitades de la célula (Downing & Allen, 1987; Voronina & Wessel, 2006). Adicionalmente, la adición de un tercer juego de cromosomas puede alterar la alineación del huso mitótico durante los estadios iniciales de la mitosis, cambiando con esto la dinámica (crecimiento y reducción) de los microtúbulos durante la división celular y en consecuencia modificar la distribución de los cromosomas y del volumen citoplasmático entre las células hijas, produciendo potencialmente células con diferente nivel de ploidía, incluyendo aneuploides, las cuales en última instancia podrían ser responsables de la alta mortalidad observada a la eclosión, así como del decremento en el número de larvas vivas en los grupos expuestos al shock en frío observado en nuestros experimentos.

La triploidía puede ser inducida a través de varios métodos, aparte del shock en frío. A este respecto, ha sido señalado que el shock de presión es probablemente el método más efectivo, tomando en cuenta las tasas de triploidía y supervivencia obtenidas sin el uso de químicos (Johnstone, 1985; Cassani & Caton, 1985). La presión inhibe la división meiótica, disolviendo los microfilamentos del huso meiótico y por lo tanto separando los cromosomas de los microfilamentos de actina, lo cual detiene por completo el movimiento de los cromosomas, sin afectar la citocinesis. En contraste, la

temperatura (shock en frío) inhibe no solo la formación de los microfilamentos de actina del huso meiótico, sino también los microtubulos que conectan el huso al cortex celular, afectando con esto no solo el movimiento de los cromosomas, sino también la división citoplasmática (Downing & Allen, 1987; Allen *et al.*, 1989; Brydges & Benfey, 1991). El efecto del shock en frío sobre la cariocinesis y la citocinesis puede ser responsable del incremento de divisiones anormales observado de manera constante en nuestros experimentos. Sin embargo no se ha estudiado el efecto de la presión sobre las divisiones iniciales de la embriogénesis.

A pesar de que el shock de presión puede reducir las divisiones anormales y la mortalidad durante el periodo embrionario, es difícil transferir su tecnología a un nivel comercial, debido a los costos y limitaciones de los equipos utilizados para la inducción del mismo. Una de sus principales ventajas es que el total de los huevos expuestos al tratamiento reciben una intensidad de tratamiento absolutamente uniforme (Benfey, 1991). Esto no es posible con el shock de temperatura, ya que las variaciones presentes dentro de los recipientes utilizados pueden contribuir a la aparición de divisiones anormales, a las variaciones en los porcentajes de triploidía obtenidos y por último al descenso de la supervivencia durante el periodo embrionario.

En un estudio de triploidía en el bacalao *Gadus morhua*, Sultana (2005) no encontró diferencias significativas en el porcentaje de divisiones anormales entre los huevos expuestos a un shock en frío y los huevos del control. Sin embargo, el porcentaje de divisiones anormales fue muy bajo tanto en el grupo expuesto al shock como en el grupo control. Aunque, el porcentaje de eclosión fue muy bajo en ambos grupos. Mientras que la intensidad del shock en frío puede provocar un incremento en la mortalidad observada, sin embargo, Díaz *et al.* (1993) reportan que la diferencia entre la temperatura del agua (pre-shock) y la temperatura del shock en frío puede ser más determinante que la temperatura del shock en sí misma. Por lo que la diferencia observada entre nuestro trabajo y el de Sultana puede deberse a este diferencial de temperatura, el cual fue de solo 5 °C, mientras que en el presente estudio fue de aproximadamente 14 °C. Esta gran diferencia entre la temperatura del pre-shock y la temperatura del shock en frío puede ser responsable del alto porcentaje de divisiones anormales observado en la cabrilla arenosa.

En el grupo control también fue posible observar la presencia de divisiones anormales. Sin embargo, a pesar de observar porcentajes de divisiones anormales del orden de 25%, el porcentaje de eclosión observado fue superior al 90%. En relación a esto, en los desoves en los cuales se separaron los huevos anormales de los huevos normales tanto del grupo control como del grupo expuesto al shock, fue posible observar una correlación lineal negativa entre los huevos anormales y el porcentaje de eclosión solamente para el grupo expuesto al shock. Estos resultados sugieren que una proporción de huevos anormales del grupo control pueden eclosionar y producir larvas viables. En contraste, en los huevos normales del grupo expuesto al shock, esta proporción fue menor que en los huevos del grupo control, evidenciando con esto el efecto negativo de la aplicación del shock. Avery & Brown (2005) observaron en el lenguado *Limanda ferruginea* que alrededor del 40% de los huevos con divisiones anormales eclosionan de manera normal. Nuestros resultados para el grupo control coinciden con lo reportado por Vallin & Nissling (1998) en el bacalao *Gadus morhua*, los cuales mencionan que las anomalías observadas durante las primeras divisiones (4-32 células) pueden ser reparadas y por lo tanto no impiden un desarrollo normal del embrión hasta la eclosión. Adicionalmente, se ha reportado que mecanismos de reparación o “checkpoints” se encuentran trabajando de manera constante durante las divisiones mitóticas para reducir la aparición de divisiones anormales y la mortalidad embrionaria (Gerald, 2005).

Las diferencias observadas en la supervivencia entre los embriones del grupo control y los del grupo expuesto al shock, pueden también ser explicadas por la presencia de diferentes tipos de divisiones anormales. Rideout *et al.* (2004) separó estas anomalías durante el desarrollo embrionario en cuatro diferentes categorías y la viabilidad fue diferente según el tipo de anomalías; los embriones que presentan poca unión entre los blastómeros fueron los que arrojaron una supervivencia a la eclosión más baja que aquellas que presentaron solamente blastómeros asimétricos. En el presente estudio, no fue posible separar los embriones con divisiones anormales en diferentes categorías debido a que las divisiones iniciales del desarrollo embrionario ocurren rápidamente en la cabrilla arenosa por lo que sería interesante en un futuro trabajo considerarlo. Los patrones de división anormales han sido utilizados como un

criterio de calidad en diferentes especies de peces marinos, ya que ha sido observada una correlación negativa entre la proporción de divisiones anormales y la tasa de eclosión (Kjørsvik *et al.*, 2003; Rideout *et al.*, 2004). Esto sugiere que la proporción de divisiones anormales puede ser utilizada para estimar el porcentaje de eclosión. Sin embargo, la alta tasa de eclosión observada en los huevos del grupo control a pesar de la alta proporción de divisiones anormales indica que este criterio no es apropiado para los individuos diploides de cabrilla arenosa, solo para los triploides.

Supervivencia de triploides a la eclosión, 24 horas y durante el periodo larvario.

Numerosos estudios han reportado una baja supervivencia de individuos triploides comparado con diploides durante las etapas iniciales de desarrollo. Esto se ha observado principalmente en embriones y larvas hasta la primera alimentación (Felip *et al.*, 2001; Tiwary *et al.*, 2004; Maxime, 2008). De manera general, fue posible observar en el presente trabajo una reducción de la supervivencia obtenida en todos los experimentos realizados tanto a la eclosión como a las 24 horas después y así mismo durante todo el periodo larvario, aunque esta disminución fue significativa solo en algunos experimentos debido a la variación observada entre replicas. A este respecto, ha sido propuesto que esta caída en la supervivencia, así como la variación observada entre desoves puede ser resultado de un grado diferente de endogamia provocado por la retención del segundo cuerpo polar, la intensidad del tratamiento (Solar *et al.*, 1984) o bien una combinación de ambas.

Sin embargo, el mecanismo a través del cual la retención de un tercer juego de cromosomas puede causar la reducción observada en la supervivencia no es muy claro. Al poseer más heterocigocidad genómica se espera que los triploides sean más viables que los diploides. En teoría, los triploides deberían presentar mejores tasas de supervivencia y de crecimiento (Leary *et al.*, 1985). Esta hipótesis proviene del hecho de que los individuos que poseen tres alelos en un locus (triploides = triple heterocigoto) tienen una ventaja adaptativa sobre los individuos que poseen dos alelos. Es la misma hipótesis que se hace cuando se comparan dos alelos heterocigotos con respecto a dos homocigotos. Sin embargo, en el caso de los peces, determinar la heterocigocidad específica de un locus en un triploide es complicado ya que se tiene que determinar si

dicho locus ha sido o no afectado por recombinación durante la meiosis del huevo a partir del cual se desarrollo (Piferrer *et al.*, 2009). Sin embargo, lo anterior es posible utilizando la técnica de marcadores moleculares, en especial, loci microsatelites los cuales presentan un alto polimorfismo que permite identificar genotipos recombinantes (Hernández-Ibarra, 2010).

En cuanto a la intensidad del tratamiento, ha sido reportado que en respuesta al estrés generado por la aplicación del shock, las células activan proteínas cuya función principal es disminuir el estrés celular. Cualquier disminución de la temperatura produce en el citoesqueleto de la membrana, en las proteínas intracelulares y los ácidos nucleicos un efecto opuesto a la hipertermia (aumento de temperatura), es decir, se produce un decremento de la fluidez de la membrana, lo cual puede afectar la forma celular, el transporte trans-membranal y la síntesis de ARN/ADN (Maxime, 2008). A pesar del efecto dañino del shock térmico, Chernenko (1986) y Holmerfjord & Refstie (1997), reportan que para que el shock sea efectivo, la temperatura de éste (en el caso de shock térmico) debe estar cercana a los niveles sub-letales de cada especie en particular. En mamíferos, se ha observado que la estructura y propiedades físicas de las macromoléculas (lípidos de la membrana y proteínas), así como los procesos fisiológicos relacionados con la membrana, son afectados significativamente por cualquier cambio drástico en la temperatura. En contraste, Maxime (2008) menciona que parece improbable que las temperaturas manejadas durante la inducción a la triploidía sean lo suficientemente intensas para alterar el desarrollo durante la embriogénesis y el inicio del periodo larvario.

En el presente trabajo, este decremento de la supervivencia no solo se observó en las etapas tempranas después de la eclosión, ya que durante todo el periodo larvario fue posible observar un decremento significativo de los porcentajes de triploidía, lo cual indicó de manera indirecta una mortalidad más alta de larvas triploides. Piferrer *et al.* (2009) sugieren que si el tratamiento de inducción a la triploidía no es 100% efectivo, las cohortes de triploides contendrán muchos individuos diploides que no respondieron al shock. Estos “diploides expuestos al shock” pueden servir como controles para conocer el efecto de la intensidad del shock, ya que si éstos presentan una supervivencia igual a los triploides durante el periodo larvario, entonces la mortalidad

observada es consecuencia de la intensidad del shock. En contraste, si los diploides expuestos al shock, presentan una mejor supervivencia que los triploides, entonces esa mortalidad diferencial se debe a la triploidización. A este respecto, Cherfas *et al.* (1994) mencionan, que los diploides expuestos al shock y los triploides presentan una supervivencia similar durante la primera parte del periodo larvario. Sin embargo, en nuestros experimentos, los resultados obtenidos indican que la supervivencia de las larvas triploides fue mucho menor que la de los diploides expuestos al shock, lo cual sugiere que el descenso en la supervivencia observado en larvas triploides es consecuencia principalmente de la adición de un tercer juego de cromosomas. Adicionalmente, una mortalidad más alta de individuos triploides comparado a los controles diploides, han sido reportadas en larvas del salmón del Atlántico (Galbreath *et al.*, 1994), la carpa común (Cherfas *et al.*, 1994) y la trucha arcoíris (Thorgaard *et al.*, 1982).

En algunas especies se ha observado una conducta anormal en larvas triploides (Piferrer *et al.*, 2009). En la trucha arcoíris fue posible observar un nado y una conducta alimenticia inusual (Solar *et al.*, 1984). El nado inusual puede provenir de un desgaste o malformación de las aletas en peces triploides. Adicionalmente, se ha observado una conducta menos agresiva por parte de las larvas triploides, que en algunos casos se atribuye a los bajos niveles de cortisol presentes en la sangre. Esta conducta menos agresiva, puede incluir en algunos casos, el que las larvas triploides simplemente se observen en un estado decaído (postrado) en el fondo del tanque (Galbreath *et al.*, 1994; Piferrer *et al.*, 2009). Aunque en el presente trabajo no se analizó la conducta de las larvas durante el cultivo, fue posible observar en algunos de los tanques triploides, un gran número de larvas en el fondo del tanque durante periodos de tiempo intermitentes. Esto podría implicar una reducción en la cantidad de alimento ingerido y por lo tanto un decremento en su capacidad de competencia con respecto a las larvas diploides ES.

Por último, el seguimiento de los porcentajes de triploidía en etapas tempranas fue motivado por los resultados obtenidos en los experimentos de seguimiento del crecimiento los cuales a pesar de presentar 90% de triploidía a la eclosión presentaron un porcentaje final de 17% después de 10 meses de cultivo. La mortalidad diferencial

entre triploides y diploides expuestos al shock se presento en todos los desoves obtenidos tanto individuales como mixtos. Nuestros resultados sugieren que la mortalidad más alta se presenta en la etapa larvaria, pues en la etapa juvenil, la mortalidad fue baja y ocasionada principalmente por juveniles que saltaron fuera del tanque. Observaciones similares han sido reportadas por Utter *et al.* (1983) en el salmón plateado *Oncorhynchus kisutch*, en el cual una de las dos familias originalmente compuesta de un 85% de triploides en la etapa de pigmentación de los ojos, pasó a estar compuesta por solo un 19% de triploides a los 17 meses de cultivo. Por último, una mortalidad más alta de individuos triploides comparado a los controles diploides, han sido reportadas en larvas del salmón del Atlántico (Galbreath *et al.*, 1994), la carpa común (Cherfas *et al.*, 1994) y la trucha arcoíris (Thorgaard *et al.*, 1982).

Crecimiento de larvas y juveniles triploides

El crecimiento de triploides comparado con el de diploides, especialmente en peces, ha generado cierta confusión. En teoría, los triploides podrían crecer más rápido que los diploides por tres razones principales; el efecto de gigantismo en las células triploides (Piferrer *et al.*, 2009), el incremento de la heterocigocidad genómica (Leary *et al.*, 1985; Piferrer *et al.*, 2009) y el desvío de energía proveniente del desarrollo gonadal hacia el crecimiento somático (Felip *et al.*, 2001; Piferrer *et al.*, 2001; Piferrer *et al.*, 2009). Los dos primeros efectos, de presentarse, deberían operar durante todo el ciclo de vida de los triploides, mientras que el tercer efecto estaría restringido a la etapa adulta. En algunos estudios, cuando diploides y triploides son cultivados de manera comunal debido a protocolos de inducción que no son 100% efectivos o por la facilidad del manejo, los individuos triploides frecuentemente muestran una menor tasa de crecimiento que los diploides, aunque en algunos casos esto también se presenta al ser cultivados por separado (Cassani & Caton, 1985; Galbreath *et al.*, 1994). Estos resultados, sin embargo, varían mucho dentro de una misma especie, dependiendo de las condiciones experimentales. En el presente experimento durante el periodo larvario, debido a que no fue posible obtener un porcentaje del 100% de triploidía, se contó con tres tipos de larvas, diploides del control, diploides ES y triploides. El crecimiento de los triploides mostró ser mayor que el de los diploides del control. Sin embargo, el mayor crecimiento se observó, de manera general, en las larvas diploides ES. Estos resultados

concuerdan con lo reportado en varias especies, incluyendo la carpa herbívora (Cassani & Caton, 1985), la carpa común (Cherfas *et al.*, 1994) y la trucha arcoíris (Thorgaard *et al.*, 1982), donde los diploides expuestos al shock crecen más rápido que los triploides. Adicionalmente, de acuerdo a lo reportado por Galbreath *et al.* (1994), la menor agresividad por parte de los individuos triploides a la hora de alimentarse puede ser responsable de las diferencias observadas en el crecimiento dentro de los tanques.

En lo que respecta a la etapa juvenil, ha sido reportado que durante la etapa juvenil los peces triploides crecen a tasas similares o menores que los juveniles diploides, especialmente cuando se cultivan comunalmente. Lo anterior sugiere que los triploides no poseen una ventaja intrínseca en la tasa de crecimiento comparado con diploides antes de la primera madurez (Piferrer *et al.*, 2009). En este caso al igual que en el periodo larvario, se conto con tres tipos de juveniles, diploides, diploides ES y triploides, y nuestros resultados durante esta etapa mostraron la misma tendencia que para el cultivo larval, con los diploides ES, mostrando los valores más altos de peso y longitud patrón, seguido de los juveniles triploides. Sin embargo, en este caso se observó una gran variabilidad de tamaño en estos últimos. La competencia entre diploides y triploides parece una de las hipótesis más probable a considerar, ya que está parece estar relacionada con las condiciones de cultivo, debido a que la concentración de alimento y los rangos de los parámetros ambientales determinan el mayor o menor desempeño de los individuos, en este caso triploides (Galbreath *et al.*, 1994; Piferrer *et al.*, 2009). La reducción observada en el número de triploides, hace más difícil identificar los factores involucrados en el crecimiento obtenido, no obstante, es posible observar que solo los triploides mejor adaptados sobreviven hasta este periodo, ya que, a menor porcentaje de triploidía obtenido (por réplica) se observó el mayor peso y longitud en promedio en los triploides encontrados.

Por último, ha sido reportado que los triploides tienden a redirigir la energía originalmente destinada hacia la reproducción hacia depósitos de grasa en la zona visceral, más que hacia la producción de tejido muscular (Tiwary *et al.*, 2004; Maxime, 2008). Aunque en este trabajo no se evaluó la cantidad de grasa visceral, fue posible observar la existencia de estos depósitos en los peces colectados, especialmente aquellos de mayor tamaño.

Madurez gonádica en individuos triploides.

De manera general, se reporta que las hembras y machos triploides son funcionalmente estériles, ya que durante la meiosis I se presentan fallas en la sinapsis de los tres cromosomas homólogos (Cassani & Caton, 1985; Arai & Wilkins, 1987; Aldridge *et al.*, 1990; Benfey, 2001; Piferrer *et al.*, 2009). Esta formación de trivalentes, no permite, especialmente en las hembras triploides, un desarrollo significativo, permaneciendo en la mayoría de los casos en un estadio primario, caracterizado principalmente por oogonias, oocitos en estadio perinucleolar y en algunos casos en las primeras etapas de la vitelogénesis (Benfey & Donaldson, 1988; Felip *et al.*, 1999; Tiwary *et al.*, 2004; Cal *et al.*, 2006; Comai, 2006) lo cual se refleja en la presencia de pequeñas gónadas asociadas con índices gonadosomáticos bajos. Lo anterior concuerda con lo observado en la cabrilla arenera, ya que las hembras triploides mostraron mayormente oogonias y oocitos perinucleolares, con algunos oocitos en alvéolo cortical, lo cual corresponde a un estadio de desarrollo primario. También presentaron índices gonadosomáticos más bajos que los de los diploides. En contraste, las hembras diploides mostraron principalmente oocitos en diferentes estadios de vitelogénesis hasta vitelogénesis avanzada e hidratación. El impacto de la triploidía en el desarrollo gonadal de las hembras se encuentra bien reportado en varias especies, incluidas el bagre de río (Wolters *et al.*, 1982), la trucha arcoíris (Lincoln & Scott, 1984), la lubina (Felip *et al.*, 1999) y el bagre de la India (Tiwary *et al.*, 2000).

En los machos, a diferencia de las hembras, la meiosis ocurre al inicio de la pubertad, después de que las espermatogonias han llevado a cabo varios ciclos de división por mitosis. Aunque la meiosis al igual que en las hembras, se ve afectada por la formación de trivalentes, las gónadas de los machos pueden desarrollarse a niveles comparables a los de los diploides. Histológicamente, la espermatogénesis en machos triploides, puede exhibir la multiplicación de espermatogonias y la división de espermatocitos secundarios principalmente, pero con una consecuente reducción en el IGS (Felip *et al.*, 2001; Piferrer *et al.*, 2009). En lo que respecta a nuestro trabajo, el grado de desarrollo gonádico reportado concuerda con lo observado en los machos triploides de cabrilla arenera donde se observó una interrupción total del desarrollo

gonadal a la etapa de espermatocito secundario caracterizada por la ausencia de espermatidas y o bien espermatozoides en los machos analizados. A este respecto, la esterilidad funcional, es decir la falta de producción de esperma, ha sido reportada en triploides de varias especies, incluyendo; la lubina (Felip *et al.*, 2001), la dorada (Haffray *et al.*, 2005) y el rodaballo (Cal *et al.*, 2006)

Los machos triploides en algunas ocasiones presentan un desarrollo de los testículos similar al de individuos diploides, lo cual resulta en gónadas grandes con células esteroideogénicas totalmente activas y por lo tanto con niveles hormonales similares a los diploides (Benfey, 1999; Piferrer *et al.*, 2009). Sin embargo, en algunas especies, como la trucha arcoíris, es posible observar la producción de gametos aneuploides (Benfey & Donaldson, 1988; Felip *et al.*, 1999). En contraste, en nuestro caso, fue posible observar una reducción significativa del peso de la gónada comparado con el de diploides y por ende del índice gonadosomático, lo cual sugiere en la cabrilla arenera una baja producción hormonal, principalmente de la hormona gonadotropina (por una baja retroalimentación positiva) y del esteroide sexual 11-ketotestosterona, los cuales son los principales responsables del desarrollo gonadal en individuos diploides.

Adicionalmente, en el presente trabajo fue posible observar en los triploides una proporción de sexos diferente a la observada en los diploides. El grupo triploide presentó casi ocho machos por cada hembra, mientras que el grupo diploide presentó casi 3 hembras por cada macho. Estos cambios en la proporción de sexos han sido reportados previamente en varias especies y han sido atribuidos a factores epistáticos, es decir a la alteración de la interacción entre genes situados en diferentes loci o bien a los efectos producidos por el juego extra de cromosomas, el cual puede alterar la proporción de cromosomas sexuales a autosomas requerida para la determinación del sexo (Devlin & Nagahama, 2002; Futuyama, 2005; Ryan, 2006; Piferrer *et al.*, 2009). La alta proporción de machos observada puede sugerir que la cabrilla arenera posee un sistema de determinación del sexo basado en un macho homogamético (ZZ macho, ZW hembra) (Omoto *et al.*, 2005; Piferrer *et al.*, 2009), es decir, al triploidizar a la población, la proporción observada de carga cromosómica sería, WWZ = hembras y ZZZ = machos en una proporción del 50% cada uno. La mayor proporción de machos puede ser explicada si WWZ no es completamente viable. En este caso es posible que esta

condición cause un incremento de la mortalidad embrionaria o bien que ambos cromosomas sean responsable por la selección del género. Lo anterior ha sido sugerido para el caso de las aves, donde nunca ha sido posible observar un ave con una carga cromosómica WWZ (Smith *et al.* 2007).

Sin embargo debido a que no todos los juveniles fueron cultivados en un mismo tanque, bajo las mismas condiciones, es posible que otros factores sean al menos parcialmente responsables del cambio en la proporción de sexos observada, ya que la interacción entre el genotipo y el ambiente puede afectar la determinación del sexo. La temperatura del agua durante las etapas iniciales, incluyendo el periodo larvario, puede afectar el aumento o disminución de uno de los dos sexos (Ocampo, 2002; Haffray *et al.*, 2005). Diferencias de temperatura de incubación y aun más entre tanques durante el periodo larvario contribuyan a las variaciones observadas en la proporción de sexos entre niveles de ploidía. A este respecto, Sánchez (2006) determino que a una talla de 11.6 mm (durante el periodo larvario) es donde se da la primera diferenciación de las células germinales, las cuales comienzan su desarrollo a partir de este momento. Este mismo autor señala que la diferenciación de las células germinales está relacionada más que con la edad, con la talla del individuo. Lo anterior hace factible que variaciones de temperatura entre tanques atrasen o aceleren esta diferenciación debido a un crecimiento diferencial y puedan afectar con esto la aparición de uno u otro sexo. Adicionalmente, al igual que existen especies donde uno de los dos sexos es más favorable para el cultivo, debido a su crecimiento más rápido, es posible que en los individuos triploides, uno de los dos sexos presente una mayor mortalidad en respuesta a las condiciones de cultivo.

Debido a que no todos los individuos diploides y triploides analizados se mantuvieron bajo un mismo tanque, las variables físico-químicas (ya mencionadas) y también muy importante, las interacciones entre sexos en los sistemas sociales pueden haber presentado variaciones de un tanque a otro, lo cual pudo contribuir a la proporción sexual observada en los diploides. Este último factor solo aplicaría a individuos diploides, especialmente en el caso de la cabrilla arenera, debido al hermafroditismo protoginico que presenta como modalidad reproductiva en la bahía de La Paz. En contraste, en el caso de los triploides, ha sido reportado que estos no

cambian de sexo debido al papel que juegan las hormonas sexuales en este proceso, las cuales permanecen en niveles muy bajos en individuos triploides. A este respecto, Haffray *et al.* (2005) reportan en la dorada *Sparus aurata*, una especie protándrica que el 70% de la población inicial de machos diploides presento cambio de sexo para convertirse en hembras funcionales, mientras que la población de machos triploides permaneció sin cambio alguno.

En conclusión, aunque es posible que los factores anteriormente expuestos pudieran tener un efecto en la proporción de sexos, estos dependen de concentraciones de hormonas, principalmente hormonas sexuales, las cuales de acuerdo a lo reportado por otros autores, se mantiene en niveles bajos en individuos triploides. Entonces tomando en cuenta el poco desarrollo gonádico en triploides de cabrilla arenera, se puede suponer que las concentraciones de hormonas sexuales también se mantuvieron en niveles bajos y por lo tanto es más factible los machos obtenidos fueran machos primarios, es decir que la proporción de machos se determine por factores genéticos asociados a cromosomas sexuales.

El desempeño de los individuos triploides en la cabrilla arenera requiere de más estudios durante las etapas tempranas del desarrollo, en especial, durante el periodo larvario, el cual de acuerdo a nuestras observaciones, es uno de los periodos más críticos para la supervivencia y crecimiento de individuos triploides. Para poder determinar si la triploidía es adecuada para la cabrilla arenera, es necesario mejorar el protocolo de inducción a la triploidía y reducir las variaciones en el porcentaje de triploidía y supervivencia obtenidos, y de esta manera obtener porcentajes del 100% que permitan evaluar el desempeño de larvas y juveniles triploides cuando son cultivados bajo optimas condiciones. Asimismo, los triploides representan una oportunidad para estudiar aspectos como el efecto de las divisiones anormales en la supervivencia a la eclosión, la determinación y diferenciación del sexo en una especie protoginica.

Conclusión.

En general, la importancia que puede tener una técnica de manipulación cromosómica adentro de un paquete tecnológico de cultivo se mide por las ventajas que conlleva en el peso ganado por unidad de tiempo o bien una mejor supervivencia después de cierta edad, especialmente después de la maduración gonádica debido principalmente a la reducida madurez gonádica que muestran en particular los individuos triploides. Entonces, tomando en cuenta esta premisa se puede concluir a la luz de los resultados obtenidos que la inducción a la triploidía en la cabrilla arenosa, no ha traído ventajas marcadas, ya que a pesar de presentar una madurez gonádica menos avanzada que en los diploides, no se observó un mayor crecimiento y/o supervivencia. En términos generales, la cabrilla arenosa se puede clasificar como una especie que sigue el patrón generalmente encontrado en la literatura para los periodos juvenil y adulto, con un crecimiento que es en el mejor de los casos igual al de los individuos diploides y con una madurez gonádica que se interrumpe en las etapas reportadas para machos y hembras.

Además, se han presentado efectos negativos de la triploidía en etapas tempranas del desarrollo y en el periodo larvario entre otras la aparición de un mayor número de divisiones anormales en los embriones relacionado con un bajo porcentaje de eclosión como una fuerte reducción de los porcentajes de triploidía durante el periodo larvario, consecuencia de una mortalidad más alta de larvas triploides. Existen pocos reportes de estas últimas observaciones en la literatura y no se pudo llegar en nuestro estudio a identificar las causas por lo que resulta sumamente interesante seguir estudiando el desarrollo embrionario en triploides, identificando los diferentes tipos de anomalías en las divisiones y su relación con el desarrollo del embrión, ya que puede aportar información para entender las razones detrás del fracaso en la producción de triploides y su uso en la acuicultura.

El proceso de inducción a la triploidía no pudo ser mejorado, ya que el tratamiento reportado como exitoso por Alcántar-Vázquez *et al.* (2008) continuo siendo el más adecuado para obtener altos porcentajes de triploidía con una supervivencia moderada. Al aumentar el tiempo de contacto de los huevos con el esperma se incrementa en efecto la supervivencia, sin embargo el porcentaje de triploidía se reduce

significativamente. Lo cual indica que la ventana para una óptima inducción a la triploidía en la cabrilla arenosa es muy estrecha. A este respecto y tomando en cuenta la variación observada en los porcentajes de triploidía provenientes de hembras y machos silvestres, podemos concluir que la mejor manera de incrementar el número de larvas triploides obtenidas es a través de la inducción hormonal de una mayor número de hembras o bien mediante el mantenimiento de un stock de reproductores que consistentemente respondan favorablemente a la inducción tanto hormonal como a la triploidía.

En la etapa adulta la aportación principal del trabajo se encuentra en la proporción de sexos observada en individuos triploides, que nos permite inferir con respecto al sistema de determinación del sexo en la cabrilla arenosa, un hermafrodita protoginico, así como la posibilidad de trabajar con una población constituida casi en su totalidad por un solo sexo.

Los resultados obtenidos, como se mencionó no permiten recomendar ampliamente la triploidía para mejorar el crecimiento de la cabrilla arenosa durante su cultivo, pero diferentes aspectos pueden seguir estudiándose dentro de un contexto que incluye conocimiento básico de la biología de peces.

Literatura Citada.

- Aegerter S. & B. Jalabert. 2004. Effects of post-ovulatory oocyte ageing and temperature on egg quality and on the occurrence of triploid fry in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Aquaculture 231: 59-71.
- Aguado, C. & S. C. Cuartero (Eds.). 2001. Diccionario esencial de las ciencias. Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Editorial Espasa Calpe, S. A. Madrid, España. 1122 p.
- Alcántar-Vázquez, J. P. 2005. Evaluación de tratamientos para inducir la triploidía en la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Percoidei: Serranidae) mediante shock frío. Tesis de Maestría. CICIMAR-IPN. 76 p.
- Alcántar-Vázquez, J. P., S. Dumas, E. Puente-Carreón, H. S. Pliego-Cortés & R. Peña. 2008. Induction of triploidy in spotted sand bass (*Paralabrax maculatofasciatus* Steindachner, 1868) by cold shock. Aquaculture Research 39: 59-63.
- Aldridge, F. J., R. Q. Marston & J. V. Shireman. 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 polyploidy fish and shellfish. Aquaculture 33: 317-328
- Allen, S. K., Jr. & J. G. Stanley. 1979. Polyploid mosaics induced by cytochalasin B in landlocked Atlantic Salmon *Salmo salar*. The American Fisheries Society 108: 462-466
- Allen, S. K. Jr., S. L. Downing & K. K. Chew. 1989. Hatchery manual for producing triploid oyster. University of Washington Press, 27 p.
- Álvarez-González, C. A. 1999. Optimización del proceso de producción de semilla de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Percoidei: Serranidae) en sistemas de circulación cerrada. Tesis de Maestría. CICIMAR-IPN. 99 p.
- Álvarez-González, C. A. 2003. Actividad enzimática digestiva y evaluación de dietas para el destete de larvas de cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Percoidei: Serranidae). Tesis de maestría. CICIMAR-IPN. 164 p.

- Álvarez-González C. A., J. L. Ortiz-Galindo, S. Dumas, S. Martínez-Díaz, D. E. Hernández-Ceballos, T. Grayeb del Alamo, M. Moreno-Legorreta, R. Peña-Martínez & R. Civera-Cerecedo. 2000. Effect of stocking density on the growth and survival of spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus* larvae in a closed recirculating system. Journal of the World aquaculture Society 32: 130-137.
- Álvarez-González C. A., R. Civera-Cerecedo, J. L. Ortiz-Galindo, S. Dumas, M. Moreno-Legorreta & T. Grayeb del Alamo. 2001. Effect of dietary protein level on growth on body composition of juvenile spotted sand bass, *Paralabrax maculatofasciatus*, fed practical diets. Aquaculture 194:151-159.
- Arai, K., 2001. Genetic improvement of aquaculture finfish species by chromosome manipulation techniques in Japan. Aquaculture 197: 205–228.
- Arai, K. & N. Wilkins. 1987. Triploidization of brown trout (*Salmo trutta*) by heat shocks. Aquaculture 64: 97-103.
- Avery T.S. & A. J. Brown. 2005. Investigating the relationship among abnormal patterns of cell cleavage, egg mortality and early larval condition in *Limanda ferruginea*. Journal of Fish Biology 67: 890-892.
- Avilés-Quevedo, A., U. Macgregor-Pardo, R. Rodríguez-Ramos, O. Hiraes, M. Huerta-Bello & M. Iizwa. 1995. Biología y cultivo de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Steindachner, 1876). JICA, SEPESCA, INP. México. 85 p.
- Ayala, J. F. & J. A. Kiger, Jr. 1984. Genética moderna. Ediciones Omega. España. 836 p.
- Baldwin, N. W., C. A. Busack & K. O. Meals. 1990. Induction of triploidy in white crappie by temperature shock. The American Fisheries Society 119: 438-444.
- Ballarin, L., M. Dall'Oro, D. Bertotto, A. Libertini, A. Francescon & A. Barbaro. 2004. Haematological parameters in *Umbrina cirrosa* (Teleostei, Sciaenidae): a comparison between diploid and triploid specimens. Comparative Biochemistry and Physiology 138: 45– 51.
- Balon, E. K. 1981. Saltatory processes and altricial to precocial forms in the ontogeny of fishes. American Zoologist 21: 573-596.

- Barnabé, V.H. 1994. Artificial insemination using two different diluents. Buffalo Journal Supplement 2: 83-86.
- Basavaraju, Y., G. C. Mair, H. M. Kumar, S. P. Kumar, G. Y. Keshavappa, & D. J. Penman. 2002. An evaluation of triploidy as a potential solution to the problem of precocious sexual maturation in common carp, *Cyprinus carpio*, in Karnataka, India. Aquaculture 204: 407-418.
- Benfey, T. J. 1991. The physiology of triploid salmonids in relation to aquaculture. Canadian Technology Fisheries and Aquatic Sciences. 1789: 73-80.
- Benfey, T. J. 1999. The physiology and behavior of triploid fishes. Reviews Fisheries Sciences 7: 39–67.
- Benfey, T. J. 2001. Use of sterile triploid Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) for aquaculture in New Brunswick, Canada. Journal of Marine Science 58: 525-529.
- Benfey, T. J. & E. M. Donaldson. 1988. Triploidy in the culture of Pacific Salmon. 549-554. En: Proc. Aquaculture International Congress, Vancouver, Canada: Sept. 6-9, 1988.
- Benfey, T., E. L. McCabe & P. Pepin. 1997. Critical thermal maxima of diploid and triploid brook charr, *Salvelinus fontinalis*. Environmental Biology of Fishes 49: 259-264.
- Benfey, T. J., M. A. Sutterlin & R. J. Thompson. 1984. Use of erythrocyte measurement to identify triploid salmonids. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 41: 980-984.
- Brydges, K. & T. J. Benfey. 1991. Triploid brown trout (*Salmo trutta*) produced by hydrostatic pressure shock. Bulletin of the Aquaculture Association of Canada. 91-3.
- Cal, R. M., S. Vidal, C. Gómez, B. Álvarez-Blázquez, P. Martínez & F. Piferrer. 2005. Growth and gonadal development in diploid and triploid turbot (*Scophthalmus maximus*). Aquaculture 251: 99-108.
- Carter, C. G., I. D. McCarthy, D. F. Houlihan, R. Johnstone, M. V. Walsingham, & A. I. Mitchell. 1994. Food consumption, feeding behaviour, and growth of triploid and diploid Atlantic salmon, *Salmo salar* L., parr. Canadian Journal of Zoology 72: 609-617.

- Cassani, J. R. & W. E. Caton. 1985. Induced triploidy in grass carp, *Ctenopharyngodon idella* Val. Aquaculture 46: 37-44.
- Chan, S. T. H. & W. S. B. Yeung, 1983. Sex-control and sex-reversal in fish under natural conditions. En: Fish Physiology. Hoar W.S., D.J. Randall and E.M. Donaldson, eds). Academic Press, New York pp. 171-222.
- Chernenko, E. V. 1986. Induction of triploidy in Pacific salmon (salmonidae). Scripta Technica, Inc. 124-130.
- Cherfas, N. B., B. Gomelsky, N. Ben-Dom, Y. Peretz & G. Hulata. 1994. Assessment of triploid common carp (*Cyprinus carpio*) for culture. Aquaculture 127: 11–18.
- Chourrout, D. 1988. Induction of gynogenesis, triploidy, and tetraploidy in fish. Atlas of science: Animal and plant Sciences, 65-70.
- Civera, R., J. L. Ortiz, S. Dumas, H. Nolasco, A. Álvarez, B. Anguas, R. Peña, M. Rosales, V. Carrasco, R. García & E. Goytortúa. 2002. Avances en la nutrición de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*). En: L.E. Cruz-Suárez, D. Ricque-Marie, M. Tapia- Salazar, M. G. Gaxiola-Cortés, N. Simoes (Eds.). Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 3 al 6 de Septiembre del 2002. Cancún, Quintana Roo, México.
- Colombo, L., A. Barbaro, A. Libertini, P. Benedetti, A. Francescon, & I. Lombardo. 1995. Artificial fertilization and induction of triploidy and meiogynogenesis in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. Journal of Applied Ichthyology 11: 118-125.
- Comai, L. 2006. The advantages and disadvantages of being polyploid. Genetics 6: 836-846.
- Devlin, R.H., & Y. Nagahama. 2002. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. Aquaculture 208: 191–364.
- Desrosiers, R. R., A. Gérard, J. M. Peignon, Y. Naciri, L. Dufresne, J. Morasse, C. Ledu, P. Phélipot, P. Guerrier & F. Dubé. 1993. A novel method to produce triploids embryos in bivalve molluscs by the use of 6-Dimethylaminopurine. Journal of Experimental Biology and Ecology 170: 29-43.

- Diaz, N. F., P. Iturra, A. Veloso, F. Estay & N. Colihueque N. 1993. Physiological factors affecting triploid production in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Aquaculture 114: 33-40.
- Don, J. & R. R. Avtalion. 1988. Comparative study on the induction of triploidy in tilapias, using cold- and heat shock techniques. Journal of Fish Biology 32: 665-672.
- Downing, S. L. & S. K. Allen Jr. 1987. Induced triploidy in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Optimal treatments with cytochalasin B depend on temperature. Aquaculture 61: 1-15.
- Dubé, P., J. M. Blanc, M. Chouinard & J. De la Noüe. 1990. Triploidy induced by heat shock in brook trout (*Salvelinus fontinalis*). Aquaculture 92: 621-624.
- Erickson, D. L., J. Hightower & G. Grossman. 1985. The relative Gonadal Index: An Alternative index for quantification of reproductive condition. Comp. Biochem. Physiol. 81a: 117-120.
- Espinosa, E., A. Josa, L. Gil & J. I. Martí. 2005. Triploidy in rainbow trout determined by computer-assisted analysis. Journal of experimental zoology 11: 1007-1012.
- Fast, A. W. 1998. Triploid Chinese Catfish. Aquafarmer information sheet. Center for Tropical and Subtropical Aquaculture 134.
- Flajšhans, M., M. Rodina, K. Halačka, L. Vetešník, D. Gela, V. Lusková & S. Lusk 2008. Characteristics of sperm of polyploid Prussian carp *Carassius gibelio* (Bloch). Journal of Fish Biology 73: 323–328.
- Felip, A., S. Zanuy, M. Carrillo, G. Martínez, J. Ramos & F. Piferrer. 1997. Optimal Conditions for the induction of triploidy in the sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). Aquaculture 152: 287-298.
- Felip, A., S. Zanuy, M. Carrillo & F. Piferrer. 1999. Growth and gonadal development in triploid sea bass (*Dicentrarchus labrax*) during the first two years of age. Aquaculture 173: 389-399.
- Felip, A., F. Piferrer, S. Zanuy & M. Carrillo. 2001. Comparative growth performance of diploid and triploid European sea bass over the first four spawning seasons. Journal of Fish Biology 58: 76-88.
- Futuyma, L. 2005. Evolution. 3ª edición. USA. 894 p.

- Galbreath, F. P., W. St. Jean, V. Anderson & G. H. Thorgaard. 1994. Freshwater performance of all-female diploid and triploid Atlantic salmon. Aquaculture 128: 41-49.
- Galindo, O. M., 1998. Efecto de la temperatura y la salinidad en parámetros poblacionales de *Pseudodiaptomus euryhalinus* Johnson (Crustacea: Copepoda: Calanoidea) en condiciones controladas. Tesis de Maestría. CICIMAR-IPN. 68 p.
- Garrido-Ramos, M., R. De la Herrán, R. Lozano, S. Cardenas, C. Ruiz-Rejón & M. Ruiz-Rejón. 1996. Induction of triploidy of gilthead seabream (*Sparus aurata*) by means of heat shock. Journal of Applied Ichthyology 12: 53-55.
- Gerald K. 2005. Cell and Molecular Biology: Concepts and Experiments, 4th edn. John Wiley and Sons, Hoboken, N. J. 599 p.
- Gervai, J., S., A. Péter, L. Nagy, L. Horváth & V. Csányi. 1980. Induced triploidy in carp, *Cyprinus carpio* L. Journal of Fish Biology 17: 667-671.
- Grier, H. J. & R. G. Taylor. 1998. Testicular maturation and regression in the common snook. Journal of Fish Biology, 53: 521-542.
- Gold, J. R. & R. Ellison. 1982. Silver staining for nucleolar organizing regions of vertebrate chromosomes. Stain Technology 58: 51-55.
- Grayeb del Alamo T. 2001. Efecto de la densidad en el crecimiento de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Percoidae: Serranidae) cultivada en jaulas flotantes. Tesis de Maestría. CICIMAR-IPN. 119 p.
- Haffray, P., J. S. Bruant, M. Facqueur & A. Fostier. 2005. Gonad development, growth survival and quality traits in triploids of the protandrous hermaphrodite gilthead seabream *Sparus aurata* (L.). Aquaculture 247: 107-117.
- Happe, A. E. Quillet & B. Chevassus. 1988. Early life history of triploid rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). Aquaculture 71: 107-118.
- Hasting, P. A. 1989. Protogynous hermaphroditism in *Paralabrax maculatofasciatus* (Pisces: Serranidae) Copeia 1: 184-188.
- Heemstra, P. C. 1995. Serranidae. EN: W. Fisher, F. Krupp, W. Schneider, C. Sommer; K. Carpenter y H. Niem. Eds. Guía FAO para la identificación de

- especies para los fines de pesca. Pacífico Centro-Oriente. Vol. III. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Rome. 1565-1613.
- Hegarty, J. M. & S. J. Hiscock. 2008. Genomic clues to the evolutionary success of review polyploid plants. Current Biology 18: 435-444.
- Hernández-Ibarra, N. K., R. M. Morelos, P. Cruz, C. E. Galindo-Sanchez, S. Ávila, J. L. Ramirez & A. M. Ibarra. 2010. Allotriploid genotypic assignment in abalone larvae by detection of microsatellite-recombinant genotypes. The American genetic association. 10: 1093.
- Holmerfjord, I. & T. Refstie. 1997. Induction of triploidy in Atlantic halibut by temperature shocks. Aquaculture international 5: 169-173.
- Johnson, R. M., J. M. Shrimpton, J. W. Heath & D. D. Heath. 2004 Family, induction methodology and interaction effects on the performance of diploid and triploid chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). Aquaculture 234: 123–142.
- Johnstone, R. 1985. Induction of triploidy in Atlantic salmon by heat shock. Aquaculture 49: 133-139.
- Kendall, Jr. A. W., E. H. Ahlstrom & H. G. Moser. 1984. Early Life history stages of fishes and their characters. 1: 1-22. En: H.G. Moser, W. J. R., D.M. Cohen, M. P. Fahay, A.W. Kendall jr y S. L. Richardson. Ontogeny and systematics of fishes association ichthyology herpetology special. 1.
- Kjørsvik E., K. Hoelhne-Reitan & K. I. Reitan. 2003. Egg and larval quality criteria as predictive measures for juvenile production in turbot (*Scophthalmus maximus* L.). Aquaculture 227: 9-20.
- Komen, A., Y. Uchimura, H. Ieyama & K. T. Wada. 1988. Detection of induced triploid scallop, *Chlamys nobilis*, by DNA microfluorometry with DAPI staining. Aquaculture 69: 201-209.
- Komen, H., G. H. Thorgaard. 2007. Androgenesis, gynogenesis and the production of clones in fishes: a review. Aquaculture 269, 150–173.
- Leary, R. F., F. W. Allendorf, K. L. Knudsen & G. H. Thorgaard. 1985. Heterozygosity and developmental stability in gynogenetic diploid and triploid rainbow trout. Heredity 54: 219-225.

- Lemoine, Jr. H. L. & L. T. Smith. 1980. Polyploidy induced in brook trout by cold shock. The American Fisheries Society 109: 626-631.
- Lincoln, R.F. & A. P. Scott. 1984. Sexual maturation in triploid rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. Journal of Fish Biology 25: 385–392.
- Lincoln, R. F., D. Aulstad & A. Grammeltvedt. 1974. Attempted triploid induction in Atlantic salmon (*Salmo salar*) using cold shocks. Aquaculture 4: 287-297.
- Linhart, O., M. Rodina, M. Flajšhans, N. Mavrodiev, J. Nebesarova, D. Gela & M. Kocour. 2006. Studies on sperm of diploid and triploid tench (*Tinca tinca* L.). Aquatic International 14: 9–25.
- Liu, S., K. Sezaki, K. Hashimoto, H. Kobayasi, M. Nakamura. 1978. Simplified techniques for determination of polyploidy in ginbuna *Carassius auratus langsdorfi*. Bulletin Japanese Society of Sciences and Fisheries. 44: 601–606.
- Longo, F. K. 1972. The effects of cytochalasin B on the events of fertilization in the surf clam, *Spisula solidissima*. Journal of Experimental Zoology 182: 322-344.
- Lluch-Cota, D. 1995. Aspectos reproductivos de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Pisces:Serranidae) en Bahía Magdalena-Almejas, B.C.S., México. Tesis de Maestría. CICIMAR-IPN. 171 p.
- Lou, Y. D. & C. E. Purdom. 1984. Polyploidy induced by hydrostatic pressure in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. Journal of Fish Biology 25: 345-351.
- Mable, K. B. 2003. Breaking down taxonomic barriers in polyploidy research. TRENDS in plants science 8: 582-590.
- Mable, B. K. 2004. Why polyploidy is rarer in animals than in plants: myths and mechanisms. Biological Journal of the Linnean Society 82: 453–466.
- Manning, A. J., M. P. Burton & L. W. Crim. 2004. Reproductive evaluation of triploid yellowtail flounder, *Limanda ferruginea* (Storer). Aquaculture 242: 625-640.
- Martínez-Brown, J. M. 2007. Efecto del nivel de inclusión de ácidos grasos esenciales y proteína en el alimento de reproductores de Cabrilla arenera *paralabrax Maculatofasciatus* (Percoidei: Serranidae) sobre la calidad de las primeras fases de vida. Tesis de maestría. CICIMAR-IPN. 99pp.
- Martínez-Díaz, S. F., R. Martínez-Pecero, M. O. Rosales-Velázquez, R. Alvarado-Castillo, H. Pérez-España & J. Tucker, Jr.. 2001. Voluntary spawning, early

- development and completion of the life cycle of spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus* in the laboratory. Journal of the World Aquaculture Society 32: 122-129.
- Matus-Nivón, E., R. Ramírez-Sevilla, J. L. Ortiz-Galindo, R. Martínez-Pecero & B. González-Acosta. 1990. Potencial Acuacultural de ocho especies de peces marinos del Pacífico mexicano, con base a su biología temprana. Revista de Biología Tropical 37: 115-125.
- Maxime, V. 2008. The physiology of triploid fish: Current knowledge and comparisons with diploid fish. Fish and Fisheries 9: 67-78.
- Miller, D. J. & R. N. Lea. 1972. Guide to the coastal marine fishes of California. California Fish Bulletin, USA, 157: 249 p.
- Molnar, S. 2000. The evolution of polyploidy. Biological Journal of the Linnean Society 82: 454-460.
- Nagahama, Y. 1983. The functional morphology of teleost gonads. 223-276. EN: W.S. Hoar y D.J. Randall Eds. Fish Physiology. Vol. IXA. Reproduction, Endocrine Tissues and Hormones. Academic Press, Inc.
- Nagahama, Y. 1994. Endocrine regulation of gametogenesis in fish. International Journal of Developmental Biology 38: 217-229.
- Nai-Hsien, Ch., H. Hui-Wen, H. Hung-yu, L. Wen-Hsin & L. Chiu. 1993. Studies on methods of triploidy percentage analysis. TML conference proceedings 3: 203-210.
- Nelson, J. S. 1994. Fishes of the world. John Wiley & Sons, inc. USA. 600 p.
- Ocampo, C. J. A. 2002. Desarrollo gonádico y actividad reproductiva de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Teleostei: Serranidae) en la Bahía de La Paz, Baja California Sur. Tesis de Maestría. CICIMAR-IPN. 78 p.
- Oda, D. L., R. J. Lavenverg & M. Rounds. 1993. Reproductive biology of the three California species of *Paralabrax* (Pisces: Serranidae). Californian Cooperative for Oceanic Fish Investigations 34: 122-132.
- Ojolic, E. J., R. Cusack, J. T. Benfey & S. R. Kerr. 1995. Survival and growth of all-female diploid and triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) reared at chronic high temperature. Aquaculture 131: 177-187.

- Oliva-Teles, A. & S. J. Kaushik, 1990. Effect of temperature on utilization of endogenous reserves during embryonic development of diploid and triploid rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). Aquaculture 84: 373-382.
- Omoto, N., M. Maebayashi, A. Adachi, K. Arai & K. Yamauchi. 2005. Sex ratios of triploids and gynogenetic diploids induced in the hybrid sturgeon, the bester (*Huso huso* female x *Acipenser ruthenus* male). Aquaculture 12: 54-62.
- Oppedal, F., G. L. Taranger, & T. Hansen. 2003. Growth performance and sexual maturation in diploid and triploid Atlantic salmon (*salmo salar* L.) in seawater tanks exposed to continuous light or simulated natural photoperiod. Aquaculture 215: 145-162.
- Ortiz-Galindo, J. L. 1991. Ontogenia inicial de la mojarra rayada *Ugerres axillaris* Gunther, 1864. Tesis de Maestría. CICIMAR-IPN. 54pp.
- Otto, P. S. 2007. The Evolutionary Consequences of Polyploidy. Cell 131: 452-462.
- Peña Martínez, R. 2005. Estudios de la función digestiva en larvas de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*): aspectos alimenticios y sus aplicaciones prácticas. Tesis de doctorado en ciencias marinas. CICIMAR-IPN. 139 p.
- Piferrer, F., R. M. Cal, R., Álvarez-Blázquez, B., Sánchez, & P. Martínez. 2000. Induction of triploidy in the turbot (*Scophthalmus maximus*) I. ploidy determination and the effects of cold shocks. Aquaculture 188: 79-90.
- Piferrer, F., R. M. Cal, C. Gómez, C. Bouza & P. Martínez. 2003. Induction of triploidy in the turbot (*Scophthalmus maximus*) II. Effects of cold shock timing and induction of triploidy in a large volume of eggs. Aquaculture 220: 821-831.
- Piferrer, F. B. Beaumont, C. J. Falguière, C. Flajšhans, D. M. Haffray & L. Colombo. 2009. Polyploid fish and shellfish: Production, biology and applications to aquaculture for performance improvement and genetic containment. Aquaculture 293: 125–156
- Puente-Carreón, E. 2004. Inducción a la triploidía en el camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). Tesis de Maestría. CICIMAR-IPN. 50 p.
- Qin, J. G., A. W. Fast & H. Ako. 1998. Growout performance of diploid and triploid chinese catfish *Clarias fuscus*. Aquaculture 166: 247-258.

- Quillet, E., B. Chevassus, J. M. Blanc, F. Krieg, D. Chourrout. 1988. Performances of auto and allotriploids in salmonids. I. Survival and growth in fresh water farming. Aquatic Living Resources 1: 29–43.
- Refstie, T., V. Vassvik & T. Gjedrem. 1977. Induction of poliploidy in salmonids by Cytochalasin B. Aquaculture 10: 65-74.
- Rideout R. M., E. A. Trippel & M. K. Litvak. 2004. Predicting haddock embryo viability based on early cleavage patterns. Aquaculture 230: 215-228.
- Rodríguez-Gutiérrez, M. 1992. Técnicas de evaluación cuantitativa de la madurez gonádica en peces. AGT, México. 79 p.
- Rosales-Velázquez, M. O. 2008. Efecto de la 17 α -metilttestosterona en la diferenciación sexual de juveniles de *Paralabrax maculatofasciatus* (steindachner, 1868) (Teleostei: Serranidae). Tesis de doctorado en ciencias marinas. CICIMAR-IPN. 104 p.
- Ruiz-Verdugo, C. A. 2000. Triploidía en almeja catarina (*Argopecten ventricosus*, Sowerby 1842): Inducción, crecimiento, gametogénesis y composición bioquímica. Tesis de Doctorado. CIBNOR. 103 p.
- Ryan, P. F., 2006. Genomic creativity and natural selection: a modern synthesis. Biological journal of the Linnean Society 88: 655-672.
- Saddler, J., R. M. Wells, M. P. Pankhurst & N. W. Pankhurst. 2000. Blood oxygen transport, rheology and haematological responses to confinement stress in diploid and triploid Atlantic salmon, *Salmo salar*. Aquaculture 184: 349-361.
- Sadovy, Y. & D. J. Shapiro. 1987. Criteria for the diagnosis of hermaphroditism in fishes. Copeia 1: 136-156.
- Sanchez-Gallegos, J. 2006. Organogénesis del sistema reproductor de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Percoidei: Serranidae) desde larva Hasta juvenil. Tesis de maestría. CICIMAR-IPN. 63 p.
- Shelton, C. J., A. G. MacDonald & R. Johnstone. 1986. Induction of triploidy in rainbow trout using Nitrous Oxide. Aquaculture 58: 155-159.
- Shields R.J., N. P. Brown & N. R. Bromage 1997. Blastomere morphology as a predictive measure of fish egg viability. Aquaculture 155: 1-12.

- Sinnot, E. W., L. C. Duna & T. Dobzhansky. 1977. Principios de Genética. Ed. Omega. España. 581 p.
- Small, S. A. & J. T. Benfey. 1987. Cell size in triploid salmon. Journal of Experimental Zoology, 241: 339-342.
- Smith, L. T. & H. L. Lemoine. 1979. Colchicine-induced polyploidy in brook trout. The progressive Fish-Culturist 41: 86-88.
- Smith C. A., K. N. Roeszler, Q. J. Hudson & A. H. Sinclair. 2007. Avian sex determination: what, when and where?. Cytogenetic and Genome Research. 117: 165–73.
- Solar, I. I., E. M. Donaldson & G. A. Hunter. 1984. Induction of triploidy in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) by heat shock, and investigation of early growth. Aquaculture 42: 57-67.
- Sokal R.R. & F. J. Rohlf. 1998. Biometry, 3rd Edn. W. H. Freeman and Company, USA. 887 p.
- Sultana R. M. 2005. Prediction of larval viability based on egg quality parameters and early cleavage patterns in the experiments of triploidy induction in Atlantic cod, *Gadus morhua* L. Tesis de Maestría. University of Tromso, Norway. 52 p.
- Szöllösi, M. S., J. Z. Kubiak P. Debey, H. De Pennart, D. Szöllösi & B. Maro. 1993. Inhibition of protein kinases by 6-dimethylaminopurine accelerates the transition to interphase in activated mouse oocytes. Journal of Cell Science 104: 861-872.
- Thomas, P. & R. Morrison. 1995. A method to asses triploidy in swim-up rainbow trout. Autasia Aquaculture 9: 62-63.
- Thompson, B. Z., R. J. Wattendorf, R. S. Hestand & J. L. Underwood. 1987. Triploid grass carp production. The progressive Fish-Culturist 49: 213- 217.
- Thorgaard, G.H., 1983. Chromosome set manipulation and sex control in fish. EN: Hoar, W. H., Randall, D.J., E. M. Donaldson (Eds.), Fish Physiology, Vol. IXB. Academic Press, New York, 405–434.
- Thorgaard, G. H. 1986. Ploidy manipulation and performance. Aquaculture 57: 57-64.
- Thorgaard, G. H., M. E. Jazwin & A. R. Stier. 1981. Polyploidy induced by heat shock in rainbow trout. The American Fisheries Society 110: 546-550.

- Thorgaard, G. H., P. S. Rabinovitch, M. W. Shen, G. A. Gall, J. Propp & F. M. Utter. 1982. Triploid rainbow trout identified by flow cytometry. Aquaculture 29: 305-309.
- Thorpe, H. P., B. S. Gonzalez & R. Rothstein. 2007. More is not always better: the genetic constraints of polyploidy. Trends in Genetics 8: 546-552.
- Tiwary, B. K., & A. K. Ray. 2000. Gonadal development in triploid *Heteropneustes fossilis*. Journal of Fish Biology 57: 1343-1348.
- Tiwary, B. K., R. Kirubakaran & A. K. Ray. 2004. The biology of triploid fish. Reviews in Fish Biology and Fisheries 14: 391-402.
- Tucker, J. W. 1998. Marine fish culture. Kluwer Academic Publisher. USA. 736 p.
- Turner, B. S. (Ed.). 1984. Evolutionary genetics of fishes. Plenum Press. USA. 636 p.
- Tyler, C. R. & J. P. Sumpter. 1996. Oocyte growth and development in the teleost. Reviste of Fish Biology and Fisheries 6: 287-318.
- Utter, F. M., O. W. Johnson, G. H. Thorgaard & P. S. Rabinovitch. 1983. Measurement and potential applications of induced triploidy in Pacific salmon. Aquaculture 35: 125-135.
- Vallin L. & A. Nissling. 1998. Cell morphology as an indicator of viability of cod egg – results from an experimental study. Fisheries Research 38: 247-255.
- Valenti, R. J. 1975. Induced polyploidy in *Tilapia aurea* (Steindachner) by means of temperature shock treatment. Journal of Fish Biology 7: 519-528.
- Villee, C. A. & V. G. Dethier. 1976. Biological principles and processes. W. B. Saunders Company. USA. 999 p.
- Voronina E. & G. M. Wessel. 2006. Activator of G-protein signaling in asymmetric cell divisions of the sea urchin embryo. Development Growth and Differentiation 48: 549-557.
- Winchester, A. M. 1981. Genética. Compañía Editorial Continental. Tercera Edición. México. 576 p.
- Withler, R. E., C. W. Clarke, J. Blackburn & I. Baker. 1998. Effect of triploidy on growth and survival of pre-smolt and post-smolt coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). Aquaculture 168: 413-422.

- Wolters, W. R., G. S. Libey & C. L. Chrisman. 1982. Effect of triploidy on growth and gonad development of channel catfish. Transaction of the American Fisheries Society 111: 102–105.
- Zhang, Q. & K. Arai. 1999. Aberrant meioses and viable aneuploid progeny of induced triploid loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) when crossed to natural tetraploids. Aquaculture 175: 63-76.
- Zhenmin, B., Z. Quanqi, W. Hai & D. Jixon. 1994. Cytochalasin B induced triploidy in *Penaeus chinensis*. China Oceanic Press 13: 261-267.
- Zohar, Y. & C. Mylonas. 2001. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: From hormones to genes. Aquaculture 197: 99-136.

Anexo 1.

Tabla 1. Tercer factorial. Porcentajes de supervivencia de las larvas expuestas al shock (ST) y supervivencia de las larvas del grupo control (SC) (Promedio \pm E. Std).

		ST	SC
Hembra 1	<i>Macho 1</i>	56.2 \pm 2.1 ^a	68.9 \pm 2.1
	<i>Macho 2</i>	49.6 \pm 3.4 ^a	61.4 \pm 4.0
	<i>Macho 3</i>	60.4 \pm 1.9 ^a	69.3 \pm 4.1
Hembra 2	<i>Macho 1</i>	59.9 \pm 2.6 ^a	60.8 \pm 6.2
	<i>Macho 2</i>	53.1 \pm 1.0 ^a	59.3 \pm 6.0
	<i>Macho 3</i>	58.9 \pm 4.8 ^a	67.4 \pm 3.1
Hembra 3	<i>Macho 1</i>	54.1 \pm 3.1 ^a	58.9 \pm 2.0
	<i>Macho 2</i>	48.3 \pm 3.9 ^a	59.8 \pm 3.5
	<i>Macho 3</i>	61.3 \pm 3.1 ^a	61.9 \pm 2.1