



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS  
DEL NOROESTE, S.C.

---

---

Programa de Estudios de Posgrado

**Poliploidía en moluscos de importancia comercial (almeja catarina *Argopecten ventricosus* Sowerby II, 1842; almeja mano de león *Nodipecten subnodosus* Sowerby 1835; y abulón rojo *Haliotis rufescens* Swainson 1822).**

## **T E S I S**

Que para obtener el grado de

**Doctor en Ciencias**

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales  
(Orientación en Acuacultura)

p r e s e n t a

**Rosalío Maldonado Amparo**

La Paz, B.C.S. Diciembre del 2003

## CONFORMACIÓN DE COMITES

### La presente tesis fue dirigida por:

- Dra. Ana María Ibarra Humphries. Genética Acuícola. CIBNOR.

### El comité tutorial fue integrado por:

- Dra. Gabriela del Valle Pignataro. Genética Acuicola. CIAD.
- Dr. Miguel Angel del Río Portilla. Genética Poblacional. CICESE.
- Dr. Ricardo Pérez Enríquez. Genética Poblacional. CIBNOR
- Dra. Ana María Ibarra Humphries. Genética Acuícola. CIBNOR.
- Dr. Standish K. Allen. Genética Acuícola. VIMS.

### El comité sinodal fue integrado por:

- Dra. Gabriela Del Valle Pignataro. Genética Acuícola. CIAD.
- Dr. Miguel Angel del Río Portilla. Genética Poblacional. CICESE.
- Dr. Ricardo Pérez Enríquez. Genética Poblacional. CIBNOR
- Dra. Ana María Ibarra Humphries. Genética Acuícola. CIBNOR.
- Dr. Standish K. Allen Jr. Genética Acuícola. VIMS.
- Dr. Ilie Sava Racotta Dimitrov. Fisiología Metabólica. CIBNOR

## PREFACIO

El presente trabajo se realizó en el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C., como requisito para obtener el grado de Doctor en Ciencias en el Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales con Orientación en Acuicultura.

La presente tesis esta basada en los siguientes artículos:

1. Maldonado A. R., A.M. Ibarra, J.L. Ramírez, S. Avila, J.E. Vazquez and L.M. Badillo. Induction of triploidy in Pacific red abalone (*Haliotis rufescens*). *Journal of Shellfish Research*, 20 (3): 1071-1075, 2001.
2. Maldonado-Amparo, R. and A. M. Ibarra. Ultrastructural characteristics of spermatogenesis in diploid and triploid catarina scallop (*Argopecten ventricosus* Sowerby II, 1842). *Journal of Shellfish Research* 21(1): 93-101, 2002.
3. Maldonado-Amparo, R. and A. M. Ibarra. Comparative analysis of oocyte type frequencies in diploid and triploid catarina scallop (*Argopecten ventricosus*) as indicators of meiotic failure. *Journal of Shellfish Research* 21(2): 597-603, 2002.
4. Maldonado A.R., A.M. Ibarra and J.L. Ramírez. Induction to tetraploidy in catarina scallop, *Argopecten ventricosus* (Sowerby II, 1842). *Ciencias Marinas* 29(2): 229-238, 2003.
5. Maldonado-Amparo R., J.L. Ramírez, S. Avila and A.M. Ibarra. Triploid lion-paw scallops (*Nodipecten subnodosus*); growth, gametogenesis, and gametic cell frequencies, when grown at a high food availability site. *Aquaculture*, 2003 (sometido).

## **DEDICATORIA**

**A un Angelito que está en el cielo "*mi hija Marysol*"**

A mi hijo Bryan, al bebé y a mi esposa Nora Laura

A mis padres Ma. Bárbara Amparo y Catarino Maldonado

y a mis hermanos Silvia Severa (Blanca), Sonia Simona (Morena),

Adriana, Fermina, Elías, Edith y Antonio.

## AGRADECIMIENTOS

De manera muy especial expreso mi agradecimiento a mi directora de tesis la Dra. Ana María Ibarra Humphries por su paciencia, dedicación y apoyo para sacar adelante esta tesis y por brindarme una excelente formación desde la maestría.

Hago patente mi agradecimiento al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. por permitirme el acceso a todas sus instalaciones y por la excelente formación académica que me dio. A todas las personas que laboran en él, al área de Posgrado (Lic. Leticia Gonzalez, Lic. Osvelia Ibarra, Manuel Melero, Horacio Sandoval y Bety) por todo su apoyo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y a la Dirección General de Educación en Ciencia y Tecnología del Mar (DGECyTM) por su apoyo económico. La presente tesis fue financiada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, a través de un proyecto de la Dra. Ana María Ibarra Humphries (CONACYT-28256-B).

A mi comité tutorial por su apoyo y orientaciones: Dra. Ana María Ibarra Humphries, Dra. Gabriela del Valle, Dr. Ricardo Pérez, Dr. Miguel Ángel del Río y Dr. Standish Allen. Al Dr. Thomas Famula de UC Davis por sus consejos en análisis estadísticos de un artículo. Al Dr. Ilie Sava Racotta por sus consejos acertados. Dra. Elena Palacios por sus sugerencias para un manuscrito. Ellis Glazier por sus correcciones del Inglés.

Todo el desarrollo de este trabajo de investigación fue posible gracias al apoyo de muchas personas. Agradezco al grupo de Genética Acuícola del CIBNOR por su ayuda y apoyo durante todo el trabajo: Dra. Ana María Ibarra Humphries, Susana Ávila, Gabriel González, J. Manuel Macklitz y en particular a José Luis Ramírez Arce por su apoyo en el trabajo de campo y laboratorio. Al soporte técnico histológico: Carmen Rodríguez, Sofia Ramos, Teresa Arteché, Norma Olgún. Al personal de biblioteca: Ana María Talamantes, Edgar Yuen, Esther Ojeda, Antonio Díaz "Tony" y Susana. Al departamento de diseño gráfico: Gerardo Hernández, Sergio Rosas y Adriana Landa.

Al Departamento de Microscopía Electrónica del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, Dr. Mark West, Rodolfo Paredes y Jorge Sepúlveda.

A las personas que participaron en el trabajo de campo en el Estero de Rancho Bueno, Don Fructoso García, Héctor García "Patol", Manolo Romero, Víctor Polo y José Luis Ramírez.

A la granja Abulones Cultivados, J. Enrique Vázquez, Leticia M. Badillo, Mercedes y "El Campanita", por permitirme el acceso a sus instalaciones, por todo el soporte técnico y la donación de los organismos.

Así mismo al clan Arcos-Pérez (Fabiola y Dr. Carlos), Martín Suárez, Armando Monge, Diana Carreño, Dr. Cesar Ruiz-Verdugo, Dr. Pedro Cruz, Minerva Cerros, Dulce, Memo, Martín Martínez y al Dr. Edilmar Cortés.

Al Dr. S.K. Allen y Aime Howe, del Instituto de Ciencias Marinas de Virginia, por el análisis de muestras por citometría de flujo al inicio de la tesis.

A los compañeros del CIB-Guaymas: Dr. Marco Linne Unzueta, Dr. Alberto Aragón, Dra. Juana López, MC Marcos Porchas y a “Chico”.

A mis compañeros y amigos de trabajo del CETMAR-Guaymas, Biol. Jorge I. Díaz Galaviz, Tec. Narciso Corona Palos, MC Adriana López, Lic. Teresita de Jesús Ramos, Sra. Georgina Barrera, Ing. José Luis Cruz, Ing. Martín Cervantes, Ing. Santos Mercado, Georgina Barrera, Prof. Juan Ramírez, los de “Cancún”: Prof. M. A. Y. Moroyoqui, Prof. Ismael García, Ing. Anastasio Catzin, Lic. G. Jiménez, Lic. Sara Valle, Lorena Atwuel y a todo el personal que en él labora por su apoyo.

A mis padres María Bárbara y Catarino por su apoyo moral en todo momento, así como a mis hermanos Blanca, Morena, Adriana, Fermina, Elias, Edith y Antonio.

**A mi angelito "Marysol" que nunca pude darle el tiempo debido, por siempre será mi inspiración.** A mi hijo Bryan, el bebé y a mi esposa Nora Laura.

A todas aquellas personas que de alguna forma contribuyeron para la culminación de este trabajo.

Y sobre todo a Dios.

## ÍNDICE GENERAL

Acta de revisión de tesis.....	i
Conformación de comités.....	ii
Prefacio.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos.....	v
Índice de Figuras.....	ix
Índice de Tablas.....	xiii
Lista de abreviaturas.....	xv
Resumen.....	xvi
Abstract.....	xx
Introducción.....	1
Antecedentes.....	4
Triploidía en moluscos.....	4
Características generales del triploide.....	10
Problemática actual en la producción de triploides.....	15
Tetraploides en moluscos.....	16
Características generales del tetraploide.....	19
Bases del conocimiento celular asociado con la inducción a la poliploidía.....	20
Justificación.....	37
Objetivos.....	40
Literatura citada.....	41
Capítulo I. Efecto de la triploidía sobre la estructura y abundancia de diferentes estadios de desarrollo gaméticos en la almeja catarina.....	47
Sección 1: Características ultraestructurales de la espermatogénesis en diploides y triploides de la almeja catarina ( <i>Argopecten ventricosus</i> Sowerby II, 1842).....	48
Sección 2: Análisis comparativo de la frecuencia del tipo de ovocito en diploides y triploides de almeja catarina ( <i>Argopecten ventricosus</i> ) como indicador de arresto meiótico.....	74
Capítulo II. Evaluación de tres modalidades para la inducción a la tetraploidía en almeja catarina ( <i>Argopecten ventricosus</i> Sowerby II, 1842), con fines de producir tetraploides viables.....	93
Sección 1: Inducción a la tetraploidía en la almeja catarina, <i>Argopecten ventricosus</i> (Sowerby II, 1842).....	94
Capítulo III. Evaluación de la inducción a la triploidía en almeja mano de león ( <i>Nodipecten subnodosus</i> Sowerby, 1835) y sus efectos sobre el crecimiento y gametogénesis.....	113
Sección 1: Almeja mano de león triploide ( <i>Nodipecten subnodosus</i> ); crecimiento, gametogénesis, y frecuencia de células gaméticas.....	114
Capítulo IV. Evaluación de la inducción a la triploidía con diferentes concentraciones en abulón rojo <i>Haliotis rufescens</i> (Swainson, 1822).....	148
Sección 1: Inducción a la triploidía en abulón rojo del Pacífico ( <i>Haliotis rufescens</i> ).....	149
Discusión General.....	167

Conclusiones.....	192
Perspectivas.....	194
Literatura citada.....	196



## ÍNDICE DE FIGURAS

### Introducción.

- Fig. 1. Este diagrama circular representa un solo ciclo celular. El tiempo de generación, es el lapso necesario para completar un ciclo, comprende la división celular (mitosis y citocinesis) y la interfase. (Tomado de Herskowitz, 1987).....22
- Fig. 2. Esquema de la mitosis. Tomado de Hartl (1991)..... 23
- Fig. 3. Esquema de la meiosis. Tomado de Hartl (1991).....25
- Fig.4. Subestadios de profase de la primera división meiótica en microsporocitos de un Lily (*Lilium longiflorum*) A. Leptoteno, en el que la condensación de los cromosomas es iniciada y los cromómeros son visibles a lo largo de la longitud de los cromosomas. B. Cigoteno, en este subestadio ocurre el apareamiento (sinapsis) de los cromosomas homólogos. Regiones pareadas y no pareadas pueden observarse particularmente en la parte baja izquierda de esta fotografía. C. Paquiteno, ocurren los “crossing-over” entre los cromosomas homólogos. D. Diploteno, caracterizado por la repulsión mutua de los cromosomas homólogos pareados que quedan unidos en uno o más puntos (quiasmas) a lo largo de su longitud. E. Diacinesis, en el que los cromosomas alcanzan su máxima contracción. F. Cigoteno, (en magnificación alta en otra célula), mostrando homólogos pareados y emparejamiento de cromosomas durante la sinopsis. [Cortesía de Marta Walters (A,B,C,E,F) y Herbert Stern (D).] Tomada de Hartl (1991).....27
- Fig. 5. Representación esquemática de la inhibición del primer cuerpo polar para producir cigotos triploides, en ovocitos normales. Esquema diseñado por A. M. Ibarra.....32
- Fig. 6. Representación esquemática de la inhibición del segundo cuerpo polar para producir cigotos triploides en ovocitos normales. Esquema diseñado por A. M. Ibarra.....33
- Fig. 7. Representación esquemática de la inhibición de la primera división metótica, para producir cigotos tetraploides. Esquema diseñado por A.M. Ibarra. ....34
- Fig. 8. Representación esquemática de la inhibición del primer cuerpo polar, donde resultan cigotos tetraploides de forma “accidental”. Esquema diseñado por A. M. Ibarra.....35
- Fig. 9. Representación esquemática de la inhibición del primer cuerpo polar en ovocitos de triploides, fecundados con espermias haploides para producir cigotos tetraploides (Guo y Allen, 1994b). Esquema diseñado por A. M. Ibarra.....36

### Capítulo 1, Sección 1

- Fig. 1. Diploid and triploid light photomicrographs. A. Diploid female and male gonads in advanced stages of gametogenesis. B. Triploid female and male parts of the gonad at 9 months old. C. Diploid male portion of the gonad in advanced stage of spermatogenesis. D. Triploid male part of the gonad with few spermatogenic stages developing.....55
- Fig. 2. Diploid gonad structure and ultrastructure. A. Light microscopy (LM) of male acinus with spermatogonia (Spg) attached to the wall (W), spermatocytes (Spc), and spermatozoa (Spz). B. TEM of spermatogenic stages: Spg, Spc, spermatid (Spm), and Spz. C. TEM of primary spermatocyte with multiple mitochondria (Mi) and

- Golgi bodies (Gb). D. TEM of Spm with mitochondria at posterior pole, transversal cuts of flagella (Fl).....57
- Fig. 3. Diploid spermatozoa ultrastructure. A. TEM of section through a spermatozoon head, showing acrosome (Ac), anterior invagination (Ai), nucleus (Nu), and two cross-sections of mitochondria (Mi). B. TEM section of spermatozoa mid-part; posterior invagination (Pi), proximal centriole (Pc), distal centriole (Dc), glycogen granules (Gi), mitochondria (Mi) and flagella (Fl). C. TEM of transverse section through the mid-part of spermatozoa showing five cross-sections of mitochondria at most. D. TEM of transverse section through flagella showing the classical structure of 9 external microtubule doublets (Md), and 2 internal.....59
- Fig. 4. Triploid structure and ultrastructure of male part of the gonad. A. LM of section through a male acinus with few spermatogonia (Spg) by the wall (W), spermatocytes (Spc), and spermatozoa (Spz). B. Scanning electron microscopy (SEM) of spermatozoa found in male acinus, with electron dense nucleus (Nu), acrosome (Ac), mitochondria (Mi) at the base, and flagella (Fl). C-D. TEM of section through a male acinus with spermatocytes (Spc1), spermatogonia (spg) and haemocyte (He).....61
- Fig. 5. Triploid structure and ultrastructure showing degeneration of male spermatogenic stages. A. LM of section through a male acinus with spermatogonia (Spg) and spermatocytes (Spc) closet to the wall, and acinus filled with haemocytes (He). B. LM of connective tissue (Ct) at acinus wall with He. C. TEM of Spc in degeneration process (Dsc), surrounded by multiple He. D. TEM at larger amplification of He and Dsc.....63
- Fig. 6. Gonad structure and ultrastructure of 12-mo old scallops. A. LM of male part of gonad in triploid occupied with female acini with oocyte development. B. TEM of oocytes in male part of the gonad of a triploid, showing nucleus (Nu), vitelline inclusions (Vi), cortical granules (Cg), and vitelline coat (Vc). C. TEM of oocytes from a diploid scallop with the same structure than that in triploids.....64

## Capítulo 1, Sección 2

- Fig. 1. Diploid oocyte in catarina scallop. Light microscopy (100X). A) Oogonia (Og); B) Previtellogenic oocytes in zygotene-pachytene (Prev zy-pa); C) Previtellogenic oocyte in diplotene (Prev di); D) Vitellogenic oocyte; E) Postvitellogenic oocyte; F) Mature oocyte. AC = auxiliary cells; Ch = chromosomes in metaphase; CT = connective tissue; Cy = cytoplasm; Nc = nucleolus; Nu = nucleus; VE = vitelline envelope.....81
- Fig. 2. Triploid oocytes in catarina scallop. Light microscopy. A) Oogonia (Og), and large numbers of previtellogenic oocytes in zygotene-pachytene (Prev zy-pa) (40X). B) Closer view of Prev zy-pa (100X). C) Isolated vitellogenic oocyte (Vit) (40X). D) Isolated postvitellogenic oocyte (Postv) (40X). LC = Cell lysis.....83
- Fig. 3. Diploid (left) and triploid (right) catarina scallop female gonad structure at 81d (A & B), 118d (C & D), and 205d (E & F) of grow out. Light microscopy (20X). In diploids at 81 d (A) there were abundant vitellogenic oocytes (Vit), and few previtellogenic (Prev); by 118d (C) postvitellogenic oocytes (Postv) were abundant;

by 205d (E) some mature oocytes (Mat) were also present. In triploids previtellogenic oocytes were the most common type at all ages although a few vitellogenic (B) were already present at 81d, increasing in numbers by 118d (D); some postvitellogenic oocytes were evident by 205d (F).....84

Fig. 4. Frequencies of oocyte types (oogonia, previtellogenic, vitellogenic) per scallop in both, diploids and triploids, at each of the evaluated ages.....86

Capítulo 3, Sección 1

Fig. 1 Percent survival (a) and triploid success (b) (arcsine transformed) observed for the untreated control and different CB concentrations (0.5, 0.75, 1.0 mg/l) in D-larvae, pediveliger, and spat stages of *Nodipecten subnodosus*. Different capital letters indicate differences between CB concentrations or differences between larval stages (bold). Different small letters indicate differences between treatments.....1.26

Fig. 2 Growth in shell length, shell width, total weight, tissue weight, adductor muscle weight, gonad weight, and muscle and gonad indices for triploids (continuous line), treated diploids (dashed line), and diploid controls (dotted line) of *Nodipecten subnodosus* during the experimental period of 21 mo. Means of 3 replicates ( $n=11$ ) per group, per month (May, June, August, October, and December for 2001, and February, April, June, July, August, October, and December for 2002).....128

Fig. 3 Gametogenesis processes in the female and male gonad parts of diploid and triploid *Nodipecten subnodosus* during a 21 mo grow-out period. Monthly samples of 5 gonads from each replicate within each control and treated groups were observed.....130

Fig. 4 Female gametogenic stages for diploids (A, C, E) and triploids (B, D, F) *Nodipecten subnodosus*. Beginning of oogenesis in (A) diploids with oogonia (o), previtellogenic oocytes (prev), and a few vitellogenic oocytes (vo), and (B) triploids with oogonia and previtellogenic oocytes. Advanced stages of oogenesis in (C) diploids with large numbers of vitellogenic (vo) and postvitellogenic oocytes (pvo), and in (D) triploids showing mostly previtellogenic oocytes (prev) and few vitellogenic oocytes (vo). Final stages of oogenesis, with (E) diploids being spawned, and still having some postvitellogenic oocytes (pvo), and (F) triploids showing empty acini, still with previtellogenic oocytes (prev).....132

Fig. 5 Male gametogenic stages for diploids (A, C, E) and triploids (B, D, F) *Nodipecten subnodosus*. Beginning of spermatogenesis in (A) diploids with spermatogonia (spg), spermatocytes (spc), and a few spermatids (spt), and (B) triploids showing only spermatogonia and spermatocytes. Advanced stages of spermatogenesis in (C) diploids with large numbers of spermatocytes (spc), spermatids (spt), and spermatozoa (spz), and in (D) triploids showing mostly spermatocytes (spc). Final stages of spermatogenesis, with (E) diploids having the centripetal pattern within acini, with peripheal spermatocytes (spc), intermediate spermatids (spm), and centrally located spermatozoa (spz), and (F) triploids with no clear array, few spermatocytes, and evidence of reabsortion by vacuolated cells (vc).....133

Fig. 6 Triploids gametogenic stages during second maturation peak of *Nodipecten subnodosus*. (A) Female gametogenic stages at the beginning of the new peak, with oogonia (o) and few previtellogenic oocytes (prev). B) Male acini early during maturation peak with the most advanced stage being spermatocytes (spc). C) Female acini late during the gametogenic process, with predominant previtellogenic oocytes, and some haemocytes (hc) in lumen. D) Male acini of scallop late during the gametogenic process with large numbers of spermatocytes (spc) and few spermatids (spt).....134

## ÍNDICE DE TABLAS

### Antecedentes.

Tabla 1. Resumen de experimentos en inducción a la triploidía usando CB, en moluscos.....	7
Tabla 2. Resumen de ventajas de los triploides sobre los diploides en crecimiento en grupos de moluscos.....	15

### Capítulo 1, Sección 1

Tabla 1. Mean diameter (SD) of spermatogenic stages (n = 30) in diploid and triploid catarina scallop <i>Argopecten ventricosus</i> measured by image analysis light microscopy, and percent increase area in triploids with regard to diploids.....	56
--	----

### Capítulo 1, Sección 2

Tabla 1. Mean cytoplasm diameters (minimum-maximum) of each oocyte type (n=20) for each group, diploid (2N) and triploid (3N), in catarina scallop ( <i>Argopecten ventricosus</i> ).....	80
Tabla 2. Mean numbers of oocyte types at each age and for each ploidy group, diploid (2N) and triploid (3N) of catarina scallop, <i>Argopecten ventricosus</i> .....	82

### Capítulo 2, Sección 1

Tabla 1. Resultados de la ploidía obtenida en los experimentos I al III para producción de poliploides de <i>Argopecten ventricosus</i> por inhibición del primer y segundo cuerpo polar (1CP & 2CP), y primera división celular (1 <sup>a</sup> DC). Se incluye el control, y la inhibición del 2CP con fines comparativos entre este y 1CP. Cada clase de ploidía fue definida estableciendo límites (Media de esa ploidía $\pm$ 3 desv. est.).....	106
Tabla 2. Resultados de ploidía obtenida en el experimento IV para inducir a la tetraploidía en <i>Argopecten ventricosus</i> por inhibición del 1CP en huevos de triploides fertilizados con espermias haploides. Cada clase de ploidía fue definida estableciendo límites (Media de la ploidía $\pm$ 3 desv. est.).....	107

### Capítulo 3, Sección 1

Tabla 1. Size, weight, and index means at 21 months of age for all growth traits evaluated in <i>Nodipecten subnodosus</i> triploids, diploids within treated group, and diploids from control group.....	129
Tabla 2. MANOVA results ( <i>P</i> -values) for cell type frequency differences in diploid and triploid ( <i>P</i> : ploidy) lion-paw scallop <i>Nodipecten subnodosus</i> at four ages ( <i>A</i> : ages 1, 5, 10 and 17 months of growth-out), and the age by ploidy ( <i>A*P</i> ) interaction.....	135
Tabla 3. Mean numbers of gametic cell types at each gonad part at ages 1, 5, 10 and 17 months, and for each ploidy group, diploid (2N) and triploid (3N) of lion-paw scallop <i>Nodipecten subnodosus</i> (n=10) .....	137

### Capítulo 4. Sección 1

Tabla 1. Absolute and relative mean survival to trochophore larvae and postlarvae treated with different concentrations of CB, and percent of triploidy success in Pacific red abalone, <i>Haliotis rufescens</i> , induced to triploidy in (A) May, (B) September, and (C) November. n = 4 for all induction times.....	158
Tabla 2. Absolute mean survival (%) and coefficient of variation (CV) from egg to trochophore and from egg to postlarvae of control untreated groups, for each of the experimental inductions.....	159

## LISTA DE ABREVIATURAS (por sus siglas en Ingles)

Ac	Acrosoma
AC	Células auxiliares
Ai	Invaginación anterior
CB	Citocalasina-B
Cg	Gránulo cortical
Ch	Cromosa en metafase
Ct	Tejido conjuntivo
CV	Coefficiente de variación
Cy	Citoplasma
Dc	Centriolo distal
DMSO	Dimetil sulfoxido
Dsc	Proceso de degeneración
Fl	Flagelo
Gb	Cuerpo de golgi
He	Hemocito
LC	Lisis celular
LM	Microscopía de luz
Mat	Maduro
Md	Dobles microtúbulos
Mi	Mitocondrias
Nc	Nucleolo
Nu	Núcleo
Og, o	Ovogonia
Pc	Centriolo proximal
Pi	Invaginación posterior
Prev	Previtelogénico
Prev di	Previtelogénico en diploteno
Prev zy-pa	Previtelogénico en cigoteno-paquiteno
pro	Ovocito previtelogénico
Postv	Postvitelogénico
pvo	Ovocito postvitelogénico
Spc, spc	Espermatocito
Spcl	Espermatocito primario
Spg, spg	Espermatogonia
Spm, spt	Espermátida
Spz, spz	Espermatozoide
SEM	Microscopía electrónica de barrido
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
Vc	Cubierta vitelina
vc	Célula vacuolada
VE	Envoltura vitelina
Vi	Inclusiones vitelinas
Vit	Vitelogénico
vo	Ovocito vitelogénico

## RESUMEN

La poliploidía ha sido una de las biotecnologías más empleadas en la última década para el mejoramiento genético de moluscos bivalvos por ser una de las mejores alternativas a corto plazo para incrementar la producción. Los organismos triploides presentan tres juegos completos de cromosomas homólogos que afectan la sinapsis, lo cual da como resultado una esterilidad parcial o total, la cual teóricamente repercute favorablemente en el crecimiento. Sin embargo, la inducción a la triploidía presenta algunos problemas que podrían resolverse con la disponibilidad de tetraploides para producir triploides biológicos. En este trabajo se presentan los resultados del desarrollo de biotecnologías de poliploidía en tres especies de moluscos nativos al noroeste de México, el abulón rojo (*Haliotis rufescens*), la almeja catarina (*Argopecten ventricosus*) y la almeja mano de león (*Nodipecten subnodosus*).

En **abulón rojo** se evaluó la inducción a la triploidía en tres épocas del año (mayo, septiembre y noviembre), obteniéndose en el mes de noviembre los mejores porcentajes de triploides. El éxito alcanzado en la triploidía fue paralelo a la viabilidad larval observada en larvas control durante cada inducción; la supervivencia más alta a trocófora y el coeficiente de variación (CV) más bajo ocurrió para las larvas producidas en noviembre o invierno. Las larvas producidas en mayo presentaron una supervivencia intermedia, mientras que las producidas en septiembre presentaron la supervivencia más baja a larva trocófora y el CV más alto. En **almeja mano de león**, para la cual se evaluaron diferentes concentraciones de citocalacina-B, se encontró que las concentraciones de CB de 0.75 mg/L y 1.0 mg/L



presentaron el mayor éxito (87 % y 95 %, respectivamente), aunque la supervivencia larval estuvo inversamente correlacionada con el éxito a la triploidía.

Al evaluar los efectos de la triploidía sobre la gametogénesis y el crecimiento de la **almeja mano de león** durante un período de 21 meses, comparando triploides, diploides tratados, y diploides control, se encontró que el crecimiento de los triploides no fue superior a los grupos diploides. La falta de ventaja de crecimiento del triploide ocurrió a pesar de la incapacidad de los triploides para madurar y formar gametos, mostrando una esterilidad del 95 % al 99 % con respecto a los diploides. Este resultado podría estar asociado con la característica reproductiva de esta especie en el sitio particular donde se realizó la evaluación, donde se ha observado que la reproducción es ‘oportunistica’, así como también podría estar relacionado con un efecto negativo de la alta productividad primaria en este sitio particular.

En **almeja catarina**, especie para la cual ya se había desarrollado previamente el conocimiento sobre la triploidía (su inducción y ventajas en cultivo: Ruiz-Verdugo *et al.*, 2000), en el presente trabajo se evaluó la inducción a la tetraploidía mediante tres métodos. El primero, por inhibición de la extrusión del primer cuerpo polar en ovocitos producidos por diploides y fertilizados por esperma haploide, produjo un porcentaje reducido de larva-D tetraploide, pero no resultó en supervivencia de estos a semilla o adulto. El segundo método, la inhibición de la primera división celular del cigoto, resultó principalmente en larva anormal no viable. El tercer método, la inducción a la tetraploidía inhibiendo el primer cuerpo polar en ovocitos de triploides fertilizados con esperma haploide, fue el único método en donde se obtuvo un alto porcentaje de larva-D tetraploide. De estas

progenies tetraploides se logró el obtener adultos, mostrando que este es el único método viable para la producción de tetraploides, previamente demostrado para el ostión japonés.

Adicionalmente a las definiciones de las mejores condiciones y métodos para inducción a la poliploidía en estas tres especies, y la evaluación del crecimiento comparativo entre diploides y triploides en una especie, se definieron algunos de los efectos que la condición de triploide tiene sobre la gametogénesis en pectínidos como la en **almeja catarina** y en **almeja mano de león**, evaluada a un nivel no previamente reportado en moluscos: estimación de la frecuencia de células gaméticas sexuales específicas para cada estadio de desarrollo y para cada sexo. Esto se realizó con fines de definir los estadios específicos de la ovogénesis y espermatogénesis en donde ocurre un arresto de la meiosis en los moluscos triploides. Se encontró que independientemente de la edad de muestreo y de la especie, el tipo de ovocito más abundante en triploides fue siempre el previtelogénico, mientras que en diploides siempre fue el vitelogénico. Esto indica que, en los pectinidos triploides el estadio de ovocito en el que la gametogénesis fue detenida fue en el ovocito previtelogénico, el cual se encuentra en la profase I, antes del estadio de diploteno. La causa principal para este arresto meiótico esta posiblemente asociada a problemas durante el estadio de cigoteno-paquiteno de la profase I, cuando la sinapsis y su resolución ocurren, ya que la presencia de tres cromosomas homólogos puede resultar en la formación de complejos sinaptoténicos anormales (múltiples entre cromátidas hermanas de los tres homólogos presentes), no resueltos al alcanzar el estadio de paquiteno. En la gónada masculina la espermatogénesis fue detenida en el estadio de espermatocito primario, indicando nuevamente que el arresto de la meiosis ocurre durante la etapa de la profase I, en el cigoteno – paquiteno, o antes de

entrar al estadio de diploteno, el cual se sabe solamente se alcanza por aquellos ovocitos entrando a vitelogénesis (vitelogénicos), o por aquellos espermatocitos pasando a espermatocitos secundarios. Dado los resultados tanto en hembras como en machos de esta especie, en donde la esterilidad observada en triploides está dada por un arresto del proceso meiótico, evidenciado por la incapacidad de las células gaméticas para proceder a estadios meióticos más avanzados durante la gametogénesis, se propone que esta esterilidad puede ser resultado de la acción de mecanismos genéticos de mantenimiento celular recientemente descritos como “checkpoint mechanisms”.

Finalmente, el tamaño celular y nuclear de los gametos en triploides presentó un incremento sustancial sobre el tamaño de las células y núcleos observados en diploides. Esto es indicativo de un incremento no solo en el número de cromosomas en triploides, sino en el tamaño del núcleo conteniéndolos, así como un incremento en el número de **organélos** y citoplasma para mantenimiento de esas células más grandes. Ese mayor tamaño en las células sexuales, específicamente los ovocitos, podría explicar el éxito logrado en la inducción a la tetraploidía en **almeja catarina** cuando se utilizaron ovocitos de triploides, ya que un mayor tamaño nuclear y celular permitiría un mejor acomodo de los cromosomas en la metafase y un mayor citoplasma permitiría una mayor reserva de componentes requeridos para la multiplicación de una célula poliploide (Guo y Allen, 1994c)

Palabras claves: *Moluscos, triploidía, tetraploidía*

## ABSTRACT

Polyploidy is a biotechnology that in the last decade had provided with an improvement method for mollusks in aquaculture. Triploids have three sets of chromosomes rather than the two carried by diploids. The third set has an effect on chromosomes synapsis, producing sterility during reproduction. That sterility is the most accepted cause for the better growth seen in triploids. Artificial induction to triploidy has some problems, which can be solved by the existence of tetraploids, which could be mated to diploids to produce biological triploids. This research presents results on the development of polyploidy biotechnologies for three mollusks species native to the northwest of Mexico: red abalone (*Haliotis rufescens*), the catarina scallop (*Argopecten ventricosus*), and the lion-paw scallop (*Nodipecten subnodosus*).

In **red abalone** induction to triploidy was evaluated in three seasons, spring, summer, and winter, finding that the best results (85% to 100%) in percent triploids was when evaluated in the winter, and when CB concentration was not important in triploidy success. Success in triploid percent during each induction was parallel to larval viability in control groups: the largest survival to trochophore larvae and the lowest coefficient of variation was seen for the evaluations in November; the lowest survival and the highest coefficient of variation was seen during the evaluation in September; and for the May evaluation survival and CV were intermediate. In the lion-paw scallop, induction to triploidy was done only once, finding that concentration of CV was important in the success to produce triploids, but survival was inversely related to the percent of triploids produced. In **lion-paw scallop**, induction was done only during the natural reproductive season of this species, November,

finding that the cytochalasin-B concentration used for the induction was important in the success to triploidy achieved, although there was an inverse relationship between CB concentration and D-larvae survival.

Growth and gametogenesis were evaluated for triploids and diploids of the **lion-paw scallop** during a 21-mo period, not finding an advantage of triploid scallops over diploids for any of the traits evaluated for growth. The lack of advantage for triploids was observed in spite of 95% to 99% sterility in triploids. This is a unique result, as triploidy rarely has been reported as not advantageous in mollusks. Either, the reproductive strategy of this species (opportunistic), or a negative effect of high primary productivity at the site the study was carried might be related to this unique result.

For the **catarina scallop**, a species for which triploidy had been previously demonstrated as feasible and highly promising for improving aquaculture production, the induction to tetraploidy, and the viability of tetraploids to juvenile size was investigated. Three methods were evaluated: inhibition of first polar body in eggs from diploids, inhibition of first cell division in diploid zygotes, and inhibition of first polar body in eggs from triploids. The first and the third did succeed in producing tetraploid larvae, but not the second one. However, juvenile and adult tetraploids were only seen when the third method was used, proving this method as the only one through which tetraploidy can be induced as previously demonstrated for the Pacific oyster.

Using as model organism the **catarina scallop** and the **lion-paw scallop**, we attempted to understand the precise stage at which gametogenesis is inhibited in mollusks, which can allow for a better understanding of the effects of triploidy on gamete formation. Most previous studies in triploid mollusks had evaluated gametogenesis as developing stages

describing the most common event at specific points in time, generally concluding that gametogenesis was delayed in triploids when compared to that seen in diploids. By using a different approach, that is, estimating the gametic cell type frequencies in both, diploids and triploids, the effects of triploidy on gametogenesis can be unequivocally defined to a particular cell type, and meiotic event. It was found that regardless of age at sampling, the most frequently occurring oocyte type in triploid scallops was the previtellogenic oocyte, whereas in diploids it was the vitellogenic oocyte. It is known that the previtellogenic oocyte in pectinids is in prophase I, at the pachytene - zygotene stage of meiosis, and that only those oocytes reaching the diplotene stage can become vitellogenic oocytes. Therefore, it can be concluded that triploidy induces sterility in pectinids because of inability to complete meiosis I, either at the pachytene or zygotene stage. In the male gonad of triploids, the most common gametic cell type was the primary spermatocyte, indicating again the arrest of meiosis at prophase I. Previous studies had proposed mechanical problems during synapsis of chromosomes as the cause of triploid sterility. However, genetic mechanisms can be proposed to be involved in the sterility seen among triploids, as those recently described as 'checkpoints', involving proteins detecting and arresting meiosis when failures or errors occur at different steps. Among those checkpoint mechanisms, the pachytene check point is proposed as one involved in the sterility seen among triploids, arresting the meiotic process when problems occur during the synapsis of chromosomes and with the resolution of chromosomes crossing over.

Finally, gametic cells of triploids and diploids were compared for nucleus and cytoplasm diameter, finding a significant increase in cell and nucleus size in triploids over diploids. This result might point toward the cause for the only method to induce tetraploidy

in **catarina scallop** having been only that using eggs from triploids, as these eggs would result in an increased probability of the extra set of chromosomes aligning correctly in the metaphase, and the largest cytoplasm would allow for an adequate energy reserve during cell divisions, as pointed out for the Pacific oyster (Guo y Allen, 1994c).

Key words: Mollusks, Triploidy, Tetraploidy

## INTRODUCCIÓN

La acuicultura es una biotecnología que con los años ha adquirido mayor importancia, debido principalmente a las necesidades cada vez más urgentes de conservar a las especies y a la creciente demanda de tecnología para el cultivo de organismos acuáticos. El cultivo de organismos acuáticos en condiciones más o menos controladas por el hombre es una actividad que comienza en tiempos remotos. Sin embargo, sorprende constatar el lento desarrollo histórico de la acuicultura, especialmente cuando se le compara con otras actividades productivas como la ganadería y agricultura. Seguramente a este hecho ha contribuido el que la pesca haya extraído riqueza con relativa facilidad hasta recientemente. Hoy en día la situación ha cambiado, con un creciente número de especies para las cuales la pesquería ya no es capaz de abastecer la demanda. La importancia de la acuicultura hoy en día se refleja en los niveles de producción

De acuerdo a la FAO (2003) la producción mundial derivada de la acuicultura en el 2000 fue de 45.71 millones de toneladas métricas, de las cuales los moluscos (42 especies) comprenden un 23.5%. Sin embargo, América Latina y el Caribe aportaron solamente el 0.3% de la producción total de moluscos. Las principales especies de moluscos cultivadas son el ostión japonés, *Crassostrea gigas*, la almeja *Ruditapes philippinarum*, la escalopa *Pecten yessoensis*, el mejillón *Mytilus edulis*, y el berberecho *Anadara granosa*. En el caso específico de México, de acuerdo al Anuario Estadístico de Pesca (SAGARPA, 2000), la producción acuacultural está representada en su gran mayoría por recursos de agua dulce y sólo dos de agua marina, el camarón y el ostión, con una aportación de este último de 49,710 toneladas. Otros recursos, como el abulón y la almeja sólo aparecen representados



como producciones pesqueras, con valores de producción en los últimos 10 años tendientes a la baja. La aportación más elevada a nivel nacional de estos recursos proviene del estado de Baja California Sur.

El cultivo de moluscos en México es relativamente reciente. Las primeras constancias datan de la época de la Revolución Mexicana, cuando en las costas de Baja California Sur se implementó un cultivo de ostras perleras (Rangel-Dávalos y Chávez-Villalba, 1994). En lo que respecta al cultivo de ostión, los registros datan desde el trabajo de Sevilla (1965). Posteriormente, en los años 70's, en la región noroeste del país se introdujo el ostión Japonés *Crassostrea gigas* (García *et al.*, 1988). Otra especie que está siendo cultivada en la península de Baja California es el abulón rojo, *Haliotis rufescens*, para la cual existen considerables avances a nivel internacional en el desarrollo tecnológico de su cultivo (Salas *et al.*, 1988), más no en su desarrollo de biotecnologías genéticas. En cuanto a otras especies de moluscos cultivadas en la península de Baja California Sur, la almeja catarina *Argopecten ventricosus*, se cultiva en Baja California Sur desde hace dos décadas (Mazon, 1996; Maeda-Martínez *et al.*, 2001), y más recientemente la almeja mano de león *Nodipecten subnodosus* (Felix-Pico *et al.*, 1999; Maeda-Martínez *et al.*, 2001), aunque mucha de su tecnología óptima de cultivo aun está en desarrollo.

Uno de los principales criterios para elegir una especie para cultivo aparte de su valor económico es la existencia de técnicas adecuadas para la reproducción controlada, con el fin de asegurar la disponibilidad oportuna y en cantidad de larvas para la cría. Así mismo, el control del ciclo de vida cerrado es una necesidad básica para la domesticación del organismo, así como para poder aprovechar los beneficios de programas de mejoramiento genético. Una de las formas de contribuir con el mejoramiento genético de organismos

acuáticos como los moluscos es a través de la manipulación cromosómica o la aplicación de biotecnologías de poliploidía. Por ejemplo, la utilización en cultivo de organismos triploides podría resolver problemas que actualmente afectan la tasa de retorno, como es el tiempo en que los organismos alcanzan la talla comercial (FAO 2003).

El presente trabajo presenta los resultados de los primeros pasos requeridos para el desarrollo de biotecnologías de poliploidía en 2 especies, el abulón rojo (*Haliotis rufescens*) y la almeja mano de león (*Nodipecten subnodosus*). Estos primeros pasos involucran el conocimiento sobre dosis óptimas de inducción, así como el conocer algunos de los factores externos que intervienen en el éxito a la inducción a la triploidía. Adicionalmente, para una de estas 2 especies, la almeja mano de león, se profundiza en el estudio de los efectos de la triploidía sobre el crecimiento y la gametogenesis, evaluando la hipótesis que establece que la triploidía resulta en un mejor crecimiento debido a la esterilidad característica de los triploides. Finalmente para otra especie en la cual ya se desarrolló previamente el conocimiento sobre la triploidía (su inducción y ventajas en cultivo), se presentan resultados sobre el desarrollo de una biotecnología derivada de la anterior, la producción de tetraploides de almeja catarina.

## ANTECEDENTES

### TRIPLOIDÍA DE MOLUSCOS

#### **1. *Historia-origen de los primeros estudios.***

Las primeras referencias de la obtención de moluscos triploides se remontan a 1979, cuando John G. Stanley, Stan Allen y H. Hidu evalúan la inducción a la triploidía en la ostra americana *Crassostrea virginica* (Stanley *et al.*, 1981). Los resultados reportados por Stanley y colaboradores fueron los primeros reportes de literatura científica de triploides bivalvos viables. Con el apoyo de la NSF, el conocimiento de bivalvos triploides fue expandido. De 1983 a 1986 en la Universidad de Washington, en cooperación con Coast Oyster Company y Wescott Bay Sea Farms, los resultados obtenidos en estudios acerca de la biología y producción de ostiones triploides de *Crassostrea gigas*, permitieron el escalamiento de su producción a niveles comerciales (Stanley *et al.*, 1981; Allen, 1988). En la actualidad se considera que de un 30% a 50% del ostión cultivado en las costas del Pacífico de los EUA es triploide (Chew, 1994),

#### **2. *Métodos de inducción a la triploidía.***

La inducción artificial a la triploidía en bivalvos y gasterópodos es posible, debido a que en las hembras, los gametos femeninos liberados al medio son ovocitos primarios. Esto es, la meiosis, proceso mediante el cual ocurren las reducciones cromosómicas para formar gametos haploides, está detenida antes de que ocurra cualquiera de las dos reducciones cromosómicas. Al entrar el esperma y permanecer como un pronúcleo independiente del núcleo del ovocito, el proceso meiótico del ovocito es reactivado para

culminar con la formación de ovocitos haploides después de la formación de dos cuerpos polares. La triploidía ha sido inducida por diferentes tipos de tratamientos agrupados en “físicos” o “químicos”. Los tratamientos físicos comprenden choques de temperatura y presión hidrostática, mientras que los químicos involucran el uso de compuestos como la citocalasina-B o la 6-dimetilaminopurina. Dadas las características de la meiosis en estos organismos, los tratamientos pueden ser aplicados ya sea durante la meiosis I (MI) o meiosis II (MII), con fines de bloquear la formación del primer (MI) o segundo cuerpo polar (MII). Todos estos métodos buscan prevenir la división citoplasmática que tendría como consecuencia una reducción cromosómica. El resultado de inhibir la división citoplasmática es un ovocito cuyo pronúcleo femenino será diploide y la posterior “singamia” (fusión del pronúcleo femenino y masculino) con un pronúcleo masculino haploide permitirá la formación de un cigoto triploide (Beaumont y Fairbrother, 1991).

Los choques de temperatura y la presión hidrostática actúan de forma similar en evitar la división citoplasmática. La temperatura promueve que se disuelvan las fibras del huso cromático que separa los cromosomas dentro de la célula, evitando así la formación del cuerpo polar al no ocurrir la división cromosómica. La presión hidrostática inhibe la formación ó extrusión de los cuerpos polares por la misma presión ejercida sobre la pared celular del ovocito (Downing, 1987, citada por Allen *et al.*, 1989).

En el caso del uso de la temperatura en la inducción a la triploidía en moluscos, los ovocitos son sometidos a choques tanto fríos como calientes, según la especie (Yamamoto y Sugawara, 1988; Canello *et al.*, 1992; Toro *et al.*, 1995a; Toro y Sastre, 1995). En lo que respecta a la presión hidrostática, el método en moluscos consiste en someter los ovocitos a choques de presión hidrostática que puede variar de 6000 a 8000 psi (Allen *et al.*, 1986).

Múltiples estudios en moluscos con ambos métodos han demostrado que los tratamientos químicos con sustancias como la citocalasina-B (CB) son los más efectivos en inducir un alto porcentaje de triploides, por lo que en la actualidad este método es el más utilizado. La CB, un compuesto originalmente desarrollado como un antibiótico, actúa inhibiendo la polimerización de la actina que produce el anillo contráctil para la formación de los cuerpos polares inhibiendo así la reducción cromosómica (Longo, 1972). La CB es hidrofóbica, por lo que para lograr que penetre en el ovocito, se disuelve en dimetilsulfóxido (DMSO) como una solución transporte. Los ovocitos fertilizados son expuestos a esa solución a concentraciones y tiempos variables. En moluscos diferentes concentraciones de CB y tiempos de aplicación han sido evaluadas para múltiples especies (Tabla 1). Los tiempos de aplicación varían dependiendo de cuál reducción cromosómica se pretende inhibir (la asociada con MI o MII), así como de los tiempos exactos después de la fertilización en que cada una de esas reducciones cromosómicas ocurren. Otro químico utilizado en la inducción a la triploidía es el 6-Dimetilaminopurina, el cual actúa de forma diferente que la CB, ya que ataca la organización y despolimerización de los microtúbulos que forman el huso acromático y sobre los filamentos corticales. Esto induce al bloqueo del movimiento de los cromosomas inhibiendo la anafase y la formación de cuerpos polares (Desrosier *et al.*, 1993; Gérard *et al.*, 1994b; Brake *et al.*, 2002).

Otros compuestos químicos como la cafeína y el calcio, los cuales actúan sobre la polimerización y depolimerización de microtúbulos, han sido también evaluados para la inducción a la triploidía, observando que en general su éxito es bajo (Beaumont y Fairbrother, 1991).

Tabla 1. Resumen de experimentos en inducción a la triploidía usando CB, en moluscos.

Referencia	Especie	Concentración mg/L de CB	Inicio postfert. (min)	Durac. Tratam (min)	Éxito (%)	Supervivencia a larva D (%)
<b>Haliótid</b>						
Stepo y Cook, 1998	<i>Haliotis midae</i>	0.5	3	20	70.9	15.8
<b>Miidos</b>						
Allen <i>et al.</i> , 1982	<i>Mya arenaria</i>	1.0	0 15	15 15	84-100 75-80	1.4 4.6
<b>Mitílidos</b>						
Beaumont y Kelly, 1989	<i>Mytilus edulis</i>	0.1 0.5 1.0	5 (M I) 30 (M II)	15 20	(0.1, 30,15)38 (0.5, 30,15)60 (1.0, 30,15)50	38.7 62.5 48.7
Scarpa <i>et al.</i> , 1994	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	1.0	20	15	86	
<b>Ostréidos</b>						
Allen y Bushek, 1992	<i>Crassostrea virginica</i>	1.0	50% CP1	20	79	22
Allen y Downing, 1986	<i>Crassostrea gigas</i>	1.0	30-45	15	(30) 96.3	
Barber y Mann, 1991	<i>Crassostrea virginica</i>	1.0	15	15	96	
Barber <i>et al.</i> , 1992	<i>Crassostrea virginica</i>	0.1, 0.5 y 1.0 0.25 y 0.5 0.1 y 0.25	25 y 20 13 15	10 y 22 15 10	(0.25, 13, 10- 15)96	84
Desrosiers <i>et al.</i> , 1993	<i>Crassostrea gigas</i>	0.5 1.0	20 20	20 15	94-100 100	14 - 3 semanas
Downing y Allen, 1987	<i>Crassostrea gigas</i>	1.0	0, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120	15	(1.0, 30,15)88	56
Gerard <i>et al.</i> , 1999	<i>Crassostrea gigas</i>	1.0	5 40	10 10	16-55 60-95	
Gerard <i>et al.</i> , 1994b	<i>Crassostrea gigas</i>	1.0	20	15	95	36
Hawkins <i>et al.</i> , 1994	<i>Ostrea edulis</i>	1.0	40 y 90	20	N.A.	
Nell <i>et al.</i> , 1994	<i>Saccostrea commercialis</i>	0.5	23	20	81 85 (semilla)	
Nell <i>et al.</i> , 1996	<i>Saccostrea commercialis</i>	0.75 1.5	30	15	83	43
Stanley <i>et al.</i> , 1981	<i>Crassostrea virginica</i>	0.1, 1.0 y 5	50	20		
Stanley <i>et al.</i> , 1984	<i>Crassostrea virginica</i>	0.5	15	0-15 15-30	61 72	
Supan <i>et al.</i> , 2000	<i>Crassostrea virginica</i>	0.125 0.25 0.50	50% CP1 50% CP1 50% CP1	10 10 10	13 61.8 68.2	
<b>Pectínidos</b>						
Baron <i>et al.</i> , 1989	<i>Chlamys varia</i>	1.0	10, 20, 30	15	(1, 20, 15)78.5	87.5
Beaumont, 1986	<i>Pecten maximus</i>	0.1 0.5	10 10	20 20	23 36	
Jackson <i>et al.</i> , 2002	<i>Placopecten magellanicus</i>	0.25 0.5 0.25 0.5			13 16 39 65	

Tabla 1.(Continuación) Resumen de experimentos en inducción a la triploidía usando CB, en moluscos.

Referencia	Especie	Concentrac. mg/L de CB	Inicio postfert. (min)	Durac. Tratam (min)	Éxito (%)	Supervivencia a larva D (%)
Ruiz-Verdugo <i>et al.</i> , 2000	<i>Argopecten ventricosus</i>	0.1 0.5	50% CP1 50% CP1	15 15	8 58	15 9
Ruiz-Verdugo <i>et al.</i> , 2001a	<i>Argopecten ventricosus</i>	0.5 0.5	30-40% CP1 30-40% CP1	15 15	0-100 36-100	2.06-33.16 1.76-12.74
Tabrini, 1984	<i>Argopecten irradians</i>	0.05 0.1	10 10	20 20	66 94	20 6
<b>Pteridos</b>						
Jiang <i>et al.</i> , 1993	<i>Pinctada martensii</i>	0.75 y 1.0	2 y 17	15 y 17		
Uchimura <i>et al.</i> , 1989	<i>Pinctada fucata martensii</i>	0.5	5	15	65.4	
Wada <i>et al.</i> , 1989	<i>Pinctada fucata</i>	0.1	5, 10, 15, 20, 25, 25 y 30	15	(0.1, 20, 15) 52	
		0.5	3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27 y 30	15	(0.5, 20, 15) 100	39
<b>Venéridos</b>						
Dufy y Diter, 1990	<i>Ruditapes philippinarum</i>	1.0	20	15	75.8	19.3
Gerard <i>et al.</i> , 1994a	<i>Ruditapes decussatus</i>	0.5	10	15	63	52
		0.5	15	15	63	35
		0.5	20	15	36	29
		0.5	25	15	3	-
		0.5	10	15	50	65
		0.5	15	15	63	68
		1.0	15	15	95	31
		1.0	15	20	94	44
		1.0	15	15	85	26
		1.0	15	20	95	24
Gosling y Nolan, 1989	<i>Ruditapes decussatus</i>	0.5 1.0	15 15	15 15	50 40	
Nell <i>et al.</i> , 1995	<i>Ruditapes philippinarum</i>	1.0		15	56-85	
Utting y Child, 1994	<i>Ruditapes philippinarum</i>	0.5 0.5	15 20	15 20	70 75	45
Utting y Doyou, 1992	<i>Ruditapes philippinarum</i>	0.5			67-73	

### **3. Especies de moluscos inducidas a la triploidía utilizando citocalacina-B (CB).**

La triploidía ha sido inducida en abulones, almejas, mejillones, ostiones, ostras y pectínidos o escalopas (Tabla 1). En haliótidos ó abulones, se ha evaluado el uso de CB en *Haliotis midae*, alcanzando un éxito de 70.9 % (Stepto y Cook, 1998). En un grupo de almejas, los miídos, se evaluó en *Mya arenaria*, obteniendo porcentajes de 75 a 100% de triploidía (Allen *et al.*, 1982). En mejillones ó mitilidos, como *Mytilus edulis* y *M. galloprovincialis* se han obtenido porcentajes de triploidía de 38-86% (Beaumont y Kelly, 1989; Scarpa *et al.*, 1994). El principal grupo donde se ha trabajado más ampliamente la inducción a la triploidía es en los ostiones ó ostréidos, incluyendo a *Crassostrea virginica*, *C. gigas*, *Ostrea edulis* y *Saccostrea commercialis*, en las cuales se han alcanzado porcentajes de triploidía desde 16 hasta 100%. Los mejores resultados en este grupo se han obtenido con concentraciones que van de 0.5 a 1.0 mg/L de CB, donde se han alcanzado éxitos a la triploidía de 94-100 % (Allen y Bushek, 1992; Allen y Downing, 1986; Barber y Mann, 1991; Barber *et al.*, 1992; Desrosiers *et al.*, 1993; Downing y Allen, 1987; Gerard *et al.*, 1999; Gerard *et al.*, 1994b; Hawkins *et al.*, 1994; Nell *et al.*, 1994; Nell *et al.*, 1996; Stanley *et al.*, 1981; Stanley *et al.*, 1984; Supan *et al.*, 2000). El segundo grupo donde existe un gran número de trabajos reportados es en los pectínidos ó escalopas, como *Argopecten irradians*, *A. ventricosus*, *Chlamys varia*, *Pecten maximus* y *Placopecten magellanicus*. Los porcentajes más elevados de triploidía los obtuvo Ruiz-Verdugo *et al.* (2001a) utilizando 0.5 mg/L de CB, realizando las inducciones en por familia. Se observó que no en todas se obtuvo el 100%, lo que indica que el éxito a la triploidía no solo depende de la concentración y duración del tratamiento, sino de otros factores asociados a cada desove, lo cual ha sido discutido por pocos autores (Baron *et al.*, 1989; Beaumont,



1986; Jackson *et al.*, 2002; Ruiz-Verdugo *et al.*, 2000; Ruiz-Verdugo *et al.*, 2001a). En los pteridos u ostras perleras, como *Pinctada fucata martensii*, se han alcanzado valores de éxito a la triploidía de 52 a 100%, (Jiang *et al.*, 1993; Uchimura *et al.*, 1989; Wada *et al.*, 1989). El tercer grupo donde se han realizado trabajos de inducción a la triploidía es en otro grupo de almejas, los venéridos, como *Ruditapes philippinarum* y *R. decussatus*, en las cuales se ha tenido un éxito de 36 a 85 %, (Dufy y Diter, 1990; Gerard *et al.*, 1994a; Gosling y Nolan, 1989; Nell *et al.*, 1995; Utting y Child, 1994; Utting y Doyou, 1992) (Tabla 1).

## **CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL TRIPLOIDE**

### ***1. Gametogénesis y esterilidad***

La gametogénesis en moluscos triploides ha sido catalogada en dos formas: como retardada, implicando una ovogénesis y espermatogénesis con un desarrollo atrasado pero similar a los diploides (Eversole *et al.*, 1996; Cox *et al.*, 1996; Allen y Downing, 1991; Allen *et al.*, 1986; Tabarini, 1984), y como arrestada, desarrollo de gametogénesis bloqueada en un estadio temprano (Ruiz-Verdugo *et al.*, 2000; Kiyomoto *et al.*, 1996; Barber y Mann, 1991)

El rasgo más importante de los organismos triploides es el pobre desarrollo gonádico, el cual puede variar entre, e incluso dentro de, especies (Beaumont y Fairbrother, 1991), produciendo ya sea una esterilidad parcial (gametogénesis reducida con producción de algunos gametos) o total (gametogénesis inhibida sin producción de gametos). La esterilidad es una consecuencia de una sinapsis irregular cuando tres juegos de

cromosomas homólogos ocurren en un organismo durante la profase de la meiosis I (Thorgaard, 1983; Allen, 1987a). Esta condición de esterilidad en especies de importancia comercial es importante, ya que ha sido demostrado que produce ventajas sobre los diploides, como son el presentar una mayor tasa de crecimiento, mejor calidad de la carne y mejor sabor (Allen y Downing, 1986; Allen y Downing, 1991; Beaumont y Fairbrother, 1991).

La esterilidad total no ocurre en todos los moluscos. Cuando la esterilidad no es total, la fecundidad y el potencial reproductivo de los triploides puede ser estudiado como ha sido para algunas especies, como *Mya arenaria* (Allen *et al.*, 1986), *Mulinia lateralis* (Guo y Allen, 1994a), *Crassostrea gigas* (Guo y Allen, 1994b; Guo y Allen, 1997), *Ruditapes philippinarum* (Utting *et al.*, 1996), *Saccostrea commercialis* (Cox *et al.*, 1996) y *Argopecten ventricosus* (Ruiz-Verdugo *et al.*, 2001a; 2000). En estos estudios se ha observado que los organismos triploides no son completamente estériles. Por ejemplo, para *Crassostrea gigas* la fecundidad de un triploide se estimó que se reduce en 92 a 98 % con relación a la fecundidad de los diploides (Guo y Allen, 1994b); en *Argopecten ventricosus* el triploide presenta una reducción del 82% de la fecundidad del diploide (Ruiz-Verdugo *et al.*, 2001a), y en *Ruditapes philippinarum* se estimó una reducción de fecundidad del 68% con respecto a los diploides (Utting *et al.*, 1996). Otras especies con esterilidad parcial son *Mercenaria mercenaria* y *Pinctada martensii* (Eversole *et al.*, 1996; Komaru y Wada, 1990).

Por otro lado, se ha observado que algunas de las especies evaluadas para fertilidad, solo un sexo es capaz de desarrollar gametos. Por ejemplo en *Argopecten ventricosus*, a

pesar de ser un organismo hermafrodita funcional como diploide, en triploides de un año de edad se encontró la parte masculina degenerada, desarrollándose sólo gónada femenina (Ruiz-Verdugo *et al.*, 2000). La importancia de este resultado radica en el hecho de que uno de los problemas principales en estudios de ploidía de esta especie ha sido la inhabilidad de separar gametos de diferente sexo totalmente, ocurriendo generalmente como consecuencia la autofecundación de un cierto porcentaje de los ovocitos. Con la disponibilidad de organismos triploides que desarrollan sólo un tipo de gameto (femenino), ese problema podrá ser minimizado durante la producción de tetraploides de esta especie.

## ***2. Condición fisiológica / Composición bioquímica de los triploides***

Previo a la gametogénesis, y cuando el alimento es abundante, en los moluscos se realiza un almacenamiento de lípidos, proteínas y glucógeno, los cuales son canalizados posteriormente para la reproducción (Barber y Blake, 1991; Shpigel *et al.*, 1992). Debido a la condición de esterilidad parcial en los triploides, se han realizado varios estudios con diferentes especies de moluscos para evaluar el uso de las reservas energéticas para la gametogénesis en triploides *versus* diploides. Por ejemplo, en *Crassostrea gigas* se ha observado que en diploides el contenido de glucógeno disminuye constantemente durante el proceso de gametogénesis, alcanzando el nivel más bajo durante el periodo de desove, mientras que en triploides el contenido de glucógeno fue significativamente más grande durante el mismo periodo (Allen y Downing, 1986; Allen, 1987b; Akashige y Fushimi, 1991; Shpigel *et al.*, 1992). Los mismos resultados han sido obtenidos en otras especies de ostión, como el ostión Australiano, *Saccostrea commercialis* (Nell *et al.*, 1994). En triploides de la almeja *Ruditapes philippinarum* se han observado diferencias significativas

en el contenido de lípidos (Shpigel y Spencer, 1996), ó de lípidos y carbohidratos (Utting *et al.*, 1996). En pectínidos como *Argopecten irradians*, el contenido de glucógeno en músculo aductor de triploides es mayor que en diploides (Tabarini, 1984), mientras que en triploides de *Argopecten ventricosus* el contenido de carbohidratos en músculo no indicó un almacenamiento de esta forma de energía en el músculo aductor (Ruiz-Verdugo *et al.*, 2001b) a pesar de observarse una esterilidad parcial en los triploides, así como una ventaja en crecimiento sobre los diploides.

### **3. Crecimiento**

En el grupo de los Ostréidos (*Crassostrea gigas*, *Crassostrea virginica*, *Ostrea edulis*, *Saccostrea commercialis*), especies para las cuales existe la mayor cantidad de estudios comparativos de crecimiento en triploides *versus* diploides, se ha observado que los triploides presentan incrementos porcentuales en biomasa húmeda de 29 al 80% sobre los diploides (Barber y Mann, 1991; Akashige y Fushimi, 1991; Matthiessen y Davis, 1992; Hawkins *et al.*, 1994; Nell *et al.*, 1994; Hand *et al.*, 1998; Landau y Guo, 1999). En el grupo de los Pectínidos (*Argopecten irradians*, *Argopecten ventricosus*, *Chlamys nobilis*, *Chlamys farreri*), se ha observado que los triploides presentan un incremento porcentual respecto a los diploides de 32 a 81% en biomasa húmeda, y un incremento de 44 al 167% en músculo aductor (Tabarini, 1984; Komaru y Wada, 1989; Ruiz-Verdugo *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2000). En el grupo de los Pteridos, en la especie *Pinctada martensii*, los triploides presentaron un incremento porcentual de 27 a 58% sobre los diploides en biomasa húmeda (Jiang *et al.*, 1991). En el grupo de los Mactrídos, la almeja *Mulinia*

*lateralis* triploide presenta un incremento en biomasa húmeda de 72% sobre la almeja diploide (Guo y Allen, 1994a). (Tabla 2).

Entre otras posibles causas de un mejor crecimiento en triploides con respecto a los diploides están la ya mencionada esterilidad parcial o total, y la consecuente canalización alterna de energía que sería utilizada para madurar hacia el crecimiento somático. Esta causa se planteó primero en base a observaciones en *Crassostrea gigas* (Allen y Downing, 1986). Dos hipótesis alternas han sido propuestas posteriormente para explicar el mayor crecimiento en triploides. La primera propone la ocurrencia de un gigantismo poliploide, causado por el incremento en tamaño celular debido a un incremento en volumen celular sin reducción del número de células en organismos poliploides (Guo y Allen, 1994a). Esta hipótesis, plantea que el gigantismo poliploide puede presentarse solo en algunos órganos como el músculo aductor, y su expresión puede ser afectada por factores ambientales. La segunda hipótesis alterna señala que la ventaja en crecimiento de los triploides es debido a que estos tienen mayor heterocigosidad (alta variación alélica), debido a la probabilidad de llevar tres diferentes alelos en el mismo locus comparado con los diploides. Esta hipótesis fue planteada en observaciones de *Crassostrea virginica* donde se produjeron triploides de dos formas; inhibiendo el primer cuerpo polar ó el segundo para comparar su crecimiento por tres años. Stanley *et al.* (1984) observaron que los triploides derivados de la meiosis I presentaron mejor crecimiento debido a que durante la evaluación presentaron mayor heterocigosidad que los producidos inhibiendo la meiosis II.

Tabla 2. Resumen de ventajas de los triploides sobre los diploides en crecimiento en grupos de moluscos.

Especie	Tejido	% incremento en 3N	Referencia
<b>Ostréidos</b>			
<i>Crassostrea gigas</i>	Biomasa húmeda	81	Akashige y Fushimi, 1991
<i>Crassostrea gigas</i>	Biomasa húmeda	70	Landau y Guo, 1999
<i>Crassostrea virginica</i>	Biomasa húmeda	29	Barber y Mann, 1991
<i>Crassostrea virginica</i>	Biomasa húmeda	60	Matthiessen y Davis, 1992
<i>Ostrea edulis</i>	Biomasa seca	61	Hawkins <i>et al.</i> , 1994
<i>Saccostrea commercialis</i>	Biomasa húmeda	31	Hand <i>et al.</i> , 1998.
<i>Saccostrea commercialis</i>	Biomasa húmeda	41	Nell <i>et al.</i> , 1994
<b>Pectínidos</b>			
<i>Argopecten irradians</i>	Biomasa húmeda	36	Tabarini, 1984
	Músculo aductor	73	
<i>Argopecten ventricosus</i>	Músculo aductor	182	Ruíz-Verdugo <i>et al.</i> , 2000
<i>Chlamys nobilys</i>	Biomasa húmeda	32-59	Komaru y Wada, 1989
	Biomasa seca	52	
<i>Chlamys farreri</i>	Biomasa húmeda	81	Yang, <i>et al.</i> , 2000
	Músculo aductor	44-96	
<b>Ptéridos</b>			
<i>Pinctada martensii</i>	Biomasa húmeda	27-58	Jiang <i>et al.</i> , 1991
<b>Mactrídos</b>			
<i>Mulinia lateralis</i>	Biomasa húmeda	72	Guo y Allen, 1994a

## PROBLEMÁTICA ACTUAL EN LA PRODUCCIÓN DE TRIPLOIDES

Regularmente y como ya se ha mencionado, los triploides son producidos en su mayor parte por la inhibición del segundo cuerpo polar utilizando citocalasina-B (Allen *et al.*, 1989). Sin embargo es importante señalar que existen varias desventajas en la producción de triploides químicos. La primera es que la CB es considerada un químico tóxico y carcinogénico, por lo que requiere un manejo cuidadoso. El uso de este químico en algunos laboratorios de moluscos estuvo bajo revisión por la FDA en EUA (Pitts, 1994, citado por

Guo y Allen, 1994b), aunque recientemente fue aprobado. La segunda desventaja es que la eficiencia del método de inducción actual, aunque ha mejorado, pocas veces resulta en el 100% de triploidía, y depende de algunos factores ambientales por lo que la incertidumbre en la eficiencia de inducción es una preocupación continua para el manejo de laboratorios (Allen *et al.*, 1989). La tercera desventaja es que el bloqueo del segundo cuerpo polar con CB (o algunos otros agentes) afecta negativamente la supervivencia y crecimiento inicial de los triploides inducidos químicamente (Chew, 1994; Guo y Allen, 1994a; Guo *et al.*, 1996). Finalmente la cuarta desventaja es que se ha observado que en algunas especies los triploides producidos con métodos químicos presentan una reversión cromosómica en tallas grandes (Guo *et al.*, 1996), lo cual ha resultado en la incapacidad de introducir triploides a zonas donde no son nativos.

Todos estos problemas podrían ser evitados potencialmente si los triploides fueran producidos biológicamente, esto es, por apareamiento de tetraploides y diploides.

## **TETRAPLOIDÍA EN MOLUSCOS**

### ***1. Historia-origen de primeros estudios de tetraploidía en moluscos***

El desarrollo de organismos tetraploides en moluscos ha sido un proceso difícil, siendo la descripción más acertada de este proceso la realizada por Chew (1994), quien señala que en 1988 el Dr. Xi Ming Guo fue el primer interesado en el desarrollo de moluscos tetraploides (ostras) durante sus estudios de postgrado con el Dr. Hershberger y el Dr. Chew en la escuela de pesquerías de la Universidad de Washington (UW). En esa época, después de múltiples intentos de producir tetraploides por medio de la inhibición de la

primera división celular, y con logros únicamente hasta estadio de larva “D”, la mayoría de la gente en el campo pensó que las ostras tetraploides eran inviables. Guo y sus colegas de la Universidad de Washington iniciaron evaluando una variedad de métodos de inducción a la tetraploidía, incluyendo inhibición de la mitosis I, bloqueo del cuerpo polar I, ginogénesis y fusión celular (Guo *et al*, 1992a; 1992b; Guo *et al*,. 1993; Guo *et al*, 1994). Todos los anteriores trabajos produjeron niveles significantes de embriones tetraploides (19-95%), pero ninguno de esos embriones sobrevivió a la talla adulta, y la mayoría raramente sobrevivió a larva “D”. Durante esos experimentos se observó que los embriones tempranos de tetraploides eran más grandes que los normales diploides, lo cual no es sorprendente, ya que las células tetraploides contienen el doble de la carga cromosómica de los diploides, por lo que se infirió que necesitan mayor citoplasma para ser funcionales. Esto llevó a Guo y sus colegas a conseguir ovocitos grandes de ostión producidos por diploides, pero se dieron cuenta que estos ovocitos presentan muy poca variación en talla. Durante estos estudios otros investigadores publicaron resultados que abrieron el camino para el futuro desarrollo de tetraploides. Stephens y Downing (1989), publicaron que los ovocitos de las ostras triploides eran significativamente más grandes que los de las diploides normales, de lo que surgió la idea de utilizar ovocitos de organismos triploides para la obtención de tetraploides. Paralelamente al analizar la fecundidad de organismos triploides de ostión, Guo encontró que las hembras triploides pueden producir un número significante de ovocitos, y que éstos presentaban divisiones meióticas posteriores a la fertilización. Estos dos resultados, mayor tamaño en ovocitos de triploides que los de diploides, y la viabilidad meiótica de los ovocitos de triploides, permitieron que a finales de 1990, Guo planteara la hipótesis que establecía que los tetraploides podrían teóricamente



ser producidos bloqueando el primer cuerpo polar en ovocitos de triploides (fecundados con esperma haploide). En el verano de 1992, Guo fue invitado por el Dr. Allen a la Universidad de Rutgers, Haskin Shellfish Research Laboratory para investigar durante su posdoctorado la genética y el potencial reproductivo de ostras triploides. Guo y Allen (1994c) encontraron que las hembras triploides pueden producir de 1 a 4 millones de ovocitos, y observaron que aunque a una frecuencia baja, los tetraploides podían ser producidos espontáneamente por apareamientos naturales de hembras triploides y machos diploides. En 1993, Guo y Allen probaron la hipótesis, produciendo tetraploides al bloquear con citocalasina B el primer cuerpo polar en ovocitos de triploides fertilizados con espermatozoides haploides. Tres meses posfertilización estos investigadores obtuvieron 2,500 ostras juveniles, de los cuales 67% fueron tetraploides, marcando estos estudios el nacimiento de los primeros moluscos tetraploides (Guo y Allen, 1994b).

## **2. Métodos de inducción a la tetraploidía.**

Antes del desarrollo de Guo y Allen en 1994b, se evaluaron tres métodos de inducción a la tetraploidía en diferentes especies. El primer método involucra la producción incidental de tetraploides, inhibiendo la extrusión del primer cuerpo polar en ovocitos derivados de reproductores diploides. En repetidos estudios se ha demostrado que los embriones producidos por este método (con una excepción) no alcanzan a sobrevivir a semilla o talla adulta (Stephens y Downing, 1988; Dufy y Diter, 1990; Gendreau y Grizel, 1990; Guo *et al.*, 1992a; 1992b; Scarpa *et al.*, 1993; Allen *et al.*, 1994; Cai y Beaumont, 1996; Yang *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2000). De acuerdo a Allen *et al.* (1994), existe una especie *Ruditapes philippinarum* donde se han producido en forma incidental tetraploides que

sobrevivieron hasta la talla adulta. El segundo método consiste en la inhibición de la primera división celular (mitosis I) en ovocitos derivados de reproductores diploides, fecundados con espermatozoides haploides, el cual tampoco ha mostrado resultados satisfactorios (Duffy y Diter, 1990; Guo, 1991, citado por Guo y Allen, 1994b; Guo *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 1997). El tercer método es el ya descrito como el que ha demostrado su factibilidad en la producción de tetraploides, esto es, utilizando ovocitos producidos por organismos triploides, los cuales son fecundados con espermatozoides de organismos diploides, e inhibiendo la extrusión del primer cuerpo polar pero permitiendo la liberación del segundo cuerpo polar (Guo y Allen, 1994b). Con este método se han logrado tetraploides viables a talla adulta en dos especies, *Crassostrea gigas* (Guo y Allen 1994b) y *Pinctada martensii* (He *et al.*, 2000).

### **CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL TETRAPLOIDE**

La característica de más importancia que debe tener un tetraploide es el ser fértil, ya que esto permitirá el perpetuar su descendencia y producir los denominados “triploides biológicos”. Guo *et al.* (1996) produjeron en el ostión *Crassostrea gigas* triploides biológicos a partir de los tetraploides logrados, evaluando comparativamente estos con triploides producidos con CB. Entre los resultados más significativos estuvo el hecho de que se logró eliminar en esta especie uno de los problemas asociados con los triploides inducidos químicamente, ya que los triploides biológicos a 8 meses de edad eran 100% triploides, mientras que en los triploides producidos con CB hubo reversión cromosómica, habiendo encontrado solo 46% triploides y 2% mosaicos (diploide-triploide). Posteriormente Guo y Allen (1997) evaluaron la gametogénesis, proporción de sexo y el

proceso meiótico en tetraploides, triploides y diploides en *Crassostrea gigas*, encontrando que los tetraploides alcanzaron la madurez sexual en un año, presentando una relación de sexos aproximada de 1:1. En contraste con una frecuencia alta de hermafroditas en los triploides, en *Crassostrea gigas* tetraploide hubo aproximadamente el mismo nivel de hermafroditas que en los diploides. La fecundidad de los tetraploides fue comparable a la de los diploides, difiriendo mucho de una reducida fecundidad de los triploides. En relación al proceso meiótico en triploides, tres cromosomas homólogos sinapsan como trivalentes y en la metafase de la meiosis I el cromosoma extra segrega en forma aleatoria produciendo gametos aneuploides. Sin embargo, en tetraploides los cuatro cromosomas sinapsan de forma cuadrivalente y los dos cromosomas extras cosegregan en la meiosis I para producir gametos balanceados diploides.

## **BASES DEL CONOCIMIENTO CELULAR ASOCIADO CON LA INDUCCIÓN A LA POLIPLOIDÍA.**

### ***1. Mitosis***

Al igual que la mayoría de las especies animales, los moluscos tienen dos juegos de cromosomas (cada juego siendo la contribución de cada progenitor) y son referidos como diploides. El crecimiento de un organismo diploide se lleva a cabo por multiplicación o división celular, implicado únicamente el proceso mitótico (Fig. 1). Una célula diploide experimenta un periodo de crecimiento e incremento de la masa celular, denominada G<sub>1</sub>. En el caso de una célula que requiere 24 horas para el ciclo completo, las primeras 10 horas podrían corresponder al periodo G<sub>1</sub>. En este periodo la célula además de dedicarse a crecer se prepara químicamente para la síntesis de ADN. Durante la fase de síntesis (S), cuya

duración es de alrededor de 9 horas, el material genético (ADN de todos los cromosomas) se duplica. Después de completarse la duplicación del ADN, la célula entra en una segunda fase de crecimiento denominada  $G_2$ . Esta etapa requiere de por lo menos 4 horas y continúa hasta la cuarta fase, correspondiente al inicio de la mitosis, la cual se completa en sólo una hora (Gardner *et al.*, 1998).

La mitosis, que en un sentido estricto se refiere a la división del núcleo en dos núcleos hijos idénticos seguida por una división celular, comprende cuatro fases sin considerar la interfase, que es el lapso que transcurre entre dos divisiones celulares ( $G_1$ , S,  $G_2$ ). Estas fases son *profase*, *metafase*, *anafase* y *telofase* (Fig. 2). Una vez que los cromosomas se duplican durante la interfase ( $G_1$ , S,  $G_2$ ) los centriolos (dos pequeños cuerpos cilíndricos que desempeñan un papel prominente durante la división celular) se dividen e inician su separación hacia los polos opuestos de la célula. Durante la *profase* los cromosomas se compactan y pueden observarse en un microscopio óptico que son dobles en toda su extensión, excepto en un pequeño punto en el que están unidos, llamado centrómero. Cada una de las dos partes idénticas (replicadas) de un cromosoma recibe el nombre de cromátida.

Los centriolos se desplazan a los lados opuestos del núcleo y el citoplasma que los rodea se modifica formando fibras proteicas delgadas que darán lugar al huso acromático. Al conjunto formado por el centriolo y los filamentos de la proteína tubulina se les conoce como aster. Al final de la *profase*, tanto la membrana nuclear como los nucleolos se desintegran y desaparecen en el citoplasma. Los cromosomas replicados se desplazan hacia el ecuador, y en ese momento la mitosis entra en etapa de *metafase*. En esta fase los

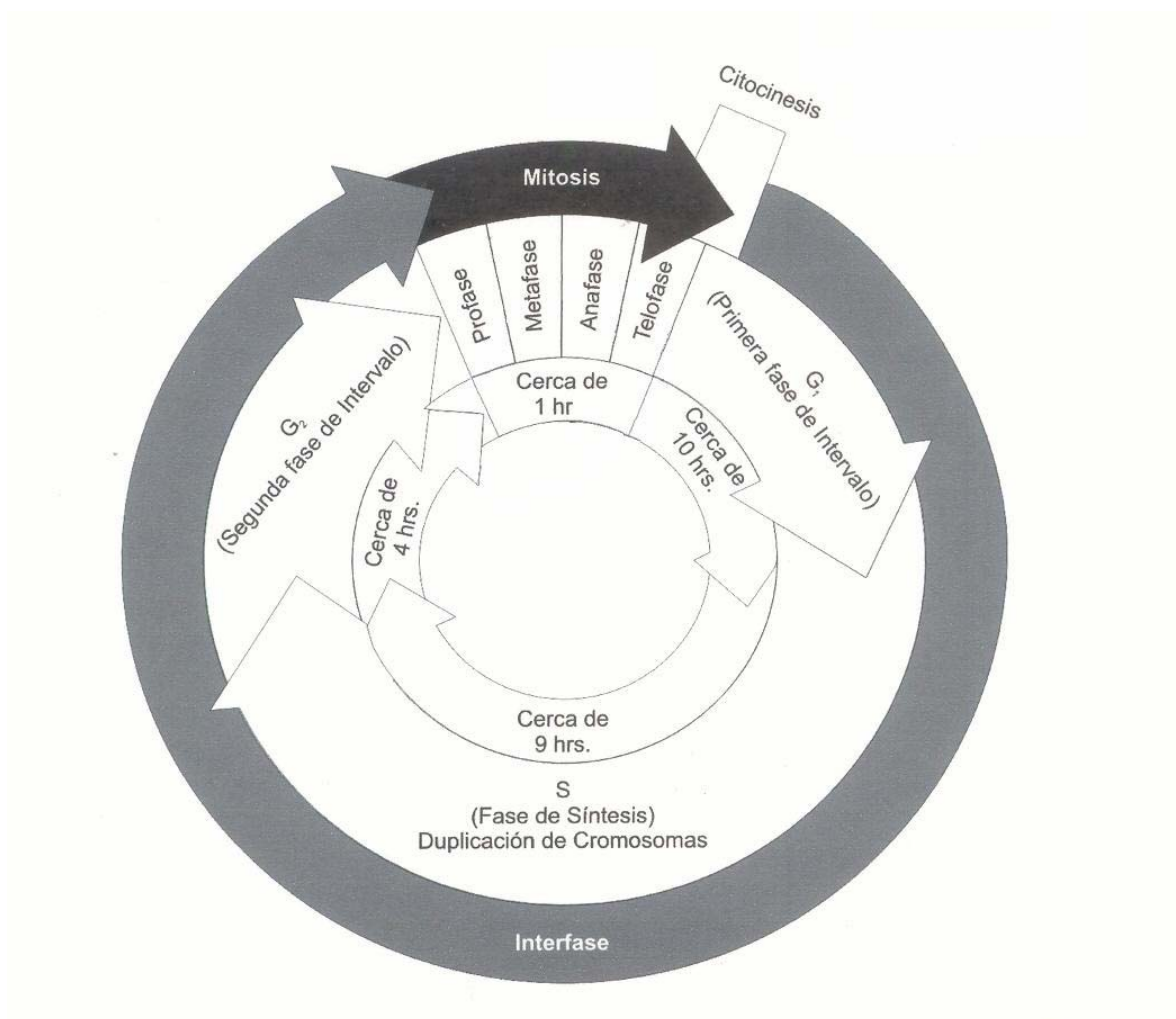


Fig. 1. Diagrama circular representando un solo ciclo celular. El tiempo de generación, lapso necesario para completar un ciclo, comprende la división celular (mitosis y citocinesis) y la interfase. (Tomado de Herskowitz, 1987).

cromosomas se unen a las fibras del huso acromático por medio de su centrómero. Durante la *anafase*, los centrómeros se separan y tan pronto como esto sucede las cromátidas hermanas de cada cromosoma se repelen mutuamente, iniciando un desplazamiento hacia

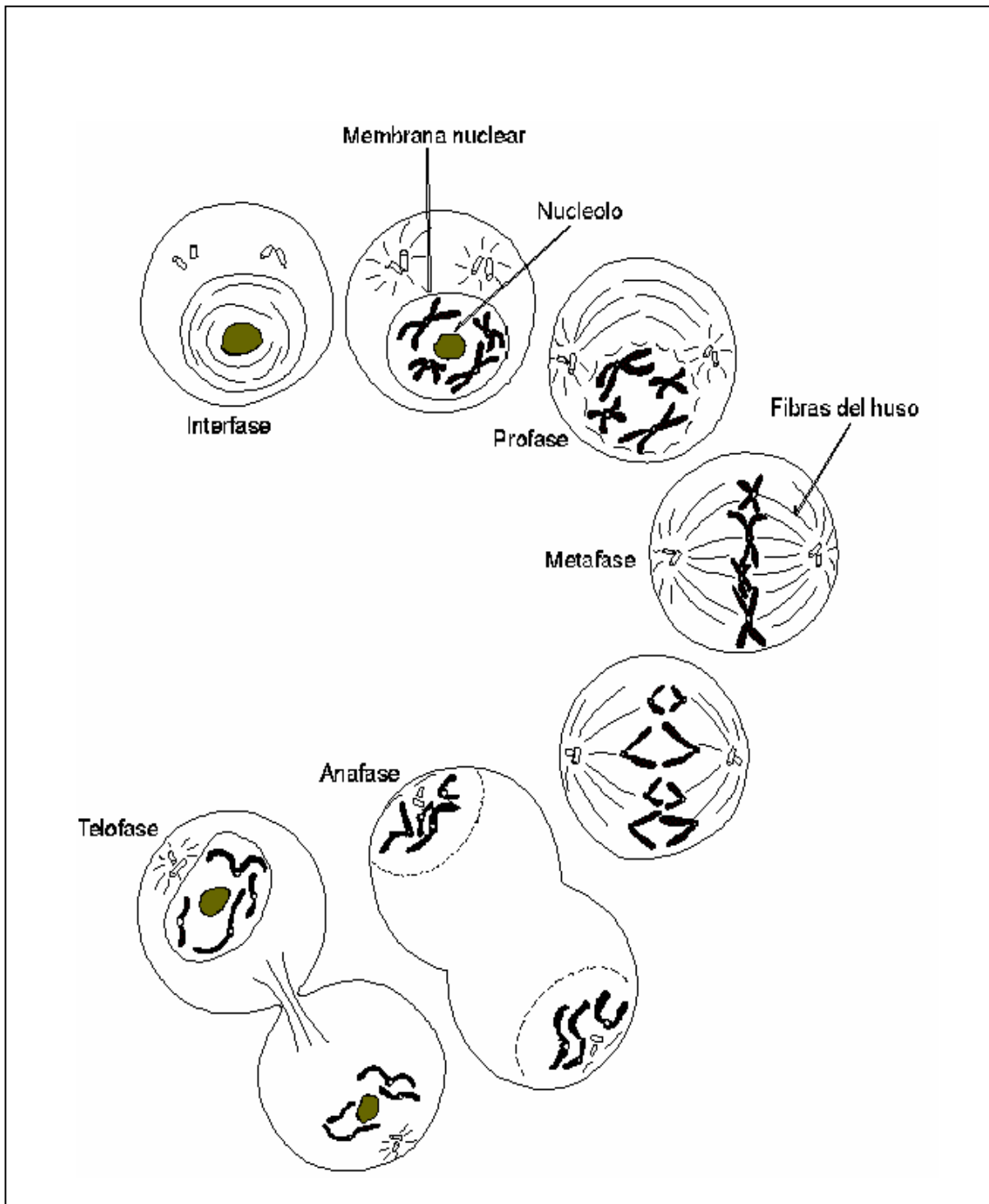


Fig. 2. Esquema de la mitosis. Tomado de Hartl (1991).

polos opuestos, posiblemente debido al acortamiento de las fibras del huso que jalar a las cromátidas. La *anafase* termina cuando las cromátidas llegan a los polos (cada cromátida es ahora un cromosoma completo). Después de llegar a los polos se alargan o descompactan, estado en el que estarán durante la interfase. Durante la *telofase* las fibras del huso acromático y los aster desaparecen, se forman dos núcleos con una membrana alrededor de cada uno, y la mitosis concluye. Finalmente el citoplasma se divide mediante una constricción que converge de las dos partes separando a las dos células hijas, ambas entrando a una nueva interfase (Fig. 2) (Gardner *et al.*, 1998).

## **2. Meiosis**

La meiosis, a diferencia de la mitosis, es un proceso en el cual adicionalmente a la replicación cromosómica, existen dos reducciones cromosómicas con el fin de obtener un producto haploide. Otra característica que distingue a la meiosis de la mitosis es el entrecruzamiento o recombinación entre cromosomas homólogos (proceso por el cual los cromosomas homólogos intercambian segmentos formando nuevas combinaciones de alelos). La meiosis comienza en un núcleo diploide de células germinales, en el cual cada cromosoma contiene una cantidad de ADN replicado. Después de dos divisiones celulares (meiosis I y meiosis II) y en ausencia de una nueva replicación de ADN, se obtienen cuatro núcleos haploides en los cuales cada juego cromosómico contiene la mitad de la cantidad de ADN que había antes del inicio de la meiosis (Fig. 3) (Gardner *et al.*, 1998).

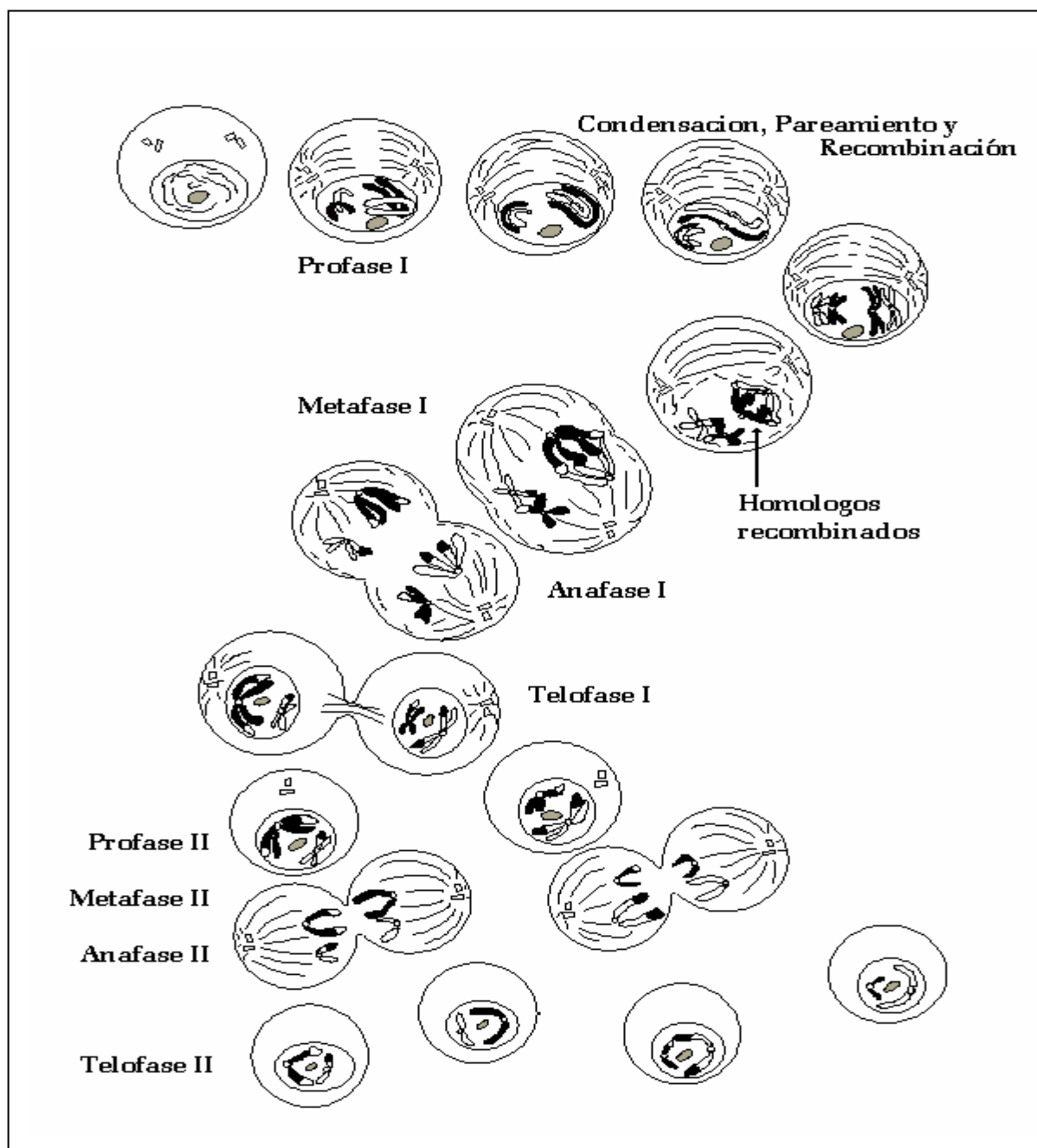


Fig. 3. Esquema de la meiosis. Tomado de Hartl (1991).



### **2.1 Primera división meiótica (MI).**

La *profase* de la meiosis I (primera división) se subdivide en subetapas. La *profase* es el intervalo más complejo, prolongado y genéticamente más significativo, debido al entrecruzamiento o recombinación entre cromosomas homólogos que permite generar nueva variabilidad genética en los gametos (Fig. 4). Las subdivisiones de la *profase* I son: leptoteno (“filamento delgado”), cigoteno (“filamento pareado”), paquiteno (“filamento grueso”), diploteno (“filamento doble”) y diacinesis (“dividido a través”). En el inicio de la *profase* I, en leptoteno, los filamentos de cromatina se ven mezclados, y resulta casi imposible seguir un filamento por más de una micra de su longitud sin perderlo en un laberinto de otros filamentos (Fig. 4.1A). La continuación de la *profase* I es el cigoteno, caracterizado por ser el estado donde ocurre el apareamiento de los cromosomas homólogos, a través del proceso de asociación denominado sinapsis. La sinapsis no parece comenzar en un sitio particular del cromosoma, ni tampoco ciertos cromosomas se juntan antes que otros. A medida que ocurre la sinapsis, en el espacio que queda entre los cromosomas apareados se organiza una estructura compleja, denominado complejo sinaptonémico, la cual se encuentra exclusivamente en las células meióticas durante la *profase* I temprana. El complejo sinaptonémico se caracteriza por apareamiento punto por punto de cromosomas homólogos dando lugar a formaciones cromosómicas que se conocen como bivalentes (Fig. 4.1B y F). Cuando termina el apareamiento y el complejo sinaptonémico está completamente desarrollado, el cigoteno termina e inicia el paquiteno, el cual se caracteriza por presentar los cromosomas homólogos completamente apareados. Los cromosomas se han condensado mucho más, aunque todavía no se muestra visualmente

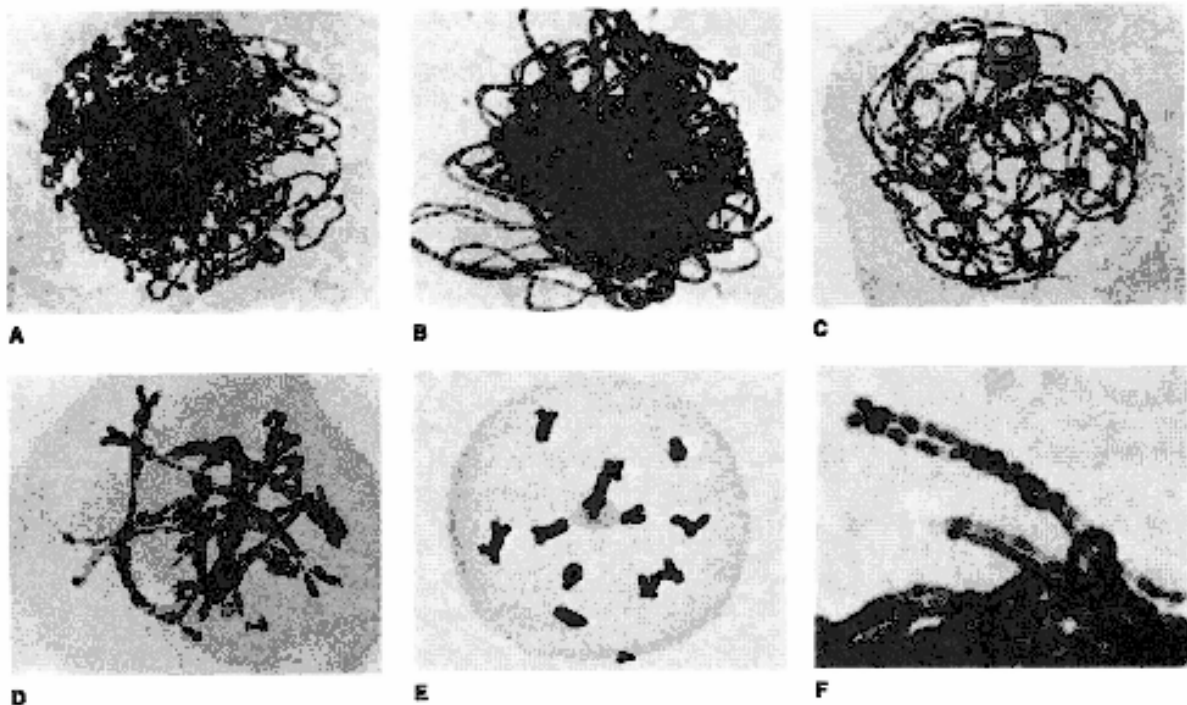


Fig. 4.1 . Subestadios de profase de la primera división meiótica en microsporocitos de un Lily (*Lilium longiflorum*) A. Leptoteno, en el que la condensación de los cromosomas es iniciada y los cromómeros son visibles a lo largo de la longitud de los cromosomas. B. Cigoteno, en este subestadio ocurre el apareamiento (sinapsis) de los cromosomas homólogos. Regiones pareadas y no pareadas pueden observarse particularmente en la parte baja izquierda de esta fotografía. C. Paquiteno, ocurren los “crossing-over” entre los cromosomas homólogos. D. Diploteno, caracterizado por la repulsión mutua de los cromosomas homólogos pareados que quedan unidos en uno o más puntos (quiasmas) a lo largo de su longitud. E. Diacinesis, en el que los cromosomas alcanzan su máxima contracción. F. Cigoteno, (en magnificación alta en otra célula), mostrando homólogos pareados y emparejamiento de cromosomas durante la sinapsis. [Cortesía de Marta Walters (A,B,C,E,F) y Herbert Stern (D).] Tomada de Hartl (1991).

su condición replicada. Un par de cromosomas es llamado bivalente, y al igual que para la mitosis, cada cromosoma de este par está constituido por dos mitades replicadas denominadas cromátidas hermanas. A medida que el paquiteno avanza los bivalentes se condensan más, pero siguen siendo pares en estrecha sinapsis. El intercambio físico entre segmentos de cromosomas homólogos, proceso denominado entrecruzamiento (“crossing

over”), ocurre durante el paquiteno (Fig. 4.1C). En el diploteno comienza la separación de los cromosomas sinapsados a lo largo de diversos sectores, y los homólogos se mantienen asociados sólo en ciertos lugares denominados quiasmas, que son los sitios en donde previamente ocurrió entrecruzamiento entre cromátidas diferentes homólogas (Fig. 4.1D). La diacinesis se caracteriza por la máxima contracción de los cromosomas. Los cromosomas bivalentes se observan cortos y gruesos, los quiasmas son evidentes, y los bivalentes individuales están relativamente bien separados en el núcleo. A medida que la diacinesis se aproxima a su término, el núcleo y la envoltura nuclear desaparecen y los microtúbulos del huso se hacen visibles en el área cromosómica (Fig. 4.1E). En *prometáfase* los cromosomas se mueven de manera errática, pero eventualmente ocurre la conjunción de cromosomas homólogos en el punto medio del huso. Al final de esta fase preliminar los bivalentes homólogos se encuentran alineados conjuntamente a lo largo del plano ecuatorial del huso, iniciando así la *metáfase I*. En esta fase los brazos de los cromosomas bivalentes se encuentran en el ecuador del huso y los centrómeros de los cromosomas bivalentes homólogos se encuentran pareados pero tan separados entre sí como físicamente es posible. Esta situación es opuesta a la del alineamiento de los cromosomas durante una metafase mitótica, en la que los centrómeros se ubican en el punto medio del huso de cada uno de los cromosomas replicados (sin apareamiento de homólogos) y los brazos de los cromosomas se ondean en todas direcciones de ambos lados de esta zona (Gardner *et al.*, 1998).

Cada cromosoma del bivalente está compuesto por dos cromátidas y los centrómeros de cada par de cromátidas hermanas permanecen estrechamente asociadas al mismo lado del

punto medio del huso, esto es, enfrentan el mismo polo, mientras que las cromátidas hermanas del cromosoma homólogo enfrentan el polo opuesto. Cuando la *anafase I* inicia, cada cromosoma completo (replicado y recombinado) se separa de su homólogo dirigiéndose hacia polos opuestos. Cada cromosoma es conocido como diada (describe su carácter doble e indica que esta compuesto por dos cromátidas). Cada diada posee la cantidad 2X de ADN, de tal forma que la reducción a la haploidía aun no se alcanza. En *telofase I*, si es que esta etapa existe en una secuencia meiótica, ocurre la reorganización de los cromosomas. Los cromosomas se descondensan y alcanzan longitudes mayores, los núcleos y envolturas nucleares reaparecen haciéndose así evidentes los núcleos hijos, ocurriendo posteriormente la citocinesis (Fig. 3)(Gardner *et al.*, 1998).

### ***2.2 Segunda división meiótica (MII).***

De la primera a la segunda división meiótica no existe interfase, ni profase, iniciándose esta división en la metafase. Cada cromosoma compuesto de dos cromátidas hermanas pero recombinadas se desplaza independientemente del homólogo hasta el ecuador en la *metafase II*. En la *anafase II*, las cromátidas de cada cromosoma duplicado se separan, y migran hacia los polos opuestos del huso, cada uno de ellos siendo un cromosoma. En la *telofase II* cada cromosoma se descompacta al acercarse la *interfase*. Al terminar la meiosis II existen cuatro células sexuales haploides (Gardner *et al.*, 1998).

### ***2.3 Diferencias entre los gametos sexuales formados***

Mientras que cada célula germinal masculina produce cuatro gametos haploides funcionales después de haber completado la meiosis I y II, la célula germinal femenina se

divide en forma desigual, de tal forma que en la primera división meiótica una de las dos células contiene casi todo el citoplasma y un juego de cromosomas replicados, y la otra no contiene más que el otro juego de cromosomas replicados. Esta última célula es denominada como primer cuerpo polar el cual permanece adherido a la célula con la mayor cantidad de citoplasma. La meiosis II sigue un patrón similar en cuanto a la distribución de citoplasma entre las dos células formadas en esta división, pero ahora al concluir ésta cada una contiene un juego de cromosomas haploide. A la célula que contiene solo cromosomas y no citoplasma se le denomina segundo cuerpo polar. Al final de la meiosis se produce un ovocito con dos cuerpos polares; el segundo cuerpo polar (haploide) adherido al ovocito, e intermedio al primer cuerpo polar (diploide) posicionado distalmente (Beaumont y Fairbrother, 1991).

### ***3. La inducción a la triploidía y su asociación con eventos meióticos***

En los moluscos los ovocitos son expulsados al ambiente para la fecundación externa. Su desarrollo meiótico está detenido en la metafase de la meiosis I. El proceso meiótico se reinicia una vez que ocurre la fertilización por el espermatozoide (Longo, 1983), siendo esta característica la que permite la inducción artificial a la poliploidía en la mayor parte de los moluscos.

#### ***3.1 Inhibición de la Meiosis I***

Cuando se inhibe el primer cuerpo polar (meiosis I) para producir triploides, los cromosomas replicados de cada homólogo que formarían el primer cuerpo polar son retenidos dentro del ovocito. Posteriormente se permite que la meiosis II ocurra, la cual

diferirá de un ovocito en el cual no se inhibió el primer cuerpo polar en que el doble de cromosomas tendrá que alinearse en forma individual en la placa metafásica para la segunda división ecuacional, y el segundo cuerpo polar contendría dos juegos de cromosomas al igual que el ovocito, esto es, contendrían 2X de ADN, y serían diploides. Al unirse estos cromosomas con el juego de cromosomas proveniente del esperma, se forma un cigoto triploide (Fig. 5) (Beaumont y Fairbrother, 1991). Si la segregación cromosómica durante la meiosis II no es balanceada, otro tipo de ploidías pueden ocurrir. Por ejemplo, tetraploides pueden ocurrir cuando en el segundo cuerpo polar solamente se extruye un juego cromosómico, reteniéndose en el ovocito tres juegos completos derivados de un homólogo replicado, y uno del otro homólogo replicado. Al ocurrir la singamia (fusión del pronúcleo femenino y masculino) de pronúcleos femenino y masculino, el cigoto resultante será tetraploide. Es importante mencionar que en estudios donde se ha inhibido “teóricamente” solo la MI para producir triploides, se ha observado la ocurrencia en estadios larvarios de tetraploides y pentaploides. Estos últimos son resultado de inhibir la MI y MII lo que resulta en pronúcleos femeninos tetraploides, los cuales al unirse con el pronúcleo masculino haploide darán como resultado un cigoto pentaploide (Cooper y Guo, 1989). La ocurrencia de tetraploides como resultado de la inhibición de la primera división durante la meiosis puede ser explicada como resultado del alineamiento de homólogos bivalentes en la metafase I con una segregación posterior de 3:1.

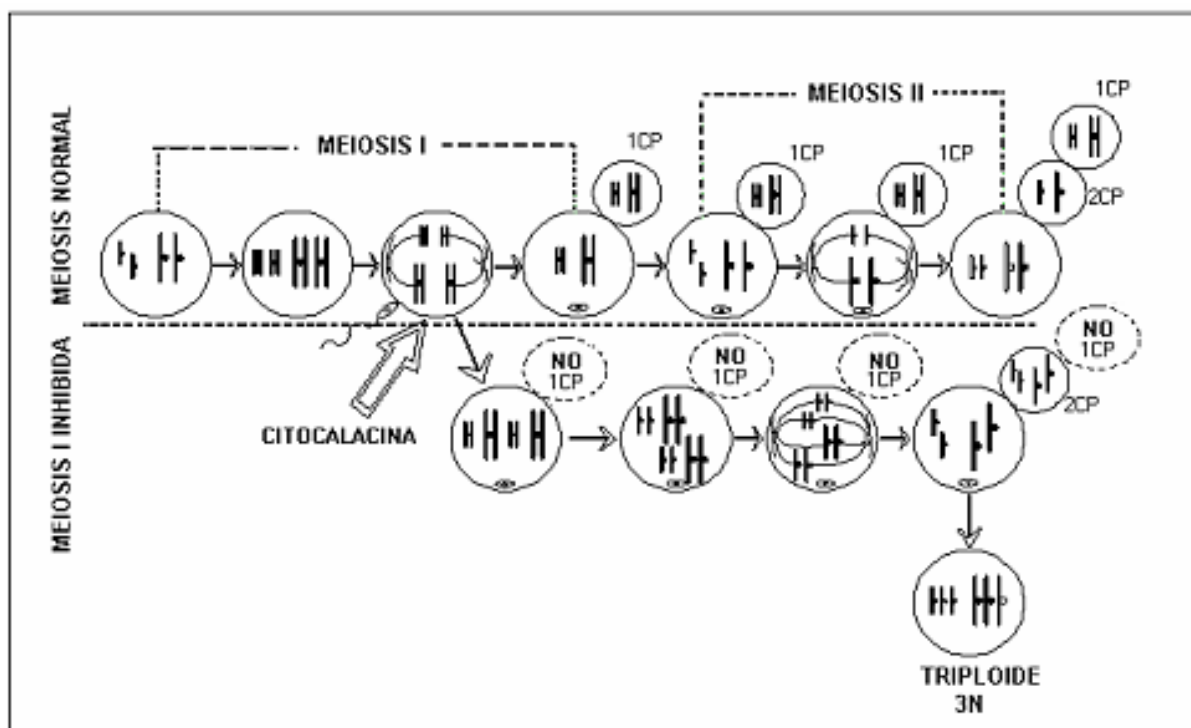


Fig. 5. Representación esquemática de la inhibición del primer cuerpo polar para producir cigotos triploides, en ovocitos normales (1CP = primer cuerpo polar; 2CP = segundo cuerpo polar). Esquema diseñado por A. M. Ibarra.

### 3.2 Inhibición de la Meiosis II

El proceso más común por el mayor éxito logrado para la producción de triploides en moluscos es a través de la inhibición de la formación del segundo cuerpo polar (MII), habiendo permitido formar normalmente el primer cuerpo polar. En este método se retiene a ambas cromátidas hermanas de cromosomas homólogos durante la meiosis II para formar un pronúcleo femenino diploide, el cual después de unirse con el juego de cromosomas aportado por el espermatozoide forma un cigoto triploide (Fig. 6) (Beaumont y Fairbrother, 1991).

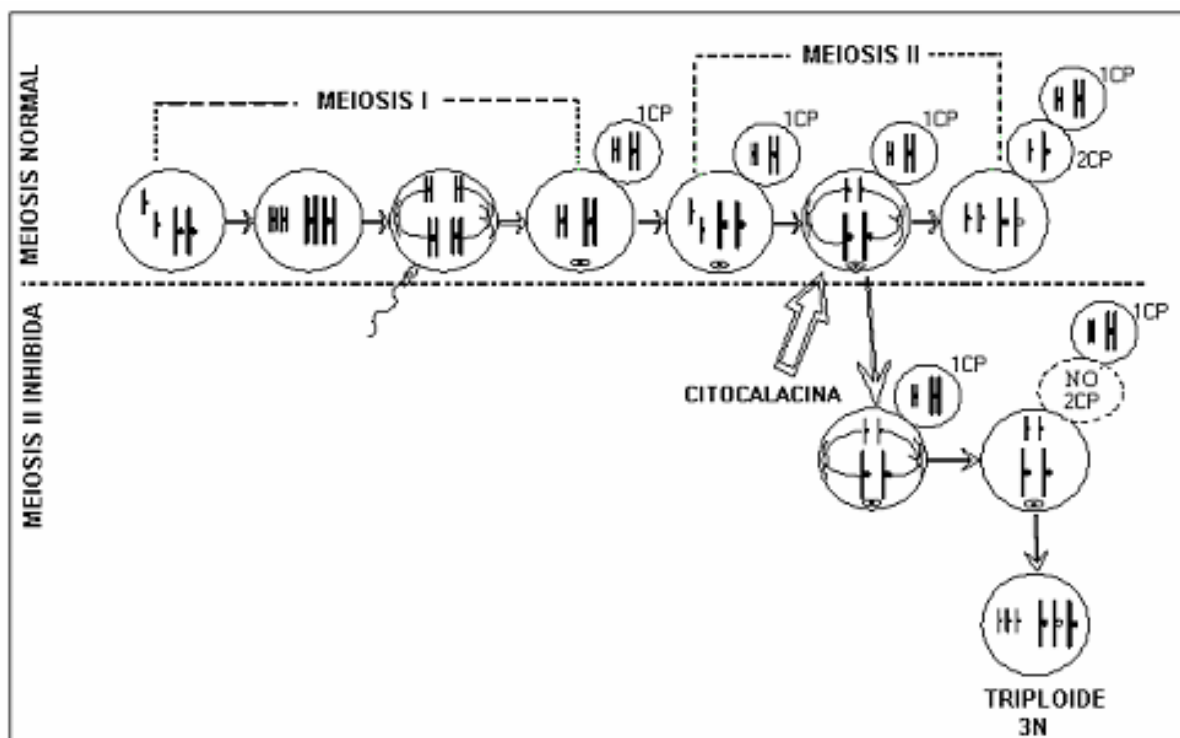


Fig. 6. Representación esquemática de la inhibición del segundo cuerpo polar para producir cigotos triploides, en ovocitos normales (1CP = primer cuerpo polar; 2CP = segundo cuerpo polar). Esquema diseñado por A. M. Ibarra.

#### 4. La inducción a la tetraploidía y su asociación con eventos mitóticos y meióticos.

La inducción a la tetraploidía ha utilizado tres métodos:

**4.1 Inhibición de la mitosis o la primera división celular del cigoto.** Teóricamente, si el tratamiento de inhibición con CB es administrado durante la primera división, los cromosomas replicados que normalmente se dividirían para formar dos células “hijas”, serían retenidos en una sola célula resultando en un cigoto con cuatro juegos de cromosomas. Subsecuentemente las divisiones mitóticas producirían sólo células con cuatro juegos de cromosomas, conformando un organismo tetraploide (Fig. 7) (Beaumont y Fairbrother, 1991).



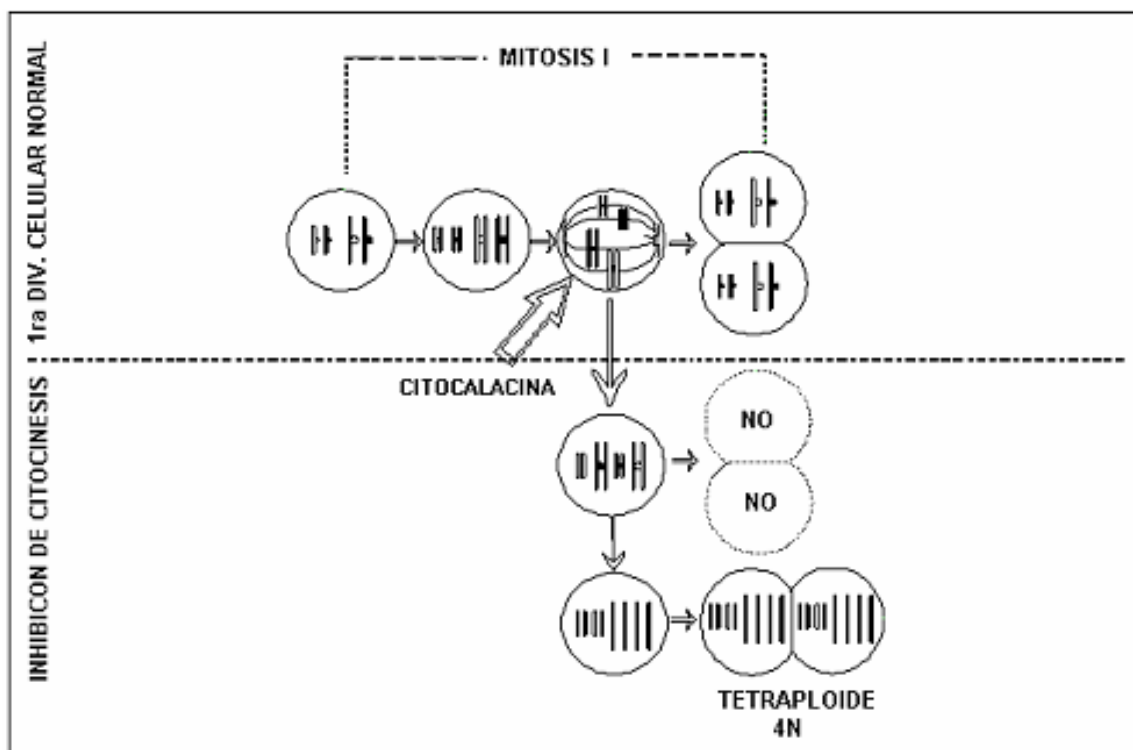


Fig. 7. Representación esquemática de la inhibición de la primera división mitótica, para producir cigotos tetraploides. Esquema diseñado por A. M. Ibarra.

**4.2 Inhibición del primer cuerpo polar.** El segundo método es a través de la inhibición del primer cuerpo polar, en donde como ya se explicó anteriormente, una segregación incidental de 3:1 durante la meiosis II permitiría lograr la producción de tetraploides (Fig. 8).

**4.3 Inhibición del primer cuerpo polar en huevos de triploides.** El tercer método se sustenta en el hecho de que al inhibir la meiosis I, o la primera reducción cromosómica en un ovocito de un triploide, se reduce la probabilidad de producir gametos no balanceados. Los gametos no balanceados ocurren debido a que para cada cromosoma existen tres copias en el triploide, y durante la metafase I solamente se podrán aparear dos de ellas. La tercera

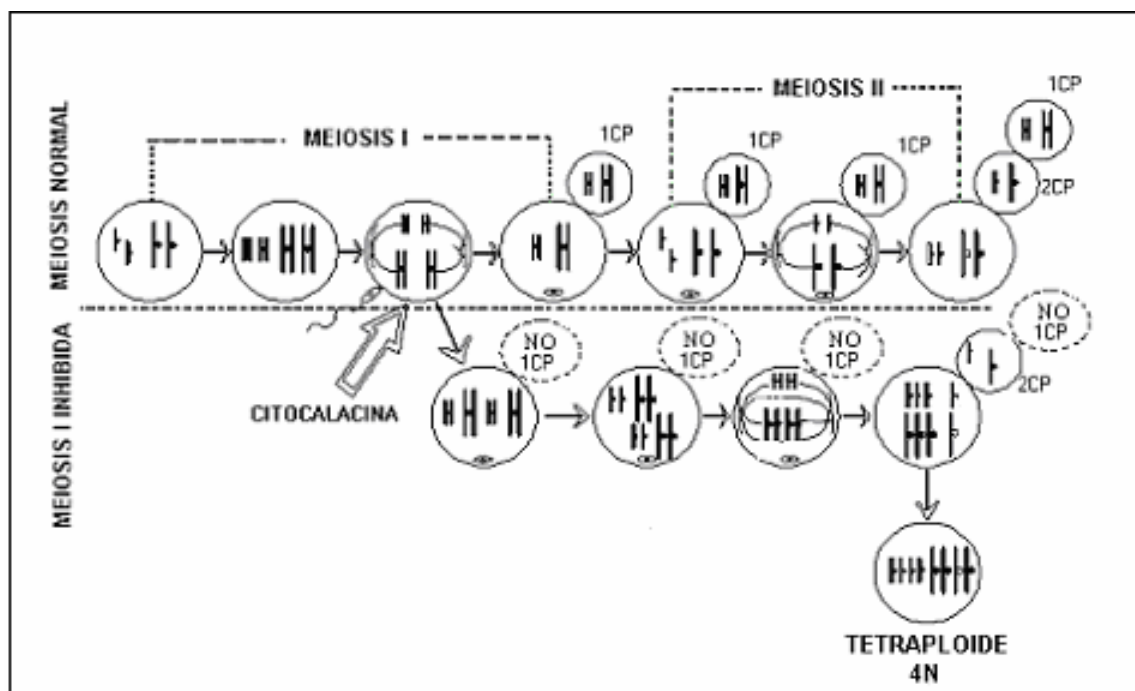


Fig. 8. Representación esquemática de la inhibición del primer cuerpo polar, donde resultan cigotos tetraploides de forma “incidental”. Esquema diseñado por A.M. Ibarra.

copia de cada uno de los cromosomas podrá migrar aleatoriamente hacia cualquiera de los dos polos durante la anafase I, lo cual resultará en que en algunos casos la tercera copia de un cromosoma migre hacia el cuerpo polar, pero para otros cromosomas la tercera copia puede que sea retenida. Al inhibir la primera reducción cromosómica o meiosis I lo que se busca es que existan cromosomas en pares, de tal manera que durante la segunda reducción cromosómica (metafase II) cada cromosoma se alinea en el ecuador de la célula, lográndose así la producción de gametos balanceados, que se caracterizarán por contener tres juegos completos de cromosomas. Cuando la contribución cromosómica del esperma es integrada, el cigoto producido es tetraploide, en el cual tres juegos son aportados por la hembra, y uno por el macho (Fig. 9).

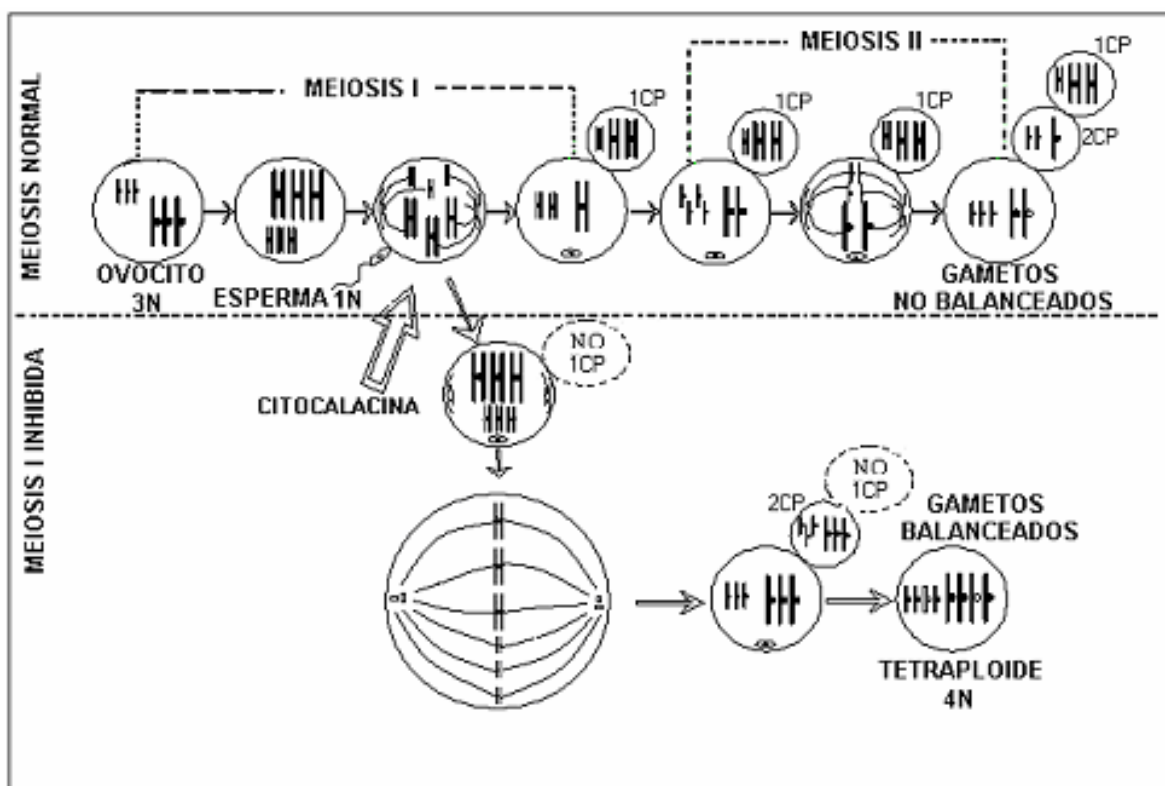


Fig. 9. Representación esquemática de la inhibición del primer cuerpo polar en ovocitos de triploides, fecundados con espermias haploides para producir cigotos tetraploides (Guo y Allen, 1994b), Esquema diseñado por A. M. Ibarra.

## JUSTIFICACIÓN

Contrario a los avances a nivel internacional en cuanto a la generación de organismos poliploides para ser utilizados en la producción comercial de moluscos, en México existen pocos avances. De hecho, el único estudio previo existente sobre el tema logró ya el desarrollo de un conocimiento sobre la producción de triploides de almeja catarina *Argopecten ventricosus*, y su evaluación productiva y reproductiva (Ruiz-Verdugo et al., 2000, 2001a, 2001b), habiendo encontrado que la ventaja del triploide sobre el diploide es de tal magnitud que la producción de callo (músculo aductor) de esa especie podría ser incrementada en un 100% al utilizar organismos triploides. El siguiente paso en la investigación de esta especie es claramente la evaluación de métodos para la inducción a la tetraploidía, buscando producir organismos que al ser apareados con diploides permitan la producción de 'triploides biológicos'. Este fue el primer objetivo planteado en el presente trabajo. Para este fin era necesario un entendimiento mayor sobre los efectos de la triploidía en la almeja a nivel de células gaméticas, ya que la producción exitosa de los organismos tetraploides se sustenta en la disponibilidad de ovocitos de triploides como ya se mencionó en la última sección de los antecedentes. Por lo tanto, se estudiaron los efectos de la triploidía sobre la gametogénesis a nivel de ultraestructura y cortes finos tanto en gónada femenina como en gónada masculina de almeja catarina.

De las otras especies de moluscos mencionadas inicialmente en la introducción, esto es, esas con importancia comercial en cultivo en el noroeste de México, a la fecha existe poca investigación en forma general, y en cuanto a la triploidía no existen estudios previos que pudiesen ser aplicados en el mejoramiento de la producción acuícola. Por ejemplo, no

se conocen las mejores condiciones de inducción a la triploidía, así como tampoco se conocen los efectos de la triploidía en la gametogénesis o el crecimiento o engorda a talla comercial. Esta información es vital antes de tomar una decisión de desarrollar una biotecnología de poliploidía a nivel comercial para cualquier especie.

Se decidió iniciar con el desarrollo de este conocimiento en dos especies nativas: el abulón rojo (*Haliotis rufescens*) y la almeja mano de león (*Nodipecten subnodosus*). El abulón es una especie cuya explotación ha sido principalmente por medio de la pesquería, y solo recientemente se han desarrollado dos laboratorios comerciales en Baja California, Abulones Cultivados y BC Abalone, para su producción y engorda en cautiverio. Este desarrollo nos permitió el poder llevar a cabo los primeros estudios en abulón, los cuales comprenden únicamente la inducción a la triploidía en este trabajo de tesis, debido al hecho de que esta es una especie con un ciclo de vida muy largo, e imposible de evaluar dentro del contexto de este trabajo doctoral. La hipótesis general de trabajo en este caso fue que la triploidía en abulón podía ser inducida simplemente encontrando la mejor dosis del químico comúnmente utilizado (citocalacina-B). Los resultados del presente trabajo nos indicaron la existencia de un efecto adicional a la dosis en el éxito logrado durante la inducción a la triploidía. En el caso de la almeja mano de león, una especie con un ciclo de vida de 2 años o más, con maduración gonádica ocurriendo desde el primer año de vida (Racotta et al. 2003), los estudios realizados en el presente trabajo comprenden desde la inducción a la triploidía hasta la evaluación comparativa del crecimiento y gametogénesis entre diploides y triploides durante dos años. Basados en la información obtenida previamente por Ruiz-Verdugo et al. (2000, 2001a, 2001b) para la almeja catarina, la hipótesis general de trabajo para los estudios realizados en la almeja mano de león fue que

la triploidía resultaría en ventajas significativas sobre el crecimiento de esta especie, y que la esterilidad sería parcial. Los resultados en este caso nos indicaron una respuesta única entre moluscos en cuanto a los efectos de la triploidía sobre el crecimiento.

## OBJETIVOS

### GENERAL

- Establecer las bases biotecnológicas para la inducción a la poliploidía (tri- y tetraploidía) en tres especies de moluscos, así como evaluar los efectos biológicos y productivos resultantes de la alteración de la condición normal de diploidía (2N).

### ESPECÍFICOS

- Determinar los efectos de la triploidía sobre la estructura y abundancia de diferentes tipos celulares de gametos durante el proceso de gametogénesis en la almeja catarina (*Argopecten ventricosus* Sowerby II, 1842), con fines de definir el estadio celular de arresto meiótico.
- Evaluar tres modalidades para la inducción a la tetraploidía en la almeja catarina (*Argopecten ventricosus* Sowerby II, 1842), con fines de producir tetraploides viables.
- Evaluar la inducción a la triploidía en almeja mano de león *Nodipecten (Lyropecten) subnodosus* y sus efectos sobre el crecimiento y gametogénesis.
- Evaluar la inducción a la triploidía con diferentes concentraciones en abulón rojo *Haliotis rufescens*.

## LITERATURA CITADA

- Akashige, S., Fushimi, T., 1991. Growth, survival and glycogen content of triploid pacific oyster *Crassostrea gigas* in the waters of Hiroshima, Japan. Nippon Suisan Gakkaishi 56: 1063-1071.
- Allen, S. K. Jr., 1987a. Gametogenesis in three species of triploid shellfish: *Mya arenaria*, *Crassostrea gigas* and *Crassostrea virginica*. Proc. World Symposium on Selection Hybridation and Genetic Engineering in Aquaculture of Fish and Shellfish for Consumption and Stocking. Bordeaux, 27-30 may, Vol. II, Berlin, pp. 207-217.
- Allen, S. K. Jr., 1987b. Genetic manipulations - Critical Review of methods and performances. proc. World Symposium on selection Hybridization and Genetic Engineering in aquaculture of fish and shellfish for consumption and stoking. Bordeaux, 27-30 May. Voll II, Berling. 127-143 pp.
- Allen, S. K. Jr. 1988. Triploid oysters ensure year-round supply. Oceanus, 58-63.
- Allen, S. K. Jr., Bushek, D., 1992. Large-scale production of triploid oysters, *Crassostrea virginica* (Gmelin), using "stripped" gametes. Aquaculture, 103: 241-251.
- Allen, S.K. Jr., Downing, S.L., 1986 Performance of triploid pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). I Survival, growth, glycogen conten and sexual maturation in yearlings. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 102: 197-208.
- Allen, S.K. Jr., Downing, S.L., 1991. Performance of triploid Pacific Oysters *Crassostrea gigas*, gametogenesis. J. Fish. Aquat. Sci. (47): 1213-1222.
- Allen, S.K. Jr., Downing, S.L., Chew, K.K., 1989. Hatchery Manual for Producing Triploid Oysters. Washington Sea Grant Program, University of Washington Press. pp. 27.
- Allen, S.K.Jr., Gagnon, P.S., Hidu, H., 1982. Induced triploidy in the soft-shell clam. Cytogenetic and allozymic confirmation. J. Heredity 73: 412-428.
- Allen, S. K. Jr., Hidu, H., Stanley, J.G., 1986. Abnormal gametogenesis and sex ratio in triploid soft-shell clams (*Mya arenaria*). Biol. Bull. 170: 198-210.
- Allen, S. K. Jr., Shpigel, M., Utting, S., Spencer, B., 1994. Incidental production of tetraploid Manila clams *Tapes Philippinarum* (Adams and Reeve) Aquaculture, 128: 13-19.
- Barber B.J., Blake N.J., 1991. Reproductive physiology. In: Shumway, S.E. (Ed).Scallops: Biology, Ecology an Aquaculture. Elsevier, Amsterdam, pp. 377-428.
- Barber, B.J., Mann, R., 1991. Sterile triploid *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791) growth faster than diplid but are equally susceptible to *Perkinsus marinus*. J. Shellfish Res.10(2): 445-450.
- Barber, B.J., Mann, R., Allen, S.K.Jr., 1992. Optimization of triploid induction for the oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin). Aquaculture 106: 21-26.
- Baron, J., Diter, A., Bodoy, A., 1989. Triploidy Induction in the Black Scallop *Chlamys varia* L.) and its effect on larval growth and survival. Aquaculture, 77:103-111.
- Beaumont, A.R., 1986. Genetic aspects of hatchery rearing of the Scallop *Pecten maximus* (L) Aquaculture, 57:99-110.
- Beaumont, A. R., Fairbrother, J.E., 1991. Ploidy manipulation in mollusca shellfish: a review. J. Shellfish Res., 10(1): 1-18.



- Beaumont, A. R., Fairbrother, J.E., Hoare, K., 1995. Multilocus heterozygosity and size: A test of hypotheses using triploid *Mytilus edulis*. *Heredity* 75(3): 256-266.
- Beaumont, A.R., Kelly, K.S., 1989. Production and growth of triploid *Mytilus edulis* larvae. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 132: 69-84.
- Brake, J., Dvaidson, J., Davis, J., 2002. Observations on growth, gametogenesis and sex ratio of triploid and diploid *Mytilus edulis*. *J. Shellfish Res.* 21(1): 392.
- Cai, G., Beaumont, R., 1996. Tetraploid induction in the mussel *Mytilus edulis* by application of 6-dimethylaminopurine (6-DMAP) during early development. *Tropic Oceanology/Redai Haiyang*, 15: 26-30.
- Canello, O. F., Paredes, O.L., Toro, Y. J., 1992. Inducción a la triploidía en el ostión del norte *Argopecten purpuratus*, por medio de shock térmico de calor. *Inv. Pesq. (Chile)* 37: 5-11.
- Chew, K. K., 1994. Tetraploid Pacific Oyster offer promise to future production of triploid. *Aquaculture magazine* november/december, pp. 69-74.
- Cooper, J., Guo, X., 1989. Poliploid Pacific oysters produced by inhibiting polar body I and II with cytochalasin B. *J. Shellfish Res.*, 8 412
- Cox, E.S., Smith, M.S.R., Nell, J. A., Maguire, G.B., 1996. Studies on triploid oysters in Australia. VI. Gonad development in diploid and triploid Sydney rock oysters *Saccostrea commercialis* (Iredale and Roughley). *Aquaculture*, 197: 101-120.
- Desrosiers, R.R., Gerard, A., Peignon, J.M., Naciri, Y., Dufresne, L., Morasse, J., Ledu, C., Phelipot, P., Guerrier, P., Dube, F., 1993. A novel method to produce triploid embryos in bivalve mollusks by the use of 6-dimethylaminopurine. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 170: 29-43.
- Duffy, C., Diter, A., 1990. Poliploidy in the Manila Clam *Ruditapes philippinarum*. II. Chemical induction of tetraploid embryos. *Aquat. Living Resour.* 3: 107-112.
- Downing, S.L., Allen, S.K. Jr., 1987. Induced Triploidy in the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*: optimum treatments with Cytochalasin B Depend on Temperature. *Aquaculture*, 61: 1-15.
- Eversole, A.G., Kempton, C.J., Hadley, W. H., Buzzi, W.R., 1996. Comparison of growth, survival, and reproductive success of diploid and triploid *Mercenaria mercenaria*. *J. Shellfish Res.* 15(3): 689-694.
- FAO. 2003. Review of the state of world aquaculture. FAO Fisheries Circular No. 886, Rev. 2, Rome, FAO 2003. 95 p.
- Felix-Pico, E.F., Villalejo-Fuerte, M., Pripp-Quezada, A., Holguin-Quiñones, O., 1999. Growth and survival of *Lyropecten subnodosus* (Sowerby, 1835) in suspended cultured at the National Marine Park of Bahía de Loreto, B.C.S., México. 12 Int. Pectinid Workshop, Bergen (Norway) 5-11, May. Book-abstracts.
- García, L., Salas, A., Searcy, R., García, F., Lizárraga, S., Cancio, J. L., 1988. Cultivo experimental de mejillón *Mytilus edulis* en la Bahía de Todos Santos, B.C. Informe Anual, Tomo I. Cap. 2; 68-151 pp. U.A.B.C. México.
- Gardner, E.J., Simmons, M.J., Snustad, D.P., 1998. Principios de Genética. Cuarta edición. Noriega editores. México, D.F.
- Gendreau, S., Grizel, H., 1990. Induced triploidy and tetraploidy in European flat oyster, *Ostrea edulis*. *Aquaculture*, 90:229-238.

- Gerard, a., Naciri, Y., Noiret, C., Ledu, C., Peignon, J.M., Phelipot, P., 1994a. Induced triploidy in the European clam, *Ruditapes decussatus* (L.) and performance of triploid larvae. *Aqua. Fisheries Man.*, 25: 769-779.
- Gerard, A., Naciri, Y., Peignon, J.M., Ledu, C., Phelipot, P., 1994b. Optimization of triploid induction by the use of 6-DMAP for the oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg). *Aqua. and Fisheries Man.* 25: 709-919.
- Gerard, A., Ledu, C., Phelipot, P., 1999. The induction of MI and MII triploids in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* with 6-DMAP or CB. *Aquaculture* 174: 229-242.
- Gosling, E.M., Nolan, A., 1989. Triploidy induction by thermal shock in the Manila clam, *Tapes semidecussatus*. *Aquaculture* 78: 223-228.
- Guo, X., Allen, S.K. Jr., 1994a. Sex Determination and Polyploid Gigantism in the Dwarf Surfclam (*Mulinia lateralis* Say) *Genetics*, 138: 1199-1206.
- Guo, X., Allen, S.K. Jr., 1994b. Viable tetraploids in the Pacific Oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg) produced by inhibition polar body I in eggs from triploids. *Mol. Mar. Biol. and Biot.*, 3(1): 42-50.
- Guo, X., Allen, S.K. Jr., 1994c. Reproductive potential and genetic of triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg) *Biol. Bull.* 187: 309-318.
- Guo, X., Allen, S.K. Jr., 1997. Sex and meiosis in autotetraploid Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Genome*, 40:397-405.
- Guo, X., DeBrosse, G.A., Allen, S.K. Jr. 1996. All-triploid Pacific Oysters (*Crassostrea gigas* Thunberg) produced by mating tetraploid and diploid. *Aquaculture*, 142: 149-161.
- Guo, X., Cooper, K., Hershberger, W. K., Chew, K.K., 1992a. Genetic consequences of blocking polar body I with cytochalasin B in fertilized eggs of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*: I. Ploidy of resultant embryos. *Biol. Bull.*, 183: 381-386
- Guo, X., Hershberger, W.K., Cooper, K., Chew, K.K., 1992b. Genetic consequences of blocking polar body I with Cytochalasin B in fertilized eggs of Pacific Oyster, *Crassostrea gigas* II Segregation of chromosomes, *Biol. Bull. (Woods Hole, Mass)*, 183: 387-393.
- Guo, X., Hershberger, W.K. Cooper, K., Chew, K.K., 1993. Artificial gynogenesis with ultraviolet light-irradiated sperm in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. I. Induction and survival. *Aquaculture* 113: 201-214.
- Guo, X., Hershberger, W.K. Cooper, K., Chew, K.K., 1994. Tetraploid induction with mitosis I, inhibition and cell fusion in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg). *J. Shellfish Res.*, 13: 193-198.
- Hand, R., Nell, J., Maguire, G.B., 1998. Studies on triploid oysters in Australia: X. Growth and mortality of diploid and triploid Sydney rock oysters *Saccostrea commercialis* (Iredale and Roughley). *J. Shellfish Res.* 17(4): 1115-1127.
- Hartl, D.L., 1991. *Basic Genetics*. Jones and Bartlett Publishers. Boston.
- Hawkins, A.J.S., Day, A.J., Gerard, A., Naciri, Y., Ledu, C., Bayne, B.L., Heral, M., 1994. A genetic and metabolic basis for faster growth among triploids by blocking meiosis I but not meiosis II in the larviparous European flat oysters, *Ostrea edulis* L. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 184: 21-40.

- He, M., Lin, Y., Shen, Q., Hu, J., Jiang, W., 2000. Production of tetraploid pearl oyster (*Pinctada martensii* Dunker) by inhibiting the first polar body in eggs from triploid. *J. Shellfish Res.*, 19: 147-151.
- Herskowitz, I.H., 1987. Genetics. Boston, Little, Brown & Co.
- Jackson, J.E., MacDonald, B.W., James, S., Vercaemer, B., Kenchington, E.L., 2002. Investigations with triploid atlantic sea scallops *Placopecten magellanicus*. *J. Shellfish Res.* 21(1): 433.
- Jiang, W.G., Li, G., Xu, G.Q., Lin, Y.G., Quing, N., 1993. Growth of the induced triploid pearl oyster, *Pinctada martensii* (D). *Aquaculture*, 111: 245-253.
- Jiang, W., Xu, G., Lin, Y., Li, G., 1991. Comparison of growth between triploid and diploid of *Pinctada martensii* (D). *Tropic Oceanography*. 10(3): 1-7. (en chino).
- Kiyomoto, M., Komaru, K., Scarpa, J., Wada, K.T., Danton, E., Awaji, M., 1996. Abnormal Gametogenesis, Male Dominant Sex Ratio, and Sertoli Cell Morphology in Induced triploid Mussel, *Mytilus galloprovincialis*. *Zool. Sci.*, 13: 393-402.
- Komaru, A., Wada, K. T., 1989. Gametogenesis and growth of induced triploid scallops *Chlamys nobilis*. *Nip. Sui. Gakkaishi* 55: 447-452.
- Komaru, A., Wada, K. T., 1990. gametogenesis of triploid Japanese pearl oyster, *Pinctada fucata martensii*. In: Goshi, M., Yamashita, , O. (Eds.) *Advances in Invertebrate Reproduction* %. Elsevier Science Publisher B.V., Amsterdam, pp. 469-474.
- Landau, B., Guo, X., 1999. Growth characteristics in triploid pacific oysters – A new dimension. *J. Shellfish Res.* 18(1): 270-271.
- Longo, F.J., 1972. The effects of cytochalasin B on the events of fertilization in the surf clam, *Spisula solidissima*. *J. Exp. Zool.* 182: 322-344.
- Longo, F.J., 1983. Meiotic maturation and fertilization. In: *The Mollusca*, Vol. 3, Verdonk, N.K., Van Den Biggelaar, J.A.M., Tompa, A.S. (eds), Academic Press, New York, pp. 49-83.
- Maeda-Martínez, A.N., Lombeida, P., Freitas, L., Lodeiros, C., Sicard, M.T., 2001. Cultivo de pectínidos en fondo y estanques. En: A.N. Maeda Martínez (Ed) *Los moluscos Pectínidos Iberoamericanos: Ciencia y Acuicultura*. Editorial LIMUSA, México, D.F.
- Matthiessen, G. C., Davis, J. P., 1992. Observations on growth rate and resistance to MSX (*Haplosporidium Nelson*) among diploid and triploid eastern oysters (*Crassostrea virginica* Gmelin, 1791) in new England. *J. Shellfish Res.* 11: 449-454.
- Mazon, S.J.M., 1996. Cultivo de almeja catarina *Argopecten ventricosus*. En: *Estudio del potencial pesquero y acuícola de Baja California Sur*. Casas y Valdez, M. y G. Ponce Díaz (eds), México.
- Nell, J.A., Cox, E., Smith, I.R., Maguire, G.B., 1994. Studies on triploid oyster in Australia: I. The farming potential of of triploid Sidney rock oysters *Saccostrea commercialis* (Iredale and Roughley). *Aquaculture* 126: 243-255.
- Nell, J.A., Hand, R.E., Goard, L.J., McAdam, S.P., 1996. Studies on triploid oyster in Australia: Evaluation of cytochalasin B and 6-dimethylaminopurine for triploid induction in sidney rock oysters *Saccostrea commercialis* (Iredale and Roughley). *Aquaculture Res.* 27: 689-698.

- Nell, J.A., O'Connor, W.A., Hand, R.E., McAdam, S.P., 1995. Hatchery production of triploid and tetraploid clams, *Tapes dorsatus* (Lamarck 1818): A potential new species for aquaculture. *Aquaculture* 130(4): 389-394.
- Rangel-Dávalos C., Chávez-Villalba, J., 1994. Desarrollo Científico y Tecnológico del Cultivo de Madre Perla y Concha Nácar. Secretaría de Pesca.
- Racotta, I. S., Ramírez, J.L., Ibarra, A.M., Rodríguez-Jaramillo, M.C., Carreño, D., Palacios, E., 2003. Growth and gametogenesis in the lion-paw scallop *Nodipecten (Lyropecten) subnodosus*. *Aquaculture* 217(1-4): 335-349.
- Ruiz-Verdugo, C.A., Allen, S.K. Jr., Ibarra, A.M., 2001a. Family differences in success of triploid induction and effects of triploidy on fecundity of catarina scallop (*Argopecten ventricosus*). *Aquaculture*, 201: 19-33.
- Ruiz-Verdugo, C.A., Racotta, I.S., Ibarra, A.M., 2001b. Comparative biochemical composition in gonad and adductor muscle of triploid and diploid catarina scallop (*Argopecten ventricosus*, Sowerby II, 1842). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 259: 155-170.
- Ruiz-Verdugo, C. A., J.L. Ramírez, Allen J.S. Jr., Ibarra A.M., 2000. Triploid catarina scallop (*Argopecten ventricosus* Sowerby II, 1842): growth and suppression of functional hermaphroditism. *Aquaculture*, 186:13-32.
- SAGARPA., 2000. Anuario estadístico de pesca. México D.F. 268 p.
- Salas, A., García, L., Searcy, R., García, F., Cancino, J.L., Lizárraga, S., 1988. Cultivo extensivo de mejillón azul *Mytilus californianus* y *Mytilus edulis* en las costas de Baja California. Informe Anual Tomo I. Cap. 1:1-6 pp. U.A.B.C. – I.I.O. S.E.P.
- Sevilla, M., 1965. Contribución al conocimiento de la madre perla *Pinctada mazatlanica* (Hanley, 1854) *Rev. Soc. Méx. Hist. Nav.* 30: 223-262.
- Scarpa, J., Toro, J.E., Wada, K.T., 1994. Direct comparison of six methods to induce triploidy in bivalves. *Aquaculture*, 119: 119-133.
- Scarpa, J., Wada, K.T., Kamaru, A., 1993. Induction of tetraploidy in Mussels by Suppression of polar body formation. *Nip. Sui. Gakkaishi*, 59(12): 2017-2023.
- Shpigel, M., Barber, B.J., Mann, R., 1992. Effects of elevated temperature on growth, gametogenesis, physiology, and biochemical composition in diploid and triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* Thunberg. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 161: 15-25.
- Shpigel, M., Spencer, B., 1996. Performance of diploid and triploid Manila clams (*Tapes philippinarum*, Adams and Reeve) at various levels of tidal exposure in the UK and in water from fish ponds at Eilat, Israel. *Aquaculture* 14: 159-171.
- Stanley, J.G., Allen, S.K. Jr., Hidu, H., 1981. Polyploidy induced in the American oyster *Crassostrea virginica* with Cytochalasin B. *Aquaculture*, 12: 1-10
- Stanley, G.J., Hidu, H., Allen, S.K. Jr., 1984. Growth of American Oysters increased by polyploidy induced by blocking meiosis I but not meiosis II. *Aquaculture*, 37: 147-155.
- Stephens, L.B., Downing, S.L., 1988. Inhibiting first polar body formation in *Crassostrea gigas* produces tetraploids, not meiotic I triploids. *J. Shellfish Res.* 7: 550-551.
- Stephens, L.B., Downing, S.L., 1989. Comparing diploid and triploid gametes from the pacific oyster (*Crassostrea gigas*) using a scanning electron microscope. *J. Shellfish Res.* 8: 324

- Stepito, N.K., Cook, P.A., 1998. Induction of triploidy in the South African abalone using Cytochalasin B. *Aquaculture International*, 6: 161-169.
- Supan, J.E., Wilson, C.E., Allen, S.K.Jr., 2000. The effect of cytochalasin B dosage on the survival and ploidy of *Crassostrea virginica* (Gmelin) larvae. *J. Shellfish Res.* 19(1): 125-128.
- Tabarini, C.L., 1984. Induced triploidy in the bay scallop, *Argopecten irradians*, and its effect on Growth and Gametogenesis. *Aquaculture*, 42: 151-160.
- Thorgaard, G.H., 1983. Chromosome set manipulation and sex control in fish. Pp. 405-434. In *Fish Physiology*, Vol. 9(B), W. S. Hoard, D.J., Randall, and E.M. Donaldson, eds. Academic Press, London.
- Toro, J.E., Sanhueza, M.A., Paredes, L., Canello, F., 1995a. Induction of triploid embryos by heat shock in the Chilean northern scallop *Argopecten purpuratus* Lamarck, 1819. *New Zealand J. Mar. and Freshwater Res.*, 29:101-105.
- Toro, J.E., Sastre, H., 1995b. Induced triploidy in the Chilean blue mussel, *Mytilus chilensis* (Hupe, 1854 ), and performance of triploid larvae. *J. Shellfish Res.*, 14(1): 161-164.
- Uchimura, Y., Komaru, A., Wada, K.T., Ieyama, H., Yamaki, M., Furuta, H., 1989. Detection of induced triploidy at different ages for larvae of the Japanese pearl oyster, *Pinctada fucata martensii*, by microfluorometry with DAPI staining. *Aquaculture* 76: 1-9.
- Utting, S.D., Child, A.R., 1994. Genetic manipulation of the Manila clam (*Tapes philippinarum*) using cytochalasin B to induce triploidy. *Aquaculture* 120: 271-282.
- Utting, S.D., Doyou, J., 1992. The increased utilization of egg lipid reserves following induction of triploidy in the Manila clam *Tapes philippinarum*. *Aquaculture* 103: 17-28.
- Utting, S.D., Millican, P.F., Laing, I., 1996. The breeding potential and biochemical composition of triploid Manila clams, *Tapes philippinarum* Adams and Reeve. *Aquaculture Res.* 27: 573-580.
- Wada, K.T., Komaru, A., Uchimura, Y., 1989. Triploid production in the Japanese pearl oyster *Pinctada fucata martensii*. *Aquaculture* 76: 11-19.
- Yamamoto, S., Sugawara, Y., 1988. Induced triploidy in the mussel *Mytilus edulis*, by temperature shock. *Aquaculture* 72: 21-29.
- Yang, H., Wang, R., Guo, X., Yu, Y., 1997. Tetraploid induction with Cytochalasin B treatment in scallop *Chlamys azumapekten* F. 11<sup>th</sup> International Pectinid Workshop, La Paz, B.C.S., México, 10-15 April 1997. *Book of Abstracts*, 187-188.
- Yang, H., Zhang, F.S., Guo, X., 2000. Triploid and tetraploid Zhikong Scallop, *Chlamys farreri* Jones et preston, Produced by Inhibiting Polar body I. *Mar. Biotechnology*, 2, 466-475.
- Zhang, G., Wang, Z., Chang, Y., Song, J., Ding, J., Zhao, S., Guo, X., 2000. Tetraploid induction in the Pacific abalone *Haliotis discus hannai* Ino with 6-DMAP and CB. *J. Shellfish Res.*, 19: 540-541.

# **CAPÍTULO I**

## **EFECTO DE LA TRIPLOIDÍA SOBRE LA ESTRUCTURA Y ABUNDANCIA DE DIFERENTES ESTADIOS DE DESARROLLO GAMÉTICOS EN LA ALMEJA CATARINA**

**CARACTERÍSTICAS ULTRAESTRUCTURALES DE LA ESPERMATOGÉNESIS  
EN DIPLOIDES Y TRIPLOIDES DE LA ALMEJA CATARINA (*Argopecten  
ventricosus* Sowerby II, 1842)**

**ARTÍCULO (Publicado):**

Maldonado-Amparo, R. and A. M. Ibarra. Ultrastructural characteristics of spermatogenesis in diploid and triploid catarina scallop (*Argopecten ventricosus* Sowerby II, 1842).

*Journal of Shellfish Research* 21(1): 93-101, 2002.

## **ABSTRACT**

Spermatogenic stages in diploid and triploid catarina scallop (*Argopecten ventricosus*) were studied by light and electron microscopy at two different ages. In 9-mo old triploid scallops, a reduced number of spermatogonia and primary spermatocytes were seen in the male acini, and although no spermatids were found, a few spermatozoa were observed. All triploid spermatogenic stages and their nuclei were larger in diameter than those in diploids. Ultrastructure analysis revealed that spermatogenesis in triploids was almost completely arrested early, at the primary spermatocyte stage, indicating the halt occurs during the prophase stage of meiosis I, before the first reductional division. When 12-mo old, a large number of haemocytes were invading some of the remaining male acini of triploids, which possibly have a trophic role after development is halted. At this age, the male part of the gonad in most analyzed scallops was completely replaced by female acini, with some developing oocytes. Checkpoint mechanisms recently described as ‘meiotic checkpoints’ are proposed as possibly being involved in the partial or total sterility resulting from the triploid condition.

## **INTRODUCTION**

Triploid sterility has been reported for a number of mollusk species, but in most cases the sterility is not reflected in a complete lack of gametogenic stages, but rather on a delayed process and a reduced number of fully developed gametes (Allen et al. 1986; Komaru & Wada 1989, 1990; Allen 1987; Allen & Downing 1990; Guo & Allen 1994b; Cox et al. 1996; Eversole et al. 1996; Kiyomoto et al. 1996; Ruiz-Verdugo et al. 2000).



Whereas the most common characteristic in triploid mollusks has been reported to be the reduced development of the gonad and gametes, the reversal of gonad sex in a known functional hermaphrodite has been only reported to occur in catarina scallop (Ruiz-Verdugo et al. 2000).

Inasmuch as several studies comparing diploids and triploids have been done on gametogenic stages by light microscopy, partial or total ultrastructure analysis of abnormal gametogenesis in polyploid mollusks has been done only for triploid Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Komaru et al. 1994), triploid Sydney rock oyster *Saccostrea commercialis* (Cox et al. 1996), and triploid and tetraploid Mediterranean blue mussel *Mytilus galloprovincialis* (Komaru et al. 1995; Kiyomoto et al. 1996). Spermatogenesis in diploid catarina scallop *Argopecten ventricosus* at the ultrastructure level has not been studied before, although it has been done for other pectinid species, *Pecten maximus* (Dorange & Le Pennec 1989a; Beninger & Le Pennec 1991).

The catarina scallop, *Argopecten ventricosus*, is a functional hermaphrodite pectinid in which the gonad is divided into two parts, one female and one male. When triploidy is induced in this species, a gradual suppression of functional hermaphroditism has been noted to occur, with only female gametogenic stages developing in the male part of the gonad in 1-yr old scallops (Ruiz-Verdugo et al. 2000). As reported for oysters (Guo & Allen 1994a) and Manila clams (Utting et al. 1996), as well as for this particular species (Ruiz-Verdugo et al. 2001), the number of oocytes formed was reduced when compared to diploids. In a continuance of those studies with triploid catarina scallop, we report here the

effects of triploidy on spermatogenesis, studied as the comparative structure and ultrastructure of 9 mo-old and 12 mo-old diploid and triploid catarina scallops.

## **MATERIALS AND METHODS**

### *Scallops*

Diploid and triploid catarina scallops about 9-mo of age (6 cm in shell length), kept in a growout area at Bahía Magdalena in Baja California Mexico, were transported to the Genetic Laboratory of CIBNOR (Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste), and placed under maturation conditioning for 20 days. A second group of scallops that were not conditioned for maturation in the laboratory were sampled from the field area when the scallops were 12-mo of age. The triploid scallops were produced using cytochalasin-B (0.5 mg/L) as described by Ruiz-Verdugo et al. (2001), and the diploids were from a control group the same age.

### *Maturation conditioning*

Each ploidy group was stocked (5 scallops per 40-L tank) and kept under standardized controlled maturation conditions during 20 days (Ramírez et al. 1999). Feeding consisted of adding a mixture of *Isochrysis galbana*, *Monochrysis lutheri*, and *Chaetoceros muelleri* at a total concentration of  $4 \times 10^6$  cells / scallop / day. Water temperature was kept at 19 -

20 °C, salinity at 36‰, and dissolved oxygen up to 7-9 mg / L. The maturation room was provided with a 12-h light and 12-h dark photoperiod.

### ***Sampling and histology for light microscopy***

After the 20-d maturation-conditioning period, the gonads from 20 scallops per ploidy group were fixed in buffered formaldehyde (10%), dehydrated in a graded ethanol series, and embedded in paraffin. Duplicated sections, 5 µm thick, were obtained from each gonad, and stained with hematoxylin-eosin (H&E) and Feulgen.

Spermatogenic stages in diploid and triploid scallops were measured using image analyses. Images were taken with an Olympus BX-41 microscope, with an integrated camera (CoolSNAP-Pro). The images were analyzed with SigmaScan Pro 5, obtaining an area by digitalizing contours and estimating diameters from the area for cytoplasm and nucleus of each spermatogenic stage. To correct for scale differences, for each microphotograph evaluated the image analysis program was calibrated accordingly to the microscope objective used for those images. For each ploidy group and stage (spermatogonium, spermatocyte, spermatid, and spermatozoa), 30 cells were measured.

Diameters of each spermatogenic stage for the two ploidy groups were analyzed with a single factor (ploidy) ANOVA, and mean differences tested with the F-test (Neter et al. 1985). Significance was set at  $P < 0.05$ .

To establish the impact of triploidy on both nuclei and cell size, a ratio between nucleus diameter and total cell diameter was estimated by dividing the nucleus diameter by the total

cell diameter. Additionally, the increase in area ( $\text{Area} = 3.1416 \times \text{radius}^2$ ) in triploids was estimated for each cell and nuclei from the following relationship;  $[(\text{Area in } 3n \times 100 / \text{Area in } 2n) - 100]$ .

### ***Electron microscopy***

Five gonad samples from each ploidy group were taken 20 d after laboratory conditioning (9-mo old) as well as five from each ploidy group from 12-mo old field scallops.

The methodology described by Komaru et al. (1994) was followed for transmission electron microscopy (TEM). Gonad samples ( $2 \text{ mm}^2$ ) were fixed with a 4% gluteraldehyde solution in 0.1 M Sorensen's phosphate buffer, pH 7.5, for two hours at  $4^\circ\text{C}$ . The pieces were then washed in Sorensen's buffer solution three times for 30 min, and post-fixed in 1% osmium tetroxide ( $\text{OsO}_4$ ) in the same buffer for 1 hour, at  $4^\circ\text{C}$ . Samples were then dehydrated in ethanol (25, 50, 70, 95 and 100%) for 20 min in each concentration, and twice in 100% propylene oxide for 20 min. They were embedded according to the protocol of the commercial Kit Embed 812 Electron Microscopy Sciences (Luft 1961). Sections of  $900\text{\AA}$  were obtained with an ultramicrotome (Reicher, Model OMU3), mounted on a grid and stained with 2% uranyl acetate for 20 min and lead citrate for 5 minutes (Komaru et al. 1994). Photo microscopy was done using a JEOL JEM-1200EXII TEM.

Diameters of cell and nuclei of spermatogenic stages captured by photographic prints of TEM were measured after scanning the photomicrographs. To correct for amplifications,

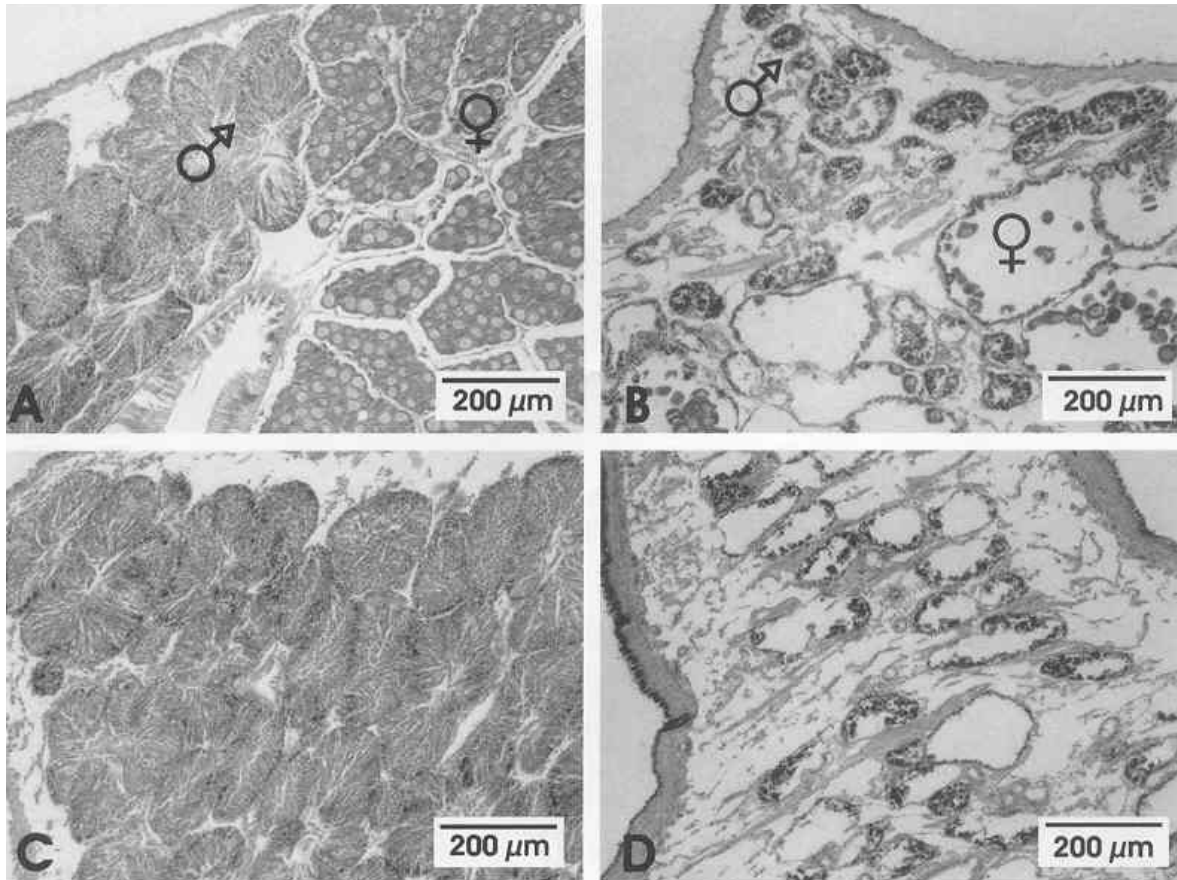
the size bar of each EM photomicrographs was used as a reference. All measurements were done using the image analyzer SigmaScan Pro 5. The number of stages measured varied, and depended on the number found in photomicrographs (6 spermatogonia, 15 spermatocytes and spermatids, 30 spermatozoa nucleus, mitochondria, and flagella, and 21 for acrosome length and invaginations in spermatozoa). The low number of captured spermatogenic stages in the triploids did not allow for measurement.

Scanning electron microscopy (SEM) gonad samples (4 mm<sup>2</sup>) were fixed, post-fixed, and dehydrated in the same manner. Samples were dried in a SAMDRI-PVT-3P critical point dryer and coated with gold in an EDWARDS S150B sputter coating system (Komaru et al. 1994). Photo-microscopy was done using a JEOL JSM-5410LV SEM. All electron microscopy work was done at the Institute of Cellular Physiology in the National Autonomous University of Mexico (UNAM).

## **RESULTS**

Gonad structure of 9-mo diploid and triploid scallops are presented in Figure 1. In diploid scallops the characteristic synchronized development of sperm and oocytes in the gonad was seen (Fig. 1A). Compared to diploids (Fig. 1C), gametogenesis in triploids was retarded (Fig. 1B), and spermatogenesis was largely abnormal with only a reduced number of acini showing development of spermatogenic stages (Fig. 1D).

A summary of differences in mean size of spermatogenic stages between the two ploidy groups is in Table 1. The acini of triploid scallops were significantly larger (55%,  $P = 0.01$ ) than those in diploids. There were also significant differences between ploidy groups



**Figure 1.** Diploid and triploid light photomicrographs. **A** Diploid female and male gonads in advanced stages of gametogenesis. **B** Triploid female and male parts of the gonad when 9-mo old. **C** Diploid male portion of the gonad in advanced stage of spermatogenesis. **D** Triploid male part of the gonad with few spermatogenic stages developing.

in the diameter of all spermatogenic stages, as well as in their nucleus. Triploid scallops not only had larger nuclei area in spermatogonia and spermatocyte than diploid scallops (37% and 112% larger area in 3Ns, respectively), but also more cytoplasm area (78% and 119% more in 3Ns). Spermatids were not found in triploids, and comparative measurements between ploidy groups were not possible, but the few spermatozoa found indicated that triploids had a 50% larger area than diploids (Table 1). The nucleus/total cell ratio of

Table 1.- Mean diameter (SD) of spermatogenic stages (n=30) in diploid and triploid catarina scallop *Argopecten ventricosus* measured by image analyses – light microscopy, and percent increase area in triploids with regard to diploids.

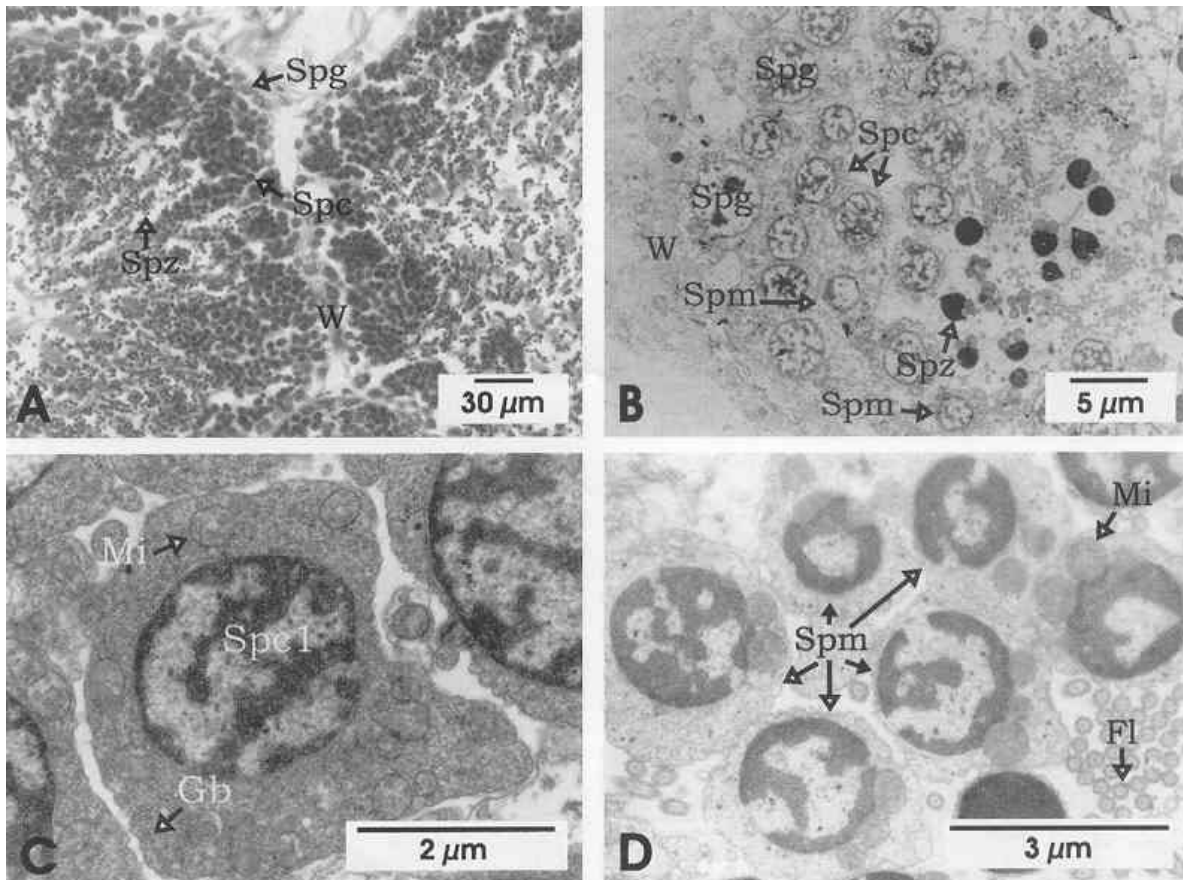
Spermatogenic stages	Diameter ( $\mu\text{m}$ )		Percent area increase in 3N
	Diploid	Triploid	
Acinus <sup>1</sup>	167 (36) <sup>a</sup>	259 (47) <sup>b</sup>	141
Spermatogonia <sup>2</sup>	6.30 (0.43) <sup>a</sup>	8.41 (1.64) <sup>b</sup>	78
Spermatogonia nucleus <sup>2</sup>	4.81 (0.36) <sup>a</sup>	5.62 (1.11) <sup>b</sup>	37
Spermatocyte <sup>2</sup>	3.81 (0.31) <sup>a</sup>	5.64 (0.44) <sup>b</sup>	119
Spermatocyte nucleus <sup>2</sup>	3.34 (0.32) <sup>a</sup>	4.86 (0.36) <sup>b</sup>	112
Spermatid <sup>3</sup>	2.62 (0.25)	n.a.	-
Spermatozoa <sup>3</sup> head	1.69 (0.08) <sup>a</sup>	2.07 (0.15) <sup>b</sup>	50
Number of Sperm / 1000 $\mu\text{m}^2$	250,000	2-3	

Superscript numbers in spermatogenic structures indicate magnification used for measurements: 1=4X; 2=10X; 3=100X. n. a. = not available for measurements. Different letters between ploidy groups indicate significant differences ( $P < 0.05$ ).

spermatogonia was smaller for triploids (0.67) than diploids (0.76), whereas for spermatocytes it was approximately the same ratio for both ploidy groups (0.88 for 2Ns, 0.86 for 3Ns).

#### *Diploid male gonad structure and ultrastructure*

The details of the male part of the gonad of a diploid scallop are shown in figures 2 and 3. Male germinal cells were grouped in acini ranging from 120 to 200  $\mu\text{m}$  in diameter. Each acinus contained a variety of developing stages distributed in a centripetal pattern from the inner acinus wall to the lumen (Fig. 2A). The spermatogonia (Spg) are oval shaped, and located nearest to the inner wall, whereas the spermatocytes (Spc) are smaller and loose



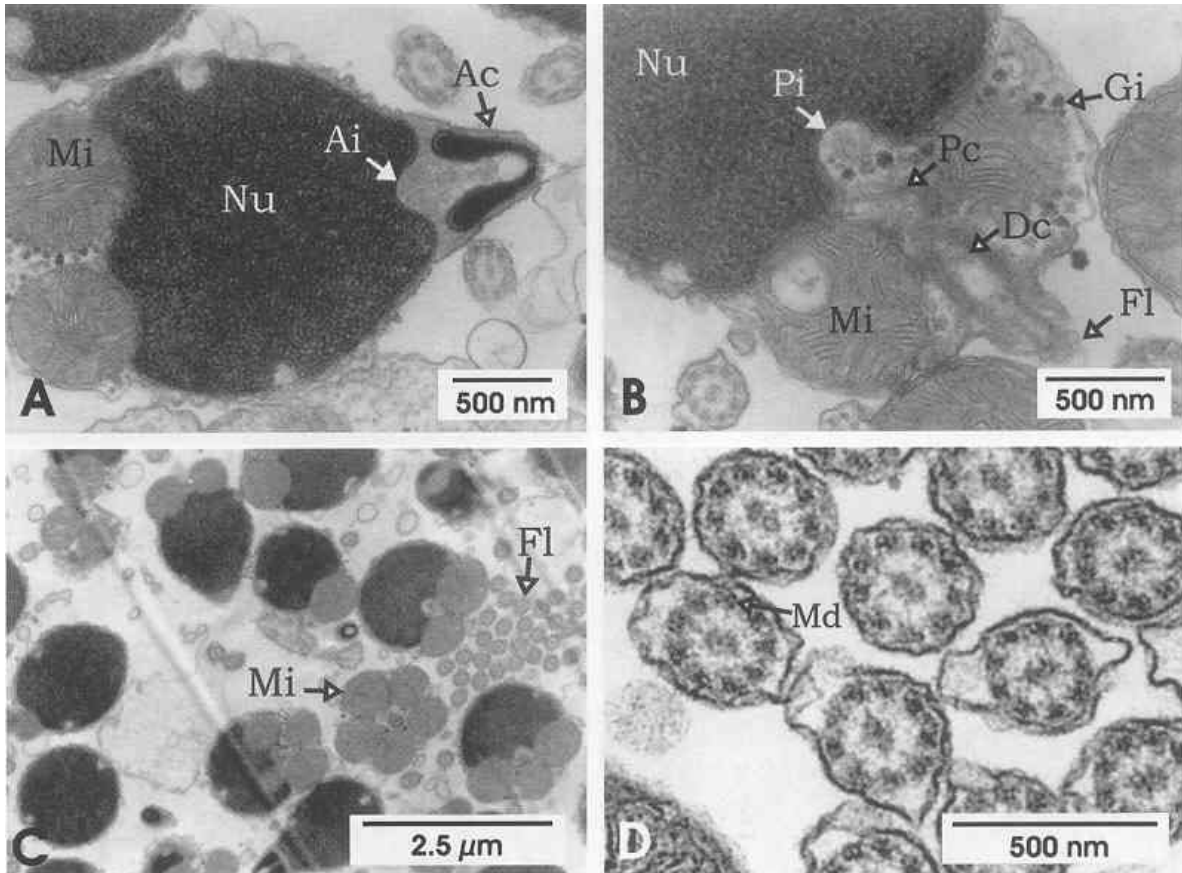
**Figure 2.** Diploid gonad structure and ultrastructure. **A** Light microscopy (LM) of male acinus with spermatogonia (Spg) attached to the wall (W), spermatocytes (Spc), and spermatozoa (Spz). **B** TEM of spermatogenic stages: Spg, Spc, spermatid (Spm), and Spz. **C** TEM of primary spermatocyte with multiple mitochondria (Mi) and Golgi bodies (Gb). **D** TEM of spermatid (Spm) with mitochondria at posterior pole, transversal cuts of flagella (Fl).

from the acinus wall, positioned between the spermatogonia and the lumen of the acinus. Mature spermatozoa (Spz) are almost exclusively confined to the central lumen of the acinus (Fig. 2A). The Spg had a diameter in ultrastructure measurements of 6.95  $\mu\text{m}$ , and a nucleus 4.39  $\mu\text{m}$ . The Spc appear to be more numerous than the Spg (Fig. 2B), with a



diameter approximately 3.92  $\mu\text{m}$ , and a nucleus 2.93  $\mu\text{m}$ . The Spc cytoplasm contains a complement of organelles, Golgi bodies (Gb) and mitochondria (Mi), very similar to those in the spermatogonia. The nucleus of primary spermatocytes (Spc1) exhibits scattered electron-dense chromatin (Fig. 2C), and its cytoplasm contains some mitochondria (Mi) and Golgi bodies (Gb). Spermatids (Spm) in their early stages are spherical cells about 2.63  $\mu\text{m}$  in diameter by ultrastructure measurements, with a dense nucleus, also spherical, about 1.95  $\mu\text{m}$  in diameter (Fig. 2D). In the cytoplasm of the maturing Spm, mitochondria (Mi) can be seen in what will be the basal pole of the future spermatozoon (Spz).

The spermatozoa (Spz) have a proximal acrosome (Ac), nucleus (Nu), and a maximum of five cross-sectioned mitochondria (Mi) in its distal part (Fig. 3A), where the flagellum (Fl) emerges. The anterior part of the spermatozoa, where the acrosome is, appears slightly denser than the nucleus. The ultrastructure of the spermatozoa in diploid *Argopecten ventricosus* can be divided into three main components: a sperm head consisting of the acrosome (Ac) and nucleus (Nu), a middle piece consisting of two centrioles and the mitochondria, and a tail or flagella. The acrosome is invaginated toward the nuclear surface forming a conical structure about 0.51  $\mu\text{m}$  in height, and it is composed of an outer layer with electron dense material and an inner layer of electron lucent material (Fig. 3A). The spherical electron-dense nucleus (Nu) is 1.82  $\mu\text{m}$  in diameter and presents an anterior invagination (Ai) 0.23  $\mu\text{m}$  in depth (Fig. 3A), and a posterior invagination (Pi) 0.29  $\mu\text{m}$  in depth (Fig. 3B). The distal mid-part of the spermatozoa head contains a ring of three to five cross-sections of mitochondria, each about 0.76  $\mu\text{m}$  in diameter around two centrioles (Fig. 3B, 3C). The proximal centriole (Pc) is joined to the nuclear envelope by a satellite body



**Figure 3.** Diploid spermatozoa ultrastructure. **A** TEM of section through a spermatozoon head, showing acrosome (Ac), anterior invagination (Ai), nucleus (Nu), and two cross-sections of mitochondria (Mi). **B** TEM section of the spermatozoa mid-part; posterior invagination (Pi), proximal centriole (Pc), distal centriole (Dc), glycogen granules (Gi), mitochondria (Mi) and flagella (Fl). **C** TEM of transverse section through the mid-part of spermatozoa showing five cross-sections of mitochondria at most. **D** TEM of transverse section through flagella showing the classical structure of 9 external microtubule doublets (Md), and 2 internal.

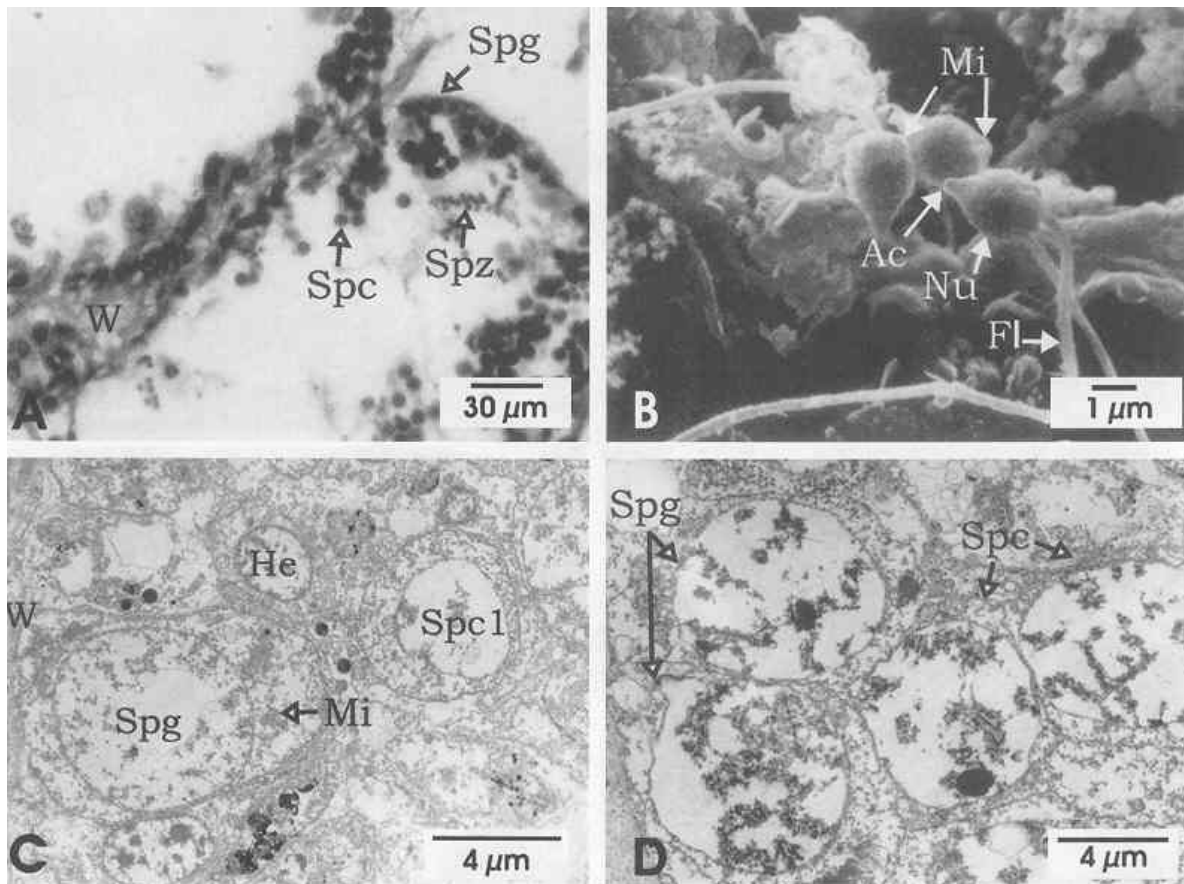
(not shown) found in the post-nuclear fosse. The distal centriole (Dc) is joined and forms the basal body of the flagellum (Fl), which has a diameter of 0.31  $\mu\text{m}$ . Granules of glycogen (Gi) are detected between the mitochondria cross-section (Fig. 3B). Transversal

cuts of the flagellum show the classical structure of nine external microtubule doublets (Md) and two internal single microtubules (Fig. 3D).

*Triploid male gonad structure and ultrastructure of 9-mo old scallops conditioned in the laboratory*

Male acini of triploids were larger than in diploids, with a diameter varying from 197 to 387  $\mu\text{m}$ . On the acinus wall dark colored cells representing spermatogonia (Spg) can be seen, and detached from the acinus wall some spermatocytes (Spc) were present. In some of the triploid scallops, spermatozoa (Spz) were seen sparsely distributed in the lumen of the acinus when using the Feulgen stain (Fig. 4A), and also when using scanning electron microscopy (Fig. 4B). The overall structure of the spermatozoa produced by a triploid catarina scallop appears to be similar to those produced by a diploid.

The spermatogonia were oval, and had the chromatin uniformly dispersed in small aggregations, with numerous mitochondria in the cytoplasm (Fig. 4C). As in diploids, the primary spermatocyte had a smaller size than the spermatogonia, and their cytoplasm also contains a complement of organelles very similar to the spermatogonia (Fig. 4D). In the nucleus, the chromatin, set out in clusters, indicates the spermatocytes were in zygotene-pachytene stages of prophase I. There was no evidence in transmission electron microscopy of secondary spermatocytes and spermatids, although as already stated, some spermatozoa were observed by scanning electron microscopy (Fig. 4B).



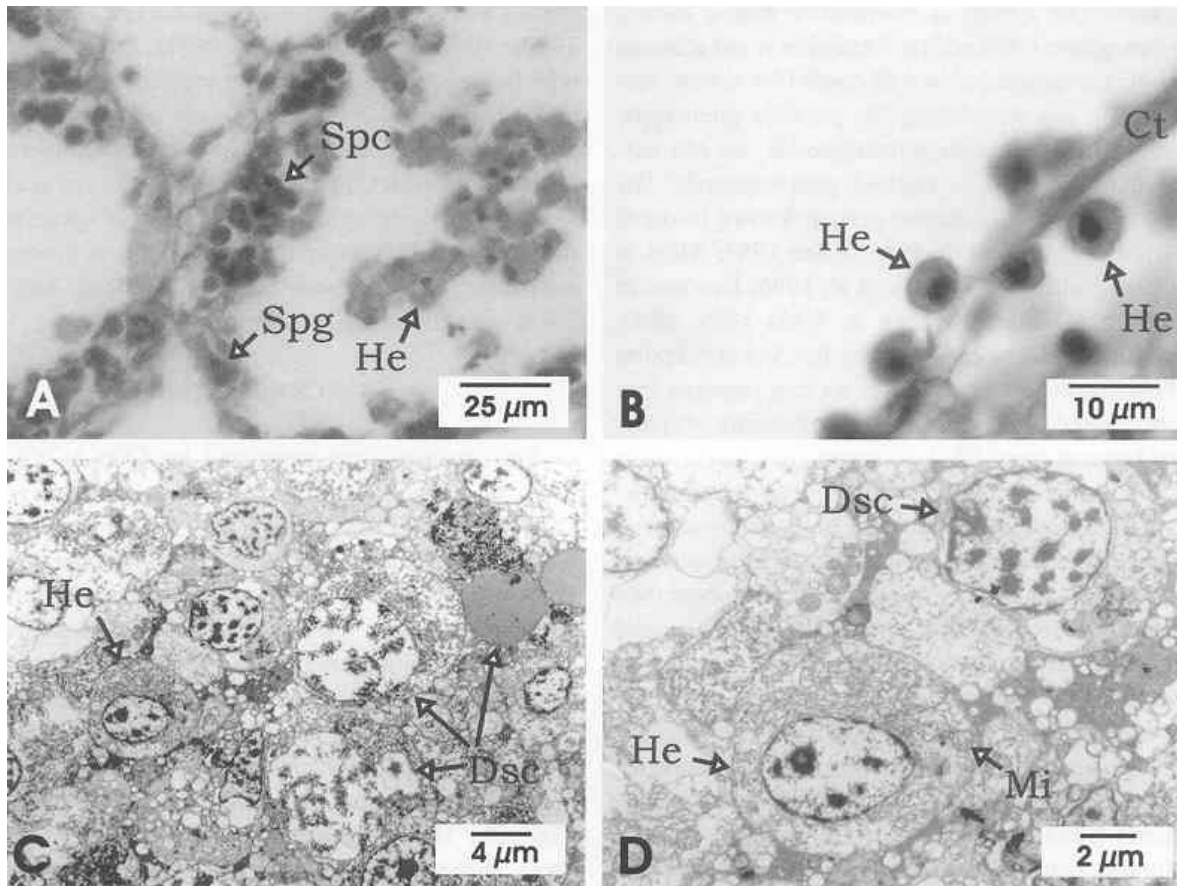
**Figure 4.** Triploid structure and ultrastructure of male part of the gonad. **A** LM of section through a male acinus with few spermatogonia (Spg) by the wall (W), spermatocytes (Spc), and spermatozoa (Spz). **B** Scanning electron microscopy (SEM) of spermatozoa found in a male acinus, with electron dense nucleus (Nu), acrosome (Ac), mitochondria (Mi) at the base, and flagella (Fl). **C-D** TEM of section through a male acinus with spermatocytes (Spc1), spermatogonia (Spg), and haemocyte (He).

*Triploid male gonad structure and ultrastructure of field scallops sampled when 12-mo old*

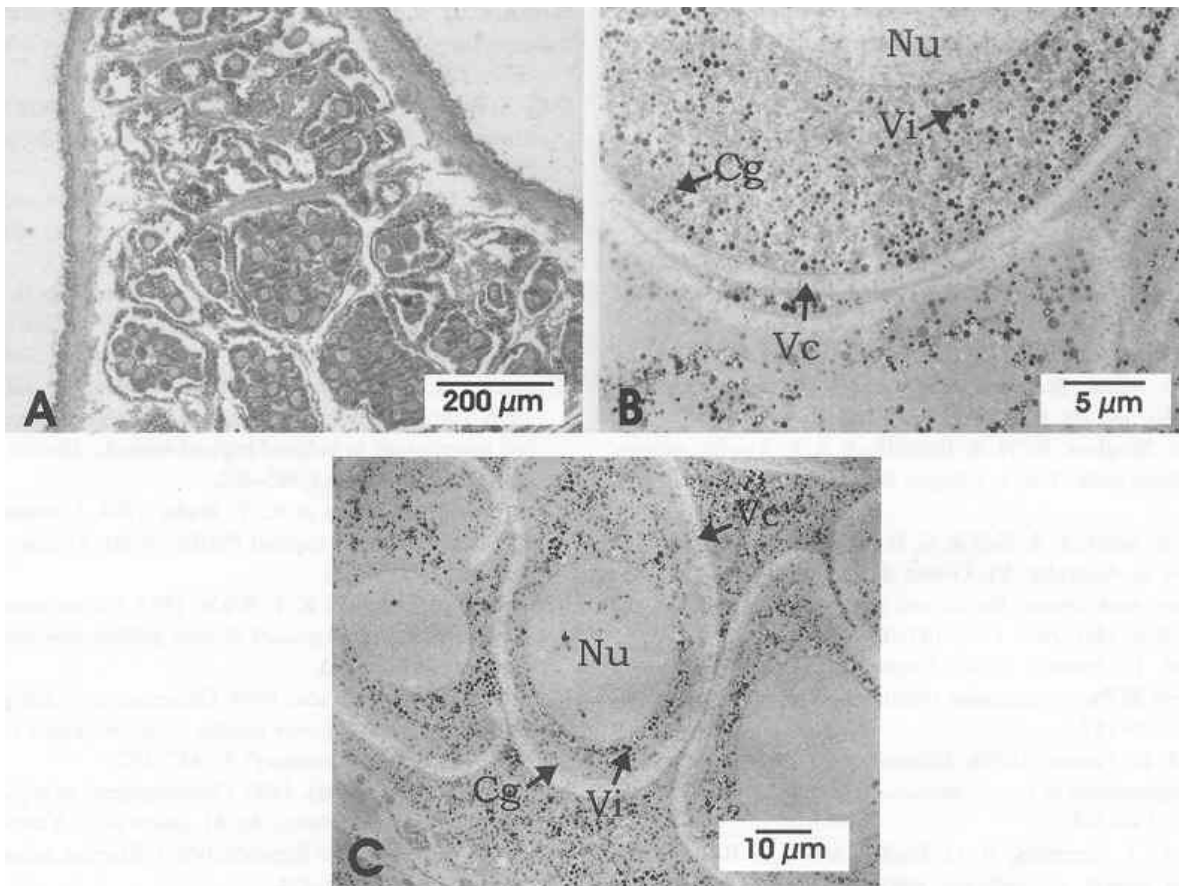
The male part of the gonad in some triploid catarina scallops when 12-mo old had a mixture of male and female acini, with both male and female gametogenic stages occurring in different acinus. However, most of the male germinal cells were in the process of

degeneration. Large numbers of haemocytes were invading the male acini (Fig. 5A, 5B), which were characterized by the presence of degenerating spermatogonia and primary spermatocytes (Fig. 5C). The haemocytes were of the basophilic granulocyte type, with a not centrally positioned oval-rounded nucleus 4.5  $\mu\text{m}$  in diameter, condensed chromatin, and an entire cell approximately 8  $\mu\text{m}$  in diameter (Fig. 5D).

In most triploid scallops a gonad sex change occurred, as the male part of the gonad (the most distal part) was completely suppressed and female germinal structures were replacing the male germinal structures (Fig. 6A). Oocytes developing in the male part of the gonad of triploids (Fig. 6B) were similar to those found in the female part of the gonad of a diploid (Fig. 6C). They contained numerous vitelline inclusions, cortical granules and a vitelline coat.



**Figure 5.** Triploid structure and ultrastructure showing degeneration of male spermatogenic stages. **A** LM of section through a male acinus with spermatogonia (Spg) and spermatocytes (Spc) closest to the wall, and acinus filled with haemocytes (He). **B** LM of connective tissue (Ct) at acinus wall with He. **C** TEM of Spc in degeneration process (Dsc), surrounded by multiple He. **D** TEM at larger amplification of He and Dsc.



**Figure 6.** Gonad structure and ultrastructure of 12-mo old scallops. **A** LM of male part of gonad in triploid occupied with female acini with oocyte development. **B** TEM of oocytes in male part of the gonad of a triploid, showing nucleus (Nu), vitelline inclusions (Vi), cortical granules (Cg), and vitelline coat (Vc). **C** TEM of oocytes from a diploid scallop with the same structures than that in triploids.

## DISCUSSION

The ultrastructure of diploid spermatogenesis was similar to that described by Dorange and Le Penec (1989a) for *Pecten maximus*, with some size and morphology differences which is not surprising, as closely related species are known to have similar but not identical ultrastructure of gametic stages (Le Penec & Beninger 1997).

Differences in cell size between triploid and diploid mollusks have been reported only for egg size (Guo & Allen 1994a, 1994c; Eversole et al. 1996; Utting et al. 1996; Ruiz-Verdugo et al. 2001) or sperm size (Komaru et al. 1994), but in triploid fish species an increase in size of different cell types has been reported (Valenti 1975; Ueno 1984; Small & Benfey 1987; Aliah et al. 1990). In the present study not only spermatogonia, but also all other spermatogenic stages measured indicated a larger cell size in triploids than diploids. Furthermore, an increase in spermatogenic stage size was not necessarily a correlate of increase in nucleus size. For example, there is an expected increase in the nucleus/total cell ratio of spermatocytes when compared to that same ratio in spermatogonia occurring as a consequence of nuclear distention (Dorange & Le Pennec 1989a). However, whereas the increased ratio in spermatocytes was observed in this study for both ploidy groups, the nucleus-total cell ratio in spermatogonia was smaller for triploids than diploids, and this occurred despite the larger nucleus in triploid spermatogonia than in diploids. This, as well as the increase in area estimated for triploid spermatogonia cell and nuclei indicates that a larger increase in cell size than nucleus size occurs in triploid spermatogonia of catarina scallop, and might be caused by a larger number of organelles (mitochondria, endoplasmic reticulum, ribosomes) than those found in diploids, as previously proposed by Guo & Allen (1994a) to explain the increased egg size of triploid oysters. These authors proposed that the increase egg size could be a consequence of a larger nucleus requiring a larger cytoplasm, such that allocation of nutrients and organelles is in adequate proportions during cell divisions. Unfortunately, because of the few spermatogenic stages found in triploids when electron microscopy was done, quantification of the number of organelles could not be accomplished.



The spermatozoa of triploid catarina scallop was morphologically similar to that in diploids, although as shown by Komaru et al. (1994) for the Pacific oyster, it showed a larger head than that in diploids. The diameter differences observed between diploid and triploid spermatozoa of catarina scallop correspond to an area for triploid sperm of 1.5 times that of a diploid sperm, and is most probably a consequence of an increased amount of DNA in the sperm produced by triploids. Komaru et al. (1994) found an increase area of 1.4 times in sperm from triploids when compared with diploids, and the increase in area in triploid spermatozoa of the Pacific oyster has been shown to agree with an increased amount of DNA (1.5 of that in sperm from diploids) by flow cytometry (Allen 1987; Guo & Allen 1994a). In spite of the size increase, the spermatozoa of triploid catarina scallop had the same number of cross-sectioned mitochondria than diploids. A larger number of organelles in gametic cells have been demonstrated only for tetraploid Mediterranean blue mussel, but not for sperm produced by triploid Pacific oyster. That is, Komaru et al. (1995) found that spermatozoa from tetraploid Mediterranean blue mussels had from 5 to 7 mitochondria with a mode of 6, whereas that from diploids had 5. Contrary to that, spermatozoa from triploid Pacific oyster, although larger than that in diploids, had the same number of mitochondria as diploids (Komaru et al. 1994).

The observation of spermatozoa in triploid catarina scallop, even if in low numbers was important because previously, Ruiz-Verdugo et al. (2000) were unable to observe sperm in triploids from this same species, but their histology techniques were limited to H&E staining and light microscopy. In the present study, the use of the Feulgen stain for light microscopy allowed for the finding of some spermatozoa in isolated acinus, an observation

that was corroborated when spermatozoa were also found by scanning electron microscopy. However, even if present, the rare occasions in which spermatozoa were found indicates that the triploid condition in catarina scallop results for the most part in an arrest of spermatogenesis early during the process of gamete formation, at the primary spermatocyte stage. That is, the arrest occurs at meiosis I, when the secondary spermatocyte would be produced by the first meiotic reduction (Beninger and Le Penneec 1991). The nearly complete arrest of meiosis at the primary spermatocyte stage has been previously noted by ultrastructure analysis in other bivalves such as *Saccostrea commercialis* (Cox et al. 1996) and *Mytilus galloprovincialis* (Kiyomoto et al. 1996). Contrary to that, in triploid *Crassostrea gigas* spermatogenesis has been reported to be reduced, but not arrested at the primary spermatocyte as spermatid and spermatozoa production occurs (Allen & Downing 1990), the last one being capable of fertilizing eggs (Guo & Allen 1994a).

The finding that in older triploid catarina scallop the male portion of the gonad was replaced with female acini is similar to that reported by Ruiz-Verdugo et al. (2000) after studying the annual gametogenic cycle of diploids and triploids for this scallop. The few gametic stages still present in the male acini of scallops 12-mo old were being lysed and possibly recycled through phagocytic activity, as demonstrated by the presence of large numbers of haemocytes, which are known to play a role in phagocytosis of degenerating pectinids gametogenic structures (Dorange & Le Penneec 1989a, 1989b; Beninger & Le Penneec 1991). The haemocytes were the typical ones described for other bivalves such as *Mya arenaria* and *Mytilus edulis* (Cheng 1981).

With this study we have demonstrated that the male gonad of triploid catarina scallop is almost but not completely sterile, as the lack of male gametes occurs until after spermatogenesis begins and is arrested, observing later oogenesis in male acini. The cause of the reversal of sex in male acini of catarina scallop is not known, but might be a consequence of the arrest of meiosis signaling, possibly through a neuroendocrine mechanism, an arrest of synthesis or release of some type of maleness factor required for spermatogenesis. Neuroendocrine factors are known to be necessary for development of male and female gonad in some mollusks (Feral et al. 1987), or only needed for development of the male gonad in functional hermaphrodites for which female gonad results from auto-differentiation (Gomot & Griffond 1993). The existence of those neuroendocrine factors has been demonstrated by isolation in other mollusks (van Minnen et al. 1989), but not in pectinids.

With regard to the arrest of meiosis, it has generally been presumed that the primary cause for triploid sterility, measured as inability to form viable and large number of gametes as in diploids, is the inability of chromosomes to pair and complete synapses because of multivalent formation. However, it has been demonstrated at least for one species that this is not the cause of sterility; Guo and Allen (1994a) established that for the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, the normal synapse of chromosomes and normal segregation was not a necessary event to obtain mature gametes in triploids, as they observed that the extra set of chromosomes segregated randomly in spawned eggs from triploids. To explain the sterility induced in triploids it is interesting to point to new research being done in the molecular genetic field. During the last decade a series of

'housekeeping' mechanisms or 'checkpoints' operating in the cell cycle during meiosis have been described for a number of experimental organisms. Their function is to detain further development when problems during replication, recombination, or segregation are present in a cell, and it is possible to explain some of the abnormal events occurring in triploids gametogenesis by considering them. These checkpoints act by means of protein complexes signaling abnormalities in chromosome behavior, and effector proteins acting on those signals to delay or arrest the meiotic process (Roeder & Bailis 2000). For example, among the described checkpoint mechanisms for meiosis is a 'S-phase or premeiotic replication checkpoint', which functions on detecting chromosomal lesions after replication, but before recombination (Murakami & Nurse 1999). A second checkpoint mechanism, the 'recombination or pachytene checkpoint', is known to act on gametogenic cells that have not completed correctly the recombination between sister chromatids during meiosis I, or in which the synaptonemal complex is defective, and it will arrest meiosis at pachytene (Murakami & Nurse 1999, 2000; Roeder & Bailis 2000; Tarsounas & Moens 2001). A third checkpoint mechanism, the 'metaphase checkpoint', has been described for arresting meiosis in metaphase I, by blocking the metaphase to anaphase transition when chromosomes are misaligned on the spindle apparatus. An interesting aspect of this checkpoint mechanism is that it is known to operate in mammalian males, halting spermatocytes at metaphase I, but oocyte formation is not affected or detained even when missegregation will result (for review see: Roeder & Bailis 2000). By considering the possible phenotypic effects of these three checkpoints on gametogenesis, we can parallel some of the known events in triploid gametogenesis. For example, the delay in the onset of gametogenesis known to occur in both sexes of triploids (Allen et al. 1986; Allen 1987;

Allen & Downing 1990; Guo & Allen 1994b; Cox et al. 1996; Eversole et al. 1996; Kiyomoto et al. 1996; Komaru & Wada 1989, 1990; Ruiz-Verdugo et al. 2000) can be explained by the first checkpoint mechanism, the 'replication checkpoint'. If we can presume that DNA replication in triploids will have a larger probability of errors needing correction because more DNA is present, that could result in a delayed onset of gametogenesis. The delay reported to occur in triploid gametogenesis and not necessarily on their growth can be explained by a difference between meiosis and mitosis: the S-phase in meiosis usually takes from two to five times longer than the S-phase in mitosis (Murakami & Nurse 2000). The second checkpoint mechanism, the 'pachytene checkpoint', agrees well with the observation that spermatogenesis is arrested at the pachytene-zygotene stage of prophase in meiosis I, at the primary spermatocyte, and also agrees with the fact that a lower number of vitellogenic and mature oocytes are formed in triploid catarina scallop than diploids (Ruiz-Verdugo et al. 2000, 2001), as it is known that in diploid scallops only oocytes that complete the pachytene stage and enter the diplotene stage will begin the process of vitellogenesis and become mature (Dorange & Le Pennec 1989b; Beninger & Le Pennec 1991). Further research on oocyte type frequencies in diploid and triploid mollusks are necessary to understand precisely at which stage oogenesis is halted.

In conclusion, this study has established spermatogenetic differences between diploid and triploid catarina scallop *Argopecten ventricosus*, pointing toward the halting of spermatogenesis occurring during prophase of the first meiotic division. Future studies are

necessary to establish the level of ploidy and functionality of the few produced male gametes in triploids.

## ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by CONACYT grant 28256-B to A.M. Ibarra. We thank Carmen Rodriguez-Jaramillo from CIBNOR for histology technical support, and Dr. Mark West, Rodolfo Paredes and Jorge Sepulveda from the Institute of Cellular Physiology of the UNAM for their support to carry out the ultrastructure analyses. We thank Dr. Elena Palacios for valuable suggestions on the manuscript. We also thank Dr. Alejandro Lopez-Cortes from CIBNOR for his advise on preserving tissues for ultrastructure analysis, and Sergio Rosas and Gerardo Hernández-García for the photography prints. The Scan Pro program used for the image analyses was that from Dr. Mario Monteforte at CIBNOR. The senior author is a CONACYT and SEP (DECYTM) Ph.D. fellow, and the results presented here are part of his thesis. Dr. Ellis Glazier edited the English language.

## REFERENCES

- Aliah, R.S., K. Yamaoka, Y. Inada, N. Taniguchi. 1990. Effect of triploidy on the tissue structure of some organ in Ayu. *Nippon Suisan Gakkaishi* 56: 569-575.
- Allen Jr., S.K. 1987. Gametogenesis in three species of triploid shellfish: *Mya arenaria*, *Crassostrea gigas* and *Crassostrea virginica*. Proc. World Symp. on Selection, Hybridization, and Genetic Engineering in Aquaculture, Bordeaux 27-30 May, 1986. Vol. II. Berling 1987.
- Allen Jr., S.K., S.L. Downing. 1990. Performance of triploid Pacific Oysters, *Crassostrea gigas*; gametogenesis. *J. Fish. Aquat. Sci.* 4: 1213-1222.
- Allen Jr., S.K., H. Hidu, J.G. Stanley. 1986. Abnormal gametogenesis and sex ratio in triploid soft-shell clams (*Mya arenaria*). *Biol. Bull.* 170: 189-210.
- Beninger, P.G., M. Le Penec. 1991. Functional anatomy of scallops. In: Shumway, S.E.

- (Ed.), *Scallops: Biology, Ecology and Aquaculture*. Elsevier, Amsterdam, pp. 133-223.
- Cheng, T.C. 1981. Bivalves. In: Ratcliffe N.A., Rowley, A.F. (Eds.), *Invertebrate blood cells*, Vol. 1. Academic Press. London, Chapter 8: pp. 233-300.
- Cox, E.S., M.S.R. Smith, J.A. Nell, G.B. Maguire. 1996. Studies on triploid oysters in Australia. VI. Gonad development in diploid and triploid Sydney rock oyster *Saccostrea commercialis* (Iredale and Roughley). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 197: 101-120.
- Dorange, G., M. Le Penne. 1989a. Ultrastructural characteristics of spermatogenesis in *Pecten maximus* (Mollusca, Bivalvia). *Invert. Reprod. Dev.* 15(2): 109-117.
- Dorange, G., M. Le Penne. 1989b. Ultrastructural study of oogenesis and oocytic degeneration in *Pecten maximus* from the bay of St. Brieuc. *Mar. Biol.* 103: 339-348.
- Eversole, A.G., C.J. Kempton, N.H. Hadley, W.R. Buzzi. 1996. Comparison of growth, survival, and reproductive success of diploid and triploid *Mercenaria mercenaria*. *J. Shellfish Res.* 15: 689-694.
- Feral, C., S. Le Gall, M.C. Martin, C. Lengrone. 1987. The neuroendocrine mechanism responsible for sexual inversion of the gonad in the protandrous hermaphroditic mollusc, *Crepidula fornicata* L. *General & Comparative Endocrinology* 65: 432-438.
- Gomot, L., B. Griffond. 1993. Action of the epigenetic factors on the expression of hermaphroditism in the snail *Helix aspersa*. *Comp. Biochem. Physiol.* 104A(2): 195-199.
- Guo, X., S.K. Allen Jr. 1994a. Reproductive potential and genetics of triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Biol. Bull.* 187: 309 - 318.
- Guo, X., S.K. Allen Jr. 1994b. Sex determination and polyploid gigantism in the dwarf-surf clam, *Mulinia lateralis* Say. *Genetics* 138: 1199-1209.
- Guo, X., S.K. Allen Jr. 1994c. Viable tetraploids in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg) produced by inhibiting polar body 1 in eggs from triploids. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 3: 42-50.
- Kiyomoto, M., A. Komaru, J. Scarpa, K.T. Wada, E. Danton, M. Awaji. 1996. Abnormal gametogenesis, male dominant sex ratio, and sertoli cell morphology in induced triploid mussels, *Mytilus galloprovincialis*. *Zoological Science* 13: 393-402.
- Komaru, A., K. Konishi, K.T. Wada. 1994. Ultrastructure of spermatozoa from induced triploid Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquaculture* 123: 217-222.
- Komaru, A., J. Scarpa, K.T. Wada. 1995. Ultrastructure of spermatozoa in induced tetraploid mussel *Mytilus galloprovincialis* (LMK) *J. Shellfish Res.* 14(2): 405-410,
- Komaru, A., K.T. Wada. 1989. Gametogenesis and growth of induced triploid scallops *Chlamys nobilis*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 55: 447-452 ( in Japanese with English summary).
- Komaru, A., K.T. Wada. 1990. Gametogenesis of triploid Japanese pearl oyster *Pinctada martensii*. In: Goshi, M., Yamashita, O. (Eds.) *Advances in Invertebrate Reproduction* 5. Elsevier Science Publisher B.V. Amsterdam, pp. 469-474.
- Le Penne, M., P.G. Beninger. 1997. Ultrastructural characteristics of spermatogenesis in the three species of deep-sea hydrothermal vent mytilids. *Can. J. Zool.* 75: 308-316.
- Luft, J.H. 1961. Improvements in epoxy resin embedding. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 9: 409-414.
- Murakami, H., P. Nurse. 1999. Meiotic DNA replication checkpoint control in fission yeast. *Genes and Development* 13: 2581-2593.

- Murakami, H., P. Nurse. 2000. DNA replication and damage checkpoints and meiotic cell cycle controls in the fission and budding yeast. *Biochemistry J.* 349: 1-12.
- Neter, J., W. Wasserman, M.H. Kutner. 1985. Applied linear statistical models. Illinois USA. Richard D. Irwin, Inc.
- Ramirez, J.L., S. Avila, A.M. Ibarra. 1999. Optimization of forage in two food-filtering organisms with the use of a continuous, low-food concentration, agricultural drip system. *Aquaculture Eng.* 20: 175-189.
- Roeder, G.S., J.M. Bailis. 2000. The pachytene checkpoint. *Trends in Genetics* 16(9): 395-403.
- Ruiz-Verdugo, C.A., S.K. Allen Jr., A.M. Ibarra. 2001. Family differences in success of triploid induction and effects of triploidy on fecundity of catarina scallop (*Argopecten ventricosus*). *Aquaculture* 201: 19-33.
- Ruiz-Verdugo, C.A., J.L. Ramirez, S.K. Allen Jr., A.M. Ibarra. 2000. Triploid catarina scallop (*Argopecten ventricosus* Sowerby II, 1842): growth, gametogenesis, and suppression of functional hermaphroditism. *Aquaculture* 186: 13-32.
- Small, S.A., T.J. Benfey. 1987. Cell size in triploid salmon. *J. Exp. Zool.* 241: 339-342.
- Tarsounas, M., P.B. Moens. 2001. Checkpoint and DNA-repair proteins are associated with the cores of mammalian meiotic chromosomes. *Current Topics in Developmental Biol.* 51: 109-134.
- Ueno, K. 1984. Induction of triploid carp and their haematological characteristics. *Jpn. J. Genet.* 59: 585-591.
- Utting, S.D., P.F. Millican, I. Laing. 1996. The breeding potential and biochemical composition of triploid Manila clams, *Tapes philippinarum* Adams and Reeve. *Aquaculture Res.* 27: 573-580.
- Valenti, R.J. 1975. Induced polyploidy in *Tilapia aurea* (Steindachner) by means of temperature shock treatment. *J. Fish Biol.* 7: 519-528.
- van Minnen, J., R.W. Dirks, E. Vreugdenhil, J. van Diepen. 1989. Expression of egg-laying hormone genes in peripheral neurons and exocrine cells in the reproductive tract of mollusc *Lymnaea stagnalis*. *Neuroscience* (England) 33 (1), 35-46.



**ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA FRECUENCIA DEL TIPO DE OVOCITO EN  
DIPLOIDES Y TRIPLOIDES DE ALMEJA CATARINA (*ARGOPECTEN  
VENTRICOSUS*) COMO INDICADOR DE ARRESTO MEIÓTICO**

**ARTÍCULO (Publicado):**

Maldonado-Amparo, R. and A. M. Ibarra. Comparative analysis of oocyte type frequencies in diploid and triploid catarina scallop (*Argopecten ventricosus*) as indicators of meiotic failure.

*Journal of Shellfish Research* 21(2): 597-603, 2002.

## **Abstract**

Differences between diploid and triploid female mollusks in their gametogenic process had previously centered on comparing the general gametogenic cycle, not the oocyte types in each ploidy class, which by their presence or absence might be used as indicators of completion of specific meiotic events. In this study we compared oocyte type frequencies at three different stages of the gametogenic cycle of triploid and diploid catarina scallops. Regardless of age of sampling (81d, 118d, 205d of grow out), the most abundant oocyte type in diploids was always the vitellogenic, and in triploids the previtellogenic. The frequency of occurrence of vitellogenic oocytes in triploids was only 4.7% to 19% of that in diploids, and that for postvitellogenic oocytes was only from 0% to 8% of that in diploids. This indicates that the oocyte stage in triploids at which gametogenesis was largely arrested was the previtellogenic oocyte, at meiosis I. The principal cause for the meiotic arrest might be associated to problems during zygotene at the time of synapsis between the three homologous chromosomes in triploids as previously suggested by other authors.

## **Introduction**

Previous research comparing diploid and triploid female mollusk gonad development have centered on comparisons of the gametogenesis cycle as described for diploids. Those studies have lead to the general conclusion that triploid gametogenesis is retarded when compared with diploids (Allen & Downing, 1986 & 1990; Allen 1987; Komaru & Wada

1989; Cox et al., 1996). Whereas some studies have based the comparative analysis of diploid and triploid gametogenic cycle in the qualitative occurrence of some particular type of oocyte at an age (Cox et al., 1996), a different approach to study the abnormal gonad development in triploid females is to estimated oocyte type frequencies in each ploidy class at different stages of the gametogenic cycle as it has been done for some fish species (Carrasco et al., 1998; Felip et al., 2001). The most common method of comparing diploids and triploids (by gametogenesis cycle) results in that it is not clear if the delayed gametogenesis in triploids is caused by a lower developmental rate of most oogenic stages, or by an inhibitory effect resulting in delay or an arrest of a particular stage so further development is impaired, or by both. What is clear is that a final consequence of the triploid condition at the end of the gametogenic cycle is the occurrence of partial or total sterility observed for most mollusk species, measured as the qualitative observation of low numbers of either spermatozoa or mature oocytes (Komaru & Wada, 1989; Allen & Downing, 1990; Guo & Allen, 1994a, 1994b; Cox et al., 1996; Eversole et al., 1996).

As with other mollusk species, in the functional hermaphrodite catarina scallop, *Argopecten ventricosus*, gametogenesis of triploid scallops is apparently delayed when compared to diploids, resulting in partial sterility of triploids. The partial sterility results in fecundity being largely reduced in triploid females, with the male gonad generally not developing further than the spermatocyte stage, and becoming replaced by female germinal cells later in the life cycle of triploids (Ruiz-Verdugo et al., 2000 & 2001; Maldonado-Amparo & Ibarra 2002). However, as is the case with most other mollusk species, an oocyte stage at which gametogenesis is arrested has not been clearly identified. The objective of this study

was to compare oocyte type frequencies between diploid and triploid catarina scallops at three different ages to define if such a stage exists.

## **Materials and methods**

### **a) Definition of oocyte types and their size**

Because oocyte types in catarina scallop have not been previously described, we first defined the oocyte stages based on those described by Dorange and LePennec (1989) and Saout (2000) for another scallop, *Pecten maximus*. The oocyte stages described by those authors included oogonia, previtellogenic oocyte, vitellogenic oocyte, and postvitellogenic oocyte. An additional oocyte stage was described for catarina scallop, mature oocytes, following the description from Longo (1983). The definition of meiotic stages occurring in previtellogenic oocytes of catarina scallop were based on those described for *Pecten maximus* by Saout (2000).

To obtain high definition photomicrographs of each oocyte stage, samples of diploid and triploid catarina scallop gonads were taken from five scallops of each ploidy group when 7 months old. These scallops were produced following the same methodology than Ruiz-Verdugo et al. (2000), inhibiting formation of the second polar body with cytochalasin-B ( $0.5 \text{ mg L}^{-1}$ ), and grown under the same conditions. All gonad samples were fixed similarly as for electronic microscopy studies (Komaru et al., 1994) to be able to obtain semi-thin ( $2 \text{ }\mu\text{m}$ ) sections, with the following modifications. The gonads were fixed in 2% gluteraldehyde in phosphate buffer (0.2 M) with an adjusted pH to 7.4 for 24 hours. After

this time, all samples were washed twice, each during 30 min, in a washing solution (9 g NaCl, 0.14 g KCl, 0.12 g CaCl<sub>2</sub>, 0.2 g NaHCO<sub>3</sub>, 2 g glucose, in 1000 ml distilled water). The samples were then progressively dehydrated passing them sequentially from 30% alcohol to absolute alcohol. The rest of the histological process was the same than with H&E. Photomicrographs taken with an Olympus BX-41 microscope with an integrated camera (CoolSNAP-Pro Color) were digitalized and measurements of oocyte types diameters of each ploidy class were taken with the image analysis program SigmaScan Pro5, obtaining the area by digitalizing contours and estimating diameters. A total of 30 cells of each type were measured per ploidy.

#### **b) Quantification of oocyte types**

After defining the type of oocytes in catarina scallop, we proceeded to obtain oocyte types frequencies. The diploid and triploid catarina scallops utilized in the evaluation of numbers of oocyte types in this study were those used by Ruiz-Verdugo et al. (2000) for the study of gametogenesis between triploids and diploids. In that study oocyte types present in each ploidy class at different ages were not comparatively quantified. Those triploids were produced by inhibition of polar body 2 with 0.5 mg cytochalasin-B L<sup>-1</sup>, and the scallops were reared for one year at Bahía Magdalena, B.C.S. Mexico.

Gonad samples from three ages were evaluated for both ploidy groups. Samples were taken at 81d of grow out when vitellogenesis was beginning in diploids, at 118d as an intermediate gametogenesis stage in which advanced vitellogenesis was evidenced by the presence of large numbers of vitellogenic and postvitellogenic oocytes, and at 205d of grow

out when mature oocyte stages occurred in diploids and spawning had taken place in some scallops. For the quantification of each oocyte type the same digitalization process than that used for definition of oocyte types was followed. For each ploidy class 9 to 10 gonads (organisms) were randomly sampled, and for each gonad all oocyte types in 20 randomly selected acini were counted.

### **c) Statistical Analyzes**

Differences in size of oocyte types between ploidy groups were analyzed with a single factor (ploidy) analysis of variance for each oocyte type. Means were compared with a Duncan test. Differences in numbers of oocyte types between ploidy groups at age were analyzed with a multivariate mixed ANOVA model, in which scallops were a random effect, and age and ploidy were fixed effects. For the only fixed interaction (ploidy by age), *post hoc* comparisons were done between treatment means using a Tukey test (Sokal and Rohlf, 1981). Significance for all analyzes was established at  $P < 0.05$ .

## **Results**

### **Oocyte types in catarina scallop**

The oocyte types occurring in diploid catarina scallop are depicted in Fig. 1, and their mean sizes in table 1. Those stages included oogonia (diameter 4.57  $\mu\text{m}$ ) attached to the acinus wall, previtellogenic oocytes with an average diameter of 6.95  $\mu\text{m}$  in which the prophase I stages of zygotene-pachytene and diplotene could be distinguished (based on

Saout, 2000). The first association of oocytes to auxiliary cells characterized vitellogenic oocytes, with an average diameter of 37.34  $\mu\text{m}$ , but ranging from 11.99  $\mu\text{m}$  to 49.31  $\mu\text{m}$ . Postvitellogenic oocytes, in which a clearly defined vitelline envelope was present, had an average diameter of 43.84  $\mu\text{m}$ . Few mature oocytes, those in which the germinal vesicle was broken, were observed in this scallops, and therefore not measured.

In triploid catarina scallop (Fig. 2, Table 1), oogonia also attached to the acinus wall were significantly larger (4.85  $\mu\text{m}$ ) than those in diploids. Previtellogenic oocytes (diam. 7.81

Table 1. Mean cytoplasm diameters (minimum - maximum) of each oocyte type (n=20) for each group, diploid (2N) and triploid (3N), in catarina scallop (*Argopecten ventricosus*).

	Diploid	Triploid
Oocyte types:	Cytoplasm diameter, $\mu\text{m}$ (range)	
Oogonia	4.57 (3.98 – 5.12) <sup>a</sup>	4.85 (4.08 – 5.46) <sup>b</sup>
Previtellogenic	6.95 (5.75 – 8.34) <sup>a</sup>	7.81 (7.24 – 8.76) <sup>b</sup>
Vitellogenic	37.34 (11.99 – 49.31) <sup>a</sup>	32.77 (10.29 – 55.54) <sup>a</sup>
Postvitellogenic	43.84 (35.25 – 50.54) <sup>a</sup>	50.35 (38.77 – 58.93) <sup>b</sup>

Different letters between columns indicate significant differences between ploidy classes.

$\mu\text{m}$ ) were also larger and differed from diploids in that they were the most abundant oocyte type, and in that they were surrounded by empty spaces, probably a consequence of cell lyses. Vitellogenic oocytes diameter (32.77  $\mu\text{m}$ ) in triploids was not significantly different from diploids, although in triploids most of the few observed vitellogenic oocytes were still pedunculated. Postvitellogenic oocytes (diam. 50.35  $\mu\text{m}$ ) were larger than in diploids and free in the lumen of the acinus. No mature oocytes were observed in triploid scallops.

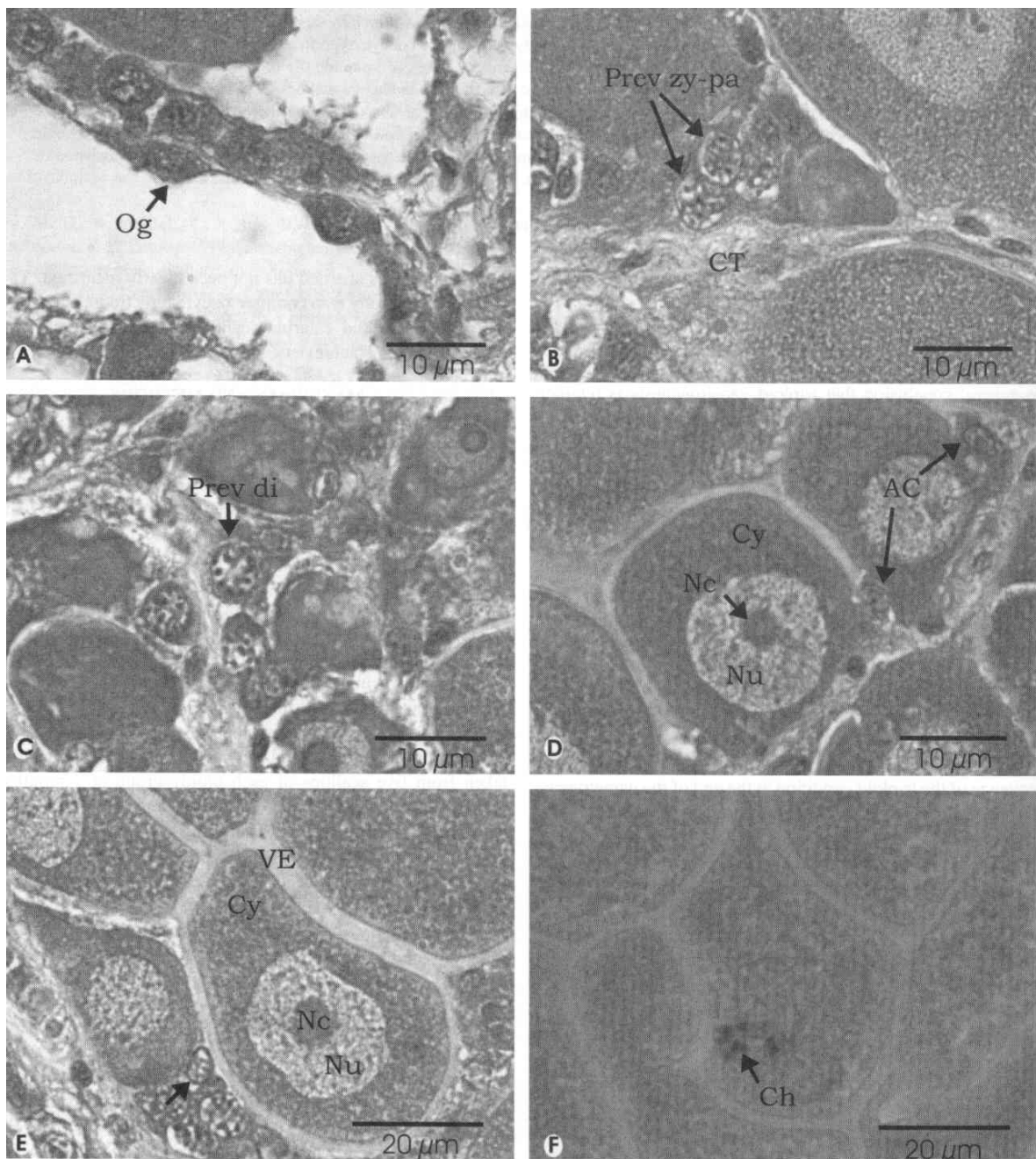


Fig. 1. Diploid oocyte in catarina scallop. Light microscopy (100X). A) Oogonia (Og); B) Previtellogenic oocytes in zygotene-pachytene (Prev zy-pa); C) Previtellogenic oocyte in diplotene (Prev di); D) Vitellogenic oocyte; E) Postvitellogenic oocyte; F) Mature oocyte. AC = auxiliary cells; Ch = chromosomes in metaphase; CT = connective tissue; Cy = cytoplasm; Nc = nucleolus; Nu = nucleus; VE = vitelline envelope.



Table 2. Mean numbers of oocyte types at each age and for each ploidy group, diploid (2N) and triploid (3N) of catarina scallop, *Argopecten ventricosus*.

Oocyte types:		Oogonia	Previtellogen ic	Vitellogeni c	Postvitellogen ic	Mature
Age	Ploidy					
81 d	2N	1.43 b	6.89 b	15.26 c	1.07 b	0.09 a
	3N	6.62 b	27.82 c	2.16 a	0.00 a	0.00 a
118 d	2N	0.00 a	0.66 a	29.47 e	6.62 cd	0.65 b
	3N	0.35 a	85.53 e	1.40 a	0.03 a	0.00 a
205 d	2N	0.03 a	0.01 a	24.64 d	5.76 c	2.74 c
	3N	0.00 a	77.06 d	4.76 b	0.47 ab	0.00 a

Different letters within columns (oocyte types) indicate significant differences between ploidy groups and ages.

### Analyzes of numbers of oocyte types

Both, ploidy class and age were significant effects ( $P < 0.0001$ ) in the analysis for frequencies of all oocyte types. There was a significant interaction between ploidy class and age, and also the triple (random) interaction effect was significant. At 81d and 118d of grow out, diploids had significantly less oogonia and previtellogenic oocytes than triploids, and more vitellogenic, postvitellogenic, and mature oocytes than triploids (Table 2). At 205d diploid and triploids practically showed no oogonia, but diploids still had significantly less previtellogenic oocytes and more vitellogenic, post-vitellogenic, and mature oocytes than triploids. In triploids evaluated at this late age the most common oocyte type was still the previtellogenic oocyte.

Besides the differences within age for numbers of oocyte types between ploidy groups, and the difference in the most common oocyte type between diploid and triploid scallops at

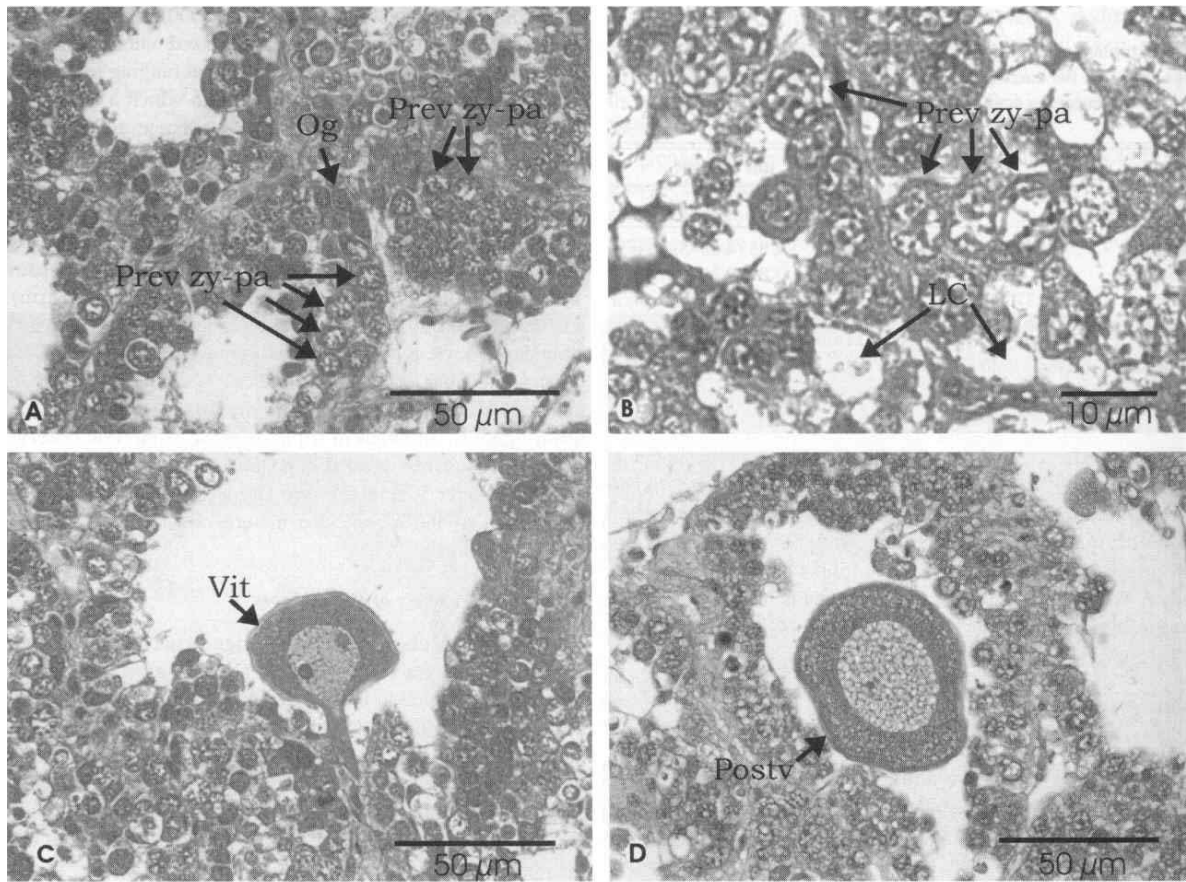
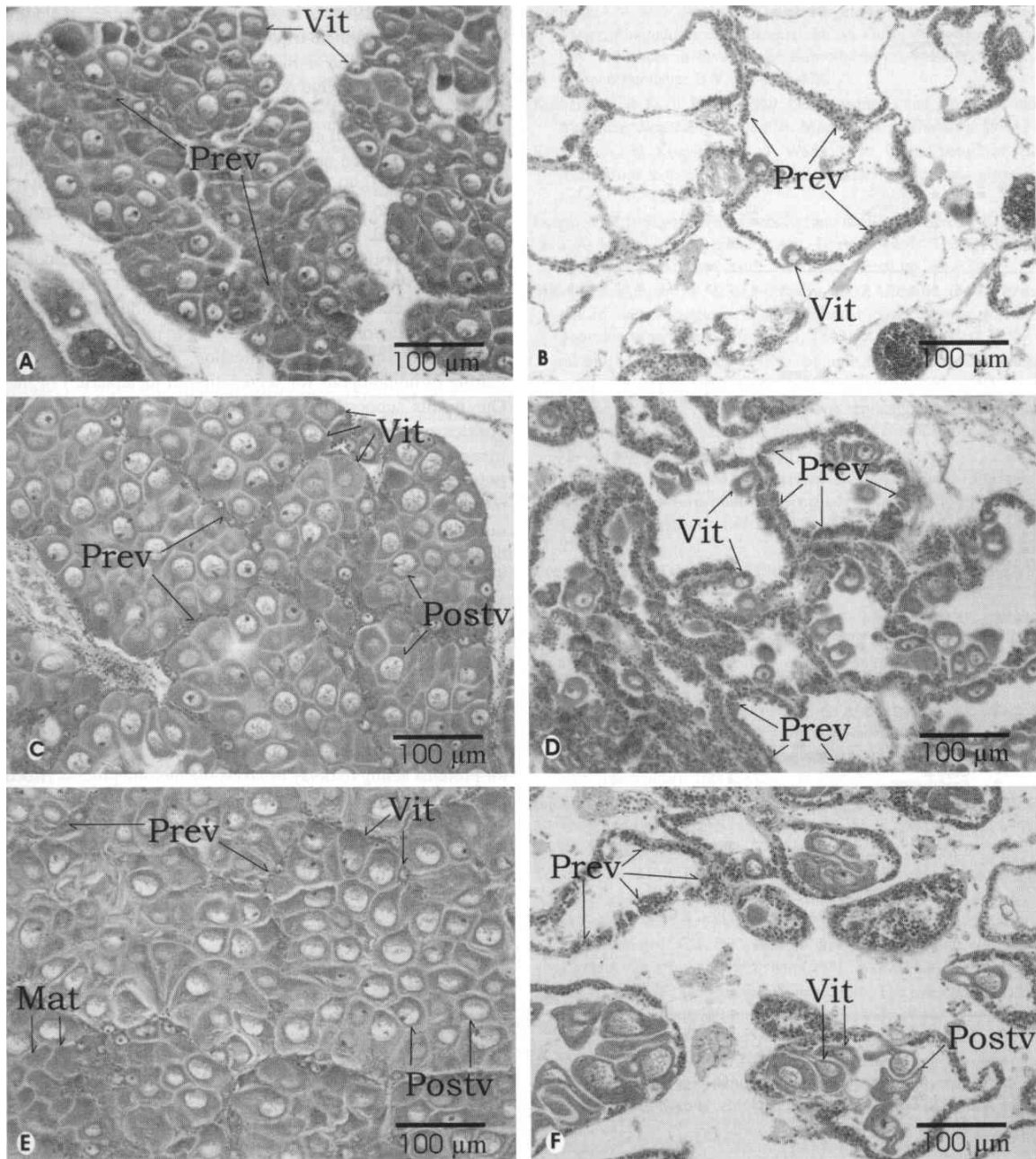


Fig. 2. Triploid oocytes in catarina scallop. Light microscopy. A) Oogonia (Og), and large numbers of previtellogenic oocytes in zygotene-pachytene (Prev zy-pa) (40X). B) Closer view of Prev zy-pa (100X). C) Isolated vitellogenic oocyte (Vit) (40X). D) Isolated postvitellogenic oocyte (Postv) (40X). LC = Cell lysis.

any age (Fig. 3), diploids had an increasing number of vitellogenic oocytes and a decreasing number of previtellogenic oocytes from 81d (15.26 and 6.89, respectively) to 118d (29.47 and 0.7, respectively), whereas triploid scallops had an increasing number of previtellogenic oocytes and a decreasing number of vitellogenic oocytes during the same period (27.82 and 2.19 at 81d, and 85.53 and 1.4 at 118d). There was a decrease in numbers of vitellogenic oocytes found in diploids from 118d (29.47) to 205d (24.64), which was paralleled by an increase in mature oocytes (0.65 at 118d, and 2.74 at 205d).



**Fig. 3.** Diploid (left) and triploid (right) catarina scallop female gonad structure at 81d (A & B), 118d (C & D), and 205d (E & F) of grow out. Light microscopy (20X). In diploids at 81 d (A) there were abundant vitellogenic oocytes (Vit), and few previtellogenic (Prev); by 118d (C) postvitellogenic oocytes (Postv) were abundant; by 205d (E) some mature oocytes (Mat) were also present. In triploids previtellogenic oocytes were the most common type at all ages although a few vitellogenic (B) were already present at 81d, increasing in numbers by 118d (D); some postvitellogenic oocytes were evident by 205d (F).

Among triploids there was a decrease in number of previtellogenic oocytes from 118d (85.53) to 205d (77.01), which paralleled an increase in numbers of vitellogenic oocytes (1.40 at 118d, and 4.76 at 205d).

The significance of the triple random interaction (ploidy, age, organism) was caused by differences among diploid and triploid individuals in the number of the different types of oocytes each showed at the different ages evaluated, with the largest differences occurring among triploid individuals for the number of previtellogenic oocytes present per individual, followed by the number of oogonia and vitellogenic oocytes. In diploids, variation between individuals was seen especially for numbers of vitellogenic oocytes, but the variation was not as marked as that seen for previtellogenic oocytes among triploids (Fig. 4).

## **Discussion**

We have demonstrated in this study that in catarina scallop the number of late developmental oocyte stages (vitellogenic, postvitellogenic, and mature) is largely reduced in triploids when compared with those developing in diploids, and that the number of early oocyte stages in triploids, especially the previtellogenic oocyte, is in a large frequency from the beginning to the end of the reproductive cycle of diploids. A large reduction in fecundity, measured as number of mature or spawned eggs, as a consequence of triploidy has been observed for oysters and clams (Guo & Allen 1994c; Utting et al. 1996), as well as for the catarina scallop (Ruiz-Verdugo et al. 2001). The sporadic occurrence of vitellogenic oocytes in triploid scallops appears to be a random event, as significant variation between individuals was seen. The low number of vitellogenic oocytes translates

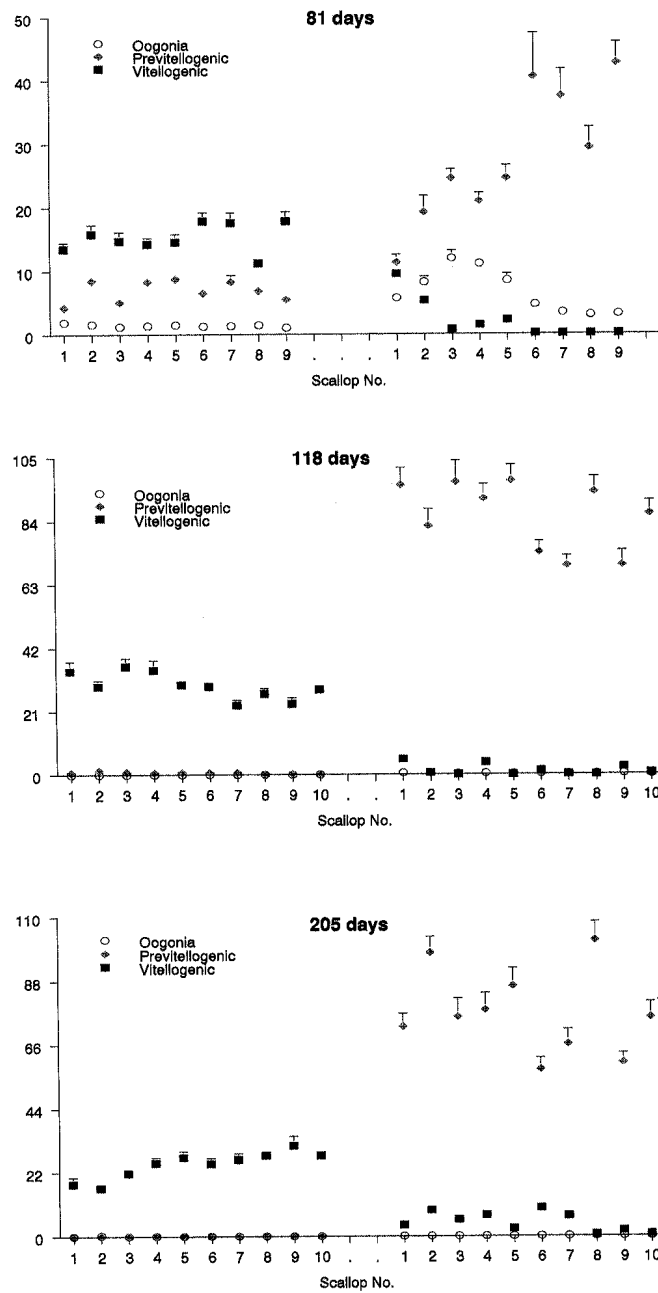


Fig. 4. Frequencies of oocyte types (oogonia, previtellogenic, vitellogenic) per scallop in both, diploids and triploids, at each of the evaluated ages.

into a reduction in fecundity of 86% at 81d, 95% at 118d, and 81% at 205d of growth. However, when post-vitellogenic oocytes are considered, the reduction in fecundity was larger, 100% at 81d, 99% at 118d, and 92% at 205d.

Because the first sampling analyzed already contained diploid scallops with advanced stages of development, not just the first oocyte stages, we were unable to determine whether there was an actual delay in triploid scallops in the initial occurrence of the first oocyte stages (oogonia and previtellogenic oocytes) when compared with diploids by oocyte frequency counts. In this study the scallops shell height at the earliest sampling (81d) was close to 3 cm (Ruiz-Verdugo et al., 2000), and it is known that the first age of sexual maturation for catarina scallop when grown at the same environment than in this study is a shell height of 2 cm (Cruz et al., 2000). Further studies at ages or sizes smaller

In fish, studies comparing numbers of oocyte types between diploids and triploids (Carrasco et al., 1998; Felip et al., 2001), have also indicated that there is a difference between ploidy groups in the type of oocytes most frequently occurring, with the most common one in triploids being the previtellogenic oocyte. This points towards the first oocyte stage at which the triploid condition results in an inhibitory effect of further development being the previtellogenic oocyte, such that more advanced oocyte stages occur at much lower frequencies. In scallops it is known that only those previtellogenic oocytes that complete the pachytene stage and enter the diplotene stage of meiosis I will begin the process of vitellogenesis and become mature (Beninger & Le Pennec, 1991; Dorange & Le Pennec 1989). Our results clearly point toward the fact that oogenesis in triploid catarina scallop (*Argopecten ventricosus*) was largely arrested at the previtellogenic oocyte, and the

reduced numbers of oocyte stages other than the previtellogenic type in triploids point to the halt of oocyte development at prophase of meiosis I, before the diplotene stage. In the male gonad part of this hermaphrodite species it is known that the halt in spermatogenesis occurs also at prophase I (Maldonado & Ibarra, 2002).

Until now, the cause of the sterility in triploid mollusks had been mostly ascribed to the inability of chromosomes to synapse, align, and segregate. However, at least for one species, the Pacific oyster, it has been demonstrated that synapses and segregation of chromosomes can occur in triploid oocytes even if in a lower number of oocytes than in diploids and in an abnormal fashion (Guo & Allen, 1994c). In other mollusk species, including the catarina scallop, female triploids are known to be able to produce mature oocytes, even if in largely reduced numbers when compared with diploids (Guo and Allen, 1994a; Utting et al., 1996; Ruiz-Verdugo et al., 2001). Among some species of male triploid mollusks, meiosis I and II are able to proceed through sperm formation although in reduced numbers when compared with diploids (Komaru and Wada, 1990; Guo and Allen, 1994a; Cox et al., 1996; Maldonado-Amparo and Ibarra, 2002), and the produced sperm is generally aneuploid.

Because mollusks do not have to go through the completion of meiosis I to form mature oocytes, Allen (1987) proposed that the fact that oogenesis is arrested in triploid mollusks must be a consequence of meiotic difficulties arising at pre-synaptic or synaptic stages, after chromosome replication, rather than difficulties in pairing of homologous for segregation in metaphase I of meiosis. Our results support this same conclusion. The finding that few oocytes proceeded to the vitellogenic oocyte in triploids points toward the

halt of meiosis being just before the diplotene stage at prophase I. The regulatory mechanisms to explain that arrest of meiosis remain to be investigated. One possible regulatory mechanism might be associated with the known 'meiotic checkpoints' described for a number of organisms (Murakami & Nurse, 1999 & 2000; Roeder & Bailis 2000; Tarsounas and Moens, 2001), with the 'recombination or pachytene checkpoint' being one of the most interesting ones to explain the arrest of meiosis in oocytes of triploid organisms, as it provides with a genetic, rather than just a mechanical mechanism for the observed arrest of further development. Meiotic checkpoints, also called 'housekeeping mechanisms', are known to act by means of protein complexes signaling abnormal chromosome behavior, with effector proteins acting to delay or arrest the meiotic process (Roeder & Bailis 2000).

In conclusion, partial sterility in the female gonad of the catarina scallop is related to a halt in previtellogenic oocytes. As it is known that only those previtellogenic oocytes that complete the diplotene stage of meiosis I become vitellogenic, we conclude that the sterility is caused by problems during chromosome synapsis and recombination, that is, during the zygotene and pachytene stages of meiosis I. Why some oocytes are able to complete the vitellogenic process in spite of the demonstrated general arrest at previtellogenic oocyte is not known, but recent studies in triploids of other species point toward the existence of a correction mechanism of trivalent and tetravalent formation when homologous pair for recombination, which appears to be sex specific (Gui et al., 1991, 1992, 1995; Oliveira et al., 1995; Zickler and Kleckner, 1999), and explains triploids differences between sexes in sterility.



## Acknowledgements

This research was supported by CONACYT grant no. 28256B to A.M. Ibarra. We thank Dr. Thomas Famula, biometrician from UC Davis for advise on the statistical analyses. We also thank Carmen Rodriguez for histology support. The senior author is a CONACYT and SEP (DECYTM) Ph.D. fellow, and the results presented here are part of his thesis.

## References

- Allen Jr., S. K. & S. L. Downing. 1986. Performance of triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg). I. Survival, growth, glycogen content, and sexual maturation in yearlings. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 102:197-208.
- Allen Jr., S. K. 1987. Gametogenesis in three species of triploid shellfish: *Mya arenaria*, *Crassostrea gigas* and *Crassostrea virginica*. Proc. World Symposium on Selection, Hybridization and Genetic Engineering in Aquaculture of fish and shellfish for consumption and stocking. Bordeaux, 27-30 may. Vol. II, Berlin, pp. 207-217.
- Allen Jr., S. K. & S. L. Downing. 1990. Performance of triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. Gametogenesis. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 47:1213-1222.
- Benninger, P. G. & M. LePennec. 1991. Functional anatomy of scallops. In: Shumway, S.E. (Ed.), *Scallop Biology, Ecology and Aquaculture*. Elsevier, pp. 133-223.
- Carrasco, L. A. P., S. Doroshov, D. J. Penman & N. Bromage. 1998. Long-term quantitative analysis of gametogenesis in auto triploid rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Reproduction and Fertility* 113:197-210.
- Cox, E. S., M. R. Smith, J. A. Nell & G. B. Maguire. 1996. Studies on triploid oysters in Australia. IV. Gonad development in diploid and triploid Sydney rock oysters *Saccostrea commercialis* (Iredale and Roughley). *J. Exp. Mar. Biology. And Ecology* 197:101-120.
- Cruz, P., C. Rodriguez-Jaramillo & A. M. Ibarra. 2000. Environmental and population origin effects on first sexual maturity of catarina scallop, *Argopecten ventricosus* (Sowerby II, 1842). *J. Shellfish Res.* 19:89-93.
- Dorange, G. & M. LePennec. 1889. Ultrastructural study of oogenesis and oocytic degeneration in *Pecten maximus* from the Bay of St. Briec. *Marine Biology* 103:339-348.
- Eversole, A. G., C. J. Kempton, N. H. Hadley & W. Buzzi. 1996. Comparison of growth, survival, and reproductive success of diploid and triploid *Mercenaria mercenaria*. *J. Shellfish Res.* 15:689-694.
- Felip, A., F. Piferrer, M. Carrillo & S. Zanuy. 2001. Comparison of the gonadal

- development and plasma levels of sex steroid hormones in diploid and triploid sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. *J. of Experimental Zoology* 290:384-395.
- Gui, J. F., J. Jia, S. C. Liang & Y. G. Jiang. 1992. Meiotic chromosome behavior in male triploid transparent colored crucian carp *Carassius auratus* L. *J. of Fish Biology* 41:317-326.
- Gui, J. F., W. H. Xiao, L. Chen, S. C. Liang & Y. G. Jiang. 1991. Gonadal development in artificial triploid transparent colored crucian carp. *Acta Zoologica Sinica* 37:297-304.
- Gui, J. F., L. Chen, S. Liang & Y. Jiang. 1995. Light microscopy investigation of meiotic chromosome pairing in artificial triploid fishes with blocked ovaries. *Acta Hydrobiologica Sinica* 19:223-226.
- Guo, X. & S. K. Allen Jr. 1994a. Viable tetraploids in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg) produced by inhibiting polar body I in eggs from triploids. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 3:42-50.
- Guo, X. & S. K. Allen Jr. 1994b. Sex determination and polyploid gigantism in the Dwarf surf clam (*Mulinia lateralis*) say. *Genetics* 138:1199-1206.
- Guo, X. & S. K. Allen Jr. 1994c. Reproductive potential and genetic of triploid Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Biol. Bull.* 187:309-318.
- Komaru, A. & K. T. Wada. 1990. Gametogenesis of triploid Japanese pearl oyster, *Pinctada fucata martensii*. In: Goshi, M. & O. Yamashita. (Eds.) *Advances in Invertebrate Reproduction* 5. Elsevier Science Publisher B.V., Amsterdam, pp. 469-474.
- Komaru, A. & K. T. Wada. 1989. Gametogenesis and growth of induced triploid scallop *Chlamys nobilis*. *Nippon Suisan Gakkishi* 55:447-452.
- Komaru, A., K. Konishi & K. T. Wada. 1994. Ultrastructure of spermatozoa from induced triploid Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquaculture* 123:217-222.
- Longo, F. J. 1983. Meiotic maturation and fertilization. Pp. 49-89. In: Verdonk, N. K., J. A. M. van den Biggelaar & A. S. Tompa. (Eds.). *The Mollusca*, Vol. 3, Development, Academic Press, New York.
- Maldonado-Amparo, R. & A. M. Ibarra. 2002. Ultrastructural characteristics of spermatogenesis in diploid and triploid catarina scallop (*Argopecten ventricosus* Sowerby II, 1842). *J. Shellfish Res.* 21, in press
- Murakami, H. P. & P. Nurse. 1999. Meiotic DNA replication checkpoint control in fission yeast. *Genes and Development* 13:2581-2593.
- Murakami, H. P. & P. Nurse. 2000. DNA replication and damage checkpoints and meiotic cell cycle controls in the fission and budding yeast. *Biochemistry J.* 349:1-12.
- Oliveira, C., F. Foresti, M. G. Rigolino & Y. A. Tabata. 1995. Synaptotomal complex formation in spermatocytes of the autotriploid rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Pisces, Salmonidae). *Hereditas* 123:215-220.
- Roeder, G. S. & J. M. Bailis. 2000. The pachytene checkpoint. *Trends in Genetics* 16:395-403.
- Ruiz-Verdugo, C. A., S. K. Allen Jr. & A. M. Ibarra. 2001. Family differences in success of triploid induction and effects of triploidy on fecundity of catarina scallop (*Argopecten ventricosus*). *Aquaculture* 201:19-33.

- Ruiz-Verdugo, C. A., J. L. Ramírez, S. K. Allen Jr. & A. M. Ibarra. 2000. Triploid catarina scallop (*Argopecten ventricosus* Sowerby II, 1842): growth, gametogenesis, and suppression of functional hermaphroditism. *Aquaculture* 186:13-32.
- Saout, C. 2000. Controle de la reproduction chez *Pecten maximus* (L): etudes *in situ* et experimentales. These de doctorat, Universite de Bretagne Occidentale, France. 172 pp.
- Sokal, R. R. & F. J. Rohlf. 1981. Biometry: The principles and practice of statistics in biological research. Freeman, New York.
- Tarsounas, M. & P. B. Moens. 2001. Checkpoint and DNA-repair proteins are associated with the cores of mammalian meiotic chromosomes. *Current Topics in Developmental Biol.* 51:109-134.
- Utting, S. D., P. F. Millican & I. Laing. 1996. The breeding potential and biochemical composition of triploid manila clams, *Tapes philippinarum* Adams and Reeve. *Aquaculture Research* 27:573-580.
- Zickler, D. & N. Kleckner. 1999. Meiotic chromosome: integrating structure and function. *Annual Review of Genetics* 33:603-754.

## **CAPÍTULO II**

**EVALUACIÓN DE TRES MODALIDADES PARA LA  
INDUCCIÓN A LA TETRAPLOIDÍA EN LA ALMEJA  
CATARINA (*Argopecten ventricosus*, Sowerby II, 1842),  
CON FINES DE PRODUCIR TETRAPLOIDES  
VIABLES.**

**INDUCCIÓN A LA TETRAPLOIDÍA EN ALMEJA CATARINA, *Argopecten ventricosus* (Sowerby II, 1842)**

**ARTÍCULO (Publicado):**

Maldonado A.R., A.M. Ibarra and J.L. Ramírez. Induction to tetraploidy in catarina scallop, *Argopecten ventricosus* (Sowerby II, 1842).

*Ciencias Marinas* 29(2): 229-238, 2003.

## **Resumen**

La inducción a la tetraploidía por inhibición de la extrusión del primer cuerpo polar en huevos producidos por diploides y fertilizados por esperma haploide produjo un porcentaje reducido de larva-D tetraploide, pero no resultó en la presencia de semilla o adultos tetraploides. La inhibición de la primera división celular del cigoto resultó principalmente en larva anormal. Cuando la inducción a la tetraploidía se realizó inhibiendo el primer cuerpo polar en huevos de triploides fertilizados con esperma haploide se obtuvo un alto porcentaje de larva-D tetraploide en una de las inducciones. De las progenies tetraploides, 6 sobrevivieron a talla adulta. El análisis de hemolinfa por medio de citometría de flujo de los supervivientes indicó que 5 eran tetraploides y uno era mosaico ( $2n$  y  $4n$ ). Con base en estos resultados, los esfuerzos futuros para la producción de tetraploides de almeja catarina deberán centrarse en la utilización de ovocitos de triploides (fecundados con esperma haploide), inhibiendo el primer cuerpo polar.

## **1. Introducción**

La inducción a la poliploidía en moluscos es una realidad en nuestros días, especialmente cuando se considera a la triploidía. Los moluscos triploides se caracterizan por presentar un mejor crecimiento o calidad de carne que los diploides. Esto se debe principalmente a que la condición del triploide resulta en una esterilidad parcial o total, de tal forma que la energía disponible para lo que sería la formación de gametos y maduración de los mismos puede ser utilizada en crecimiento (Allen y Downing, 1986). Uno de los problemas de esa tecnología es que para la producción de triploides se tienen que utilizar métodos de inducción ya sea químicos o físicos, ambos de los cuales resultan en una alta

mortandad de los huevos sometidos a estos tratamientos. Una alternativa para obtener organismos triploides para la producción de moluscos en cultivos es por medio de la utilización de apareamientos ‘naturales’ entre organismos tetraploides y diploides (Guo et al., 1996). Debido a que los organismos tetraploides no existen en forma natural en los moluscos, estos tienen que ser producidos primero. La producción de tetraploides ha demostrado ser difícil, aunque algunos se han producido en forma accidental cuando se ha inhibido la extrusión del primer cuerpo polar en huevos de diploides (Allen et al., 1994; Cai y Beaumont, 1996; Diter y Dufy, 1990; Gendreau y Grizel, 1990; Guo et al., 1992; Scarpa et al., 1993; Stephens y Downing, 1988; Yang et al., 2000; Zhang et al., 2000). La ploidía esperada cuando se inhibe el primer cuerpo polar en huevos de diploides fertilizados con esperma haploide es un cigoto triploide. Por ello cuando se observan tetraploides se supone que es consecuencia de un evento aleatorio raro como es la segregación de los cromosomas en un arreglo tri- y unipolar (en contraste con uno bipolar), en donde un juego completo de cromosomas es liberado en el segundo cuerpo polar, y tres juegos completos son retenidos. Ocasionalmente, también cuando se inhibe el primer cuerpo polar, se han observado progenies pentaploides (Cooper y Guo, 1989; Diter y Dufy, 1990; Scarpa et al., 1993; Yang et al., 2000), lo cual es una consecuencia de la inhibición, no inducida, del segundo cuerpo polar adicionalmente al primer cuerpo polar inducido.

Mientras que en plantas la obtención de tetraploides provocados por la inhibición de la primera división celular con colchicina se ha logrado con éxito (Gardner et al., 1998; Klug y Cummings, 1996; Norstog y Long, 1976; Tamarin, 1999), los intentos de producir tetraploides de moluscos por inhibición de la primera división celular no han mostrado resultados satisfactorios (Diter y Dufy, 1990; Guo 1991 citado por Guo y Allen, 1994; Guo

et al., 1994; Yang et al., 1997). Solamente una metodología (Guo y Allen, 1994) ha demostrado su factibilidad en la producción de tetraploides viables de ostión Japonés. Esta consiste en la utilización de huevos producidos por triploides, los cuales son fecundados con espermatozoides haploides, inhibidos en la extrusión del primer cuerpo polar, pero permitiendo la liberación del segundo cuerpo polar. En huevos de triploides la segregación de cromosomas en la meiosis I es impar resultando en aneuploidía. Al inhibir la meiosis I, la probabilidad de una segregación balanceada en la meiosis II se incrementa ya que la división que ocurre en la meiosis II es de tipo equitativo, en donde todos los cromosomas duplicados se alinean en la metafase, y al separarse los centrómeros una de cada una de las cromátidas hermanas segrega al segundo cuerpo polar, reteniendo el ovocito tres juegos completos de cromosomas. Un ovocito que contribuye con 3 juegos cromosómicos cuando es fecundado con un espermatozoide haploide resultará en un cigoto tetraploide, como ha sido demostrado que ocurre en el ostión Japonés (Guo y Allen, 1994), y en la ostra perlera asiática (He et al., 2000).

En la almeja catarina la triploidía ha sido inducida en forma exitosa, encontrándose una ventaja significativa en crecimiento del triploide cuando se compara con el diploide, especialmente cuando se considera la parte comercial de esta especie, el músculo aductor o 'callo', el cual en el triploide fue del doble del observado en el diploide (Ruiz-Verdugo et al. 2000). Así mismo, se ha observado que la esterilidad en la gónada femenina es parcial (Ruiz-Verdugo et al. 2000), de tal manera que al menos un 20% de los ovocitos en un diploide pueden ser obtenidos en desoves inducidos en triploides (Ruiz-Verdugo et al. 2001). Estos ovocitos pueden ser utilizados para la evaluación de la producción de almeja



catarina tetraploide a través de la utilización del método desarrollado por Guo y Allen (1994) para el ostión Japonés.

En este estudio reportamos los resultados sobre la inducción a la tetraploidía en almeja catarina (*Argopecten ventricosus* Sowerby II, 1842) utilizando tres métodos diferentes: inhibición del primer cuerpo polar e inhibición de la primera división celular en huevos de diploides, así como inhibición del primer cuerpo polar en huevos de triploides fecundados con esperma haploide.

## **2. Materiales y Métodos**

### **2.1 Reproductores y colecta de gametos**

Las almejas catarina diploides y triploides, con una longitud aproximada de 7 cm, fueron acondicionadas para el desove siguiendo la metodología de Ramírez et al. (1999). Esta consiste en proveer con alimentación continua con un sistema de riego por goteo adaptado para este fin. Las almejas diploides alcanzaron la madurez después de 15 días, mientras que las triploides tardaron de 20 a 21 días. La madurez fue evaluada por medio de la escala visual de Sastry (1963), en donde cuatro estadios son reconocidos: inmaduro, madurez parcial (tanto la sección femenina como masculina son identificadas fácilmente por su coloración, pero la gónada aun presenta espacios), maduro (la gónada se observa 'llena', con una coloración naranja-rojo brillante), y desovado. Los procedimientos de inducción al desove y la colecta de gametos fueron los mismos para todos los experimentos. El desove se indujo inyectando intramuscularmente 0.2 mL de una solución

de serotonina al 0.5 mM. En esta especie hermafrodita funcional, la serotonina induce la liberación del espermatozoides primero, seguido por el huevo. Una vez que las almejas inician la liberación del huevo estas son enjuagadas con agua de mar y colocadas en vasos (1L) individuales para la colecta del huevo.

Para todas las inducciones a la poliploidía se utilizó citocalacina-B (CB) (Sigma C-6762), enjuagando después del tratamiento con DMSO (dimetil-sulfóxido a una concentración igual a la de la CB utilizada en esa inducción) durante 15 minutos para remover el excedente de CB (Allen et al., 1989). La concentración de CB utilizada por litro varió entre inducciones, y es indicada en la descripción de cada experimento.

## **2.2 Eventos meióticos evaluados para la inducción a la tetraploidía**

### *2.2.1 Inhibición del primer cuerpo polar (meiosis I) en huevos de diploides:*

En este método el tratamiento con CB se inició 5-6 minutos después de la fertilización, y se concluyó cuando los primeros huevos en un grupo control mostraron la extrusión del segundo cuerpo polar (2CP). Esto correspondió a cuando el 70% de los huevos en el control mostraron la extrusión del primer cuerpo polar (1CP).

### *2.2.2 Inhibición de la primera división celular (mitosis) en cigotos diploides:*

El tratamiento se inició cuando el 50% de los huevos en el grupo control mostraron la extrusión del 2CP, y se concluyó cuando 50% de los cigotos en el grupo control estaban en primera división celular (1ªDC).

### *2.2.3 Inhibición del 1CP en huevos de triploides fertilizados con espermatozoides haploides:*

El tratamiento se inició 5 minutos después de la fertilización, y se concluyó cuando del 50% al 70% de los huevos en el grupo control mostraron la extrusión del 1CP.

### **2.3 Experimentos**

Todos los experimentos descritos a continuación se hicieron utilizando agua de mar filtrada mediante filtros de polipropileno hasta 1  $\mu\text{m}$  y esterilizada con luz UV (180 Watts). La salinidad fue de 36 ppm, y la temperatura de 21.5 a 22  $^{\circ}\text{C}$ , la cual es lograda utilizando un sistema de enfriamiento comercial que trabaja por recirculación a una cisterna de 7,000 L. El volumen de agua utilizado para los diferentes tratamientos con citocalacina-B fue siempre de 250 mL, irrespectivo del número de huevos obtenido en cada experimento. Este volumen optimiza la cantidad de citocalacina-B utilizada, y ha sido utilizado previamente con inducciones por individuo en esta especie con resultados satisfactorios (Ruiz-Verdugo et al., 2001).

En el experimento I los huevos de 7 almejas se mantuvieron en forma individual, conformando 7 réplicas. Cada réplica fue dividida en dos: 1 grupo control no tratado (aproximadamente 1/3 del total de huevo por hembra), y un grupo para inhibición de la 1<sup>a</sup>DC (el resto del huevo obtenido de cada hembra, aproximadamente 2/3) utilizando 0.5 mg CB L<sup>-1</sup>. El número de huevos desovado por hembra varió de 448,000 a 1'683,000. En aquellas réplicas en las que se observó larva normal en el grupo control, se estimó el porcentaje de cada clase de ploidía (diploide, triploide, tetraploide, pentaploide) resultante por citometría de flujo siguiendo los procedimientos descritos por Allen y Bushek (1992). En resumen, la larva fue concentrada en una suspensión de agua de mar de 1 mL,

centrifugada, y teñida con 0.5 mL de una solución de DAPI / detergente / DMSO. La concentración de DAPI en esa solución es de  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Posteriormente la larva fue desagregada macerando conchas y tejido. La suspensión de células obtenidas fue filtrada en una malla con abertura diagonal de  $30\text{-}\mu\text{m}$ , agregando 1.5 mL de la solución de DAPI / detergente / DMSO 5 minutos antes de la lectura por citometría de flujo (PLOIDY ANALYZER II, Partec, Alemania). Adicionalmente, para estimar el porcentaje de células en cada clase de ploidía se establecieron límites mínimos y máximos para cada clase de ploidía. El límite mínimo se estimó como la media de esa ploidía menos 3 desviaciones estándar, y el límite máximo como la media mas 3 desviaciones estándar.

En el experimento II se evaluaron 4 repeticiones. Cada repetición se conformó por el total de los huevos producidos por 6 almejas. El propósito de este experimento fue el definir si almeja catarina tetraploide podía ser producida en forma alterna a la inhibición de la 1ª DC. Esto es, utilizando ahora la inhibición del 1CP, y comparando con los resultados obtenidos al inhibir la 1ª DC. Basándonos en los datos de número de huevos desovados por hembra en el primer experimento, lo cual indicó que puede ser tan bajo como de 450,000, en este experimento se utilizó un 'pool' de huevos ya que se requeriría de dividir los huevos en 3 grupos. Cada repetición se dividió en 3 grupos: control (no tratado); inhibición del 1CP ( $0.75 \text{ mg CB L}^{-1}$ ); e inhibición de la 1ªDC ( $0.5 \text{ mg CB L}^{-1}$ ). El número de huevos varió entre repeticiones, dependiendo del número desovado por las 6 hembras conformando esa repetición. En la repetición 1 se obtuvieron un total de 9'334,900 huevos, en la repetición 2 un total de 5'962,000 huevos, en la repetición 3 un total de 4'941,000 huevos, y en la repetición 4 un total de 4'095,000 huevos. Para aquellas repeticiones en las que se

obtuvo larva normal en los grupos controles se estimaron los porcentajes de ploidía ocurriendo en cada grupo, analizados como en el experimento I.

En el experimento III se evaluaron 5 repeticiones, cada una formada al combinar los huevos de 3 a 4 almejas. El 'pool' se utilizó por las mismas razones ya explicadas en el experimento anterior. El objetivo principal de este experimento fue el evaluar si la inhibición del 1CP resultaba en diferencias con la inhibición del 2CP en la ploidía lograda cuando para ambos se utilizó  $0.5 \text{ mg CB L}^{-1}$ . Cada repetición se dividió en 3 grupos: control (no tratado); inhibición del 1CP; e inhibición del 2CP. El número de huevos obtenido por repetición varió de 1'145,000 a 3'284,000. Independientemente del número total de huevos por repetición, aproximadamente 10% de los mismos fueron destinados al control, 45% para inhibición del 1CP, y 45% para inhibición de 2CP. La ploidía resultante en las repeticiones que resultaron con larva normal en los controles se analizó por citometría de flujo tanto en larva-D como en algunas de las semillas logradas (repetición 2 de las que presentaron larva normal en el control). Para semilla, el análisis de citometría de flujo se hizo de acuerdo con el método de Allen (1983) y Allen y Bushek (1992), analizando cada semilla en forma individual. El número de semillas analizadas fue de 20 para el grupo control, 68 para aquellas inhibidas en 1CP, y 20 para las inhibidas en 2CP.

El experimento IV se llevó a cabo para evaluar la inducción a la tetraploidía al inhibir el 1CP en huevos de triploides, fertilizados con esperma haploide. De 144 almejas triploides, 19 fueron seleccionadas por observación macroscópica para la presencia del mayor número de huevos en la gónada. Seis de las 19 almejas desovaron. El número de huevos obtenido por almeja triploide fue de 446,000, 382,000, 536,000, 332,000, 244,000 y 526,000 para las almejas 1 a la 6, respectivamente. Los huevos se mantuvieron en forma individual. Cada

desove se dividió en dos grupos: una muestra de 1/4 del total para un control que permitiera establecer tiempos de eventos meióticos, y el resto (3/4) de los huevos de cada almeja triploide fueron tratados con 0.5 mg CB L<sup>-1</sup> siguiendo la metodología de Guo y Allen (1994) para inducir tetraploidía en ostión e introduciendo las sugerencias de Eudeline et al. (2000) para incrementar el éxito. El tratamiento de los huevos con CB se inició 5 minutos después de la fertilización, y se concluyó cuando del 50 al 70% de los huevos en el grupo control de ese desove mostraron la extrusión del 1CP. La ploidía resultante en larva-D de los 6 desoves inducidos fue analizada como en los otros experimentos. Para aquellos organismos que alcanzaron mayores tallas (preadultos) la ploidía se analizó extrayendo de 0.1 - 0.3 mL de hemolinfa con una jeringa de 1 mL del músculo aductor de cada almeja. La repetición 5 fue la única que produjo semilla y preadultos. Las células obtenidas se tiñeron con 1.5 mL de la misma solución de DAPI / detergente / DMSO ya antes mencionada durante 5 minutos, y se analizaron por citometría de flujo.

### **3. Resultados**

La inhibición de la primera división celular resultó en 100% de larva-D anormal, no viable, irrespectivo al experimento. El uso de desoves individuales en el experimento I no resultó en mayor éxito que cuando se usaron desoves mezclados en el experimento II en cuanto a la supervivencia a larva-D cuando se inhibió la 1ª DC. Así mismo, cuando se inhibió el 1CP en ovocitos de diploides el porcentaje de larva-D anormal fue de 95% a 100%, con una sola excepción en el experimento III en la cual se obtuvo solamente un 70% de larva anormal (repetición III.2). La inhibición del 2CP resultó en 50 a 100% de larva-D

anormal dependiendo de la repetición. Estas anomalías en la larva-D se manifiestan principalmente por la forma de la concha, la cual se observa con una forma redondeada mas que con la forma normal en 'D' como su nombre lo indica.

En el experimento I la supervivencia promedio a larva-D de los huevos inhibidos en la 1ª DC, relativa al control, fue de cero. En el experimento II la supervivencia promedio de los huevos inhibidos en la 1ª DC así como en el 1CP fue también de cero. En el experimento III la supervivencia promedio a larva-D, relativa al control, fue de 1.3% para aquellos inhibidos en 1CP, y de 18.3% para los inhibidos en el 2CP.

### **3.1 Ploidía estimada por citometría de flujo**

#### **3.1.1 En larva-D obtenida en los experimentos I al III:**

La ploidía obtenida en estos experimentos se resume en la tabla 1. La inhibición de la primera división celular (1ª DC) con el propósito de producir tetraploides no tuvo éxito. Al inhibir la 1ª DC las ploidías resultantes mas comunes fueron diploides y triploides, aunque en forma general, la inhibición de la 1ª DC resultó en larva hipo- y hiperploide, lo cual se evidenció por la ausencia de un pico de fluorescencia definitivo durante la citometría de flujo, especialmente cuando se compara con los resultados de citometría observados para el grupo control. La inhibición del 1CP produjo desde larva diploide hasta pentaploide, habiendo obtenido tetraploides en 3 de 5 de los desoves inducidos. Larva pentaploide fue observada únicamente cuando se inhibió el 1CP. El éxito en la producción de triploides al inhibir el 1CP fue menor que el alcanzado al inhibir el 2CP.

### 3.1.2 En semilla obtenida del experimento III:

La ploidía estimada para la semilla superviviente del tratamiento de inhibición del 1CP fue de 18% de triploides y 82% de diploides. No se detectaron tetraploides a esta edad a pesar de los que fueron detectados en larva-D. Para la semilla superviviente del tratamiento de inhibición del 2CP la ploidía fue de 80% de triploides y 20% de diploides. En el grupo control solo se detectaron diploides.

### 3.1.3 En larva-D y en la hemolinfa de los adultos producidos en el experimento IV:

La ploidía resultante al inhibir el 1CP en huevos de triploides se presenta en la tabla 2. Solamente uno de los desoves inducidos (hembra 5) produjo un alto porcentaje de tetraploides (59%), mientras que los otros desoves variaron en el éxito en la producción de tetraploides (10% a 26%). El desove de la hembra 5 produjo 6,000 larvas-D, de las cuales solamente 17 llegaron a semilla. . De esas semillas solamente 6 almejas sobrevivieron a talla de preadulto (2.5 cm). El análisis de hemolinfa por citometría de flujo de esas 6 almejas indicó que 5 eran tetraploides y una era mosaico de diploide-tetraploide. Los análisis de citometría de estas almejas se realizaron en forma repetida, separados por 8 días, encontrándose lo mismo en ambas evaluaciones.



Tabla 1. Resultados de la ploidía obtenida en los experimentos I al III para la producción de poliploides de *Argopecten ventricosus* por inhibición del primer y segundo cuerpo polar (1CP y 2CP), y primera división celular (1ª DC). Se incluye el control, y la inhibición del 2CP con fines comparativos entre este y 1CP. Cada clase de ploidía fue definida estableciendo límites (Media de esa ploidía  $\pm$  3 desv. est.).

EXPERIMENTO.REPETICIÓN Tratamiento		Porcentaje de cada clase de ploidía en larva-D			
		2N	3N	4N	5N
I.1	Control	100	0	0	0
	1ªDC	69	31	0	0
I.2	Control	100	0	0	0
	1ªDC	44	56	0	0
I.3	Control	100	0	0	0
	1ªDC	69	31	0	0
II.1	Control	100	0	0	0
	1CP	0	34	44	22
	1ªDC	43	57	0	0
II.2	Control	100	0	0	0
	1CP	38	33	0	29
	1ªDC	27	73	0	0
II.3	Control	100	0	0	0
	1ªDC	32	68	0	0
III.1	Control	100	0	0	0
	1CP	28	43	29	0
	2CP	12	88	0	0
III.2	Control	100	0	0	0
	1CP	56	19	26	0
	2CP	0	100	0	0
III.3	Control	100	0	0	0
	1CP	83	11	0	6

Tabla 2. Resultados de la ploidía obtenida en el experimento IV para inducir a la tetraploidía en *Argopecten ventricosus* por inhibición del 1CP en huevos de triploides fertilizados con espermatozoides haploides. Cada clase de ploidía fue definida estableciendo límites (Media de la ploidía  $\pm$  3 desv. est.).

Desove	Porcentaje de larva anormal	Porcentaje de ploidías observadas en larva-D			
		Haploide (1N)	Diploide (2N)	Triploide (3N)	Tetraploide (4N)
1	95	42	34	13	10
2	100	28	29	23	19
3	95	40	31	18	11
4	95	25	25	25	25
5	5	12	13	16	59
6	100	24	25	25	26

#### 4. Discusión

Nuestros resultados han demostrado que la tetraploidía puede ser inducida en la almeja catarina (*Argopecten ventricosus*) utilizando citocalacina-B para inhibir la liberación del primer cuerpo polar en huevos de almejas diploides y triploides. Sin embargo, en acuerdo con los estudios previos desarrollados en otras especies, los tetraploides producidos al inhibir el primer cuerpo polar (1CP) en diploides no alcanzan a sobrevivir hasta la talla de semilla o adulto, mientras que los producidos por la inhibición del 1CP en huevos de triploides son viables hasta tallas adultas. La tecnología para la producción de moluscos tetraploides utilizando este último método fue desarrollada por Guo y Allen (1994) para el ostión Japonés (*Crassostrea gigas*), y ha sido demostrada como factible para lograr la producción de larva tetraploide también en otra especie, la ostra perlera, *Pinctada martensii* (He et al., 2000). Con el presente estudio esta tecnología ha sido demostrada como factible

en tres especies de moluscos. Esta tecnología permitirá eliminar la dependencia de métodos de inducción (química o física) a la triploidía, permitiendo la conformación de los denominados ‘triploides biológicos’ de almeja catarina así como se ha logrado para el ostión japonés (Guo et al. 1996), eliminando dos factores de riesgo durante la producción de triploides: alta mortandad por la inducción, y bajo éxito en el porcentaje de triploides logrados.

La ocurrencia de tetraploides cuando se inhibe el 1CP con fines de producir triploides (ver introducción) se considera un evento azaroso, y por lo tanto la ocurrencia del mismo no se espera en todas las inhibiciones del 1CP. Mayores estudios a nivel citológico y cromosómico son necesarios para entender este fenómeno. Por otro lado, las variaciones en ploidía observadas entre repeticiones en los diferentes experimentos cuando se inhibió el 1CP en ovocitos de diploides, pueden ser explicadas como un posible efecto de diferencias en tasas meióticas de los ovocitos utilizados entre repeticiones. El éxito en la inhibición de eventos meióticos depende de sincronización en el desarrollo de los huevos, la cual depende a su vez de la calidad de los gametos (Gerard et al. 1999). Esto es, se sabe que la tasa meiótica es afectada por la condición de madurez del ovocito utilizado, observándose una asincronía en eventos meióticos entre ovocitos incluso cuando son del mismo origen pero el método de obtención entre hembras varía (Coates y Supan, 2000). La importancia de la calidad del huevo en las inducciones a la poliploidía fue primero denotada por Utting y Doyou (1992), quienes demostraron que la existencia de variación en calidad de huevo de la almeja Manila *Ruditapes philippinarum* podía afectar el éxito a la triploidía, y que esto es causado por una falta de sincronía en las tasas meióticas.

En relación a la falta de éxito en la producción de tetraploides directamente de diploides, esta ha sido reportada para diferentes especies, como *Ruditapes philippinarum* (Diter y Duffy, 1990), *Crassostrea gigas* (Guo 1991 citado por Guo y Allen, 1994; Guo et al., 1994), *Chlamys azumapekten* (Yang et al., 1997). Guo (1991, citado por Guo y Allen, 1994) propuso que la causa para la inviabilidad de tetraploides producidos directamente de huevos de diploides puede estar asociada con el tamaño del huevo y las reservas energéticas existentes para el desarrollo y multiplicación de un cigoto diploide en comparación con un tetraploide, así como también el tamaño del núcleo que no es capaz de permitir la alineación correcta del doble de cromosomas durante la metafase. Esto podría explicar los resultados observados cuando se inhibió la 1ª DC con fines de producir tetraploides, en donde se observó un desarrollo de larvas anormales que en su mayor parte no alcanzaron la talla de semilla. En contraste, cuando se inhibió el 1 CP en huevos de triploides los organismos tetraploides producidos si fueron viables, aunque en números reducidos. El tamaño del ovocito de un diploide vs. un triploide de la almeja catarina ha sido previamente documentado para esta especie (Ruiz-Verdugo et al., 2001). El diploide presenta un diámetro de ovocito de aproximadamente 38um, mientras que el diámetro del ovocito del triploide es mayor, de 43um. Estas diferencias se traducen en que el ovocito del triploide tiene 55% más de volumen que el de un diploide, lo cual posiblemente resulta en una mayor cantidad de reservas energéticas. Aun más, el tamaño del núcleo de un ovocito de triploide es 109% mayor que el de un diploide, lo cual permitiría la alineación de todos los cromosomas durante la metafase.

En conclusión, nuestros resultados reafirman las observaciones previas de otros autores acerca de la producción de tetraploides en moluscos, que no es factible a partir de diploides,

así como también corroboran la factibilidad de la metodología desarrollada por Guo y Allen (1994) para la producción de tetraploides a partir de triploides, indicando con ello que los esfuerzos futuros dirigidos a la producción de tetraploides en moluscos sean centrados en esa metodología.

### **Agradecimientos**

Esta investigación fue apoyada por CONACYT, proyecto 28256-B a A.M. Ibarra. Agradecemos el apoyo de la Ing. Ac. Susana Ávila en los análisis de citometría de flujo, y el apoyo técnico de Gabriel González y Juan M. Macliz durante el cultivo larvario. El primer autor es estudiante de doctorado, becado por CONACYT y SEP (DECYTM), y los resultados presentados son parte de su tesis.

### **Referencias**

- Allen, S. K. Jr. and Bushek, D. (1992). Large scale production of triploid *Crassostrea virginica* (Gmelin) using “stripped” gametes. *Aquaculture* 103: 241-251
- Allen, S.K., Jr. and Downing, S.L. (1986). Performance of triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg). I. Survival, growth, glycogen content, and sexual maturation in yearlings. *J. Exp. Mar. Biol. & Ecol.* 102: 197-208
- Allen, S. K. Jr., Downing, S. L. and Chew, K. K. (1989). Hatchery manual for producing triploid oyster. University of Washington Press, 27 pp.
- Allen, S.K., Jr., Shpigel, M., Utting, S. and Spencer, B. (1994). Incidental production of tetraploid Manila clams, *Tapes Philippinarum* (Addams and Reeve). *Aquaculture* 128:13-19.
- Cai, G. and Beaumont, R. (1996). Tetraploid induction in the mussel *Mytilus edulis* by application of 6-dimethylaminopurine (6-DMAP) during early development. *Tropic Oceanology/Redai Haiyang.* 15: 26-30.
- Coates, G.M. and Supan, J.E. (2000). Potential triploid production of oysters using second metaphase oocytes. *J. Shellfish Res.* 19(1): 662
- Cooper, K. and Guo, X. (1989). Polyploid Pacific oyster produced by inhibiting polar body I and II with cytochalasin B. *J. Shellfish Res.* 8(2): 412 Abstract only.
- Diter, A. and Dufy, C. (1990). Polyploidy in the Manila clam *Ruditapes Philippinarum* II. Chemical induction of tetraploid embryos. *Aquat. Living Resour.* 3:107-112.

- Eudeline, B., Allen, S. K., Jr. and Guo, X. (2000). Optimization of tetraploid induction in pacific oysters, *Crassostrea gigas*, using first polar body as a natural indicator. *Aquaculture* 187:73-84.
- Gardner, E. J., Simmons, M. J. and Snustad, D. P. (1998). *Principios de genetica*, 4<sup>th</sup> ed. Noriega-Utea editors, Mexico, D.F. 649 pp.
- Gendreau, S. and Grizel, H. (1990). Induced triploidy and tetraploidy in the European flat oyster *Ostrea edulis* L. *Aquaculture* 90: 229-238.
- Gérard, A., Ledu, C., Phélipot, P. and Naciri-Graven, Y. (1999). The induction of MI and MII triploids in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* with 6-DMAP or CB. *Aquaculture* 174: 229-242.
- Guo, X. and Allen, S. K. Jr. (1994). Viable tetraploids in the pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg) produced by inhibiting polar body 1 in eggs from triploids. *Mol. Mar. Biol. Biotech.* 3: 42-50.
- Guo, X., Cooper, K., Hershberger, W. and Chew, K. (1992). Genetic consequences of blocking polar body I with cytochalasin B in fertilized eggs of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*: I Ploidy of resultant embryos. *Biol. Bull.* 183: 381-386.
- Guo, X., DeBrosse, G.A., Allen, S.K., Jr. (1996). All-triploid Pacific oysters (*Crassostrea gigas* Thunberg) produced by mating tetraploids and diploids. *Aquaculture* 142: 149-161.
- Guo, X., Hershberger, W. K., Cooper, K. and Chew, K. K. (1994). Tetraploid induction with mitosis I inhibition and cell fusion in the Pacific Oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg). *J. Shellfish Res.* 13(1): 193-198.
- He, M., Lin, Y., Shen, Q., Hu, J. and Jiang, W. (2000). Production of tetraploid pearl oyster (*Pinctada martensii* Dunker) by inhibiting the first polar body in eggs from triploids. *J. Shellfish Res.* 19: 147-151.
- Klug, W. S. and Cummings, M.R. (1996). *Essentials of genetics*, 2<sup>nd</sup> ed. Prentice hall. New Jersey, USA. 559 pp.
- Norstog, K. and Long, R. W. (1976). *Plant biology*. W. B. Saunders company. Philadelphia, Pa. 585 pp.
- Ramirez, J. L., Avila, S. and Ibarra, A. M. (1999). Optimization of forage in two food-filtering organisms with the use of a continuous, low-food concentration, agricultural drip system. *Aquacult. Eng.* 20: 175-189.
- Ruíz-Verdugo, C.A., Allen Jr. S.K. and Ibarra, A. M. (2001). Family differences in success of triploid induction and effects of triploidy on fecundity of catarina scallop (*Argopecten ventricosus*). *Aquaculture* 201: 19-33.
- Ruíz-Verdugo, C.A., Ramírez, J.L., Allen Jr., S.K. and Ibarra, A.M. (2000). Triploid catarina scallop (*Argopecten ventricosus* Sowerby II, 1842): growth, gametogénesis, and suppression of functional hermaphroditism. *Aquaculture* 186: 13-32.
- Sastry, A.N. (1963). Reproduction of the Bay scallop, *Aequipecten irradians* Lamarck. Influence of temperature on maturation and spawning. *Biol. Bull.* 125: 146-153
- Scarpa, J., Wada, K. T. and Komaru, A. (1993). Induction of tetraploidy in mussels by suppression of polar body formation. *Nippon Suisan Gakkaishi* 59: 2017-2023.
- Stephens, L.B. and Downing, S. L. (1988). Inhibiting first polar body formation in *Crassostrea gigas* produces tetraploids, not meiotic I triploids. *J. Shellfish Res.* 7: 550-551.

- Tamarin, R. H. (1999). Principles of genetics, 6<sup>th</sup> ed. WCB McGraw-Hill. New York, USA. 686 pp.
- Utting, S.D. and Doyou, J. (1992). The increased utilization of egg lipid reserves following induction of triploidy in the Manila clam (*Tapes philippinarum*). *Aquaculture* 103: 17-28.
- Yang, H., Wang, R., Guo, X. and Yu, Y. (1997). Tetraploid induction with cytochalasin B treatment in scallop *Chlamys azumapekten* F. 11<sup>th</sup> International Pectinid Workshop, La Paz, B.C.S., Mexico. 10-15 April 1997. Book of abstract 187-188.
- Yang, H., Zhang, F. and Guo, X. (2000). Triploid and tetraploid zhikong scallop, *Chlamys farreri* Jones et Preston, produced by inhibiting polar body I. *Mar. Biotechnol.* 2: 466-475.
- Zhang, G., Wang, Z., Chang, Y., Song, J., Ding, J., Zhao, S. and Guo, X. (2000). Tetraploid induction in the Pacific abalone *Haliotis discus hannai* Ino with 6-DMAP and CB. *J. Shellfish Res.* 19: 540-541.

## CAPÍTULO III

**EVALUACIÓN DE LA INDUCCIÓN A LA  
TRIPLOIDÍA EN ALMEJA MANO DE LEÓN  
(*Nodipecten subnodosus* Sowerby, 1835) Y SUS  
EFECTOS SOBRE EL CRECIMIENTO Y  
GAMETOGENESIS.**



**ALMEJA MANO DE LEÓN TRIPLOIDE (*Nodipecten subnodosus*);  
CRECIMIENTO, GAMETOGÉNESIS, Y FRECUENCIA DE CÉLULAS  
GAMÉTICAS, CUANDO FUE CULTIVADA EN U SITIO DE ALTA  
DISPONIBILIDAD DE ALIMENTO.**

**ARTÍCULO (Sometido)**

Maldonado-Amparo R., J.L. Ramírez, S. Avila and A.M. Ibarra. Triploid lion-paw scallops (*Nodipecten subnodosus*); growth, gametogenesis, and gametic cell frequencies, when grown at a high food availability site. *Aquaculture*, 2003

**Triploid lion-paw scallop (*Nodipecten subnodosus* Sowerby); growth, gametogenesis,  
and gametic cell frequencies when grown at a high food availability site.**

Rosalío Maldonado-Amparo, José L. Ramírez, Susana Ávila, Ana M. Ibarra\*

Aquacultural Genetics Lab., Aquaculture Program  
CIBNOR, S.C.  
A.P. 128, La Paz B.C.S. 23000  
México

\*Corresponding author A.M. Ibarra: [aibarra@cibnor.mx](mailto:aibarra@cibnor.mx)

Short running title: Triploid lion-paw scallop

**Abstract**

Triploidy was induced in lion-paw scallop, *Nodipecten subnodosus* evaluating different cytochalasin-B (CB) concentrations for treatment of eggs. Concentrations of 0.75 mg/l and 1.0 mg/l were those with the largest triploid success (87% & 95%, respectively). Gametogenesis, and shell and weight traits were evaluated during a grow-out period of 21 months, comparing triploids, treated diploids, and control diploids. Growth of triploids was not superior to either diploid group, and only adductor muscle index was larger in triploids when compared with both diploid groups. Lack of triploid growth advantage occurred in spite of triploids being unable to mature and form gametes, showing a sterility of 95% to 99% when compared with diploids. Analyses of frequencies of gametic cell types indicated that the arrest of oogenesis was at the previtellogenic oocyte stage, or before the diplotene stage of meiosis I. The lack of triploid growth advantage may be related to the reproductive strategy in this species at this site, where energy for maturation is not derived from stored resources but rather from newly ingested food, largely abundant at this site. Possible additional negative effects of high primary productivity at the evaluation site may occur on triploids.

*Keywords:* triploid-growth, meiosis-arrest, sterility, muscle-index, reproductive-energy.

Lion-paw scallop, *Nodipecten subnodosus*.

## 1. Introduction

Research on triploid aquatic organisms in the last two decades has increased worldwide, mostly because triploids reportedly have better growth characteristics than diploids. Triploidy in mollusks has been induced by physical shock or chemical treatment in multiple species.

The most common characteristic of triploid mollusks is a poor gonad development resulting from partial sterility (Guo and Allen, 1994a; 1994b; 1997; Utting et al., 1996; Ruiz-Verdugo et al., 2000, 2001) or total sterility (Allen et al., 1986; Komaru and Wada, 1989; Kiyomoto et al., 1996), caused by irregular synapses of chromosomes during early stages of meiosis. The resulting sterility is important as it can be the main cause of larger growth rates, better meat quality, larger adductor muscle, and better taste (Tabarini, 1984; Allen and Downing, 1986; Komaru and Wada, 1989; Allen and Downing, 1990; Beaumont and Fairbrother, 1991; Ruiz-Verdugo et al., 2000; Yang et al., 2000).

The lion-paw scallop *Nodipecten subnodosus* (Sowerby 1835), a species commercially exploited through fisheries for decades in the Peninsula of Baja California, Mexico (Baqueiros et al., 1982), has recently been included among potential species for aquaculture development (Reyes-Sosa, 1990; Garcia-Dominguez et al., 1992; Felix-Pico et al., 1999; Maeda-Martinez et al., 2001). However, little research has been carried out on this potentially valuable species. In the present work, we report on the induction of triploidy in the lion-paw scallop, its effects on growth and on the gametogenic process, including an evaluation of gametic development at specific times during the gametogenic process. The aim of the research was to clarify if this biotechnology could be advantageously applied in the culture of this species.

## 2. Material and Methods

### 2.1 Scallops (origin, number, maturation conditioning, spawning induction)

Twenty wild lion-paw scallops were collected from Laguna Manuela in Baja California Sur, and brought to CIBNOR at La Paz for maturation conditioning. Scallops were kept at 20 °C in two 1,000-L tanks, and fed continuously (30% *Isochrysis galbana*, 40% *Chaetoceros calcitrans*, and 30% *Pavlova lutheri*) at a concentration of  $4 \times 10^9$  cells/day/scallop. After 24 days, they were induced to spawn by alternating cold (16 °C) and heat (25 °C) shocks. The eggs spawned from each of three scallops were individually kept in a 20-L bucket at 20 °C, counted, fertilized with sperm from a single unrelated male, and each set was divided into 4 equal groups: one untreated control and three for triploid induction with different concentrations of CB. The total number of eggs obtained for each of the three spawns was  $17.2 \times 10^6$ ,  $18.8 \times 10^6$ , and  $25.6 \times 10^6$ .

### 2.2 Triploid induction and ploidy evaluation

Three CB concentrations were evaluated to establish optimum dosage in this species; 0.5 mg CB/l, 0.75 mg CB/l, and 1 mg CB/l. Each egg batch was induced separately following Eudeline et al. (2000) recommendations for optimisation of individual timing of meiotic events. Regardless of egg batch or CB concentration, all eggs were first treated when 50% of first polar bodies were extruded in the control group of each of the three egg batches, finishing the treatment when 50% (from the control group) had shown extrusion of the second polar body.

The ploidy in each set and CB concentration was analysed by flow cytometry (PARTEC Ploidy Analyzer, Germany) of three developmental stages; 1d-old D-larvae,

pediveliger larvae, and spat stages. The flow cytometry methodology was as described by Allen (1983), with modifications as in Allen and Bushek (1992). In short, approximately 500 D-larvae and 100 pediveliger larvae per set and treatment were concentrated in a 1-ml suspension, centrifuged, and the pellet was stained with 0.5 ml of a DAPI / detergent / DMSO solution (see Allen and Bushek, 1992). To release the tissue, larvae and spat were disaggregated as in Allen and Bushek (1992) by means of crushing the meat/shell with a glass rod. A mixed sample of 30 spats from each set and treatment group were used to estimate ploidy. The obtained cell suspensions were passed through a 30  $\mu$ m screen, adding 1.5 ml of the DAPI / detergent / DMSO solution before flow cytometry assay.

### 2.3 Larvae rearing

Each treatment group ( $n = 4$ ) for each female ( $n = 3$ ) was grown individually in 50L conical tanks. Stocking density was 12 D-larvae / ml, which was adjusted at the pediveliger larval stage to a maximum of 2 larvae / ml. Feeding from D-larvae to pediveliger stage consisted of a microalgae mixture (1 : 1 *Isochrysis galbana* : *Pavlova lutheri*), increasing the concentration from 30,000 cells/ml to 80,000 cells/ml as age increased. After adding a substrate for settling in the rearing tanks, feeding consisted of a mixture of *Isochrysis galbana* (40%), *Pavlova lutheri* (40%), and *Chaetoceros calcitrans* (20%). Water temperature was 20 °C and salinity 36 psu (practical salinity units).

Survival was estimated for D-larvae, pediveliger larvae, and spat by counting three samples from each tank, and obtaining a mean per tank. For D-larvae and pediveliger larvae, three 1 ml samples were counted and the mean number extrapolated to 14 l. For spat, three 1 ml 'dry' samples were counted, and the mean number extrapolated to total

volume of spats. Survival was estimated as the proportion of surviving larvae at each stage given the total number of larvae in the previous stage. For D-larvae, it was estimated as the ratio between number of D-larvae and total number of eggs used for each replicate.

#### 2.4 Grow-out

For growth evaluations the spat obtained in the treatments 0.75 and 1 mg CB / ml were used; spat from all three spawns were pooled, and 6 sub-replicates were analysed from this pool. The pooled or weighted mean (Zar, 1999) percentage of triploids in these combined groups was 60%. Spat from the 0.5 mg/L CB concentration had a low percentage of triploids (14%), and therefore were not kept for further evaluation. For the control group, spat from all three spawns was also pooled, and 4 sub-replicates were formed. Unexplained lower survival in the control groups during the first 3 months of spat grow-out (before the grow-out evaluations were initiated) did not allow for the use of the same number of replicates compared to the treated group.

All groups were grown at Bahía Magdalena, a bay located in the southern part of the Baja California Peninsula, on the Pacific Ocean side. Each replicate was initially composed of by 250 individuals, each grown in Nestier trays (56 x 56 x 5 cm) during 4-mo, and changed to larger trays (75 x 50 x 10 cm) with wider mesh opening (3 cm) for the remainder of the grow-out period of 16 months. Sampling of 5 to 11 individuals monthly decreased density in each replicate. Shell length, shell height, shell width, total weight, tissue weight, muscle weight, gonad weight, remaining tissue weight (digestive gland and mantle), and indices for gonad and muscle (gonad or muscle weight / total tissue weight X 100) were evaluated from May 2001 to December 2002.

By the last sampling, there were 30 scallops per tray on average.

Analysis of ploidy was done on a piece of mantle (1 mm<sup>2</sup>). During biometric analyses each scallop mantle was sampled and frozen dry at -80 °C for up to one week. For cytometry assays the mantle was placed in a petri dish, adding 1 ml of the DAPI / detergent / DMSO solution, and cutting repeatedly with a scalpel to disaggregate cells. Cell suspensions were passed through a 30 µm screen, adding 1.5 ml of the DAPI / detergent / DMSO solution before flow cytometry assay.

#### 2.4.1 Histology

Monthly samples of 5 gonads from each replicate within each control and treated groups were fixed in Davidson's solution, and preserved in 70% alcohol. Cytometry analyses to establish their ploidy were done on each as explained before. Tissues were processed by conventional histology, and stained with eosin-haematoxylin. Gametogenic stages were determined, based on Villalejo-Fuerte and Ochoa (1993) scale for diploid catarina scallop (*Argopecten ventricosus*), modified by Ruiz-Verdugo et al. (2000) for the same species. The same scale was used for both control and treated groups. Seven stages, characterized by the amount of connective tissue and gametogenic cells development, are included: 0 = undetermined (abundant connective tissue, 14 acini per mm<sup>2</sup>, acini diameter 100 µm, scarce germinal cells, and no residual gametes); I = beginning of gametogenesis (abundant connective tissue between acini, evident gametogenic cell development, 5.3 acini per mm<sup>2</sup>, acini diameter 200 µm, spermatocytes are predominant in male acini and previtellogenic oocytes in female acini); II = advanced gametogenesis (scarce connective tissue inter-acini, 2.6 acini per mm<sup>2</sup>, acini diameter 200 µm, vitellogenic oocytes



predominate in female acini, and abundant spermatocytes in the male acini periphery, with spermatids and spermatozoa at the acini centre); III = maturity (no connective tissue visible, acini diameter 280  $\mu\text{m}$ , female acini with mature oocytes, and male acini with spermatids and spermatozoa in a centripetal pattern –directed toward the centre-); IV = spawned (connective tissue scarce and disperse, 2 acini per  $\text{mm}^2$ , partially empty, acini diameter 150  $\mu\text{m}$ , female acini show mature oocytes at centre and vitellogenic oocytes toward the periphery, and male acini with spermatozoa centrally located and with evident spaces indicating spawning); V = post-spawned (abundant inter-acini connective tissue, 3.6 acini per  $\text{mm}^2$ , acini diameter 100  $\mu\text{m}$ , residual and isolated oocytes and spermatozoa, and haemocytes present); VI = inactive (abundant connective inter-acini tissue, 2.0 acini per  $\text{mm}^2$ , acini diameter 150  $\mu\text{m}$ , with no gametogenic development in acini, and occasionally some residual gametes present).

#### 2.4.2 Frequencies of gametic cell types

Gonad samples derived from four of the samplings during the 21-mo (April 2001 to December 2002) evaluation period were used for this analysis. Two months in which inactive gametogenic activity was seen were chosen, one during the early life cycle at 1 month of grow-out in the field (April 2001), and a second one in between the first and second maturation peaks (January 2002). Another two samples during months in which the peak of maturation was observed were also evaluated, one during the first maturation peak (August 2001), and another during the second maturation peak (August 2002). During each of those months, the number of each gametic cell type in 10 acini of both the male and female gonads, were counted in 10 individuals of each ploidy class (diploids from the

control group and triploids certified by flow cytometry as such). Image analysis (SigmaScan Pro 5) of microphotographs taken with a CoolSNAP-Pro colour camera, connected to a computer and captured with an Olympus BX41 microscope were used for the quantification of gametic cell types.

Gametic cells were identified based on descriptions for *Pecten maximus* and *Argopecten ventricosus* (Dorange and LePennec, 1989a, 1989b; Saout, 2000; Maldonado-Amparo and Ibarra, 2002a; 2002b). The gametic cell types counted in males were spermatogonia, spermatocytes (indistinguishable between primary and secondary), spermatids, and spermatozoa. In females gametic cell types counted were oogonia, previtellogenic, vitellogenic, and postvitellogenic oocytes.

## 2.5 Statistical analyses

Significance was established at  $P < 0.05$  for all analyses.

### 2.5.1 Larval survival and ploidy at different ages

A two factor, fixed ANOVA's was used to test for the main effects of CB concentration (4 levels: 0, 0.5, 0.75, 1.0 mg CB l<sup>-1</sup>) and larval stage (D-larvae, pediveliger larvae, spat) on both, survival and ploidy. Treatment means of survival and ploidy were compared using Tukey tests.

### 2.5.2 Growth, survival, and percent triploidy in the field

The grow-out data (shell length, shell height, shell width, total weight, tissue weight, muscle weight, gonad weight, and remaining tissue weight –digestive gland and mantle) was analysed for those months when 11 individuals could be sampled; i.e. May, June,

August, October, and December for 2001, and February, April, June, July, August, October, and December for 2002. As the true ploidy condition of each individual was known, three treatment groups were considered for the analyses of growth: triploid, diploid-control, and diploid-treated. This last group contained all individuals that were within the treated group but which were diploids. A multivariate fixed ANOVA was used to establish the effect of ploidy (diploid-control, diploid-treated, and triploid), age, and the interaction of age and ploidy on the growth traits. The mean of each replicate was used as the observational data in the analyses. Differences between the three groups for size and weight traits were tested with contrasts of least square means.

For survival during grow-out, a two factor (treatment and age) fixed ANOVA was used. Survival could only be evaluated by separating treated scallops (containing 2n and 3n) from untreated (2n controls). Survival was transformed to arcsine before analysis.

The triploidy percent per month was evaluated with a single factor ANOVA to establish if the number of triploids decreased during the grow-out period. Ploidy percentages per replicate of the treated group were transformed to arcsine before analysis.

### 2.5.3 Frequencies of gametic cell types

A multivariate ANOVA was used for the analysis of gametic cell frequencies. A mixed model was used to test for the fixed effects of age, ploidy, their interaction, and for the random effect of organism (scallop) within sampling age by ploidy group. Means were compared using Tukey tests.

## **3. Results**

### 3.1 Larval survival and triploidy

Both factors, CB concentration and larval stage of evaluation, but not their interaction, had a significant effect ( $P < 0.001$ ) on the two dependent variables evaluated, survival and triploidy. Each is presented separately.

### 3.1.1 Larval Survival

Regardless of larval stage, the effect of CB concentration on survival was significant, with survival of the control (35.9%) and the 0.5 mg CB/l group (28.6%) not significantly different. Survival of the 0.75 mg CB/l group (22.1%) was intermediate and not significantly different from survival of either, the control, the 0.5 mg CB/l or the 1 mg CB/l groups (11.6%), although survival of the latter was significantly less than in the control and the 0.5 mg CB/l group (Fig. 1a – concentrations). The effect of larval stage on survival was significant regardless of CB concentration, with the highest survival for D-larvae (60.9%), significantly different from survival of pediveliger larvae (9.9%) and spat (9.7%), these last two being not significantly different from each other (Fig. 1a – stages). Treatment means survival for each CB concentration and stage are also presented in Figure 1a.

### 3.1.2 Ploidy Success

Regardless of larval stage no triploids were observed in the control group, thus resulting in significant differences between the control and all other treatments. Triploid success was the highest for 1 mg CB/l (95.4%) and 0.75 mg CB/l (87.1%), followed by 0.5 mg CB/l (48%), which differed significantly from the control and the 0.75 mg CB/l and 1 mg CB/l treatments (Fig. 1b - concentrations). When larval stages were compared for ploidy level, it was evident that there was a significant decrease in the percent of triploids observed at spat stage (32.4%) when compared to that observed for pediveliger (55.1%) or D-larvae (68.6%), the last two being not significantly different (Fig. 1b – stages).

Treatment means percent of triploids for each treatment and stage are presented in Figure 1b.

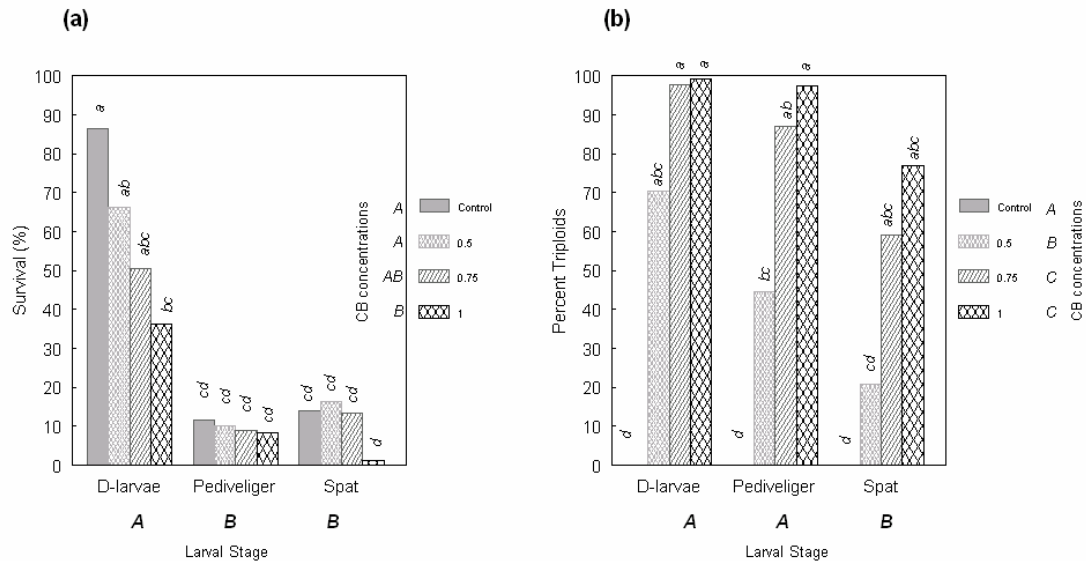


Fig. 1 Percent survival (a) and triploid success (b) (arcsine transformed) observed for the untreated control and different CB concentrations (0.5, 0.75, 1.0 mg/l) in D-larvae, pediveliger, and spat stages of *Nodipecten subnodosus*. Different capital letters indicate differences between CB concentrations or differences between larval stages (bold). Different small letters indicate differences between treatments.

### 3.2 Survival, growth, and percent triploidy during grow-out

#### 3.2.1 Survival

The only significant effect on survival was age ( $P < 0.001$ ). Scallops within the treated group had an average monthly survival of 97%, which did not differ significantly from the control group (98%). Regardless of group, the lowest survivals were seen after transfer

from the laboratory to the field during the second month (95%), and at the end of the experimental period in August (90%) to October (87%) of 2002.

### 3.2.2 Growth

There was no advantage in growth for triploids when compared with diploids from control or treated groups. Means for shell sizes, weights, and indices at each month for the 20 months period of grow-out are shown in Figure 2. The analysis of grow-out, that is, considering age and ploidy, indicated that there were significant effects of both factors for all traits evaluated, and that there was a significant interaction between ploidy and age for weight traits and indices. Triploids had significantly smaller sizes and weights ( $P < 0.01$ ) than either of the diploid groups. The interaction was the result of different increases in growth rates or indices in the different ploidy groups. For example, the interaction for weight traits was caused by a lower growth rate of triploids than either of the diploid groups (treated and controls), and the interaction for indices was caused by the larger increase in muscle index for triploids from June to October of 2002, and the lack of an increase in gonad index for triploids during the two maturation peaks (Fig. 2).

Mean comparisons of groups at the end of the grow-out period (Dec 2002) indicated that diploids from the treated group had significantly larger shell length, shell height, shell width, total weight, gonad weight, and remaining of tissue weight than triploids and diploids from the control group, although there were no differences between the ploidy groups for tissue weight and adductor muscle weight (Table 1). Gonad index of triploids was significantly smaller than either diploid group, and muscle index was significantly larger than either diploid group.

### 3.2.3 Percent Triploids

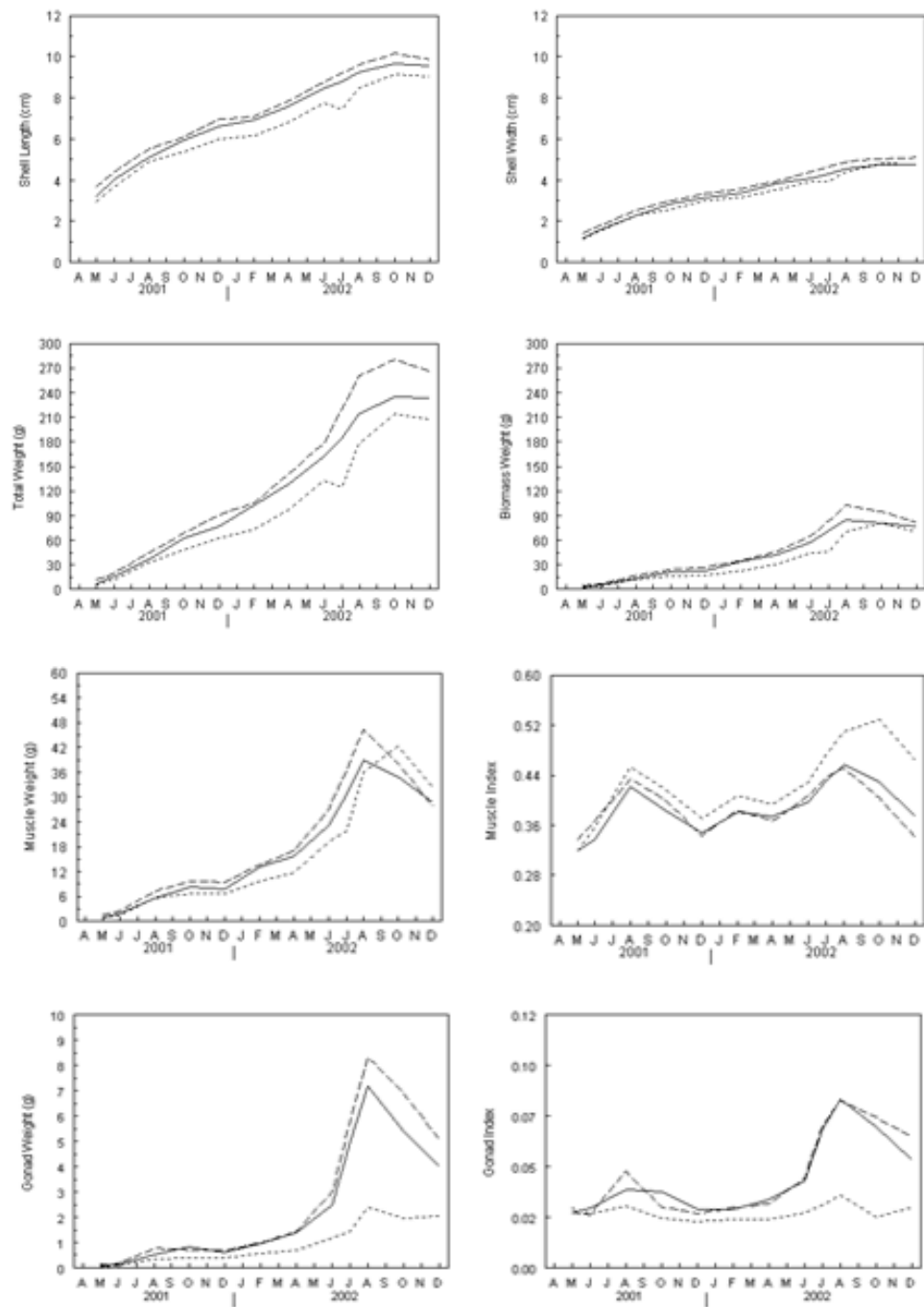


Fig. 2 Growth in shell length, shell width, total weight, tissue weight, adductor muscle weight, gonad weight, and muscle and gonad indices for triploids (continuous line), treated diploids (dashed line), and diploid controls (dotted line) of *Nodipecten subnodosus* during the experimental period of 21 mo. Means of 3 replicates ( $n=11$ ) per group, per month (May, June, August, October, and December for 2001, and February, April, June, July, August, October, and December for 2002).

Table 1. Size, weight, and index means at 21 months of age for all growth traits evaluated in *Nodipecten subnodosus* triploids, diploids from control group, and diploids within treated group.

Growth traits:	Ploidy Groups		
	Triploid	Diploid (Control)	Diploid (Treated)
Shell length (cm)	9.05 <sup>a</sup>	9.56 <sup>a</sup>	9.87 <sup>b</sup>
Shell height (cm)	9.10 <sup>a</sup>	9.48 <sup>a</sup>	9.78 <sup>b</sup>
Shell width (cm)	4.75 <sup>a</sup>	4.76 <sup>a</sup>	5.11 <sup>b</sup>
Total weight (g)	207.37 <sup>a</sup>	234.00 <sup>a</sup>	265.80 <sup>b</sup>
Tissue weight (g)	70.00 <sup>a</sup>	77.31 <sup>a</sup>	81.99 <sup>a</sup>
Adductor muscle weight (g)	32.63 <sup>a</sup>	28.89 <sup>a</sup>	27.88 <sup>a</sup>
Gonad weight (g)	2.04 <sup>a</sup>	4.02 <sup>a</sup>	5.08 <sup>b</sup>
Rest of Tissue weight (g)	26.33 <sup>a</sup>	32.84 <sup>a</sup>	35.60 <sup>b</sup>
Gonad Index (%)	2.86 <sup>a</sup>	5.13 <sup>b</sup>	6.19 <sup>c</sup>
Muscle Index (%)	46.37 <sup>a</sup>	37.38 <sup>b</sup>	34.03 <sup>c</sup>

Different letters within lines indicate significant differences between groups at the established level.

There were significant differences in the percent of triploids sampled each month, which resulted in a significant effect of age on percent triploidy. However, because there was no consistent decrease in triploidy percentage during the grow-out period ( $P > 0.05$ ), the differences were caused most probably by random sampling.

### 3.3 Gametogenesis

Gametogenesis in diploid scallops within the control group (Fig. 3) indicated a normal development in this hermaphrodite species through the 21 months of evaluation, with two maturation peaks regardless of whether it was the male or female gonad part. The first peak occurred between August and December 2001, and the second from July to December 2002. In contrast to gametogenesis in diploids, for which two distinctive maturation and



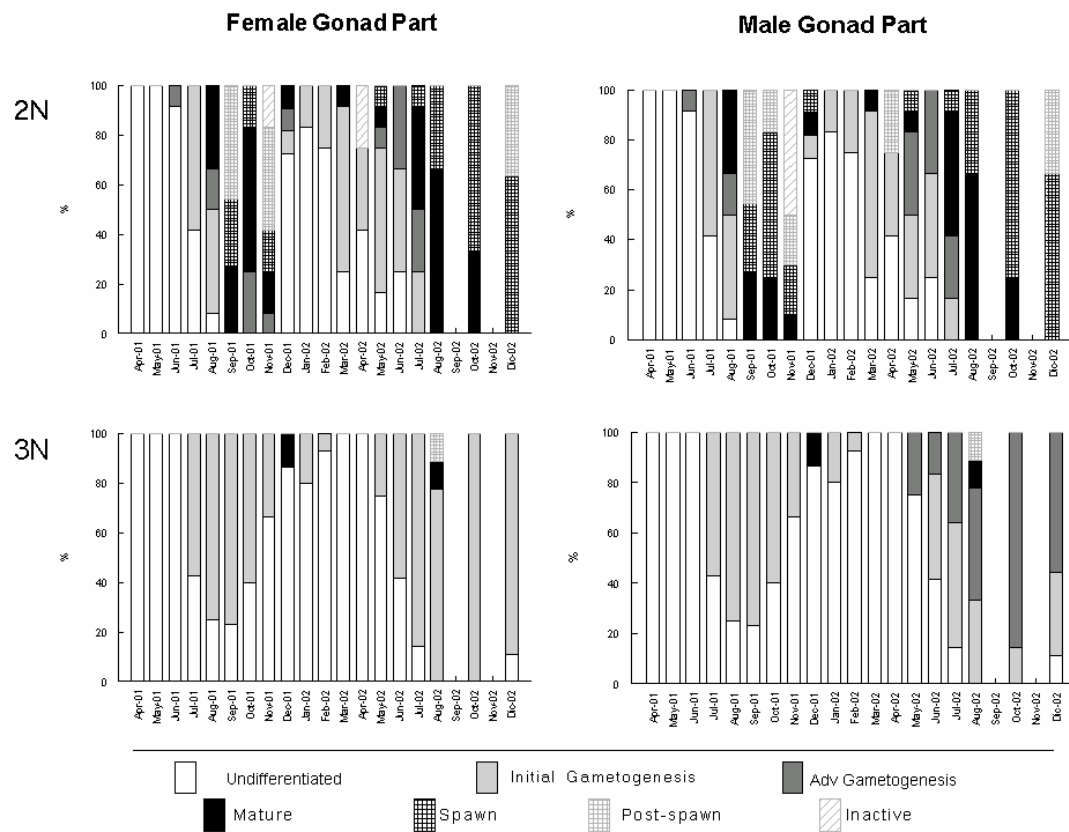


Fig. 3 Gametogenesis processes in the female and male gonad parts of diploid and triploid *Nodipecten subnodosus* during a 21 mo grow-out period. Monthly samples of 5 gonads from each replicate within each control and treated groups were observed.

spawning peaks were seen, gametogenesis in triploids was arrested at the initial stages of development, with only 11-13% of triploid scallops reaching maturity by December 2001 and August 2002 regardless of gonad part (Fig. 3). This occurred despite the fact that gametogenesis in triploids for both male and female gonad parts started at the same time as the first maturation peak (July 2001) in diploids. (Fig. 4A, 4B and 5A, 5B). Diploids had already some spermatozoa at this early age (Fig. 5A) whereas none was seen in triploids (Fig. 5B). By September 2001 diploid scallops showed advanced stages of maturation in both gonads (Fig. 4C, 5C), but triploids had mostly previtellogenic oocytes and with no clear array, few spermatocytes, and evidence of reabsorption by vacuolated cells (vc) spermatocytes in their female and male acini, respectively. By December 2001, diploids

had spawned but no evidence of spawning was seen in triploids (Fig. 4E and 4F). In the

male part of the gonad of triploids some reabsorption appeared to be taking place, evidenced by vacuolated cells in the male acini (Fig. 5F).

One year later, at the second maturation peak, large differences were again evident for diploid and triploid scallops in their acini contents (not shown). In July 2002, diploid scallops had previtellogenic and vitellogenic oocytes present in the female gonad part, and spermatocytes and spermatids, whereas triploids had mostly empty female acini (Fig. 6A), and much fewer spermatocytes in the male acini (Fig. 6B). By September 2002, diploid scallops had female acini full of vitellogenic and postvitellogenic oocytes and male acini had stages up to spermatozoa. Triploid female scallops at this same age had mostly previtellogenic oocytes, few vitellogenic, and no apparent postvitellogenic oocytes, and male triploid scallops had as the most advanced stage spermatocytes, with little evidence of spermatids or spermatozoa. At the last sampling, December 2002, diploid scallops showed evidence of having spawn, with some remaining postvitellogenic oocytes still present in the female acini and the classical centripetal array in the male acini. In triploids, female acini were invaded by haemocytes (Fig. 6C), although at the periphery of the acini there were a few previtellogenic and vitellogenic oocytes. In the male acini there were abundant spermatocytes and no clear array or centripetal pattern (Fig. 6D).

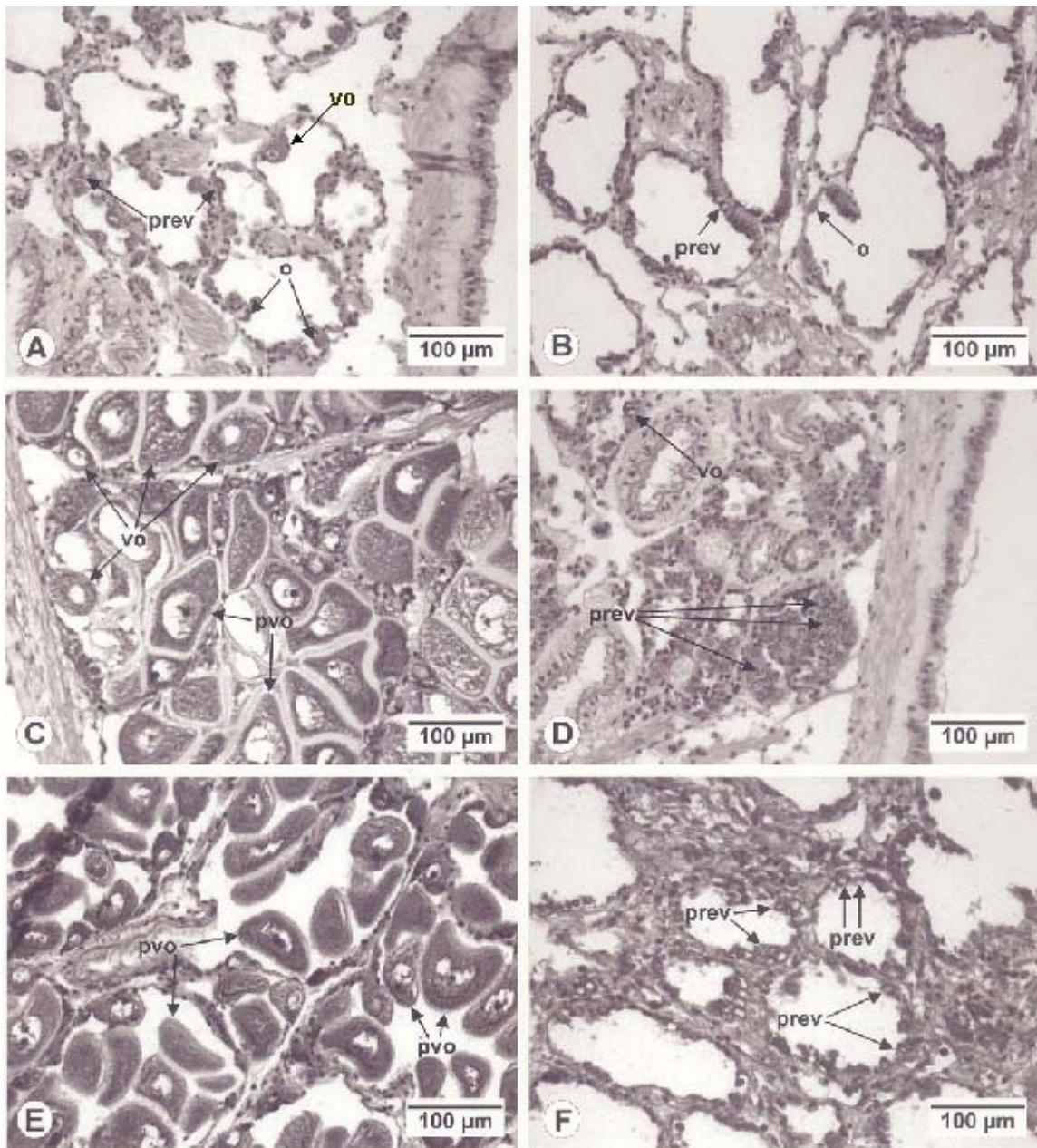


Fig. 4 Female gametogenic stages for diploids (A, C, E) and triploids (B, D, F) *Nodipecten subnodosus*. Beginning of oogenesis in (A) diploids with oogonia (o), previtellogenic oocytes (prev), and a few vitellogenic oocytes (vo), and (B) triploids with oogonia and previtellogenic oocytes. Advanced stages of oogenesis in (C) diploids with large numbers of vitellogenic (vo) and postvitellogenic oocytes (pvo), and in (D) triploids showing mostly previtellogenic oocytes (prev) and few vitellogenic oocytes (vo). Final stages of oogenesis, with (E) diploids being spawned, and still having some postvitellogenic oocytes (pvo), and (F) triploids showing empty acini, still with previtellogenic oocytes (prev).



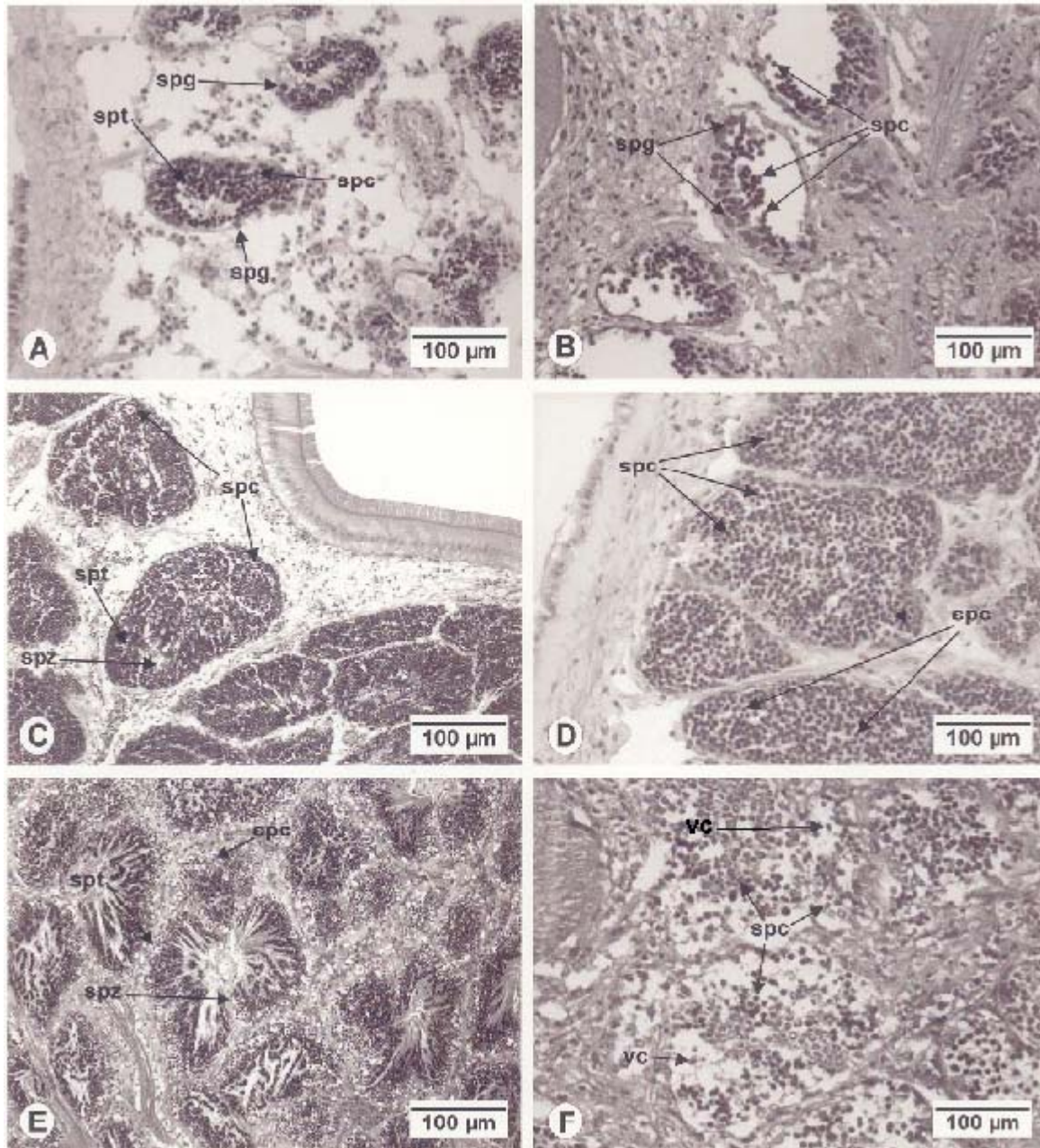


Fig. 5 Male gametogenic stages for diploids (A, C, E) and triploids (B, D, F) *Nodipecten subnodosus*. Beginning of spermatogenesis in (A) diploids with spermatogonia (spg), spermatocytes (spc), and a few spermatids (spt), and (B) triploids showing only spermatogonia and spermatocytes. Advanced stages of spermatogenesis in (C) diploids with large numbers of spermatocytes (spc), spermatids (spt), and spermatozoa (spz), and in (D) triploids showing mostly spermatocytes (spc). Final stages of spermatogenesis, with (E) diploids having the centripetal pattern within acini, with peripheral spermatocytes (spc), intermediate spermatids (spm), and centrally located spermatozoa (spz), and (F) triploids.

### 3.4 Gametic cell types

The number of gametic cell types observed during the evaluation period was significantly different. This was expected because the analyses compared number of gametic cell types at two months during each of the two maturation peaks and at two

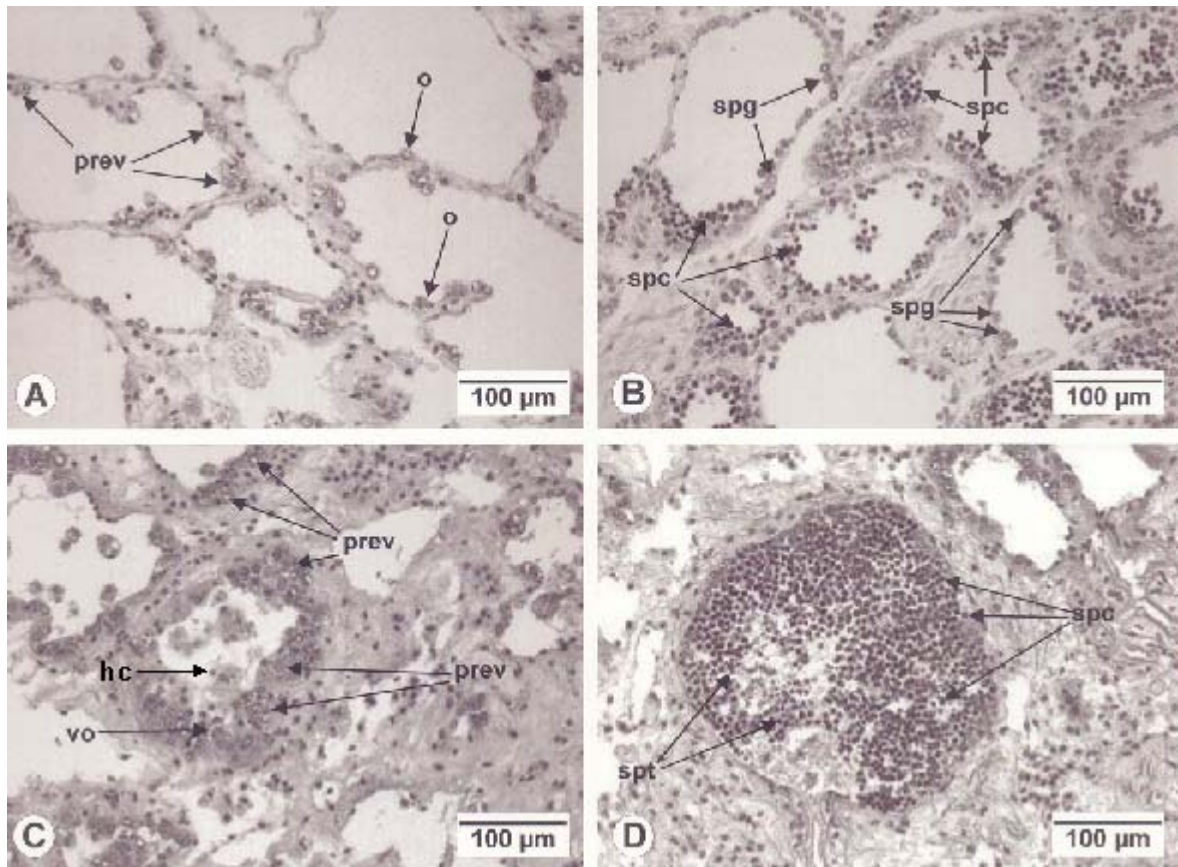


Fig. 6 Triploids gametogenic stages during second maturation peak of *Nodipecten subnodosus*. (A) Female gametogenic stages at the beginning of the new peak, with oogonia (o) and few previtellogenic oocytes (prev). (B) Male acini early during maturation peak with the most advanced stage being spermatocytes (spc). (C) Female acini late during the gametogenic process, with predominant previtellogenic oocytes, and some haemocytes (hc) in lumen. (D) Male acini of scallop late during the gametogenic process with large numbers of spermatocytes (spc) and few spermatids (spt).

months with inactive development. However, ploidy had also a significant effect on the observed number of gametic cell types with the exception of oogonia and spermatogonia. Also there was a significant interaction between ploidy and age for previtellogenic, vitellogenic, and postvitellogenic oocyte numbers, but for male gametic cell types it was only significant for spermatid and spermatozoa numbers, and not for spermatocytes (Table 2). In diploids the most abundant gametic cell type during the first inactive month (April

Table 2. MANOVA results (*P*-values) for cell type frequency differences in diploid and triploid (P: ploidy) lion-paw scallop *Nodipecten subnodosus* at four ages (A: ages 1, 5, 10, and 17 months of grow-out), and the age by ploidy (A\*P) interaction

Female acini		Gametic cell types			
	d.f.	Oogonia	Previtellogenic	Vitellogenic	Postvitellogenic
Age	3	0.00	0.00	0.00	0.00
Ploidy	1	0.06	0.00	0.00	0.00
A*P	3	0.32	0.00	0.00	0.00
Org(A*P) <sup>a</sup>	70	0.00	0.00	0.00	0.00

Male acini		Gametic cell types			
	d.f.	Spermatogonia	Spermatocyte	Spermatid	Spermatozoa
Age	3	0.00	0.00	0.00	0.00
Ploidy	1	0.24	0.61	0.00	0.00
A*P	3	0.17	0.55	0.00	0.00
Org(A*P) <sup>a</sup>	70	0.00	0.00	0.00	0.00

<sup>a</sup> Random effect of organism within age and ploidy group.

2001) were oogonia and spermatogonia, but by the second inactive month evaluated (Jan 2002) spermatocytes were the most abundant male cell type. In triploids, regardless of if it was the first or second inactive months sampled, the most abundant gametic cell types were oogonia and spermatogonia.

In August 2001 and 2002, months included within each of the maturity peaks observed for diploids, diploids had significantly larger numbers of advanced stage gametic cells (vitellogenic oocytes, postvitellogenic oocytes, spermatids, and spermatozoa,) than triploids. On the other hand, triploids had significantly larger numbers of early gametic cell stages (previtellogenic oocytes) and equal numbers of spermatocytes compared with diploids but very few spermatids or spermatozoa (Table 3). The overall result was that sterility was high in triploids regardless of gonad part. For example, in August 2002 vitellogenic oocytes in triploids were only 4.3% of the number seen in diploids, and postvitellogenic oocytes were only 5% of the number in diploids. Also during August 2002, in the male gonad part spermatids were present in very low number in triploids (4.5% of those in diploids), and spermatozoa were only 0.05% of those in diploids.

Table 3. Mean numbers of gametic cell types at each gonad part at ages 1, 5, 10 and 17 months, and for each ploidy group, diploid (2N) and triploid (3N) of lion-paw scallop *Nodipecten subnodosus* ( $n = 10$ ).

Female types:		Oogonia	Previtellogenic	Vitellogenic	Postvitellogenic
Age	Ploidy				
Apr. 2001	2N	3.06 <sup>a</sup>	0.09 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
	3N	3.11 <sup>a</sup>	0.06 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
Aug. 2001	2N	3.17 <sup>a</sup>	1.82 <sup>b</sup>	5.19 <sup>b</sup>	1.20 <sup>c</sup>
	3N	3.54 <sup>a</sup>	6.55 <sup>d</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
Jan. 2002	2N	3.43 <sup>a</sup>	0.85 <sup>ab</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
	3N	3.57 <sup>a</sup>	0.54 <sup>ab</sup>	0 <sup>a</sup>	0.03 <sup>a</sup>
Aug. 2002	2N	0.89 <sup>a</sup>	3.87 <sup>c</sup>	13.92 <sup>c</sup>	8.04 <sup>d</sup>
	3N	2.03 <sup>a</sup>	21.57 <sup>c</sup>	0.60 <sup>a</sup>	0.40 <sup>b</sup>

Male types:		Spermatogonia	Spermatocyte	Spermatid	Spermatozoa
Age	Ploidy				
Apr. 2001	2N	2.95 <sup>a</sup>	0.09 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
	3N	3.40 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
Aug. 2001	2N	9.11 <sup>a</sup>	154.81 <sup>b</sup>	49.16 <sup>b</sup>	1278 <sup>b</sup>
	3N	7.17 <sup>a</sup>	133.37 <sup>b</sup>	0.36 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
Jan. 2002	2N	3.54 <sup>a</sup>	6.03 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
	3N	3.55 <sup>a</sup>	0.81 <sup>a</sup>	0.16 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
Aug. 2002	2N	4.47 <sup>a</sup>	312.87 <sup>c</sup>	397.61 <sup>c</sup>	5514 <sup>c</sup>
	3N	4.05 <sup>a</sup>	394.66 <sup>c</sup>	17.79 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>

Different letters within columns indicate significant differences between ploidy groups and ages.

#### 4. Discussion

Successful production of triploid lion-paw scallops by means of inhibiting extrusion of the second polar body with cytochalasin-B was demonstrated, thus adding this species to other pectinids in which triploidy has been induced (Tabarini, 1984; Beaumont, 1986;



Baron et al., 1989; Komaru and Wada, 1989; Yang et al., 2000; Ruiz-Verdugo et al., 2000; Yang et al., 2001). For several mollusk species, the effect of increasing CB concentration leads to increased triploid production, but this is usually accompanied by increased mortality (Downing and Allen, 1987; Barber et al., 1992; Zeng et al., 1995), an effect most probably caused by toxicity of the induction chemicals. We also observed significant decreased survival of triploids from D-larvae to pediveliger (or pre-metamorphosis stage), an effect that has been previously documented for pectinids (Baron et al., 1989) and other mollusk species (Gerard et al., 1994; Nell et al., 1995).

### **Grow-out**

A surprising result in the present study was that growth of triploid lion-paw scallops was not faster than either type of diploid (diploids within the treated group and diploids from the control-untreated group), although triploids were unable to progress in the gametogenic process further than previtellogenic oocytes or spermatocytes, thus resulting in minimal or no production of mature gametes in either male or female gonad parts. The influence of other factors, such as differential survival of ploidy groups or reversal of triploidy, can be ruled out because survival did not differ between treated and control scallops and the percentage of triploids did not decrease during the grow-out period. The only trait showing triploid superiority was muscle index, which was significantly larger for triploids than for both types of diploids in spite of the fact that triploids had a lower (whole grow-out period) or equal (end of grow-out) adductor muscle weight than diploids. However, the larger muscle index in triploids might just be an artefact derived from

obtaining a proportion; triploids had a smaller tissue weight than diploids, therefore, the proportion of muscle weight to tissue weight would be larger in triploids.

Results from a previous studies on another scallop, the catarina scallop (*Argopecten ventricosus*) grown in the same environment, Bahía Magdalena, indicated a highly significant increase in total weight, adductor muscle weight, and muscle index in triploids compared with diploids (Ruiz-Verdugo et al., 2000). For other scallop species triploids have also been shown to grow better than diploids (Tabarini, 1984; Komaru and Wada, 1989; Lin et al., 1995; Yang et al., 2000).

Three hypothesis have been used to explain the better growth or size attained by triploid mollusks; 1) sterility resulting in surplus energy not used for reproduction being channelled instead to growth (Stanley et al., 1984; Allen and Downing, 1990; Akashige and Fushimi, 1991; Shpigel et al., 1992; Gerard et al., 1999); 2) polyploid gigantism without cell number compensation (Guo and Allen, 1994a; Eversole et al., 1996; Guo et al., 1996; Guo et al., 2001); and 3) increased heterozygosity or reduction of effects caused by monosomic chromosomes (Stanley et al., 1981; Yamamoto et al., 1988; Beaumont and Kelly, 1989; Hawkins et al., 1994; Zhang et al., 1998; Wang et al., 2002). To explain our results, the first hypothesis can be turned around to postulate that when there is no energy stored for reproduction there will be no triploid advantage. One possible explanation for the lack of a growth advantage of triploids over diploids is that scallops have a distinctive reproductive strategy in terms of energy storage and usage at this site. Racotta et al. (2003) found that diploid scallops of this species grown at this site were able to sustain the full cost of gametogenesis without, or with minimal, energy transfer from storage tissues, indicating that an opportunistic reproductive behaviour was present (Bayne, 1976). This is presumed

to be a consequence of there being ample food supply available in this environment to directly support gametogenesis. Conversely, results from diploid lion-paw scallops grown at a different site have indicated that this reproductive strategy does not always occur. Arellano-Martinez et al. (2003) found that lion-paw scallops grown in Laguna Ojo de Liebre, a site also located in the Baja California Peninsula, but north of the site in the present study and with lower productivity (Garrate-Lizarraga et al., 2000), do in fact store energy for reproduction. Whether growing triploid lion-paw scallops in Laguna Ojo de Liebre would result in better growth than diploids is not known. However, the results obtained in the present study do imply that diploids grown in Bahía Magdalena, whether maturing or not are at no disadvantage when compared to triploids regarding available energy for growth. Biochemical analyses of these scallops during grow-out might help to understand this phenomenon (in progress). Other possible explanations for the lower growth rate in triploid lion-paw scallops grown at Bahía Magdalena might be related to feeding efficiency in triploids and diploids. For example, it is known that when triploid Sydney rock oysters (*Saccostrea commercialis*) are grown in food concentrations higher than 6 mg/l, they had a lower scope for growth than diploids, caused by a reduction in their clearance rate and an increase in respired energy (Kesarcodi-Watson et al., 2001). Bahía Magdalena is located in one of three Biological Active Centres (BACs) in the Baja California Peninsula (Lluch-Belda, 2000), and has the largest phytoplankton concentration of all three BACs (Gárate-Lizarraga et al., 2000) in the Baja Peninsula. Chlorophyll-*a* concentrations at this site can vary from 0.36 mg Chlorophyll-*a* / m<sup>3</sup> in the low productive season of the year, to 4.5 mg Chlorophyll-*a* / m<sup>3</sup> in the high productivity season (Martínez-López and Verdugo-Díaz, 2000). This productivity is several times larger than that

estimated to occur in Laguna Ojo de Liebre (0.1 to 1.5 mg Chlorophyll-*a* / m<sup>3</sup>), which is also located in a BAC (Hernández-Rivas et al., 2000), and was the site where Arellano-Martínez et al. (2003) found that lion-paw scallops do stores reserves for maturation. In summary, lack of triploid superiority in the present study may have been a consequence of a unique reproductive strategy at the site evaluated resulting in no surplus energy for growth, or alternatively, of a larger reduced scope for growth in triploids than diploids caused by excessive particulate matter leading to larger energy usage for respiration and reduced clearance rates.

### **Gametogenesis – Gametic cell types**

Gametogenesis of diploid populations of this species has been previously described (Reinecke-Reyes, 1996; Barrios et al., 1997; Racotta et al., 2003; Arellano-Martinez et al., 2003). In agreement with our results, the higher spawning peak is known to occur around August – September. We found that in both years evaluated, after the first spawning peak there was a ‘resting’ period, although a small percentage (8 to 9%) of mature individuals were observed between the two maturation peaks, in December 2001 and March 2002 (Fig. 3). The occurrence of a small maturation peak was also seen by Arellano-Martinez et al. (2003) for this species when grown at a more northerly site (Laguna Ojo de Liebre), and might be an indication of the existence of a small percentage of early maturing individuals in this lion-paw population.

Gametogenesis in triploids contrasted with that in diploids in both developmental stages reached and numbers of the same stages present when evaluated at the same time in both ploidy groups. During the two maturation peaks in diploids, triploids were behind in

the developmental stage of the gametic cell stage present, with the most common stage being either previtellogenic oocyte or spermatocytes. This meant that during the first maturation peak triploid scallops were 100% sterile, with no postvitellogenic oocytes or spermatozoa. By the second maturation peak, the sterility observed in triploids was 95% for the female part of the gonad, and 99.95% for the male part of the gonad. As it is known that in scallops the transition from previtellogenic oocyte to vitellogenic oocyte is dependant on meiosis I entering the diplotene stage (Dorange and LePenec, 1989b; Beninger and LePenec, 1991), it can be concluded that the halt in oocyte development was caused by meiosis I arrest, probably at the zygotene-pachytene stages of prophase. In the male part of the gonad the same event might have resulted in the observed sterility, although without the ability to distinguish between primary and secondary spermatocytes a definitive conclusion cannot be reached.

In conclusion, the triploid condition in lion-paw scallop results in the early arrest of gametogenesis, during the zygotene - pachytene stages of meiosis. This results in almost complete sterility of both gonad parts, although this does not translate into a growth advantage for triploids. A reproductive strategy present at this particular grow-out site, in which mobilization of energy reserves does not play an important role during maturation, might explain this unusual result. The results indicate that triploidy would not be an advantageous biotechnology for the aquaculture production of this species at this particular site, as commercial harvest is carried out after approximately 18 mo of grow-out. However, the advantages of culturing triploids still have to be defined for other grow-out sites (i.e. Laguna Ojo de Liebre), in which it is known that a different reproductive strategy occurs, and lower primary productivity is present.

## Acknowledgements

This research was supported by CONACYT grant 28256-B and CIBNOR grant PAC14 to A.M. Ibarra. We thank Dr. Thomas R. Famula, biometrician from UC Davis, for advice on the statistical analyses. We thank Dr. I.S. Racotta and Dr. E. Palacios for reviewing the manuscript and for their valuable comments. We also thank Carmen Rodriguez and Teresa Arteche for histology support; Miguel Robles for supplying the spawners; Juan Manuel Macklitz and Gabriel Gonzalez for hatchery support. The senior author is a CONACYT and SEP (DGECYT) Ph.D. fellow, and the results presented here are part of his thesis.

## References

- Akashige, S., Fushimi, T., 1991. Growth, survival and glycogen content of triploid Pacific oyster *Crassostrea gigas* in the waters of Hiroshima, Japan. *Nippon Suisan Gakkaishi* 56, 1063-1071.
- Allen, S.K. Jr., 1983. Flow cytometry: assaying experimental polyploid fish and shellfish. *Aquaculture* 33, 317-328.
- Allen, S.K. Jr., Bushek, D., 1992. Large-scale production of triploid oysters, *Crassostrea virginica* (Gmelin), using "Stripped" gametes. *Aquaculture* 103, 241-251.
- Allen, S.K., Jr., Downing, S.L., 1986 Performance of triploid pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). I Survival, growth, glycogen content and sexual maturation in yearlings. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 102, 197-208.
- Allen, S.K. Jr., Downing, S.L., 1990. Performance of triploid Pacific oysters *Crassostrea gigas*: gametogenesis. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 47, 1213-1222.
- Allen, S.K. Jr., Hidu, H., Stanley, J.G., 1986. Abnormal gametogenesis and sex ratio in triploid soft-shell clams (*Mya arenaria*). *Biol. Bull.* 170, 198-210.
- Arrellano-Martínez, M., Ceballos-Vázquez, B.P., Elorduy-Garay, J.F., Racotta, I.S. 2003. Biochemical composition in *Nodipecten subnodosus* related to reproduction and food availability. *Book of Abstracts, 14th International Pectinid Workshop.* St. Petersburg, FL, USA, pp120-121
- Baqueiros, C.E., Masso, J.A., Guajardo, H., 1982. Distribución y abundancia de moluscos de importancia comercial en Baja California Sur. *Serie de divulgación. CRIP-La Paz. INP.* 11, 7-32.

- Barber, B.J., Mann, R., Allen, S.K. Jr., 1992. Optimization of triploid induction for the oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Aquaculture* 106, 21-26.
- Barrios, D., Chavez, J., Caceres, C., 1997. First trial of growth *Lyropecten subnodosus* under culture conditions in Bahía de La Paz, B.C.S., Mexico. In: Félix-Pico, E. (Ed.), 11<sup>th</sup> International Pectinid Workshop, La Paz, México, pp. 107-110.
- Baron, J., Diter, A., Bodoy, A., 1989. Triploidy induction in the black scallop (*Chlamys varia* L.) and its effects on larval growth. *Aquaculture* 77, 103-111.
- Bayne, B.L., 1976. Aspects of reproduction in bivalve mollusks. In: Wiley, M.L. (Ed.), *Estuarine Processes*. Academic Press, New York, pp. 432-448
- Beaumont, A.R., 1986. Genetics aspects of hatchery rearing of the scallop, *Pecten maximus* (L.). *Aquaculture* 57, 99-110.
- Beaumont, A.R., Fairbrother, J.E., 1991. Ploidy manipulation in mollusca shellfish: a review. *J. Shellfish Res.* 10(1), 1-18.
- Beaumont, A.R., Kelly, K.S., 1989. Production and growth of triploid *Mytilus edulis* larvae. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 132, 69-84.
- Beninger, P.G., LePenec, M., 1991. Functional anatomy of scallops. In: Shumway, S.E. (Ed.), *Scallops: Biology, Ecology and Aquaculture*. Elsevier, Amsterdam, pp. 133-223.
- Dorange, G., LePenec, M., 1989a. Ultrastructural characteristics of spermatogenesis in *Pecten maximus* (Mollusca, Bivalvia). *Invert. Repro. Dev.* 15, 109-117.
- Dorange, G., LePenec, M., 1989b. Ultrastructural study of oogenesis and oocytic degeneration in *Pecten maximus* from Bay of St. Brieuc. *Mar. Biol.* 103, 339-348.
- Downing, S.L., Allen, S.K. Jr., 1987. Induced Triploidy in the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*: optimum treatments with Cytochalasin B Depend on Temperature. *Aquaculture* 61, 1-15.
- Eudeline, B., Allen, S.K. Jr., Guo, X., 2000. Optimization of tetraploid induction in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, using first polar body as a natural indicator. *Aquaculture* 187, 73-84.
- Eversole, A.G., Kempton, C.J., Hadley, W.H., Buzzi, W.R., 1996. Comparison of growth, survival, and reproductive success of diploid and triploid *Mercenaria mercenaria*. *J. Shellfish Res.* 15(3), 689-694.
- Felix-Pico, E.F., Villalejo-Fuerte, M., Tripp-Quezada, A., Holguin-Quiñones, O., 1999. Growth and survival of *Lyropecten subnodosus* (Sowerby, 1835) in suspended cultured at the National Marine Park of Bahia de Loreto, B.C.S., México. 12 Int. Pectinid Workshop, Bergen (Norway) 5-11, May. Book of Abstracts.
- Gárate-Lizárraga, I., Siqueiros-Beltrones, D.A., Verdugo-Díaz, G., Guerrero-Caballero, R., 2000. Dinámica del fitoplancton en el sistema lagunar Magdalena – Almejas. In: Lluch-Belda, D., Elorduy-Garay, J., Lluch-Cota, S.E., Ponce-Díaz, G. (Eds.), *Centros de actividad biológica del Pacífico Mexicano*. CIBNOR / CONACYT, La Paz BCS, México. pp. 143-155.
- García-Domínguez, F., Castro-Moroyoqui, P., Félix-Pico, E.F., 1992. Spat settlement and early growth of *Lyropecten subnodosus* (Sowerby, 1835) in Laguna Ojo de Liebre B.C.S., Mexico 1989-1990. *J. Shellfish Res.* 11(1), 195.

- Gerard, A., Naciri, Y., Peignon, J.M., Ledu, C., Phelipot, P., 1994. Optimization of triploid induction by the use of 6-DMAP for the oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquacult. Fish. Manage.* 25, 709-719.
- Gerard, A., Ledu, C., Phelipot, P., 1999. The induction of MI and MII triploids in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* with 6-DMAP or CB. *Aquaculture* 174, 229-242.
- Guo, X., Allen, S.K. Jr., 1994a. Sex Determination and Polyploid Gigantism in the Dwarf Surfclam (*Mulinia lateralis* Say) *Genetics* 138, 1199-1206.
- Guo X., Allen, S.K. Jr., 1994b. Viable tetraploids in the Pacific Oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg) produced by inhibition polar body I in eggs from triploids. *Mol. Mar. Biol. Biotech.* 3(1), 42-50.
- Guo, X., Allen, S.K. Jr., 1997. Sex and meiosis in autotetraploid Pacific oyster, *Crassostrea gigas*(Thunberg). *Genome* 40,397-405.
- Guo, X., Debrosse, G.A., Allen, S.K. Jr., 1996. All-triploid Pacific Oysters (*Crassostrea gigas* Thunberg) produced by mating tetraploid and diploid. *Aquaculture* 142, 149-161.
- Guo, X., Wang, Z., Allen, S.K. Jr., Landau, B., 2001. Triploid gigantism in mollusks and possible explanations. *J. Shellfish Res.* 20(1), 545.
- Hawkins, A.J.S., Day, A.J., Gerard, A., Naciri, Y., Ledu, C., Bayne, B.L., Heral, M., 1994. A genetic and metabolic basis for faster growth among triploids by blocking meiosis I but not meiosis II in the larviparus European flat oysters, *Ostrea edulis* L. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 184, 21-40.
- Hernández-Rivas, M.E., Jiménez-Rosenberg, S.P., Funes-Rodríguez, R., Saldierna-Martínez, R.J., 2000. El centro de actividad biológica de la Bahía de Sebastián Vizcaíno, una primera aproximación. In: Lluch-Belda, D., Elorduy-Garay, J., Lluch-Cota, S.E., Ponce-Díaz, G. (eds.), *Centros de actividad biológica del Pacífico Mexicano*. CIBNOR / CONACYT, La Paz BCS, México. pp. 65-85
- Kesarcodi-Watson, A., Klumpp, D.W., Lucas, J.S., 2001. Comparative feeding and physiological energetics in diploid and triploid Sydney rock oysters (*Saccostrea commercialis*). II. Influences of food concentration and tissue energy distribution. *Aquaculture* 203, 195-216.
- Kiyomoto, M., Komaru, K., Scarpa, J., Wada, K.T., Danton, E., Awaji, M., 1996. Abnormal Gametogenesis, Male Dominant Sex Ratio, and Sertoli Cell Morphology in Induced triploid Mussel, *Mytilus galloprovincialis*. *Zool. Sci.* 13, 393-402.
- Komaru, A., Wada, K.T., 1989. Gametogenesis and growth of induced triploid scallop *Chlamys nobilis*. *Nippon Suissan Gakkaishi* 55, 447-452.
- Lin, Y., He, M., Qing, N., Jiang, W., 1995. Triploid induction in the scallop, *Chlamys nobilis* and growth comparisons. *Trop. Oceanol. Redai Haiyang* 14(4), 84-89.
- Lluch-Belda, D., 2000. Centros de actividad biológica en la costa occidental de Baja California. In: Lluch-Belda, D., Elorduy-Garay, J., Lluch-Cota, S.E., Ponce-Díaz, G. (Eds.), *Centros de actividad biológica del Pacífico Mexicano*. CIBNOR / CONACYT, La Paz BCS, México. pp. 49-64
- Maeda-Martínez, A.N., Lombeida, P., Freitas, L., Lodeiros, C., Sicard, M.T., 2001. Cultivo de pectinidos en fondo y estanques. In: Maeda-Martínez, A.N. (Ed.), *Los*



- moluscos Pectinidos Iberoamericanos: Ciencia y Acuicultura. LIMUSA, México, D.F.
- Maldonado, A.R., Ibarra, A.M., Ramirez, J.L., Avila, S., Vazquez, J.E., Badillo, L.M., 2001. Induction of triploid in Pacific red abalone (*Haliotis rufescens*). J. Shellfish Res. 20(3), 1071-1075.
- Maldonado-Amparo, R., Ibarra, A.M., 2002a. Ultrastructural characteristic of spermatogenesis in diploid and triploid catarina scallop (*Argopecten ventricosus* Sowerby II, 1842). J. Shellfish Res. 21(1), 93-101.
- Maldonado-Amparo, R., Ibarra, A.M., 2002b. Comparative analysis of oocyte type frequencies in diploid and triploid catarina scallop (*Argopecten ventricosus*) as indicators of meiotic failure. J. Shellfish Res. 21(2), 597-603.
- Martínez-López, A., Verdugo-Díaz, G., 2000. Composición y dinámica del fitoplancton en el BAC de Bahía Magdalena, B.C.S. In: Lluch-Belda, D., Elorduy-Garay, J., Lluch-Cota, S.E., Ponce-Díaz, G. (Eds.), Centros de actividad biológica del Pacífico Mexicano. CIBNOR / CONACYT, La Paz BCS, México. pp. 125-142
- Nell, J.A., O'Connor, W.A., Hand, R.E., McAdam, S.P., 1995. Hatchery production of diploid and triploid clams, *Tapes dorsatus* (Lamarck 1818): A potential new species for aquaculture. Aquaculture 130, 389-394.
- Racotta, I.S., Ramirez, J.L., Ibarra, A.M., Rodríguez-Jaramillo, M.C., Carreño, D., Palacios, E., 2003. Growth and gametogenesis in the lion-paw scallop *Nodipecten (Lyropecten) subnodosus*. Aquaculture 217, 335-349
- Reinecke-Reyes, M.A., 1996. Madurez y desove de la almeja Mano de León *Lyropecten subnodosus* Sowerby, 1835 (Bivalvia: Pectinidae) en laguna Ojo de Liebre, B.C.S. México. Bol. Pesq. CRIP (La Paz B.C.S., México) 3, 17-20.
- Reyes-Sosa, C., 1990. El cultivo de Pectinidos en México. Ser. Cient. Univ. Auton. B. C. S., La Paz B.C.S, Mexico 1(1), 25-29.
- Ruiz-Verdugo, C.A., Ramirez, J.L., Allen, S.K. Jr., Ibarra, A.M., 2000. Triploid catarina scallop (*Argopecten ventricosus* Sowerby II, 1842): growth, gametogenesis, and suppression of functional hermaphroditism. Aquaculture 186, 13-32.
- Ruiz-Verdugo, C.A., Allen, S.K. Jr., Ibarra, A.M., 2001. Family differences in success of triploid induction and effects of triploidy on fecundity of catarina scallop (*Argopecten ventricosus*). Aquaculture 201, 19-33.
- Saout, C., 2000. Controle de la reproduction chez *Pecten maximus* (L): etudes *in situ* et experimentales. These de doctorat, France: Universite de Bretagne Occidentale. 172 pp.
- Shpigel, M., Barber, B.J., Mann, R., 1992. Effects of elevated temperature on growth, gametogenesis, physiology and biochemical composition in diploid and triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* Thunberg. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 161, 15-25.
- Stanley, J.G., Allen, S.K. Jr., Hidu, H., 1981. Polyploidy induced in the American oyster, *Crassostrea virginica*, with cytochalasin B. Aquaculture 23, 1-10.
- Stanley, J.G., Hidu, H., Allen, S.K. Jr., 1984. Growth of American oyster. Increased by polyploidy induced by blocking meiosis I but not meiosis II. Aquaculture 37, 147-155.
- Tabarini, C.L., 1984. Induced triploidy in the bay scallop *Argopecten irradians*, and its

- effect on growth and gametogenesis. *Aquaculture* 42, 151-160.
- Utting, S.D., Millican, P.F., Laing, I., 1996. The breeding potential and biochemical composition of triploid Manila clams, *Tapes philippinarum* Adams and Reeve. *Aquaculture Res.* 27, 573-580.
- Villalejo-Fuerte, M., Ochoa, R.I., 1993. The reproductive cycle of the scallop (*Argopecten circularis* Sowerby II, 1842) in relation to temperature and photoperiod, in Bahía Concepcion, B. C. S. Mexico. *Ciencias Marinas* 19, 181-202.
- Wang, Z., Guo, X., Allen, S.K. Jr., Wang, R., 2002. Heterozygosity and body size in triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* Thunberg, produced from meiosis II inhibition and tetraploid. *Aquaculture* 204, 337-348.
- Yamamoto, S., Sugawara, Y., Nomaru, T., Oshimo, A., 1988. Induced triploidy in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, and performance of triploid larvae. *Tohoku J. Agr. Res.* 39(1), 47-59.
- Yang, H., Wang, J., Guo, X., 2001. Production and evaluation of meiosis I and II triploids in the hard clam *Mercenaria mercenaria*. Pp. 708. In book of abstracts. WAS Meeting - Aquaculture 2001. Lake Buena Vista, FL (USA), 21-25 Jan 2001.
- Yang, H.P., Zhang, F.S., Guo, X., 2000. Triploid and tetraploid Zhikong, *Chlamys farreri* Jones et Preston, produced by inhibiting polar body I. *Mar. Biotechnology* 2, 466-475.
- Zar, J. H., 1999. *Biostatistical Analysis*, 4th ed. Prentice Hall, New Jersey.
- Zeng, Z., Chen, M., Lin, Q., Chen, P., Liu, W., Chen, Y., 1995. Induced triploidy in scallop, *Chlamys nobilis*. *J. Oceanogr.* 14, 155-162, Taiwan Strait, Taiwan Haixia.
- Zhang, G., Wang, Z., Chang, Y., Song, J., Wang, R., 1998. Triploid induction in Pacific abalone *Haliotis discus hannai* Ino by 6-dimethylaminopurine and performance of triploid juvenile. *J. Shellfish Res.* 17(3), 783-788.

## **CAPÍTULO IV**

**EVALUACIÓN DE LA INDUCCIÓN A LA  
TRIPLOIDÍA CON DIFERENTES  
CONCENTRACIONES DE CB EN ABULÓN ROJO  
(*Haliotis rufescens* Swainson, 1822).**

**INDUCCIÓN A LA TRIPLOIDÍA EN ABULÓN ROJO DEL PACIFICO (*Haliotis rufescens*)**

**ARTÍCULO (Publicado)**

Maldonado A. R., A.M. Ibarra, J.L. Ramírez, S. Avila, J.E. Vazquez and L.M. Badillo.

Induction of triploidy in Pacific red abalone (*Haliotis rufescens*).

*Journal of Shellfish Research*, 20 (3): 1071-1075, 2001.

## **Abstract**

Induction of triploidy was evaluated in red abalone, *Haliotis rufescens*, using cytochalasin-B (CB). Three experiments were done at different times of the year and with different CB concentrations, but triploids were produced only in May and November. The largest percentages of triploids were obtained in the November induction (85%, 100%, 100%, for 0.5, 0.75, 1.0 mg/L CB, respectively), and poorer triploidy success was obtained in the May induction (3%, 11%, 26%, for 0.3, 0.5, 0.7 mg/L CB). When the induction was done in November CB concentration did not play a significant role in success of triploidy, although it did play a role on relative survival to trochophore, with the two highest concentrations resulting in lower survivals. For the May and September inductions, treatment with CB had a significant effect on survival, but this was independent of CB concentration. The results on triploidy success at each time of induction paralleled those for larval viability at each of those times of the year when evaluated in untreated control larvae, with the largest survival to trochophore (55%) and the lowest coefficient of variation (CV = 12%) for survival of untreated larvae produced in November. Untreated larvae produced in May had an intermediate survival (37%) and CV (57%), whereas that produced in September had the lowest survival to trochophore (1%) and the largest CV (143%)

## **1. Introduction**

Pacific red abalone (*Haliotis rufescens*) is found from southern Oregon - northern California in the USA to the north of the Baja California Peninsula in Mexico (Cox 1962; Lindberg 1992). Aquaculture production of this species began during the last decade in

Mexico, where the whole life cycle is managed under controlled conditions. The growth rate in this abalone is slow, reaching 120 mm to 160 mm in three to four years (Tegner and Butler 1985), and ways to improve production need to be defined. Triploidy, among other methods, has been proposed to improve production of abalone (Fujino 1992; Elliott 2000).

Triploidy has been induced in a wide variety of marine mollusks (Beaumont and Fairbrother 1991), with the pioneer work having been on oysters (Stanley et al. 1981). For most species, induction of triploidy in mollusks is done by inhibiting the extrusion of the second polar body during the conclusion of meiosis in fertilized eggs. Several induction methods have been tested; chemical treatment with cytochalasin-B (CB) or 6-dimethylaminopurine (6-DMAP), and physical treatment with hydrostatic pressure or thermal shock (cold or heat). In abalone species Arai et al. (1986) and Kudo et al. (1991) were the first to report successful production of triploid abalone (*Haliotis discus hannai* and *Haliotis diversicolor diversicolor*) using thermal shock. Curatolo and Wilkins (1995) produced triploids of *Haliotis discus hannai* using hydrostatic pressure. Recently, Zhang et al. (1998) produced triploids of that same species using 6-DMAP, Yang et al. (1998a, 1998b) produced triploids of *Haliotis diversicolor* using thermal shock and cytochalasin-B, and Stepto and Cook (1998) produced triploids of *Haliotis midae* using cytochalasin-B. Powers et al. (1996) mentioned their success in producing and growing triploids of Pacific red abalone, *Haliotis rufescens*, although no details are given in the abstract.

In this study we report on the effects of induction to triploidy using different CB concentrations in east Pacific red abalone, *Haliotis rufescens*, during three times of the year.

## 2. Materials and Methods

Three experimental inductions to triploidy were done at different times during the year 2000 in a private hatchery; late May, early September, and late November.

### 2.1 Spawning

Spawning and gamete collection procedures were the same for all experimental inductions. Mature spawners (10 - 15 cm shell length) of red abalone, *Haliotis rufescens*, were selected from the broodstock kept in the commercial farm 'Abulones Cultivados' at Erendira, Baja California, Mexico, and used to obtain eggs for the treatments. Spawning was induced following methods developed by Morse et al. (1977), by adding hydrogen peroxide dissolved (final concentration 0.02%) in seawater for a period of approximately two hours, or until spawning began.

### 2.2 Gamete collection

Four sets or blocks were used for each of the three experimental induction times. Because the number of eggs shed by red abalone is not large enough to be able to divide the eggs from one female into different CB treatment concentrations, each set was composed of a mixture of eggs from 3-5 females. The sets were made sequentially, that is, eggs of the first three to five females that spawned were mixed to make the first set, and the other sets were made sequentially, each of them with 3 to 5 spawners. Eggs were fertilized by adding about 30 sperm per egg.

### 2.3 Triploid induction

For each of the three experimental induction times, each set was divided into the same four treatment groups (one untreated control, and three CB treatment concentrations). For the May induction, the CB concentrations tested were 0.3, 0.5, and 0.7 mg L<sup>-1</sup>; for the September induction 0.6, 0.8, and 1.0 mg of CB L<sup>-1</sup> were tested; and for the November inductions the CB concentrations tested were 0.5, 0.75, and 1 mg L<sup>-1</sup>. During the May induction, cytochalasin-B was added at the time at which the eggs in the control group showed the beginning of the extrusion of the second polar body (PB2) and ended when 50% of the control group eggs showed the second polar body. On average, the treatment lasted 20 min. Water temperature during the induction was 15 °C. Egg density for each treatment was 2 x 10<sup>5</sup> L<sup>-1</sup>. For the inductions in September and November, CB was added when 50% of the eggs in control group showed the first polar body (PB1), and ended when 50% had the second polar body. For the September induction, treatment lasted from 19 to 55 min, depending on when 50% of the eggs in each set showed extrusion of PB2. Water temperature during treatments was 20 °C, and egg density for all treatments was 1.2 x 10<sup>5</sup> L<sup>-1</sup>. During the November induction, treatment lasted between 32 to 48 min, depending on the set. Water temperature during the induction was 14.5 °C, and egg density for the treatments was 2.3 x 10<sup>5</sup> L<sup>-1</sup>. For all three experimental induction times, after treatment with the different concentrations of CB, eggs were rinsed in DMSO (1 mL L<sup>-1</sup>) for 15 min to remove any remaining CB (Allen et al. 1989).

Absolute and relative survival from egg to trochophore larvae (about 20 h post fertilization) and absolute and relative survival from egg to postlarvae (about 120 h post



fertilization) were estimated for each treatment group and control for all experimental inductions. Relative survivals were estimated within each set and induction time as the ratio between the survival of the treated group to the survival in its control group, and expressed in percentages.

Ploidy success was estimated by flow cytometry (Ploidy Analyzer II, PARTEC Germany) of postlarval stages (approximately 200 / treatment / block), with the exception of the experimental induction in September, for which trochophore larvae (for those sets with surviving larvae) were analyzed. The flow cytometry methodology was that originally developed by Allen (1983), with modifications for larvae in Allen & Bushek (1992). In short, larvae were concentrated in a 1-ml suspension, centrifuged, and the pellet was stained with 0.5 ml of a DAPI/detergent/DMSO solution (see Allen & Bushek, 1992), re-suspending by vortex. Trochophore and postlarvae were disaggregated as in Allen and Bushek (1992); trochophore larvae by repeated aspiration with a 1 ml syringe, and postlarvae were disaggregated by means of crushing the meat/shell with a glass rod. In both cases the obtained cell suspensions were passed through a 30  $\mu\text{m}$  screen, adding 1.5 ml of the DAPI/detergent/DMSO solution before flow cytometry assay.

#### 2.4 Larval culture

After treatment the embryos were kept in 100 L tanks until hatching. No feeding, aeration, or water flow was provided during this period (20 h). After hatching, swimming trochophore larvae was transferred to 150L tanks at a stocking density of 4 larvae / ml, providing continuous flow. Trochophore larvae were induced to settle after 6 days

following Morse et al. (1979) methodology, modified by Searcy-Bernal & Anguiano-Beltran (1998) by adding GABA (gamma-aminobutyric acid) at a final concentration of 1.6  $\mu\text{M}$ . After settling, postlarvae was grown in 200 L circular tanks (112 cm diameter, 28 cm height) by placing 30,000 postlarvae / tank, feeding by inoculating each tank with 3000 cells/cm<sup>2</sup> of the benthonic microalgae *Navicula incerta*.

## 2.5 Statistical Analyses

For each experimental induction, the effect of CB concentration on mean larval survival, and mean triploid success (n=4), was analyzed using a randomized block design analysis of variance (Neter et al. 1985). Set (block) was considered a random effect. Percentage data were transformed to arcsine for analysis (Zar 1999). Significance was set as at  $P < 0.05$  for all analyses. Tukey pairwise comparisons were used to test for differences between means (Neter et al. 1985).

To establish whether there were differences in larval viability between dates of spawning regardless of CB treatments, the effect of experimental induction time on absolute survival of the control, untreated groups, was analyzed with the same model above.

## 3. Results

The results on survival to trochophore and to postlarvae, and on success in triploid production for each experimental induction time are in table 1.

### 3.1 Triploidy

Triploid abalone were successfully produced only during the May and November inductions. During the September induction, no triploids were detected in any of the tested concentrations. For the May induction, the highest concentration (0.7 mg CB L<sup>-1</sup>) gave the best success in triploid production (26%), whereas the lowest concentration (0.3 mg CB L<sup>-1</sup>) resulted in the lowest success in triploids produced (3%) which was not significantly different ( $P > 0.05$ ) from the control (0% triploids). The intermediate concentration (0.5 mg CB L<sup>-1</sup>) resulted in 11% triploids, which was not significantly different from the results using the lowest or the highest concentrations (Table 1A). There were no triploids detected in the control groups of any of the sets. For the November induction all tested concentrations resulted in high success in triploid induction (Table 1C), all being significantly different from the control group, but not from each other. Only one of the four sets in the 0.5 mg L<sup>-1</sup> treatment had less (40%) than 100% triploids. Success in triploidy ranged from 85% for the lowest concentration (0.5 mg CB L<sup>-1</sup>) to 100% for the intermediate (0.75 mg CB L<sup>-1</sup>) and highest concentration (1 mg CB L<sup>-1</sup>) tested.

### 3.2 Survival

#### *3.2.1 Treated and control groups – within experimental induction times*

For the May induction, there were no significant differences in absolute survival to trochophore or postlarvae between the treated groups and the control (Table 1A). However, there were significant differences in relative survival to trochophore ( $P < 0.05$ ), with the control group having a survival larger than both the 0.3 and 0.5 mg CB L<sup>-1</sup> treated groups,

but not than the  $0.7 \text{ mg L}^{-1}$  treated group. There were no significant differences between treated and control group for relative survival to postlarvae.

For the September induction, absolute survival to trochophore larvae was not different between concentrations or the control, but relative survival was significantly larger ( $P < 0.05$ ) for the control group than for any of the treated groups, which did not differ significantly from each other. There were no surviving postlarvae in any group (Table 1B).

For the November induction, there were no differences in absolute survival to trochophore larvae between control and CB treated groups, but there were differences ( $P < 0.05$ ) in absolute survival to postlarvae, with the control group showing the largest survival, and the CB treated groups not being different from each other. Relative survival to trochophore larvae and to postlarvae was also different from the control group. The lowest relative survival to trochophore was seen for the two highest tested CB concentrations ( $0.75$  and  $1 \text{ mg L}^{-1}$ ), whereas the lowest CB concentration did not show significant differences with the control or the other tested CB concentrations. All treated groups had significantly lower relative survival to postlarvae than the control group (Table 1C).

### *3.2.2 Control groups – between experimental induction times*

Survival of trochophore and postlarvae in the control groups was significantly different ( $P < 0.05$ ) between experimental induction times (Table 2). The highest survival was seen for larvae produced in November (55% to trochophore larvae, 46% to postlarvae), followed by larvae produced in May (37% to trochophore larvae, 10% to postlarvae). For the September spawn, there was only 1% survival to trochophore larvae, and no surviving

postlarvae. The coefficients of variation for mean survival were high for the September induction, followed by May, and with the lowest CV the survivals in November.

Table 1.- Absolute and relative mean survival to trochophore larvae and postlarvae treated with different concentrations of CB, and percent of triploidy success in Pacific red abalone, *Haliotis rufescens*, induced to triploidy in (A) May, (B) September, and (C) November. n=4 for all induction times.

CB Treatment	Absolute		Relative		Percent triploidy
	Survival to trochophore (%)	Survival to postlarvae (%)	Survival to trochophore (%)	Survival to postlarvae (%)	
<b>(A)</b>					
Control	37 <sup>a</sup>	10 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
0.3 mg L <sup>-1</sup>	20 <sup>a</sup>	5 <sup>a</sup>	56 <sup>b</sup>	54 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>
0.5 mg L <sup>-1</sup>	21 <sup>a</sup>	5 <sup>a</sup>	58 <sup>b</sup>	50 <sup>a</sup>	11 <sup>ab</sup>
0.7 mg L <sup>-1</sup>	23 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	63 <sup>ab</sup>	24 <sup>a</sup>	26 <sup>b</sup>
<b>(B)</b>					
Control	0.96 <sup>a</sup>	0	100 <sup>a</sup>	0	0 <sup>a</sup>
0.6 mg L <sup>-1</sup>	0.44 <sup>a</sup>	0	20 <sup>b</sup>	0	0 <sup>a</sup>
0.8 mg L <sup>-1</sup>	0.46 <sup>a</sup>	0	34 <sup>b</sup>	0	0 <sup>a</sup>
1.0 mg L <sup>-1</sup>	0.30 <sup>a</sup>	0	10 <sup>b</sup>	0	0 <sup>a</sup>
<b>(C)</b>					
Control	55 <sup>a</sup>	46 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
0.5 mg L <sup>-1</sup>	48 <sup>a</sup>	23 <sup>b</sup>	84 <sup>ab</sup>	47 <sup>b</sup>	85 <sup>b</sup>
0.75 mg L <sup>-1</sup>	31 <sup>a</sup>	12 <sup>b</sup>	56 <sup>b</sup>	24 <sup>b</sup>	100 <sup>b</sup>
1.0 mg L <sup>-1</sup>	32 <sup>a</sup>	13 <sup>b</sup>	60 <sup>b</sup>	27 <sup>b</sup>	100 <sup>b</sup>

Within columns and experimental induction time, different letters are used when means are significantly different (ANOVA,  $P < 0.05$ ).

Table 2. Absolute mean survival (%) and coefficient of variation (CV) from egg to trochophore and from egg to postlarvae of the control untreated groups, for each of the experimental inductions.

Induction time	Survival mean % (CV) Egg to trochophore	Survival mean % (CV) Egg to postlarvae
May	36.7 <sup>b</sup> ( 57)	9.6 <sup>a</sup> (62)
September	1.0 <sup>a</sup> (143)	-
November	55.3 <sup>c</sup> ( 12)	46.0 <sup>b</sup> (28)

Different letters within columns indicate significant differences between induction times.

#### 4. Discussion

Our results show that triploidy can be induced in red abalone, *Haliotis rufescens*, using cytochalasin-B (CB) to inhibit release of the second polar body, and that factors other than CB concentration can have an effect on success of triploid induction as evidenced by the different results obtained between May and November in spite of having used two equal CB concentrations. The cause for the variable success rate in triploids produced between the three experimental induction times is not known, but three possible causes might have been influencing the results, either independently or combined: different temperatures during the spawning and inductions, differences in the CB concentrations and duration of the inductions, and differences in egg quality of abalones used in each of those months.

During the three induction times the temperature was different only for the September induction, when a unusually high temperature of 20°C was recorded and a low survival to trochophore with no triploids produced, and no surviving postlarvae were observed. The effect of increased water temperature on larval viability during the spawning for this

species is not known, and no inferences can be drawn with regard to this factor alone. Furthermore, in May and November the results on triploidy success were different between both inductions, but water temperature was about the same for both inductions, 14.5°C and 15°C. Whereas it is known that at least in oysters meiotic rates are increased as temperature increases (Downing & Allen, 1987; Eudeline et al., 2000b), in our study meiotic rates were actually slower during the September induction (40 min for 50% PB1) than for the November induction (27 min for 50% PB1) in spite of the higher water temperature occurring during the September induction. This points toward another factor rather than temperature on itself being the cause of no success in triploid production during September. The second possible cause, CB concentration and duration of induction, can not explain completely the difference between induction times in September and November because similar concentrations were tested, and in both cases the biological criteria defined by Allen & Bushek (1992) were used for the inductions; starting when 50% of the eggs showed the first polar body (PB), and ending when 50% showed the second PB. When the May and November induction results are compared, they indicated that CB concentration was important for the percentage of triploids produced only during the May induction but not during the November induction. However, this might be explained by differences in the duration of the induction between May and November, because induction in May was not started until the appearance in the first eggs of the extrusion of the second polar body, whereas in November it was started before, when 50% of the eggs had the first polar body. Given the shorter treatment duration in May resulting from this (20 min) when compared with the other induction times (>30 min), increasing CB concentrations might have been important in inducing a larger percentage of triploids during the short induction time in

May. Supan et al. (2000) found that whereas increasing CB concentration was important for improved success in triploidy induction for the American oyster, *Crassostrea virginica*, a longer treatment time might have resulted in greater triploidy success. They used a fixed treatment time (10 min), which as in our case for the May induction, did not follow completely the biological criteria recommended by Allen and Bushek (1992) for triploid induction.

The third possible cause for the differences in triploidy success between induction times could have been differences in reproductive condition of the abalones between May, September, and November. There are few studies on the reproductive cycle of red abalone native to the study area. From the two found it is known that the reproductive cycle of red abalone in northern Baja California is active from May to December, reaching maturity around September (Ortiz-Quintanilla et al. 1990), with the spawning peak occurring between October and December (Molina-Martínez 1983). If during the year of the experiment the reproductive cycle followed that described, mature individuals should have been available at all three induction times, and in fact they were. However, an observation during the induction times was that, even if available, mature spawners were more difficult to find at the farm during the May induction, and still more difficult to find in September than in November, when the largest success was seen in triploid production. Then, whereas the variable abundance of mature spawners appears to indicate that the egg quality was variable between those induction times, biochemical determination of egg quality was not done. However, alternative or indirect measurements of egg quality that do not involve biochemical determinations of reserves have been previously used in association with



evaluations of triploid success. For example, Aldridge et al. (1990) used survival in the control groups as a measurement of egg quality, finding an association between survival in the controls and success in triploid induction in bighead carp. They proposed that egg quality, measured as larval viability in the control groups, can provide a good indicator of success in triploid production. In the present study survival in the control groups indicated also an association with triploidy success, with the highest survivals to trochophore larvae having seen during November, when the largest success to triploidy was obtained, and the lowest triploidy success was observed when the lowest survival occurred in the control groups. Furthermore, the coefficients of variation (CV) for mean survival to trochophore larvae in the control groups for each induction time, with the lowest CV seen for the November data, and the highest CV for the September data, are also indicative of large variability in survival being associated to low success in triploid production and low variability in survival with high success. The importance of evaluating survival in the control groups rather in the treated groups as a potential indicator of success in triploidy is demonstrated by the fact that Allen and Bushek (1992) did not find a correlation between survival of treated batches or families of oyster eggs and success in triploidy, nor did Ruiz-Verdugo et al. (2001) when working with scallop eggs. However, the last authors found that the correlation between number of eggs and number of D-larvae in untreated groups was highly significant, whereas in the CB treated groups that correlation was lost, indicating that survival in treated groups is affected by factors other than egg quality, as for example, toxicity of the CB treatment itself.

The importance of egg quality in triploid induction of mollusks have been stressed by Utting and Doyou (1992), who demonstrated that variability in egg quality among the treated eggs of the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, can affect the success during triploid induction, and this is presumably caused by a lack of synchrony in meiotic rates, which are known to be highly important in triploid and tetraploid induction (Allen & Bushek, 1992; Eudeline et al., 2000a). In the present study there was evidence of lower synchronization in meiotic rates between the sets used during September than those used during November. That evidence comes from the coefficient of variation (CV) of meiotic rate between sets, measured as time to reach 50% of PB1, which was twice during the September induction (CV=33%) than in November (CV=16%).

In conclusion, success of triploidy in Pacific red abalone can be obtained when using CB concentrations from 0.5 to 1 mg L<sup>-1</sup>, and when the induction is started when 50% of the eggs show extrusion of the first polar body. Larger concentrations of CB will result in lower survival of treated eggs, possibly as an effect of toxicity of the chemical. Variation among induced batches at different times of the year can be expected, and this might be a consequence of differences in the egg quality of the spawners at each time, although this has to be further evaluated using biochemical data.

## Acknowledgements

We thank the board of trustees and specially Mr. Benito Altamira-Rodriguez from the commercial farm Abulones Cultivados for their support in doing this research. We also thank Dr. S.K. Allen and Aimee Howe from ABC at the Virginia Institute of Marine Sciences, for the May induction analyses by flow cytometry. This research was supported by CONACYT grant 28256-B to A.M. Ibarra. The senior author is a CONACYT and SEP (DECYTM) Ph.D. fellow, and the results presented here are part of his thesis. Dr. Ellis Glazier edited the English language text.

## References

- Aldridge, F.J., Marston, R.Q., Shireman, J.V. 1990. Induced triploids and tetraploids in bighead carp, *Hypophthalmichthys nobilis*, verified by multi-embryo cytofluorometric analysis. *Aquaculture* 87: 121-131.
- Allen, S.K., Jr. 1983. Flow cytometry: assaying experimental polyploid fish and shellfish. *Aquaculture* 33: 317-328
- Allen, S.K., Jr., Bushek, D. 1992. Large-scale production of triploid oysters, *Crassostrea virginica* (Gmelin), using “stripped” gametes. *Aquaculture* 103: 241-251.
- Allen, S.K., Jr., Downing, S.L., Chew, K.K. 1989. Hatchery manual for producing triploid oysters. University of Washington Press, Seattle, WA, USA.
- Arai, K., Naito, F., Fujino, K. 1986. Triploidization of the Pacific abalone with temperature and pressure treatments. *Nippon Suisan Gakkaishi* 52(3): 417-422
- Beaumont, A.R., Fairbrother, J.E. 1991. Ploidy manipulation in mollusk shellfish: a review. *J. Shellfish Res.* 10(1): 1-18.
- Cox, K.W. 1962. California abalones, family Haliotidae. California Fish and Game. Fishery Bulletin No. 118. 133 pp
- Curatolo, A., Wilkins, N.P. 1995. Induzione della triploidia per mezzo della pressione idrostatica nell’abalone giapponese (*Haliotis discus hannai*). *Biologia Marina Mediterranean* 2: 315-316
- Downing, S.L., Allen, S.K., Jr. 1987. Induced triploidy in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* optimal treatments with cytochalasin B depend on temperature. *Aquaculture* 61: 1-16

- Eudeline, B., Allen, S.K., Jr., Guo, X., 2000a. Optimization of tetraploid induction in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, using first polar body as a natural indicator. *Aquaculture* 187 : 73-84.
- Eudeline, B., Allen, S.K., Jr., Guo, X. 2000b. Delayed meiosis and polar body release in eggs of triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in relation to tetraploid production. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 248: 151-161
- Elliott, N.G. 2000. Genetic improvement programs in abalone: what is the future. *Aquaculture Res.* 31: 51-59.
- Fujino, K. 1992. Review of genetics and stock management of the Pacific abalone. In: S.A. Shepherd, M.J. Tegner, S.A. Guzmán del Prío (Eds.). Abalone of the world. Biology, fisheries and culture. Oxford London. Fishing News Books. 491-503.
- Kudo, M., Arai, K., Fujino, K. 1991. Triploidization of *Haliotis diversicolor diversicolor* by cold shock. *Nippon Suisan Gakkaishi* 57: 1263-1267.
- Lindberg, D.R. 1992. Evolution, distribution and systematics of Haliotidae. In: S.A. Shepherd, M.J. Tegner, S.A. Guzmán del Prío (Eds.). Abalone of the world. Biology, fisheries and culture. Oxford London. Fishing News Books. 3-18
- Molina-Martínez, J. 1983. Estimaciones de fecundidad en *Haliotis rufescens* de El Bajo, Bahía Rosario, Baja California. Instituto Nacional de la Pesca, Secretaría de Pesca, Mexico. *Ciencia Pesquera* 4: 77-95.
- Morse, D.E., Duncan, H., Hooker, N., Morse, A. 1977. Hydrogen peroxide induces spawning in molluscs, with activation of prostaglandin endoperoxide synthetase. *Science* 196: 298-300.
- Morse, D.E., Hooker, N., Jensen, L., Duncan, H. 1979. Induction of larval abalone settling and metamorphosis by  $\gamma$ -aminobutyric acid and its congeners from crustose red algae: 2. Applications to cultivation, seed-production and bioassays; principal causes of mortality and interference. In: Avault, J.W., Jr (Ed.), Proceedings of the tenth annual meeting. World Maricult. Soc., World Mariculture Soc., Baton Rouge, USA. pp. 81-91
- Neter, J., Wasserman, W., Kutner, M.H. 1985. Applied linear statistical models. Illinois USA. Richard D. Irwin, Inc.
- Ortíz-Quintanilla, M., León-Carballo, G., Reinecke-Reyes, M.A., Lelevier-Grijalva, A., Turrubiates-Morales, J.R., González-Aviles, J.G. 1990. Proceso reproductivo de las especies de abulón (*Haliotis* spp.) y su relación con los mecanismos regulatorio-pesqueros en la costa occidental e islas de la Península de Baja California, México. In: M. Dalley & H. Berisch (Eds.), Proceedings of the VIII Symposium in Marine Biology, June 4-8, 1990, Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada, Baja California, Mexico. pp. 156-163.
- Powers, D.A., Kirby, V., Gomez-Ghiarri, M. 1996. Genetic engineering abalone: gene transfer and ploidy manipulation. *J. Shellfish Res.* 15(2): 477
- Ruiz-Verdugo, C.A., Allen Jr., S.K., Ibarra, A.M. 2001. Family differences in success of triploid induction and effects of triploidy on fecundity of catarina scallop (*Argopecten ventricosus*). *Aquaculture* (in press; Proofs AQUA 61584).
- Searcy-Bernal, R., Anguiano-Beltran, C. 1998. Optimizing the concentration of gamma-aminobutyric acid (GABA) for inducing larval metamorphosis in the red abalone

- Haliotis rufescens* (Mollusca: Gasteropoda). *J. World Aquaculture Soc.* 29(4): 463-470
- Stanley, J.G., Allen, S.K., Jr., Hidu, H. 1981. Polyploidy induced in the American oyster *Crassostrea virginica* with cytochalasin B. *Aquaculture* 12: 1-10.
- Stephens, N.K., Cook, P.A. 1998. Induction of triploidy in the South African abalone using cytochalasin B. *Aquaculture International* 6: 161-169.
- Supan, J.E., Wilson, C.E., Allen, S.K., Jr. 2000. The effect of cytochalasin B dosage on the survival and ploidy of *Crassostrea virginica* (Gmelin) larvae. *J. Shellfish Res.* 19(1): 125-128.
- Tegner, M.J., Butler, R.A. 1985. The survival and mortality of seeded and native red abalones, *Haliotis rufescens*, on the Palos Verdes Peninsula. *California Fish Game* 71: 150-163.
- Utting, S.D., Doyou, J. 1992. The increased utilization of egg lipid reserves following induction of triploidy in the Manila clam (*Tapes philippinarum*). *Aquaculture* 103: 17-28.
- Yang, H.S., Chen, H.C., Ting, Y.Y. 1998a. Induction of polyploidy and embryonic development of the abalone, *Haliotis diversicolor*, with temperature treatment. *Am. Malacological Bull.* 14(2): 139-147
- Yang, H.S., Ting, Y.Y., Chen, H.C. 1998b. Blocking polar body with cytochalasin B in the fertilized eggs of the small abalone, *Haliotis diversicolor supertexta* (Lischke), and the development and ploidy of the resultant embryos. *Aquaculture Res.* 29: 775-783.
- Zar, J.H. 1999. Biostatistical Analysis. Prentice-Hall international. New Jersey, USA. Englewood Cliffs.
- Zhang, G., Wang, Z., Chang, Y., Song, J., Ding, J., Wang, Y., Wang, R. 1998. Triploid induction in Pacific abalone, *Haliotis discus hannai* Ino, by 6-dimethylaminopurine and the performance of triploid juveniles. *J. Shellfish Res.* 17(3): 783-788.

## DISCUSIÓN GENERAL

En este trabajo se lograron avances significantes en el desarrollo de biotecnologías de poliploidía para tres especies de moluscos nativos del noroeste de México. Para dos de las especies (abulón rojo y almeja mano de león) se sentaron bases del conocimiento asociadas a la inducción a la triploidía, mientras que para la tercera especie, almeja catarina, se sentaron bases para la inducción a la tetraploidía.

Adicionalmente a definir la mejor metodología de inducción a la poliploidía, se lograron definir algunos de los efectos que la condición de triploide tiene sobre los organismos, como fue el conocer el efecto de la condición de triploide sobre la gametogénesis, pero evaluada a un nivel no previamente reportado en moluscos, esto es, con base en la frecuencia de células gaméticas sexuales específicas para cada sexo, lo cual permitió definir los estadios de la ovogénesis y espermatogénesis en donde ocurre un arresto de la meiosis en triploides, y proponer un mecanismo genético de arresto o inhibición de la meiosis.

Finalmente, otro de los conocidos efectos de la triploidía, el crecimiento, fue evaluado en una de las tres especies mencionadas, la almeja mano de león, con el fin de definir el potencial productivo de este tipo de organismo en cultivo. Los resultados obtenidos en esos estudios representan los primeros publicados para moluscos bivalvos en cuanto a, no solamente una falta de superioridad del triploide cuando se le compara con el diploide, sino de hecho la ocurrencia de un menor crecimiento del triploide que del diploide, lo cual afirma la necesidad de no solamente desarrollar biotecnologías de inducción a la triploidía, sino de conocer sus efectos antes de promover el uso de este tipo de organismo para el cultivo.

A continuación se discutirán los aspectos de mayor relevancia encontrados en estos estudios con relación a la inducción a la poliploidía (tri- y tetraploidía), y los efectos de la triploidía sobre la gametogénesis en dos de las especies, y del crecimiento en una de las especies. A mayor detalle dada la novedad de ese tema, se discuten los posibles mecanismos involucrados en el arresto o inhibición de la meiosis en organismos triploides.

### ***Inducción a la poliploidía***

#### **Inducciones a la triploidía en abulón rojo *Haliotis rufescens* y en almeja mano de león *Nodipecten subnodosus***

La producción de triploides en ambas especies, basada en el bloqueo de la liberación del segundo cuerpo polar o inhibición de la segunda división meiótica (Fig. 5, Antecedentes), se logró al igual que con otros moluscos (Tabla 1, Antecedentes), utilizando el compuesto químico conocido como citocalacina-B (ó CB), un compuesto originalmente desarrollado como un antibiótico, que se sabe afecta la polimerización de las fibras de actina que producen la constricción durante las divisiones celulares, y en el caso específico de la inducción a la poliploidía, afecta la formación de los cuerpos polares (Longo, 1972).

Previamente a las inducciones realizadas, y para cada una de las especies evaluadas se determinaron los tiempos óptimos de inicio y término de la inducción en un grupo de ovocitos fertilizados, basando esos tiempos en el seguimiento de los eventos meióticos y primera mitosis en cada especie que sería inducida (Fig. 1 y 2, Este capítulo), estimando las frecuencias de ocurrencia de cada evento en el tiempo. Las frecuencias obtenidas de esta forma se utilizaron en la definición de los mejores tiempos de inicio y conclusión del

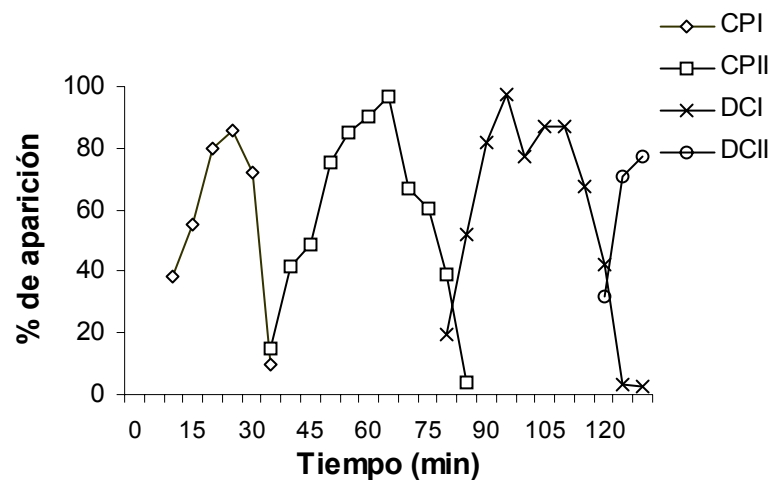


Fig.1 Tiempos de aparición de cada uno de los eventos celulares en abulón rojo.

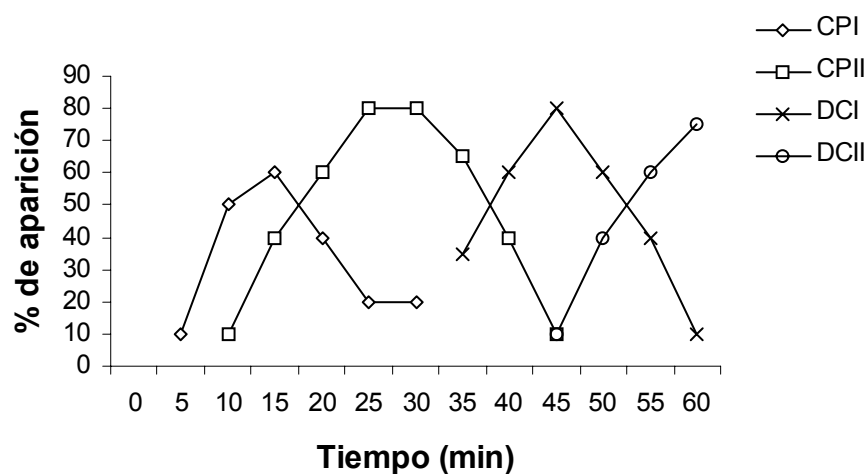


Fig.2. Tiempos de aparición de cada uno de los eventos celulares de almeja mano de león.

tratamiento. La inducción se realizó siguiendo protocolos ya descritos por otros autores (Allen y Bushek, 1992) para lograr la mayor efectividad en la inhibición de la formación del segundo cuerpo polar en moluscos, en los que se recomienda iniciar el tratamiento con



CB cuando se observa aproximadamente el 50% de los ovocitos en un grupo control habiendo liberado el primer cuerpo polar, y continuando con el tratamiento durante el tiempo requerido para que 50% de los ovocitos alcancen la liberación del segundo cuerpo polar. Otro de los factores conocidos como importantes en lograr un alto éxito en la inducción a la triploidía en moluscos es que el uso de familias o desoves individuales (Eudeline *et al.*, 2000; Ruiz-Verdugo *et al.*, 2001) es lo más adecuado, ya que el éxito en la producción de triploides depende en gran parte de una alta sincronía en el desarrollo de los eventos meióticos, la cual es mayor dentro de un mismo desove que entre desoves. Este factor pudo ser controlado solamente en las inducciones a la triploidía en almeja mano de león pero no en abulón, debido a que la talla de los reproductores de abulón disponibles no permitió obtener suficientes huevos de un solo organismo para las inducciones con diferentes concentraciones de CB. Finalmente, otro factor menos evaluado, pero previamente reportado (Utting y Doyou, 1992) como importante en alcanzar altos éxitos en la inducción a la triploidía es la calidad del huevo utilizado. La calidad del huevo puede ser evaluada a un nivel bioquímico, o alternativamente puede ser evaluada por la supervivencia larvaria inicial. Adicionalmente, puede ser evaluada indirectamente midiendo la sincronización en eventos meióticos, ya que se sabe que huevos con una baja reserva energética presentan la característica de asincronía de la tasa meiótica (Allen y Bushek, 1992; Utting y Doyou, 1992; Eudeline *et al.*, 2000; Ruiz-Verdugo *et al.*, 2001).

Los estudios de inducción a la triploidía realizados con el abulón rojo incluyeron tres experimentos en el laboratorio comercial Abulones Cultivados (Eréndira, Baja California), los cuales se llevaron a cabo en diferentes temporadas del año: mayo ó primavera, septiembre ó verano, y noviembre ó otoño. El hecho de realizar esos diferentes

experimentos durante diferentes épocas del año permitió establecer que otros factores diferentes a la concentración de CB intervinieron en el éxito logrado a la triploidía en esta especie. Esto fue evidenciado por los resultados diferentes obtenidos entre las inducciones de mayo y noviembre, donde se manejaron concentraciones similares de CB, y sin embargo los resultados obtenidos fueron muy diferentes. A partir de esos resultados se analizaron algunos de los factores que pudiesen intervenir en el éxito alcanzado en las diferentes inducciones. Estos factores fueron: temperaturas diferentes durante cada inducción, el uso de distintas concentraciones de CB, y posibles diferencias en la calidad del ovocito derivadas de diferencias en las reservas energéticas presentes en la temporada del año en la cual se llevó a cabo cada inducción. El primer factor, la temperatura del agua durante cada inducción es importante, ya que se ha reportado que los eventos meióticos ocurren más rápido a mayores temperaturas (Downing y Allen, 1987). Sabíamos que para las tres inducciones la temperatura del agua había sido diferente, con la temperatura más alta habiendo ocurrido durante la inducción de septiembre. Durante las otras dos inducciones, en mayo y noviembre, la temperatura fue similar (aprox. 15 °C), pero los resultados fueron diferentes en cada una de esas inducciones (Tabla 1, sección 1, Capítulo IV). Sin embargo, cuando analizamos las tasas meióticas para cada experimento se observó que la meiosis fue más lenta en septiembre, cuando se tuvo la mayor temperatura, alcanzando a liberarse el 50% del primer cuerpo polar en 40 min., mientras que en noviembre el mismo porcentaje de cuerpos polares en ovocitos fue liberados en 27 min. Esto nos señaló hacia otro factor distinto a la temperatura afectando el éxito en la inducción a la triploidía. Un segundo factor es la concentración de CB y el tiempo de duración del tratamiento. Este factor por sí mismo tampoco explica las diferencias observadas entre inducciones ya que para las

inducciones en septiembre y noviembre se utilizaron dosis similares, siguiendo el mismo criterio biológico definido por Allen y Bushek (1992), esto es, iniciar el tratamiento cuando 50% de los ovocitos presentan el primer cuerpo polar y concluirlo cuando 50% presentan el segundo cuerpo polar, pero los resultados fueron muy diferentes. Mientras que incrementos en la concentración de CB han sido reportados como un factor asociado con un mayor éxito a la triploidía (Tabla 1, Antecedentes), nuestros resultados no pueden ser explicados solamente por ese factor. Un tercer factor es la calidad reproductiva de los organismos utilizados para obtener huevos durante cada una de las inducciones a la triploidía. Se ha publicado que el ciclo reproductivo del abulón rojo en Baja California presenta actividad gametogénica de mayo a diciembre, y alcanzando la madurez sexual alrededor de septiembre (Ortiz-Quintanilla et al., 1990), con el pico de desove ocurriendo entre octubre y diciembre (Molina-Martínez, 1983). Desoves en condiciones de laboratorio con esta especie son generalmente inducidos a partir de los meses de noviembre y diciembre, logrando producir larva en ocasiones hasta el mes de mayo (Steve Walker, BC Abalone, comunicación personal). Durante las inducciones realizadas en diferentes meses se observó que aun cuando se podían obtener reproductores aparentemente maduros en todos ellos, los números obtenidos durante las inducciones en mayo fueron menos que los obtenidos durante noviembre, y los obtenidos durante septiembre fueron aun menos que para las otras dos inducciones. Dada esta información, se postuló que el factor de mayor importancia afectando los resultados obtenidos en las tres diferentes inducciones fue la calidad reproductiva, o calidad del huevo utilizado en las inducciones. Debido a que no se evaluó la calidad de huevo directamente (i.e. composición bioquímica), una medida alterna de calidad de huevo propuesta por Aldridge *et al.* (1990) fue utilizada para comparar entre

inducciones: la supervivencia a larva trocófora en grupos controles y el coeficiente de variación de la supervivencia entre inducciones. La mayor supervivencia y menor coeficiente de variación en supervivencia entre réplicas de controles ocurrió durante la inducción de noviembre, seguida por la inducción en mayo, y finalmente con la menor supervivencia y el mayor coeficiente de variación de la supervivencia fue la inducción en septiembre. Una alta calidad de huevo no solo repercute en una alta supervivencia, sino en una alta sincronización de los eventos meióticos (Utting y Doyou, 1992), resultando por lo tanto en un mayor éxito a la triploidía. En el caso particular de las inducciones a la triploidía en el abulón rojo, la sincronización en eventos meióticos pudo ser evaluada indirectamente como el tiempo requerido para que el 50% de los ovocitos alcanzaran la liberación del primer cuerpo polar, y el coeficiente de variación de esas tasas meióticas permite una comparación en grado de sincronización. Esa evaluación nos permitió definir la ocurrencia de una mayor asincronía de tasa meiótica en septiembre que en noviembre, ya que el coeficiente de variación en tasa meiótica durante la inducción de septiembre fue del doble (33%) que el coeficiente de variación estimado para la tasa meiótica durante noviembre (16%). En conclusión, la dosis de CB utilizada en inducciones a la triploidía de abulón rojo puede tener un efecto cuando la calidad de huevo no es óptima, y tratamientos más largos serán requeridos para lograr incrementar el éxito a la triploidía. Esto último posiblemente asociado con una tasa meiótica más lenta. Por otro lado, cuando la condición reproductiva es alta, la dosis de CB no parece tener efecto en el éxito a la triploidía, pero si puede afectar la supervivencia a larva trocófora, posiblemente por efectos de toxicidad del químico mismo.

Para la segunda especie en la cual se evaluó la inducción a la triploidía, la almeja mano de león, no se tuvo problemas en la obtención de organismos maduros ya que la maduración de estos organismos se realiza bajo condiciones controladas de laboratorio siguiendo metodologías previamente establecidas para especies afines (Ramírez *et al.*, 1999). Durante la inducción a la triploidía, el tiempo de aplicación y duración del tratamiento fueron establecidos sobre la base de los tiempos en cada uno de los eventos meióticos que ocurren a una temperatura de 21 °C (Fig. 2, Este capítulo). Se siguieron las recomendaciones para la optimización de los tiempos de inducción basados en eventos meióticos de desoves individuales (Eudeline *et al.*, 2000), esto es, utilizando un grupo control en cada desove para seguimiento de los eventos meióticos, iniciando el tratamiento cuando 50% de los ovocitos en ese desove en particular presentaron el primer cuerpo polar y concluyendo el tratamiento cuando 50% presentaron el segundo cuerpo polar.

Se logró determinar para esta especie la dosis óptima de CB al evaluar tres concentraciones (0.5, 0.75, y 1 mg/L) de este químico, encontrando que la concentración de 0.75 mg CB/L es la más adecuada para producir triploides en la almeja mano de león. En esta conclusión va implícito el hecho de que no solo es importante el éxito a la triploidía, sino también la supervivencia obtenida, la cual fue menor a mayor concentración de CB. Entonces, a pesar de que el mayor porcentaje de triploides (95.5%) se obtuvo cuando se utilizó 1 mg de CB/L, la menor supervivencia se observó en este mismo grupo. La asociación inversa entre la supervivencia obtenida en inducciones a la triploidía con dosis crecientes de CB, y la asociación positiva de la dosis con el éxito logrado ha sido observada para otras especies de moluscos (Downing y Allen, 1987; Barber *et al.*, 1992; Zeng *et al.*,

1995), y no requiere mayor discusión, ya que se sabe que altas dosis de CB son tóxicas, pero altas dosis pueden ser necesarias para lograr inhibir la formación de cuerpos polares.

En conclusión, los estudios realizados sobre la inducción a la triploidía en dos especies nativas, abulón rojo y almeja mano de león, nos indican la factibilidad de producir organismos triploides. Así mismo, estos resultados han permitido esclarecer que la condición reproductiva de los organismos utilizados para obtener el huevo a inducir es un factor determinante en el éxito alcanzado a la triploidía. Otro factor determinante fue la dosis de CB, por su relación con la supervivencia resultante, observándose en general que las dosis más altas evaluadas produjeron el mayor porcentaje de triploides siempre y cuando la condición reproductiva de las hembras fuera la adecuada, pero las dosis más altas también resultaron en la menor supervivencia.

La inducción a la triploidía en abulón rojo debe llevarse a cabo utilizando una concentración máxima de CB de 0.75 mg/L, con una probabilidad alta de obtener hasta 100% de triploides, y una supervivencia alrededor de 24% a 50%. En la almeja mano de león la misma concentración máxima que en abulón (0.75 mg CB/L) resultará en un alto porcentaje de triploides (aprox. 75%) con una supervivencia a semilla igual que la concentración de 0.5 mg CB/L, y mucho mayor que la obtenida cuando se utilizó 1 mg CB/L. En ambos casos la inducción debe llevarse a cabo cuando 50% de los ovocitos en un grupo control muestren la extrusión del primer cuerpo polar, y concluirse cuando 50% presenten el segundo cuerpo polar. Si el número de huevos obtenidos de un sólo reproductor es alto, las inducciones deben realizarse en forma individual por desove con fines de obtener la máxima sincronización de los eventos meióticos.

### **Inducción a la tetraploidía en almeja catarina, *Argopecten ventricosus***

La almeja catarina diploide presenta la característica de ser hermafrodita funcional, desarrollando en un solo saco gonadal simultáneamente ovocitos y espermias, cada uno en una región de la gónada. La expulsión de gametos es sincrónica, esto es, ambos gametos son liberados en un solo desove intermitentemente. Por otro lado, la almeja catarina triploide se caracteriza por presentar solamente un tipo de gameto (ovocitos) cuando madura, (Ruiz-Verdugo *et al.*, 2000), y por tener una fecundidad altamente reducida (Ruiz-Verdugo *et al.*, 2001) cuando se le compara con la del diploide. Esta característica del triploide, en donde no se forman espermatozoides, permitió evitar que la autofecundación de cierto porcentaje (10-20%, datos no publicados) de los huevos redujera el éxito en la conformación de tetraploides. Esto se debe a que durante la inducción a la poliploidía, la existencia de huevos autofecundados reduce el número de huevos que serán inducidos a retener uno u otro cuerpo polar, ya que el desarrollo cigótico de los huevos autofecundados inicia anticipadamente a los fertilizados artificialmente. La importancia de esto radica en el hecho de que como ya se mencionó, el triploide de almeja catarina produce ovocitos pero en bajo número, lo cual puede resultar en un muy bajo número de larvas trocóforas debido a la baja supervivencia asociada al tratamiento con CB, y la autofecundación de un porcentaje de esos pocos huevos resultaría aun en un menor éxito.

La instrumentación de la metodología desarrollada por Guo y Allen (1994b) en almeja catarina para la producción de tetraploides del ostión Japonés resultó en la producción de tetraploides, habiendo sido este el único método de los tres evaluados por el cual se logró la producción de tetraploides viables, aunque un segundo método resultó en la producción de larva-D tetraploide mas no semilla tetraploide. Los tres métodos evaluados para la

inducción a la tetraploidía fueron: inhibición del primer cuerpo polar en ovocitos de diploides, inhibición de la primera división celular en cigotos de diploides, e inhibición del primer cuerpo polar en ovocitos de triploides. Los tetraploides producidos con el método de inhibición del primer cuerpo polar de ovocitos de diploides no fueron viables, observándose por citometría de flujo la presencia de tetraploides en estadios tempranos de larva-D, pero no en estadios de semilla. Sin embargo, los tetraploides producidos como resultado de la inhibición del primer cuerpo polar en ovocitos de triploides si produjeron semilla y juveniles tetraploides. La falta de éxito en producir tetraploides viables a semilla o tallas adultas cuando se utiliza como método de inducción la inhibición del primer cuerpo polar en ovocitos de diploides ha sido ampliamente documentada en otras especies de moluscos, entre ellas el abulón asiático (Zhang *et al.*, 2000), el mejillón (Scarpa *et al.*, 1993; Cai y Beaumont, 1996), los ostiones y ostras (Stephens y Downing, 1988; Gendreau y Grizel, 1990; Guo *et al.*, 1992a; 1992b), otros pectínidos (Yang *et al.*, 2000), y una almeja del grupo de los Venéridos (Diter y Dufy, 1990; Allen *et al.*, 1994). De hecho, la formación de tetraploides cuando se inhibe el primer cuerpo polar en ovocitos de diploides se considera un evento incidental y de baja frecuencia de ocurrencia, ya que el producto esperado de esa inhibición es un triploide. La ocurrencia de tetraploides resultando de ese tipo de inhibición posiblemente esta relacionado con una segregación cromosómica tripolar: unipolar en la meiosis II. Esto resultaría en que en forma aleatoria algunos ovocitos retendrían 3 juegos de cromosomas, y el cuarto juego de cromosomas saldría en el segundo cuerpo polar. La singamia del núcleo femenino con el masculino producirá de esta forma en un cigoto tetraploide.



Guo (1991, citado por Guo y Allen, 1994b) propuso que una posible causa de la falta de viabilidad en tetraploides producidos a partir de huevos de diploides puede ser un reducido tamaño nuclear y celular en el ovocito diploide, el cual no es capaz de permitir el acomodo de los cromosomas en el núcleo, ni de contener los componentes bioquímicos y energéticos requeridos para mantener y replicar un cigoto con el doble de cromosomas. Mientras que esto puede ser una causa de la no viabilidad de los cigotos tetraploides derivados directamente de diploides, existen otras explicaciones. Por ejemplo, eventos incidentales de baja frecuencia como la ocurrencia de un bajo porcentaje de tetraploides al inhibir la meiosis I pueden resultar a consecuencia de un problema presente en la metafase, con todos los cromosomas duplicados alineados en pares homólogos, y con una segregación ‘perfecta’ de una sola cromátida al cuerpo polar, reteniéndose un homólogo duplicado y una cromátida del otro homólogo en el ovocito. Debido a la baja viabilidad de los tetraploides resultantes de estos eventos, se puede proponer que la segregación no es ‘perfecta’, y que ocurren casos de aneuploidía, en los cuales alguno de los cromosomas del complemento total se presenta en forma haploide. Es conocido que alteraciones en el balance euploide resultan en baja viabilidad de los organismos (Guo *et al.*, 1992; Yang *et al.*, 2000; Peruzzi y Guo, 2002), con la letalidad de esta condición dependiendo del cromosoma faltante, y ocurriendo en diferentes estadios del desarrollo inicial de los organismos. La ocurrencia de este tipo de segregación con aneuploidía como causa de la no viabilidad de tetraploides producidos a partir de la inhibición del primer cuerpo polar en huevos de diploides podrá ser resuelto en un futuro a través de la aplicación de técnicas como GISH (por sus siglas en inglés ‘*genomic in situ hybridization*’, o hibridación

genómica in situ), evaluando esto en los embriones en desarrollo resultantes de la inhibición del primer cuerpo polar.

La ocurrencia de segregación anormal en huevos de triploides inhibidos en la formación del primer cuerpo polar demuestra que la segregación durante la metafase II no es 'perfecta'. Esto es, a pesar de que el tamaño del núcleo de un ovocito triploide es 1.5 veces mas grande que el del diploide, y el tamaño celular es mayor en el triploide que el diploide (Tabla 1, Capítulo 1), la segregación resultante de inhibir el primer cuerpo polar en ovocitos de triploides resulta en la producción de cigotos con una gama de ploidías y aneuploidías (Guo y Allen, 1994c; Ruiz-Verdugo *et al.* 2001; tabla 1, Capítulo 1) aun mayor que la que ocurre en la inhibición del primer cuerpo polar en ovocitos de diploides. Esto parece indicar que el problema principal en la producción de tetraploides esta asociado a la segregación de los cromosomas durante la metafase, y será importante elucidar esto en un futuro.

En conclusión, el único método que produjo tetraploides viables hasta estadios avanzados (semilla) fue el desarrollado por Guo y Allen (1994b), el cual involucra la formación de triploides y el uso de las hembras 'fértils' para inducir sus huevos a la tetraploidía por inhibición del primer cuerpo polar posteriormente a ser fertilizados con esperma haploide. La almeja Catarina representa la tercera especie a nivel internacional para la cual este método ha sido demostrado como el que permite la producción de tetraploides viables, habiendo sido la primera especie el ostión Japonés (Guo y Allen, 1994b) y la segunda la ostra perlera *Pinctada martensii* (He *et al.*, 2000).

### ***Gametogénesis y Crecimiento en la Almeja Mano de león Triploide***

La gametogénesis en organismos diploides de la almeja mano de león procedió normalmente y de acuerdo a estudios previos en esta misma especie (Reinecke-Reyes, 1996; Barrios *et al.*, 1997; Racotta *et al.*, 2003; Arellano-Martínez *et al.*, sometido). Se observó una delimitación de fases del ciclo gametogénico, con un pico anual de maduración localizado entre los meses de agosto y septiembre, y un periodo de reposo después de tal pico, para posteriormente iniciar nuevamente la maduración durante el segundo año, presentando el pico durante el mismo periodo que el año previo. Por otro lado, la gametogénesis de los triploides, no diferenciable entre diploides y triploides al inicio de la misma, se caracterizó por que los triploides no avanzaron más allá de la gametogénesis inicial en ambas regiones gonadales (masculina y femenina), resultando en una esterilidad entre el 95% y 100%.

Durante estos estudios, para los cuales se utilizó la semilla superviviente de los grupos inducidos con una concentración de CB de 0.5 y 0.75 mg/L, la triploidía en esta talla de semilla fue de 60%. Esto se traduce en que de cada 10 organismos muestreados dentro del grupo tratado para la triploidía, 6 eran triploides y 4 diploides. Este tipo de diploide, uno representando huevos 'refráciles' a la triploidía, permitió el realizar una comparación del crecimiento no solamente entre un grupo control diploide y uno triploide, sino también con un grupo diploide tratado. La ventaja del grupo diploide tratado al utilizarlo en comparaciones con los triploides radica en el hecho de que esos organismos fueron crecidos juntos desde estadios larvarios, evitando efectos diferenciales de tanque y canasta durante la engorda, lo cual permitió el poder establecer sin dudas que el triploide de almeja mano

de león evaluado en el ambiente de Rancho Bueno (Bahía Magdalena) no presenta ventajas en el crecimiento sobre el diploide, ya sea el diploide tratado o el diploide control.

En forma general, reportes previos sobre crecimiento en moluscos triploides (vs. diploides) han manifestado la ventaja de estos, presuntamente dada a consecuencia del inicio de la maduración en los diploides (Stanley *et al.*, 1984; Barber y Mann, 1991; Guo y Allen, 1994a; Hand *et al.*, 1998; Ruiz-Verdugo *et al.*, 2000). Fue interesante el hecho de que, la falta de ventaja en crecimiento en la almeja mano de león triploide ocurrió a pesar de que se presentó una esterilidad prácticamente total en ambas gónadas, esto es, no maduraron como el diploide. El único rasgo que presentó superioridad en el grupo triploide de almeja mano de león fue el índice muscular, un rasgo derivado de una proporción que posiblemente resultó no de una ventaja real del triploide, sino del hecho de que los triploides tenían un peso de tejido menor que el de los diploides. Los resultados observados en almeja mano de león contrastan con estudios previos comparando diploides y triploides de otro Pectínido, la almeja Catarina en la misma zona de engorda, especie para la cual se encontró un aumento significativo en peso total, peso del músculo aductor e índice muscular en triploides (Ruiz-Verdugo *et al.*, 2000). Otras especies de escalopas en las que los triploides han manifestado una superioridad sobre los diploides son *Chlamys farreri*, *Chlamys nobilis*, y *Argopecten irradians* (Tabarini, 1984; Komaru y Wada, 1989; Lin *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 2000). Lo poco común del resultado obtenido en almeja mano de león triploide en cuanto a su crecimiento hizo importante el analizar algunas de las posibles causas para este resultado. Una de ellas podría haber sido la ocurrencia de diferentes densidades de cultivo para el grupo tratado (triploides y diploides) que para el grupo control diploide, causado por una posible mortalidad diferencial durante el cultivo en

campo. Sin embargo, el análisis de supervivencia a lo largo de los meses de cultivo nos indicó que este factor no intervino en los resultados observados, ya que no hubo diferencias en supervivencia entre los grupos control y tratado, y el número de organismos muestreado en cada grupo siempre fue el mismo.

Otro factor importante de considerar es la estabilidad (o falta de) del porcentaje de triploides a lo largo del tiempo de cultivo. Esto se debe a que se conoce que en otras especies, por ejemplo el ostión *C. gigas*, se presenta una reversión de triploidía a mosaicos ( $3n/2n$ ) y a diploides a lo largo del tiempo durante la engorda a talla comercial (Allen *et al.*, 1996 y 1999). Sin embargo, el análisis de ploidías presentes a lo largo del cultivo de la almeja mano de león realizado en forma individual (organismo por organismo) no indicó que el porcentaje de triploidía haya disminuido a lo largo del periodo de crecimiento evaluado.

Dado que no ocurrió ninguno de los factores más comunes que se sabe que podrían haber resultado en una interpretación errónea de los resultados obtenidos en cuanto a la falta de ventaja del triploide de almeja mano de león, el siguiente paso fue el analizar las posibles causas para que ninguna de las hipótesis presentadas a la fecha como aquellas que determinan la superioridad del triploide ocurriera en esta especie. Esas hipótesis plantean que: 1. existe un excedente de energía para crecimiento en triploides debido a la esterilidad e inhibición de la maduración, 2. existe un incremento en volumen celular sin compensación en número celular (Guo y Allen, 1994a), y 3. los organismos triploides presentan una mayor heterocigosidad que los diploides, haciendo a los primeros más ‘aptos’ (Stanley *et al.*, 1984). La primera hipótesis para explicar la superioridad del triploide ha sido evaluada para diferentes especies de moluscos, y es la más aceptada a la

fecha, ya que de hecho se ha observado una mayor cantidad de glicógeno o lípidos de reserva en organismos triploides que en diploides (Allen y Downing, 1986; 1990; Akashige y Fushimi, 1991; Shpigel *et al.*, 1992; Gerard *et al.*, 1999). La segunda hipótesis no puede ser descartada para el presente caso, ya que aunque sabemos que el tamaño celular de los pocos gametos producidos fue mayor en triploides, desconocemos si hubo un incremento en tamaño de otras células. Por otro lado, de haber existido un incremento en tamaño celular, éste no se tradujo en una ventaja, aunque se desconoce si hubo una compensación en número de células. La tercera hipótesis tampoco fue evaluada, pero no existen razones para suponer que los triploides presentaron una menor heterocigosidad que los diploides ya que los progenitores utilizados fueron de origen silvestre, no previamente producidos en laboratorio y con la probabilidad de una reducción en heterocigosidad. Regresando a la primera de las tres hipótesis esta nos permitió hacer una propuesta para explicar los resultados obtenidos: cuando en la especie evaluada no existe un almacenamiento de energía para la reproducción, no habrá energía de reserva para canalizar al crecimiento aun con esterilidad total. Esta hipótesis se deriva de conocimiento generado en estudios previos con esta misma especie, en los cuales se observó que los organismos de esta misma especie cultivados en el ambiente de Rancho Bueno – Bahía Magdalena presentaban un comportamiento reproductivo ‘oportunistico’, esto es, presentaban un desarrollo de la gametogénesis con o sin transferencia de energía de tejidos de almacenamiento (Racotta *et al.*, 2003). Sin embargo, cuando esta especie es cultivada en otro ambiente, Laguna Ojo de Liebre, no presentó la estrategia reproductiva antes mencionada, observándose en este caso un almacenamiento de energía y su transferencia para la reproducción (Arellano-Martínez *et al.*, 2003).

Sin embargo, mientras que la falta de almacenamiento de energía en tejidos de la almeja mano de león cuando se le cultiva en Rancho Bueno explica parcialmente la falta de ventaja en crecimiento del triploide sobre el diploide, esto no explica por qué el triploide no canaliza al crecimiento la energía obtenida por alimentación durante el proceso de gametogénesis en diploides, sobre todo si es claro que no la utilizará en la maduración de gametos puesto que es prácticamente estéril. Es importante recordar (Capítulo 3) que el triploide de hecho presentó un menor crecimiento que ambos grupos de diploides (control y tratados), lo cual podría ser considerado como un indicador de una deficiencia en filtración o asimilación del alimento en el triploide en este ambiente. Interesantemente, estudios previos en el ostión de roca australiano, *Saccostrea commercialis*, han indicado que la concentración de alimento puede ser un factor determinante en la superioridad de los ostiones triploides. Esto es, cuando este ostión fue crecido bajo concentraciones de microalgas mayores a 6 mg/L el ‘marco o potencial de crecimiento’ (del inglés ‘scope for growth’) de los triploides fue menor que el de los diploides como consecuencia de una reducción en la tasa de aclaración y un incremento en la energía de respiración (Kesarodi-Watson *et al.*, 2001). A pesar de que en este trabajo no se evaluó la tasa de filtración ni la concentración disponible de microalgas en el sitio de cultivo, se sabe que Bahía Magdalena está localizada dentro de uno de los tres centros de actividad biológica (CAB, o BAC’s por sus siglas en inglés) en la Península de Baja California (Lluch-Belda, 2000). Estos CAB’s se caracterizan por presentar concentraciones de clorofila-*a* muy altas, ocurriendo la concentración mas alta en el CAB de Bahía Magdalena (Garate-Lizárraga *et al.*, 2000), encontrándose aquí un orden de magnitud de 4 veces la concentración de clorofila presente en otro de los CAB’s, precisamente el que comprende a Laguna Ojo de Liebre. La

distribución de la almeja mano de león en la costa oeste de la Península incluye desde Ensenada B.C. hasta Bahía Magdalena B.C.S., aunque el hábitat en el que se le encuentra en ese gradiente varía. Esto es, se le encuentra en forma abundante dentro de lagunas en la parte norte, y preferentemente fuera de lagunas o esteros, esto es, en la plataforma continental en la parte sur. En otros pectínidos el hábitat en el que se encuentra una misma especie en su rango latitudinal parece responder a dos factores, las condiciones de temperatura y la concentración de materia orgánica particulada. Incrementos en la concentración de materia inorgánica particulada tiene un efecto negativo sobre la eficiencia de asimilación y el crecimiento (Brand, 1991). Para juveniles (4.5 a 6.5 cm de altura) de la almeja mano de león en particular se sabe que la tasa de aclaramiento varía inversamente proporcional a la concentración de partículas, encontrándose el rango óptimo de tasa de aclaramiento entre  $1.7 \times 10^4$  y  $8.0 \times 10^4$  cel/ml (López-Sánchez, 2003, López-Sánchez *et al.*, 2003). En el sistema de Bahía Magdalena, el CAB más productivo en la Península de Baja California, las menores concentraciones de microalgas reportadas han sido de  $8 \times 10^5$  cel/ml, y las mayores concentraciones reportadas como hasta  $50 \times 10^9$  cel/ml, lo cual podría indicar un efecto ‘negativo’ de la alta productividad sobre el crecimiento o eficiencia alimenticia de esta especie en particular.

Lo anterior, aunado al hecho que se conoce que esta especie presenta dos estrategias reproductivas (Racotta *et al.*, 2003; Arellano-Martínez *et al.*, 2003) que ocurren dependiendo del medio ambiente en donde se le crece, permite proponer que el medio ambiente tiene un impacto significativo en el crecimiento de los triploides, tanto como resultado de la estrategia reproductiva que ocurra en ese ambiente como de la concentración de alimento o partículas en suspensión.



***El efecto de la triploidía sobre la frecuencia de diversos tipos de células sexuales y su asociación con eventos meióticos***

Se sabe que la condición de triploidía afecta la gametogénesis produciendo un desarrollo reducido de la gónada y resultando en una esterilidad total en donde no se forman gametos, o en una esterilidad parcial en donde se produce un número reducido de gametos. El efecto de la triploidía sobre la esterilidad varía entre especies (Beaumont y Fairbrother, 1991) e incluso dentro de la misma especie (Ruiz-Verdugo *et al.*, 2001). Sin embargo, los eventos específicos durante la gametogénesis afectados por la condición de triploidía no se habían estudiado a detalle, aunque se infería por estudios en otros organismos que la esterilidad tenía que ver con dos eventos específicos asociados a la presencia de un tercer juego de cromosomas: 1. problemas de sinapsis de cromátidas hermanas durante la profase I y, 2. problemas durante el apareamiento de cromosomas homólogos durante la metafase I.

La meiosis, o el proceso mediante el cual ocurren las reducciones cromosómicas necesarias para la formación de gametos haploides, inicia en el núcleo de las células germinales en el tejido gonadal. La meiosis en organismos triploides, si no es inhibida, no concluye con un complemento cromosómico haploide. Por ejemplo, en el ostión Japonés, *Crassostrea gigas*, la meiosis no es completamente inhibida en machos (Allen y Downing, 1990; Guo y Allen, 1994c), y los espermias producidos contienen una cantidad de ADN mayor (1.5x) que un esperma normal haploide (1x) (Allen, 1987; Guo y Allen, 1994c). Este tipo de evento sin duda produce espermias disómicos, con algunos de los cromosomas del complemento haploide estando representados en 2 copias, mientras que otros estarán

representados en una copia. El cigoto resultante de la fertilización de este tipo de esperma no es viable (Guo y Allen, 1994c), y esto posiblemente este asociado con la presencia de múltiples trisomías (3 copias de uno o mas cromosomas).

Contrario a lo observado en el ostión Japonés, en la almeja Catarina triploide la inhibición de la meiosis en la gónada masculina es prácticamente total, aunque en raras ocasiones se observaron espermatozoides por microscopia electrónica de transmisión. El arresto de la meiosis ocurrió en el estadio de espermatozocito primario, observándose que estos se encontraban en el estadio de cigoteno-paquiteno de la profase en meiosis I. Este estadio puede ser reconocido por el arreglo de la cromatina en el núcleo, la cual se observa en forma de 'racimos' (Dorange y LePenec, 1989a). Es durante el estadio de cigoteno que la sinapsis de cromosomas se inicia (Dorange y LePenec, 1989b; Beninger y LePenec, 1991), por lo que fue posible concluir que la esterilidad en la gónada masculina de la almeja Catarina ocurrió a consecuencia de un problema de sinapsis de cromátidas hermanas cuando tres juegos de cromosomas existen.

Al igual que en la almeja catarina, la inhibición de la meiosis en almeja mano de león fue prácticamente total. En la almeja mano de león triploide el espermatozocito primario no pudo ser diferenciado del espermatozocito secundario, sin embargo, el hecho de que la espermatogénesis se caracterizó por la presencia preponderante de espermatozocitos, y solo en el segundo pico de maduración de los diploides se observaron algunos espermatozoides, permite concluir que la meiosis fue inhibida durante el estadio de cigoteno-paquiteno. Similarmente a lo observado en ambos Pectínidos evaluados en el presente trabajo, la almeja catarina y la almeja mano de león, la inhibición prácticamente total de la meiosis en espermatozocito primario ha sido reportada para el ostión de roca Australiano (*Saccostrea*

*commercialis*) y el mejillón (*Mytilus galloprovincialis*) (Cox *et al.*, 1996; Kiyomoto *et al.*, 1996).

En la gónada femenina de la almeja catarina triploide, se observó que el tipo de célula gametogénica mas común durante todo el ciclo reproductivo fue el ovocito previtelogénico, aunque otros tipos de células gametogénicas como ovocitos vitelogénicos, postvitelogénicos y maduros también ocurren, en muy baja frecuencia. Esto ultimo contrasta con lo observado en la almeja mano de león, para la cual también el ovocito previtelogénico fue el tipo de célula gametogénica mas común, pero no se observaron tipos de ovocitos mas avanzados, con la excepción de algunos postvitelogénicos aislados, pero ningún ovocito maduro. Mientras que una esterilidad total de la gónada femenina ha sido reportada para *Crassostrea gigas*, *Chlamys nobilis*, *Mytilus galloprovincialis* (Allen y Downing, 1986; Komaru y Wada, 1989; Kiyomoto *et al.*, 1996), y una esterilidad parcial ha sido observada en *Mulinia lateralis*, *Crassostrea gigas*, *Tapes philippinarum*, *Argopecten ventricosus* (Guo y Allen, 1994a; 1994b; 1997; Utting *et al.*, 1996; Ruiz-Verdugo *et al.*, 2000; 2001), ninguno de esos estudios previos evaluaron el tipo de ovocito más común en triploides. La importancia de esto radica en que, en general, estudios previos de la gametogénesis en triploides llevaron a concluir que la gametogénesis en triploides estaba ‘retrasada’ con relación a la observada en diploides (Allen *et al.*, 1986; Allen, 1987; Allen y Downing, 1990; Guo y Allen, 1994b; Cox *et al.*, 1996; Eversole *et al.*, 1996; Kiyomoto *et al.*, 1996; Komaru y Wada, 1989; 1990; Ruiz-Verdugo *et al.*, 2000). Esta conclusión implica que existe la posibilidad de que los triploides en algún momento ‘alcancen’ el estadio de madurez en los diploides, cuando en realidad no existe un retraso como tal, sino un arresto o una inhibición de la meiosis, la cual se refleja en una alta frecuencia del tipo de

ovocito en el cual el arresto ocurre, y en una muy baja frecuencia de tipos de ovocitos más avanzados. Por ejemplo, en peces donde sí existen estudios de frecuencias de tipos de ovocitos en triploides, estos han indicado que el ovocito previtelogénico es el más común (Carrasco *et al.*, 1998; Felip *et al.*, 2001). En Pectínidos como la almeja catarina y la almeja mano de león se sabe que solamente los ovocitos previtelogénicos que concluyen la etapa de paquiteno y entran en la etapa de diploteno de la profase en la meiosis I inician el proceso de vitelogénesis (Dorange y Le Penneec, 1989; Beninger y Le Penneec, 1991). Nuestros resultados, esto es, la alta frecuencia de ovocitos previtelogénicos tanto en almeja catarina como en almeja mano de león, indican claramente que la condición de triploidía tiene un efecto sobre la ovogénesis, el cual se traduce como un arresto antes (cigoteno) o durante la etapa del paquiteno en la profase I de la meiosis.

El arresto de la meiosis en triploides en esos estadios se presumía que resultaba de la incapacidad de los cromosomas homólogos para aparearse en la metafase I debido a la presencia de tres copias de cada cromosoma, impidiendo esto la segregación. Sin embargo, la presencia preponderante de ovocitos previtelogénicos y mínima representación de ovocitos maduros indica que el evento de mayor importancia afectando la fecundidad de los moluscos debe de ocurrir antes del inicio de la vitelogénesis, esto es, antes del diploteno en la profase I. Guo y Allen (1994c) demostraron con estudios de cariotipo que la esterilidad del ostión Japonés *C. gigas* triploide no es resultado de una inhibición de la formación de metafases, ya que se observó en los huevos desovados que el juego de cromosomas extra fue segregado azarosamente. Esto indica que debe de existir otro mecanismo asociado con el proceso meiótico, y que dadas las diferencias observadas entre especies de moluscos en cuanto al grado de esterilidad resultante de la triploidía, este mecanismo interviene

diferencialmente entre especies. De hecho, desde 1984, Allen observó que el ostión triploide presenta una esterilidad (parcial) con la formación de ovocitos en números reducidos, concluyendo que debido a que la ovogénesis en moluscos no procede más allá del inicio de la metafase de la meiosis I, los eventos causantes de la esterilidad en triploides deben de ocurrir en estadios previos a este pero posteriormente a la replicación de los cromosomas en las células germinales.

Interesantemente, durante la última década una serie de mecanismos de control que actúan en el ciclo celular han sido descritos. Estos son los denominados ‘checkpoints’ o ‘mecanismos de mantenimiento de casa’, los cuales actúan por medio de complejos proteicos que detectan y señalan anomalías en el comportamiento de los cromosomas, y de proteínas afectoras que reaccionan a esas señales retrasando o deteniendo el proceso meiótico (Roeder y Bailis, 2000). Estos mecanismos de ‘checkpoint’ explican algunos de los eventos anormales que ocurren en la ovogénesis y espermatogénesis de organismos triploides. Por ejemplo, uno de esos checkpoints, denominado de ‘recombinación o paquiteno’, actúa deteniendo la meiosis en el estadio de paquiteno (profase I) en aquellas células gaméticas que no han concluido correctamente la recombinación entre cromátidas hermanas durante la meiosis I, o en las que el complejo sinaptotomal es defectuoso (Murakami y Nurse, 1999 & 2000; Roeder y Bailis, 2000; Tarsounas y Monees, 2001). Este checkpoint puede ser propuesto por lo tanto para explicar el arresto de la ovogénesis y espermatogénesis en almeja Catarina y almeja mano de león, el cual, como ya se menciona ocurre en el estadio de cigoteno-paquiteno, deducido del hecho de que el tipo de ovocitos y espermatoцитos más abundante fueron los ovocitos previtelogénicos y los espermatoцитos primarios. Otro checkpoint, el de metafase I, el cual se sabe interviene deteniendo la

meiosis en metafase cuando los cromosomas no están alineados adecuadamente en la placa metafásica del uso acromático, podría explicar el arresto en espermatocito primario en forma adicional o consecutiva al primer checkpoint. Interesantemente se sabe que este checkpoint funciona en machos de mamíferos, deteniendo en espermatocitos la metafase I, pero la formación de ovocitos no es afectada aun cuando como resultado de la segregación se formen productos aneuploides o de trisomías (Roeder y Bailis, 2000).

Si la ya demostrada existencia de mecanismos de control o checkpoints en el ciclo celular fuese de hecho la causa del arresto de la gametogénesis en triploides, las preguntas que permanecen son, ¿por qué en algunas especies existe un mayor grado de esterilidad que en otras, y por qué existen diferencias en fertilidad entre los dos sexos de una misma especie?. La primera pregunta no tiene respuesta en el presente, pero puede proponerse que siendo este un mecanismo genético (y no mecánico como antes se había propuesto en cuanto a la segregación), este presenta variabilidad genética entre y dentro de especies, explicando no solamente las diferencias entre especies en grado de esterilidad, sino las observaciones entre individuos dentro de una misma especie (Ruiz-Verdugo *et al.*, 2001). En cuanto a la segunda pregunta, estudios recientes han indicado la existencia de un mecanismo de corrección cuando ocurre la formación de tri- y tetravalentes durante la recombinación de homólogos, el cual al parecer es específico para un solo sexo (Gui *et al.*, 1991; Gui *et al.* 1992; Oliveira *et al.* 1995; Zickler & Kleckner 1999), y por tanto podría explicar las diferencias en grado de esterilidad entre sexos de una misma especie.

## CONCLUSIONES

- La esterilidad parcial en la gónada femenina de la almeja catarina está relacionada con un arresto en ovocitos previtelogénicos.
- Se han establecido diferencias espermatogénéticas entre diploides y triploides de almeja catarina *Argopecten ventricosus*, señalando hacia el arresto de la gametogénesis ocurriendo durante la profase de la primera división meiotica.
- Debido a que los ovocitos previtelogénicos que completan el estadio de diploteno de la meiosis I llegan a ser vitelogénicos, se concluye que la esterilidad es causada por problemas durante la sinapsis y la recombinación de cromosomas, es decir, durante las etapas de cigoteno y paquiteno de la meiosis I.
- Se desconoce el por qué algunos ovocitos pueden terminar el proceso vitelogénico a pesar del arresto general demostrado en ovocitos previtelogénicos, pero estudios recientes en triploides de otras especies apuntan hacia la existencia de un mecanismo de corrección de la formación trivalente y tetravalente (Gui *et al.*, 1991, Gui *et al.*, 1992, Gui *et al.*, 1995; Oliveira *et al.*, 1995; Zickler y Kleckner, 1999), que merece mayor estudio.
- Estos resultados reafirman las observaciones de otros autores acerca de que la producción de tetraploides en moluscos no es factible a partir de diploides, así como también corroboran la factibilidad de la metodología desarrollada por Guo y Allen (1994b) para la producción de tetraploides a partir de triploides.

- La condición de triploidía en la almeja mano de león resulta en arresto de la gametogénesis inicial, durante los estadios de cigoteno-paquiteno de la meiosis, lo cual resulta en una esterilidad prácticamente total.
- La esterilidad en almeja mano de león crecida en el sistema de Bahía Magdalena no se traduce en una ventaja de crecimiento para los triploides.
- Este resultado indica que la triploidía podría no ser una biotecnología ventajosa para las producciones acuaculturales de esta especie en este sitio en particular. Una estrategia reproductiva presente en este sitio de crecimiento en particular, en el cual la movilización de las reservas de la energía no desempeña un papel importante durante la maduración, se asoció a este resultado no esperado.
- El éxito a la triploidía en abulón rojo del Pacífico puede ser obtenido usando concentraciones de CB desde 0.5 hasta 1 mg L<sup>-1</sup>, aunque concentraciones más grandes de CB darán lugar a una supervivencia más baja de ovocitos tratados, posiblemente como efecto de la toxicidad del producto químico.
- Variaciones entre tratamientos inducidos en diversas épocas del año pueden esperarse, y éstas parecen ser una consecuencia de diferencias en la calidad de ovocitos de los reproductores en cada época.
- Teóricamente la ventaja de los triploides para la acuicultura se debe a su esterilidad, no gastan energía en la formación de gametos alcanzando mayores tallas, lo cual no sucede en todas las especies por lo que es importante evaluar el beneficio de esta condición en las diferentes especies antes de plantear otras biotecnologías de ploidías como la tetraploidía.



## PERSPECTIVAS

- En abulón rojo es necesario evaluar el efecto que diferentes condiciones gonádicas, evaluadas por composición bioquímica, tienen sobre el éxito alcanzado a la triploidía.
- Debido a que los abulones triploides fueron producidos con el uso de un método químico (Citocalasina-B), es necesario evaluar su estabilidad cromosómica en un ciclo de producción, ya que en algunas especies existe una reversión cromosómica en tallas adultas e investigar a la vez su índice de mortalidad.
- Así mismo, es importante establecer en abulón rojo los efectos de la condición de triploidía hasta la talla de medallón en laboratorio y a la talla comercial en campo con el fin de determinar si esta condición pudiera ser ventajosa para mejorar la producción acuacultural de esta especie.
- En el caso de la almeja catarina, haber obtenido los tetraploides es un paso más, pero lo que es necesario evaluar es el potencial reproductivo de los organismos tetraploides para producir triploides biológicos e investigar el desempeño de estos últimos *versus* los triploides producidos por inductores químicos.
- Es importante perpetuar la línea tetraploide con fines de mantener un stock de reproductores.
- En lo que respecta a la almeja mano de león es necesario evaluar las posibles ventajas de la condición de triploidía en cultivo en otros sitios donde exista una estrategia reproductiva diferente como Laguna Ojo de Liebre.

- Dado los resultados con almeja mano de león, es importante evaluar estas biotecnologías en otras especies de moluscos endémicos potenciales de cultivo antes de proponer su uso sin haber definido la existencia de ventajas del triploide.
- Una vez definido lo anterior, considerando la problemática que existe para producir triploides mediante el uso diferentes inductores químicos, es esencial realizar mayores esfuerzos dirigidos a la producción de tetraploides en moluscos usando la metodología de Guo y Allen (1994) para producir triploides biológicos.
- Es necesario el análisis de complejos sinaptotenuales en ovocitos previtelogénicos arrestados en paquiteno antes de diploteno y espermatoцитos primarios en cigoteno-paquiteo para confirmar el arresto meiótico causado por la condición de triploidía.

## LITERATURA CITADA

- Akashige, S., Fushimi, T., 1991. Growth, survival and glycogen content of triploid pacific oyster *Crassostrea gigas* in the waters of Hiroshima, Japan. Nip. Sui. Gakkaishi 56: 1063-1071.
- Aldridge, F.J., Marston, R.Q., Shireman, J.V. 1990. Induced triploids and tetraploids in bighead carp, *Hypophthalmichthys nobilis*, verified by multi-embryo cytofluorometric analysis. *Aquaculture* 87: 121-131.
- Allen Jr., S. K. 1987. Gametogenesis in three species of triploid shellfish: *Mya arenaria*, *Crassostrea gigas* and *Crassostrea virginica*. Proc. World Symposium on Selection, Hybridization and Genetic Engineering in Aquaculture of fish and shellfish for consumption and stocking. Bordeaux, 27-30 may. Vol. II, Berlin, pp. 207-217.
- Allen, S. K. Jr., Bushek, D., 1992. Large-scale production of triploid oysters, *Crassostrea virginica* (Gmelin), using "stripped" gametes. *Aquaculture*, 103: 241-251.
- Allen, S.K. Jr., Downing, S.L., 1986 Performance of triploid pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). I Survival, growth, glycogen content and sexual maturation in yearlings. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 102: 197-208.
- Allen Jr., S.K., Downing, S.L., 1990. Performance of triploid Pacific Oysters, *Crassostrea gigas*; gametogenesis. *J. Fish. Aquat. Sci.* 4: 1213-1222.
- Allen S.K.Jr., Guo, X., Burreson, G., Mann, R. 1996. Heteroploid mosaics and reversion among triploid oysters, *Crassostrea gigas*. Fact or artifact. *J. Shellfish Res.* 15, 514 (abstract).
- Allen, S.K., Jr., Hidu, H., Stanley, J.G., 1986. Abnormal gametogenesis and sex ratio in triploid soft-shell clams (*Mya arenaria*). *Biol. Bull.* 170: 189-210.
- Allen S.K.Jr., Howe, A., Gallivan, T., Guo, X., DeBrosse, G. 1999. Genotype and environmental variation in reversion of triploid *Crassostrea gigas* to the heteroploid mosaic state. *J. Shellfish Res.* 18, 293 (abstract).
- Allen, S.K., Jr., Shpigel, M., Utting, S., Spencer, B., 1994. Incidental production of tetraploid Manila clams, *Tape philippinarum* (Addams and Reeve). *Aquaculture*, 128: 13-19.
- Arellano-Martínez, M., Racotta, I.S., Cevallos-Vázquez, B.P., Elorduy-Garay, J.F., submitted. Energy cycle, reproductive activity, and food availability of the lion-paw scallop *Nodipecten subnodosus* in Laguna Ojo de Liebre, B.C.S., México. *J. Shellfish Res.*
- Barber, B.J., Mann, R., 1991. Sterile triploid *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791) growth faster than diploid but are equally susceptible to *Perkinsus marinus*. *J. Shellfish Res.* 10(2): 445-450.
- Barber, B.J., Mann, R., Allen, S.K.Jr., 1992. Optimization of triploid induction for the oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Aquaculture* 106: 21-26.

- Barrios, D., Chávez, J., Cáceres, C., 1997. First trial of growth *Lyropecten subnodosus* under culture conditions in Bahía de La Paz, B.C.S., Mexico. In: Félix-Pico, E. (Ed.), 11<sup>th</sup> International Pectinid Workshop, La Paz, México, pp. 107-110.
- Beaumont, A. R., Fairbrother, J.E., 1991. Ploidy manipulation in mollusca shellfish: a review. *J. Shellfish Res.*, 10(1): 1-18.
- Beninger, P.G., LePennec, M., 1991. Functional anatomy of scallops. In: S.E. Shumway (Ed.), *Scallops: Biology, Ecology and Aquaculture*. Elsevier, Amsterdam, pp. 133-223.
- Brand, A.R. 1991. Scallop ecology: distributions and behaviour. In: S.E. Shumway (Ed.), *Scallops: Biology, Ecology and Aquaculture*. Elsevier, Amsterdam, pp. 517-584.
- Cai, G., Beaumont, R., 1996. Tetraploid induction in the mussel *Mytilus edulis* by application of 6-dimethylaminopurine (6-DMAP) during early development. *Tropic Oceanology/Redai Haiyang*, 15: 26-30.
- Carrasco, L. A. P., S. Doroshov, D. J. Penman & N. Bromage. 1998. Long-term quantitative analysis of gametogenesis in auto triploid rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *J. Rep. and Fertility* 113:197-210.
- Cox, E.S., Smith, M.S.R., Nell, J. A., Maguire, G.B., 1996. Studies on triploid oysters in Australia. VI. Gonad development in diploid and triploid Sydney rock oysters *Saccostrea commercialis* (Iredale and Roughley). *Aquaculture*, 197: 101-120.
- Dorange, G., LePennec, M., 1989a. Ultrastructural characteristics of spermatogenesis in *Pecten maximus* (Mollusca, Bivalvia). *Inv. Rep. and Development*, 15(2): 109-117.
- Dorange, G., LePennec, M., 1989b. Ultrastructural study of oogenesis and oocytic degeneration in *Pecten maximus* from Bay of St. Brieuc. *Mar. Biol.* 103, 339-348.
- Downing, S.L., Allen, S.K. Jr., 1987. Induced Triploidy in the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*: optimum treatments with Cytochalasin B Depend on Temperature. *Aquaculture*, 61: 1-15.
- Diter, A., Dufy, C., 1990. Poliploidy in the manila clam *Ruditapes philippinarum* I. Chemical induction and larval performances of triploids. *Aquat. Living Resour* 3(1): 55-60.
- Eudeline, B., Allen, S.K., Jr. y Guo, X. 2000. Optimization of tetraploid induction in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, using first polar body as a natural indicator. *Aquaculture*, 187: 73-84.
- Eversole, A.G., Kempton, C.J., Hadley, N.H., Buzzi, W.R., 1996. Comparison of growth, survival, and reproductive success of diploid and triploid *Mercenaria mercenaria*. *J. Shellfish Res.* 15: 689-694.
- Felip, A., F. Piferrer, M. Carrillo & S. Zanuy. 2001. Comparison of the gonadal development and plasma levels of sex steroid hormones in diploid and triploid sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. *J. Exp. Zoology* 290:384-395.

- Gárate-Lizárraga, I., Siqueiros-Beltrones, D.A., Verdugo-Díaz, G., Guerrero-Caballero, R., 2000. Dinámica del fitoplancton en el sistema lagunar Magdalena – Almejas. In: Lluch-Belda, D., Elorduy-Garay, J., Lluch-Cota, S.E., Ponce-Díaz, G. (eds.), Centros de actividad biológica del Pacífico Mexicano. CIBNOR / CONACYT, La Paz BCS, México. Pp. 143-155.
- Gendreau, S., Grizel, H., 1990. Induced triploidy and tetraploidy in the European flat oyster *Ostrea edulis* L. *Aquaculture*, 90: 229-238.
- Gerard, A., Ledu, C., Phelipot, P., 1999. The induction of MI and MII triploids in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* with 6-DMAP or CB. *Aquaculture* 174: 229-242.
- Gui, J.F., Xiao, W.H., Chen, L., Liang, S.C., Jiang, Y.G., 1991. Gonadal development in artificial triploid transparent colored crucian carp. *A. Zoo. Sinica*, 37: 397-304.
- Gui, J.F., Jia, J., Liang, S.C., Jiang, Y.G., 1992. Meiotic chromosome behavior in male triploid transparent colored crucian carp *Carassius auratus* L. *J. Fish Biology*, 41: 317-326.
- Gui, J.F., Chen, L., Liang, S., g, Y., 1995. Light microscopy investigation of meiotic chromosome pairing in artificial triploid fishes with blocked ovaries. *A. Hyd. Sinica* 19: 223-226.
- Guo, X., Allen, S.K. Jr., 1994a. Sex Determination and Polyploid Gigantism in the Dwarf Surfclam (*Mulinia lateralis* Say) *Genetics*, 138: 1199-1206.
- Guo, X., Allen, S.K. Jr., 1994b. Viable tetraploids in the Pacific Oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg) produced by inhibition polar body I in eggs from triploids. *Mol. Mar. Biol. and Biot.*, 3(1): 42-50.
- Guo, X., Allen, S.K. Jr., 1994c. Reproductive potential and genetic of triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg) *Biol. Bull.* 187: 309-318.
- Guo, X., Allen, S.K., Jr., 1997. Sex and meiosis in autotetraploid Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Genome* 40: 397-405.
- Guo, X., Cooper, K., Hershberger, W., Chew, K., 1992a. Genetic consequences of blocking polar body I with cytochalasina B in fertilized eggs of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. I. Ploidy of resultant embryos. *Biol. Bull.*, 183: 381-386.
- Guo, X., Hershberger, W.K., Cooper, K., Chew, K.K., 1992b. Genetic consequences of blocking polar body I with cytochalasina B in fertilized eggs of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. II. Segregation of chromosomes. *Biol. Bull. (Woods Hole, Mass)*, 183: 387-393.
- Hand, R., Nell, J., Maguire, G.B., 1998. Studies on triploid oysters in Australia: X. Growth and mortality of diploid and triploid Sydney rock oysters *Saccostrea commercialis* (Iredale and Roughley). *J. Shellfish Res.* 17(4): 1115-1127.
- He, M., Lin, Y., Shen, Q., Hu, J., Jiang, W., 2000. Production of tetraploid pearl oyster (*Pinctada martensii* Dunker) by inhibiting the first polar body in eggs from triploids. *J. Shellfish Res.* 19: 147-151.

- Kesarcodi-Watson, A., Klumpp, D.W., Lucas, J.S., 2001. Comparative feeding and physiological energetics in diploid and triploid Sydney rock oysters (*Saccostrea commercialis*). II. Influences of food concentration and tissue energy distribution. *Aquaculture* 203, 195-216.
- Kiyomoto, M., Komaru, K., Scarpa, J., Wada, K.T., Danton, E., Awaji, M., 1996. Abnormal Gametogenesis, Male Dominant Sex Ratio, and Sertoli Cell Morphology in Induced triploid Mussel, *Mytilus galloprovincialis*. *Zool. Sci.*, 13: 393-402.
- Komaru, A., Wada, K. T., 1989. Gametogenesis and growth of induced triploid scallops *Chlamys nobilis*. *Nip. Sui. Gakkaishi* 55: 447-452.
- Komaru, A., Wada, K. T., 1990. Gametogenesis of triploid Japanese pearl oyster *Pinctada martensii*. In: Goshi, M., Yashamita, O., (Eds.) *Advances in Invertebrate Reproduction 5*. Elsevier Science Publisher B.V. Amsterdam, pp. 469-474.
- Lin, Y., He, M., Qing, N., Jiang, W., 1995. Triploid induction in the scallop, *Chlamys nobilis* and growth comparisons. *Trop. Oceanol. Redai Haiyang* 14(4), 84-89.
- Longo, F.K., 1972. The effects of cytochalasina B on events of fertilization in the surf clam, *Spisula siliidissima*. *J. Exp. Zool.*, 182: 322-344.
- López-Sánchez J.A., 2003. Tasa de filtración y aclaramiento en la almeja mano de león (*Nodipecten subnodosus* Sowerby, 1835) en función de la cantidad del alimento, temperatura y de su tamaño. Tesis de Maestría. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C.
- López-Sánchez J.A., Maeda-Martinez, A.N., Sicard, G.T., Civera, C.R., 2003. Tasa de filtración y aclaramiento en la almeja mano de león (*Nodipecten subnodosus* Sowerby, 1835) en función de la cantidad del alimento, temperatura y de su tamaño. Libro de resúmenes de I foro de intercambio científico sobre recursos bentónicos de México; Biología, Ecología, Pesquerías y Acuicultura. 1-3 de septiembre del 2003. Hotel Los Arcos La Paz, B.C.S. Pag. 31.
- Lluch-Belda, D., 2000. Centros de actividad biológica en la costa occidental de Baja California. In: Lluch-Belda, D., Elorduy-Garay, J., Lluch-Cota, S.E., Ponce-Díaz, G. (eds.), *Centros de actividad biológica del Pacífico Mexicano*. CIBNOR / CONACYT, La Paz BCS, México. Pp. 49-64.
- Molina-Martínez, J. 1983. Estimaciones de fecundidad en *Haliotis rufescens* de El Bajo, Bahía Rosario, Baja California. Instituto Nacional de la Pesca, Secretaría de Pesca, México. *Ciencia Pesquera* 4: 77-95.
- Murakami, H., P. Nurse. 1999. Meiotic DNA replication checkpoint control in fission yeast. *G. and Development* 13: 2581-2593.
- Murakami, H., P. Nurse. 2000. DNA replication and damage checkpoints and meiotic cell cycle controls in the fission and budding yeast. *Biochemistry J.* 349: 1-12.

- Oliveira, C., Foresti, F., Rigolino, M.G., Tabata, Y.A., 1995. Synaptotomal complex formation in spermatocyte of the autotriploid rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Pisces, Salmonidae). *Hereditas*, 123: 215-220.
- Ortiz-Quintanilla, M., León-Carballo, G., Reinecke-Reyes, M.A., Lelevier-Grijalva, A., Turrubiates-Morales, J.R., González-Avilés, J.G. 1990. Proceso reproductivo de las especies de abulón (*Haliotis* spp.) y su relación con los mecanismos regulatorio-pesqueros en la costa occidental e islas de la Península de Baja California, México. *In*: M. Dalley & H. Berisch (Eds.), *Proceedings of the VIII Symposium in Marine Biology*, June 4-8, 1990, Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada, Baja California, México. pp. 156-163.
- Peruzzi, S., Guo, X., 2002. Tetraploid induction by meiosis inhibition with cytochalasina B in the dwarf surfclam, *Mulinia lateralis* Say: Effects of temperature. *J. Shellfish Res.*, 21(2): 677-684.
- Racotta, I. S., Ramírez, J.L., Ibarra, A.M., Rodríguez-Jaramillo, M.C., Carreño, D., Palacios, E., 2003. Growth and gametogenesis in the lion-paw scallop *Nodipecten (Lyropecten) subnodosus*. *Aquaculture* 217(1-4): 335-349.
- Ramírez, J.L., Avila, S., Ibarra, A.M., 1999. Optimization of forage in two food-filtering organisms with the use of continuous, low-food concentration, agricultural drip system. *Aquac. Engineering*, 20: 175-189.
- Reinecke-Reyes, M.A., 1996. Madurez y desove de la almeja Mano de León *Lyropecten subnodosus* Sowerby, 1835 (Bivalvia: Pectinidae) en laguna Ojo de Liebre, B.C.S. México. *Biol. Pesq. CRIP (La Paz B.C.S., México)* 3, 17-20.
- Roeder, G.S., J.M. Bailis. 2000. The pachytene checkpoint. *Trends in Genetics* 16(9): 395-403.
- Ruiz-Verdugo, C.A., Allen, S.K. Jr., Ibarra, A.M., 2001. Family differences in success of triploid induction and effects of triploidy on fecundity of catarina scallop (*Argopecten ventricosus*). *Aquaculture*, 201: 19-33.
- Ruiz-Verdugo, C. A., J.L. Ramírez, Allen J.S. Jr., Ibarra A.M., 2000. Triploid catarina scallop (*Argopecten ventricosus* Sowerby II, 1842): growth and suppression of functional hermaphroditism. *Aquaculture*, 186:13-32.
- Scarpa, J., Wada, K.T., Komaru, A., 1993. Induction of tetraploidy in mussel by suppression of polar body formation. *Nip. Sui. Gakkaishi*, 59: 2017-023.
- Shpigel, M., Barber, B.J., Mann, R., 1992. Effects of elevated temperature on growth, gametogenesis, physiology and biochemical composition in diploid and triploid Pacific oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 161: 15-25.
- Stanley, G.J., Hidu, H., Allen, S.K. Jr., 1984. Growth of American Oysters increased by polyploidy induced by blocking meiosis I but not meiosis II. *Aquaculture*, 37: 147-155.

- Stephens, L.B., Downing, S.L., 1988. Inhibition first polar body formation in *Crassostrea gigas* produces tetraploids, not meiotic I triploids. *J. Shellfish Res.*, 7: 550-551.
- Tabarini, C.L., 1984. Induced triploidy in the bay scallop, *Argopecten irradians*, and its effect on Growth and Gametogenesis. *Aquaculture*, 42: 151-160.
- Tarsounas, M. & P. B. Moeens. 2001. Checkpoint and DNA-repair proteins are associated with the cores of mammalian meiotic chromosomes. C. T. in *Developmental Biol.* 51:109-134.
- Utting, S.D., Doyou, J., 1992. the increased utilization of egg lipid reserves following induction of triploidy in the manila clam *Tapes philippinarum*. *Aquaculture* 103: 17-28.
- Utting, S.D., Millican, P.F., Laing, I., 1996. The breeding potential and biochemical composition of triploid Manila clams, *Tapes philippinarum* Adams and Reeve. *Aquaculture Res.* 27: 573-580.
- Yang, H., Zhang, F.S., Guo, X., 2000. Triploid and tetraploid Zhikong Scallop, *Chlamys farreri* Jones et preston, Produced by Inhibiting Polar body I. *Mar. Biotechnology*, 2, 466-475.
- Zhang, G., Wang, Z., Chang, Y., Song, J., Ding, J., Zhao, S., Guo, X., 2000. Tetraploid induction in the Pacific abalone *Haliotis discus hannai* Ino with 6-DMAP and CB. *J. Shellfish Res.*, 19: 540-541.
- Zeng, Z., Chen, M., Lin, Q., Chen, P., Liu, W., Chen, Y., 1995. Induced triploidy in scallop, *Chlamys nobilis*. *J. Oceanogr.* 14, 155-162, Taiwan Strait, Taiwan Haixia.
- Zickler, D., Kleckner, N., 1999. Meiotic chromosome: integrating structure and function. *Annual Review of Genetics*, 33: 603-754.