

**EFFECTO DE TRES MÉTODOS DE INDUCCIÓN A LA TRIPLOIDÍA SOBRE LA  
PRODUCCIÓN DE LARVAS Y POSTLARVAS DE *Argopecten nucleus***

**ALIX JOHANNA BARRETO HERNÁNDEZ**

**Directora**

**LUZ ADRIANA VELASCO CIFUENTES**

**PhD en Ciencias Mención Zoología**

**Codirector**

**FEDERICO EMILIO WINKLER MANNS**

**PhD en Ciencias Mención Biología**

**UNIVERSIDAD DEL MAGDALENA**

**FACULTAD DE INGENIERIA**

**MAESTRIA EN ACUICULTURA**

**SANTA MARTA**

**2016**

## CONTENIDO

RESUMEN .....	7
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	8
2. ANTECEDENTES .....	11
3. MARCO TEÓRICO .....	14
3.1 Generalidades de la especie <i>Argopecten nucleus</i> .....	14
3.2 Reproducción .....	15
3.2 Gametogénesis .....	15
3.4 Ciclo reproductivo .....	17
3.5 Puesta y fecundación .....	17
3.6 Desarrollo embrionario y larvario.....	18
PRODUCCIÓN DE BIVALVOS TRIPLOIDES.....	18
4. OBJETIVOS.....	26
4.1 Objetivo General.....	26
4.2 Objetivos específicos .....	26
5. METODOLOGÍA .....	27
5.1 Obtención de Cigotos.....	27
5.2 Diseño experimental y cultivo larvario.....	28
5.3 Asentamiento y cultivo postlarvario .....	30
5.4 Análisis Estadístico.....	31
6. RESULTADOS .....	32
6.1 Evaluación de larvas triploides.....	32
6.2 Desarrollo temprano .....	33
6.3 Anomalías del desarrollo embrionario.....	36
6.4 Supervivencia y crecimiento larvario .....	37

6.5 Supervivencia y crecimiento de postlarvas recuperadas.....	40
7. DISCUSIÓN.....	43
8. CONCLUSIONES .....	49
9. BIBLIOGRAFÍA.....	50

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Morfología externa de <i>Argopecten nucleus</i> .....	14
<b>Figura 2.</b> Gónada madura de <i>A. nucleus</i> . (A) Porción masculina y (B) Porción femenina. ....	15
<b>Figura 3.</b> Representación del proceso de gametogénesis en bivalvos. A. Machos. B. Hembras (Tomado de Sastry, 1975). ....	17
<b>Figura 4.</b> Inducción a la triploidía. Los huevos son expulsados en la metafase de la meiosis I. La fertilización reanuda la meiosis. Choques físicos o químicos aplicados durante la meiosis I o II puede suprimir la división celular, la producción de triploides por la retención del primer (I1) o segundo (I2) cuerpo polar.....	20
<b>Figura 5.</b> Producción de un cigoto triploide, mediante el cruce de un ovocito de un animal tetraploide con un espermatozoide de un individuo diploide.....	21
<b>Figura 6.</b> A) Producción de un tetraploide por la inhibición de la primera división celular (primera mitosis). B) Producción de un tetraploide por inactivación del ADN del espermatozoide seguido por la inhibición de la expulsión. C) Producción de un tetraploide por inhibición del primer cuerpo polar en huevos derivados de ejemplares triploides y fecundados con espermatozoide de individuos diploides.....	21
<b>Figura 7.</b> a) Reproductores de <i>A. nucleus</i> en desecación y b) Gametos femeninos y masculinos de <i>A. nucleus</i> .....	28
<b>Figura 8.</b> Histograma de frecuencia con el contenido de ADN relativo para el nivel de ploidía de las larvas de <i>A. nucleus</i> . A. Estándares haploide N (espermatozoide de <i>A. nucleus</i> ) y diploide 2N (hemolinfa de <i>A. nucleus</i> ), B. larvas no tratadas 2N y C. larvas tratadas 2N y 3N.....	32
<b>Figura 9.</b> Porcentaje de larvas triploides de <i>A. nucleus</i> obtenidas mediante la inhibición de la expulsión del segundo cuerpo polar. Letras iguales indican falta de diferencias significativas ( $P > 0,05$ ). Las barras de error representan el error estándar. ....	33
<b>Figura 10.</b> Porcentaje de embriones o larvas de <i>A. nucleus</i> en diferentes fases desarrollo procedentes de cigotos inducidos y no inducidos a la triploidía. Letras iguales indican falta de diferencias significativas ( $P > 0,05$ ). Las barras de error representan el error estándar. ....	35
<b>Figura 11.</b> Embriones de <i>A. nucleus</i> tratados con CB y el grupo control: A, B y C, Primer clivaje, D, E y F, Segundo clivaje, G, H y I, Tercer clivaje, J, K y L, Blástula. ....	37

**Figura 12.** Porcentaje promedio de larvas D de *A. nucleus* procedentes de cigotos inducidos y no inducidos a la triploidía. Letras iguales indican falta de diferencias significativas ( $P > 0,05$ ). Las barras de error representan el error estándar..... 38

**Figura 13. A.** Variación en la supervivencia acumulada de las larvas de *A. nucleus* procedentes de cigotos inducidos y no inducidos a la triploidía. **B.** Variación en la longitud de larvas de *A. nucleus* procedentes de cigotos inducidos y no inducidos a la triploidía. Letras iguales indican falta de diferencias significativas ( $P > 0,05$ ). Las barras de error representan el error estándar. .... 39

**Figura 14. A.** Porcentaje de postlarvas recuperadas de *A. nucleus*. **B.** Longitud de la concha de postlarvas recuperadas de *A. nucleus* a los 2 meses post inicio de fijación procedentes de cigotos sometidos a dos métodos de inducción a triploidía. **C.** Densidad de pediveliger fijadas por número de colectores de cigotos inducidos y no inducidos a la triploidía. Letras iguales indican falta de diferencias significativas ( $P > 0,05$ ). Las barras de error representan el error estándar..... 41

## LISTA DE TABLAS

**Tabla 1.** Efectos de la inducción a la triploidía en larvas de bivalvos mediante la inhibición de la expulsión del primer o segundo cuerpo polar. I1, I2 = inhibición de la expulsión del primer y segundo cuerpo polar respectivamente, 2N = diploide o no inducidos a la triploidía, 3N = triploide o inducidos a la triploidía, P = presión, CB = citocalasina-B, 6DMAP= 6-Dimetilaminopurina, T = choque térmico, CF = cafeína, CA = calcio, cf = citofluorometría, cc = conteo cromosómico, ccp = conteo de cuerpos polares, tn = tamaño del núcleo, I= inducidos a la triploidía, NI= no inducidos a la triploidía. .... 22

## RESUMEN

*Argopecten nucleus* es un pectínido del Caribe que actualmente está siendo cultivado a escala piloto a partir de juveniles producidos en laboratorio. Aunque esta especie tiene rápido crecimiento, el tamaño y peso final de sus partes blandas son relativamente bajos. Con el fin de contribuir a evaluar la factibilidad de la utilización de la triploidía como herramienta de mejoramiento genético en esta especie, se evaluó el efecto de tres métodos de inducción a la triploidía sobre la producción de larvas triploides, la supervivencia, desarrollo y crecimiento de larvas y postlarvas. Se probaron 3 diferentes técnicas de inhibición de la expulsión del segundo cuerpo polar: 1) choques térmicos, 18°C por 10 min; 2) 6 dimetilaminopurina (6-DMAP), 300  $\mu\text{M L}^{-1}$  por 15 min y 3) citocalasina B (CB), 1 mg  $\text{L}^{-1}$  + dimetilsulfóxido (DMSO) al 1% por 15 min, enjuagando con DMSO al 0,1% por 20 min. Se tuvo un grupo control del CB adicionando solo DMSO y otro grupo control general con cigotos no tratados. Se obtuvieron larvas triploides en los tres tratamientos probados pero no en los controles. Los mayores porcentajes de larvas triploides se presentaron en los cigotos tratados con 6DMAP (39%) y los menores, aplicando el choque térmico (14%). La supervivencia y desarrollo fue menor en las larvas tratadas que en las no tratadas, siendo especialmente bajos en el tratamiento de CB, el cual no logró culminar su desarrollo larval. No se encontró una influencia significativa de los tratamientos de inducción a la triploidía sobre el crecimiento de las larvas (110 y 216  $\mu\text{m}$ ) ni el porcentaje de postlarvas recuperadas (0,3 y 2,7%), pero el crecimiento de las postlarvas fue mayor en los tratamientos de 18°C y control DMSO, aparentemente más debido a un efecto densodependiente que al inductor aplicado. Luego, la producción de larvas triploides de *A. nucleus* es factible mediante la inhibición química o física de la expulsión del segundo cuerpo polar, sin embargo esta manipulación ocasiona una disminución en la supervivencia larvaria y las larvas y postlarvas inducidas no mostraron una ventaja en el crecimiento y/o supervivencia en comparación con las no inducidas.

*Palabras clave:* Triploidía, bivalvos, 6-DMAP, citocalasina B, choque térmico, supervivencia, crecimiento, desarrollo, ploidía, scallops.

## 1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El pectínido del Caribe *Argopecten nucleus* es una especie de bivalvo de interés comercial cuyo paquete tecnológico de producción de semilla y adultos ya está disponible en Colombia (Velasco, 2008b). Desde el año 2010, la Universidad del Magdalena y un grupo de pescadores artesanales de Taganga se encuentran produciendo esta especie por acuicultura. Mientras la primera entidad produce la semilla, la segunda se encarga de su cultivo en el mar y su comercialización en el mercado local (Velasco, 2013).

Esta especie tiene ventajas para la acuicultura, como sus altos valores de tasa reproductiva (desova cada 15 días,  $1,8 \times 10^6$  ovocitos/animal) (Velasco et al., 2007) y rápido crecimiento (talla comercial en 10 meses de vida) (Velasco, 2008b). No obstante, su tamaño (40 mm), peso húmedo total y de sus partes blandas (23 y 8 g, respectivamente) son relativamente bajos (Velasco, 2012). Esto hace que tenga un menor precio en el mercado, en torno a (COP\$500 por unidad), comparado con otras especies de pectínidos importados que doblan su tamaño (COP\$1600 por unidad). Para promover su cultivo a mayor escala, sería conveniente producir pectínidos de mayor talla y peso. Para lograr esto existen diferentes métodos de mejoramiento genético que son empleados para aumentar la producción de especies cultivadas. Entre los métodos más utilizados en individuos acuáticos están: la hibridación, selección artificial y triploidía.

*La hibridación* consiste en el cruzamiento entre poblaciones genéticamente diferentes o entre líneas endogámicas, lo cual provoca un incremento de la heterocigosidad (Wilkins, 1981; Mitton y Grant, 1984; Beaumont y Hoare, 2003) y la aparición de los efectos de heterosis (vigor híbrido), la que se define como un aumento en el rendimiento productivo de los híbridos resultantes respecto del promedio de las líneas puras (Beck y Bigger, 1982; Dunham et al., 2001). Aunque esta técnica ha sido ampliamente probada y usada en muchas especies comerciales en la acuicultura, como carpas, bagres, tilapias, truchas, camarones, doradas, ostras y salmones, entre otras (Beck y Bigger, 1982; Dunham et al., 2001), no es siempre una solución para superar los bajos rendimientos en el cultivo, encontrándose que raramente los híbridos tienen un mayor rendimiento que la mejor línea parental (Gjedrem y Baransky, 2009).



Además, este método puede tener riesgos ecológicos por la introgresión de genes en poblaciones nativas cuando se usa una especie o variedad introducida, y no siempre se traduce en heterosis positiva para caracteres importantes en la productividad (Pérez y Kent, 1998). En Colombia no se conocen estudios de genética de poblaciones de *A. nucleus*, no se tienen linajes definidos, ni hay otras especies del mismo género en el Caribe colombiano. Una posibilidad sería la introducción de una especie del pacífico o del hemisferio norte, pero esto no está permitido por las regulaciones a la introducción de especies en Colombia.

*La selección artificial* consiste en escoger un grupo de ejemplares o familias con características fenotípicas deseables para cruzarlos entre sí (Falconer y Mackay, 2006). Es una técnica que ha sido ampliamente aplicada para la mejora genética de plantas y animales de granja con el fin de aumentar el rendimiento, la tasa de supervivencia y la producción (Zhang et al., 2008). Aunque es una herramienta poderosa para generar cambios permanentes en caracteres de las poblaciones, solo es efectiva cuando la heredabilidad, o variabilidad genética aditiva del carácter de interés, es alta y no hay correlaciones genéticas perjudiciales con otros caracteres de interés (Falconer y Mackay, 2006). Actualmente la Universidad del Magdalena adelanta un estudio para determinar la viabilidad del uso de esta herramienta para el mejoramiento de los caracteres asociados a la producción en *A. nucleus* (Velasco, 2013).

*La triploidía* se basa en la inducción a la formación de individuos que posean tres juegos de cromosomas en las células somáticas, siendo la condición normal la diploidía (Arai, 2000). La gran ventaja de la triploidía radica en que los individuos son total o parcialmente estériles, habitualmente con ausencia de desarrollo de gónada, por lo que normalmente alcanzan un mayor peso y tamaño corporal que los diploides a edades y condiciones de cultivo similares (Beaumont y Fairbrother, 1991) dado que no derivan energía a la formación de gónada y gametos (Allen y Downing, 1986). Las mejoras de los caracteres productivos obtenidas con este método no son permanentes, es decir, no se transmiten a la descendencia, por lo que debe aplicarse en cada evento reproductivo y los cambios generados por su uso en acuicultura pueden ser revertidos fácilmente ante la eventualidad de alguna consecuencia no deseable (Beaumont y Fairbrother, 1991). La inducción a la triploidía ha sido usada en el cultivo de bivalvos desde la década de los 80's para mejorar caracteres productivos de bivalvos (Stanley et

al., 1981; FAO, 2005; Dunham, 2011; FIS, 2014), dado de los individuos triploides presentan una esterilidad parcial o total, derivando una mayor cantidad de energía al crecimiento somático (Allen y Downing, 1986). Actualmente, muchos de los criaderos de ostras alrededor del mundo se enfocan hacia la producción de organismos triploides (FAO, 2005; Dunham, 2011).

La obtención de bivalvos triploides se ha logrado inhibiendo la liberación del primer o segundo cuerpo polar (Beaumont y Fairbrother, 1991), o mediante el cruce de reproductores hembras tetraploides (4N) con machos diploides (2N) (Wang et al., 2002; Nam y Kim, 2004). Esta última técnica es considerada la más eficaz y compleja, dado el requerimiento de organismos tetraploides, mientras que la inhibición del segundo cuerpo polar es la segunda más eficaz, y sencilla de aplicar (Beaumont y Fairbrother, 1991; Guo et al., 1996). En pectínidos se ha logrado obtener larvas triploides usando estímulos químicos (Beaumont, 1986; Desroisiers et al., 1993; Ruiz-Verdugo et al., 2000) y físicos (Canello et al., 1992; Toro et al., 1995), obteniéndose mayores porcentajes de larvas triploides mediante el uso de estímulos químicos (Desroisiers et al., 1993). Aunque esta manipulación no parece afectar el crecimiento larvario de los bivalvos (Yang et al., 2000), su desarrollo larvario puede retrasarse (Wada et al., 1989) y en algunos casos la supervivencia de las larvas inducidas puede ser baja (Maldonado-Amparo et al., 2004), especialmente cuando se aplica estimulación química (Tabarini, 1984; Beaumont, 1986). En *A. nucleus* aún no se han realizado estudios relacionados con triploidía, por lo que se desconoce la factibilidad y efectos de aplicar este tipo de herramienta de mejoramiento genético. Esta especie reviste un interés especial dada la escasa información de manipulaciones cromosómicas en pectínidos tropicales.

Teniendo en cuenta lo anterior, en esta investigación se pretenden responder las siguientes preguntas:

¿Es factible obtener larvas triploides de *A. nucleus* mediante la aplicación de estímulos químicos y/o físicos que inhiban la expulsión del segundo cuerpo polar?

¿Cuál es el efecto del uso de los estímulos inductores a la triploidía sobre la supervivencia, desarrollo y crecimiento larvario del pectínido *A. nucleus*?

## 2. ANTECEDENTES

A escala mundial existe una amplia literatura disponible con respecto a la manipulación de la ploidía de bivalvos, siendo la triploidía una de las más estudiadas en especies de importancia comercial pertenecientes a los grupos conocidos como ostras, almejas, mejillones y pectínidos.

En ostras se ha llevado a cabo la mayor cantidad de estudios de inducción a la triploidía. Estos se han centrado principalmente en la ostra del Pacífico *Crassostrea gigas* (Chaiton y Allen, 1985; Allen y Downing, 1986; Allen et al., 1986a; Quillet y Panelay, 1986; Downing y Allen, 1987; Allen, 1988; Davis, 1988a y b; Downing, 1988a y b; Guo et al., 1988; Cooper y Guo, 1989; Davis, 1989; Downing, 1989a; Guo et al., 1989a y b; Allen y Downing, 1990; Desroisiers et al., 1993), en la ostra americana *Crassostrea virginica* (Stanley et al., 1981; Allen, 1983; Stanley et al., 1984; Lee, 1988; Shatkin y Allen, 1989; Barber y Mann, 1991; Allen y Bushek, 1992) y en menor escala, en la ostra australiana *Saccostrea commercialis* (Kesarcodi-Watson et al., 2001).

En las ostras perlíferas solo se conocen los trabajos con *Pinctada fucata martensii* (Uchimura et al., 1989; Wada et al., 1989; Jiang et al., 1993).

En lo referente a estudios de triploidía con almejas, entre las principales especies estudiadas están *Mercenaria mercenaria* (Buzzi y Manzi, 1988; Hidu et al., 1988; Eversole et al., 1996), *Mulinia lateralis* (Guo y Allen, 1994), *Mya arenaria* (Allen et al., 1982; Allen, 1983; Allen et al., 1986b; Mason et al., 1988) y *Tapes philippinarum* (= *Ruditapes philippinarum* = *Tapes semidecussatus*) (Dufey y Diter, 1990; Beaumont y Contaris, 1988; Gosling y Nolan, 1989; Ekaratne y Davenport, 1993).

Con mejillones, se conocen trabajos con *Mitylus edulis* (Yamamoto y Sugawara, 1988; Beaumont y Kelly, 1989; Brake et al., 2004) y *M. galloprovincialis* (Davis, 1997).

Finalmente, en pectínidos o vieiras también hay un cuerpo importante de estudios de inducción a la triploidía, entre los que destacan los realizados con *Argopecten irradians* (Tabarini, 1984; Komaru et al., 1988; Zarnoch et al., 2008), *A. purpuratus* (Canello et al., 1992; Winkler et al., 1993; Toro et al., 1995; Lohrmann y Von Brand, 2005), *A. ventricosus* (Ruiz-Verdugo et al., 2000), *Chlamys nobilis* (Komaru et al., 1988), *Chlamys varia* (Barón et al., 1989), *Chlamys farreri* (Yang et al., 2000) y *Pecten maximus* (Beaumont, 1986), *Nodipecten subnodosus* (Maldonado-Amparo et al., 2004); *Patinopecten yessoensis* (Meng et al., 2012). No obstante en la actualidad no existen reportes de cultivos comerciales de pectínidos aplicando triploidía (Tucker y Hargreaves, 2008; Burnell y Allan, 2009), solo de la ostra japonesa (*Crassostrea gigas*) (Nell, 2002; Gosling, 2015; Cultimar, 2016).

Dentro de estos estudios, la mayoría se han centrado en verificar la factibilidad de obtener organismos triploides en fase larvaria (Chaiton y Allen, 1985; Yamamoto y Sugawara, 1988; Beaumont y Kelly, 1989; Gosling y Nolan, 1989; Winkler et al., 1993; Toro et al., 1995), juveniles (Stanley et al., 1984, Guo et al., 1996; Mason et al., 1988) o adulta (Tabarini, 1984, Allen y Downing, 1990, Brake et al., 2004; Racotta et al., 2008). Otros trabajos se han dedicado a estudiar la utilidad de la triploidía para el mejoramiento del crecimiento de larvas (Stanley et al., 1981; Downing y Allen, 1987; Yang et al., 2000), juveniles (Barber y Mann, 1991; Scarpa et al., 1994; Kesarcodi-Watson et al., 2001) y adultos (Stanley et al., 1984; Allen y Downing, 1986; Shpigel et al., 1992; Jiang et al., 1993). Unos cuantos trabajos han evaluado diferentes métodos de inducción a la triploidía (Wada et al., 1989; Desroisiers et al., 1993; Scarpa et al., 1994), mientras que otros tanto han estudiado el desarrollo y/o supervivencia de larvas inducidas a la triploidía (Barón et al., 1989; Dufey y Diter, 1990; Toro et al., 1995).

En Colombia se han realizado estudios de triploidía en los peces tilapia nilótica, *Oreochromis niloticus* (Martínez et al., 1995), el bagre *Rhamdia quelen* (Cardona et al., 2012) y en la trucha arcoíris, *Oncorhynchus mykiss* (Pineda, 2004). Sin embargo, no se tienen reportes de este tipo de estudios en ninguna especie de molusco.

El pectínido del Caribe, *Argopecten nucleus*, ha sido estudiado en aspectos como su distribución y morfología (Díaz y Puyana, 1994; Puyana y Velasco, 2008), su fisiología (Velasco, 2006; 2007), biología reproductiva (Daniel, 2011), abundancia de larvas en el medio

natural (Castellanos y Valero, 1998), captación de postlarvas silvestres (Castellanos y Campos, 2007), acondicionamiento reproductivo (Velasco y Barros, 2007; Velasco, 2008a), inducción al desove (Velasco et al., 2007), cultivo larvario (De la Roche y Velasco, 2008; Velasco y Barros, 2008; Carreño et al., 2012; Acosta y Gómez-León, 2013), cultivo postlarvario (Freites et al., 2008; Velasco y Barros, 2009; Gómez-León et al., 2010), cultivo de juveniles y adultos (Freites y Velasco, 2008; Velasco et al., 2009; Gómez-León et al., 2010), análisis financiero de producción de semilla y cultivo en el mar (Velasco, et al., 2008; Gómez-León et al., 2010, Valderrama et al., en imprenta). No obstante, no se encuentran estudios reportados en Colombia relacionados con estudios de triploidía de esta especie.

### 3. MARCO TEÓRICO

#### 3.1 Generalidades de la especie *Argopecten nucleus*

*A. nucleus* es una especie que se caracteriza por tener una concha gruesa con ambas valvas convexas (Figura 1). Presenta de 20 a 23 costillas radiales, su color es variable, usualmente blanco con moteado rojo, anaranjado, púrpura, marrón, y/o gris (Díaz y Puyana, 1994). Esta especie está distribuida desde el Sureste de la Florida, abarcando el sur del Golfo de México y el mar Caribe, hasta Surinam (Díaz y Puyana, 1994). Habita comúnmente en fondos arenosos con presencia de pastos marinos, especialmente cerca de zonas arrecifales y aguas someras, hasta 50 m de profundidad (Lodeiros et al., 1993; Díaz y Puyana, 1994).

Clasificación taxonómica según Mikkelsen y Bieller (2008):

Phylum **Mollusca** Cuvier, 1795

Clase **Bivalvia** Linnaeus, 1758

Subclase **Pteriomorphia** Beurlen, 1944

Orden **Pectinoidea** Adams, H. y A. Adams, 1857

Superfamilia **Pectinoidea** Rafinesque, 1815

Familia **Pectinidae** Rafinesque, 1815

Género ***Argopecten*** Monterosato, 1889

Especie ***Argopecten nucleus*** Born, 1778

Nombres comunes; Conchuela, ostión, vieira, scallop.



Figura 1. Morfología externa de *Argopecten nucleus*

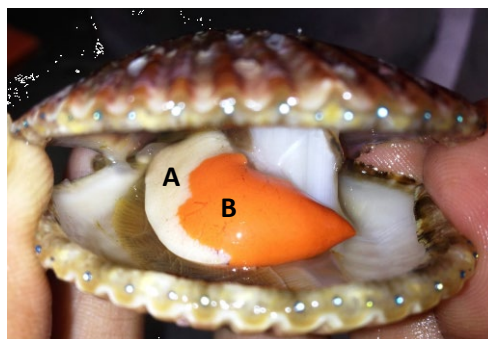
## 3.2 Reproducción

### *Primera madurez y sexualidad*

*A. nucleus* tiene su primera madurez sexual dentro del primer año de vida, por lo cual es considerado como un pectínido precoz. Se puede evidenciar desarrollo gonadal desde los 3 meses de vida, a longitudes de 20 a 25 mm (Velasco, 2008a). Se caracteriza por ser una especie hermafrodita funcional, donde la maduración de la gónada es simultánea para ambos sexos, pudiendo producirse autofecundación (Lodeiros et al., 1993).

### *Estructura gonadal*

En *A. nucleus*, como en otros pectínidos, la gónada es una estructura que se encuentra unida a la masa visceral en las proximidades del músculo aductor, distinguiéndose una porción anterior testicular de color blanco cremoso y otra posterior ovárica de color anaranjado (Figura 2) (Pérez y Román, 1987). Ella está compuesta por conductos ciliados ramificados desde donde se abren numerosos sacos o folículos. La proliferación de las células germinales que recubren la pared del folículo da lugar a los gametos. Cuando las gónadas o el tejido gonadosomático han alcanzado la plena madurez son fáciles de ver y ocupan gran parte del cuerpo blando del animal. Los gonoductos que transportan los gametos hasta la cavidad corporal se desarrollan, aumentan de tamaño y se pueden observar a simple vista en la gónada. Estos animales no poseen papila genital diferenciada. Los gonoductos se abren en la parte superior del saco renal, evacuando los productos genitales a través del nefridio, y salen a la cavidad paleal por el orificio urinario, siendo expulsados al medio exterior donde tiene lugar la fecundación (Helm et al., 2006).



**Figura 2.** Gónada madura de *A. nucleus*. (A) Porción masculina y (B) Porción femenina.

### 3.2 Gametogénesis

La gametogénesis es la producción de dos tipos de gametos; espermatozoides (células sexuales masculinas) y ovocitos (células sexuales femeninas), según se formen se les llamará espermatogénesis u ovogénesis. Según Pérez y Román (1987), Dupré (1995), Román et al. (2001) y Shumway y Parson (2006), este proceso en los pectínidos puede sintetizarse así:

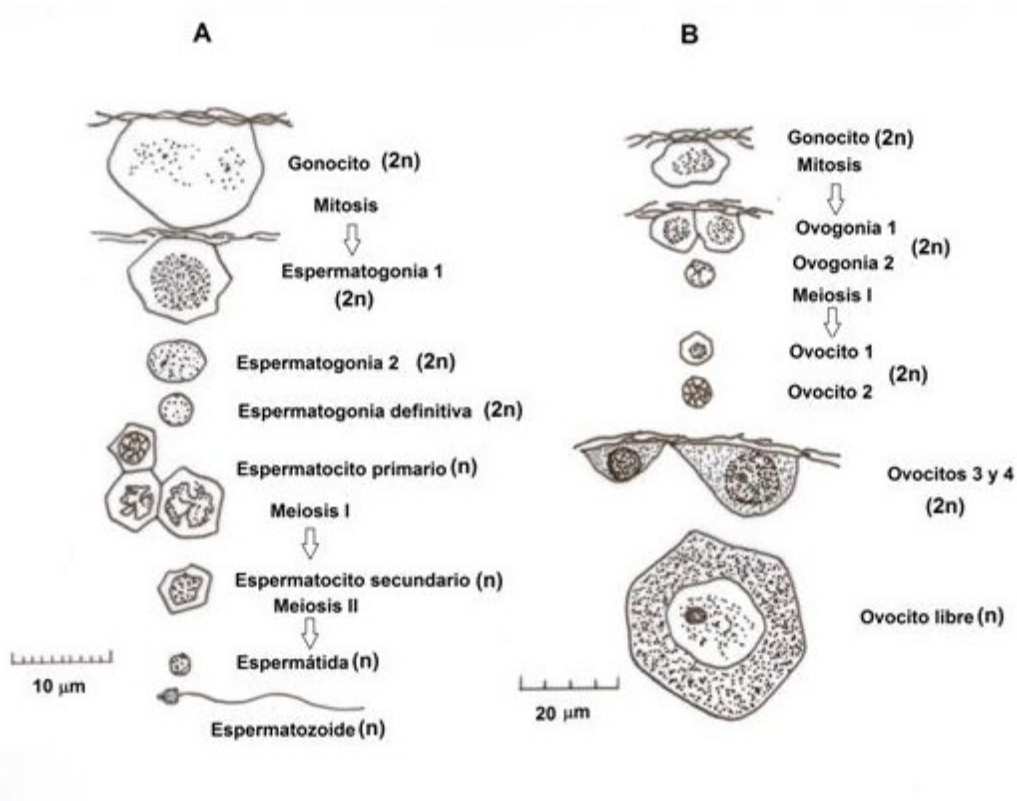
#### *Espermatogénesis*

Los gonocitos diploides ( $2N$ ) se dividen por mitosis formando las espermatogonias primarias, las cuales se dividen y forman espermatogonias secundarias ( $2N$ ). Las espermatogonias secundarias se convierten en espermatoцитos primarios, los cuales experimentan la primera división meiótica (meiosis I) donde ocurre la reducción cromosómica para formar gametos haploides ( $N$ ). Anterior a este proceso ocurre la replicación del ADN de todos los cromosomas, luego se da el apareamiento de los cromosomas homólogos, su recombinación y su segregación a polos opuestos del huso meiótico, dando origen a dos células hijas llamadas espermatoцитos secundarios ( $N$ ). Estos se transforman rápidamente en espermátidas y experimentan la segunda división meiótica (meiosis II) en la cual las cromátidas hermanas se separan originando dos espermátidas jóvenes ( $N$ ) que entran en un proceso de diferenciación hasta convertirse en espermatozoides funcionales.

#### *Ovogénesis*

En el estadio Premeiótico, los gonocitos diploides se dividen y se diferencian dando lugar a las ovogonias primarias ( $2N$ ), luego se dividen por mitosis formando las ovogonias secundarias ( $2N$ ) que tienen aproximadamente el mismo tamaño y estructura de sus progenitoras, las cuales entran en la primera profase de la meiosis dando origen a ovocitos previtelogenéticos. Estos ovocitos bloquean su división en el estadio de diploteno de la primera profase meiótica y entran en vitelogénesis teniendo una carga cromosómica diploide, en este estadio los ovocitos aumentan su talla de tal forma que llega alcanzar hasta  $150\ \mu\text{m}$  al final del proceso de maduración y dependiendo de la especie de pectínido que se trate. Luego, el ovocito maduro es expulsado durante el desove con esta dotación cromosómica. La reactivación de la meiosis ocurre cuando el ovocito es fertilizado.





**Figura 3.** Representación del proceso de gametogénesis en bivalvos. A. Machos. B. Hembras (Tomado de Sastry, 1975).

### 3.4 Ciclo reproductivo

*A. nucleus* es una especie iterópara, es decir, que tiene varios eventos reproductivos a lo largo de su vida, presentando un ciclo reproductivo continuo, desoves parciales y una alta capacidad de recuperación gonadal, pudiendo reiniciar gametogénesis cada 15 días (Daniel, 2011).

### 3.5 Puesta y fecundación

Cuando la gónada alcanza el máximo desarrollo ocurre la puesta, que es la expulsión de los gametos al medio externo (Pérez y Román, 1987). La expulsión de espermatozoides se conoce como espermiación y la expulsión ovocitos como desove (Fernández-Álvarez, 1991). Posteriormente ocurre la fecundación, que es la unión de los gametos femeninos y masculinos en el medio externo. El espermatozoide, al penetrar el ovocito, activa el huevo, reiniciándose la meiosis, lo que da lugar a la expulsión del primer y segundo cuerpo polar (Shumway y Parson, 2006).

### **3.6 Desarrollo embrionario y larvario**

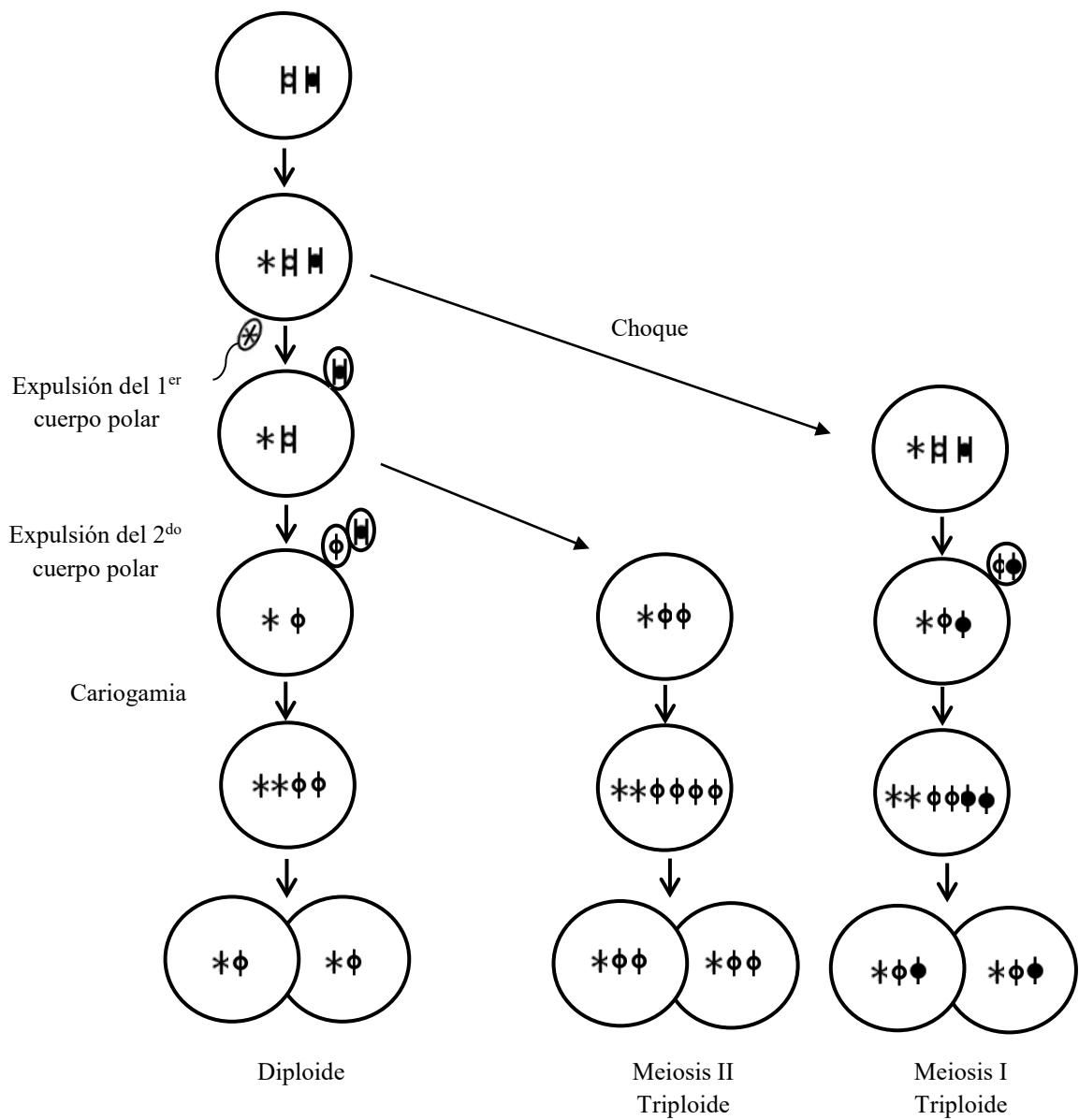
El desarrollo embrionario de *A. nucleus* es bentónico, mientras que el larvario es planctónico. Entre las principales fases de desarrollo, a  $25\pm 1$  °C, están: expulsión del primer cuerpo polar ( $10\pm 3$  min), expulsión del segundo cuerpo polar ( $18\pm 1$  min), mórula ( $2,5\pm 0,4$  h), blástula ( $3,5\pm 0,3$  h), gástrula ( $6\pm 1$  h), larva trocófora ( $12\pm 0,6$  h) y larva veliger ( $19\pm 0,7$  h) (Velasco et al., 2007; De la Roche y Velasco, 2008).

### **PRODUCCIÓN DE BIVALVOS TRIPLOIDES**

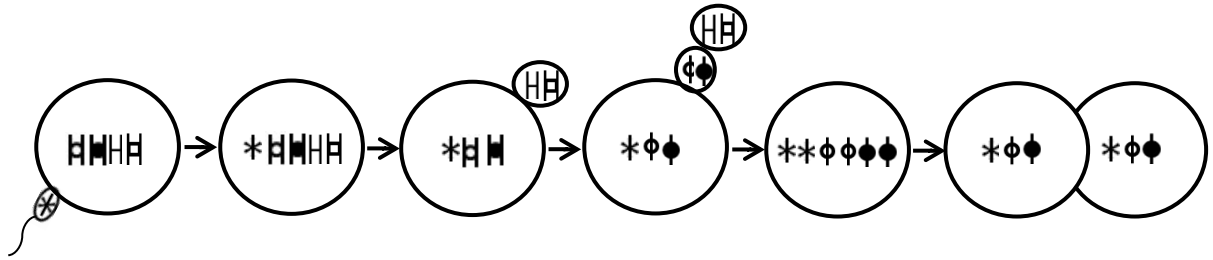
Un triploide es un individuo que posee tres juegos de cromosomas homólogos en las células somáticas, siendo la diploidía la condición normal en la mayoría de las especies de peces y moluscos, es decir, la presencia de dos juegos de cromosomas en cada célula somática (Arai, 2000). Los moluscos triploides generalmente son de mayor tamaño en comparación con los diploides, lo cual se ha explicado por tres hipótesis relacionadas con el aumento en la heterocigosidad, la de la esterilidad y finalmente la del el tamaño celular (Guo y Allen 1994a; Wang et al., 2002). Stanley et al. (1984) sugiere que el incremento en el tamaño de los triploides es debido a la heterocigosidad que estos presentan. Normalmente, los cromosomas homólogos se separan en la meiosis I; si esta división es bloqueada, la heterocigosidad podría resultar, ya sea porque la madre era heterocigoto o porque el espermatozoide llevaba un alelo heterólogo. En este sentido, la frecuencia de triploides heterocigotos por lo tanto es mayor que en los diploides, donde la heterocigosidad se produce sólo por la fertilización con un espermatozoide que lleva un alelo heterólogo (Stanley et al., 1984). De otro lado, la hipótesis de esterilidad sostiene que los triploides son parcial o completamente estériles, a consecuencia de que los cromosomas homólogos en las células germinales de los triploides adultos no pueden realizar la sinapsis durante la meiosis, la cual es detenida en estadios iniciales de la misma (profase de la meiosis I), suprimiéndose a su vez la maduración de los gametos y produciendo esterilidad (Beaumont y Fairbrother, 1991). Debido a que no hay transferencia de reservas energéticas para el desarrollo de la gónada, en los triploides ellas son usadas en un mayor crecimiento somático, en lugar de asignar una parte de la misma al crecimiento gonadal, como ocurre normalmente en los diploides (Allen y Downing, 1986; Mason et al., 1988; Wang et al., 2002). Por último, la hipótesis del tamaño de la célula sugiere que hay un aumento en el

tamaño celular, dado que las células triploides tienen un 50% más ADN que la de los diploides, desarrollan también más citoplasma para mantener constante la relación citoplasma/núcleo (Guo y Allen 1994a; Wang et al., 2002).

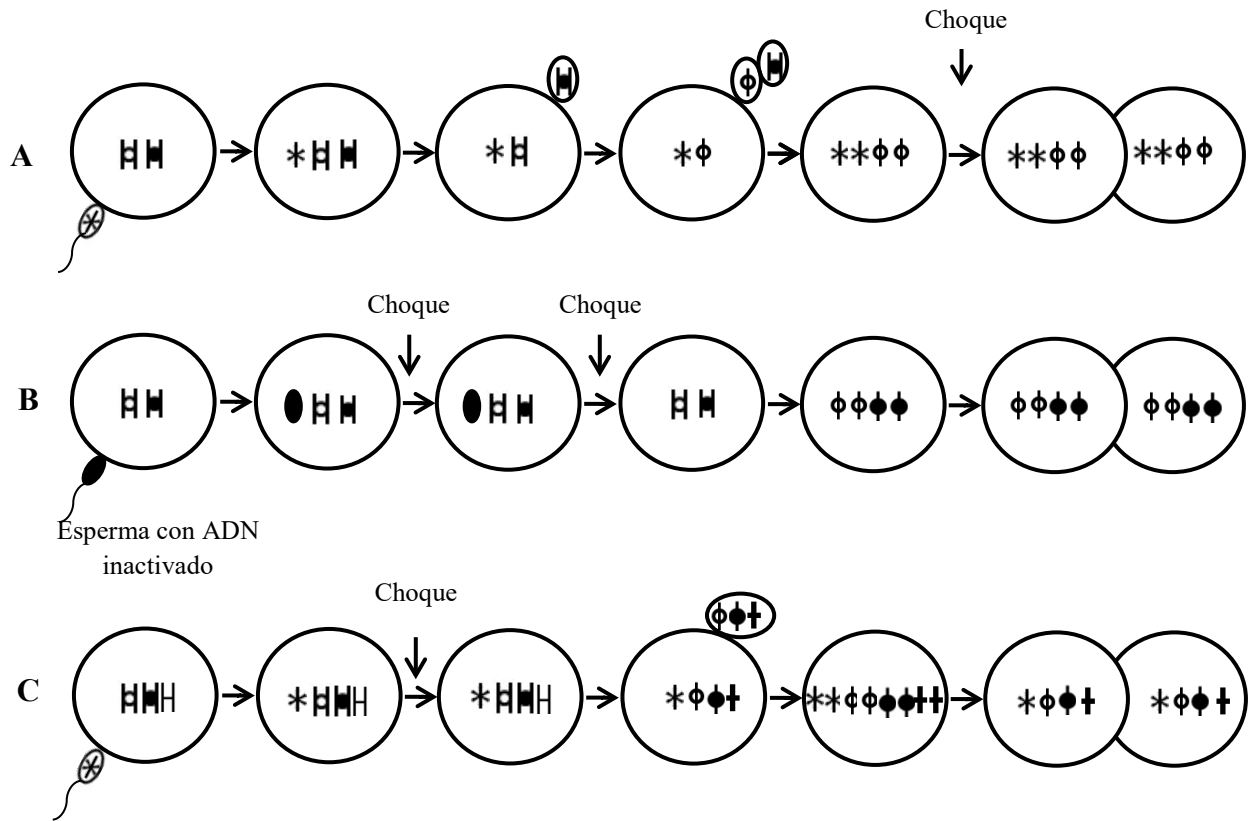
La triploidía se puede lograr por diferentes métodos, usando agentes físicos o químicos para inhibir la expulsión del primer o segundo cuerpo polar (Beaumont y Fairbrother, 1991; Piferrer et al., 2009) (Figura 3), o mediante el cruce de reproductores machos tetraploides (4N) con hembras diploides (2N) (Wang et al., 2002; Nam y Kim, 2004; Francescon et al., 2004) (Figura 4). Aunque éste último es el método más confiable para obtener una descendencia de 100% triploides (Piferrer et al., 2009), requiere de mayor trabajo para producir tetraploides y se produce un número bajo de progenie. Los individuos tetraploides son producidos por la inhibición de la primera división celular (Figura 5A), por medio de técnicas de inactivación del ADN del espermatozoides seguido por la inhibición de la expulsión de ambos cuerpos polares (Figura 5B), o por inhibición del primer cuerpo polar en huevos derivados de ejemplares triploides y fecundados con espermatozoides de un individuo diploide (Figura 5C) (Guo et al., 1993; Guo y Allen 1994a; Guo y Allen 1994b). Los espermatozoides irradiados tienen la desventaja de que pierden motilidad (Guo et al., 1993; Hernández-Ibarra, 2004) y capacidad para activar el ovocito, ocurriendo un descenso en el porcentaje de desarrollo de los embriones (Guo et al., 1993; Fairbrother, 1994; Li et al., 2000). Como resultado de esto, los embriones tetraploides sobreviven hasta la etapa juvenil, pero raramente alcanzan la talla adulta (Guo et al., 1992a; 1992b; Guo et al., 1993; Scarpa et al., 1993; Allen et al., 1994; Guo et al., 1994; Cai y Beaumont, 1996; Yang et al., 2000; Zhang et al., 2000). Debido a las complicaciones para la formación de tetraploides, la inhibición de la expulsión del primer o segundo cuerpo polar por agentes físicos o químicos son los métodos que más se usan para la producción de triploides (Ver tabla 1).



**Figura 4.** Inducción a la triploidía. Los huevos son expulsados en la metafase de la meiosis I. La fertilización reanuda la meiosis. Choques físicos o químicos aplicados durante la meiosis I o II puede suprimir la división celular, la producción de triploides por la retención del primer (I1) o segundo (I2) cuerpo polar.



**Figura 5.** Producción de un cigoto triploide, mediante el cruce de un ovocito de un animal tetraploide con un espermatozoide de un individuo diploide.



**Figura 6.** A) Producción de un tetraploide por la inhibición de la primera división celular (primera mitosis). B) Producción de un tetraploide por inactivación del ADN del espermatozoide seguido por la inhibición de la expulsión. C) Producción de un tetraploide por inhibición del primer cuerpo polar en huevos derivados de ejemplares triploides y fecundados con espermatozoide de individuos diploides.

Son varios los métodos usados para inhibir la expulsión del primer o segundo cuerpo polar en bivalvos. Hay inductores de naturaleza química, como citocalasina-B (CB), 6-dimetilaminopurina (6DMAP), cafeína (CF) y calcio (CA), así como físicos, como choques térmicos (T) y presión (P) (Tabla 1).

**Tabla 1.** Efectos de la inducción a la triploidía en larvas de bivalvos mediante la inhibición de la expulsión del primer o segundo cuerpo polar. I1, I2 = inhibición de la expulsión del primer y segundo cuerpo polar respectivamente, 2N = diploide o no inducidos a la triploidía, 3N = triploide o inducidos a la triploidía, P = presión, CB = citocalasina-B, 6DMAP= 6-Dimetilaminopurina, T = choque térmico, CF = cafeína, CA = calcio, cf = citofluorometría, cc = conteo cromosómico, ccp = conteo de cuerpos polares, tn = tamaño del núcleo, I= inducidos a la triploidía, NI= no inducidos a la triploidía.

	Método de Inducción	Larvas Triploides (%)	Supervivencia larvas inducidas (%)	Crecimiento larvas inducidas (µm/d)	Método de Verificación de ploidía	Autores
<i>Argopecten irradians</i>	I1: CB: 0,05- 0,1 mg L <sup>-1</sup>	66-94	6-20	-	cf	Tabarini, 1984
	Control	-	80	-	-	-
<i>Argopecten purpuratus</i>	I2: CB: 0,5 mg L <sup>-1</sup>	17	-	-	cc	Winkler et al., 1993
	Control	-	-	-	-	-
	I1: T: 31°C	67	11,2-16,5	11,6	cc	Toro et al., 1995
	Control	-	51,8-53,4	12,5	-	-
<i>Argopecten ventricosus</i>	I1: T: 31°C	46	-	-	cc	Canello et al., 1992
	I2: CB: 0,5 -1 mg L <sup>-1</sup>	8-58	9-15	-	cf	Ruiz-Verdugo et al., 2000
<i>Chlamys farreri</i>	Control	-	100	-	-	-
	I1: CB: 0,1-0,5 mg L <sup>-1</sup>	18	0,2	10,4	cc: cf	Yang et al., 2000
	Control	-	18	11,0	-	-
	I1:T:1°C	31	-	-	cc	Zichen et al., 1990
<i>Chlamys nobilis</i>	Control	-	-	-	-	-
	I1: T:6 °C	41	-	-	-	Zhinan et al., 1995
<i>Chlamys varia</i>	Control	-	-	-	-	-
	I2: CB: 1 mg L <sup>-1</sup>	78	87,5	10,2	cc	Barón et al., 1989
<i>Crassostrea gigas</i>	Control	-	50	9,7	-	-
	I1: P 6000-8000 psi	57	-	-	cf: cc	Chaiton y Allen, 1985
	I1: CB: 1 mg L <sup>-1</sup>	4-38	-	-	cf	Allen et al., 1986a
	I2: CB: 1 mg L <sup>-1</sup>	12-100	-	-	-	-
	I1: P: 7200 psi	60	-	-	-	-
	T: 32-35°C	25-60	60-72	-	cc	Quillet y Panelay, 1986
	T: 30-38°C	45	0-15	-	-	-
	Control	-	49-71	-	-	-
	I1: CB: 0,5-1 mg L <sup>-1</sup>	94-100	12,5	12,3	tn	Desroisers et al., 1993
	I1:6DMAP 300 µM L <sup>-1</sup>	90	13,5	13,0	-	-
	Control	-	26,0	13,8	-	-
	I2: CB: 1 mg L <sup>-1</sup>	70	-	I= NI	cf	Allen y Downing, 1986
	Control	-	-	-	-	-
	I1: CB 0,5 mg L <sup>-1</sup>	55-57	21	-	cf	Melo et al., 2015
	I1:6D: 398-450 µM L <sup>-1</sup>	22-56	17	-	-	-
	Control	45	57	-	-	-
	I2: CB: 1 mg L <sup>-1</sup>	82-94	-	-	-	Wang et al., 2002
	Control	-	-	-	-	-
	I1: CB 1,0 mg L <sup>-1</sup>	52-90	I>NI	11	-	Downing y Allen, 1987
	Control	-	-	10,3	-	-
<i>Crassostrea virginica</i>	I2: CB: 0,1-1 mg L <sup>-1</sup>	11,5-50	I<NI	-	cc	Stanley et al., 1981
	I1: CB 0,5-1 mg L <sup>-1</sup>	7-100	-	-	-	Shatkin y Allen, 1989
	I2: CB 0,5-1 mg L <sup>-1</sup>	96	-	-	-	-
	I2: CB: 1 mg L <sup>-1</sup>	79	22	-	cf	Allen y Bushek, 1992
<i>Mytilus edulis</i>	I2: T: 28-38°C	97	-	-	cc	Yamamoto y Sugawara, 1988
	I1: T: 1°C	40-60	-	-	-	-
	I2: T: 1°C	85	-	-	-	-
	I1: T: 20, 25, 30°C	25	-	-	cc	Beaumont y Kelly, 1989
	I1: CB: 0,1; 0,5; 1 mg L <sup>-1</sup>	13-44	53,5	-	-	-

	I2: CB: 0,1; 0,5; 1 mg L <sup>-1</sup>	24-71	80,2	-		
	Control	-	87,1			
<b><i>Mytilus galloprovincialis</i></b>	I2: CB: 1 mg L <sup>-1</sup>	86	77,8	4,5	cf, ccp	Scarpa et al., 1994
	I2: T: 30°C	81	63,6	4,2		
	I2: CA: 0,1 M	7	51,5	5,0		
	I2: CF: 15 mM	71	46,0	4,6		
	I2: CA+T(30°C)	81	58,4	3,5		
	I2: CF+T(30°C)	73	60,2	3,5		
	Control		80,3	5,2		
<b><i>Nodipecten subnodosus</i></b>	I2:CB:0,5-1,0 mg L <sup>-1</sup>	70-95	38-67	-	-	Maldonado-Amparo et al., 2004
	Control	-	87	-		
<b><i>Ostrea edulis</i></b>	I2: CB: 1,0 mg L <sup>-1</sup>	68-70	I<NI	15,2	cc	Gendrau y Grizel, 1990
	Control			14,7		
<b><i>Pecten maximus</i></b>	I1: CB: 0,1, 0,5 mg L <sup>-1</sup>	13-30	12,7	-	cc: ccp	Beaumont, 1986
	Control	-	19,9			
<b><i>Pinctada fucata martensii</i></b>	I1: CB: 0,5 mg L <sup>-1</sup>	65	-	-	cc: cf	Uchimura et al., 1989
	I1: CB: 0,5 mg L <sup>-1</sup>	0	I<NI	I>NI	cf	Wada et al., 1989
	I2: CB: 0,5 mg L <sup>-1</sup>	100	-	-		
	I1: CB: 0,1 mg L <sup>-1</sup>	0-77				
	I2: CB: 0,1 mg L <sup>-1</sup>	0-80				
	I1: T: 6,5°C	52				
	I2: T:7,5°C	0				
<b><i>Placopecten magellanicus</i></b>	I1: CD: 0-10 mg L <sup>-1</sup>	87	-	-	cc, tn	Desroisiers et al., 1993
	I2: 6DMAP: 0-600 µM	95	-	-		
<b><i>Ruditapes philippinarum</i></b>	I1: CB: 1 mg L <sup>-1</sup>	75	19-27	I=NI	cc	Dufey y Diter, 1990
	Control	-	18-34			
<b><i>Tapes philippinarum</i></b>	I2: CB: 0,5 mg L <sup>-1</sup>	73	46-67	9,33		Laing y Utting, 1994
	Control		41-69	9,12		
	I1: CB: 0,5 mg L <sup>-1</sup>	67-73	66	4,1		Utting y Doyou, 1992
	Control		62	3,9		
<b><i>Tapes semidecussatus</i></b>	I1: CB: 0,2; 0,5; 1 mg L <sup>-1</sup>	31-77	-	-	cc, ccp	Beaumont y Contaris, 1988
	I2: CB:0,2; 0,5; 1 mg L <sup>-1</sup>	31-81	-	-		
	I1:CB: 0,5-1 mg L <sup>-1</sup>	40-50	-	-	cc	Gosling y Nolan, 1989
	I1:T: 32°C	23-56	-	-		
<b><i>Saccostrea cucullata</i></b>	I2:CB: 1,5 mg L <sup>-1</sup>	87	-	-	-	Zhinan et al., 1994
	I2:T: 32-39 °C	4-55	-	-		
	I2:T: 0-0,1°C	37	-	-		

De acuerdo a los datos presentados en la tabla 1, es posible sacar en claro varios aspectos: 1) La técnica más usada y aceptada para verificar la ploidía en larvas de bivalvos es el conteo cromosómico, seguido de la citofluorometría; 2) los mayores valores de porcentaje de larvas triploides han sido obtenidos usando el método de la inhibición de la expulsión del segundo cuerpo polar en comparación con la inhibición de primer cuerpo polar; 3) entre los estímulos que permiten obtener mayores porcentajes de larvas triploides están el uso de los inductores CB, 6DMAP y Temperatura; 4) el uso de inductores a la triploidía está asociado a bajos valores de supervivencia de las larvas, pero no tiene un efecto sobre su crecimiento; 5) en especies de clima cálido, como *Pinctada fucata martensii*, se ha obtenido éxito en la inducción a la triploidía con bajas temperaturas, mientras que en especies de clima templado, como *Argopecten purpuratus* y *Mytilus edulis*, esto mismo ha ocurrido aplicando altas temperaturas (Toro et al., 1995).

La forma de acción, así como las ventajas y desventajas del uso de agentes químicos y físicos como inhibidores de la expulsión de cuerpos polares, es variada. En el caso de la CB, este es un metabolito fúngico que inhibe la polimerización de los microfilamentos de actina y de los microtúbulos de tubulina, reteniendo así el primer o segundo cuerpo polar del cigoto (Beaumont y Fairbrother, 1991; Ruiz-Verdugo et al., 2000; Sun y Schatten, 2006). Esta sustancia se une al dímero  $\alpha\beta$ -tubulina, impidiendo que éstos se añadan al extremo de los microtúbulos, de modo que se interrumpe el equilibrio dinámico de la polimerización de los microtúbulos (Meza y Frixione, 1996). El uso de la CB es considerado uno de los métodos más eficaces para producir triploides (Beaumont y Fairbrother, 1991; Winkler et al., 1993), pero tiene como desventaja que produce altos porcentajes de anomalías y mortalidad durante los primeros estadios de vida (Gosling y Nolan, 1989; Winkler et al., 1993; Hernández-Ibarra, 2004). Asimismo es un reactivo muy costoso y considerado cancerígeno (Desroisiers et al., 1993), requiere ser mezclado con dimetilsulfóxido (DMSO) para que penetre en el ovocito (Eudeline et al., 2000). De otro lado, el 6-DMAP es un inhibidor de la fosforilación de proteínas (Rimme et al., 1989; Szöllösi et al., 1993). Los eventos de fosforilación del complejo guanina tubulina (GDP-tubulina  $\rightarrow$  GTP-tubulina) son requeridos para que ocurra la unión de los dímeros  $\alpha\beta$ -tubulina y la consecuente polimerización de los microtúbulos (Mitchison y Kirschner, 1984). De tal forma que el uso de este químico afecta la organización y



despolimerización de los microtúbulos que forman el huso acromático y los filamentos corticales, induciendo al bloqueo del movimiento de los cromosomas e inhibiendo la anafase y la formación de cuerpos polares (Desroisers et al., 1993; Gérard et al., 1994). Este método tiene varias ventajas, como ser también muy eficaz para producir bivalvos triploides (Desroisers et al., 1993), no ser cancerígeno y ser soluble en agua (Gerard et al., 1994). No obstante, se ha reportado que las larvas tratadas son afectadas por el 6DMAP, siendo menos resistentes que las no tratadas (Desroisers et al., 1993). En cuanto a los estímulos físicos, los choques de temperatura evitan la división citoplasmática, promoviendo que se disuelvan las fibras del huso cromático así como los filamentos de actina en el surco de segmentación, evitando de este modo la formación del cuerpo polar (Allen et al., 1989). La polimerización de los dímeros  $\alpha\beta$ -tubulina y la estabilidad de los microtúbulos formados depende de la temperatura, temperaturas muy altas o bajas ocasionan la separación de estos dímeros (Lodish et al., 2000). Tiene como ventaja que es un método económico (Yamamoto y Sugawara, 1988), pero la desventaja de que se obtienen menores porcentajes de triploides en comparación con los inductores químicos (Canello et al., 1992).

Además del tipo de inductor aplicado, otros factores que influyen en la eficacia de la formación de triploides son la calidad del esperma, el momento de aplicación del estímulo así como su intensidad dada por la duración dosis del estímulo. Se obtiene mayor eficacia usando ejemplares con espermatozoides completamente maduros (Downing, 1988a) aplicando los inductores entre 2 y 4 minutos antes de la expulsión del primer cuerpo polar, o cuando el 50% de los ovocitos hayan expulsado el primer cuerpo polar (Maldonado-Amparo et al., 2004) a una dosis y duración intermedia (Downing y Allen, 1987). El uso de altas concentraciones de químicos frecuentemente conduce a una mayor producción de triploides (Stanley et al., 1984; Tabarini, 1984; Komaru et al., 1988) pero esto suele ir acompañado por un incremento en la mortalidad, especialmente en la fase larvaria (Beaumont, 1986; Downing y Allen, 1987; Barber y Man, 1991; Zeng et al., 1995; Ruiz-Verdugo et al., 2000; Yang et al., 2000), un efecto probablemente causado por la toxicidad de los productos químicos (Beaumont y Fairbrother, 1991). En cuanto a la duración de los tratamientos, aquellos de corta duración (10 y 15 minutos) permiten obtener mayores porcentajes de triploides y porcentaje de larvas D que a duraciones mayores o menores (Gerard et al., 1994).

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo General

Evaluar el efecto de tres métodos de inducción a la triploidía sobre el desarrollo, la supervivencia y crecimiento larvario y postlarvario de *Argopecten nucleus*.

### 4.2 Objetivos específicos

- Obtener larvas triploides de *A. nucleus* mediante la inhibición de la expulsión del segundo cuerpo polar de los cigotos mediante la aplicación de estímulos químicos y/o físicos.
- Evaluar el uso de tres métodos de inhibición de la expulsión del segundo cuerpo polar de los cigotos (Citocalasina B, 6-Dimetilaminopurina y temperatura de 18°C) para obtener larvas triploides de *A. nucleus*.
- Analizar el desarrollo, supervivencia y crecimiento de larvas y postlarvas de *A. nucleus* derivadas de cigotos inducidos y no inducidos a la triploidía.

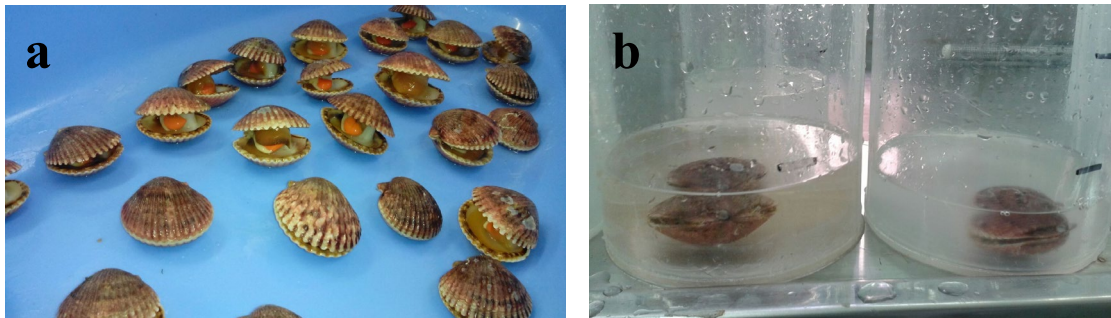
## 5. METODOLOGÍA

### 5.1 Obtención de Cigotos

Un total de 60 ejemplares de *A. nucleus* (longitud > 40 mm) captados del medio natural y cultivados en Bahía de Neguanje, Santa Marta, Colombia (11° 20' LN y 74° 10' LW) por INVEMAR, se trasladaron en húmedo a 18°C al Laboratorio de Moluscos Marinos de la Universidad del Magdalena ubicado en Taganga, Santa Marta (11° 16' 03" LN y 74° 11' 24" LW). En esta zona, el promedio de la temperatura del agua de mar varía entre 22°C y 30°C, la salinidad fluctúa entre 32 y 37 ‰, la concentración de seston está entre 0,93 y 6,6 mg L<sup>-1</sup> y el porcentaje orgánico del seston entre 15 y 45 %, (Velasco y Barros, 2007; López, 2008; Velasco et al., 2009). Se hizo un acondicionamiento reproductivo de estos animales colocándolos durante 20 días en unas canastas plásticas (60 x 40 x 25 cm) suspendidas dentro de tanques rectangulares de fibra de vidrio con fondo plano (2,56 x 0,50 x 0,36m, 200 L) a una densidad de 30% de cobertura del fondo. Estos tanques fueron provistos de agua de mar microfiltrada a 1µm a 25°C y 37 ‰ salinidad. Como alimento se suministró una mezcla de *Isochrysis galbana* y *Chaetoceros sp.* en proporción 1:1, de forma continua por goteo, manteniendo una concentración de 50 células µL<sup>-1</sup> en el tanque. Diariamente se realizaron recambios de agua del 80%, así como un lavado de las paredes y un sifoneo del material precipitado.

Grupos de 20 ejemplares diferentes de *A. nucleus* sexualmente maduros, fueron dejados sin alimentación por 24 h e inducidos al desove, en tres ocasiones diferentes. Para ello, se eliminaron los epibiontes presentes en las conchas de los animales mediante abrasión, se pusieron en desecación por 30 min (Figura 7a) y se expusieron a una alta concentración de microalgas (*Isochrysis galbana* y *Chaetoceros sp.*) y a cambios de temperatura de 23°C a 30°C cada 30 min manteniéndolos en un acuario de fondo oscuro (15 L). Los animales desovantes se separaron en recipientes de acrílico (500 mL) con agua de mar filtrada (1µm) y a una temperatura de 25 °C, cuidando de cambiar frecuentemente el agua para evitar la autofecundación. En cada expulsión, los gametos fueron trasladados a un balde, mientras que el animal fue lavado y colocado con agua de mar microfiltrada fresca en el mismo recipiente, para evitar que se mezclaran espermias con ovocitos, almacenando los gametos de cada animal

en un recipiente (10 L) diferente y debidamente marcado por no más de 30 minutos (Figura 7b). Luego, la fecundación se hizo adicionando espermatozoides al recipiente con ovocitos, hasta lograr un 90% de fertilización (ovocitos con membrana de fecundación y expulsando del primer cuerpo polar en relación al total de ovocitos), posteriormente se homogenizó mediante agitación suave con una paleta de acrílico perforada.



**Figura 7.** a) Reproductores de *A. nucleus* en desecación y b) Gametos femeninos y masculinos de *A. nucleus*.

## 5.2 Diseño experimental y cultivo larvario

Con grupos de cigotos provenientes de distintas fecundaciones cruzadas se probaron 3 diferentes técnicas de inhibición de la expulsión del segundo cuerpo polar: 1) choques térmicos de 18°C por 10 min (Yamamoto y Sugawara, 1988; Beaumont y Kelly, 1989; Wada et al., 1989), 2) 6 Dimetilaminopurina (6-DMAP), 300  $\mu\text{M L}^{-1}$  por 15 min (Desroisers et al., 1993) y 3) citocalasina B (CB), 1 mg  $\text{L}^{-1}$  disuelta en dimetilsulfóxido (DMSO) al 1% por 15 min enjuagando luego los cigotos con DMSO al 0,1% por 20 min (Barón et al., 1989; Shatkin y Allen, 1989; Dufey y Diter, 1990). Se tuvo un grupo control con cigotos no tratados, y un control del DMSO usado en el tratamiento de CB (control DMSO) al cual se le adicionó DMSO al 1% por 15 min, enjuagando luego con una solución de DMSO al 0,1% por 20 min. Todos los tratamientos fueron iniciados cuando el 50% de los ovocitos expulsaron el primer cuerpo polar (Allen y Bushek, 1992; Maldonado-Amparo et al., 2004; Racotta et al., 2008), lo cual ocurrió alrededor de los  $17 \pm 2$  minutos postfertilización. Estos tratamientos fueron aplicados por triplicado, haciendo 3 eventos de fecundación con al menos 15 días de separación entre ellos y usando reproductores diferentes. Los cigotos producidos en cada tratamiento fueron mantenidos a una densidad de  $1 \times 10^6$  cigotos  $\text{L}^{-1}$  (Eudeline et al., 2000). Todos los

enjuagues que se hicieron con DMSO se llevaron a cabo reteniendo los cigotos con un tamiz de 10  $\mu\text{m}$ . La estimulación de los cigotos tratados se detuvo por dilución, colocándolos en los tanques de cultivo larval con 500 L de agua de mar microfiltrada a 25°C (1  $\mu\text{m}$ ).

Los cigotos tratados y no tratados fueron colocados a una densidad máxima de 1 cigoto  $\text{mL}^{-1}$  en tanques cilindrocónicos (500 L), bajo las mismas condiciones de calidad de agua descritas anteriormente y sin aireación. A partir de las 24 h, cada 48 h se hizo un recambio del 100% del agua, reteniendo las larvas en tamices (ojos de malla entre 40 y 65  $\mu\text{m}$ ) y colocándolas a una densidad entre 0,66 y 0,74 larvas  $\text{mL}^{-1}$ . A cada tanque se le suministró aireación y una mezcla de *Isochrysis galbana* y *Chaetoceros* sp. (1:1) a una concentración de 10 células  $\mu\text{L}^{-1}$  día<sup>-1</sup> entre los días 1 y 6, y 15 células  $\mu\text{L}^{-1}$  día<sup>-1</sup> entre los días 7 y 13.

A las edades de 4, 7, 14 y 20 horas, así como a los 3, 5, 7, 9, 11 y 13 días se tomaron 3 muestras representativas de la columna de agua de cada tanque, luego de realizar una homogenización del contenido de éste. Estas muestras fueron fijadas con lugol (10%) y analizadas bajo un microscopio Nikon Eclipse E200® provisto de una cámara fotográfica digital Optica®, y se realizó un registro fotográfico, una estimación de la densidad y estadio de desarrollo de los embriones o larvas, así como y la medición de la longitud de al menos 30 de ellos elegidos al azar. Con estos datos se estimó la supervivencia acumulada de cada réplica a lo largo del cultivo como la proporción de larvas vivas en las diferentes edades muestreadas respecto al número de larvas sembradas a las 24 h de vida en cada tanque. La tasa de desarrollo se determinó de acuerdo al porcentaje de embriones y/o larvas desarrollados en cada hora de medición. De otro lado, a las 14 horas se tomaron tres muestras adicionales de cada tanque (300 larvas trocófora) para los análisis de estimación del porcentaje de larvas triploides, siguiendo la metodología de Allen y Bushek (1992), así como la de Darzynkiewicz y Juan (2001). De acuerdo a las mismas, las larvas fueron concentradas en una suspensión de 1 mL, peletizándolas por centrifugación a 1500x g por 10 s, en una centrífuga. El sobrenadante fue descartado y a cada tubo se le añadió 300  $\mu\text{L}$  de una solución stock de yoduro de propidio (PI) (10 mg de PI, 0,1 mL de Tritón X100, 3,7 mg de EDTA y 90 mL de PBS al 10% sin calcio, la cual se pasó por un microfilro de 0,20  $\mu\text{m}$  y se aforó a 100 mL). Estas muestras se almacenaron protegidas de la luz a 4°C por un tiempo máximo de cuatro horas. Los análisis de citofluorometría se llevaron a cabo usando un citofluorómetro de flujo (BD LSRFortessa). La

ploidía aparente de cada tratamiento fue calculada de la proporción relativa de células triploides en relación al número total de células analizadas por el ajustador de curvas del programa (FlowJo 7.6.1), usando como estándares espermatozoides (condición haploide) y hemolinfa de *A. nucleus* (control diploide). El cálculo de la ploidía aparente asume que cada larva, diploide y triploide, hace una contribución aproximadamente igual al total de células medidas, lo cual es razonable ya que el rango de distribución de tallas de las larvas trocófora es muy estrecho.

### 5.3 Asentamiento y cultivo postlarvario

Cuando más del 50% de las larvas presentaron mancha ocular (día 11 y 13), en cada tanque se sumergieron 25 colectores artificiales, consistentes en bolsas de polipropileno (90 x 70 cm), previamente biologizados (por 5 días) sumergiéndolos en una mezcla de microalgas *Isochrysis galbana*, *Tetraselmis chui* y *Chaetoceros calcitrans*. Los tanques se mantuvieron bajo las mismas condiciones descritas anteriormente para el cultivo de larvas, exceptuando que los tanques fueron cubiertos con una malla plástica negra para reducir la intensidad de la luz, se redujo la temperatura a 24°C y el recambio de agua se hizo cada 24 h sin bajar el nivel del agua de los tanques. Para ello se adicionó agua de mar por la parte superior del tanque, mientras se extrajo agua por el drenaje inferior del mismo colocando los primeros días un tamiz de 65 µm para recuperar las larvas aún no asentadas que pudieron salir por el drenaje. Luego de 15 días, los colectores fueron empacados individualmente en bolsas mosquiteras de nailon (55 x 15 cm, ojo de malla de 1 mm) y amarrados en parejas a líneas de 15 m. Con ayuda de un montacargas y una lancha, las líneas con los colectores húmedos se trasladaron dentro de tanques de 500 L hasta la estación de cultivo en Bahía Taganga (11° 16' 04" LN y 74° 11' 36" LW). Allí fueron suspendidos a 6 m de profundidad, en líneas de cultivo o *long lines* durante un mes y medio, hasta convertirse en juveniles de 10 mm, momento en el cual fueron desprendidos manualmente de los colectores artificiales. El porcentaje de juveniles recuperados fue calculado como la relación entre el número de juveniles encontrados con respecto al número de larvas pediveliger sembradas en los tanques con colectores, mientras que el crecimiento se determinó a partir de la medición de la longitud de al menos 30 de juveniles elegidos al azar de cada tratamiento. Durante los meses de cultivo postlarvario en el mar (diciembre de 2015 a marzo de 2016), se midieron algunas variables ambientales como temperatura (°C), salinidad

(‰), seston  $\text{mg L}^{-1}$  y contenido de materia orgánica del seston (MOP), siguiendo la metodología de Strickland y Parsons (1972).

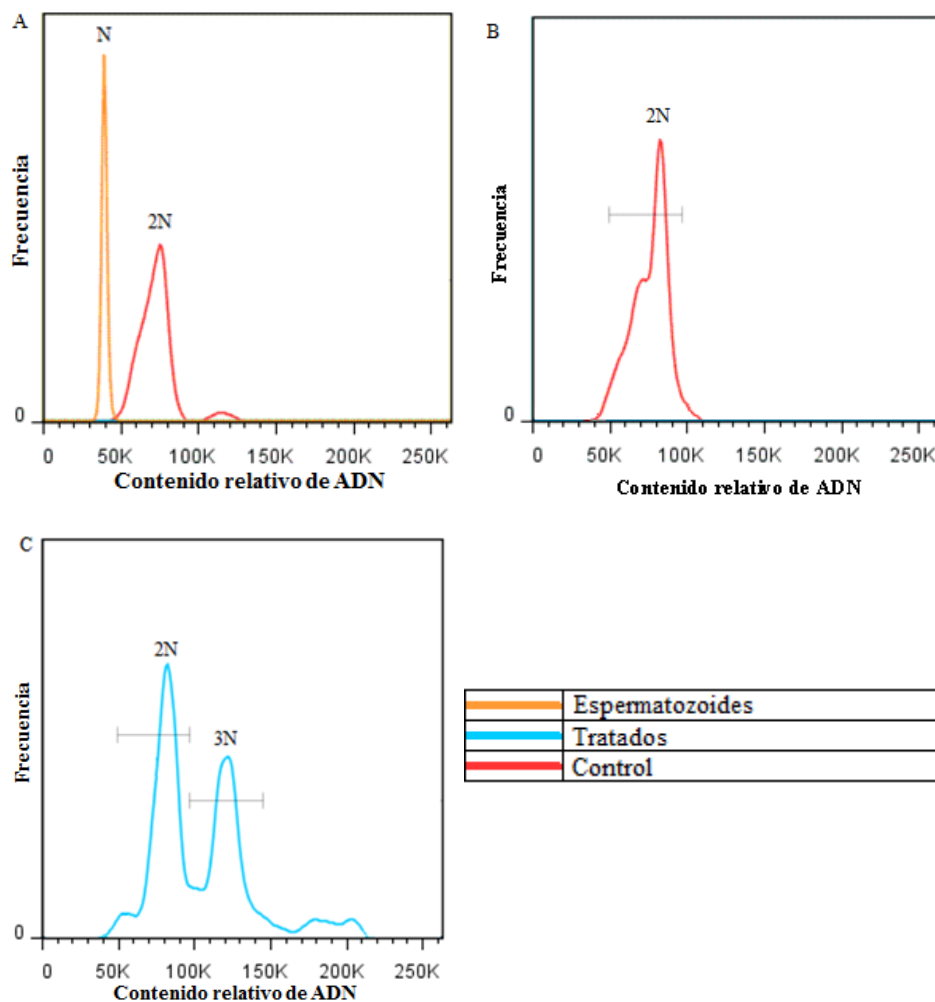
#### **5.4 Análisis Estadístico**

Se realizaron análisis de varianza a una vía para establecer la existencia de diferencias significativas entre los tratamientos y controles en cuanto los porcentajes de larvas triploides, de larvas D y postlarvas recuperadas, así como a la longitud las postlarvas. Se aplicaron análisis de covarianza para establecer la existencia de diferencias significativas en el porcentaje de embriones o larvas en diferentes fases desarrollo así como el crecimiento y supervivencia acumulada de las larvas sometidas a los diferentes tratamientos de inducción a la triploidía y a los controles, teniendo como covariador la edad de las larvas. Previamente se comprobó el cumplimiento de los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas. Como el crecimiento de las larvas no cumplió con estos supuestos, los datos fueron transformados a logaritmo natural. Se realizaron análisis de correlación para establecer asociaciones entre el porcentaje de juveniles recuperados o su tasa de crecimiento, con la temperatura, salinidad, seston y contenido orgánico del seston. Para la realización de todos los análisis se usó el programa estadístico STATGRAPHICS Centurión XVI.I, usando un alfa de 0,05 para todas las decisiones de significancia.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Evaluación de larvas triploides

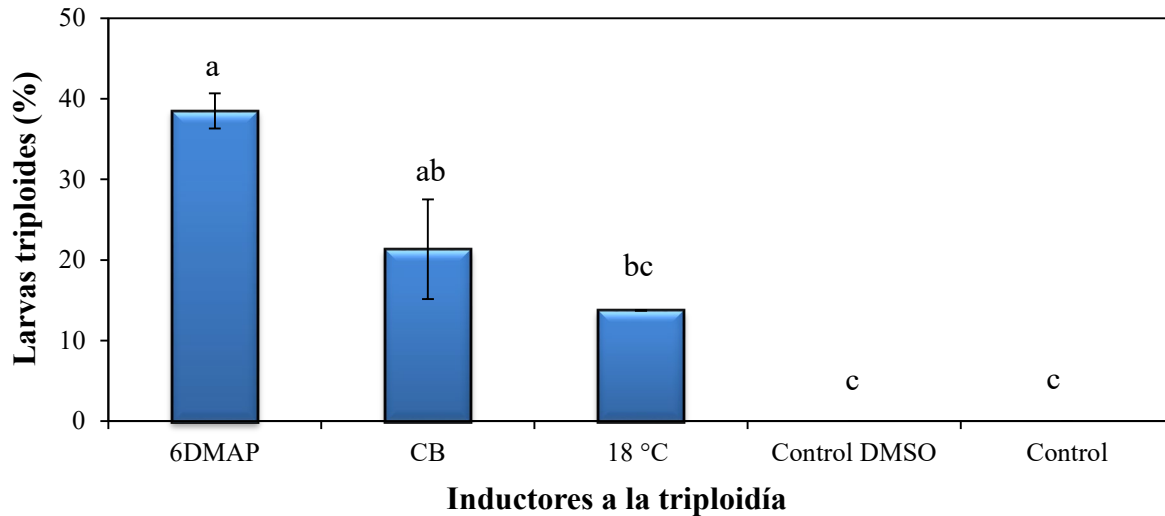
Los análisis de citometría de flujo permitieron determinar los distintos niveles de ploidía. El cálculo se hizo teniendo como referencia los perfiles estándar de contenido de ADN para las condiciones haploide (espermatozoides de *A. nucleus*) y diploide (hemolinfa de *A. nucleus*) (Figura 8A). Los grupos control, con larvas predominantemente diploides, y los tratados, con larvas diploides y triploides, se detallan en las figuras 8B y 8C, respectivamente.



**Figura 8.** Histograma de frecuencia con el contenido de ADN relativo para el nivel de ploidía de las larvas de *A. nucleus*. A. Estándares haploide N (espermatozoides de *A. nucleus*) y diploide 2N (hemolinfa de *A. nucleus*), B. larvas no tratadas 2N y C. larvas tratadas 2N y 3N.



El uso de los agentes inductores químicos 6DMAP y CB, y el choque térmico produjo larvas trocófora triploides de *A. nucleus*, mientras que estas no fueron detectadas en ninguno de los controles (general y el de CB). El porcentaje de larvas triploides dependió significativamente del tratamiento usado ( $gl = 4$ ,  $F = 20,9$ ,  $P = 0,0003$ ), siendo mayor en el grupo tratado con 6DMAP (39%) que sometido a choque térmico (14%;  $P < 0,05$ ), mientras que en el tratado con CB fue intermedio (21%;  $P > 0,05$ ) (Figura 9).

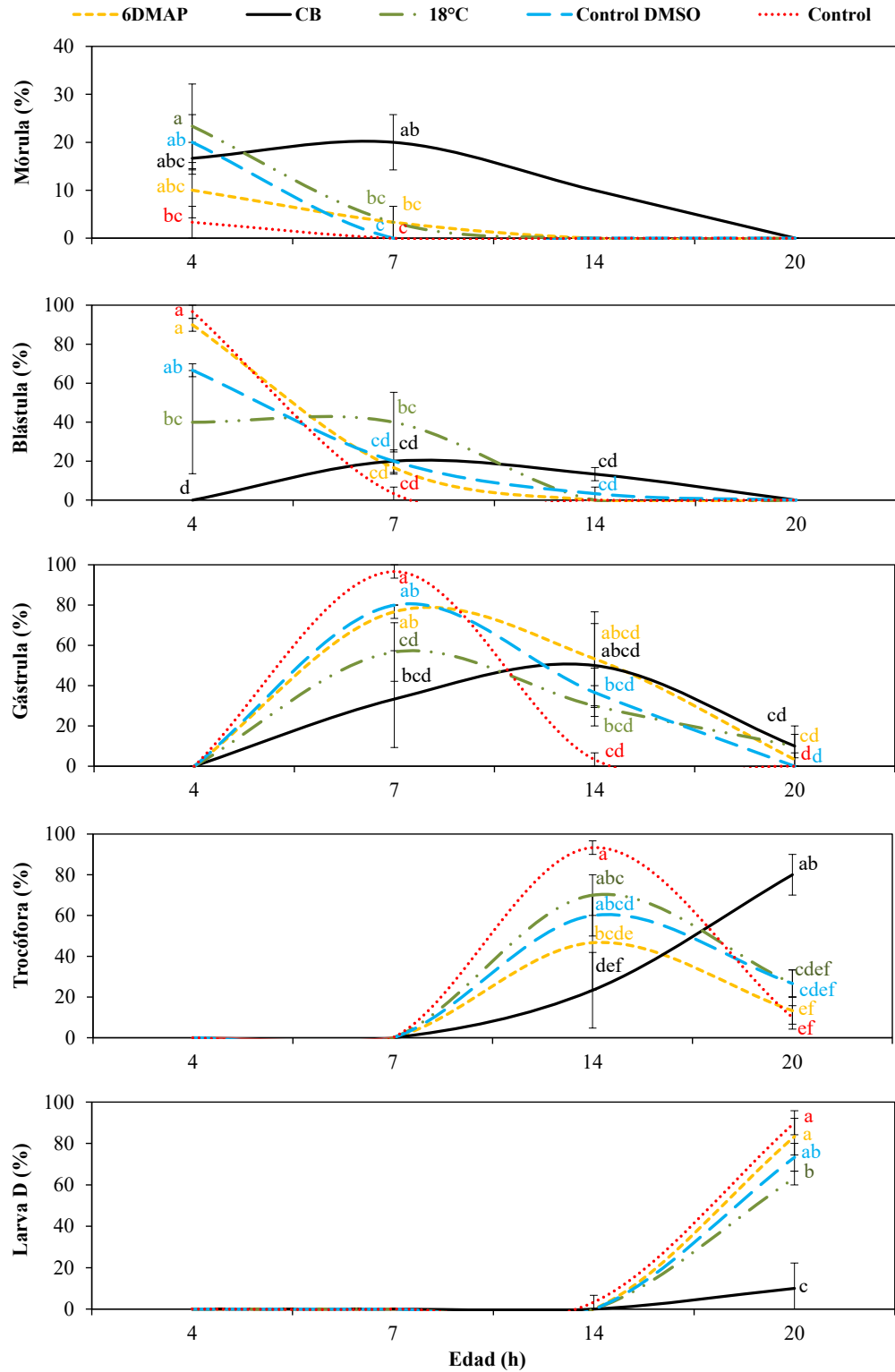


**Figura 9.** Porcentaje de larvas triploides de *A. nucleus* obtenidas mediante la inhibición de la expulsión del segundo cuerpo polar. Letras iguales indican falta de diferencias significativas ( $P > 0,05$ ). Las barras de error representan el error estándar.

## 6.2 Desarrollo temprano

Los cigotos pasaron por los estadios de mórula, blástula, gástrula, larvas trocófora y veliger en las primeras 20 horas de vida, variando sus porcentajes de abundancia de 0 a 97% (Figura 10). Dentro de las horas a las que se hicieron los muestreos, las mayores abundancias de mórulas y blástulas se presentaron a la edad de 4 horas, mientras que gástrulas, larvas trocófora y veliger a las edades de 7, 14 y 20 horas, respectivamente. No obstante, en el tratamiento con CB se observó un patrón diferente, presentándose las mayores abundancias de mórulas y blástulas a las 7 horas, de gástrulas a las 14 horas y larvas trocófora y pediveliger a las 20 horas. Los porcentajes de embriones y/o larvas en los diferentes estadios fueron afectados significativamente por la edad ( $P > 0,0001$ ), el tratamiento de inducción a la triploidía ( $P <$

0,0086) y la interacción de estos factores ( $P < 0,0155$ ). Valores significativamente mayores se presentaron en los animales del control, mientras que los menores fueron registrados en el tratamiento de CB (Figura 10).

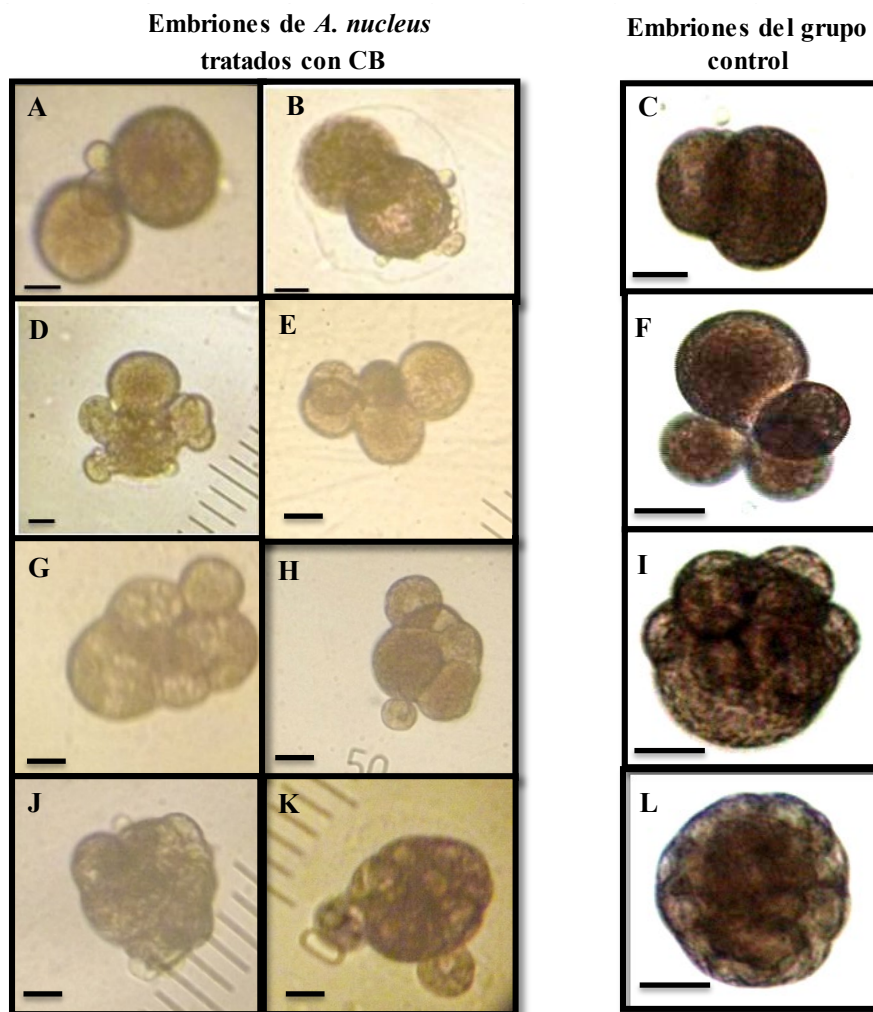


**Figura 10.** Porcentaje de embriones o larvas de *A. nucleus* en diferentes fases desarrollo procedentes de cigotos inducidos y no inducidos a la triploidía. Letras iguales indican falta de diferencias significativas ( $P > 0,05$ ). Las barras de error representan el error estándar.

### **6.3 Anomalías del desarrollo embrionario**

En los tratamientos en que se usó DMSO (CB y control DMSO) se encontró que una proporción importante de cigotos que atravesó el tamiz de 20  $\mu\text{m}$  usado para los enjuagues, por lo que fue necesario usar uno de 10  $\mu\text{m}$  para retenerlos, sin embargo bajo microscopio lucían morfológicamente normales en tamaño y forma circular.

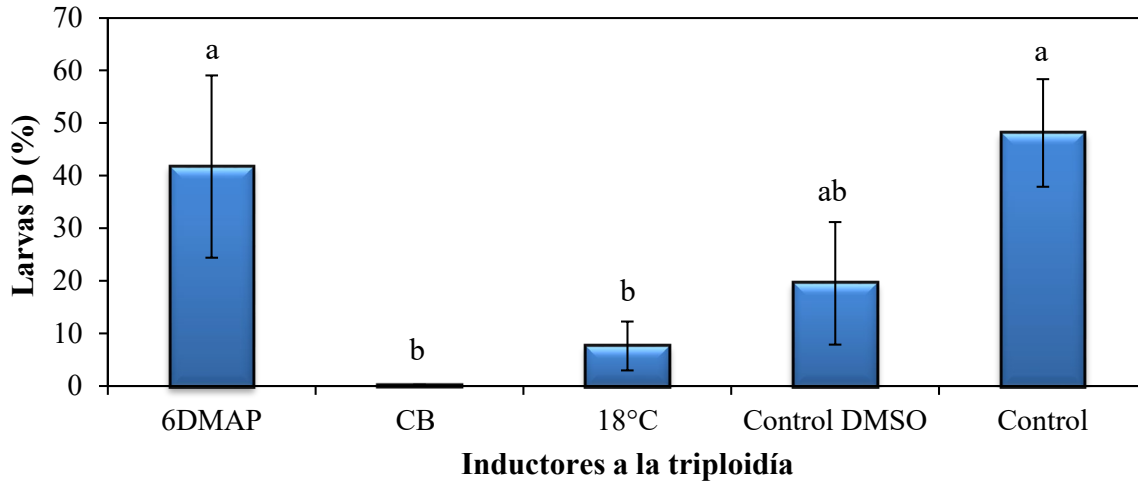
En los embriones derivados de cigotos tratados con CB se observaron anomalías morfológicas desde el primer clivaje, dando como resultado blastómeros separados y pequeñas protuberancias, micrómeros o lóbulos polares alrededor de los mismos (Figura 11A), así como una membrana despegada de los blastómeros (Figura 11B), etapa donde normalmente se forma un embrión solo con dos blastómeros sin que se observe la membrana separada (Figura 11C). En el segundo clivaje se observó la presencia de un exceso anormal de micrómeros muy pequeños y de diámetros diferentes (Figura 11 D y E), los cuales normalmente no deberían ser más de cuatro (Figura 11F). En el tercer clivaje se mostraron más micrómeros de lo normal, bastantes separados y de variables tamaños (Figura 11 G y H) donde normalmente se verifican más unidos y con tamaños similares (Figura 11I). En el estadio de blástula, varios de los micrómeros tienen una posición anormalmente excéntrica lo que confieren a la blástula una forma de pera o blastómeros que sobresalen de la periferia dando la impresión de “orejas” (Figura 11 J y K) muy diferente a la ovoide normal (Figura 11L). Además, las larvas trocófora tratadas con CB no podían nadar con normalidad y a menudo giraban en el mismo lugar y en la etapa de larvas D sus movimientos eran lentos o retardados.



**Figura 11.** Embriones de *A. nucleus* tratados con CB y el grupo control: A, B y C, Primer clivaje, D, E y F, Segundo clivaje, G, H y I, Tercer clivaje, J, K y L, Blástula.

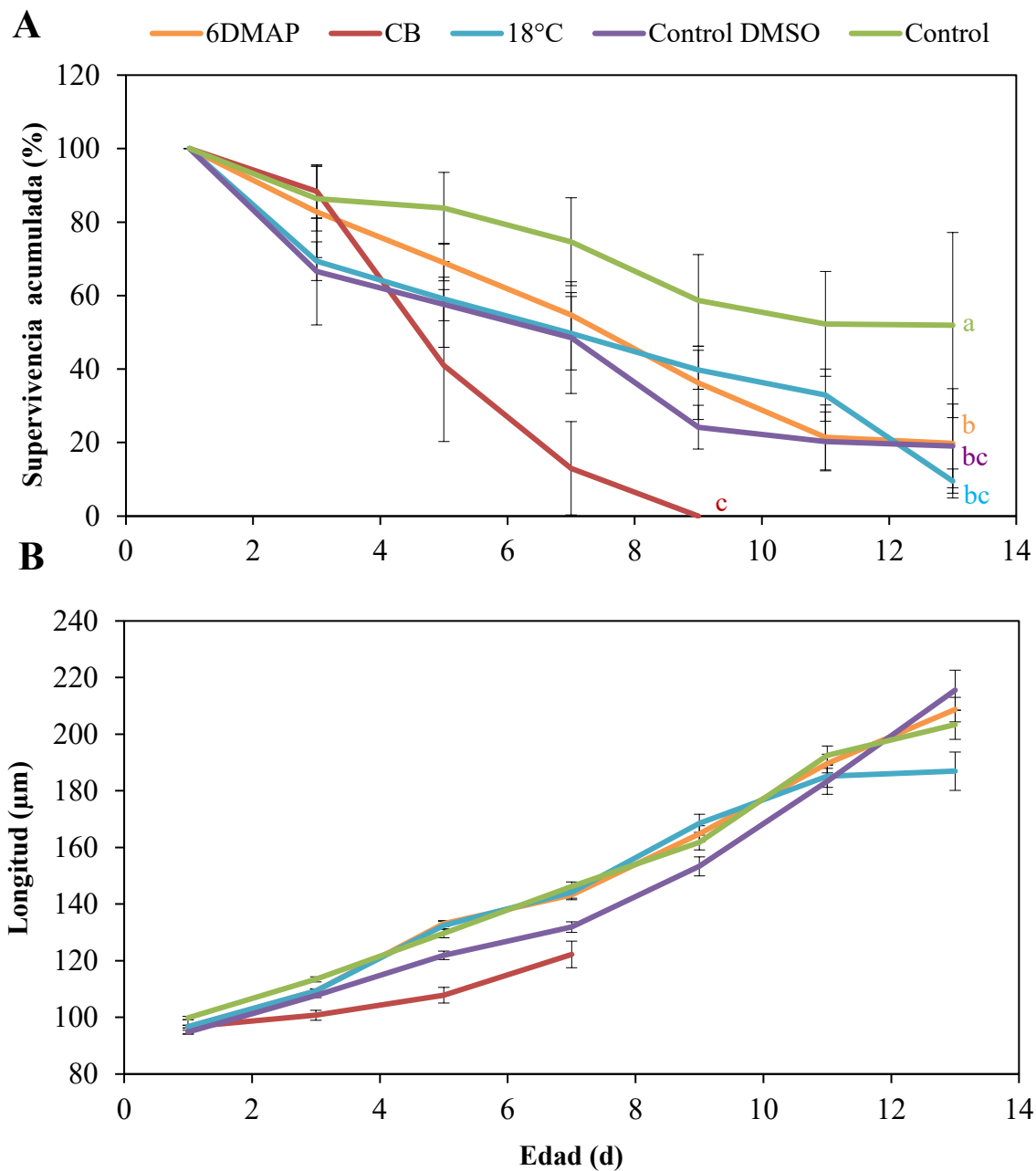
#### 6.4 Supervivencia y crecimiento larvario

El porcentaje de larvas D obtenido luego de 20 horas en los tratamientos y controles con relación al número de ovocitos colocados inicialmente estuvo entre 0,2 y 48,1% (Figura 12). Se encontró un efecto significativo de los diferentes tratamientos sobre el porcentaje de larvas D ( $gl = 4$ ,  $F = 3,89$   $P < 0,05$ ). Valores significativamente menores fueron obtenidos en los tratamientos con CB y 18°C en comparación con los presentados con 6DMAP y el control, mientras que los del control DMSO fue intermedio entre ambos grupos (Figura 12).



**Figura 12.** Porcentaje promedio de larvas D de *A. nucleus* procedentes de cigotos inducidos y no inducidos a la triploidía. Letras iguales indican falta de diferencias significativas ( $P > 0,05$ ). Las barras de error representan el error estándar.

El cultivo larvario duró entre 11 y 13 días, exceptuando el tratamiento con CB en el cual no se encontraron larvas a partir del día 9. La supervivencia promedio acumulada al final del cultivo larvario varió entre 10 y 52% entre los tratamientos y controles (Figura 13). La inducción a la triploidía afectó de forma significativa la supervivencia ( $gl = 4$ ,  $F = 7,30$   $P < 0,01$ ). La supervivencia más alta se presentó en el control, en el tratamiento con 6DMAP se obtuvo un valor intermedio, mientras que con CB se registró el menor valor (Figura 13). Las supervivencias del tratamiento térmico del control DMSO presentaron valores intermedios y similares a los obtenidos con el 6DMAP y CB. La longitud de las larvas al final del cultivo osciló entre 110 y 216  $\mu\text{m}$  (Figura 14), mientras que las tasas de crecimiento estuvieron entre 1,3 y 4,8  $\mu\text{m día}^{-1}$ . El crecimiento en longitud no fue influenciado significativamente por los tratamientos de inducción a la triploidía ( $gl = 4$ ,  $F = 1,55$ ,  $P = 0,1956$ ).

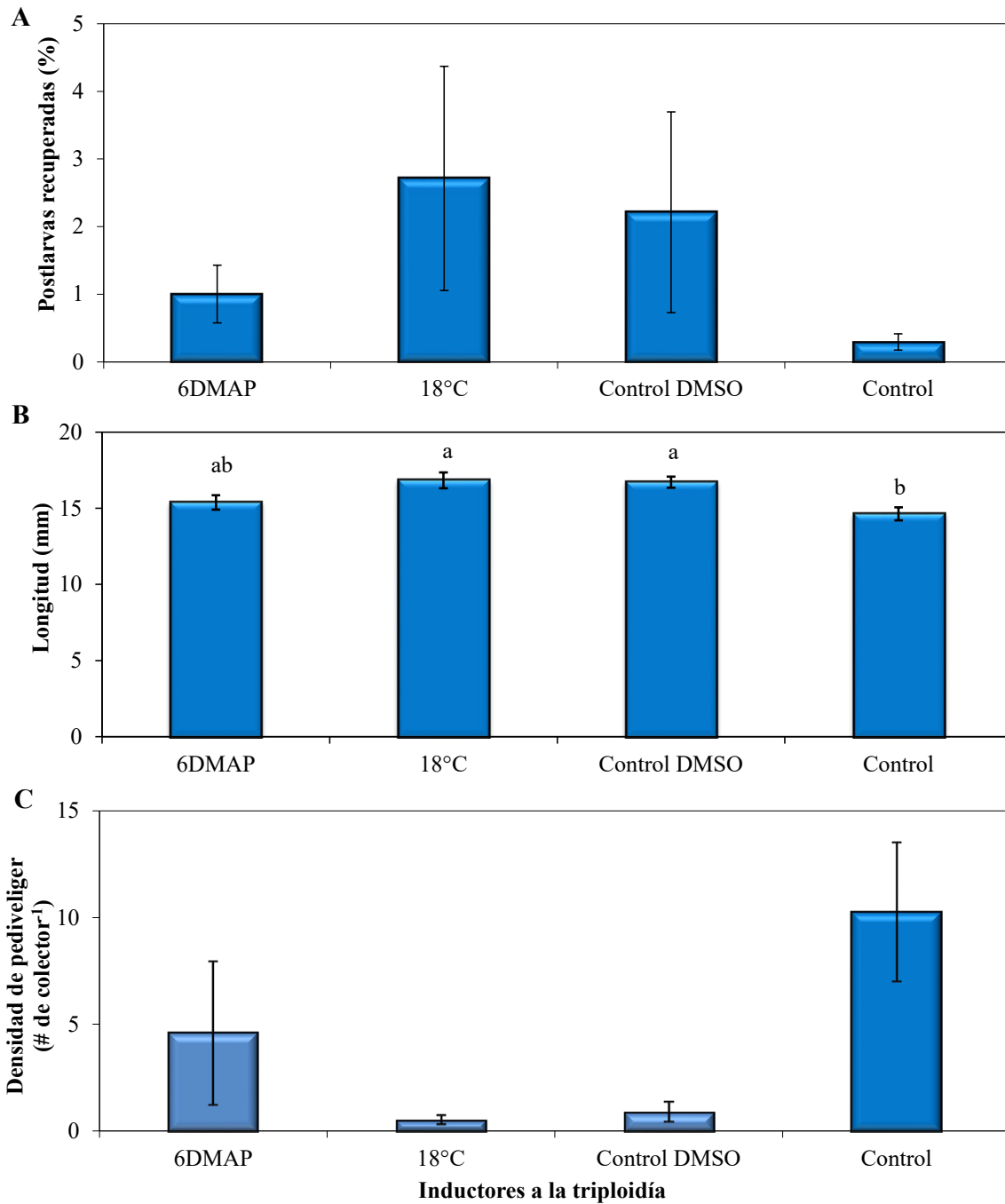


**Figura 13. A.** Variación en la supervivencia acumulada de las larvas de *A. nucleus* procedentes de cigotos inducidos y no inducidos a la triploidía. **B.** Variación en la longitud de larvas de *A. nucleus* procedentes de cigotos inducidos y no inducidos a la triploidía. Letras iguales indican falta de diferencias significativas ( $P > 0,05$ ). Las barras de error representan el error estándar.

## 6.5 Supervivencia y crecimiento de postlarvas recuperadas

Luego de 2 meses de asentamiento y cultivo postlarvario, el porcentaje de postlarvas recuperadas estuvo entre 0,3 y 2,7% (Figura 15A), siendo estadísticamente similares los valores obtenidos en los tratamientos y controles ( $gl = 3, 1, F = 0,94, P = 0,4671$ ). La longitud de las postlarvas recuperadas varió entre 14,6 y 16,8 mm (Figura 15B), correspondiendo a tasas de crecimiento entre 0,2 y 0,3 mm día<sup>-1</sup>. La longitud de las postlarvas recuperadas estuvo afectada significativamente por los tratamientos de inducción a la triploidía ( $gl = 3, F = 5,53, P = 0,0012$ ). Los grupos control DMSO y el tratado con choque térmico presentaron valores significativamente mayores que el control, mientras que el grupo tratado con 6DMAP presentó una talla intermedia y estadísticamente similar a la de los otros grupos (Figura 15B). La densidad de pediveliger asentadas por colector disponible osciló entre 520 y 10,266 (Figura 15C). Se encontraron correlaciones negativas significativas de esta variable con respecto al porcentaje de postlarvas recuperadas ( $n = 12, r = -0,4194, P = 0,1747$ ) y su longitud ( $n = 12, r = -0,5524, P = 0,0625$ ).





**Figura 14.** A. Porcentaje de postlarvas recuperadas de *A. nucleus*. B. Longitud de la concha de postlarvas recuperadas de *A. nucleus* a los 2 meses post inicio de fijación procedentes de cigotos sometidos a dos métodos de inducción a triploidía. C. Densidad de pediveliger fijadas por número de colectores de cigotos inducidos y no inducidos a la triploidía. Letras iguales indican falta de diferencias significativas ( $P > 0,05$ ). Las barras de error representan el error estándar.

Entre los meses de diciembre de 2015 y marzo de 2016 en que se hizo el cultivo postlarvario en el mar, se registraron valores de temperatura entre 25 y 26°C, salinidad entre 35 y 37‰, seston entre 1,7 y 4,8 mg L<sup>-1</sup> y el contenido de materia orgánica del seston (MOP) entre 27 y 61%. No se encontraron correlaciones significativas entre el porcentaje de juveniles recuperados o su tasa de crecimiento, con la temperatura ( $n = 9$ ,  $r = 0,0641$ ,  $P = 0,8700$ ), salinidad ( $n = 9$ ,  $r = -0,0711$ ,  $P = 0,8557$ ), seston, ni contenido orgánico de éste ( $n=9$ ,  $r= 0,0693$ ,  $P = 0,8594$ ).

## 7. DISCUSIÓN

### *Porcentaje de larvas triploides*

La obtención de larvas triploides de *Argopecten nucleus* mediante la inhibición química y física de la expulsión del segundo cuerpo polar de los cigotos, es el primer reporte en esta especie y en pectínidos, usando choque térmico. Esto demuestra la factibilidad de la utilización de estos métodos para producir larvas triploides en esta especie, al igual que se ha demostrado en otros pectínidos como *Argopecten ventricosus* (Ruíz-Verdugo et al., 2000), *Chlamys varia* (Barón et al., 1989), *Nodipecten subnodosus* (Maldonado-Amparo et al., 2004) y *Placopecten magellanicus* (Desroisers et al., 1993), usando agentes químicos.

Los mayores porcentajes de larvas triploides obtenidos mediante la aplicación de estímulos químicos (27%) en comparación con el choque térmico (14%) estuvieron asociados con el mayor tiempo de exposición que se suministró en la inducción química (15 min.) en comparación con la térmica (10 min.). Tanto los estímulos químicos (6DMAP y CB) como el térmico afectan la polimerización de los microtúbulos que conforman el huso acromático, impidiendo el desplazamiento de los cromosomas y por ende la extrusión del cuerpo polar (Beaumont y Fairbrother, 1991; Desroisers et al., 1993; Piferrer et al., 2009). Aparentemente, la inhibición de la polimerización de los microtúbulos es reversible una vez son eliminadas las sustancias químicas de las células (Dufresne et al., 1991; Planchais et al., 2000) o la temperatura normal es restablecida (Pickering et al., 1990). Considerando que el choque térmico fue aplicado por un menor tiempo que los estímulos químicos (10 vr. 15 min) y que es posible que su acción pueda ser suspendida más rápidamente al restablecer la temperatura normal del agua que con los agentes químicos que deben atravesar la membrana celular para ser eliminados de los cigotos por dilución, sus efectos en muchos de los cigotos tratados pudieron ser reversibles una vez se suspendió el estímulo, restableciéndose antes que en los otros tratamientos la polimerización de los microtúbulos del huso mitótico así como el movimiento de los cromosomas para que ocurriera la formación del segundo cuerpo polar y dando como resultado menores porcentajes de larvas triploides. Estos resultados coinciden con los encontrados en *Mytilus edulis* (Beaumont y Kelly, 1989), *Pinctada fucata martensii* (Wada et al., 1989), *Ostrea cucullata* (Zhinan, et al., 1994) y *Tapes semidecussatus* (Gosling y Nolan, 1989).

Aunque la estimulación térmica resultó ser menos eficaz que la química para la obtención de larvas triploides de *A. nucleus*, éste es un método mucho más económico y sencillo de implementar. Además, es posible que su optimización, aplicando mayores tiempos de estimulación (entre 15 y 20 min.) y/o usando temperaturas menores (6,5 °C) o altas temperaturas (30-38°C) permitan elevar estos valores a niveles superiores al 50%, como los que se han reportado en *Mytilus edulis* (Yamamoto y Sugawara, 1988), *Mytilus galloprovincialis* (Scarpa et al., 1994), *Pinctada fucata martensii* (Wada et al., 1989) y *Tapes semidecussatus* (Gosling y Nolan, 1989).

Los valores obtenidos dentro de este estudio para *A. nucleus* sobre los porcentajes de larvas triploides (14 y 39%) son menores a los obtenidos en otros bivalvos (Tabla 1). Tales resultados pueden atribuirse a que al ser el primer estudio realizado sobre el tema en esta especie, la concentración y/o tiempo de exposición de cada estímulo inductor a la triploidía pudo no ser la más apropiada, como se ha podido verificar en otros estudios exploratorios (Stanley et al., 1981; Allen et al., 1986; Beaumont, 1986; Beaumont y Kelly, 1989). La optimización de estas metodologías suele permitir la obtención de mayores valores de larvas triploides, entre el 94 y 100 %, como se ha logrado en otras especies de moluscos (Shatkin y Allen, 1989; Desroisiers et al., 1993; Scarpa et al., 1994; Maldonado-Amparo et al., 2004).

#### *Desarrollo embrionario y larvario*

El retardo en el desarrollo de los embriones y larvas de *A. nucleus* derivados de cigotos inducidos a la triploidía química o físicamente ha sido previamente reportado para otros bivalvos como *Argopecten purpuratus* (Canello et al., 1992), *Crassostrea gigas* (Quillet y Panelay, 1986), *Crassostrea virginica* (Stanley et al., 1981) y *Mytilus edulis* (Beaumont y Kelly, 1989). Este fenómeno puede atribuirse a que todos estos estímulos no solo impiden el movimiento de los cromosomas necesario para la formación del segundo cuerpo polar, sino que también retardan la unión de los pronúcleos masculino y femenino (anfimixis), requerida para iniciar el proceso de segmentación. Estos tratamientos inhiben la polimerización de los microtúbulos que transportan a los cromosomas, así como la de los microfilamentos de actina necesarios para el movimiento de los pronúcleos que son

desplazados por acción de la miosina (Reinsch y Karsenti; 1997; Sun y Schatten, 2006; Kawashima et al., 2014). El retraso de estos procesos y consecuentemente del inicio de la segmentación se vio reflejado en el retraso normal en el desarrollo de los embriones de *A. nucleus* durante las primeras 20 horas de vida.

Las más bajas tasas de desarrollo de los embriones y larvas de *A. nucleus* obtenidas en el tratamiento con CB pueden relacionarse con la mayor dificultad para eliminar de la célula esta sustancia y suspender su acción. La CB tiene un mayor peso molecular en comparación con el 6DMAP (479,6 vr. 163,09 g mol<sup>-1</sup>; Smith y Yue, 2006; Trendowski et al., 2015), por lo que requirió de un detergente, el DMSO, para ingresarla y sacarla de la célula, aumentando la permeabilidad de la membrana. Es posible que el efecto del DMSO haya tenido una corta duración y que la CB haya tenido mayor dificultad para atravesar la membrana celular y salir del cigoto una vez se suspendió el tratamiento, manteniendo su efecto de bloqueo de la anfimixis y la primera segmentación por un periodo más prolongado. Resultados similares a los obtenidos han sido reportados para *Chlamys farreri* (Yang et al., 2000), *Crassostrea gigas* (Downing y Allen, 1987), *Crassostrea virginica* (Stanley et al., 1981), *Mytilus galloprovincialis* (Scarpa et al., 1994), *Ostrea edulis* (Gendreau y Grizel, 1990), *Pinctada fucata martensii* (Wada et al., 1989) y *Ruditapes philippinarum* (Dufey y Diter, 1990).

La presencia de anomalías morfológicas tales como blastómeros separados con pequeñas protuberancias, micrómeros o lóbulos polares alrededor de los mismos, así como movimientos lentos y/o retardados en las larvas trocófora procedentes del tratamiento con CB concuerdan con lo hallado en *Crassostrea gigas* (Downing y Allen, 1987), *Crassostrea virginica* (Stanley et al., 1981), *Tapes semidecussatus* (Gosling y Nolan, 1989) y *Pinctada fucata martensii* (Uchimura et al., 1989). Se sabe que el desarrollo embrionario normal en organismos con segmentación determinada o en mosaico como la que se da en moluscos (Jurd, 1997), depende de la localización de los determinantes morfogénicos (RNAm) en el ovocito (Sun y Schatten, 2006). Específicamente, los microfilamentos de actina son los encargados de distribuir estos ácidos nucleicos, estableciendo una polaridad en la célula, la cual incidirá en el destino específico de los blastómeros del huevo (Rongo y Lehmann,

1996). La perturbación de la organización de los microtúbulos inducida por la CB, pudo alterar la distribución normal de los determinantes morfogénicos, afectando el destino de los diferentes blastómeros y su normal división.

El paso a través del tamiz de los cigotos de *A. nucleus* tratados con DMSO no ha sido reportado previamente en otros trabajos de inducción a la triploidía en moluscos, no obstante ha sido observado en *Argopecten purpuratus* (Winkler com. pers.). El DMSO aumenta la flexibilidad de las membranas celulares y su permeabilidad al agua y a los lípidos (Nortman et al., 2006). Luego, es posible que los cigotos con membranas más flexibles tratados con el DMSO al ser expuestos a la presión del agua sobre un tamiz hayan adoptado una forma ovoide temporal que les haya permitido atravesar el mismo, no verificándose ningún cambio de forma o tamaño cuando fueron observados bajo el microscopio. No obstante, esta flexibilización de la membrana se revierte antes de las 24 horas, ya que en ese momento se utilizó el tamiz normalmente usado (40 µm) y no se verificó que éstas lo atravesaran.

#### *Supervivencia y crecimiento larvario*

La reducción de la supervivencia de las larvas de *A. nucleus* inducidas a la triploidía química y físicamente es un fenómeno que ha sido explicado por la generación de organismos aneuploides, o con cromosomas de más (Wada et al., 1989; Toro et al., 1995), los cuales en su mayoría mueren antes de llegar a larva D o antes de los siete días de cultivo (Meng et al., 2012). Estos resultados también han sido obtenidos en otros bivalvos como *Argopecten irradians* (Tabarini, 1984), *Argopecten purpuratus* (Toro et al., 1995), *Argopecten ventricosus* (Ruiz-Verdugo et al., 2000), *Chlamys farreri* (Yang et al., 2000), *Crassostrea gigas* (Desroisiers et al., 1993); *Crassostrea virginica* (Stanley et al., 1981), *Mytilus edulis* (Beaumont y Kelly, 1989), *Mytilus galloprovincialis* (Scarpa et al., 1994), *Nodipecten subnodosus* (Maldonado-Amparo et al., 2004), *Pecten maximus* (Beaumont, 1986) y *Ruditapes philippinarum* (Dufey y Diter, 1990).

La menor supervivencia e inviabilidad de las larvas de *A. nucleus* derivadas de cigotos tratados con CB sugiere que esta sustancia tiene un efecto tóxico en las larvas de *A. nucleus*

cuando se usa a concentraciones mayores a 0,5 mg L<sup>-1</sup> y por tiempos de exposición mayores o iguales a 15 min. Es posible que bajo estas condiciones, las anomalías morfológicas generadas en los embriones por el CB causen también anomalías en el funcionamiento de los procesos vitales que permiten que los embriones y larvas sobrevivan. La Estos resultados coinciden con lo obtenido en *Argopecten purpuratus* (Tabarini, 1984), *Chlamys farreri* (Yang et al., 2000), *Crassostrea gigas* (Desroisiers et al., 1993; Melo et al., 2015) y *Ostrea edulis* (Gendreau y Grizel, 1990).

La falta de influencia de los diferentes tratamientos de inducción a la triploidía sobre el crecimiento de las larvas de *A. nucleus* puede deberse a una falta de efecto de la triploidía sobre el crecimiento en esta edad o a los bajos porcentajes de larvas triploides obtenidos en los tratamientos probados (< 39%). El mayor crecimiento de los moluscos triploides en comparación con los diploides se ha explicado principalmente por la asignación de la energía disponible exclusivamente al crecimiento somático, en lugar de asignar una parte de la misma al crecimiento gonadal, como ocurre normalmente en los diploides (Allen y Downing, 1986; Mason et al., 1988; Wang et al., 2002). No obstante, el desarrollo de los primordios gonadales en pectínidos comienza en la fase de postlarva (Shumway y Parsons, 2006), por lo que tanto las larvas diploides como las triploides derivarían toda la energía disponible al crecimiento somático, no observándose diferencias significativas en su crecimiento en esta fase. De otro lado, es muy posible que al tener una mezcla de alrededor de 2 partes de larvas diploides por una de larvas triploides en los tratamientos, al tomar las muestras para medir la longitud de las mismas, se hubiesen seleccionado más larvas diploides que triploides, dando como resultado un crecimiento similar. Los resultados de este estudio coinciden con lo hallado para *Argopecten purpuratus* (Toro et al., 1995), *Chlamys farreri* (Yang et al., 2000), *Chlamys varia* (Barón et al., 1989), *Crassostrea gigas* (Desroisiers et al., 1993), *Ostrea edulis* (Gendreau y Grizel, 1990), *Mytilus galloprovincialis* (Scarpa et al., 1994) y *Pinctada fucata martenssi* (Wada et al., 1989).

#### *Supervivencia y crecimiento postlarvario*

La falta de influencia del suministro de inductores a la triploidía sobre la supervivencia de las postlarvas recuperadas de *A. nucleus* concuerda con lo encontrado en *Tapes philippinarum* (Laing y Utting, 1994) y *Argopecten irradians* (Tabarini, 1984). Es posible que en esta fase ya no persisten los organismos aneuploides de los grupos inducidos y las condiciones diploide y triploide, no confieren ventaja adaptativa alguna a los grupos tratados y control.

Los mayores valores de crecimiento de las postlarvas de *A. nucleus* en el tratamiento de choque térmico y el control DMSO en comparación con los de las no tratadas, así como la similitud en el crecimiento de las postlarvas del control y las tratadas con 6DMAP no parece explicarse por un mayor crecimiento de los ejemplares triploides, dado que en el control DMSO no habían ejemplares triploides y el 6DMAP tenía mayor porcentaje de triploides que el de 18 °C. La correlación negativa hallada entre la longitud de las postlarvas y la densidad de larvas pediveliger por unidad de colector disponible para el asentamiento sugiere que el patrón del crecimiento observado entre los tratamientos y controles obedecen a un efecto densodependiente en el cual las postlarvas sembradas a mayores densidades por unidad de colector en los grupos 6DMAP y grupo control muy posiblemente estuvieron sometidas a un mayor estrés dada la competencia por espacio que los grupos de 18°C y control DMSO.



## 8. CONCLUSIONES

- Por primera vez se logró la producción de larvas triploides de *Argopecten nucleus*, inhibiendo la expulsión del segundo cuerpo polar de los cigotos, mediante la aplicación de estímulos químicos y térmicos.
- En pectínidos, se logró por primera vez la generación de larvas triploides usando estimulación térmica.
- Los mayores porcentajes de larvas triploides fueron obtenidos con los estímulos químicos: 6DMAP (39%) y CB (21%), mientras que los menores fueron con choque térmico a 18°C (14%).
- El uso de inductores químicos (6 DMAP y CB) y térmicos (18°C) afectó negativamente la supervivencia de las larvas de *A. nucleus*, mientras que no tuvo en efecto alguno sobre su crecimiento en longitud.
- La inducción a la triploidía con CB a 1mg L<sup>-1</sup> y por 15 minutos, presentó un efecto tóxico en los embriones y larvas de *A. nucleus*, ocasionando anomalías morfológicas, un retraso en el desarrollo así como su muerte a los 9 días de edad.
- El suministro de inductores a la triploidía no influyó sobre la supervivencia de las postlarvas recuperadas de *A. nucleus*.
- Los mayores valores de crecimiento de las postlarvas de *A. nucleus* se obtuvieron en el tratamiento térmico y en el control DMSO, no estando asociado a la presencia de ejemplares triploides en los mismos sino a un efecto densodependiente.
- Aunque la obtención de larvas triploides fue factible en *A. nucleus*, sus bajos valores de supervivencia y falta de evidencia de incremento en el crecimiento en larvas y postlarvas, hacen pensar que esta herramienta no provee ventajas productivas en estas etapas del desarrollo. No obstante, se hace necesaria la evaluación del crecimiento diferencial de diploides y triploides en etapas juvenil y adulta, a fin de tener resultados concluyentes.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

- Acosta, E. y J. Gómez-León. 2013. Influencia de la densidad larval inicial de siembra y la concentración de alimento sobre la larvicultura de *Argopecten nucleus* (ostreoida: pectinidae). Boletín de Investigaciones Marinas. Cost., 42 (1): 73-90.
- Allen Jr., S.K., Gagnon, P.S. y H. Hidu. 1982. Induced triploidy in the soft-shell clam: cytogenetic and allozymic confirmation. J. of Heredity, 73 (6): 421-428. Abstract only.
- Allen Jr., S.K., Downing, S.L., Chaiton, J. y J.H. Beattie. 1986a. Chemically and pressure-induced triploidy in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Aquaculture, 57: 359-360. Abstract only.
- Allen Jr., S.K., Hidu, H. y J. G. Stanley. 1986b. Abnormal gametogenesis and sex ratio in triploid soft-shell clams (*Mya arenaria*). Biol. Bull. Mar Biol. Lab. Woods Hole, 170 (2): 198-210.
- Allen Jr., S.K., Downing, S.L., y K.K. Chew. 1989. Hatchery Manual for Producing Triploid Oysters. Washington Sea Grant Program, University of Washington Press. pp. 27.
- Allen Jr., S.K., Shpigel, M., Utting, S. y B. Spencer. 1994. Incidental production of tetraploid Manila clams *Tapes Philippinarum* (Adams and Reeve) Aquaculture, 128: 13-19.
- Allen Jr., S.K., y D. Bushek. 1992. Large-scale production of triploid oysters, *Crassostrea virginica* (Gmelin), using "stripped" gametes. Aquaculture, 103: 241-251.
- Allen Jr., S.K., y S.L. Downing. 1986. Performance of triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg). I. Survival, growth, glycogen content, and sexual maturation in yearlings. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology., 102: 197-208.
- Allen Jr., S.K., y S.L. Downing. 1990. Performance of triploid Pacific oysters *Crassostrea gigas*: Gametogenesis. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 47: 1213-1222.
- Allen Jr., S.K. 1983. Flow cytometry: assaying experimental polyploid fish and shellfish. Aquaculture, 33: 317-328
- Allen Jr., S.K. 1988. Cytology of gametogenesis in triploid Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. J. Shellfish res., 7 (1): 107. Abstract only.
- Arai, K. 2000. Chromosome manipulation in aquaculture: recent progress and perspective. Suisan zoshoku J., 48 (2): 295-303.
- Barber, B.J. y R. Mann. 1991. Sterile triploid *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791) grow faster than diploids but are just as susceptible to *Perkinsus marinus*. J. Shellfish Res., 10: 445-450.
- Baron, J., Diter, A. y A. Bodoy, 1989. Triploidy induction in the black scallop (*Chlamys varia* L.) and its effects on larval growth. Aquaculture, 77: 103-111.
- Beaumont, A.R. y M.H. Contaris. 1988. Production of triploid embryos of *Tapes semidecussatus* by the use of cytochalasin B. Aquaculture, 73: 37-42.
- Beaumont, A.R. y J.E. Fairbrother. 1991. Ploidy manipulation in molluscan shellfish: a review. Journal of Shellfish Research, 10 (1): 1-18.
- Beaumont A.R. y K. Hoare. 2003. Biotechnology and Genetics in Fisheries and Aquaculture. Blackwell Science, Oxford, UK.
- Beaumont A.R. y K.S. Kelly. 1989. Production and growth of triploid *Mytilus edulis* larvae. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 132: 69-84.
- Beaumont, A.R. 1986. Genetic aspect of hatchery rearing of the scallop, *Pecten makimus* (L). Aquaculture, 57: 99-110.
- Beck M.L. y C.J. Bigger. 1982. Chromosomal investigation of *Ctenopharyngodon idella* x *Aristichthys nobilis* hybrids. Experientia, 38: 319.
- Brake, J., Davidson, J. y J. Davis. 2004. Field observations on growth, gametogenesis, and sex ratio of triploid and diploid *Mytilus edulis*. Aquaculture, 236: 179-191.
- Burnell, G. y G. Allan. 2009. New Technologies in Aquaculture: Improving Production Efficiency, Quality and Environmental Management. Amsterdam: Elsevier.

- Buzzi, B. y J. J. Manzi. 1988. Growth and survival of larval and juvenile polyploid clams, *Mercenaria mercenaria*. J. Shellfish Res., 7 (1): 151. Abstract only.
- Cai, G. y R. Beaumont. 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, F., Paredes, L. y J. Toro. 1992. Inducción a la triploidía en el ostión del norte *Argopecten purpuratus*, por medio del shock térmico de calor. Invest. Pesq. (Chile) 37: 5-11.
- Cardona, L., Olivera, M., Botero, M. y A. Tarazona. 2012. Efecto del choque térmico sobre la eficiencia en la triploidización y la sobrevivencia de larvas de *Rhynchomytilus quelen*. Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient. 15(2): 409-417.
- Carreño, Y., Acosta, E. Y J. Gómez. 2012. Crecimiento y supervivencia de larvas de *Argopecten nucleus* alimentadas con diferentes dietas microalgales. Bol. Invest. Mar. Cost. 41 (1): 103-120.
- Castellanos, C. y N. Campos. 2007. Variación espacial y temporal de juveniles de *Pinctada imbricata* (Roding, 1798) y *Argopecten nucleus* (Born, 1778) en la región norte del Caribe Colombiano. Bol. Invest. Mar. Costeras. Invermar, 36: 209-27.
- Castellanos, C. y A. Valero. 1998. Abundancia de larvas y postlarvas de tres bivalvos de interés comercial (*Pinctada imbricata*, *Nodipecten nodosus*, y *Argopecten nucleus*) en el Parque Nacional Tayrona, Caribe colombiano. XI Seminario Nacional de Política, Ciencias y Tecnología del Mar Santafé de Bogotá D.C. Octubre 26 al 30 de 1998.
- Chaiton, J. A. y S. K. Allen Jr. 1985. Early detection of triploidy in the larvae of Pacific oysters, *Crassostrea gigas* by flow cytometry. Aquaculture, 48: 35-43.
- Cooper, K. y X. Guo. 1989. Polyploid Pacific oyster produced by inhibiting polar body I and II with cytochalasin B. J. Shellfish Res., 8 (2): 412. Abstract only.
- Cultimar, 2016. Larvas de ostra diploides y triploides. Consultado abril 27 de 2016 en <http://www.cultimar.cl/cultimar/larvas-de-ostra-diploides-y-triploides/>
- Daniel, Y. 2011. Evaluación del ciclo gametogénico de *Argopecten nucleus* (Born, 1778) (Pectinidae, Bivalvia) en sistema de cultivo suspendido, en la Bahía de Neguanje, Santa Marta-Colombia. Memoria de grado presentada para optar al título de Ingeniero Pesquero. Universidad Del Magdalena. Colombia. 70 p.
- Darzynkiewicz, Z. y Juan, G. 2001. DNA content measurement for DNA ploidy and cell cycle analysis. Curr Protoc Cytom. May:Chapter 7doi: 10.1002/0471142956.cy0705s00.
- Davis, J.P. 1988a. Physiology and energetics relating to weight loss and glycogen utilization during starvation in diploid and triploid Pacific oyster. J. Shellfish Res., 7 (3): 549. Abstract only.
- Davis, J.P. 1988b. Energetics of sterile triploid oyster uncouple the reproductive and somatic effort of diploids. J. Shellfish Res., 7 (1): 114. Abstract only.
- Davis, J.P. 1989. Growth rate of sibling diploid and triploid oysters, *Crassostrea gigas*. J. Shellfish Res. 8 (1): 319. Abstract only.
- Davis, J.P. 1997. Optimizing triploid production techniques and comparative field performance of Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*) in Puget sound. J. Shellfish Res., 16 (1): 311-312. Abstract only.
- De la Roche, J. y L.A. Velasco. 2008. Cultivo larvario de los pectínidos de interés comercial de Colombia. 107-133 p. En: Velasco, L. A. (ed.) Biología y cultivo de los pectínidos de interés comercial de Colombia. Editorial Unimagdalena. Santa Marta, D.T.C.H. Colombia.
- Desroisers, R., Gérard, A., Peignon, J.M. Naciri, Y., Dufresne, L., Morasse, J., Ledu, C., Phelipot, P., Guerrier, P. y F. Dubé. 1993. A novel method to produce triploids in bivalve molluscs by the use of 6-dimethylaminopurine. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 170: 29-43.
- Díaz, J.M. y M. Puyana. 1994. Moluscos del Caribe Colombiano, un catálogo ilustrado. Colciencias, Fundación Natura y Universidad del Magdalena, Bogotá, 291p + láminas.

- Downing, S.L., y Allen Jr., S.K., 1987. Induced triploidy in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*: optimum treatments with cytochalasin B depend on temperature. *Aquaculture* 61, 1– 15.
- Downing, S.L. 1988a. Triploid hybrids between the oysters *Crassostrea gigas* and *C. rivularis*: production, detection and potential. *J. Shellfish Res.*, 7 (1): 156. Abstract only.
- Downing, S.L. 1988b. Comparing adult performance of diploid and triploid monospecific and interspecific *Crassostrea* hybrids. *J. Shellfish Res.*, 7 (3): 549. Abstract only.
- Downing, S.L. 1989a. Hybridization, triploidy and salinity effects on crosses with *Crassostrea gigas* and *Crassostrea virginica*. *J. Shellfish Res.*, 8 (2): 447. Abstract only.
- Dufey, C. y A. Diter. 1990. Polyploid in the Manila clam *Ruditapes philippinarum*. I. Chemical induction and larval performances of triploids. *Aquat. Living Resour.*, 3: 55-60.
- Dufresne L, Néant I, Saint-Pierre J, Dubé F y Guerrier. 1991. Effects of 6-dimethylaminopurine on microtubules and putative intermediate filaments *Journal of Cell Science* 99 721-730.
- Dunham, R. A., Majumdar, K., Hallerman, E., Bartley, D., Mair, G., Hulata, G., Liu, Z., Pongthana, N., Bakos, J., Penman, D., Grupta, M., Rothlisberg, P. y G. Hoerstgen-Schwark. 2001. Review of the status of aquaculture genetics. En: Subasinghe, R. P., Bueno, P., Phillips, M. j., Hough, C., McGladdery, S. E. y J. R. Arthur. (Ed). *Aquaculture in the Third Millennium. Technical Proceedings of the Conference on Aquaculture in the Third Millennium, Bangkok, Thailand, 20-25 February 2000*. Pp 137-166. NACA, Bangkok and FAO, Rome.
- Dunham, R.A. 2011. Commercial application of fish biotechnology. In: *Aquaculture and fisheries biotechnology: genetic approaches*. 2 nd edition.
- Dupré, E. 1995. Biología de la reproducción en moluscos. En: Illanes, J.E. (Ed.). 8 Curso Internacional en Cultivo de Moluscos. Universidad Católica del Norte, Coquimbo, Chile, pp. 45-64.
- Ekaratne, S. U. K. y J. Davenport. 1993. The relationships between the gametogenetic status of triploids or diploids of Manila clams, *Tapes philippinarum*, and their oxygen uptake and gill particle transport. *Aquaculture*, 117: 335–349.
- Eudeline, B., Allen, A.K. Jr. y X. Guo. 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. y W. Buzz. 1996. Comparison of growth, survival and reproductive success of diploid and triploid *Mercenaria mercenaria*. *J. Shellfish Res.*, 15 (3): 689–694.
- Fairbrother, J.E. 1994. Viable gynogenetic diploid *Mytilus edulis* (L.) larvae produced by ultraviolet light irradiation and cytochalasin B shock. *Aquaculture* 126: 25-34.
- Falconer, D.S. y T.F.C. Mackay. 2006. *Introducción a la Genética Cuantitativa*. Editorial Acribia. Zaragoza, España. 469 p.
- FAO, 2005. Cultured Aquatic Species Information Programme. *Crassostrea gigas*. Cultured Aquatic Species Information Programme. Text by Helm, M.M. In: *FAO Fisheries and Aquaculture Department [online]*. Rome. Updated 13 April 2005. [Cited 4 November 2015]. [http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Crassostrea\\_gigas/en](http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Crassostrea_gigas/en)
- Fernández-Álvarez, I. 1991. Reproducción y acondicionamiento de bivalvos en el criadero. *Consellería de Pesca, Marisqueo e Acuicultura, Xunta de Galicia, España*. 35 p.
- Fish Info & Services Co.Ltd. 2014. France Turbot Ofrece Condiciones Óptimas para la Cría de Rodaballo [en línea]. Francia. Actualizado 16 de febrero de 2011. [Citado 2 Septiembre 2014]. <http://www.fis-net.com/fis/techno/newtechno.asp?l=s&id=40524&ndb=1>
- Francescon, A., Libertini, A., Bertotto, D., Barbaro, A., 2004. Shock timing in mitogynogenesis and tetraploidization of the European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture* 236, 201–209.
- Freites, L., De La Roche, J. y L. A. Velasco. 2008. Asentamiento, metamorfosis y cultivo postlarvario de los pectínidos de interés comercial de Colombia. 135-157 p. En: Velasco, L. A. 2008b. *Biología y cultivo de los pectínidos de interés comercial de Colombia*. Editorial Universidad del Magdalena, Santa Marta. 258 p.

- Freites, L. y L.A. Velasco. 2008. Cultivo de pectínidos juveniles y adultos de interés comercial de Colombia. 159-199 p. En: Velasco, L. A. 2008b. Biología y cultivo de los pectínidos de interés comercial de Colombia. Editorial Universidad del Magdalena, Santa Marta. 258 p.
- Gendreau, S. y H. Grizel. 1990. Induced triploidy and tetraploidy in European flat oyster, *Ostrea edulis*. *Aquaculture*, 90:229-238.
- Gerard, A., Naciri, Y., Peignon, J.M., Ledu, C. y P. Phelipot. 1994. Optimization of triploid induction by the use of 6-DMAP for the oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture and Fisheries Management*, 25: 709-719.
- Gjedrem, T. y Baranski, M. 2009. Selective breeding in aquaculture: In introduction. *Reviews: Methods and Technologies in Fish Biology and Fisheries*, vol. 10. USA: Springer. pp 221.
- Gómez-León, J., Acosta, E., Castellanos, C. y M. Santos. 2010. Cultivo de pectínidos en el Caribe colombiano. Proyecto. Optimización de la producción de postlarvas del ostión *N. nodosus* y la conchuela *A. nucleus* en el Caribe colombiano. Código 2105-09-17982. Serie de Publicaciones Generales N° 40. Santa Marta, 160 Pág.
- Gosling, E.M. y A. Nolan. 1989. Triploidy induction by thermal shock in the Manila clam *Tapes semidecussatus*. *Aquaculture*, 78: 223-228.
- Gosling, E. 2015. *Marine Bivalve Molluscs*, 2nd Edition. John Wiley and Sons: Blackwell Publishing: p536.
- Guo, X., Hershberger, W.K., Chew, K. K., Downing, S.L. y P. Waterstrat. 1988. Cell fusion in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*: Tetraploids produced by blastomere fusion. *J. Shellfish Res.*, 7 (3): 549. Abstract only.
- Guo, X., Hershberger, W. K., Chew, K. K. y P. Waterstrat. 1989a. Cell fusion in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. I. Formation of polyploidy cells via oocyte fusion. *J. Shellfish Res.* 8 (1): 321. Abstract only.
- Guo, X., Cooper, K., Hershberger, W. K. y K. K. Chew. 1992a. Genetic consequences of blocking polar body I with cytochalasin B in fertilized eggs of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*: 1. Ploidy of resultant embryos. *Biol. Bull.*, 183: 381-386.
- Guo, X., Hershberger, W. K., Cooper, K. y K. K. Chew. 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. y K.K. Chew. 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. y K.K. Chew. 1994. Tetraploid induction with mitosis I, inhibition and cell fusion in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg). *J. Shellfish Res.*, 13: 193-198.
- Guo, X.G., y Allen, S.K. 1994. Reproductive Potential and Genetics of Triploid Pacific Oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Biol. Bull.* 187: 309-318.
- Guo, X. y S.K. Allen. 1994a. Sex determination and polyploid gigantism in the dwarf surfclam (*Mulinia lateralis* Say). *Genetics* 138: 1199-1206.
- Guo, X., y S.K. Allen, 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.
- Helm, M., Bourne, N. y A. Lovatelli. 2006. Cultivo de bivalvos en criadero, un manual práctico. FAO Documento técnico de pesca. No. 471. Roma, FAO. 182 p.
- Hernández-Ibarra, N.K. 2004. Poliploidía y ginogénesis en abulón rojo (*Haliotis rufescens*), certificación genética de presuntos híbridos de abulón rojo y azul (*Haliotis fulgens*), y cariotipos de las especies parentales. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias. La Paz, B. C. S., México. 132 p.
- Hidu, J., Mason, K. M., Shumway, S. E. y S. K. Allen. 1988. Induced triploidy in *Mercenaria mercenaria* L.: effects on performance in the juveniles. *J. Shellfish Res.*, 7 (1): 202. Abstract only.
- Jiang, W., Li, G., Xu, G., Lin, Y. y N. Qing. 1993. Growth of the induced triploid pearl oyster *Pinctada martensii*. *Aquaculture* 111: 245-253.

- Jurd., R.D. (ed). 2004. Animal Biology. Segunda edición. Garland science/BIOS Scientific publishers. U.K. P. 263.
- Kawashima T, Okuno H, y H, Bito. 2014. A new era for functional labeling of neurons: activity-dependent promoters have come of age. *Frontiers in Neural Circuits*. 2014; 8:37. doi:10.3389/fncir.2014.00037.
- Kesarcodi-Watson, A., Klumpp, D.W., y J.S., Lucas. 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.
- Komaru, A., Uchimura, Y. Ieyama H. y K.T. Wada. 1988. Detection of induced triploid scallop, *Chlamys nobilis*, by DNA microfluorometry with DAPI staining. *Aquaculture* 69(3-4): 201-209.
- Laing, I. y S.D. Utting. 1994. The physiology and biochemistry of diploid and triploid Manila clam (*Tapes philippinarum*) larvae and juveniles. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, Vol. 184, pp. 159-169.
- Lee, M.M. 1988. Abnormal gametogenesis in triploid American oysters *Crassostrea virginica*. *J. Shellfish Res.* 7 (1): 201-202. Abstract only.
- Li, Q., M. Osada, M. Kashihara, K. Hirohashi, y A. Kijima. 2000. Effects of ultraviolet irradiation on genetical inactivation and morphological structure of sperm of the Japanese scallop, *Patinopecten yessoensis*. *Aquaculture* 186: 233-242.
- Lodeiros, C., Freites, L. Nuñez M. y J.H. Himmelman. 1993. Growth of the Caribbean scallop *Argopecten nucleus* (Born 1970) in suspended culture. *J. Shell. Res.*, 12 (2): 291-294.
- Lodish H, Berk A, Zipursky SL. 2000. Molecular Cell Biology. 4th edition. New York: W. H. Freeman: 2000. Section 19.2, Microtubule Dynamics and Associated Proteins. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21522/>
- Lohrmann, K. y E. Von Brand. 2005. Histological study of gonads in triploid scallops, *Argopecten purpuratus*. *J. Shell. Res.*, 24 (2): 369-375.
- López, J. 2008. Crecimiento y supervivencia del scallop *Nodipecten nodosus* (Linnaeus, 1785) (Bivalvia: Pectinidae), en cultivo suspendido, Bahía de Nenguange Parque Nacional Natural Tayrona, Caribe colombiano. Tesis de pregrado para optar al título de Ingeniero Pesquero. Universidad del Magdalena, Facultad de Ingeniería. Santa Marta, Colombia. 54 p.
- Maldonado-Amparo, R., Ramírez, J., Ávila, S. y A. M. Ibarra. 2004. Triploid lion-paw scallop (*Nodipecten subnodosus* Sowerby): growth, gametogenesis, and gametic cell frequencies when grown at a high food availability site. *Aquaculture* 235: 185–205.
- Martínez, H., Celis, C. y P. Cala. 1995. Viabilidad y crecimiento de poblaciones diploides y triploides de tilapia nilotica, *Oreochromis niloticus*, Línea Ghana. *Acta Biológica Colombiana* No. 9, 43-66 p.
- Mason, K.M., Shumway, S. E., Allen, S. K. Jr. y H. Hidu. 1988. Induced triploidy in the soft-shelled clam *Mya arenaria*: energetic implications. *Mar. Biol.*, 98: 519-528.
- Mitchinson, T. y Kirschner, M. 1984. Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* 312, 237-242.
- Melo, E.M.C., Gomes, C.H.A.M., Silva, F.C., Sühnel, S., y Melo, C.M.R.D. 2015. Chemical and physical methods of triploidy induction in *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793). *Boletim do Instituto de Pesca*, 414: 889-98.
- Meng, Q., Bao, Z., Wang, Z., Wang, S., Hu, J., Hu, X., y X., Hu. 2012. Growth and reproductive performance of triploid yesso scallops (*Patinopecten yessoensis*) induced by hypotonic shock. *J. Shellfish Res.* 31, 1113-1122.
- Meza, I., y E. Frixione. 1996. Capítulo VII. Sistemas mixtos: movimiento generado por microtúbulos. Polímeros y microfilamentos. En: La ciencia es para todos. Primera edición, México, D.F.
- Mitton J.B. y M.C. Grant. 1984. Associations among protein heterozygosity, growth rate, and developmental homeostasis. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 15: 479-499.
- Nam, Y.K., y D.S Kim. 2004. Ploidy status of progeny from the crosses between tetraploide males and diploid females in mud loach (*Misgurnus mizolepis*). *Aquaculture* 236, 575–582.
- Nell, J. A.2002. Farming triploid oysters. *Aquaculture*. 210. 69-88.

- Notman, R, Noro, M, O'Malley, B, y J. Anwar. 2006. Molecular basis for dimethylsulfoxide (DMSO) action on lipid membranes. *Journal of the American Chemical Society*, vol 128, no. 43, pp.
- Pérez, J.E. y M. Kent. 1998. Hybridization and its effects on species richness in natural habitats. *Interciencia* 23: 3.
- Pérez, A. y G. Román. 1987. La reproducción en los moluscos bivalvos. 133-175 pp. En: J. Espinosa de los Monteros y U. Labarta (Eds.). *Reproducción en acuicultura*. CAICYT, Madrid, España. 321 p.
- Pickering, S. J., Braude, P. R., Johnson, M. H., Cant, A., y Currie, J. 1990. Transient cooling to room temperature can cause irreversible disruption of the meiotic spindle in the human oocyte. *Fertility and sterility*, 54(1), 102-108.
- Piferrer, F., Beaumont, A., Falguière, J. C. Flajšhans, M., Haffray, P. y L. Colombo. 2009. Polyploid fish and shellfish: Production, biology and applications to aquaculture for performance improvement and genetic containment. *Aquaculture* 293: 125–156.
- Pineda, S., Jaramillo, J., Echeverri, D. y M. Olivera. 2004. Triploidía en trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*): posibilidades en Colombia. *Rev Col Cienc Pec Vol.* 17:1.
- Planchais, S., Glab, N., Inzé, D., y Bergounioux, C. 2000. Chemical inhibitors: A tool for plant cell cycle studies. *FEBS Lett.* 476, 78–83
- Puyana, M. y L.A. Velasco. 2008. Bioecología y taxonomía de las especies de pectínidos comerciales de Colombia. 9-29 p. En: Velasco, L.A. (ed.) *Biología y cultivo de los pectínidos de interés comercial de Colombia*. Editorial Unimagdalena. Santa Marta, D.T.C.H. Colombia.
- Quillet, E. y P.J. Panelay. 1986. Triploidy induction by thermal shocks in the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. *Aquaculture* 57: 271-279.
- Racotta, I. S., Palacios, E., Ibarra, A. M., Ramírez, J. L., Arcos, F. O. Arjona. 2008. Comparative biochemical composition of ploidy groups of the lion-paw scallop (*Nodipecten subnodosus* Sowerby) supports the physiological hypothesis for the lack of advantage in triploid mollusc's growth in food-rich environments. *Mar. Biol.*, 153: 1245–1256.
- Reinsch, S., y E. Karsenti. 1997. Movement of nuclei along microtubules in *Xenopus* egg extracts. *Curr. Biol.* 7:211–214.
- Rime, H., Neant, I., Guerrier y Ozon, R. 1989. 6-Dimethylaminopurine (6-DMAP), a reversible inhibitor of the transition to metaphase during the first meiotic cell division of the mouse oocyte. *Developmental Biology*: 133 169-179.
- Román, G., Martínez, G., García, O. y L. Freitas. 2001. Reproducción. En: Maeda-Martínez, A. (Ed.). *Los moluscos pectínidos de Iberoamérica: Ciencia y Acuicultura*. Limusa, México, pp. 27-59.
- Rongo, C., y Lehmann, R. 1996 Regulated synthesis, transport and assembly of the Drosophila germ plasm. *Trends in Genetics* 12: 102–109.
- Ruiz-Verdugo, C.A., Ramirez, J.L., Allen Jr. S.K. y A.M. Ibarra. 2000. Triploid catarina scallop (*Argopecten ventricosus* Sowerby II, 1842): growth, gametogenesis, and suppression of functional hermaphroditism. *Aquaculture* 186, 13-32.
- Sastry, A.N. 1975. Physiology and ecology of reproduction in marine invertebrates. En: *Physiological Ecology of Estuarine Organism*. En: F.J. Veruberg (Ed.). Univ. of South Carolina Press., Columbia, pp. 279-299.
- Scarpa, J., Toro, J.E. y K.T. Wada. 1994. Direct comparison of six methods to induce triploidy in bivalves. *Aquaculture*, 119: 119-133.
- Scarpa, J., Wada, K.T. y A. Komaru, A. 1993. Induction of tetraploidy in mussels by suppression of polar body formation. *Nippon Suisan Gakkaishi* 59: 2017–2023.
- Shatkin, G.M. y S.K. Allen. 1989. Recommendations for commercial production of triploid oysters. *J. Shellfish Res.* 8 (2): 449. Abstract only.
- 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.

- Smith PJ, y Yue, E. 2006. CDK Inhibitors of Cyclin-Dependent Kinases as Anti-Tumor Agents. Monographs on Enzyme Inhibitors. CRC Press, Taylor & Francis: Boca Raton, FL, vol. 2., 448 pp.
- Shumway, S.E. y G.J. Parsons. 2006. Scallops: Biology, Ecology and Aquaculture, 2nd edn. Developments in Aquaculture and Fisheries Science, Vol. 35. Elsevier, Amsterdam.
- Stanley, J.G., Allen, S.K. y H. Hidu. 1981. Polyploidy induced in the American oyster *Crassostrea virginica*, whit cytochalasin B. Aquaculture, 12: 1-10.
- Stanley, J.G., Hidu, H. y S.K. Allen. 1984. Growth of American oyster increased by polyploidy induced by blocking meiosis I but not meiosis II. Aquaculture, 37:147-155.
- Strickland, J.D.H. y T.R. Parsons. 1972. A Practical Handbook of Seawater Analysis. Fish. Bull. 167: 1-310.
- Sun, Q.Y., y Schatten, H. Regulation of dynamic events by microfilaments during oocyte maturation and fertilization. Reproduction. 2006; 131:193–205.
- Szöllösi M., Kubiak, J., Debey, P., de Pennard, H., Szöllösi, D. y B Maro. 1993. Inhibition of protein kinases by 6-dimethylaminopurine accelerates the transition to interphase in activated mouse oocytes. J Cell Sci 104, 861-872.
- Tabarini, C.L. 1984. Induced triploidy in the bay scallop, *Argopecten irradians*, and its effect on growth and gametogenesis. Aquaculture 42: 151-160.
- Toro, E.J., Sanhueza, M. A., Paredes, L. y F. Canello. 1995. Induction of triploid embryos by heat shock in the Chilean northern scallop *Argopecten purpuratus* Lamarck, 1819, New Zealand. Journal of Marine and Freshwater Research, 29: 101-105.
- Trendowski M, Zoino JN, Christen TD, Acquafondata C, Fondy TP. 2015. Preparation, In Vivo Administration, Dose-Limiting Toxicities, and Antineoplastic Activity of Cytochalasin B. Translational Oncology:8(4):308-317. doi:10.1016/j.tranon.2015.06.003.
- Tucker, C, S. y J.A. Hargreaves. 2008. (eds.) Environmental Best Management practices for aquaculture. p582.
- Uchimura, Y., Komaru, A., Wada, K.T., Leyama, H., Yamaki, M. y H. Furuta. 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. y J. Doyou, 1992. The increased utilization of egg lipid reserves following induction of triploidy in the Manila clam (*Tapes philippinarum*). Aquaculture, Vol. 103, pp. 17-28.
- Velasco, L.A. y J. Barros, 2007. Potential of hatchery broodstock conditioning of the Caribbean scallops *Argopecten nucleus* and *Nodipecten nodosus*. Aquaculture 272: 767-773.
- Velasco, L.A. y J. Barros. 2008. Experimental larval culture of the Caribbean scallops *Argopecten nucleus* and *Nodipecten nodosus*. Aquaculture Research 39: 603-618.
- Velasco, L.A. y J. Barros. 2009. Survival and growth of hatchery-produced postlarvae and spat of the Caribbean scallops *Argopecten nucleus* and *Nodipecten nodosus*. Aquac. Res. 40, 362–375.
- Velasco, L.A. 2006. Effect of microalgal concentration and water temperature on the physiology of the Caribbean scallops *Argopecten nucleus* and *Nodipecten nodosus*. J. Shellfish Res. 25: 823-831.
- Velasco, L.A. 2007. Energetic physiology of the Caribbean scallops *Argopecten nucleus* and *Nodipecten nodosus* fed with different microalgal diets. Aquaculture. 270: 299-212.
- Velasco, L.A. 2008a. Acondicionamiento reproductivo de los pectínidos de interés comercial en Colombia. 65-105 p. En: Velasco, L. A. 2008. Biología y cultivo de los pectínidos de interés comercial de Colombia. Editorial Universidad del Magdalena, Santa Marta. 258 p.
- Velasco, L.A. 2008b. Biología y cultivo de los pectínidos de interés comercial de Colombia. Editorial Universidad del Magdalena, Santa Marta. 258 p.
- Velasco, L.A. 2012. Informe final: desarrollo del Cultivo de Pectínidos en el Departamento del Magdalena, República de Colombia, fase ejecución. Magdalena, Santa Marta.
- Velasco, L.A. 2013. Proyecto Colciencias: bases para el mejoramiento genético del pectínido del caribe *Argopecten nucleus*.



- Velasco, L.A., González, J. y J. Barros. 2008. Análisis financiero de la producción de semilla y adultos de los pectínidos de interés comercial en Colombia. En: Velasco, L. A. 2008. Biología y cultivo de los pectínidos de interés comercial de Colombia. Editorial Universidad del Magdalena, Santa Marta. 258 p.
- Wada, K. T., Komaru, A. y Y. Uchimura. 1989. Triploid production in the Japanese pearl oyster, *Pinctada fucata martensii*. Aquaculture, 76: 11-19.
- Wang, Z., Guo, X., Allen Jr., S.K., 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.
- Wilkins, N.P. 1981. The rationale and relevance of genetics in aquaculture: an overview. Aquaculture 22, 209-228.
- Winkler, F., Ladrón de Guevara, B. Estévez, B. y L. Jollán, 1993. Inducción a triploidía en *Argopecten purpuratus* Lamarck, 1819, mediante Citocalasina-B, Revista de Biología Marina, Valparaíso 28, 239-246.
- Yamamoto, S. y Y. Sugawara. 1988. Induced triploidy in the mussel, *Mytilus edulis*, by temperatura shock. Aquaculture, 72: 21-29.
- Yang, H., Zhang, F. y X. Guo. 2000. Triploid and tetraploid Zhikong scallop, *Chlamys farreri* Joene et Preston, produced by inhibiting polar body I. Mar. Biotechnol. 2: 466–475.
- Zarnoch, C.B., A. Surier, R. Karney, M.P. Schreibman y S. Gamss. 2008. Influence of triploidy on the biochemical composition and fiber size of bay scallop (*Argopecten irradians*: Lamarck) adductor muscle. In: Russo R. (Ed) Aquaculture I. Dynamic Biochemistry, Process Biotechnology and Molecular Biology 2 (Special Issue 1), 68-71.
- Zhang, G., Wang, Z., Chang, Y., Song, J., Ding, J., Zhao, S. y X. Guo. 2000. Tetraploid induction in the Pacific abalone *Haliotis discus hannai* Ino with 6-DMAP and CB. J. Shellfish Res., 19: 540-541.
- Zhang, H., Liu, X., Zhang, G. y C. Wang. 2008. Production of a base population and its responses to F1 selection in the bay scallop, *Argopecten irradians irradians* Lamarck (1819). Aquaculture Research, 38: 913-918.
- Allen Jr., S.K., 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.
- Zichen, W. 1990. A Preliminary Study on Induced Triploidy in the farreri and *Patinopecten yessoensis* by Temperature Shock. Journal of Dalian Fisheries University.
- Zhinan, Z.: Mu, C.: Qi, L., Puxian, C y L. Weibin. 1994: Triploidization of oyster *Ostrea cucullata* with cytochalasin B and temperature shock. Marine Science Bulletin (Tianjin). 136: 34-40.
- Zhinan, Z., Mu, C., Qi, L., Puxian, C., Weibin, L y C, Yuezhong. 1995. Induced triploidy in scallop, *Chlamys nobilis*. Journal or Oceanography in Taiwan Strait. 142: 155-162.