

Julio E. Pérez
Carmen Alfonsi
Sinatra Salazar
Mauro Nirchio



MEJORAMIENTO GENÉTICO EN ACUICULTURA



MEJORAMIENTO GENÉTICO EN ACUICULTURA

JULIO E. PÉREZ ¹
CARMEN ALFONSI ²
SINATRA K. SALAZAR ³
MAURO NIRCHIO ⁴

Usted puede usar las siguientes teclas para navegar en el libro:

FLECHA hacia abajo - próxima página
FLECHA hacia arriba - página anterior
ctrl+INICIO - principio del libro
ctrl+FIN - final del libro
ESCAPE (ESC) - minimizar la ventana del libro
ALT+F4 - cerrar el libro.

Además de todas estas teclas puede utilizar el ratón para pasar las páginas y se recomienda ajustar la resolución del monitor a 1024 por 768 píxeles.

1- Instituto Oceanográfico de Venezuela. Departamento de Biología Marina. Laboratorio de Genética. jeperezr@yahoo.com. 2- Instituto Oceanográfico de Venezuela. Departamento de Biología Marina. Laboratorio de Genética. calfonsir@hotmail.com. 3- Universidad de Oriente. Núcleo de Sucre. Venezuela. Escuela de Ciencias. Departamento de Biología. katesalazar@yahoo.com. 4- Universidad de Oriente. Núcleo de Nueva Esparta. Venezuela. Escuela de Ciencias del Mar. Boca de Río. mnirchio@cantv.net.

MEJORAMIENTO GENÉTICO EN ACUICULTURA

MEJORAMIENTO GENÉTICO EN ACUICULTURA

Producido por el Sistema de Bibliotecas de la Universidad de
Oriente

SIBIUDO

Segunda Edición

Edición previa © 1996

Derechos reservados 2012

Depósito Legal: lfx 58920138002888

Corrección de textos y estilo:

Los Autores

Composición y diagramación digital:

Lcdo. Marcos Ramírez

Diseño de portada:

Sinatra K. Salazar

JULIO E. PÉREZ
CARMEN ALFONSI
SINATRA K. SALAZAR
MAURO NIRCHIO

SIBIUDO

TABLA DE CONTENIDO

PRESENTACIÓN

CAPÍTULO 1: MARCADORES MOLECULARES

MARCADORES MOLECULARES BASADOS EN ISOENZIMAS

MARCADORES MOLECULARES BASADOS EN ADN

DESCRIPCIÓN DE ALGUNAS DE LAS METODOLOGÍAS Y TÉCNICAS PARA LA OBTENCIÓN DE MARCADORES MOLECULARES BASADOS EN EL ADN

RFLP (POLIMORFISMOS DE LONGITUD DE FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN)

RAPD (ADN POLIMÓRFICO AMPLIFICADO AL AZAR)

AFLP (POLIMORFISMOS EN LONGITUD DE FRAGMENTOS AMPLIFICADOS)

¿CUÁL ES EL MEJOR MARCADOR MOLECULAR EN ACUICULTURA?

EJEMPLOS DE MEJORAMIENTO GENÉTICO EN ACUICULTURA USANDO MARCADORES OBTENIDOS POR AFLP

5

CAPÍTULO 2: CARACTERES DETERMINADOS POR GENES SIMPLES

CAPÍTULO 3: CARACTERÍSTICAS CUANTITATIVAS

HEREDABILIDAD

MÉTODOS PARA ESTIMAR LA HEREDABILIDAD

SELECCIÓN ARTIFICIAL

RESPUESTA A LA SELECCIÓN

EJEMPLOS EN EL ÁREA DE LA ACUICULTURA

CAPÍTULO 4: CARACTERES CROMOSÓMICOS

CAMBIOS CROMOSÓMICOS

TECNICAS BÁSICAS PARA LA OBTENCIÓN DE TRIPLOIDES

OBTENCIÓN DE POLIPLOIDES POR MÉTODOS FÍSICOS

OBTENCIÓN DE POLIPLOIDES POR MÉTODOS QUÍMICOS

DETERMINACIÓN DE LA POLIPLOIDIA

6

LOS TRIPLOIDES Y LA ACUICULTURA

ORGANISMOS TETRAPLOIDES

LA GINOGÉNESIS Y LA ANDROGÉNESIS

CAPÍTULO 5: EMPLEO DE ORGANISMOS ESTÉRILES O MONOSEXUALES

TÉCNICAS DE PRODUCCIÓN DE POBLACIONES MONOSEXUALES Y ESTÉRILES

CAPÍTULO 6: HIBRIDACIÓN, HETEROSIS Y CONSANGUINIDAD

HIBRIDACIÓN Y LINEAS PURAS

HETEROCIGOSIDAD Y ADAPTABILIDAD

CAPÍTULO 7: LOS TRANSGÉNICOS Y LA ACUICULTURA

CARACTERÍSTICAS DE UNA TRANSGÉNESIS SATISFACTORIA

1.- INTEGRACIÓN

2.- TRANSMISIÓN

3.- EXPRESIÓN

LA ACUICULTURA Y LA TRANSGÉNESIS

APLICACIONES TERAPÉUTICAS Y MODELOS EXPERIMENTALES

MONITOREO AMBIENTAL

PRODUCCIÓN DE TRANSGÉNICOS ORNAMENTALES

CAPÍTULO 8: EPIGÉNESIS Y ACUICULTURA

GLOSARIO

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

PRESENTACIÓN

La genética ha jugado un papel de gran importancia en el cultivo de animales y plantas terrestres. Sin embargo su contribución al mejoramiento de organismos acuáticos sólo ha comenzado a hacerse relevante en las últimas décadas. La revisión de la literatura científica pone de manifiesto una enorme cantidad de publicaciones que demuestran el interés creciente que ha despertado la aplicación de técnicas genéticas para mejorar características de utilidad para los acuicultores e inversionistas.

El mejoramiento genético puede lograrse de diversas maneras, entre ellas, mediante el cambio de frecuencia de una determinada característica en una población, la introducción en ella de caracteres presentes en otra población de la misma o diferente especie, por cambios en la constitución cromosómica, cambios de sexo, hibridación e inserción de genes, teniendo como objetivo final que la nueva generación se desempeñe en promedio, mejor que la generación parental.

En organismos acuáticos el mejoramiento genético debería tener un éxito mayor que el obtenido en organismos terrestres, debido a la existencia de algunas características, entre ellas: la mayor variabilidad genética en comparación con vertebrados homeotermos, la alta fecundidad en peces e invertebrados que permite una selección más intensa, una determinación sexual más plástica así como la fecundación externa y escasa presencia de mecanismos de aislamiento reproductivo de

estos organismos, permiten cruces inter específicos que a menudo presentan progenies viables.

El propósito fundamental de este libro es poner al alcance del lector, los conceptos básicos y los aspectos más importantes de las técnicas de mejora genética de forma concisa y sintetizada, con base en las experiencias de reconocidos profesionales. Las citas han sido incluidas para identificar la fuente de información, pero también para que sirvan como puntos de partida para aquellos que deseen adentrarse con mayor profundidad en temas particulares.

Esperamos que el contenido de este texto sirva de orientación tanto para profesionales formados, como para aquellos que se inician en esta actividad. Para aquellos lectores con escasos conocimientos de genética, hemos preparado un glosario de términos, que esperamos les sea de utilidad.

CAPÍTULO 1

MARCADORES MOLECULARES

Los marcadores moleculares son aquellas biomoléculas (proteínas, ADN) que pueden ser identificadas y caracterizadas para definir un genotipo determinado. Muchos de ellos permiten la asociación con fenotipos específicos. Se les denomina monomórficos cuando son invariables en todos los organismos estudiados, pero cuando presentan diferencias (en el peso molecular, actividad enzimática, estructura, o sitios de restricción, dependiendo del marcador), se dice que son polimórficos.

Las aplicaciones de los marcadores moleculares son muy diversas y es de esperar que cada vez se les encuentre nuevos usos. Por ahora, se vienen empleando en la diferenciación de individuos, discriminación entre clones, análisis filogenéticos y taxonómicos, mapeo de genomas, cuantificación de variabilidad génica intra e interespecífica, mejoras genéticas, detección de infecciones o propensión a sufrirlas, localización de genes que confieren resistencia a enfermedades y análisis de dispersión de especies, entre otros.

Los marcadores genéticos moleculares pueden ser clasificados en dos categorías principales:

Tipo I: marcadores asociados con genes de función conocida. Ejemplos de este tipo de marcadores son: la mayor parte de los marcadores obtenidos por el método de

polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), las alozimas y los marcadores de secuencias expresadas tags (ESTs).

Tipo II: marcadores asociados con segmentos anónimos del genoma. Ejemplos son los marcadores obtenidos por el método de ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD), los microsatélites, a menos que estén asociados con genes de función conocida, y muchos de los marcadores producto de Polimorfismo de Nucleótidos Simples (SNP).

Otra manera de clasificar los marcadores moleculares es de acuerdo al tipo de biomoléculas que se utiliza:

•**Marcadores Moleculares de Proteínas** (incluyen antígenos e isoenzimas) y

•**Marcadores Moleculares de ADN** (nuclear y mitocondrial).

En este capítulo se tratará, de manera breve, la aplicación en acuicultura de los marcadores moleculares basados en isoenzimas ya que éstos serán analizados también en el capítulo referente a genes simples. Se describirán mayormente algunos de los marcadores basados en ADN y algunas de las técnicas para obtenerlos.

MARCADORES MOLECULARES BASADOS EN ISOENZIMAS

Las isoenzimas son distintas formas moleculares de una misma enzima que presentan o muestran especificidad por el mismo sustrato. Los marcadores basados en la identificación de proteínas e isoenzimas por electroforesis en geles de almidón fueron desarrollados principalmente durante el período comprendido entre 1960 y 1980 y, actualmente, aún son utilizados.

La técnica que se emplea para estudiar las isoenzimas es la electroforesis, que permite separar las moléculas por su diferente carga, tamaño o ambas bajo la acción de un campo eléctrico. Las alteraciones en la carga eléctrica neta se producen por sustitución de un aminoácido por otro de distinta polaridad, por ejemplo, cambio de un aminoácido ácido por otro básico o neutro y reflejan las mutaciones en el gen codificante que determinan patrones de migración electroforética característicos (Fig. 1.a).

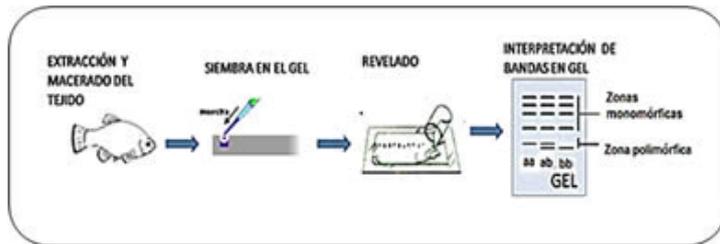


Fig 1.a. Metodología general para la visualización de marcadores moleculares

Entre los factores que determinan el patrón de bandas, están: el número de genes que las codifican, los estados alélicos (aloenzimas) y la estructura cuaternaria de los productos proteínicos. Utilizando los marcadores de isoenzimas, se emplean varias estimaciones para detectar los niveles de variación genética, entre ellos:

a. **La proporción de loci polimórficos (%P):** es el cociente que resulta de dividir el número de loci que exhiben claramente un polimorfismo entre el número total de loci claramente resueltos.

b. **La heterocigosidad observada en un locus (H_o):** proporción que resulta de dividir el número de individuos heterocigotos entre el número total de individuos analizados para ese locus.

c. **El número de alelos en un locus (N):** Se deduce del número de electromorfos (bandas) observables después del fraccionamiento electroforético.

d. **El número efectivo de alelos en un locus (N_e):** el recíproco de la suma de los cuadrados de las frecuencias alélicas en un locus.

El análisis de las isoenzimas se ha mantenido en los estudios poblacionales debido a su sencillez y bajo costo. Sin embargo, existe una serie de desventajas asociadas con estos marcadores que incluyen: la falta de confiabilidad del número de heterocigotos observados debido a los alelos nulos (enzimáticamente inactivos); la gran calidad y

cantidad de las muestras de tejidos necesarios y, además, esta técnica no es capaz de detectar polimorfismo, ya que algunos cambios en la secuencia de ADN son enmascarados al nivel de proteínas, reduciendo el nivel detectable de variación.

El contenido de información polimórfica (PIC, Polymorphic Information Content), el cual determina el valor de un marcador para detectar polimorfismo en el caso de las isoenzimas, permanece en un nivel modesto ya que el número de loci es relativamente bajo al igual que el número de alelos en la mayoría de los loci (generalmente dos o tres)

MARCADORES MOLECULARES BASADOS EN ADN

El empleo de este tipo de marcadores ha aumentado significativamente la comprensión de la variación genética ya que permite diferenciar polimorfismos directamente en la secuencia de ADN. El procedimiento general para obtener estos marcadores consiste en la extracción del ADN del organismo en estudio, seguido de purificación y amplificación bien sea del ADN total o de un segmento del genoma, sobre el que se aplican algunas técnicas (Fig 1.b).

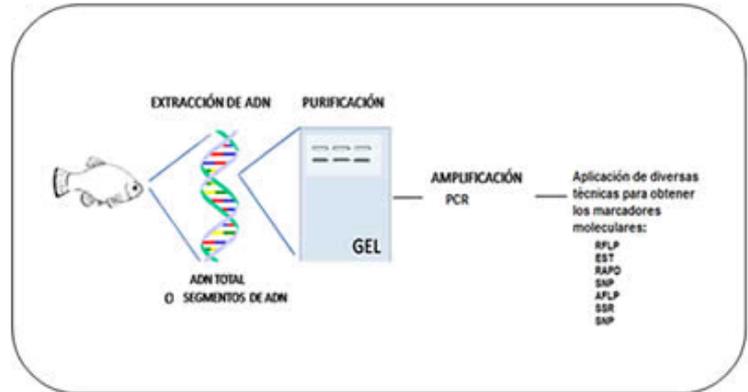


Figura 1.b. Metodología general de obtención de marcadores moleculares basados en ADN.

Debido al gran tamaño de las moléculas de ADN nuclear, al comienzo del uso de los marcadores moleculares, el interés se centró en el ADN mitocondrial (ADNmt), que se encuentra en pequeñas cantidades,

aproximadamente 1% del ADN total, que en los organismos eucariontes se localiza en las mitocondrias, fuera del núcleo, en forma de una molécula doble circular (Fig. 1.c). Actualmente, se utilizan marcadores moleculares basados tanto en el ADN nuclear como en el ADN mitocondrial y segmentos y/o genes específicos dentro de estos genomas. Los marcadores de ADNmt, están sujetos a los mismos problemas que existen para otros marcadores con base en ADN, tales como mutaciones en reverso, sustituciones paralelas y puntos calientes de mutación.

En el ADN nuclear, unos de los marcadores moleculares más utilizados, son las repeticiones de secuencias discretas (STR) o Microsatélites. Los microsatélites consisten en múltiples copias de secuencias simples repetidas en tándem (1-10 pares de bases, por Ejm. ACA o GATA repetidas desde unas pocas hasta cientos de veces). Son abundantes en todas las especies estudiadas. Los microsatélites tienden a estar distribuidos uniformemente en el genoma en todos los cromosomas y todas las regiones de los cromosomas. (Figs. 1.d y 1.e). El polimorfismo de estas secuencias está basado en diferencias de tamaño debido a números variables de repeticiones de alelos en un locus determinado.

Los microsatélites se heredan de manera mendeliana, como marcadores codominantes y tienen un elevado polimorfismo. Sin embargo, su uso implica una gran cantidad de esfuerzo y una inversión considerable. Cada locus de microsatélites debe ser identificado y secuenciada su región adyacente o flanqueadora para el diseño de

sondas de PCR.

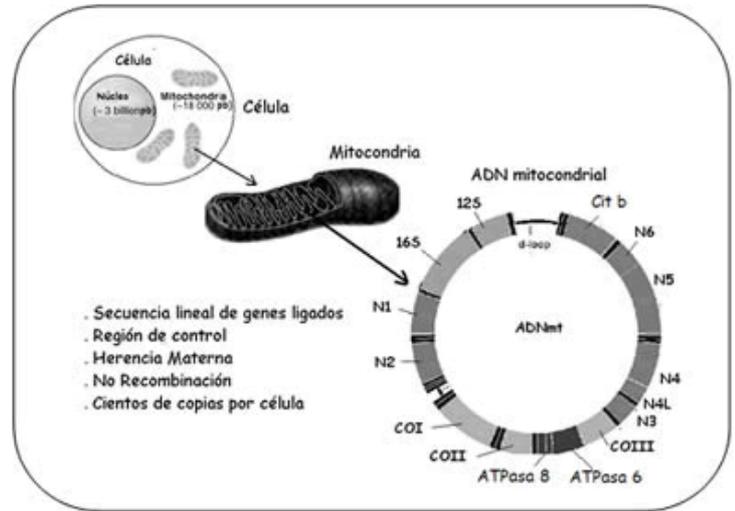


Figura 1. c. Esquema representativo de la ubicación y características del ADN mitocondrial en las células.

Debemos resaltar un tipo de marcador molecular utilizable en cualquier tipo de ADN (nuclear o mitocondrial) que revela polimorfismos originados por mutaciones puntuales y que se conoce como: Polimorfismo de Nucleótidos Simples (SNPs) (Fig.1.e). Las diferencias en secuencia, debidas a la sustitución de bases, han sido bien determinadas desde los comienzos de la secuenciación del ADN en 1977, pero la habilidad para caracterizar SNPs rápidamente en un gran número de muestras, no fue posible

hasta la aplicación de la tecnología de "gene chip" o "microarray". Los SNPs son los marcadores más abundantes en cualquier organismo y revelan polimorfismos ocultos no detectados por los otros marcadores y/o métodos. Obviamente, su PIC, no es tan alto como el de los microsatélites multialélicos, pero esta desventaja, es balanceada por su gran abundancia. Los marcadores SNPs, se heredan como marcadores codominantes.

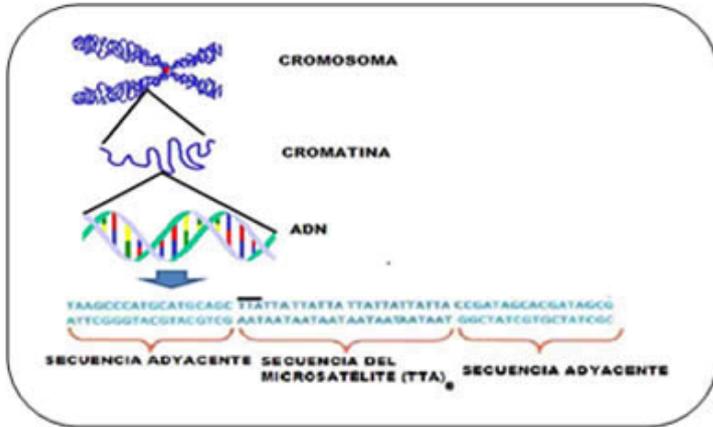


Figura 1. d. Representación de un polimorfismo en una secuencia microsatélite.

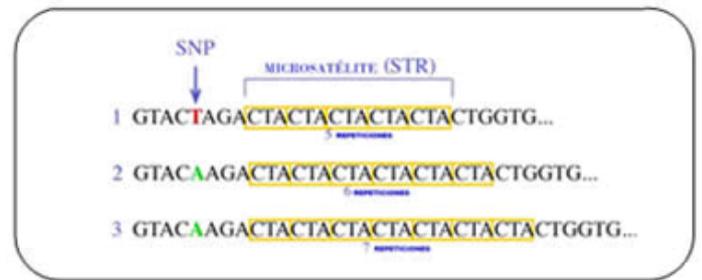


Figura 1. e. Representación de un SNP. Los números 1 al 3 representan diferentes individuos.

DESCRIPCIÓN DE ALGUNAS DE LAS METODOLOGÍAS Y TÉCNICAS PARA LA OBTENCIÓN DE MARCADORES MOLECULARES BASADOS EN EL ADN

Existen diferentes metodologías para la obtención de los marcadores moleculares basados en el ADN. Cada uno de estos procedimientos, comparten técnicas básicas que pueden incluir enzimas de restricción, PCR y electroforesis en geles de agarosa o acrilamida. Debido a que el número de metodologías y técnicas descritas es cada vez más numeroso, resultan necesario reunir las en 3 categorías: RFLP, MAAP y STS.

RFLP (POLIMORFISMOS DE LONGITUD DE FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN)

Se basa en la existencia de cambios en la secuencia del ADN de los organismos de una población. En estos casos se apreciarán cambios en el número y tamaño de los fragmentos generados, como resultado de la desaparición o aparición de nuevos sitios de corte. Para obtener el marcador se realiza la digestión del ADN con enzimas de restricción en fragmentos cuyo número y tamaño puede variar entre individuos, poblaciones o especies (Fig. 1.f). Tradicionalmente, los fragmentos, eran separados usando la técnica de transferencia de "Southern blot". Más recientemente, se ha reemplazado ésta con técnicas basadas en el PCR. La mayor ventaja de los marcadores obtenidos por RFLP, es que son codominantes. Su

desventaja es que el contenido de información polimórfica (PIC), es relativamente bajo, comparado con marcadores desarrollados más recientemente como los que se señalan a continuación.

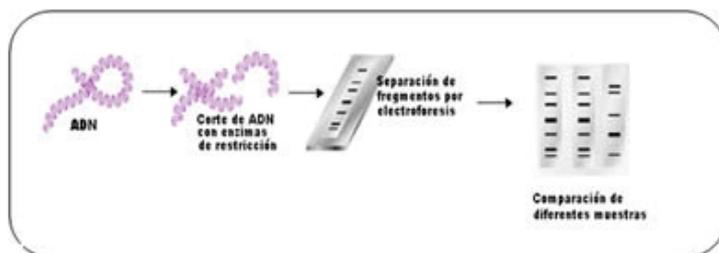


Figura 1.f. Representación de la metodología básica de RFLP

MAAP (MÚLTIPLES PERFILES ARBITRARIOS DE AMPLIFICACIÓN)

Este término, agrupa a numerosas técnicas como RAPD; AP-PCR; AFLP, entre otras. A continuación se describen sólo RAPD y AFLP.

RAPD (ADN POLIMÓRFICO AMPLIFICADO AL AZAR)

Se basa en amplificaciones por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de ADN genómico, utilizando iniciadores arbitrarios (*primers*), en condiciones de baja especificidad de apareamiento. Los polimorfismos de

RAPD, pueden presentarse debido a sustituciones de base en el *primer* sitio de unión del primer o por inserciones y deleciones en las regiones entre sitios. (Fig. 1.g). Los marcadores RAPD, se heredan como marcadores mendelianos, de manera dominante y son catalogados como presente/ausente. Una banda RAPD, es producida por homocigotos como también por un heterocigoto, y aunque la intensidad de la banda puede variar, es difícil la identificación. Además, es difícil determinar si las bandas representan loci diferentes o alelos alternos de un solo locus; de esta manera, el número de loci bajo estudio puede ser erróneo.

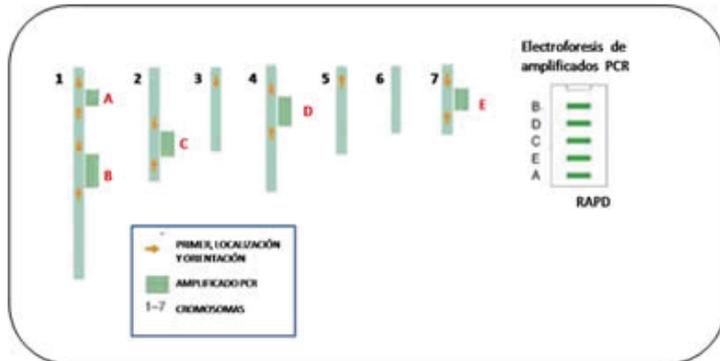


Figura 1.g. Esquema general que representa la metodología RAPD.

Los marcadores obtenidos por RAPDs, tienen todas las ventajas de un marcador basado en PCR, con la ventaja adicional que existen sondas comercialmente disponibles y

no se requieren conocimientos previos de la secuencia objetivo u organización del gen. Es una técnica simple, relativamente de bajo costo y ha tenido muchas aplicaciones (Chong *et al.* 2000). Sin embargo, la técnica es muy sensible a cambios pequeños en las condiciones de amplificación, lo que ocasiona problemas de reproducibilidad. Otra desventaja, es la presencia de productos de diferentes regiones de ADN que tienen la misma longitud. Los valores de contenido de información polimórfica (PIC) para marcadores generados por RAPD, son más bajos que los de microsatélites, SNPs, y pueden no ser tan informativos como los generados por AFLPs.

AFLP (POLIMORFISMOS EN LONGITUD DE FRAGMENTOS AMPLIFICADOS)

Los polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados, más conocidos por su acrónimo inglés AFLP ("Amplified fragment length polymorphism"), son un tipo de marcador molecular que está basado en los cortes del ADN genómico mediante enzimas de restricción y en la subsecuente amplificación de algunos de esos fragmentos mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Son una herramienta poderosa de análisis del genoma dado que poseen un alto poder de detección de la variabilidad genética.

En forma general, el ADN es incubado con dos enzimas de restricción que producen fragmentos de diferentes tamaños. Una requiere de 6-8 bases en

secuencia específica, lo que genera fragmentos muy grandes (*EcoRI*, *AseI*, *HindIII*, *Apal* y *PstI*). La segunda, solamente necesita 4 bases en su secuencia de corte (*MseI* ó *TaqI*). A los fragmentos generados, se les acopla "adaptadores" (oligonucleótidos sintéticos) de doble cadena, de 10-30 pares de bases, en los extremos para realizar la amplificación por PCR utilizando *primers* complementarios para ellos. Para facilitar la detección de los fragmentos, los *primers* contienen, además, una marca radioactiva o fluorescente. Los productos amplificados son separados en un gel de poliacrilamida y el polimorfismo se identifica por la presencia o ausencia de una banda determinada (Fig. 1.h).

El ensayo AFLP detecta los cambios de tamaño de las distintas regiones o loci en el genoma y no se requiere conocer la secuencia de éste. Se generan en condiciones de alta selectividad y es poco probable que se presenten falsos positivos. Es una técnica relativamente económica, sencilla, rápida y confiable. Las únicas desventajas de AFLP, es que son heredados de manera dominante y tienen relativamente bajo PIC; pero el gran número de loci que pueden ser catalogados de manera simultánea, aumenta considerablemente su utilidad.

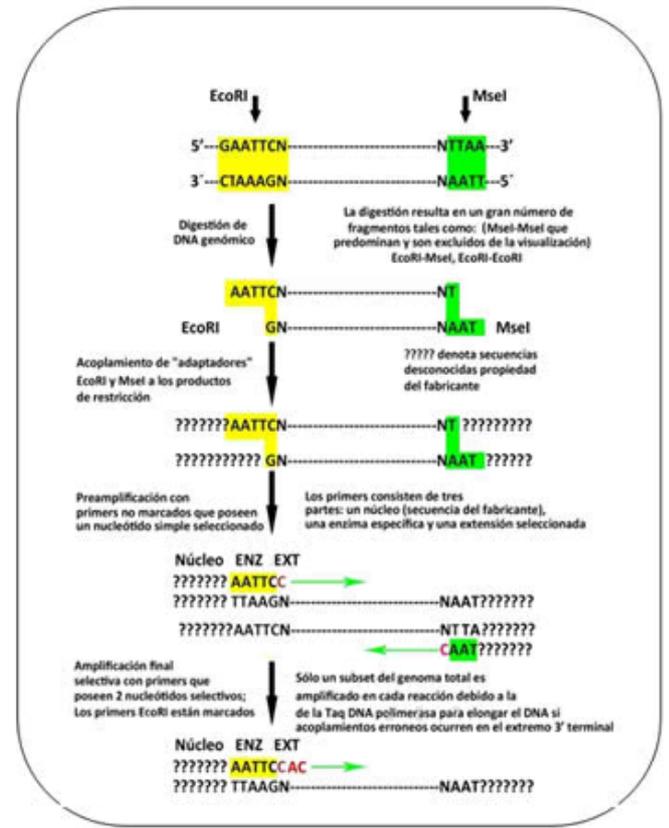


Figura 1.h. Metodología AFLP.

¿CUÁL ES EL MEJOR MARCADOR MOLECULAR EN ACUICULTURA?

La respuesta a esta pregunta depende de los objetivos específicos del estudio, de si existe información molecular previa y de los equipos y materiales disponibles. Las Tablas la y Ib, tomada de Liu & Cordes (2004) pueden ser de gran utilidad. Si el objetivo, es conocer si un organismo es puro o híbrido, los marcadores obtenidos a través de RAPDs probablemente son suficientes, ya que se trata del método más simple, con un mínimo de requerimientos de recursos.

Si el análisis requiere revelar niveles elevados de polimorfismo, los marcadores obtenidos por AFLP suministran un mayor nivel de diferenciación que los RAPDs.

Los marcadores SNP, son quizás los más poderosos para el mapeo del genoma e identificación de loci candidatos para caracteres cuantitativos (QTL). El problema es que se requiere una gran inversión ya que los equipos son muy costosos. La detección de diferencias considerables entre especies puede ser detectada mediante RFLP, RAPD, AFLP, y el uso de secuencias de microsatélites.

Tabla Ia. Marcadores moleculares, sus características y aplicaciones potenciales. Tomado de Liu & Cordes (2004).

Marcador	Modo de herencia	Tipo de marcador	Polimorfismo	Aplicación
Alozimas	codominante	Tipo I	bajo	Mapeo de ligamiento, estudios poblacionales.
ADN mitocondrial	materna	-	bajo	Ligamiento materno
ADN				
RFLP	codominante	Tipo I ó II	bajo	Mapeo de ligamiento
RAPD	dominante	Tipo II	intermedio	Estudios poblacionales, identificación de híbridos.
AFLP	dominante	Tipo II	Alto	Mapeo de ligamiento, estudios poblacionales
SSR	codominante	Tipo II	alto	Mapeo de ligamiento, estudios poblacionales, análisis de paternidad
EST	codominante	Tipo I	bajo	Mapeo de ligamiento y ligamiento físico
SNP	codominante	Tipo I y II	alto	Mapeo de ligamiento, estudios poblacionales

Tanto los microsatélites como los AFLPs, son apropiados por ejemplo para determinar líneas de peces en la acuicultura. El empleo de frecuencias alélicas de múltiples loci de microsatélites, es un poderoso enfoque para la identificación de estas líneas. Tradicionalmente, los marcadores alozimas y ADNmt han sido empleados en peces, pero su poder de diferenciación es limitado,

comparado con los obtenidos mediante RAPDs, AFLPs y en relación con los microsatélites.

Tabla 1b. Aplicación de los marcadores en genética para acuicultura. Tomado de Liu & Cordes (2004).

Característica	Sistema recomendado	Otros que pueden ser útiles
Identificación de especies	RAPD	AFLP, microsatélites, Isozymas
Identificación de cepas	AFLP, microsatélites	RAPD
Identificación de híbridos	RAPD	AFLP, microsatélites, ADNmt
Determinación de paternidad	microsatélites	
Análisis de diversidad	AFLP, microsatélites	RAPD
Mapeo genético	Marcadores Tipo I, microsatélites, SNP	AFLP, RFLP
Mapeo comparativo	Marcadores Tipo I	ESTs, microsatélites conservados

EJEMPLOS DE MEJORAMIENTO GENÉTICO EN ACUICULTURA USANDO MARCADORES OBTENIDOS POR AFLP

Mediante el empleo del ensayo AFLP han sido construidos mapas génicos en el salmón del Atlántico (Moen *et al.* 2004c) y se están buscando los genes que confieren resistencia a la anemia (Moen *et al.* 2004b), un avance que incrementará el rendimiento en el cultivo de esta especie. En la trucha, la técnica AFLP ha sido aplicada para construir mapas génicos y buscar diversos QTLs (Nichols *et al.* 2003), incluyendo los genes involucrados en la resistencia al virus de la necrosis hematopoyética (IHNV) (Rodríguez *et al.* 2004), los que controlan la actividad celular asesina (NK-like activity; Zimmerman *et al.* 2004), de genes involucrados en eficiencia alimenticia y crecimiento (Zimmerman & Wheeler 2005) y de marcadores relacionados al sexo (Felip & Young 2005). Además, se ha utilizado AFLP para el análisis del impacto ecológico en trucha arcoíris, detectando biomarcadores para tóxicos y otros agentes antropogénicos (Bagley *et al.* 2001).

Tilapias. En estas especies, la metodología AFLP se ha utilizado para la construcción de mapas génicos en la tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*; Kocher *et al.* 1998) y para la búsqueda de QTLs de tolerancia al frío y ganancia de peso corporal en híbridos (Moen *et al.* 2004a). También, han sido útiles para monitorear cruza entre diferentes especies con intención de obtener una tilapia mejorada, con mayor tolerancia al frío y a la salinidad (Agresti *et al.* 2000),

así como para el seguimiento de la inducción de ginogénesis y para poder monitorear marcadores ligados o específicos del sexo (Ezaz *et al.* 2004).

Bagres. Los marcadores obtenidos mediante AFLP se han utilizado para la construcción del mapa génico (Liu *et al.* 2003) y análisis genético del bagre de canal (*Ictalurus punctatus*), el bagre azul (*I. furcatus*) y de sus híbridos (Liu *et al.* 1998). Los AFLP también se han empleado para la construcción del mapa genético del bagre caminador *Clarias macrocephalus* (Poompuang & Na-Nakorn, 2004) y del bagre de río malayo (*Mystus nemurus*), así como para determinar la variación genética entre 5 poblaciones silvestres (Chong *et al.* 2000).

Cabrillas y Meros. En estas especies se han utilizado marcadores obtenidos mediante AFLP para verificación de ginogénesis (Felip *et al.* 2000) y para detectar variación genética en los géneros *Morone* y *Thunnus* (Han & Ely 2002)

Otros peces. El pez arowana asiático (*Scleropages formosus*), también llamado pez dragón, es una especie de ornato que está altamente amenazada. Mediante AFLP se ha estudiado la diversidad genética y estructura de población en tres reservas de animales en cautiverio, con miras a un programa de cría con fines de conservación y repoblación (Yue *et al.* 2004). AFLP también se ha usado en estudios filogenéticos en la anguila eléctrica africana (Sullivan *et al.* 2005).

Moluscos. Los marcadores obtenidos mediante AFLP se han aplicado para la construcción del mapa genómico de las ostras *C. gigas* y *C. virginica* (Yu & Guo 2003) y de la almeja china Zhikong (*Chlamys farreri*). Estos mapas, son de utilidad en los programas de selección de reproductores (Li *et al.* 2005) y específicamente se están utilizando en el análisis genético de líneas selectas de *C. virginica* (Yu & Guo 2004). Por otro lado, también utilizando AFLP, se determinó el origen y el vector de invasión del mejillón cebra (*Dreissena polymorpha*), considerado nocivo e introducido en aguas irlandesas (Pollux *et al.* 2003).

Crustáceos. Los AFLP han sido muy útiles en camaronicultura (Montaño-Pérez *et al.* 2006) para establecer genealogías, construcción de mapas genéticos e identificación de QTLs que influyen rasgos comerciales específicos en *Penaeus japonicus* (Moore *et al.* 1999); para mapeo genómico en *P. monodon* (Wilson *et al.* 2002), *P. japonicus* (Li *et al.* 2003), mapa de genes ligados al sexo en *Litopenaeus vannamei* (Montaño-Pérez *et al.* 2006); selección de reproductores en *P. chinensis* (Zhang *et al.* 2004); para identificación y estudios filogenéticos de 6 especies de camarones penéidos (Wang *et al.* 2004). Los marcadores AFLP también se han aplicado para estudiar otros crustáceos relacionados con la camaronicultura; como es el caso de la búsqueda de diversidad y diferenciación genética en especies de *Artemia* (Sun *et al.* 1999), cangrejos comestibles (Gómez-Uchida *et al.* 2003) y langostinos (Fetzner & Crandall 1999). En el mismo contexto, los AFLP se han utilizado para la tipificación de bacterias, lográndose diferenciar las que actúan como

probióticos y aquellas que son patógenos para el camarón (Vandenberghe *et al.*, 1998, 1999).

CAPÍTULO 2

CARACTERES DETERMINADOS POR GENES SIMPLES

Los caracteres que dependen de genes simples son discontinuos y, en lo relativo al mejoramiento genético, se trata fundamentalmente de los polimorfismos en patrones de color en conchas de bivalvos y de la piel en algunas especies de peces, polimorfismos isozímicos, de grupos sanguíneos. Existen genes que determinan características que pueden ser detectadas sin técnicas especiales, como los que codifican el color externo en algunos peces y en moluscos.

Así, los polimorfismos de colores (Fig. 2.a) encontrados en el mejillón azul, *M. edulis* (individuos azules y marrones), en los pectínidos *Argopecten irradians* (naranjas, amarillos, marrones y blancos) *A. purpuratus* (blancos, amarillos, marrones y morados) y *Euvola ziczac* (blancos, morado, marrones claros y oscuros, negros) están genéticamente controlados, posiblemente por más de un gen (Adamkewick & Castagna 1988; Kraeuter *et al.* 1984; Wolff & Garrido 1991; Pérez 1993).



Figura. 2.a. Algunos de los polimorfismos de color en la superficie de la concha de *Argopecten purpuratus* y el carácter línea blanca (a púrpura; b púrpura con línea blanca; c marrón; d naranja; e blanco) (tomado de Winkler *et al.* 2001).

Se encontró que el crecimiento y la supervivencia de los individuos de *A. purpuratus*, de coloración marrón-morada fue mayor que en los amarillos (Wolff & Garrido 1991). Winkler *et al.* (2001) corroboraron que el

polimorfismo de color de ésta especie se debe a un modelo sencillo y dominante de epistasis que explica la distribución de las variantes del color observado. La presencia de la línea blanca en algunos ejemplares puede ser controlada a su vez por un alelo recesivo con herencia mendeliana.

Luttikhuizen & Drent (2008) encontraron un polimorfismo de color en la especie *Macoma baltica*, que presenta un modelo sencillo de herencia con cuatro alelos en un solo locus cuya jerarquía lineal de dominancia es rojo>anaranjado>amarillo>blanco(Fig. 2.b)



Figura.2.b. Polimorfismo de color de la concha en *Macoma baltica* (Bivalvia: Tellinidae). De izquierda a derecha: filas de cinco de blanco, amarillo, naranja, conchas bicolors y rojo. Modificado de Luttikhuizen & Drent (2008).

La variación del color, es heredable y pudiera ser usada como un marcador genético. En peces se han realizado numerosos trabajos en relación al color, especialmente en tilapias, enfocándose en mutantes que otorgan una coloración más pálida que la normal, y que ha generado gran interés por su importancia económica al ser más atractivos visualmente.

Para el género *Oreochromis* se reporta el primer ancestro de la tilapia roja en 1968 en un cultivo artesanal de *Oreochromis mossambicus* de coloración silvestre, introducida desde Singapur en 1946 cerca de la población de Tainan (Taiwan). Ho Kuo en 1969 (Taiwan Fisheries Research Institute) realizó el cruce entre el macho mutante de color rojizo-anaranjado de *O. mossambicus* y la hembra de coloración normal de *O. niloticus*, obteniendo una F1 con un 25% de alevines de coloración rojiza-anaranjada. Luego de 9 años, de cruces selectivos se logró fijar la coloración roja en el 70 a 80% de la población. La tilapia roja se convirtió en la punta de lanza para el desarrollo acelerado de la piscicultura comercial a partir de la década de los 80 en países suramericanos sin tradición acuícola como: Colombia (introducida en 1982), Venezuela (introducida en 1989) y Ecuador (introducida en 1993) en forma casi simultánea con países centroamericanos, caribeños y norteamericanos (Castillo-Campos 2006). Pero en Cuba, país con un desarrollo en el cultivo de tilapias, la Empresa Nacional de Acuicultura decidió eliminar el cultivo de tilapia roja, principalmente por su baja variabilidad y crecimiento, la elevada proporción de individuos blancos, rosados o manchados, los elevados costos de alimentación

y que, además, en el mercado cubano el color rojo de la piel no tenía ningún valor adicional (Pérez 1996b).

Aunque en muchos países existe un gran interés en el cultivo de la tilapia roja, ésta, no parece una buena escogencia en países donde la acuicultura es fuente importante de la dieta diaria. Por otra parte, la tilapia roja puede ser fuente importante de divisas vendida en países donde la gente puede darse el lujo de pagar por el color de la piel de un pez.

Otra mutación interesante en tilapia, específicamente en la tilapia del Nilo (*O. niloticus*) descrita por Scott *et al.* (2008) es la cepa "blond" que mediante cruces se ha demostrado que poseen una marcada reducción de la melanina en los cromatóforos y que apareció en una población de laboratorio de *O. niloticus*; y se debe a un gen autosómico recesivo. Esta cepa, según los autores, podría tener valor comercial.

Para finalizar con los caracteres que son determinados por muy pocos genes, como lo citados, es importante señalar que las nuevas características surgen en las poblaciones por mutaciones las cuales son, en general, perjudiciales, directamente o por sus efectos pleiotrópicos, esto debido a que los organismos están adaptados a su medio y cualquier cambio tiende a alterar este equilibrio. Sin embargo, en raras ocasiones pueden determinar efectos beneficiosos para la acuicultura como el ocurrido en la langosta *Homarus americanus* (Hedgecock *et al.* 1976) con la mutación "sin ojos" que no permite el desarrollo de

los pedúnculos oculares y determina un crecimiento más rápido que en las langostas normales. En las granjas de cultivo la ablación de los pedúnculos oculares es una práctica común para inducir el desove y acelerar el crecimiento en especies de crustáceos de importancia económica, entre ellas la langosta *Panulirus argus* (Blanco & Fraga 2003) y los camarones de agua dulce *Macrobrachium rosenbergii* y *M. acanthurus* (Cunha & Oshiro 2010).

Además de estos caracteres que pueden ser observados sin el uso de técnicas especiales, existen los que requieren de la utilización de algunas metodologías y técnicas para su detección, como es el caso de los polimorfismos enzimáticos detectables mediante electroforesis, los cuales se analizaron parcialmente en el capítulo anterior y son muy utilizados tanto en estudios de poblaciones naturales como de cultivo.

En Venezuela, en la zona nor-oriental destacan los trabajos en moluscos bivalvos de la especie *Arca zebra* (Pérez 1987), *Crassostrea rhizophorae* y *C. virginica* (Gutiérrez *et al.* 1989), *Perna perna* (Pompa *et al.* 1992), *Pecten ziczac*, *Lyropecten nodosus* (Coronado *et al.* 1991; Pérez & Alfonsi 1999; Pérez *et al.* 2000a; Pérez *et al.* 2000b; Moreno *et al.* 2004). La variabilidad genética en estas especies, resultó ser muy baja, comparada con los valores determinados para otras especies de invertebrados marinos pero, suficientes para intentar preparar cepas puras (que puedan ser monitoreadas usando algunos sistemas enzimáticos polimórficos) mediante autofecundación

(especialmente en los pectínidos) y explorar así la posibilidad de heterosis, como se analiza en el sexto capítulo.

También, se han llevado a cabo investigaciones que relacionan la heterocigosidad para algunas enzimas, con la adaptabilidad de algunos organismos potencialmente cultivables, destacando entre ellos el trabajo de Nirchio *et al.* (1987; 1991) en la ostra de mangle *Crassostrea rhizophorae*, de la laguna La Restinga, Isla de Margarita, donde se determinó un polimorfismo para la enzima leucil aminopeptidasa (LAP) cuyas frecuencias, parecen estar afectadas por la salinidad. Así mismo, en un estudio de monitoreo del polimorfismo de la enzima octopina deshidrogenasa (ODH) en el bivalvo *E. ziczac*, (Coronado *et al.* 1991; Alfonsi *et al.* 1995; Pérez *et al.* 2000 a y b; Moreno *et al.* 2004) se aislaron varias isoenzimas y se analizaron la relación entre éstas y algunas estrategias adaptativas de la especie, especialmente la relacionada con la conducta de escape de estos pectínidos.

A pesar de haberse demostrado relación entre algunos fenotipos para determinadas enzimas con factores que afectan la adaptabilidad, se considera que en los programas de mejoramiento genético, difícilmente se ha explotado una relación directa entre caracteres determinados por loci simples, al menos para isozimas y ADN.

CAPÍTULO 3

CARACTERÍSTICAS CUANTITATIVAS

Una gran parte de las características importantes, desde el punto de vista productivo para la acuicultura, tales como la velocidad de crecimiento, supervivencia larval y postlarval, la calidad de la carne, son determinadas por un elevado número de genes y presentan una variación continua, razón por la cual se les llama caracteres poligénicos o cuantitativos.

Cada alelo involucrado en la determinación de un carácter cuantitativo contribuye al fenotipo final y esta acción génica aditiva hace que cada genotipo tenga un valor métrico que difiere levemente de los otros y explica, para el carácter métrico en cuestión, la distribución de valores que se aproxima a una curva normal en la población. Sin embargo, el fenotipo en los caracteres cuantitativos no sólo depende directamente de los genes que lo originan, sino que también se ve afectado por las interacciones de un alelo sobre otro (dominancia) y por el efecto de un gen sobre la expresión de otro (epistasia). Los efectos aditivos, dominantes o epistáticos pueden contribuir al fenotipo de un carácter cuantitativo, pero generalmente las interacciones aditivas son las más importantes.

Al locus de un gen que afecta un carácter cuantitativo, se le denomina en inglés "quantitative trait locus" (QTL). El número de loci que contribuyen a un carácter cuantitativo puede estimarse mediante el mapeo de QTLs, donde los

cromosomas o regiones cromosómicas se identifican mediante marcadores moleculares.

Además de los factores mencionados, los cuales son de naturaleza genética, también existen factores ambientales que afectan a los caracteres cuantitativos, teniendo como consecuencia que un genotipo puede producir muchos fenotipos o varios genotipos pueden producir el mismo fenotipo, todo esto en respuesta al ambiente. La expresión de un genotipo en diversos ambientes se llama Norma de Reacción. Debido a esto, es importante conocer parámetros estadísticos dentro de un mismo genotipo ubicado en diferentes ambientes o entre los diferentes genotipos en un mismo ambiente.

En algunos organismos experimentales es factible separar genotipo y ambiente respecto de sus efectos sobre el fenotipo promedio. Es posible entonces:

1.- Comparar el rendimiento del mismo genotipo en ambientes diferentes, y evaluar el efecto del ambiente sobre el fenotipo.

2.- Comparar el rendimiento de diferentes genotipos en el mismo ambiente, y evaluar el efecto de los genotipos sobre el fenotipo

El valor métrico (valor fenotípico) producto de la expresión del genotipo, es la suma de los efectos genéticos, ambientales y la interacción de ambos tipos de factores. De esta manera, la varianza total de un carácter

cuantitativo puede ser expresada en forma matemática:

$$VF = VG + VA + VGA$$

Donde:

VF: Variación fenotípica total para la población.

VG: Variación genética que contribuye a la varianza fenotípica total.

VA: Contribución ambiental a la variación fenotípica total.

VGA: Variación asociada a las interacciones de los factores genéticos y ambientales.

La variación genética (**VG**) puede a su vez subdividirse en tres componentes:

Variación genética aditiva (**VGa**).

Variación genética por dominancia (**VGd**).

Variación genética por interacción o epistática (**VGi**).

Entonces:

$$VG = VGa + VGd + VGi$$

La **Varianza Fenotípica Total** tendrá los siguientes componentes:

$$VF = (VGa + VGd + VGi) + VA + VGA$$

HEREDABILIDAD

Debido a que en los caracteres cuantitativos el ambiente ejerce una influencia importante, es vital conocer y cuantificar la proporción de la varianza que es determinada por la herencia, ya que el éxito de los procesos de selección (que generalmente es la técnica de mejoramiento genético por excelencia en caracteres cuantitativos) depende principalmente de la variación natural del carácter y del componente genético de esa variabilidad, denominado Heredabilidad.

Si por ejemplo, tomamos organismos de una misma edad, que crecen en el mismo ambiente, notaremos diferencias de tamaño. En este caso, la heredabilidad del tamaño es la proporción de la varianza observada que no se debe a parámetros ambientales tales como la temperatura, oxígeno disuelto, profundidad, densidad etc.

Se pueden estimar dos tipos de heredabilidad:

a. La heredabilidad en sentido amplio (H^2 o h^2_A) que es la relación de la Varianza Genética Total a la Varianza Fenotípica:

$$h^2_A = VG/VF$$

b. La heredabilidad en sentido estricto (h^2) es la relación entre la Varianza Genética Aditiva y la Varianza Fenotípica Total:

$$h^2 = VGa/VF$$

Se acostumbra dividir la escala de (h^2) de cero a uno (0 -1) en tres categorías:

Baja: valores menores de 0,2.

Intermedia: valores entre 0,2 y 0,5.

Alta: valores mayores de 0,5.

Debemos siempre recordar que la heredabilidad:

1. Es un término no individual.
2. Es específica de la población y del ambiente que se está analizando.
3. No indica en qué grado un carácter es genético, mide solamente la proporción de la varianza fenotípica debida a factores genéticos.

MÉTODOS PARA ESTIMAR LA HEREDABILIDAD

a. **Utilizando los componentes de la varianza en un análisis estadístico de varianza (ANOVA).**

En este caso, podemos estimar los componentes de la varianza a través de la tabla obtenida de la comparación de los valores de la variable de interés en distintos grupos de individuos o poblaciones de un análisis de varianza (ANOVA). En todos los casos, la media cuadrática error, representa

la varianza ambiental y la medias cuadráticas entre tratamientos son combinaciones del resto de los componentes (medias cuadráticas en el caso de ANOVA múltiple) de la varianza, los cuales podemos obtener por despejes matemáticos simples y posteriormente calcular la heredabilidad.

Un ejemplo para ilustrar las formulaciones y su manejo es el siguiente:

A partir de una población de microalgas, se obtuvieron 100 cepas que fueron evaluadas en cuanto a su crecimiento en un gradiente ambiental en un diseño completamente al azar con 4 réplicas. El análisis de varianza de esa comparación para la variable a ser mejorada produjo los siguientes resultados:

Fuente de variación	GI	Sc	Mc	Fs
Entre grupo	a-1=99	41,10	0,41	
Error	$\sum ni-a= 300$	7,10	0,02	17,58 **

Fuente de variación	gl	Sc	Mc	Fs
Entre grupo	a-1	VE + VG		
Error	$\sum ni-a$	VE		

La tabla obtenida representa las siguientes formulaciones:

a = número de grupos que se comparan

ni = número de datos

VE = varianza error o varianza ocasionada por el ambiente y la interacción genotipo ambiente ($VA + VGA$) dentro de la variación fenotípica.

VG = variación genética

De allí se deduce:

$VE = 7,10 + VG = 41,10$ y por lo tanto, $VG = (41,10 - 7,10)$; por lo cual VG = viene a ser 34; lo cual dividido entre las 4 réplicas de trabajo nos da un valor de $VG = 34/4$ y

$VG = 8,50$

Como se había mencionado ($h^2 = VG / VF$), es decir:

$h^2 = VG / (VG + VA + VGA)$, de las cuales tenemos entonces VG y ($VA + VGA$) ya estimados así que:

$h^2 = VG / (VG + VE)$

$h^2 = 8,50 / (8,50 + 7,10)$

$h^2 = 0,54$

b. Comparando la similitud entre individuos emparentados mediante análisis de regresión.

Este método consiste en realizar un análisis de regresión utilizando la medición de la variable en padres (X) e hijos (Y), la pendiente de la línea de regresión corresponderá al valor de la heredabilidad para ese carácter.

Otra manera puede ser, establecer una relación matemática entre progenies, sin considerar los valores de la variable de interés en los padres. En estos casos, debe considerarse para el cálculo, el hecho de si el análisis estadístico se realiza entre hermanos completos o entre medios hermanos por padre o madre. En el caso de los hermanos completos, la heredabilidad será estimada como $\frac{1}{2}$ de la pendiente de la recta de regresión y en el caso de los medios hermanos como $\frac{1}{4}$ del valor de la pendiente.

Se puede utilizar el siguiente ejemplo para ilustrar el procedimiento: se evaluó el peso en gramos de unos organismos de interés y sus descendientes, los cuales se muestran en la tabla siguiente:

Promedio de los padres (X)	Promedio de descendientes (Y)
11,80	7,70
8,40	5,70
9,50	5,80
10,00	7,20
10,90	7,30
7,60	5,40
10,80	7,20
8,50	5,60
11,80	8,40
10,50	7,00

Con esta información, se determina la heredabilidad del

carácter peso a través del cálculo del coeficiente de regresión (b) de la siguiente manera:

$$b = \frac{\sum XY - \left(\sum X \sum \frac{Y}{N} \right)}{\sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{N}} \quad b = \frac{684,43 - \frac{(99,8)(67,3)}{10}}{1015 - \frac{(99,8)^2}{10}} = 0,67$$

Donde:

b= coeficiente de regresión

$\sum X$ = sumatoria de todos los valores de X

$\sum Y$ = sumatoria de todos los valores de Y

$\sum XY$ = sumatoria de cada valor de x multiplicado por su correspondiente y

$\sum X \sum Y$ = la sumatoria de todos los x multiplicada por la sumatoria de todos los y

N= número de pares de datos

Por lo tanto, la heredabilidad $h^2 = b = 0,67$

c.- Midiendo la heredabilidad realizada.

En este caso, en lugar de estimar la heredabilidad y luego planificar el proceso de mejoramiento genético por selección, se lleva a cabo la selección de los organismos directamente y luego se estima la heredabilidad. Para esto,

se utiliza la fórmula:

$$h^2 = R / Sd$$

donde:

Sd= Promedio de los organismos seleccionados menos el promedio de la población de origen o población a ser mejorada.

R= Promedio de la descendencia menos el promedio de la población de origen.

El siguiente ejemplo utiliza el tamaño de las vieiras *Euvola ziczac* de un año de edad que, en una población presentó un promedio de 81,20 mm. Se escogieron los individuos con mayor tamaño en esa población, con un promedio de 85,00 mm como padres de la siguiente generación.

Entonces,

$$Sd = 85,00 - 81,20 = 3,80$$

El tamaño promedio de la descendencia de estos cruces seleccionados fue de 83,10; por lo tanto:

$$R = 83,10 - 81,20 = 1,90$$

y la heredabilidad:

$$h^2 = R / Sd = 1,90 / 3,80$$

$h^2 = 0,50$ la cual como ya se ha mencionado es considerada una heredabilidad intermedia que podría indicar buenas posibilidades para un programa de selección artificial.

SELECCIÓN ARTIFICIAL

La selección es la más común de las prácticas para el mejoramiento de los caracteres cuantitativos, en la que se escogen los mejores individuos como padres de la siguiente generación. La selección artificial, es análoga a la selección natural ya que ambas aumentan la frecuencia de los alelos que determinan el carácter seleccionado. La selección se considera positiva, cuando se escogen organismos con características superiores al promedio y negativa al eliminar individuos con fenotipos no deseables.

El conocimiento de la heredabilidad, permite predecir la posible respuesta a la selección. Como ya se ha señalado, valores de h^2 cercanos a 1 indican que la mayor parte de la variación es debida a factores genéticos y, por lo tanto, se entiende que la respuesta a la selección será importante. Por otra parte, valores de h^2 cercanos a 0 señalan que el ambiente es el agente causal principal de la variación y que la selección no tendrá resultados significativos.

RESPUESTA A LA SELECCIÓN

La respuesta a la selección realizada (R) puede estimarse como:

$$R = I \cdot rAC \sqrt{\frac{h^2}{L}}$$

Donde:

I = intensidad de la selección

rAC = precisión

h^2 = heredabilidad.

L = Intervalo entre generaciones

La selección artificial, requiere en todo momento que se utilicen los controles apropiados con organismos de igual origen y edad, tomados al azar. Pueden hacerse selecciones de tipo individual o puede hacerse selección familiar. La selección individual, es generalmente efectiva si la heredabilidad del carácter es igual o mayor a 0,25. La selección familiar presenta una ventaja sobre la individual y es el disminuir la consanguinidad, especialmente si se emplea un sistema de rotación para los cruces.

La tabla IIIa, muestra la respuesta a la selección de algunas especies de importancia en acuicultura.

Tabla IIIa. Respuesta a la tasa de selección en la tasa de crecimiento en especies acuáticas de cultivo. Tomada de Dunham *et al.* (2001)

Especies	Peso corporal promedio	Ganancia por generación (%)
Salmón coho	250 g	10,1
Trucha arcoiris	3,3 g	10
Trucha arcoiris	4,0 Kg	13
Salmón del atlántico	4,5 Kg	14,4
Salmón del Atlántico	6,3 Kg	14
Bagre del canal	450 g	14
Bagre del canal	67 g	20
Tilapia	100 g	15
Rohu	400 g	17
Camarón	20 g	4,4
Camarón	15 g	10,7
Ostras	42 g	9-12
	36 g	9
	33 g	9

En los procesos de selección en animales de cultivo, se debe ser cuidadoso en evitar algunos efectos negativos producto de la endogamia al aumentar la homocigosis de alelos recesivos. Estos efectos, son conocidos como Depresión Consanguínea. En ocasiones, se denomina a la selección como "consanguinidad indirecta".

Hay que tener en cuenta que el mejoramiento de la población mediante la selección artificial no puede continuar

indefinidamente. Una población puede responder a la selección hasta que su media sea diferente a varias desviaciones estándar de la población original pero, eventualmente, la población alcanza un límite después del cual no se logra respuesta. El progreso queda detenido porque todos los alelos que afectan el carácter se fijan o se pierden, y la heredabilidad del carácter tiende a 0.

Las enfermedades que afectan a los organismos marinos o dulceacuícolas cultivados son bastantes difíciles de controlar, mucho más que en organismos terrestres en los que el animal enfermo se aísla para tratarlo o eliminarlo. Por otra parte, el tratamiento usual de agregar drogas al agua puede provocar el desarrollo de otros patógenos al eliminar competidores. La práctica general para obtener líneas resistentes ha sido muy simple: exponer los organismos a patógenos y cruzar los supervivientes esperando obtener una progenie más resistente, en promedio, que la paterna.

En el caso de la selección a realizarse sobre características que son difíciles de cuantificar, como la resistencia a las enfermedades, eficiencia de alimentación, maduración, entre otras, la selección asistida por marcadores moleculares puede ser especialmente valiosa.

Tabla IIIb. Ejemplos de QTL en especies usadas en acuicultura (IPNV = Infectious pancreatic necrosis virus). Tomada de Lo Presti *et al.* (2009)

Especie	Característica
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Tolerancia a temperaturas
	Tiempo de desove
	Resistencia a IPNV
	Tasa de desarrollo embrionario
	Sexo
	Maduración temprana
	Nivel de cortisol
<i>Oreochromis</i> híbrido	Respuesta inmune/stress
	Color del cuerpo
<i>Oncorhynchus kisutch</i>	Color de la carne
	Epoca de desove
<i>Salmo salar</i>	Resistencia a IPNV
	Porcentaje de grasa corporal
<i>Dicentrarchus labrax</i>	Características morfométricas
<i>Paralichthys olivaceus</i>	Enfermedad linfocítica
<i>Crassostrea virginica</i>	Resistencia a enfermedades

La principal limitación para este tipo de selección es el número de marcadores moleculares estudiados (los microsatélites están entre los más utilizados) y mapas de QTLs obtenidos para las especies de interés (Lo Presti *et al.* 2009).

Para la selección artificial basada en los QTLs existen

algunas limitaciones como la dificultad de identificarse en genealogías, porque sus efectos individuales están enmascarados por los otros genes que influyen la característica y por el ambiente. Sin embargo, los QTLs pueden localizarse si están genéticamente ligados a marcadores polimórficos de ADN, ya que el genotipo que afecta al carácter cuantitativo podrá relacionarse con el genotipo del marcador genético ligado. La ubicación de los QTLs en el genoma es importante para su manipulación en programas de mejoramiento y para poder clonarlos y estudiarlos de manera de identificar sus funciones.

Numerosos proyectos han conducido al desarrollo de QTLs diseñados para identificar regiones o genes y marcadores asociados con características específicas en especies usadas en acuicultura (Tabla IIIb). Una vez identificados, estos marcadores pueden ser usados en un proceso que se conoce como selección asistida por marcadores, los cuales pueden utilizarse también para estudiar la segregación de regiones importantes en programas de mejoramiento y también como punto de partida para clonar los genes con efectos importantes sobre el carácter en cuestión.

EJEMPLOS EN EL ÁREA DE LA ACUICULTURA

El crecimiento es la característica más importante, aunque no la única, en la que se centra la atención en las especies destinadas a la acuicultura. En peces, los salmónidos y las tilapias son los más empleados para el

desarrollo de esta actividad así como en la aplicación de programas de mejoramiento de los "stocks".

Vandeputte *et al.* (2004) estimaron la heredabilidad para algunas características relacionadas con el crecimiento en juveniles de la carpa (*Cyprinus carpio*) mediante cruces factoriales completos y el uso de marcadores microsatelitales. Los estimados de heredabilidad fueron de 0,33, tanto para el peso como para la longitud y 0,37 para el factor de condición (k). Concluyeron que el mejoramiento mediante procesos de selección puede ser exitoso en los juveniles de la carpa pero, que sería conveniente hacer estas estimaciones en la edad de cosecha.

Vandeputte *et al.* (2008) también utilizaron marcadores microsatelitales en *Cyprinus carpio* y estimaron la heredabilidad en características relacionadas con el crecimiento, señalando valores de 0,21 a 0,33 para la longitud y de 0,31 a 0,44 para el peso. Los autores, concluyeron que, aunque la selección para el crecimiento parece posible para la carpa común, éste sería un proceso a largo término antes de ser apreciable. Kocour *et al.* (2007) utilizando pedigree molecular con microsatélites, encontraron para la misma especie en tallas de mercadeo valores de heredabilidad altos (>0,5) en la longitud estandard, peso del cuerpo, porcentaje de grasas y tamaño relativo de la cabeza mientras que el alto y ancho relativos del cuerpo, entre otras variables presentaron valores medios de heredabilidad (0,2 - 0,5) lo cual fue un indicativo de que la selección es un buen método para mejorar algunas de

las características de esta especie.

Pante *et al.* (2002) estimaron los componentes de la varianza y la variación genética dominante y aditiva para el peso del cuerpo a la edad de cosecha durante 6 generaciones, en la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), lo cual, ha permitido confirmar la presencia de una variación genética dominante significativa para esta característica en la especie. En el salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*), Neira *et al.* (2006), realizaron selección para el peso a la edad de cosecha en dos poblaciones durante 4 generaciones, encontrando valores de heredabilidad muy parecidos (0,40 - 0,44) en ambas poblaciones.

En otros grupos de peces y con otras características, la selección también ha sido aplicada con éxito: Charokarisa *et al.* (2005) trabajando con la tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) investigaron la tolerancia al frío de los juveniles de esa especie obteniendo estimados de heredabilidad de 0,33 para el nivel de enfriamiento por hora. Saillant *et al.* (2005) caracterizaron 3-6 loci microsatelitales en el robalo (*Dicentrarchus labrax*), utilizando selección familiar y estimaron la heredabilidad y las interacciones genotipo x ambiente para el peso del cuerpo utilizando exposición a diferentes temperaturas y densidades de cultivo. Los autores demostraron un importante componente genético aditivo y la presencia de efectos genotipo x ambiente. En el bacalao (*Gadus morhua*), Odegard *et al.* (2010) estudiaron la heredabilidad para la resistencia a la necrosis nerviosa viral utilizando selección familiar, y encontraron valores elevados, aún cuando los autores

señalan que la estructura de datos no fue la óptima para distinguir los efectos ambientales y los efectos genéticos aditivos.

Los ejemplos son menos abundantes en crustáceos y moluscos y entre ellos podemos mencionar, los trabajos de Benzie *et al.* (1997) y Kenway *et al.* (2006) en *Penaeus monodon*, obteniendo valores bajos de heredabilidad lo que indica una gran variación producto de un fuerte control ambiental en el crecimiento de este camarón; Hetzel *et al.* (2000) encontraron una heredabilidad moderada en *Penaeus japonicus*.

En moluscos, He *et al.* (2008) estudiaron, en la ostra perla *Pinctada fucata*, la selección para el alto de la concha y encontraron un promedio de heredabilidad de 0,713 y una respuesta a la selección para el crecimiento del alto de la concha marcadamente efectiva en la segunda generación. Deng *et al.* (2009) analizaron la talla de la ostra perla china *Pinctada martensii* y encontraron heredabilidades entre 0,22 y 0,64 indicando una variabilidad genética considerable y postularon que la selección masiva hasta la segunda generación sería efectiva. Liang *et al.* (2009) estimaron la heredabilidad en la vieira japonesa *Patinopecten yessoensis* señalando valores de 0,473 para la respuesta a la selección y 0,269 para la heredabilidad realizada, sugiriendo que la selección en masa para un mayor crecimiento para esta especie es efectiva.

CAPÍTULO 4

CARACTERES CROMOSÓMICOS

Los caracteres cromosómicos son de gran importancia y aplicación en los programas de mejoramiento genético. El conocimiento del número y estructura de los cromosomas (cariotipo) puede ser de gran valor para predecir por ejemplo, la posibilidad de cruzar con éxito dos especies cuyos mejores caracteres puedan reunirse en los híbridos.

La mayor parte de los organismos de reproducción sexual tienen dos conjuntos de cromosomas y se les conoce como diploides (2N), uno proviene de la madre y el otro del padre. En los organismos diploides, los óvulos y los espermatozoide llevan un solo cromosoma de cada par. Si esta reducción en el número de cromosomas de 2N a N no ocurriera mediante el proceso de meiosis el número cromosómico se duplicaría en cada generación. Cuando el espermatozoide fertiliza al óvulo (u ovocito), los dos núcleos haploides se fusionan y se restablece el estado diploide, seguido de divisiones celulares mitóticas. (Fig. 4a).

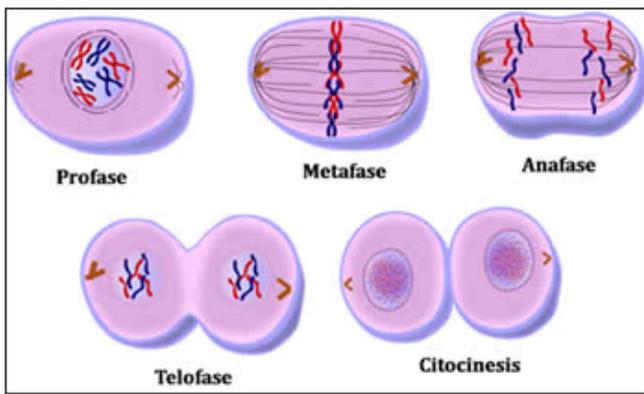


Figura 4. a. Etapas de la Mitosis.

La meiosis comprende dos divisiones sucesivas, llamadas primera y segunda divisiones meióticas o meiosis I y II (Fig 4b).

Las espermatogonias (en los testículos) y las ovogonias (en los ovarios) se multiplican por mitosis y originan células más pequeñas, los espermatoцитos y ovocitos primarios, respectivamente. Al comenzar la meiosis I, que es una división reduccional, los cromosomas son dobles, cada uno tiene dos cromátidas, al disponerse las parejas de homólogos en la metafase se forman las llamadas tétradas, las cuales originarán diadas al final de la meiosis I y cromosomas simples al finalizar la meiosis II.

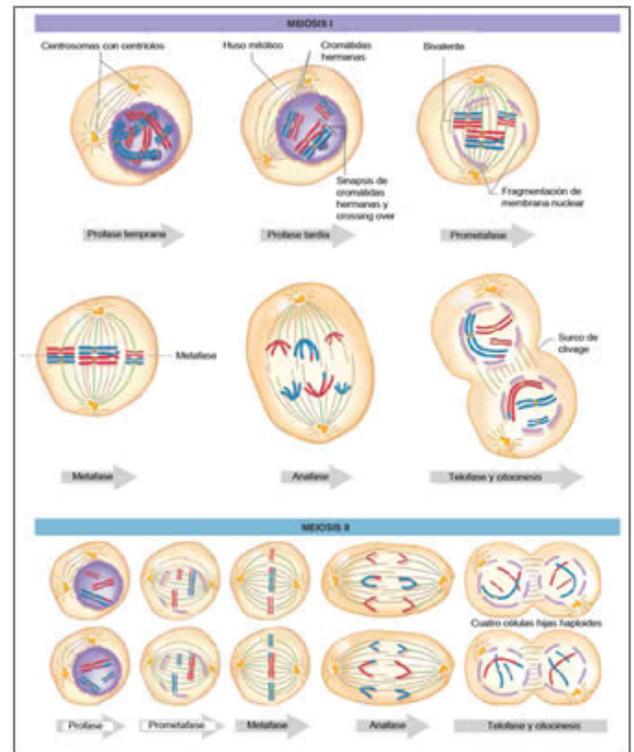


Figura 4. b. Esquema generalizado de la meiosis.

Es en la profase de la meiosis I cuando se produce el intercambio de material hereditario entre los cromosomas homólogos (entrecruzamiento o "crossing over"). Finalizada

la telofase I, se originan dos células por división citoplasmática, los espermatocitos y ovocitos secundarios, cada uno con un cromosoma (con dos cromátidas) de cada par.

La meiosis II puede ocurrir inmediatamente después de la meiosis I o luego de un lapso denominado intercinesis. En la profase II se observan los cromosomas con sus dos cromátidas preparándose para la metafase II. Los cromosomas se disponen durante la metafase II en el plano ecuatorial y en anafase II se dividen los centrómeros convirtiéndose cada cromátida en un cromosoma. En telofase II los núcleos tendrán un miembro de cada par de cromosomas homólogos; éstos son los núcleos de las espermátidas y ovótidas. Las espermátidas sufren cambios nucleares y citoplasmáticos que conducirán a la formación de los espermatozoides. La segunda división corresponde a una división mitótica normal de los cromosomas en cromátidas. De las meiosis I y II resultarán cuatro núcleos haploides.

En el caso de los machos, de cada célula germinal se producirán cuatro espermatozoides, mientras que en las hembras, divisiones citoplasmáticas desiguales conducirán a la formación de un ovocito y dos o tres cuerpos polares. Un conjunto de cromosomas producidos por la meiosis I permanece en el ovocito, mientras que el otro, es eliminado dentro del primer corpúsculo polar. Igualmente el segundo cuerpo polar, contiene uno de los conjuntos de cromosomas derivados de la meiosis II. A veces el primer corpúsculo polar, puede sufrir su propia meiosis II

originándose un total de tres corpúsculos. Para un organismo hipotético con un par de cromosomas, si se designan por C a los cromosomas y c a las cromátidas se obtendrían:

1 espermatocito (u ovocito) primario (2C-4c)

MEIOSIS I:

2 espermatocitos (u ovocitos) secundarios (1C-2c)

MEIOSIS II:

4 espermátidas (1C-1c) y 1 ovótida (1C-1c)+2 ó 3 cuerpos polares (1C-1c)

En la ovogénesis de algunas especies las divisiones meióticas se encuentran detenidas y se reanudan con la penetración del espermio en la célula que originará el óvulo. Este es el caso de los moluscos y crustáceos en los que el proceso se encuentra detenido en metafase I y en peces en la profase II.

Al penetrar el espermio, el proceso meiótico se reanuda y culmina con la formación del cigoto. Mientras las divisiones meióticas toman lugar, la cabeza del espermio penetra el ovocito y el pronúcleo masculino migra para unirse al pronúcleo femenino en el plano metafásico. En el caso de la mayoría de los bivalvos (incluyendo los pectínidos), que liberan sus ovocitos directamente al mar, los cromosomas no están contraídos y contienen dentro de la membrana nuclear la vesícula germinal. El contacto con el agua de mar determina la ruptura de la vesícula, haciendo

que con los cromosomas pasen rápidamente por los últimos sub estadios de la profase I, alcanzando la metafase I.

CAMBIOS CROMOSÓMICOS

En ocasiones, ocurren anormalidades tanto en la mitosis como en la meiosis y se producen células u organismos con cromosomas de más o de menos (aneuploides) que el número diploide. Esto se traduce, muchas veces, en anomalías funcionales que son la causa de la gran variación en tamaño que presentan, por ejemplo, las ostras juveniles de *Crassostrea gigas*. Thiriot-Qhiévreaux *et al.* (1992) observaron que el tamaño en esta especie estaba relacionado con la pérdida de cromosomas: los individuos de mayor talla tenían su complemento cromosómico completo ($2n = 20$). La talla disminuía a medida que la pérdida de cromosomas era mayor.

Algunas especies de organismos, tienen más de dos conjuntos de cromosomas: los triploides (3N), los tetraploides (4N), los pentaploides (5N), etc. A efecto del presente libro, se hace énfasis en la descripción de los triploides y tetraploides. Así mismo se consideran los organismos androgenéticos y ginogenéticos en este capítulo, en vista de que son productos de la manipulación cromosómica.

En relación a los triploides, se han encontrado algunos en poblaciones naturales de peces, entre ellos el ciprínido

Hesperoleucus symmetricus, los poecílidos del género *Poecilopsis* y la especie *Poecilia formosa*, en especies de Charácidos *Astyanax schubarti*, *A. scabripinnis* y *Curimata modesta* y el silúrido *Rhamdia queelen* (Pérez 1996; Coles *et al.* 2006; Tsuda *et al.* 2010).

Tsuda *et al.*(2010) señalan que la triploidía, es frecuente en peces neotropicales en aproximadamente 16 especies dentro de diferentes familias, registrándose la mayor frecuencia en las del género *Astyanax*.

Los casos de tetraploides en peces, son más comunes, por ejemplo en los salmónidos y catóstomidos, esta duplicación de 2N a 4N se considera que ha sido una importante fuerza evolutiva (Lampert *et al.* 2008). Sin embargo, a pesar de que estos peces son tetraploides, se comportan como diploides y se les considera diploides funcionales.

En moluscos, son muy escasos los ejemplos de triploidía en ambientes naturales, uno de los pocos casos conocidos, es el presentado en almejas del género *Laseae* (Pérez 1996).

TECNICAS BÁSICAS PARA LA OBTENCIÓN DE TRIPLOIDES

La obtención de triploides, se logra básicamente a través de cruzamiento de un tetraploide con un diploide o mediante la supresión en el ovocito de una de las divisiones meióticas por ruptura del huso acromático.

En el primer caso, es importante destacar que los tetraploides se pueden obtener por choques de presión aplicados al inicio de la primera división celular del embrión. Posteriormente, es posible cruzarlos con diploides y producir una F1 100% triploide; que se conocen como "triploides interploides", para diferenciarlos por los producidos por choques sobre los ovocitos.

En el segundo caso, la supresión en el ovocito de una de las divisiones meióticas se logra mediante la aplicación de choques térmicos o de presión, o por el empleo de algunos compuestos químicos. Gomelsky (2003); Díaz & Neira (2005) y Hammed *et al.* (2010) consideran que en general, los métodos experimentales utilizados para la obtención de poliploides, corresponden a:

a. **Métodos físicos:** choques térmicos de calor o frío y choques de presión.

b. **Métodos químicos:** exposición a citocalasina B, colchicina o 6-dimetilaminopurina.

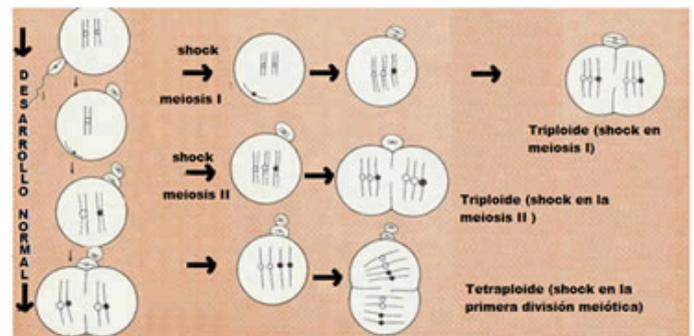


Figura 4. c. Representación diagramática de la obtención de triploides y tetraploides (tomado de Pérez & Beaumont, 1990).

OBTENCIÓN DE POLIPLOIDES POR MÉTODOS FÍSICOS

a. **Choques de temperatura.** Generalmente se emplean cuando se tratan grandes volúmenes de ovocitos y pueden ser de temperaturas altas, de 25 a 38°C o bajas, de 0 a 5 °C, dependiendo de la especie. En general la variación es de unos 5 °C por encima o por debajo de la temperatura a la cual ocurre normalmente el desarrollo. Estas técnicas no son las más adecuadas en las especies que liberan un bajo número de óvulos en cada desove, debido a la alta tasa de mortalidad producto de estos tratamientos. El choque de temperatura no permite la formación de los microfilamentos y microtúbulos, deteniendo el movimiento de los cromosomas así como la división celular. Presenta la ventaja de poder aplicarse a gran escala y no ser tóxico, su

éxito depende del momento justo de aplicación durante la meiosis I o II (Puente-Carreón 2004).

Capozza-Tebaldi & Amaral-Junior (2009) obtuvieron tilapias tetraploides de *O. niloticus* con el uso de choques térmicos, para ser empleadas en el cruce con machos diploides con el fin de obtener líneas estériles de tilapias triploides. El tratamiento ideal fue la aplicación del choque térmico 65 minutos después de la fertilización y de dos minutos de duración con 100% de tetraploides en todos los tratamientos aplicados. Kalbassi *et al.* (2009) reportaron óptimos resultados de las temperaturas aplicadas para la inducción de poliploides en diferentes especies comerciales de salmones, entre ellas la trucha marrón *Salmo trutta*, el salmón del Atlántico *Salmo salar*, el salmón rosado *Oncorhynchus gorbuscha* y la trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss*. De la misma manera, señalaron la obtención de triploides en salmón Caspian (*Salmo trutta caspius*) por choques de temperaturas cuyos óptimos oscilaron entre 26, 28 y 30°C en tiempos de 5, 10, 20 y 40 minutos después de la fertilización.

Hammed *et al.* (2010) trabajando con el pez gato *Clarias gariepinus*, obtuvieron sus mejores resultados con tiempos de exposición de 25 minutos a 0°C luego de fertilizados los huevos, con un 50% de sobrevivencia.

En moluscos, Yang & Guo (2006) lograron obtener poliploides en la especie *Mulinia lateralis* por choque de temperaturas durante la meiosis I y meiosis II, considerándolo a la vez un método efectivo de aplicar para

la obtención de poliploides en otras especies de moluscos. Prins (2011) señaló la aplicación reciente de esta metodología en especies de abalones (*Haliotis diversicolor*, *H. discus hannai* y *H. midae*) que muestran que el tratamiento logró una alta proporción de triploides.

Almeida-Aloise *et al.* (2011) obtuvieron poliploides en el camarón blanco *Litopenaeus vannamei* aplicando a los huevos fertilizados choques fríos (10°C) y calientes (38°C) a diferentes intervalos de tiempo, siendo los mas efectivos los choques fríos.

b. Choques de presión. La aplicación de presión elevada, entre 7.000 a 10.000 psi (presión por pulgada cuadrada), también permite producir triploides y tetraploides (Chourrout 1984). En este caso, después de 4 a 8 minutos de fertilizados, unos 250 - 500 ovocitos son colocados en un cilindro lleno de agua, cerrándolo con un pistón. Mediante una prensa hidráulica se eleva la presión rápidamente alcanzando la deseada en pocos segundos; a esto sigue una descompresión inmediata. El choque de presión disuelve las fibras del huso que separa a los cromosomas dentro de las células, así como los filamentos de actina evitando la citocinesis. El inconveniente con esta metodología, es el bajo número de ovocitos que se pueden tratar (Puente-Carreón 2004).

Hussain *et al.* (1991) evaluaron los tratamientos combinados de temperatura y presión para provocar triploidía en ovocitos recién fertilizados de la tilapia del Nilo, *Oreochromis niloticus*, encontrando que la temperatura alta

óptima es de 41°C, por 3,5 min aplicados a los 5 min después de la fertilización (d.f.); la baja óptima de 9 °C de 30 min de duración aplicada 7 min d.f. Para presión hallaron el óptimo en 8.000 psi durante 2 min aplicado a los 9 min d.f. Los mejores rendimientos, se obtuvieron con los tratamientos de presión, seguidos por los de temperaturas altas y por último los de temperaturas bajas.

Kozfkay *et al.* 2005 obtuvieron organismos triploides en la trucha en *Salvelinus namaycush*, con la aplicación de diferentes tratamientos de presión, entre los cuales no se obtuvieron diferencias significativas.

En otro grupo de organismos, como los moluscos, se ha reportado que esta metodología aplicada por primera vez al abalon *Haliotis midae*, evidenció niveles de triploidía efectivos en un rango de 95 a 100% (Prins 2011).

OBTENCIÓN DE POLIPLÓIDES POR MÉTODOS QUÍMICOS

Entre los compuestos químicos mayormente empleados para la obtención de triploides se pueden mencionar: óxido nítrico, cafeína (generalmente en combinación con calor), colchicina y especialmente la citocalasina B. Este último compuesto, inhibe la formación de los microfilamentos de las células, previniendo así la formación de los cuerpos polares, pero no impide la replicación de los cromosomas (Pérez, 1996a). Se emplea una solución de 0,5 a 1,0 mg citocalasina B disuelta en 1

ml de DMSO (dimetilsulfóxido) que a su vez se diluye en 1000 ml de agua de mar. Los ovocitos se sumergen en esta solución dentro de los primeros 15 minutos después de la fertilización para detener la meiosis I o de 15 a 40 minutos para la meiosis II. Estos tiempos varían según la especie y los datos señalados corresponden a *Euvola ziczac* (Ramírez & Pérez, 1993; Pérez, 1996a). En la solución de citocalasina-DMSO, los ovocitos se mantienen de 10 a 15 min y se pasan a otro envase que contiene solamente 0,01% de DMSO en agua de mar, para eliminar el resto de la citocalasina y permitir que continúe la meiosis II o las divisiones mitóticas del cigoto, según sea el caso. Finalmente, los ovocitos se colocan en agua de mar. Maldonado *et al.* (2003) obtuvieron buenos resultados empleando esta metodología en la almeja cantarina *Argopecten ventricosus*. En el mejillón, *Mytilus galloprovincialis*, se observó que la mayor producción de triploides (86% en promedio) se obtuvo con citocalasina B, luego la combinación calor-cafeína, calor solamente (ambas con un 81%), calcio-cafeína (73%), cafeína (71%), siendo el calcio solo el menos eficiente (47-75%)(Scarpa *et al.* 1994). Al comparar la efectividad de citocalasina B, en combinación con choques térmicos y de presión, Beaumont & Fairbrothers (1991) señalaron que el primero provoca mayores porcentajes de triploides que los otros tratamientos, pero causa mayores porcentajes de anomalías y de mortalidad durante el desarrollo temprano.

La Dimetilaminopurina (6-DMAP) actúa inhibiendo la rotación del huso y la expulsión del segundo cuerpo polar.

Tiene la ventaja de no ser carcinogénico y que se puede disolver en el agua de mar. Se probó la efectividad de este compuesto en especies como *Crassostrea gigas*, *Placopecten magellanicus* y *Mytilus edulis* y se obtuvo una efectividad entre 90 y 95% (Desrosiers *et al.* 1993; Puente-Carreón 2004).

DETERMINACIÓN DE LA POLIPLOIDIA

Determinar el porcentaje de triploides del lote que se está comprando o cultivando, sean cigotos, larvas, alevines, es de gran importancia para los acuicultores. Las diversas aproximaciones a esta determinación se dan a través de:

- a. Recuento del número de cromosomas, el cual es un proceso largo y laborioso, especialmente cuando se deben contar en muchos individuos. Por otra parte, muchas veces es preciso matar al organismo. El conteo puede realizarse en diferentes estadios del desarrollo y envuelve las técnicas comunes de tratamientos con colchicina, fijación, tinción y observación al microscopio.
- b. Recuento del número de nucleolos por núcleo, empleando la técnica de impregnación argéntica de Howel & Black (1980) que en especies con un único locus organizador del nucleolo (NOR) tiene fácil interpretación (Fig.4.d).

c. Caracterización hematológica y tamaño de los núcleos celulares (Fig. 4.e). Los núcleos de las células sanguíneas en organismos triploides son más grandes que en los diploides. El mayor tamaño de los glóbulos rojos y la forma alargada de su núcleo así como parámetros sanguíneos han permitido diferenciarlos de los diploides (Kalbassi *et al.* 2009). Otras de las especies en las que se han logrado diferenciar triploides de diploides a través de caracterización hematológica y citológica se encuentra la trucha *Salvelinus fontinalis* (Woznicki & Kuzminski 2002), *Misgurnus anguillicaudatus* (Gao *et al.* 2007) y el esturión *Ascipenser baeri* (Wlasow & Fopp-Bayat 2011).

d. El número de cuerpos polares es una aproximación usada en las primeras etapas del desarrollo, generalmente hasta el estadio de 8 células; si la meiosis se ha interrumpido en meiosis I (moluscos y crustáceos) no estará presente el primer corpúsculo polar; si la interrupción ha sido en la meiosis II (peces, moluscos y crustáceos), no será visible el segundo corpúsculo polar. Este método es de gran simplicidad y utilidad, pero solamente para los primeros estadios del desarrollo.

e. Electroforesis de proteínas. Utilizando la electroforesis de proteínas es posible, en algunas ocasiones, diferenciar diploides de triploides. En

los teleósteos *Poecilia formosa*, *Pagnus major* y en el molusco *Mya arenaria*, se ha usado exitosamente este método, para el cual es vital que exista variabilidad genética, que permita detectar la expresión diferencial de los modelos de isozimas en los heterocigotos (Pérez 1996).

f. Citometría de flujo. Es una técnica de análisis de las características de dispersión de luz y fluorescencia que poseen las células que se encuentran en suspensión en un fluido a medida que se les hace pasar, a través un rayo de luz. La citometría de flujo en combinación con colorantes específicos puede medir numerosas propiedades de las células, incluyendo el contenido de ADN del núcleo, la expresión de un antígeno de superficie, la actividad de enzimas intracelulares y el contenido de ARN. Este último indica el estado de ploidía de la célula, basado en la suposición de que el nivel de fluorescencia es proporcional a la ploidía. El uso de citometría de flujo para la evaluación de ploidía en moluscos bivalvos es método muy popular, un método rápido y no destructivo usado en tejidos como hemolinfa, manto, branquias, larvas etc. Entre los moluscos a los cuales se les ha aplicado esta metodología, destacan los triploides inducidos de abalones de las especies *Haliotis rubra* (Liu, et al., 2004; Liu, et al., 2009), *H. rufescens* (Maldonado, et al., 2001), *H. asinina* (Norris & Preston 2003), *H. midae* (Prins, 2011), *H. discus*

(Okumura et al., 2007) así como en ostras (Allen 1988). En peces, Sousa-Santos et al. (2007) identificaron con esta metodología un caso poco común, machos triploides fértiles en el ciprinido *Squalius alburnoides* perteneciente a un complejo de híbridos.

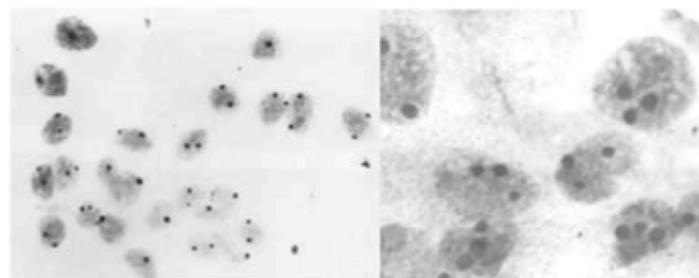


Figura 4. d. Núcleos interfásicos diploides (a) y triploides (b) teñidos con nitrato de plata, en *Rhombia quelen* (Vozzi et al., 2003).

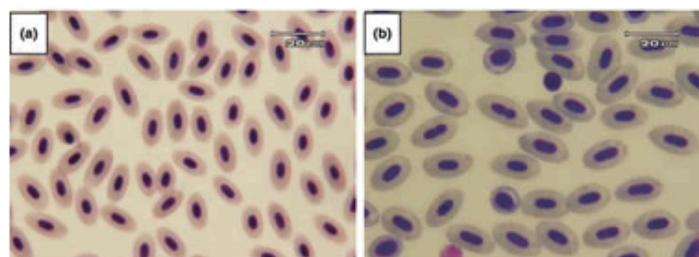


Figura 4. e. Eritrocitos diploides (a) y triploides (b) en el salmón Caspian (*Salmo trutta caspius*). Barra = 20 μ m. (Kalbassi et al. 2009).

No existe un método simple, exacto y de bajo riesgo para la cuantificación de tasas de poliploidización. Hartel *et al.* (2005) presentaron un método que combina microscopía de campo claro convencional (con marcación GIEMSA) con el análisis multiparamétrico de imágenes, denominándolo como microscopía morfológica cuantitativa (QMM). Se utilizó citometría de flujo como un método de referencia para determinar el contenido de ADN en eritrocitos diploides y triploides extraídos de truchas arcoíris inmaduras (*Oncorhynchus mykiss*). Adicionalmente, se aplicó microscopía de fluorescencia cuantitativa (QFM) usando marcadores de ADN. Estos autores señalan que QMM posee una capacidad discriminante comparable o incluso superior a la citometría de flujo.

LOS TRIPLOIDES Y LA ACUICULTURA

De los poliploides, los más empleados en la acuicultura son los triploides. Las especies de peces en las cuales es comercialmente empleada la triploidización, de acuerdo a Piferrer *et al.* 2009, incluyen la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) en Estados Unidos, Canadá, Francia, Japón, Gran Bretaña, Corea, Irán, Turquía, Polonia y Chile; la trucha marrón (*Salmo trutta*) en Gran Bretaña y Francia; la trucha marrón (*Salvelinus fontinalis*) en Canadá y Francia; el salmón del Atlántico (*Salmo salar*) en Chile y Canadá; el Artico charr (*Salvelinus alpinus*) en Francia, Canadá, Islandia y Austria; el salmón chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) en Canadá; el salmón amago (*O. rhodurus*), salmón masu (*O. masou*), salmón coho (*O.*

kisutch), el ayu (*Plecoglossus altivelis*), el hirame (*Paralichthys olivaceus*) y el ciprínido loach (*Eriocheir sinensis*), en Japón y la carpa grass en los Estados Unidos (*Ctenopharyngodon idella*).

La FAO (2010) considera que en los países en vía de desarrollo, la implementación práctica de técnicas de triploidía en la producción comercial de peces, no ha sido muy exitosa. La mayor parte de la investigación en la aplicación de esta biotecnología ha sido experimental. Haffray *et al.* (2003) demostraron que los peces triploides presentan el mismo crecimiento que los diploides, sin diferencias en supervivencia, rendimiento y parámetros de calidad.

Sin embargo, un ejemplo emblemático que ilustra las ventajas que presentan los individuos triploides para la industria de la acuicultura, es el cultivo de la trucha arcoíris, tanto en Europa como en los Estados Unidos. Durante la época reproductiva, las truchas, declinan no sólo en su crecimiento, sino también en la calidad de su carne. Esto ocurre especialmente en los machos, que generalmente maduran un año antes que las hembras. Los machos adquieren una apariencia desagradable y una actitud agresiva, producto de lo cual sufren heridas, frecuentemente infectadas por hongos y bacterias. Además, en algunas líneas, los machos mueren al final de la época reproductiva. Este problema ha sido en parte solucionado, eliminando los machos bien sea mediante el empleo de hormonas (como se verá en el capítulo referente a organismos monosexuales) , o mediante la triploidía como el método más simple,

preferido y confiable de producir truchas estériles, en comparación con el uso de esteroides (Coman *et al.* 2008).

En moluscos, desde 1980 se ha prohibido la utilización de triploides en variadas especies, entre ellas mejillones, almejas, vieiras y abalones. Los triploides más comerciales, son los de la ostra del Pacífico (*Crassostrea gigas*), a pesar de que vieiras, almejas y mejillones se han producido a una escala semicomercial. Gracias a un importante programa de investigación en el campo de la poliploidía, en la ostra del Pacífico en las zonas costeras de China, se ha desarrollado una importante industria con ostras triploides, que exhiben mayor crecimiento y calidad de la carne que los diploides (Rasmussen & Morrissey 2007; Prins 2011). Otras especies de triploides usadas con aplicaciones comerciales son *Tapes philippinarum*, *Mytilus edulis*, *Argopecten irradians* y *Chlamys farreri* (Prins 2011).

En el campo de los crustáceos se ha avanzado en la investigación con éxito en la producción de triploides estériles todas hembras, con el objetivo de controlar en las granjas de cultivo la reproducción no deseada, con crecimiento similar a los diploides (Rasmussen & Morrissey 2007).

La inducción a la triploidía en este tipo de organismos produce un retardo en el desarrollo gonadal resultando en la esterilidad de especies de cultivo como *Fenneropenaeus chinensis* y *Marsupenaeus japonicus* (Wood *et al.* 2011).

Es importante destacar que durante los cultivos, una

pequeña proporción de triploides, aparentemente, pierde un conjunto de cromosomas "revertiendo" a diploides, disminuyéndose las ventajas de su cultivo, ya que se restablece la posibilidad de reproducción. Esta reversión ha sido estudiada en *Crassostrea gigas* y *C. ariakensis*. (Zhang *et al.* 2010). Por otra parte de acuerdo a Rasmussen & Morrissey (2007) algunos triploides son capaces de producir ovocitos y espermios. Además, la inducción a la triploidía puede reducir la supervivencia.

Entre los efectos de la triploidía que se han observado en los diferentes organismos de cultivo, principalmente peces, se encuentran:

1. **Cambio en el desarrollo gonadal.** Los machos triploides de la trucha arcoíris, desarrollan los testículos y alcanzan un tamaño similar al de los diploides, sin embargo, son casi estériles, el esperma no es capaz de fertilizar o se produce en muy poca cantidad; aún cuando, se secretan las hormonas esteroides y producen los efectos indeseables de la maduración sexual. Por otra parte, en las hembras triploides el desarrollo de los ovarios está suprimido y se pueden observar como estructuras muy pequeñas, la secreción hormonal no se produce. Es así, que la triploidía es beneficiosa sólo para las hembras en esta especie y lo recomendable es producirlas exclusivamente.

2. **Aumento del crecimiento.** Es preciso señalar que los triploides crecen más rápidamente que los diploides, solamente durante la época reproductiva. Las ventajas de

los triploides para la acuicultura se deben básicamente a su esterilidad, no gastan energía en la formación de los gametos y en general, alcanzan mayores tamaños y a veces viven más tiempo. Sin embargo, a menudo los triploides juveniles exhiben un crecimiento inferior que los diploides lo que puede deberse a que la inducción de la triploidía en los ovocitos puede tener efectos dañinos sobre el embrión y el cambio en la relación núcleo citoplasma.

Maldonado *et al.* (2003) evaluaron los triploides de la almeja catarina *Argopecten ventricosus* y al compararlos con los diploides encontraron que los primeros presentaron un músculo aductor más grande que los diploides, siendo esta la característica comercial de la especie. Prins (2011) reporta también una tasa de crecimiento superior en especies de abalones triploides (*Haliotis discus hannai*, *H. midae* y *H. rubra*) con respecto a los diploides.

En un estudio en el que fue evaluado el efecto de inducción de triploidia por choques de temperatura (choque térmico a 41 ° C por 5 min) y descarga fría a 9 ° C por 30 min de duración, comenzando 4 min después de la fertilización sobre los parámetros de crecimiento y la proporción de sexos en progenies de tres poblaciones de cría de tilapia roja (*Oreochromis mossambicus* (Peters 1852) × *Oreochromis niloticus* (Linnaeus 1758)) bajo diferentes condiciones de cultivo en tanques durante 120 días, Pradeep *et al.* (2012) encontraron una diferencia significativa en el rendimiento total en favor de los grupos de triploides inducidos por shock térmico. En ese estudio, el peso corporal promedio total del pez macho, en todos los

grupos experimentales, fue significativamente mayor que el de las hembras, durante el periodo de cultivo el desarrollo gonadal en ambos sexos triploides estuvo substancialmente suprimido en comparación con los diploides (fig. 4f).

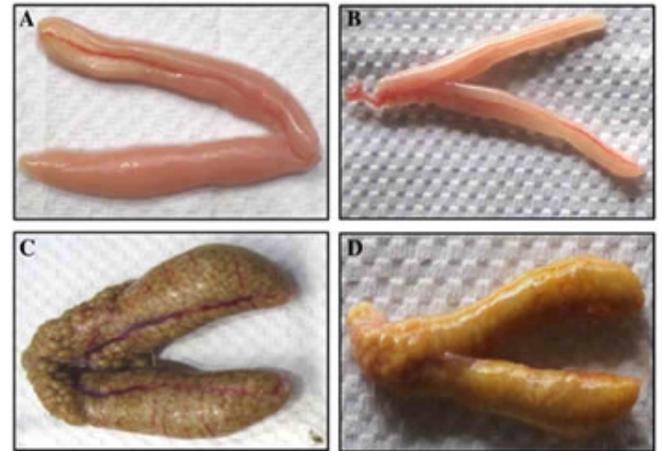


Figura 4 f.- Aspecto macroscópico de las gónadas diploides y triploides en la tilapia roja en 120 días [(A) testículos diploides, (B) testículos triploides, (C) ovario diploide y (D) ovario triploide]. (Padmaja *et al.*, 2012).

3. Aumento de la variabilidad genética. Un factor que colabora posiblemente con el mayor crecimiento de los triploides, es la heterocigosidad. Stanley *et al.* (1981), encontraron que los triploides de *Crassostrea virginica* originados por bloqueo de la meiosis I, crecieron más que los originados al bloquear la meiosis II. Es necesario

destacar que en la primera división meiotica se separan los pares homólogos lo que pudiera determinar pérdida de variabilidad. Supongamos que tenemos dos alelos: a y b, al incluirse en el cuerpo polar cualquiera de los dos cromosomas (duplicados) se eliminará el alelo a o el b. Si se bloquea la meiosis I se conservaría la variabilidad. Por el contrario, al bloquear la meiosis II, ya la variabilidad (el alelo a o el b) se habrá perdido y el óvulo sería homocigoto para a o b. Al unirse con el espermio que lleva por ejemplo un tercer alelo c, tendríamos un cigoto triploide abc si se bloquea la meiosis I, o un cigoto aac o bbc en caso de bloquear la meiosis II. Se ha encontrado que en la ostra americana *Crassostrea virginica* los triploides obtenidos por bloqueo de la meiosis I, de dos años, y cultivados en ambientes naturales, crecieron significativamente más que las ostras triploides obtenidas por bloqueo de la meiosis II y los diploides. Stanley *et al.* (1981) mediante el estudio de seis loci encontraron que el porcentaje de loci heterocigotos fue de 38% en triploides por bloqueo de meiosis I, y de 20% tanto en los triploides por meiosis II como en los controles diploides.

4. Cambio en la textura de la carne. Los triploides no pierden la textura y el sabor de su carne, esto representa una ventaja también determinada por la esterilidad. Allen (1988) señaló que los tejidos de la ostra del Pacífico, *Crassostrea gigas* que se cultiva en la costa oeste de los Estados Unidos, pierden textura y buen sabor durante la época reproductiva al usar el glicógeno (que le da el sabor agradable) como fuente de energía para la reproducción. Durante el verano, es un producto de difícil

comercialización. Además, por ser una especie exótica (originaria del Japón), no está bien adaptada a las áreas de cultivo de esa zona, donde las aguas son más frías que en su región de origen. Por este motivo, algunas maduran sexualmente, pero no liberan sus gametos, lo cual significa una pérdida adicional. En un experimento realizado con un panel de consumidores, se pudo comprobar la preferencia de ostras triploides sobre las diploides, en cuanto al sabor y a la textura (Allen & Downing 1991).

5. Aumento de la viabilidad. En el caso de muchos híbridos de salmónidos, éstos no son viables en el estado diploide, pero lo son como triploide. También se puede señalar a los híbridos entre hembras *Oreochromis niloticus* y machos de *Tilapia rendalli*, en los que se presenta una mortalidad de casi el 100%; pero que son viables si se induce la triploidía (Pérez 1996).

Son muchos los aspectos positivos que envuelven la producción de organismos acuáticos triploides. Sin embargo, es importante señalar que la incidencia de deformidades es un aspecto importante en relación al futuro de los triploides en acuicultura, lo que puede determinar la no aceptación de estos organismos en el mercado. La mayoría de los estudios sugieren que la manipulación física o química es la principal causa de la alta incidencia o severidad de deformidades y la baja sobrevivencia larval observada en los triploides (Piferrer *et al.* 2009).

Por otra parte, los organismos triploides revisten un alto potencial en el área de investigación, éstos sirven de base

en estudios fisiológicos y endocrinológicos sobre las consecuencias que acarrea el poseer un conjunto adicional de cromosomas, especialmente en la formación de los gametos, convirtiéndose también en una herramienta que impide la propagación de especies exóticas, ya que al obtener triploides en especies de esta condición, o potencialmente invasores, la esterilidad evitaría su propagación en el medio natural.

ORGANISMOS TETRAPLOIDES

Los tetraploides poseen una viabilidad y crecimiento reducidos, pero son fértiles por lo menos parcialmente, como en el caso del bagre de canal, *Ictalurus punctatus* (Bidwell *et al.* 1985). También, se ha intentado obtener tetraploides en las tilapias, *Oreochromis niloticus* y *O. mossambicus* y se han producido embriones tetraploides que no se han desarrollado (Myers 1986). En la perca amarilla (*Perca flavescens*), mediante choques de presión hidrostática se obtuvo tetraploides que fueron cultivados hasta la madurez sexual para evaluar su potencial como peces de cría (Pérez 1996).

Hershberger & Hostuttler (2007) obtuvieron tetraploides en la trucha *Oncorhynchus mykiss*, mediante choques de presión. Capozza-Tebaldi & Amaral-Junior (2009) pusieron a prueba la eficacia de la producción de tilapia tetraploides a través de la utilización de choques térmicos durante la primera división celular del embrión, para su posterior uso en la producción de lotes triploides de tilapia.

En cuanto a los intentos para obtener tetraploides en moluscos, hasta la década de los 90, estos no fueron exitosos, de acuerdo a Beaumont & Fairbrother (1991). McCombie *et al.* (2005) obtuvieron tetraploides en *C. gigas* usando citocalasina B pero en cruces entre diploide y tetraploides.

En crustáceos, la manipulación cromosómica es difícil. La mayoría de las especies importantes en acuicultura no liberan sus ovocitos al mar, sino que los incuban. Coman *et al.* (2008) utilizando choque químico produjeron organismos estériles en camarones de importancia comercial. Las diferentes técnicas han sido desarrolladas en varias especies de peneidos *Penaeus chinensis*, *P. vannamei*, *P. japonicus*. Asimismo obtuvieron triploides en cuatro familias de camarones utilizando un choque químico con 6-dimetilaminopurina (6-DMAP) y evitando la extrusión del II cuerpo polar.

LA GINOGENÉISIS Y LA ANDROGENÉISIS

En la ginogénesis se producen individuos cuyo material genético procede sólo del progenitor hembra. Consiste en lograr el desarrollo del embrión utilizando ovocitos fertilizados con espermatozoides a los que se les ha inactivado el material genético. La producción de ginogénicos requiere combinar la inactivación del semen seguido de la diploidización del complemento cromosómico materno.

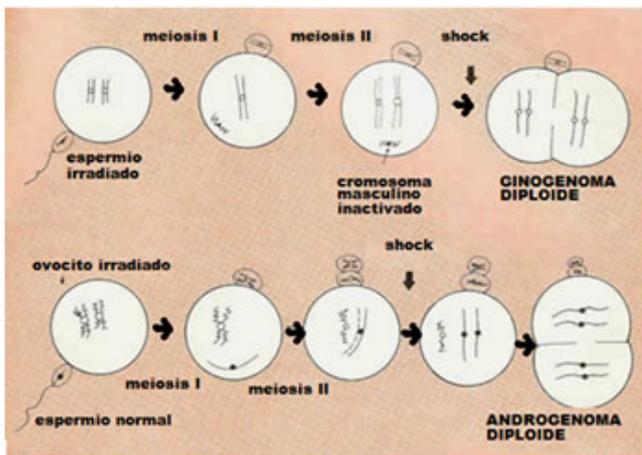


Figura 4g.- Representación diagramática de la ginogénesis y la androgénesis (tomado de Pérez & Beaumont, 1990)

En la ginogénesis artificial, los ovocitos son fecundados por espermios expuestos a rayos ultravioletas para destruir el material genético, aún cuando son capaces de fertilizar. Los cigotos resultantes son haploides (N), se desarrollan en forma anormal y mueren muy rápido. Pero, si estos cigotos haploides son sometidos a choques de temperatura o de presión, inmediatamente después de la activación o durante la primera división del cigoto, estos resultarán diploides. Si el choque ocurre inmediatamente después de la activación el primer o segundo corpúsculo polar es retenido y se fusiona con el núcleo del ovocito. Si ocurre durante la primera división mitótica, se fusionarán dos núcleos

haploides para formar uno diploide. En ambos los dos conjuntos de cromosomas provienen de la madre (Fig. 4g).

De acuerdo a la revisión hecha por Díaz & Neira (2005), la ginogénesis es la forma natural de reproducción de unas pocas especies ícticas, como *Carassius aureatus gibelius* y *Poecilia formosa*, siendo esta última la primera especie ginogenética natural descrita. Se ha observado ginogénesis también en especies de peces de otras familias tales como: peces planos (Pleuronectidae), esturiones (Acipenseridae), truchas (Salmonidae), carpas (Cyprinidae), pez gato (Siluridae) y carásidos (Characidae) (Díaz & Neira 2005).

En vista de que todos los individuos provienen de una sola hembra, el nivel de consanguinidad debería ser elevado y esto en verdad ocurre si se interrumpe la meiosis I (en moluscos por ejemplo, pero difícilmente en peces). Si la interrupción es en meiosis II, como se realiza comúnmente en peces, la consanguinidad, es aproximadamente similar a una generación de cruces hermano-hermana (Dunham 1990). Por el contrario, los ginogenéticos obtenidos al bloquear la primera división mitótica, son totalmente homocigotos; son productos de la replicación de un solo conjunto de cromosomas.

Se han obtenido individuos ginogenéticos inhibiendo la primera división mitótica mediante choques de temperatura en la carpa *Cyprinus carpio*. Por tratamientos de presión y de choques de frío, se obtuvieron individuos ginogenéticos del pez "ayu" (*Plecoglossus altivelis*) de gran valor en las

pesquerías de agua dulce del Japón (Pérez 1996).

Kucharczyk *et al.* (2007) indujeron el desarrollo de organismos ginogenéticos en el pez *Leuciscus leuciscus*, utilizando esperma de otra especie (*Leuciscus idus*), los ovocitos del primero fueron fertilizados con ovocitos genéticamente inactivados del segundo, con luz UV y reteniendo el segundo cuerpo polar. Luo *et al.* (2011) obtuvieron una producción en masa de una población de carpas todas hembras y estériles con el uso de la ginogenesis combinada con la reversión sexual y la hibridación diploides-tetraploides, en *Carassius auratus* y *Cyprinus carpio*.

Hasta el año 2005 la ginogenesis no se había logrado aún en moluscos (Díaz & Neira 2005) posteriormente Li (2009) reporta la producción de ginogenéticos diploides producidos por inhibición de la formación del II cuerpo polar en la ostra *Crassostrea gigas*, obteniendo altos niveles de heterocigosidad y sugiriendo que la ginogénesis meiótica es ideal para el establecimiento de líneas haploides.

La obtención de ginogenéticos, tiene importancia tanto para el mejoramiento de la producción en peces cultivados como por representar un material biológico de importancia. El análisis de la proporción de sexos en este tipo de organismos ha aportado información relevante en relación con la elucidación de los mecanismos de determinación sexual en diferentes especies. Por otro lado, la posibilidad de obtener ginogenéticos haploides o líneas isogénicas de origen femenino (o masculino androgénesis), facilita

enormemente el trabajo en la construcción de mapas genéticos y el análisis detallado de regiones específicas del genoma (Martínez 2005; Luo *et al.* 2011). En producción, los ginogenéticos han sido utilizados para la obtención inmediata, o a través de neomachos, de poblaciones todo-hembras así como para el desarrollo rápido de líneas de elevada consanguinidad para la explotación del componente dominante de la varianza en caracteres productivos. Los ginogenéticos haploides están siendo utilizados también para la construcción de mapas con marcadores de microsatélite (Martínez 2005).

En la Androgénesis el material genético que se destruye es el del ovocito, originándose organismos cuyo genoma proviene exclusivamente del padre. La inactivación del ovocito se realiza con radiación gamma; posteriormente se lleva a cabo un bloqueo de la primera división mitótica con alta presión. En estos casos, se obtiene homocigosidad total y herencia exclusivamente paterna.

La androgénesis ha sido identificada como la principal forma de reproducción de unas pocas especies, entre ellas algunas plantas, hormigas y en cuatro especies de almejas asiáticas del género *Corbicula*: *C. leana*, *C. fluminea*, *C. australis* y *C. fluminalis* (Hedtke *et al.* 2008; Pigneur *et al.*, 2012). El género *Corbicula* comprende especies de reproducción sexual con sexos separados, como también hermafroditas y al menos algunas de ellas se reproducen por androgénesis. Después de la fertilización por un espermio biflagelado, que contiene un complemento completo de cromosomas, el ovocito elimina el genoma

nuclear materno completo, pero retiene las mitocondrias (Hedtke *et al.* 2008).

Existe una importancia adicional de la androgénesis en los llamados bancos de genes de organismos acuáticos, como una forma de preservar recursos genéticos en peligro. Por lo pronto en peces, se ha logrado la criopreservación de espermios. La androgénesis surge como una alentadora alternativa para conservar organismos mediante sus espermios (Bhise & Khan 2002).

Las implicaciones que la ginogénesis y la androgénesis tienen para la producción de poblaciones monosexuales, serán tratadas en un capítulo posterior.

Como conclusión, es indudable que la manipulación cromosómica surge como un área de investigación aplicada de gran importancia en los cultivos de peces, crustáceos y moluscos.

CAPÍTULO 5

EMPLEO DE ORGANISMOS ESTÉRILES O MONOSEXUALES

Otra alternativa para mejorar la productividad en cultivos de peces, consiste en la obtención de poblaciones monosexuales, es decir todos machos o todas hembras, según la conveniencia del piscicultor. En algunas especies, los acuicultores muestran preferencia por organismos de cultivo de un sexo en particular, debido a las ventajas que estos poseen. Por ejemplo, en la trucha arcoíris, (*Oncorhynchus mykiss*) y la carpa (*Ctenopharingodonidella*) las hembras crecen más que los machos. Mientras que en las tilapias (*Oreochromis sp*) y bagres de canal (*Ictalurus punctatus*) y en algunos crustáceos como *Macrobrachium rosenbergii* los machos crecen más que las hembras. Desafortunadamente, se ha encontrado que en este tipo de cultivo puros machos, con el aumento de la densidad se obtiene una elevada proporción de animales pequeños, mientras que los cultivos de puras hembras despliegan una respuesta moderada y uniforme al aumento de la densidad (Malecha 2012)

Por otra parte, es importante señalar que en algunos peces, como las tilapias, se produce una maduración temprana, generalmente perjudicial desde el punto de vista económico, ya que origina una sobrepoblación y una pérdida de la energía en la reproducción, lo que detiene el crecimiento. A medida que los organismos alcanzan la madurez sexual, la velocidad de crecimiento se reduce. El

tener poblaciones monosexuales o estériles, reduce este problema.

El crecimiento más acelerado de un sexo, presumiblemente depende de factores genéticos y hormonales. No obstante, la competencia, eliminación de un sexo y las diferencias de talla inicial no pueden ser descartadas. Naturalmente, muchas observaciones de crecimiento han sido hechas cuando ambos sexos se encuentran compitiendo en el mismo ambiente. Si la competencia es interrumpida o eliminada y los dos sexos se hacen crecer en ambientes separados el dimorfismo sexual para la tasa de crecimiento podría disminuir. Sin embargo, en *T. nilotica* que se han hecho crecer en ambientes comunes o por separado, se ha demostrado que las diferencias en el crecimiento son similares y que la competencia no tiene un efecto pronunciado. Los machos de *T. nilotica* crecen 2,5 veces más rápido que las hembras cuando están juntos y 2,2 veces cuando son separados de las hembras.

En el bagre un problema derivado de la diferencia en el crecimiento entre sexos, radica en que las hembras tardan más en alcanzar la talla comercial ocasionando un retraso en la cosecha, lo cual a su vez se traduce en pérdidas por cuanto debe gastarse más alimento y esfuerzo durante un tiempo mayor. Evidentemente, conviene más cultivar poblaciones de peces de un sólo sexo, en este caso solamente machos. Por esta razón, el conocimiento de la determinación genética del sexo en los peces, permite manipular a conveniencia la situación.

Antes de analizar en detalles las técnicas para producir poblaciones estériles y monosexuales, es necesario mencionar que en los organismos acuáticos, especialmente peces, por constituir el grupo evolutivo más primitivo entre los vertebrados, no es sorprendente encontrar una gran variedad de mecanismos de determinación sexual. Aunque son relativamente pocas las especies de peces para las cuales se conoce los métodos de determinación sexual, se han registrado nueve sistemas conocidos. El sexo está controlado por cromosomas sexuales en ocho de los nueve sistemas de determinación sexual cromosómica.

El sistema XY es el más común encontrado en peces, los machos son XY (sexo heterogamético) y las hembras XX (sexo homogamético). Las hembras producen huevos portadores de un sólo cromosoma X, mientras que los machos producen espermios que contienen un solo cromosoma X o un sólo cromosoma Y, por lo que es el macho el que determina el sexo de la descendencia. La mezcla al azar de los gametos origina hembras y machos en proporción 1:1. Se presenta en truchas, salmones algunas especies de tilapias (*O. mossambicus*, *O. niloticus*) y bagres de canal (Fig. 5a).

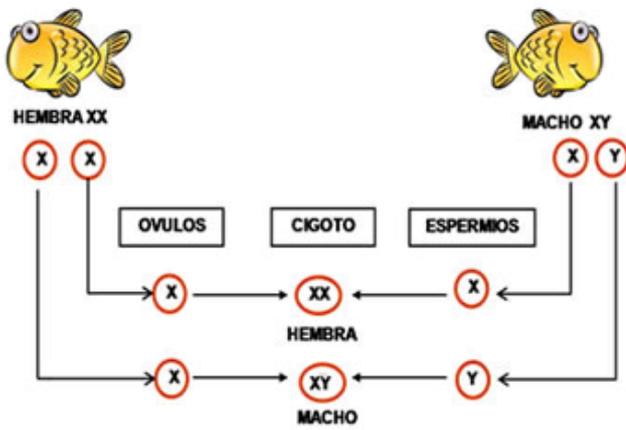


Figura 5. a. Mecanismo de determinación sexual XX-XY.

El sistema WZ es el opuesto al XY. En este caso, los machos son el sexo homogamético (ZZ) y las hembras el heterogamético (ZW). El macho produce gametos con un solo cromosoma Z y la hembra produce óvulos con un cromosoma Z o un cromosoma W. Consecuentemente, es la hembra la que determina el sexo de la progenie. Los otros sistemas que involucran cromosomas sexuales son variantes de estos dos sistemas. Cuatro de ellos involucran cromosomas sexuales múltiples y dos dependen de un solo cromosoma sexual. Lo presentan algunas especies de tilapia: *O. hornorum*, *O. aureus*, *O. macrochir*, *O. variabilis* también se ha encontrado en crustáceos, como el camarón del género *Macrobrachium* (Fig. 5b).

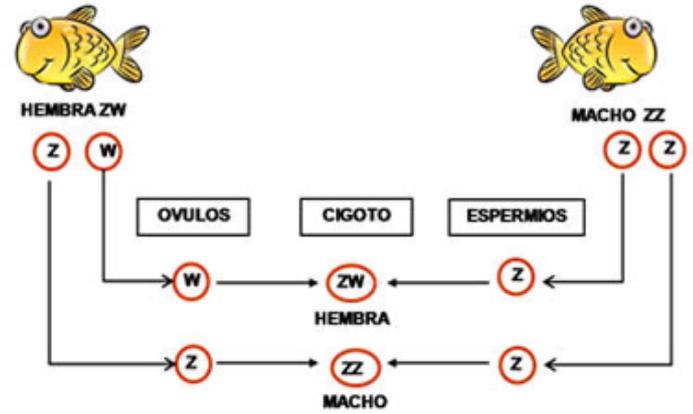


Figura 5. b. Mecanismo de determinación sexual ZZ-ZW.

El tercer sistema posee cromosomas X múltiples. Las hembras son $X_1X_1X_2X_2$ y los machos son X_1X_2Y . Las hembras producen óvulos portadores de un par de cromosomas X (X_1X_1 , X_2X_2 , X_1X_2). Los machos producen espermios con un cromosoma Y ó con el par de cromosomas X_1X_2 . En este sistema el macho determina el sexo de la progenie.

El cuarto sistema consiste de cromosomas W múltiples. Las hembras son ZW_1W_2 y los machos son ZZ. Los machos producen gametos portadores de sólo un cromosoma Z. Las hembras producen gametos con un solo cromosoma Z o con los dos cromosomas W (W_1W_2). Aquí es la hembra la que determina el sexo de la descendencia.

El quinto sistema posee cromosomas Y múltiples. Los machos son XY₁Y₂ y las hembras son XX. Las hembras producen gametos con un solo cromosoma X. Los machos producen gametos con un solo cromosoma Y o gametos con los dos cromosomas X₁ y X₂. En este caso es el macho el que determina el sexo de la progenie.

El sexto sistema depende de tres cromosomas sexuales WXY. La presencia de un cromosoma Y produce machos excepto cuando se encuentra en compañía de un cromosoma W. El cromosoma W es un cromosoma X modificado que bloquea la capacidad de determinación sexual del cromosoma Y. Consecuentemente, los individuos XY y los YY son machos, mientras que los individuos XX, WX y WY son hembras. En este sistema, ambos progenitores pueden determinar el sexo de la progenie dependiendo de su constitución genotípica.

Los sistemas 7 y 8 son aquellos en los que existe un sólo cromosoma sexual. En el Sistema XO (O es el símbolo para indicar ausencia de cromosoma), las hembras son XX y los machos XO. En el sistema ZO, los machos son ZZ mientras que las hembras son ZO. En estos sistemas el progenitor con un sólo cromosoma sexual es el que determina el sexo de la descendencia.

En el último sistema no se encuentran involucrados cromosomas sexuales. El sexo está determinado por genes autosomales. En este sistema, el sexo está controlado por uno o más genes de determinación sexual y el número total de alelos para machos o para hembras

determinan el sexo. En la siguiente tabla Va se presenta una lista de los sistemas de determinación sexual de las principales especies objeto de prácticas de acuicultura comercial.

Especie	Sistema de determinación sexual
Bagre de canal	XY
Trucha arcoiris	XY
Salmón chinook	XY
Salmón coho	XY
Carpa común	XY
Carpa herbívora	XY
Carpa plateada	XY
Tilapia nilotica	XY
Tilapia mossambica	XY
Tilapia aurea	WZ
Tilapia hornorum	WZ
Platyfish	WXY
Swordtail	Autosómico

TÉCNICAS DE PRODUCCIÓN DE POBLACIONES MONOSEXUALES y ESTÉRILES

Para la obtención de poblaciones estériles y monosexuales se han desarrollado las siguientes técnicas:

1.- La separación manual de los sexos, es una técnica muy simple pero laboriosa y no siempre segura.

Tiene además, una gran desventaja, es preciso cultivar los organismos hasta un tamaño lo suficientemente grande como para diferenciarlos sexualmente, con la consiguiente pérdida de alimento y esfuerzo (Pérez 1996).

2.- **La esterilización**, que impide la reproducción no deseada y elimina la posibilidad de que peces cultivados o especies exóticas y organismos transgénicos se establezcan en el medio natural y compitan con las poblaciones nativas (Pérez 1996). Con ésta técnica, además, se puede aumentar el crecimiento y cambiar la conducta de los organismos. La esterilización puede lograrse por cirugía, inmunología, radiación o mediante algunos compuestos químicos, también por hibridación y poliploidía, métodos que se analizan más adelante.

3.- **La hibridación**, es una técnica muy utilizada para la obtención de poblaciones estériles y poblaciones monosexuales. Esto, es debido a la existencia de mecanismos de determinación sexual diferentes en las dos especies que se hibridan. Los ejemplos mejor documentados se presentan en tilapias. La producción de híbridos "solo machos" en tilapias, se basa en la existencia de especies en este grupo de organismos que poseen el mecanismo de determinación sexual XX - XY y otras especies que poseen el mecanismo ZW - ZZ.

Para producir tilapias híbridas machos (Fig. 5c), se deben cruzar los dos sexos homogaméticos: hembras XX de una especie como por ejemplo *Oreochromis mossambicus* u *O. niloticus*, con machos ZZ de una

especie con determinación WZ - ZZ como *O. hornarum*; *O. aureus*, *O. variabilis* y *O. macrochir*.

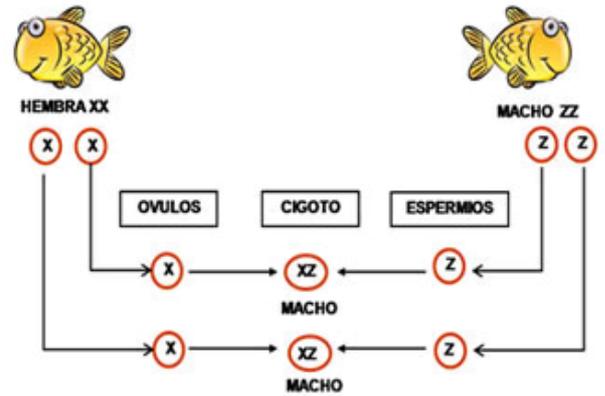


Figura 5 c. Obtención de líneas "solamente machos" por hibridación entre especies con diferente tipo de determinación sexual.

Aún cuando estos cruces producen progenie sólo de machos, en los cruces comerciales a gran escala, se producen algunas hembras híbridas, lo que permite la reproducción y la pérdida del esfuerzo en producir poblaciones monosexuales. Esto, puede deberse a una identificación errónea de las especies, lo cual es difícil en poblaciones juveniles, también puede deberse a que una o las dos especies empleadas para el cruce no sean puras y se hallen contaminadas con otras especies con diferente tipo de determinación sexual, lo cual es frecuente en estos cultivos. Otra causa puede ser la existencia de genes en los autosomas que influyen la determinación sexual y

que actúan como modificadores, disminuyendo la importancia de los cromosomas sexuales.

Para eliminar los problemas originados por la presencia de estos alelos en los autosomas, se usan programas de cruces selectivos para lo cual se deben emplear "stocks" no contaminados.

Cuando se realiza el cruce inverso: hembras heterogaméticas WZ por machos heterogaméticos XY se producen cuatro tipos con relación a los cromosomas sexuales XW, XZ, YW y YZ en iguales proporciones pero, el 75% de la progenie serán machos (Dunham 1990; Pérez 1996).

4.- La ginogénesis y la androgénesis, cuando el sistema de determinación sexual es XX - XY, si se utilizan las hembras homogaméticas (XX) se obtendrán poblaciones todas hembras ya que todos los ginogenéticos serán hembras. Esto se ha logrado en varias especies de peces tales como las carpas herbívora *Ctenopharyngodon idella*, la carpa plateada *Hypophthalmichthys molitrex*, bagres de canal *Ictalurus punctatus* y la trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss* (Gomelsky 2003). Esta técnica no es comercialmente útil debido a la baja supervivencia (generalmente menos del 1%) de los ovocitos tratados para producir ginogenéticos. Si se utiliza androgénesis en los machos XY se obtendrán hembras XX y machos YY. Estos organismos YY son también llamados supermachos, los cuales al cruzarlos con hembras normales producirán 100% machos XY. Esta aproximación es una efectiva manera de

producir poblaciones solo de machos en *Oreochromis niloticus*, *O. mossambicus* y bagres de canal (Pérez 1996). Cuando el mecanismo de determinación sexual es ZZ - ZW y utilizamos la hembra heterogaméticas (ZW) en una ginogénesis los descendientes serán ZZ y WW. Las llamadas superhembras (WW), al cruzarlas con machos normales producirán un 100% de hembras (ZW). Cuando utilizamos el sexo masculino (ZZ) en una androgénesis, los descendientes serán 100% machos ZZ (Pérez 1996).

5.- La poliploidia en acuicultura, es utilizada mayormente para la producción de triploides, organismos genéticamente estériles. La inducción de poliploidía, se ha aplicado a numerosas especies de peces, las cuales abarcan las familias Salmonidae, Characidae, Cyprinidae, Centrarchidae, Cichlidae, Pleuronectidae, con un claro predominio en la primera. Algunos trabajos recientes, que incluyen a la especie *Scophthalmus maximus*, analizan los efectos de la temperatura y la duración de los choques de frío en la supervivencia y en las tasas de triploidías, validando a su vez el uso del análisis de regiones de organización nucleolar (análisis NOR) para comprobar los niveles de ploidías en esta especie. (Piferrer *et al.* 2000; 2003; Díaz & Neira 2005; Hammed *et al.* 2010).

También se ha aplicado esta técnica en el grupo de los crustáceos especialmente en la familia Penaeidae, que incluyen especies como *Penaeus japonicus*, *P. chinensis*, *P. vannamei* que son de significativo interés comercial (Coman *et al.* 2008).

6.- **Aplicación de tratamientos hormonales**, se basa en que a pesar de que el sexo se determina en el momento de la fecundación, el fenotipo sexual aparece posteriormente durante el desarrollo. Este fenotipo puede alterarse por la administración de hormonas en cantidades que anulen los efectos de las hormonas naturales de los organismos: estrógenos para transformar organismos genéticamente machos en hembras funcionales y andrógenos para cambiar hembras en machos funcionales. Estos organismos son luego utilizados para obtener una descendencia de un solo sexo (Fig. 5d).

Entre los estrógenos más empleados se encuentra: β estradiol y etinilestradiol. Entre los andrógenos, la mayoría son derivados sintéticos de la testosterona:

17 α -metilttestosterona, 19-noretilttestosterona y fluoxymetosterona.

Las hormonas pueden ser suministradas mediante baños, implantes y comúnmente incorporadas al alimento con variantes en cuanto a la estructura de cultivo (Manosroi *et al.* 2004; López *et al.* 2007; Salgado-Zamora & Azpeitia-Hernández 2008; Chakraborty & Banerjee 2009). Según López *et al.* (2007) la inmersión es la técnica de reversión más recomendada para la tilapia roja por su menor demanda de tiempo y mano de obra, disminuyendo la exposición de animales y humanos a la hormona y representando mayores beneficios económicos.

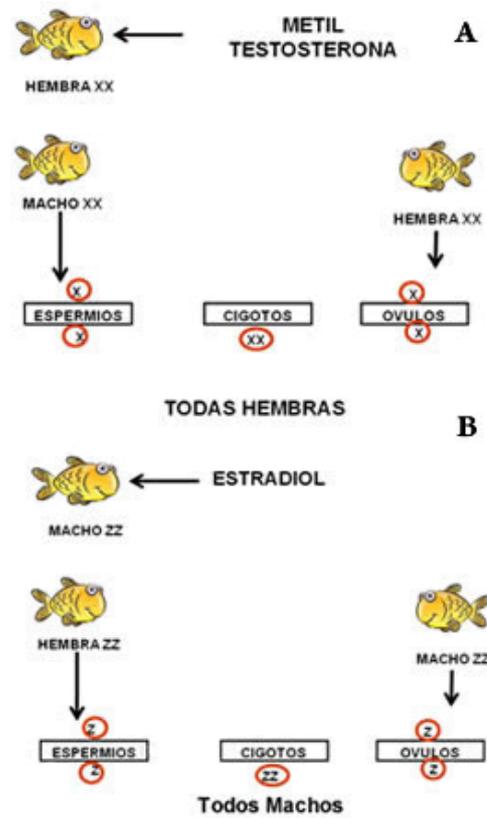


Figura 5. d. Aplicación de tratamiento hormonal para la obtención de poblaciones monosexuales. A. resultado de la aplicación de metil testosterona. B. resultado de la aplicación de estradiol.

La reversión de sexo no siempre es efectiva en el 100 % y puede ser difícil de realizar en algunas especies. En Gran Bretaña, para producir truchas "solo hembras," se suministra a los alevines una dieta con 17 metil testosterona, lo cual induce la reversión de las hembras en machos funcionales, aún cuando mantienen su constitución genética femenina. Esto se conoce como masculinización funcional de hembras (si el sexo homogamético es femenino, como en este caso).

Después del suministro de la hormona masculina, los peces crecen normalmente hasta los dos años cuando alcanzan la madurez sexual. De este modo se logra una población de puros machos de los cuales, aproximadamente, la mitad serán machos normales que se identifican en la etapa reproductiva por liberar los espermios al presionarles el abdomen. Esto no es posible con los machos reversos (genéticamente hembras) por carecer de conductos deferentes (Pérez 1996).

Estos machos reversos o machos XX serán los progenitores de la generación "puras hembras"; todos sus espermios llevan el cromosoma X. Existen, sin embargo, algunas dificultades que han sido notorias al explotar el método comercialmente. Los machos revertidos no poseen ductos espermáticos y deben ser sacrificados y los testículos cortados en pedazos para obtener el esperma, que es muy espeso. Por otra parte, algunas veces los espermios no son lo suficientemente activos para lograr altos porcentajes de fecundación, lo cual puede deberse a la interrupción de la circulación sanguínea al sacrificar el

pez. Otra dificultad, es saber cuando los espermios están maduros (al no haber conductos) y, por otra parte, los "machos revertidos" parecen madurar más tarde que los normales (Betancurt *et al.* 2008).

En otras especies, como el bagre de canal (*Ictalurus punctatus*), los machos crecen de un 10 a un 30% más rápido que las hembras. En estos peces el mecanismo de determinación sexual, es similar al de las truchas y salmones, hembras XX y machos XY. Todos los intentos para producir poblaciones de puros machos, mediante la administración de hormonas masculinas a las larvas han fallado, produciendo poblaciones sesgadas hacia las hembras. Aparentemente, estos organismos detectan los niveles elevados de andrógenos y reaccionan metabolizando el exceso y convirtiéndolos en estrógenos (Dunham 1990). El tratamiento contrario, empleando una variedad de estrógenos, incluido el 17 β - estradiol, para producir todas hembras no presenta problemas. En las tilapias la producción de machos ha sido exitosa con la administración de 17 α -metiltestosterona incorporada a la alimentación de las larvas (Pérez 1996).

Haffray *et al.* (2003) obtuvieron 100% machos y hembras de sexo revertido en el turbot *Scophthalmus maximus* tratados con 17 α -metiltestosterona o 17 β -estradiol respectivamente.

Estas experiencias se han extrapolado a especies de importancia económica en el mercado de ornamentales como *Xiphophorus helleripara* los que se ha reportado un

100% de masculinización con la hormona metil-testosterona; la mayoría de las hembras presentaron la espada, característica de los machos, característica deseada en la industria (Cháves-Hernández *et al.* 2008; Amiri-Moghaddam *et al.* 2010). Salgado-Zamora & Azpeitia-Hernández (2008) obtuvieron la masculinización de *Poecilia reticulata* con la aplicación del esteroide semi sintético acetato de trembolona, resultando efectivo para la masculinización de esta especie.

En el caso del uso de los organismos "supermachos" (YY), mencionados anteriormente en la sección de ginogénesis y androgénesis y que pueden utilizarse para obtener poblaciones totalmente masculinas, éstos pueden ser obtenidos también mediante reversión sexual al tratar larvas sexualmente indeterminadas con estrógenos y producir hembras XX y "hembras" XY.

Una técnica ingeniosa desarrollada en la Universidad de Auburn, Alabama, para producir poblaciones de sólo machos, consiste en alimentar a las larvas no diferenciadas sexualmente con esteroides anabólicos (17-estradiol o 17-ethynyltestosterona), a fin de revertir los machos a hembras y utilizar estos peces reversos para obtener progenies constituídas por solamente uno de los sexos.

Las "hembras" XY son genéticamente machos, pero fenotípicamente hembras. Cuando estos peces han madurado, se realizan pruebas para identificar cuales hembras son XY y cuales son verdaderas XX. Las hembras XY son separadas y apareadas con machos normales XY.

A partir de este apareamiento se obtendrán hembras XX, machos XY y machos YY. Estos últimos son los que realmente interesan puesto que, al ser apareados con hembra XX normales, producirán progenie XY en su totalidad, es decir sólo machos (Fig 5.e). De esta manera se logra realizar cultivos masivos de poblaciones monosexuales de peces y, consecuentemente, se obtienen las ventajas económicas que de ello derivan.

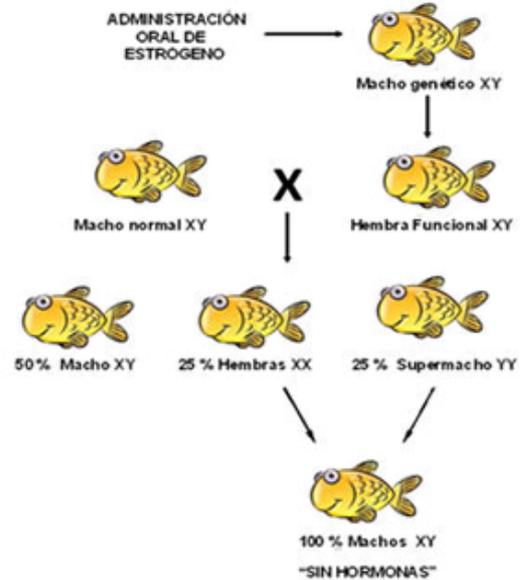


Figura 5. e.- Utilización de supermachos (YY) para la obtención de poblaciones "todos machos".

Como no se han encontrado caracteres externos para diferenciar los sexos, se deben realizar cruces con machos normales y por el análisis de la progenie, separar las hembras XX de las XY, lo que alarga mucho el proceso. Cuando la hembra es XY la progenie consistirá de machos y hembras en proporción de 3:1; dos tercios de los machos serán XY y un tercio YY o supermachos. Las "hembras" (XY) que han originado esta descendencia deben conservarse para que continúen produciendo este tipo de progenie.

En un interesante procedimiento para producir supermachos, se emplearon estrógenos para alimentar larvas de la trucha arcoíris (Tave 1993). Este procedimiento a menudo no logra el 100% de reversión y un porcentaje importante de hermafroditas, genéticamente machos XY; algunos de los cuales producen óvulos y esperma (sin conductos deferentes o rudimentarios), y pueden autofecundarse y de éstos unos pocos pueden producir embriones viables. Teóricamente, por autofecundación se esperaría 25% de hembras (XX), 50% machos (XY) y 25% de supermachos (YY), que al cruzarse con hembras normales producirían solamente machos. Paradójicamente y como se ha visto en la trucha arcoíris, los machos no son deseables, sin embargo, esta aproximación es importante para otras especies en que los machos son los importantes para cultivos (Tave 1993).

Un esquema similar de reversión del sexo y cruzamientos, se ha realizado en la tilapia *O. aureus*. Las larvas se alimentan con estrógenos lo cual produce hembras reversas (ZZ) y normales (ZW). Las hembras son

separadas mediante cruces con machos normales. Las reversas producen un 100% de machos y se conservan, las hembras ZW dan progenie en una relación de 1:1 y son eliminadas. Con las hembras reversas, será posible producir poblaciones de puros machos a voluntad. Lamentablemente, con este método la mayor parte de los machos reversos desarrollaron genitales anormales en forma de ovotestículos (Jensen & Shelton 1979).

Se ha señalado que el tratamiento de peces con hormonas tiene repercusiones sobre el metabolismo de los organismos aún después de finalizado el suministro. (Donaldson & Hunter 1982 y FAO 2010). El uso de estrógenos causa efectos catabólicos. En salmónidos, se ha encontrado que embriones y larvas tratados con estrógenos presentan disminución en el crecimiento y en ocasiones elevada mortalidad. En el caso de los andrógenos, su suministro puede tener efectos anabólicos, catabólicos o no tener ningún efecto sobre el crecimiento de los organismos. La respuesta depende entre otros factores, del tipo de hormona empleada, de la cantidad de la hormona, así como el tiempo de suministro también tiene que ver con la respuesta metabólica: 1 mg de 17 α -metiltestosterona en 1 kg de alimento aumenta el crecimiento, pero al elevar la dosis no se obtiene respuesta y si continúa aumentándose, la respuesta es negativa y el crecimiento disminuye (Pérez 1996).

En el caso de crustáceos de la especie *Macrobrachium rosenbergii*, se ha logrado producir cambios de sexo por la ablación bilateral de la glándula androgénica ya que ésta

regula la actividad endocrina relacionada con el proceso de diferenciación sexual de los machos en estos organismos a través de la hormona androgénica (HA). Por otra parte, la implantación de la glándula en hembras inmaduras, conduce al desarrollo del sistema reproductivo masculino. Los animales sometidos a estos procesos de (ablación e implantación de la glándula) son capaces de cruzarse con especímenes normales y engendrar progenie (Sagi & Cohen 1990; Sagi & Aflalo 2005; Ventura *et al.* 2009).

Sagi & Aflalo (2005) señalan que los machos de *Macrobrachium rosenbergii* crecen más rápidamente y alcanzan un mayor tamaño que las hembras (Fig. 5f). Nair *et al.* (2006) comprobaron que desde el punto de vista económico los cultivos monosexuales de machos de *M. rosenbergii* son superiores en más de un 60% a los cultivos de ambos sexos y a los cultivos de puras hembras.

Malecha *et al.* (1992) implantaron tejido de la glándula androgénica de machos adultos a hembras jóvenes. El grado de reversión del sexo y el éxito reproductivo, dependió del tamaño (edad) al cual se realizó la implantación. Se logró una reversión completa de la función sexual y un cambio casi total de la morfología sexual secundaria, en hembras, aproximadamente 30 días después de la metamorfosis al estado post larval. Rungsin *et al.* (2006) realizaron un elevado número de cruces entre machos y neohembras, resultando machos mayoritariamente, lo cual sugiere que la aplicación de estas técnicas es muy prometedora para producir "stocks" monosexuales en el cultivo de los crustáceos.

Sánchez de Bock & López (2010) plantean cultivar puros machos del crustáceo de agua dulce *Cherax quadricarinatus* (Fig. 5f), ya que estos alcanzan un mayor tamaño. En diferentes experimentos realizados con hembras juveniles, los autores encontraron que una alimentación enriquecida con glándula androgénica aumentaba el crecimiento, mientras que su cultivo a altas temperaturas incrementaba la proporción de machos. En esta investigación fueron seleccionados machos de una población inmadura, tan pronto como sus papilas genitales fueron visibles, y se les sometió a la ablación bilateral de la glándula androgénica. Estos machos no desarrollaron las quelas azules espinosas y los genitales característicos de los machos normales y su crecimiento somático se redujo. La mayor parte de estos machos desarrollaron gónadas femeninas (convirtiéndose en neohembras), la producción de ovocitos fue completa e indistinguible de las hembras normales. Del cruce con estas neohembras con machos normales resultaron cigotos viables que se desarrollaron en una población 100% de machos.

Son muy pocas las investigaciones que se han realizado sobre reversión sexual o cambios de sexo en moluscos. Entre ellas, se destaca el trabajo de Baghurst & Mitchell (2002), en *Crassostrea gigas*, quienes encontraron que la determinación sexual se debe más a factores genéticos que ambientales, lo cual abre la posibilidad de definir el sexo de esta especie a conveniencia del acuicultor.



Figura 5f. Ejemplares de camarones de importancia económica, izquierda *Macrobrachium rosenbergii* (<http://atlas.drpez.org/Macrobrachium-rosenbergii-fotos/sah>), derecha *Cherax quadricarinatus* (<http://www.aquagreen.com.au>)

CAPÍTULO 6

HIBRIDACIÓN, HETEROSIS Y CONSANGUINIDAD

La hibridación es una herramienta de uso frecuente para la mejora de las capacidades productivas en organismos acuáticos y especialmente en peces. Se denominan híbridos a la progenie de padres de diferentes líneas, cepas, subpoblaciones, poblaciones, razas geográficas (híbridos intraespecíficos), especies (interespecíficos) e incluso géneros (intergenéricos). El valor fenotípico promedio de los híbridos es, a menudo, mayor que el de los padres (heterosis o vigor híbrido) y se debe, aparentemente, a la heterocigosidad en muchos loci. Esta superioridad puede expresarse en algunos caracteres cuantitativos tales como: crecimiento, supervivencia y fertilidad. Además, con la hibridación se pueden combinar características de dos géneros, especies o poblaciones, reducir la reproducción indeseada a través de la esterilidad, obtener descendencia de un mismo sexo o aumentar la resistencia a enfermedades (Gustiano 2004; Haniffa *et al.* 2009).

En la hibridación de diferentes especies, la cual es relativamente sencilla entre especies de fecundación externa, además de generarse heterosis también se produce transferencia de variación genética (introgresión) de una especie a otra mediante cruces retrógrados, siempre que la F1 sea fértil. En aquellos casos donde los híbridos son infértiles, esto también puede presentar una ventaja, ya que los híbridos estériles no emplean energía en la

reproducción y pueden canalizarla en crecimiento

Los procesos de hibridación intraespecíficos e interespecíficos pueden ilustrarse con los bagres cultivados en los Estados Unidos. La principal especie es el bagre de canal (*Ictalurus punctatus*) la cual, tiene varias líneas domesticadas que crecen más rápidamente que las salvajes. Cruces intraespecíficos de estas líneas han producido híbrido F1 con vigor híbrido en la mayoría de los casos, así como el mejoramiento de caracteres tales como crecimiento, resistencia a algunas enfermedades y fecundidad (Dunham 1987). La hibridación interespecífica de los bagres de canal con el bagre blanco (*I. punctatus*); o del bagre azul (*I. furcatus*) con el bagre blanco son difíciles de realizar y muchos híbridos resultan anormales. Esta dificultad es causada por la diferencia de cariotipos ya que el bagre blanco tiene 48 cromosomas mientras que el bagre del canal y el azul tienen 58 cromosomas.

Como es esperar los híbridos producidos por cruces entre azules y canales especialmente, hembras canal x machos azul son fáciles de obtener y son superiores a los bagres de canal en varios fenotipos tales como crecimiento, conversión alimenticia, mayor tolerancia a bajas concentraciones de oxígeno y son más uniformes en tamaño lo cual es una ventaja para las procesadoras automáticas significando disminución de los costos de producción. La dificultad con estos híbridos es que no se producen en grandes cantidades.

Otro ejemplo de hibridación interespecífica, en bagres,

es el que involucra especies de la familia Pangasiidae, de gran importancia económica en zonas asiáticas. Estos han sido sometidos a hibridaciones, especialmente *Pangasius djambal* (sureste Asia), *P. bocourti* (Indonesia) y *Pangasionodon hypophthalmus* (Vietnam). Los numerosos esfuerzos dirigidos a esta práctica, han incrementado la producción así como la obtención de híbridos con características valiosas en el campo de la acuicultura (Gustiano 2004).

En carpas, en el noroeste de Rusia, lugar de inviernos muy fríos existe un ejemplo notable de hibridación interespecífica. Entre las escasas especies de peces capaces de sobrevivir en este ambiente, se encuentra la carpa salvaje de Amur (*Cyprinus carpio haematopterus*), resistente a las bajas temperaturas, pero de crecimiento lento. Para mejorar esta especie, se le cruzó con la llamada Carpa Europea de Galicia (*Cyprinus carpio carpio*), de buen crecimiento, pero poco resistente al frío. Mediante un programa de selección, se obtuvo un híbrido (la carpa Ropsha), de crecimiento rápido y buena supervivencia en invierno (Babuchkine 1987).

También existen ejemplos de la utilidad de la hibridación en el tratamiento de enfermedades: una muy importante se refiere a la septicemia hemorrágica viral (SHV) que elimina una quinta parte de las truchas criadas en Europa. El problema es muy grave porque afecta a los animales de mayor edad, en los que el acuicultor ha invertido más. Para obtener truchas arcoíris resistentes al SHV, se ha recurrido a producir híbridos entre esta especie

y otros salmónidos resistente al SHV, como el salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*), esperando obtener híbridos con resistencia y parecidos a la trucha arcoíris. Dos grupos de investigadores, uno en Estados Unidos (Scheerer & Thorgaard 1983) y otro en Francia (Chevassus *et al.* 1983), descubrieron que convirtiendo estos híbridos en triploides se aumentaba considerablemente la supervivencia. Los triploides híbridos son usados en muchas granjas de cultivo cuyos propietarios se encuentran permanentemente amenazados por el virus. Por otra parte, los peces son estériles y no sufren los procesos relacionados con la madurez sexual, pero su aspecto es intermedio entre las especies parentales.

En Venezuela se han realizado interesantes intentos por obtener mejores organismos para el consumo humano, mediante la hibridación de peces. Por ejemplo, híbridos entre la palometa *Mylossoma duriventris* y la cachama *Colossoma macropomum* (Kossowski *et al.* 1983); entre los bagres, *Pseudoplatystoma fasciatum* y *Leiarius marmoratus* (Kossowski 1991; Martino 2002); *Calophysus macropterus* x *Leiarius marmoratus*, *C. macropterus* x *Pimelodus blochii*, *C. macropterus* x *Pseudoplatystoma fasciatum*, y *P. fasciatum* x *P. blochii*. (Kossowski 2001); la cachama *Colossoma macropomum* y el morocoto *Piaractus brachypomus* (González & Heredia 1989). Este último cruce ha sido uno de los más estudiados usando hembras de *C. macropomum* y machos de *P. brachypomus*. Este híbrido en cultivo supera en ganancia de peso 3,6 veces el de sus medios hermanos de cruces uniespecíficos de cachama (González & Heredia 1989).

En el nororiente venezolano, se han llevado a cabo hibridaciones intraespecíficas entre las ostras *Crassostrea rhizophorae* (buen sabor, bajo crecimiento) con *C. virginica* (mal sabor, rápido crecimiento). Al cabo de doce meses de cultivo de híbridos, una prueba organoléptica; reveló que aquel presentó un sabor agradable, mejor incluso que *C. rhizophorae*, aunque su crecimiento fue muy lento (Gutiérrez 1994).

Por otra parte, la hibridación interespecífica entre *Mercenaria mercenaria* y *Mercenaria campechiensis* en Chile, produjo descendientes con una mayor tasa de crecimiento y una mejor tolerancia a un amplio rango de variables ambientales. Sin embargo, en la práctica, se ha visto que es muy difícil obtener progenie viable (Toro 2008).

Es necesario señalar que la hibridación no es la piedra angular para resolver todos los problemas de bajo rendimiento en acuicultura. En las tilapias, por ejemplo, existen indicios de que la hibridación no es el mejor método para producir "stocks" más productivos (Wohlfarth & Hulata 1983). En una prueba realizada en Filipinas, empleando ocho cepas de *O. niloticus*, se comprobó que el nivel de heterosis para crecimiento y supervivencia fue bastante bajo en todos los cruces posibles (Pullin *et al.* 1991). También hay ejemplos que señalan una ausencia de heterosis en moluscos, como es el caso de los híbridos entre poblaciones geográficas de la ostra *Crassostrea gigas* y en los híbridos resultantes de cruzar de *C. angulata* con *C. gigas* (Purdom 1986). No obstante hay que ser cauteloso,

ya que la hibridación encierra una serie de peligros cuando no es bien planificada o cuando ocurre inadvertidamente, sin el control del investigador o el acuicultor.



Figura 6. a. Algunas especies ícticas de importancia comercial que han sido utilizadas para la obtención de híbridos orientados a la mejora de características productivas y comerciales (A: carpa *Cyprinus carpio*; B: bagre *Ictalurus punctatus*; C: cachama *Colosoma macropomum*; D: morocoto *Piaractus brachipomus*; E: Tilapia roja).

HIBRIDACIÓN Y LINEAS PURAS

Los cruces entre poblaciones muy diferenciadas, han permitido obtener resultados positivos en cuanto a mejorar aspectos como velocidad de crecimiento y resistencia a climas inhóspitos y a enfermedades. Un ejemplo lo constituyen algunas poblaciones de la carpa *Cyprinus carpio* (Babuchkine 1987). Sin embargo, los resultados no han sido importantes para híbridos entre salmónidos (Chourrout *et al.* 1988), quizás por tratarse de poblaciones que no poseen suficiente diferenciación. Esto, ha llevado hacia la creación de distintas "líneas puras" (en las que todos los individuos sean genéticamente idénticos o muy similares), más diferenciadas que dos poblaciones naturales, las cuales al cruzarse producirán progenies que presenten heterosis. Los métodos para obtener estas líneas puras son: la reproducción consanguínea, ginogénesis y/o androgénesis.

Por definición, una línea consanguínea debe tener una probabilidad menor que 0,02 de ser heterocigota en cualquier locus no seleccionado. En peces cultivados, la producción de estas líneas exigiría un mínimo de 20 generaciones de cruces entre hermanos o 6 generaciones de autofecundación (Chourrout *et al.* 1988). Sin embargo, se han desarrollado algunas metodologías para facilitar la obtención de líneas consanguíneas, uno es la autofecundación unida a la reversión sexual realizada en la trucha arcoíris. Chourrout *et al.* (1988) obtuvieron como resultado de un proceso de reversión sexual una mayoría de hembras, una minoría de machos y aproximadamente un

10% de hermafroditas; lo que permitió realizar la autofecundación y aceleró el aumento de la consanguinidad, ya que en cada generación de autofecundación se pierde la mitad de la heterocigosidad, mientras que solo se pierde un cuarto en los cruces hermano-hermana. Pero, ésta metodología no es muy eficiente y es laboriosa. Además el porcentaje de hermafroditas, es bajo.

En los pectínidos, debido a que muchas especies son hermafroditas, es posible lograr líneas consanguíneas rápidamente por autofecundación. Sin embargo, debe tomarse en cuenta que a mayor grado de consanguinidad, mayor es la probabilidad de producir combinaciones homocigotas deletéreas en muchos loci y causar depresión consanguínea. En *Pecten maximus*, se determinó que las larvas de los cruces por autofertilización presentaron una disminución significativa en la velocidad de crecimiento, en relación a los controles (Beaumont & Budd 1983). También en la ostra del Pacífico (*Crassostrea gigas*) se encontró que la progenie de dos años provenientes de cruces hermano-hermana era más pequeña en tamaño de la concha, peso húmedo y peso seco que la del grupo control (Beattie *et al.* 1987). En *Euvola ziczac*, sin embargo, no se han encontrado diferencias significativas, en cuanto a la tasa de crecimiento entre progenies de cruces autofecundos y normales (Betancourt *et al.* 1995).

En general, la sola palabra consanguinidad despierta temor en los acuicultores, a veces con razón, pero no siempre debe ser así. En ocasiones, la consanguinidad se

usa como medio para obtener mejorías genéticas en los organismos cultivados.

La principal consecuencia de la consanguinidad es la formación de homocigotos. Sin embargo, esto también se puede conseguir por cruces entre individuos no relacionados. La diferencia es que el cruce entre parientes crea homocigosidad juntando alelos que son iguales por descendencia, mientras que en los cruces no emparentados los alelos no son iguales por descendencia. En el primer caso, en general, los descendientes son de menor crecimiento, fecundidad y viabilidad, lo que no sucede en el segundo.

Esto ocurre, porque todo organismo es portador de alelos recesivos deletéreos (producen fenotipos subviables, anormales o letales) enmascarados por alelos dominantes normales. Cuando se cruzan individuos emparentados que llevan alelos iguales por descendencia, los alelos recesivos se pueden unir, lo que permite que el fenotipo se exprese y produzca una progenie con fenotipos letales o anormales. Claro está que el cruce de individuos no relacionados también puede producir una descendencia con fenotipos letales o no deseables, pero en porcentajes menores. Mientras mayor sea el parentesco, mayor será el porcentaje de progenie anormal.

Si un acuicultor sospecha que la consanguinidad es la causante de una disminución en su producción, lo recomendable será adquirir nuevos "stocks" de reproductores. La mayoría de las poblaciones cultivadas

son pequeñas y/o se han originado de unos pocos fundadores, en ocasiones solo de un macho y una hembra. Además, y como ya lo hemos mencionado, la elevada fecundidad de peces e invertebrados, hace que los acuicultores empleen un pequeño número de padres. Todo esto determina una disminución de la varianza genética por aumento de la consanguinidad.

En este punto es necesario incluir un término muy importante en el manejo de una población: el número efectivo de cruce (N_e), también conocido como el tamaño efectivo de una población, es decir, el número de machos y hembras que producen progenies viables.

También puede definirse como la parte de la población que contribuye genéticamente a la siguiente generación. Debe resaltarse que el número efectivo de cruce es un término diferente del tamaño observado de una población porque no todos los miembros de ésta última serán padres.

La estimación del número efectivo de cruce dependerá de la proporción sexual de la población: a) cuando la proporción de sexos es igual: Si en una población de 1000 individuos, se producen 250 cruces que contribuyen en igual cantidad de progenie a la siguiente generación, el tamaño efectivo será solamente de 500. b) cuando la proporción de los sexos es desigual. Por ejemplo, una población de 5 machos que se cruzan con 50 hembras tendrá un tamaño efectivo superior a 5 pero inferior a 50. La relación es dada por:

$$N_e = \frac{4(H)(M)}{H+M}$$

donde H y M representa número de hembras y de machos que producen progenie viable. En nuestro ejemplo $N_e = 4(50)(5) / 50+5 = 18$

La probabilidad de que dos genes en un cigoto sean idénticos, viene dada por el llamado coeficiente de consanguinidad F. Éste se calcula por análisis de pedigrí o estimándolo en base al tamaño poblacional.

Para ilustrar el estimado del índice de consanguinidad utilizando el tamaño poblacional, tomemos el ejemplo de una población hipotética de solamente 50 individuos con 100 alelos diferentes en un locus determinado, en el que ningún individuo es portador de los mismos alelos. Además, supongamos que los organismos de esta población son hermafroditas y que los individuos se cruzan al azar. Sucede entonces que en el locus mencionado existirán 100 tipos de gametos diferentes, y por lo tanto, la probabilidad de escoger un gameto idéntico a otro previamente escogido es $1/100$ ó $1/2N$, donde N es el número de individuos diploides que se cruzan. Se puede generalizar señalando que la probabilidad de que un individuo se forme por gametos que contengan dos alelos idénticos es $1/2N$. Entonces, esta es la fórmula que se utiliza para obtener el coeficiente de consanguinidad para una generación de cruces al azar entre los gametos de una población de tamaño N.

En la siguiente generación existirán de nuevo $2N$ tipos diferentes de gametos producidos por los nuevos padres y la probabilidad de consanguinidad de nuevo será $1/2N$. Pero además de los gametos producidos por los individuos heterocigotos, algunos gametos se originarán de individuos homocigotos idénticos, que son parte de la generación paterna. Esta proporción extra de gametos idénticos aumentará la probabilidad de formar homocigotos idénticos. En términos matemáticos, si la probabilidad de que surjan nuevos homocigotos idénticos es $1/2N$ para cualquiera generación, la probabilidad de que el resto de los cigotos, $1 - (1/2N)$, tengan genes idénticos, corresponde al coeficiente de consanguinidad de la generación anterior. Así F de la generación 2,

$$F_2 = (1/2N) + 1 - (1/2N) F_1$$

Donde F_1 es el coeficiente de consanguinidad de la generación anterior, o sea la primera. El cálculo de F para sucesivas generaciones sigue el mismo modelo:

$$F_n = (1/2N) + 1 - (1/2N) F_{n-1}$$

N está inversamente relacionada con la consanguinidad. A mayor N , menor consanguinidad.

La consanguinidad, es un problema mayor en poblaciones pequeñas y cerradas que en poblaciones grandes, porque es más probable que los parientes se encuentren y se crucen en las poblaciones pequeñas cuando los cruces ocurren al azar. Sin embargo, no es

posible cuantificar el nivel de consanguinidad que causa problemas ya que éste es diferente para distintos fenotipos y poblaciones; no existe un valor crítico. Sin embargo, parece prudente el limitar la consanguinidad a un 5% (Tave 1991).

Tabla VIa Tamaño de cruce de efectivo (N_e) para producir una consanguinidad $F=5\%$, después de determinado número de generaciones (N° de generaciones) en poblaciones cerradas con cruces al azar (Tomado Pérez, 1996).

Nº gen	N_e
1	10
2	20
3	30
4	40
5	50
10	100
20	200
50	500
100	1000

Los valores de la tabla VIa. se determinan de la siguiente forma: supongamos que se desea una consanguinidad de 5% en la generación 100. Para conocer el N_e mínimo, se debe calcular primero la constante de consanguinidad por generación, necesaria para producir $F=5\%$ en la generación 100. Para lo cual se divide 0,05 entre 100 generaciones (0,0005). El segundo paso, es determinar el N_e por generación necesario para producir $F=0,0005$ en cada generación. Para hacer esto se debe usar la fórmula que describe la relación entre F y N_e .

$$F = \frac{1}{2} N_e; F = \frac{1}{2} (0,0005); F = 1000$$

El tamaño de cruce efectivo en la Tabla 5, señala el mínimo N_e . El tamaño de cruce nunca debe ser menor que el mínimo. Si lo es, la consanguinidad se acumulará a una velocidad mayor.

HETEROCIGOSIDAD Y ADAPTABILIDAD

Tal como se ha mencionado, la consanguinidad es asociada por los acuicultores con la disminución de la producción, malformaciones y aumento del índice de mortalidad, debido al aumento de la homocigosidad genética. Del mismo modo, tiende a asociarse el grado de heterocigosidad genética con una mejor adaptabilidad y desempeño de los organismos. Singh & Zouros (1978) fueron los primeros investigadores en determinar que el peso estaba positivamente relacionado con el grado de heterocigosidad de varios loci enzimáticos en las ostras *C. virginica*. Este tipo de estudios que ha sido realizado en otras especies de moluscos ha incluido además de crecimiento, la viabilidad.

Sin embargo, la asociación heterocigosidad-adaptabilidad no es general (Beaumont & Zouros 1991) y los estudios que no han hallado correlación son tan numerosos como los que si la han encontrado.

Se han adelantado dos hipótesis para explicar las correlaciones entre grado de heterocigosidad y

adaptabilidad. A) Las variantes enzimáticas, son directamente responsables por la correlación. Esto, implica que los heterocigotos serían superiores a los homocigotos en determinados loci. B) Las variantes enzimáticas detectadas no son directamente responsables por el efecto de mayor crecimiento o adaptabilidad. Existe en este caso una limitante en la sensibilidad de la técnica que no permite apreciar algunas anomalías genéticas no detectables por métodos convencionales como la electroforesis. Estas anomalías incluyen los llamados alelos nulos (variantes que no producen enzimas activas), lo cual impide diferenciar por electroforesis entre homocigotos para alelos activos y heterocigotos para alelos nulos que pudieran determinar un crecimiento menor y así los homocigotos reales y los aparentes, tendrían un tamaño promedio menor que los heterocigotos. Otra posibilidad en esta hipótesis, es la pérdida de cromosomas. Los aneuploides resultantes pueden tener una velocidad de crecimiento menor y por electroforesis aparecerán como homocigotos, conduciendo a una falsa correlación negativa entre homocigosidad electroforética y el crecimiento.

A pesar de existir dos explicaciones para la correlación observada, todas las investigaciones concuerdan en la interpretación fisiológica del fenómeno. En la ostra americana, *C. virginica*, se ha determinado que los especímenes heterocigotos presentan un consumo menor de oxígeno que los homocigotos, lo cual indicaría una menor pérdida calórica por respiración (Koehn & Shumway 1982). La interpretación fisiológica de la correlación, es que el mayor nivel de heterocigosidad permite al individuo

mantener su metabolismo basal con un menor gasto de ATP. Así, después de satisfacer sus necesidades catabólicas, los individuos heterocigotos tendrían una mayor cantidad de energía para otras funciones. Volckaert & Zouros (1989) sugieren que esta energía, podría ser canalizada por el individuo en cualquier función que le otorgue una mayor adaptabilidad. En animales sedentarios, tales como mejillones y ostras, mientras los organismos se encuentran en estado juvenil, la mejor inversión es crecimiento, mientras que en el estado adulto y en época reproductiva, estos mismos organismos, la mejor inversión sería la producción de gametos.

Esto explicaría el porqué la correlación heterocigosidad-crecimiento no se observa tan frecuentemente entre adultos como en juveniles (Diehl & Koehn 1985) y explica también la correlación encontrada por algunos investigadores entre heterocigosidad y tamaño de las gónadas en época reproductiva (Rodhouse *et al.* 1986).

En el caso de los pectínidos que poseen capacidad de nadar, como *Euvola ziczac*, especie distribuida desde las costas de Carolina del Norte, Estados Unidos a las de Brasil, el ATP extra pudiera ser empleado en una estrategia adaptativa: escapar más eficientemente de predadores, y podría esperarse una correlación entre heterocigosidad y supervivencia, más bien que entre heterocigosidad y crecimiento. *E. ziczac* presenta polimorfismo de las enzimas octopina deshidrogenasa (ODH), malato deshidrogenasa (MDH), esterases (EST), leucil amino peptidasa (LAP), fosfoglucomutasa (PGM) y glutamato

piruvato transaminasa (GPT), (Coronado *et al.* 1991; Pérez *et al.* 2000; Moreno *et al.* 2004). De éstas, Octopina deshidrogenasa (ODH) es una enzima clave en el metabolismo energético bajo condiciones anaerobias, y le permite al animal disponibilidad energética en condiciones de estrés. En un estudio de la cinética de ODH (Alfonsi *et al.* 1995; Pérez *et al.* 2000) se evidenció la existencia de diferencias significativas entre heterocigotos y homocigotos. En otro estudio para conocer la eficiencia reproductiva, metabólica y capacidad de crecimiento en *Euvola ziczac* se encontró una correlación positiva entre la actividad de algunos sistemas enzimáticos metabólicos claves y el grado de heterocigosidad (Alfonsi *et al.* 1995).

Myrard *et al.* (2002), consideran que parámetros asociados con adaptación como lo son fecundidad, crecimiento y sobrevivencia, se han correlacionado en algunos organismos con la heterocigosidad multilocus (MLH por sus siglas en inglés). Estos autores encontraron en *Mytilus edulis* un incremento en el número de heterocigotos por loci (MLH) debido a la mortalidad selectiva de los individuos más homocigotos al ser sometidos a condiciones de stress, observándose una clara relación MLH-adaptación al sobrevivir una mayor proporción de organismos heterocigotos.

La correlación heterocigosidad-adaptabilidad, también se ha encontrado en algunas especies de peces. En la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), los organismos heterocigotos presentan mayor crecimiento y menor consumo de oxígeno, lo que indica un metabolismo más

eficiente; las hembras más heterocigotas de la misma edad presentaron huevos de mayor tamaño (Danzmann *et al.* 1988). Por otra parte, los peces más heterocigotos sobrevivieron en números significativamente mayores a infecciones causadas por bacterias que provocan enfermedades de las branquias, que los menos heterocigotos (Ferguson & Draushcack 1990).

CAPÍTULO 7

LOS TRANSGÉNICOS Y LA ACUICULTURA

En la actualidad existen numerosas áreas en las ciencias biológicas que participan en el desarrollo de técnicas para aumentar la eficiencia y sustentabilidad de la acuicultura. Estas tecnologías van desde las tradicionales hasta las más sofisticadas y modernas como la transgénesis.

Un organismo transgénico u Organismo Genéticamente Modificado (OGM) es aquel que ha sido sometido a ingeniería genética y que contiene ADN de una fuente externa a su propio genoma.

La transgénesis es el procedimiento biotecnológico por el que se introduce un gen foráneo o transgén en el genoma de un ser vivo. Se busca que el transgén se integre en la línea germinal de una manera estable y que pueda ser heredado por la descendencia.

En un contexto general, los defensores de esta tecnología aseguran que su impacto ha sido positivo, especialmente en plantas, en aspectos como el aumento de la producción, la resistencia a enfermedades, mayor tamaño, resistencia a condiciones ambientales, entre otros. Sin embargo, no se puede desconocer el potencial impacto negativo que estos organismos conllevan, el cual se puede reflejar a nivel de afecciones a la salud, a nivel ambiental, de contaminación e hibridación con otras especies,

desplazamiento y extinción de especies similares y otros.

Un ejemplo emblemático a nivel mundial es el cultivo de maíz transgénico, conocido como Bt y que porta un transgen de *Bacillus thuringiensis* que codifica una proteína tóxica (Cry) para larvas de insectos que son plagas del maíz (Cotter 2009).

Navqia *et al.* (2009) reportaron la creación de un maíz transgénico hipervitamínico donde se copiaron los genes de las bacterias que producen las vitaminas A, C y el ácido fólico. El maíz presentan un color anaranjado por su alto contenido en beta caroteno (Fig. 7a)

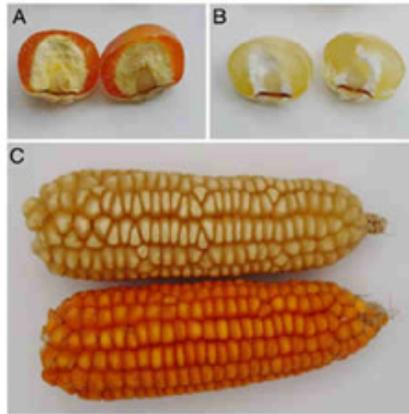


Figura 7. a. Acumulación de carotenos en el endospermo de maíz transgénico. (A) Fenotipo amarillo-anaranjado del endospermo transgénico (B) Fenotipo normal del endospermo (C) Comparación de mazorca normal y la transgénica (Tomado de Navqia *et al.* 2009).

Rossi-Mashall *et al.* 2007 y Galeano *et al.* (2009) han destacado el proceso biológico más preocupante de este tipo de cultivos: la introgresión-hibridación entre especies de plantas diferentes que abren la posibilidad de que los transgenes puedan transformar plantas silvestres en nuevas o peores malezas. Otro aspecto, es la toxicidad del polen para ciertos insectos de importancia en la cadena trófica y los exudados de las raíces, que a su vez resultan tóxicas para los cuerpos de aguas subterráneas adyacentes. Bøhn *et al.* (2010) probaron la acción de la toxina del maíz Bt sobre el crustáceo acuático *Daphnia magna* determinándose efectos negativos en la sobrevivencia, el crecimiento y en la reproducción de esta especie.

En el campo de la acuicultura, la transgénesis aplicada al desarrollo de los diferentes cultivos de organismos acuáticos, especialmente peces, ha tenido resultados muy satisfactorios (Narbón-Fernández 2008). En la mayoría de los casos se trata de especies en las que se han insertado los genes que regulan la producción de hormonas del crecimiento con el objeto de aumentar la tasa de crecimiento y rendimiento de los peces de cultivo. La mayoría de los ejemplos de transgénicos acuáticos corresponden a peces, fundamentalmente porque estos organismos poseen características tales como: grandes cantidades de ovocitos y espermios, la facilidad de llevar a cabo la fertilización en condiciones de laboratorio, así como el desarrollo embrionario que se lleva a cabo en ambiente externo.

CARACTERÍSTICAS DE UNA TRANSGÉNESIS SATISFACTORIA

La introducción exitosa de genes nuevos puede explicarse en tres etapas: integración, transmisión y expresión.

1.- INTEGRACIÓN

En esta fase una o más copias del nuevo gen se incorporan permanentemente en un locus cromosómico. Se espera que esta integración ocurra en el ovocito fertilizado antes de la división celular. Si ocurre después, el organismo resultante es probable que sea un mosaico o quimera con relación al transgen y sólo aquellos tejidos que se desarrollen de la o las células en que ha ocurrido la integración, llevan copias del transgen (Muñoz-Forcada 2006).

METODOLOGÍAS PARA LA INTEGRACIÓN DEL TRANSGEN.

La metodología generalmente empleada para la obtención de transgénicos comprende la introducción de un elevado número de copias de un gen clonado en el núcleo de un óvulo fertilizado. Una o más de estas copias, pueden integrarse al azar en los cromosomas y llegar a ser parte del material genético de ese organismo.

Desde los inicios de los primeros organismos transgénicos en los años 1980, se han descrito numerosos métodos para la obtención de éstos (Beardmore & Porter 2003) y se continúan desarrollando con la ayuda de la tecnología de punta actual. Entre estas técnicas destacan las siguientes:

1.a. Microinyección de transgenes en pronúcleos de óvulos fertilizados.

Básicamente una solución con el ADN se transfiere con una aguja microcapilar en el pronúcleo del huevo. Es la técnica más ampliamente utilizada para la obtención de peces transgénicos, especialmente porque cuando los huevos son claramente visibles se facilita y se hace más eficiente la microinyección, tal es el caso del pez Medaka *Oryzias latipes*. Se ha aplicado además en la trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss*, el bagre de canal *Ictalurus punctatus*, el salmón *Salmo trutta* y la tilapia *Oreochromis niloticus*. (Maclean & Laight 2000; Beardmore & Porter 2003; Sarmasik 2003; Van Eenennaam & Olin 2007; Tsai 2008).

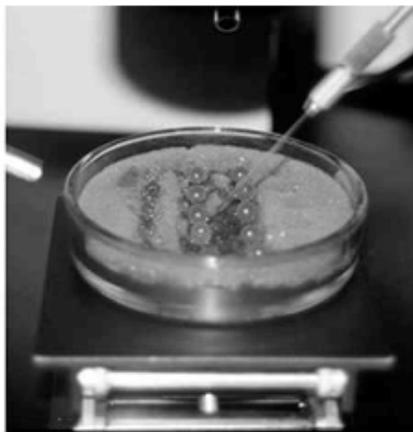


Figura 7. b. Microinyección de ADN en huevos de salmón (Tomado de Dunham, 2004)

1.b. Electroporación. Esta técnica utiliza una serie de pulsos eléctricos que aumenta la permeabilidad la membrana de la célula permitiendo penetrar el transgen. Estudios *in vitro* con membranas artificiales muestran que los potenciales transmembrana producidos generan gradientes de campo locales en la interfase agua-lípidos, formándose canales de agua con el ADN en suspensión; las cabezas de los lípidos de la capa externa son invaginadas hacia las cabezas de lípidos de la capa interna formando poros por donde penetra el agua con ADN y se origina un complejo de ADN/membrana (López-Heydeck *et al.* 2009). Tsai (2008) considera que la electroporación es una técnica masiva de transferencia de genes. Se ha aplicado en peces como el medaka y en muchas especies

comerciales de peces como el pez gato *Ictalurus punctatus*, la carpa común *Cyprinus carpio* el black porgy *Acanthopagrus schlegeli*, en moluscos como el abalón *Haliotis rufescens* y en crustáceos como el camarón tigre *Penaeus monodon*.

1.c. Transferencia de genes mediante esperma.

Esta técnica, se fundamenta en la capacidad que tienen los espermatozoides de transportar ADN exógeno y transferir estas moléculas mediante fecundación, dando lugar a animales modificados genéticamente (Peñaranda & Asensio 2006; García-Vázquez *et al.* 2009). En cuanto a animales acuáticos, Guerra *et al.* (2005) y Tsai (2008) reportaron resultados positivos cuando aplicaron esta técnica en los moluscos *Mytilus galloprovincialis*, *Mytilus chilensis*, *Chamelea gallina* y el abalón *Haliotis rufescens*. Tsai (2008) reporta resultados de la aplicación de esta técnica en la carpa común, el pez gato africano y tilapia. Señala también que la tecnología de microinyección de un único espermátforo logra una transferencia exitosa en el camarón gigante *Macrobrachium rosenbergii*.

1.d. Lipofección. La lipofección es una técnica de

transporte e introducción de material genético en células donde el material genético es transportado por un sistema que lo protege. En este caso un liposoma catiónico que entra en la célula por endocitosis. Este es un sistema de transporte de ADN muy prometedor debido a su baja toxicidad, alta versatilidad química y alta eficacia. La lipofección se caracteriza por una gran sobrevivencia celular (Sarmasik 2003; López-Heydeck *et al.* 2009).

1.e. Vectores virales. Los virus actúan como un sistema natural de transferencia de ADN a varios tipos de células. Esta transferencia puede llevarse a cabo mediante la exposición de las células a una alta concentración de virus, o mediante la microinyección de los virus directamente en el interior de los blastocistos o en el espacio perivitelino de los cigotos. El número de vectores virales disponibles es amplio y la elección del mismo dependerá del objetivo. Los retrovirus son los vectores más adecuados para la transferencia génica y si se desea la expresión prolongada del transgen. Estos virus han sido modificados para que pierdan su carácter patológico, aunque siguen siendo capaces de infectar células y de transportar una pequeña cantidad de ADN, que aunque limitada, es suficiente para transferir una amplia variedad de construcciones genéticas (Narvaiza *et al.* 2003; Gadea & García-Vásquez 2010). Los retrovirus han transferido eficientemente genes a organismos acuáticos como el pez cebra *Danio rerio*, obteniéndose ejemplares transgénicos a partir de esperma modificada genéticamente con ayuda de éstos (Kurita *et al.* 2004 y Peñaranda & Asensio 2006). Una vez lograda la integración del transgen lo siguiente es ubicar al gen exógeno en la línea germinal. Esto se conoce como transmisión.

2.- TRANSMISIÓN

La transmisión normalmente envuelve la herencia del transgén solamente para el 50% de la progenie, ya que el padre transgénico es heterocigoto para el nuevo gen (más

adecuadamente es hemicigótico, no hay secuencia equivalente en el otro cromosoma del par). Si más de una copia del transgén ha sido integrada en diferentes sitios de los cromosomas, más del 50% de la progenie será transgénica. Si menos del 50% son transgénicos es probable que los gametos del individuo transgénico sean mosaicos con relación al transgen.

En los procesos de transgénesis a través de las diversas técnicas empleadas, se ha reportado el establecimiento de líneas germinales. En el salmón del Atlántico (*Salmo salar*) se ha señalado que del 15 al 33% de la progenie de este organismo cuando es apareado con salmón silvestre, son transgénicos (Tsai 2008).

3.- EXPRESIÓN

Se refiere a la actividad del transgen manifestada como ARN mensajero y proteínas. Por supuesto esta actividad dependerá del funcionamiento apropiado de secuencias reguladoras relevantes que flanquean al transgen, como también de otros factores en los tejidos del animal transgénico (Pérez 1996).

Sarmasik (2003) y Peñaranda & Asensio (2006) señalan que para conseguir una buena expresión del gen de interés, es necesario incluir todas las secuencias que modulan su expresión, de manera que se necesita un vector que admita grandes secuencias de ADN en los que se pueda incluir todos los elementos reguladores del gen.

Para ello, se han desarrollado los transgenes genómicos, basados en cromosomas artificiales de levaduras (YACs) y de bacterias (BACs).

La expresión de un transgen puede solamente ser establecida en forma confiable por reconocimiento molecular del producto de este, ya sea detectando su actividad enzimática o por criterios inmunológicos. Una expresión satisfactoria de transgénesis en peces ha sido lograda con el gen anticongelante del lenguado *Pseudopleuronectes americanus* introducido en el salmón del Atlántico (Fletcher *et al.* 1988); con el gen bacteriano CAT introducido en bagres de canal (Stuart *et al.* 1988); empleando el gen de la hormona de crecimiento de la trucha arcoíris introducido en carpas (Zhang *et al.* 1990) y con el gen de la hormona de crecimiento del salmón coho que inyectado en la misma especie determinó crecimientos hasta de 11 veces superior a los no transgénicos (Devlin *et al.* 1994).

En la actualidad, se encuentran en desarrollo nuevas técnicas y se están mejorando las existentes para generar transgénesis, entre ellas el uso de transposones y retrotransposones así como la tecnología del ARN interferente, entre otros (Sarmasik 2003; Peñaranda & Asensio 2006; Estrada *et al.* 2007). En la medida en que se vayan perfeccionando las técnicas de transferencia génica, junto con otras técnicas del proceso igualmente importantes (mejoramiento de los transgenes), se podrán obtener mayores y más seguras aplicaciones.

LA ACUICULTURA Y LA TRANSGÉNESIS

Es importante destacar que la selección de una especie íctica para el desarrollo de un modelo transgénico, está dictada primordialmente por el potencial económico que revista la especie en base a características fenotípicas como el tamaño, tasa de crecimiento, de fecundidad, rápido desarrollo sexual y facilidad de adaptación a las condiciones de cultivo.

En los últimos años, la inserción de genes se ha aplicado en numerosas especies acuáticas dulceacuícolas y marinas que revisten una potencial importancia económica. Entre estas especies destacan el salmón del atlántico (*Salmo salar*), la carpa común (*Cyprinus carpio*), el bagre de canal (*Ictalurus punctatus*), varias especies de tilapia (*Oreochromis sp.*), el pez locha (*Misgurnus anguillicaudatus*) el medaka japonés (*Oryzias latipes*) y el pez cebra (*Danio rerio*) (Kapuscinski 2005; Iannaccone 2007)

Las diferentes áreas de aplicación de la transgénesis a la acuicultura se pueden resumir en los siguientes aspectos:

AUMENTO DE LA TASA DE CRECIMIENTO

La primera y más exitosa aplicación de la tecnología transgénica ha sido la producción de peces que aumentan su tasa de crecimiento por efecto de la inserción de un gen que codifica la hormona de crecimiento (GH). Al menos 14

especies de peces, que incluye salmones, truchas y tilapias han sido genéticamente modificadas con la inserción de este gen y la mayoría casi siempre crece más rápido que los controles no transgénicos (Van Eenennaam & Olin 2007). Económicamente el mayor crecimiento es un aspecto de suma importancia debido a que para la industria de la acuicultura se traduce en la disminución de los costos que conlleva que estos organismos alcancen un tamaño comercial (Fig. 7c).



Figura 7. c. Fotografía que muestra la proporción de crecimiento de tres semanas en peces transgénicos para la GH (izquierda) y no transgénicos (derecha) en la tilapia de cultivo *Oreochromis mossambicus* (Tomado de McClean *et al.* 2002).

De los trabajos de Devlin *et al.* (2004); Sundstrom *et al.* (2004) y Sundstrom *et al.* (2007) se puede resumir que el incremento en el crecimiento de animales transgénicos con el gen GH, es ampliamente dependiente de la disponibilidad de recursos. Detallan que la existencia de una buena

cantidad de alimento permite que el salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) transgénico, crezca significativamente más rápido que los individuos no transgénicos. Estos crecen sin condiciones de competencia y en ambientes separados.

Al mismo tiempo se ha demostrado que cuando estos organismos transgénicos y no transgénicos se crían en un mismo ambiente y con recursos suficientes, no se observa la competencia entre los grupos de organismos. En el medio natural donde la disponibilidad del espacio y el alimento es limitada y existe la presencia de predadores, los organismos transgénicos pueden desaparecer (Devlin *et al.* 2004).

Roberts *et al.* (2004) y Raven *et al.* (2008), señalan que el desarrollo y crecimiento del músculo son procesos dinámicos controlados por un número de factores que incluyen esteroides anabólicos, citocinas, ciclinas y hormonas, entre ellas la GH. Recientemente se han presentado resultados de la manipulación de proteínas asociadas al crecimiento muscular en peces, especialmente la miostatina en el pez medaka *Orizyas latipes* (Sawatari *et al.* 2010) y en la et altrucha arcoíris (Anonimo b, 2010).

Science Daily (2010) señaló que las truchas presentan deformaciones musculares como resultado de haber encontrado una manera de inhibir la miostatina, una proteína que frena el crecimiento muscular, aumentando el número de fibras musculares en los órganos de la trucha

arcoíris (Fig. 7d). Los resultados tienen implicaciones importantes para la acuicultura comercial y proporciona a su vez información completamente nueva sobre los mecanismos de crecimiento de los peces.



Figura 7. d. Ejemplares de truchas transgenicas con desarrollo muscular originado por la inhibición de la proteína miostatina (tomado de <http://www.gizmag.com/transgenic-muscle-trout/14488/>; <http://www.sciencedaily.com/releases/2010/03/100310113540.htm>).

La administración de alimentos y drogas en estados Unidos (FDA) decidió permitir la comercialización del salmón genéticamente modificado para suministro de alimento (Fig. 7e). Este salmón, como ya se sabe, crece dos veces más rápidamente que el normal, es el primer animal transgénico que se le da esta permisología en EE.UU. La empresa que creó este organismo considera que además de una alternativa alimentaria es una solución para reducir la presión de pesca en el salmón silvestre (Anónimo a 2010; Fox 2010).



Figura 7. e. Salmón del Atlántico transgénico (al fondo) y un salmón no transgénico, hermanos de la misma edad (Tomado de Fox, 2010).

Más allá del daño que el salmón transgénico podría causar al ambiente y a la economía pesquera, representa también un riesgo para la salud humana. No se han conducido estudios a largo plazo en cuanto a la seguridad de consumo de los organismos transgénicos, aunque científicos reconocen y han documentado ya la habilidad de organismos genéticamente modificados para dañar al humano y la salud animal (Le Curieux-Belfond *et al.* 2009).

La FDA no ha hecho nada por aclarar las inquietudes y preguntas surgidas de este tipo de estudios. Las investigaciones usadas por la FDA en sus análisis de la seguridad del salmón transgénico como alimento, fueron conducidas por la empresa productora de este salmón y sus contratistas. Ésta es una situación que carece de honestidad, especialmente cuando los estudios muestran que este salmón ha arrojado diferencias significativas en cuanto a su composición y nutrición (Anonimo b, 2010).

RESISTENCIA A BAJAS TEMPERATURAS

La aplicación de la tecnología transgénica para la obtención de peces resistentes a bajas temperaturas, está dirigida a ciertas especies cultivadas en regiones frías. Esto, se consigue mediante la introducción de genes codificantes para proteínas anticongelantes procedentes de especies polares, en las especies que se desea modificar. Cuatro tipos de proteínas anticongelantes estructuralmente diferentes (antifreeze proteins AFPs) y glicoproteínas anticongelantes (antifreeze glycoproteins AFGPs), se han caracterizado y clonado para una variedad de peces a partir de especies habituadas a vivir en aguas heladas, como *Pleuronectes americanus* y *Macrozoarces americanus*. Estas proteínas poseen la propiedad de inhibir las formaciones de cristales de hielo y atenuar el efecto de las bajas temperaturas. La generación de un pez transgénico tolerante a las bajas temperaturas, es beneficiosa en las granjas de cultivo en zonas frías (Galli 2002; Zbikowska 2003). La ventaja en este caso, se traduciría en que se abrirían nuevas posibilidades de cultivo de especies de

importancia económica provenientes de zonas tropicales para estas granjas de cultivo.

RESISTENCIA A ENFERMEDADES.

Las especies piscícolas, se cultivan generalmente en grandes densidades, por lo que están sujetas a condiciones susceptibles de contraer enfermedades debido a infecciones víricas, bacterianas, fúngicas o parasitarias que a su vez acarrearán pérdidas económicas importantes en el sector acuicultura.

La aplicación de técnicas transgénicas en peces, ha abierto la posibilidad de insertar construcciones génicas que confieren resistencia a algunas enfermedades que comúnmente se presentan en los sistemas de producción acuícola. Beardmore & Porter (2003) señalaron experiencias exitosas con la inyección de la secuencia del gen Cecropin B, en el bagre de canal *Ictalurus punctatus*, comprobándose su capacidad inmunizante contra las bacterias causantes de septicemias como *Flavobacterium columnare* y *Edwardsiella ictaluri*, observándose una mayor sobrevivencia en los peces transgénicos que en los organismos silvestres utilizados como control.

Hsieh *et al.* (2010) reportaron las propiedades de la Hepcidina de tilapia (*Oreochromis mossambicus*), un péptido antimicrobial secretado por el hígado durante procesos inflamatorios que juega un papel primordial en la homeostasis de los mamíferos. El gen para la Hepcidina fue insertado en el pez cebra *Danio rerio* y el cíclido

Archocentrus nigrofasciatus. También se insertó el gen de la proteína fosforescente GFP como indicador de la transmisión en la línea germinal. Los peces transgénicos expuestos a la bacteria *Vibrio vulnificus*, mostraron diferencias significativas en la reducción del número de células infectadas por bacterias luego de 24 horas, es decir se produjo la inhibición del crecimiento bacterial. Resultados similares obtuvieron Peng *et al.* (2010) en peces cebras.

APLICACIONES TERAPÉUTICAS Y MODELOS EXPERIMENTALES

Los organismos acuáticos y especialmente los peces, han crecido en importancia como modelos para llevar a cabo investigaciones básica, y como biorreactores o fábricas que producen proteínas farmacéuticas para tratamiento de enfermedades y vacunas tanto en el área de la acuicultura como la salud humana (Schmale *et al.* 2007). En esta última, Morita *et al.* 2004 publicaron el primer informe en cuanto a la producción exitosa de gonadotropina recombinante originada en ciprinidos. Estos resultados, demuestran que los biorreactores son una herramienta potencialmente poderosa para la producción de proteínas recombinantes funcionales. Pohajdak *et al.* (2004) evidenciaron en su investigación la producción de una insulina en tilapias transgénicas que podría llegar a ser una fuente adecuada y económica de este compuesto.

Los peces transgénicos, también se han utilizado

como herramienta en la investigación para la caracterización del cáncer de piel. Los melanocitos de humanos y peces son muy similares, y las proteínas que regulan la sobrevivencia de estas células son altamente conservadas. Tres de los genes que codifican la activación para el cáncer de piel en el pez cebra (*Danio rerio*) son los mismos que codifican en humanos. Las experiencias se han llevado a cabo en ejemplares del género *Xyphophorus* y la especie *Danio rerio* (Begeman 2009).

Gabillard *et al.* (2010) llevaron a cabo la producción de truchas transgénicas fluorescentes (*Oncorhynchus mykiss*) para estudiar la diferenciación *in vitro* de células miogénicas. Las truchas transgénicas exhiben fluorescencia en sus fibras musculares, por lo que el uso de estas células *in vitro*, tiene numerosas aplicaciones en la fisiología de peces.

MONITOREO AMBIENTAL

Los peces transgénicos pueden servir como sistemas de detección de contaminantes en el agua. Existen líneas de pez cebra que contienen un gen indicador, normalmente el de la proteína verde fluorescente (GFP) originalmente aislado a partir de la especie de medusa *Aequorea victoria*. Esta proteína es intrínsecamente fluorescente, lo cual permite su visualización sin necesidad de un sustrato para una reacción química. Su expresión está bajo el control de un elemento inducible por algún contaminante del agua. Así, se han utilizado promotores que responden a choques

térmicos, a metales pesados, o a hidrocarburos aromáticos. El cambio a un color específico en el pez cebra bioindicador y transgénico, sería indicativo de la presencia de un determinado elemento contaminante. Éste es un método promisorio en el contexto de la evaluación ecotoxicológica y el impacto de sustancias contaminantes producidas por actividades antrópicas (Muñoz-Forcada 2006; Carvan *et al.* 2000; Tsai 2008; Le Curieux-Belfond *et al.* 2009; Gabillard *et al.* 2010).

Kusik *et al.* (2008) utilizaron al pez cebra transgénico como indicador para describir los niveles de mercurio inorgánico presentes en el agua. La expresión del transgen se observa sólo en animales expuestos y demuestra un modelo dependiente de la dosis subletal. Las modificaciones al diseño del transgen para futuras líneas, pueden estar dirigidas a aumentar la sensibilidad y utilidad de estos ensayos.

TRANSGÉNICOS ORNAMENTALES

El incremento en la demanda a nivel mundial de peces ornamentales, ha abierto un mercado a nuevas variedades con novedosas formas y colores que han sido obtenidas a través de tecnología transgénica.

Uno de los genes que tradicionalmente se ha utilizado en la creación de animales transgénicos, ha sido el de la proteína fluorescente verde, señalado anteriormente. El ADN de este gen ha sido modificado para que emita

fluorescencia en diferentes espectros de emisión y hoy se encuentran disponibles genes productores de proteínas fluorescentes de varios colores, entre ellos amarillo, azul, cian, etc. Una aplicación para estos genes productores de proteínas de colores, ha sido la de obtener peces ornamentales transgénicos que sinteticen proteínas fluorescentes en el músculo (Fig. 7f).

El primer pez transgénico comercial en EEUU fue un pez cebra que expresaba fluorescencia amarilla, denominado "GloFish" y comercializado con fines ornamentales. La tecnología transgénica, ha sido sucesivamente usada para generar peces cebra y medakas fluorescentes como propuestas ornamentales (Fig. 7g y 7h)

Esta tecnología ha sido aplicada a otras especies de peces ornamentales. Pan *et al.* (2008) utilizando el tetra *Gymnocorymbus ternetzi* (viuda negra) evaluaron la obtención de un pez transgénico ornamental (Fig. 7i) insertándole el gen para la proteína fluorescente roja y el promotor del pez cebra. El color rojo obtenido en los ejemplares adultos puede verse de manera normal con luz de día. Este estudio, demostró la factibilidad de usar los promotores caracterizados del pez cebra para la producción de peces ornamentales utilizando otras especies.

Los cíclidos también se han utilizado para la obtención de transgénicos ornamentales, especialmente el conocido cíclido convicto (Fig. 7j) (Pelliciarì 2010, en <http://www.uopload.wikimedia.org/genetics>



Figura 7. f. Ejemplares del Pez cebra transgénico fluorescente Glofish, un nuevo tipo de pez ornamental. La fotografía muestra tres rojos fluorescentes, tres verdes fluorescentes y dos peces cebras silvestres (identificados como WT). (Tomado de Gong *et al.* 2003).

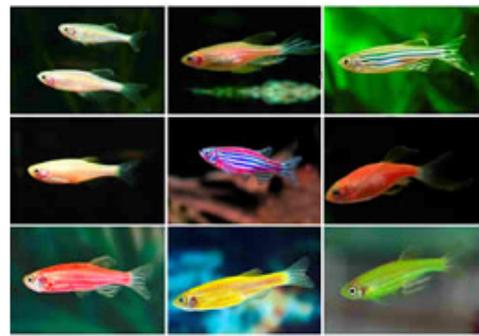


Figura 7. g. Modificaciones genéticas de *Danio rerio*. (Tomado de Van den Brandhof & Banus 2009).



Figura 7. h. Modificaciones genéticas de *Oryzias latipes*. (Tomado de Van den Brandhof & Banus 2009).

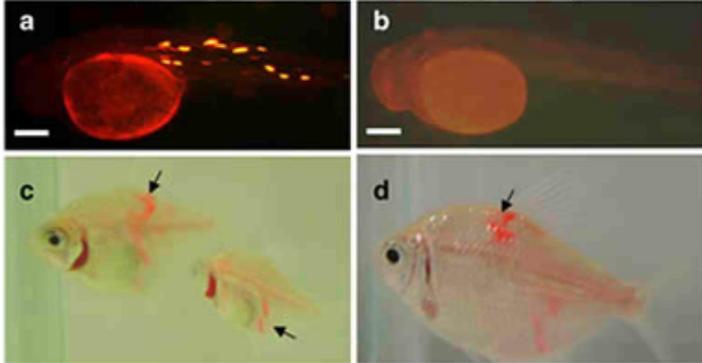


Figura 7. i. Expresión de la proteína fluorescente durante el desarrollo embrionario (a y b) y en el músculo del pez ornamental transgénico *Gymnocorymbus ternetzi* (c y d). Parte superior al centro, fotografía de un ejemplar no transgénico (Tomado de Pan *et al.* 2008).

155



Figura 7. j Cíclido convicto *Archocentrus nigrofasciatus* modificado genéticamente (Tomado de Hsieh *et al.* 2011)

156

CAPÍTULO 8

EPIGÉNESIS Y ACUICULTURA

Un aspecto muy poco estudiado en la acuicultura, pero que probablemente llegará a tener una gran importancia en el mejoramiento de las especies acuáticas, se refiere a los cambios epigenéticos. El término epigénesis, se refiere a los procesos mediante los cuales se presentan modificaciones heredadas de la función génica, que no se deben a cambios en la secuencia de las bases del ADN en los organismos. Las secuencias permanecen inalteradas, solamente el ambiente mecánico, químico y factores bióticos, tales como la presencia de depredadores afectan la expresión fenotípica (Kardong 2003).

Como lo han señalado Jablonka & Raz (2009), la adaptación de especies a nuevos ambientes, puede ocurrir de manera rápida mediante la selección de variantes epigenéticas, sin ningún tipo de cambios genéticos, como ocurre en los procesos en que se transfieren grupos metilos a bases nitrogenadas, condición reguladora del silenciamiento de los genes, lo que puede ocasionar cambios en la transcripción genética sin necesidad de que se produzca modificación en la secuencia de ADN.

Esto tiene una particular importancia cuando las poblaciones son pequeñas y han perdido variación genética, como ocurre en los cultivos de invertebrados y peces, en los que se usan unos pocos progenitores debido a su elevada fecundidad. Las variantes epigenéticas surgen a

menudo, cuando las condiciones ambientales cambian, de manera que varios individuos en la población pueden adquirir modificaciones similares, al mismo tiempo. Los mecanismos epigenéticos al parecer, permiten a un organismo responder al ambiente a través de cambios en la expresión génica (Jaenisch & Bird 2003).

Bossdorf *et al.* (2008) señalaron que existen numerosas evidencias que indican que los procesos epigenéticos constituyen un importante componente de la hibridación y poliploidización y por lo tanto, pueden jugar un papel clave en la especiación y en la biología de muchas especies invasoras y en su cultivo.

Entre los escasos trabajos que relacionan epigénesis con acuicultura se destacan el de Balon (2006) y el de McKenzie & Roberts (2010). Balon (2006) señaló que la presencia de fenotipos alternativos en algunas especies se explica por diferencias en la provisión de alimento endógeno (yema del huevo) en el desarrollo temprano, entre otros factores y son la respuesta a ambientes cambiantes. Identificados a tiempo, estos ajustes (cambios epigenéticos) podrían tener importantes implicaciones en los sistemas de cultivos.

Por otra parte McKenzie & Roberts (2010) señalan que se han investigado las posibles consecuencias de la metilación del ADN en la ostra del Pacífico (*Crassostrea gigas*). Los resultados sugieren que éste, es un proceso común en el genoma de la ostra y que los genes tienen diferentes niveles de metilación. La metilación del ADN

tiene importantes funciones reguladoras en *C. gigas*, especialmente en las familias de genes envueltos en estrés y respuestas al ambiente. Los autores analizan las implicaciones de estos avances en términos de aplicaciones a la acuicultura.

GLOSARIO

A

ÁCIDO NUCLÉICO: macromolécula formada por una repetición de nucleótidos unidos mediante enlaces fosfodiéster, son de dos tipos: ácido desoxirribonucleico (ADN) y ácido ribonucleico (ARN).

ACUICULTURA: conjunto de actividades, técnicas y conocimientos de cultivo de especies acuáticas vegetales y animales. Importante actividad económica de producción de alimentos, materias primas de uso industrial, farmacéutico y organismos vivos para repoblamiento u ornamentación.

ADAPTABILIDAD: capacidad de adaptación de un organismo, medible por el número de progenie que origina, en comparación con el promedio de la población o comparado con individuos de diferentes genotipos.

ADN RECOMBINANTE. Segmento de ADN diseñado y elaborado in vitro que es utilizado para inducir una modificación genética en un organismo receptor.

ALELO O ALELOMORFO: cada una de las formas alternativas de un gen en un locus determinado. Cuando los alelos de un locus son idénticos en un individuo, a éste se le llama homocigoto y cuando son diferentes se les denomina heterocigoto para ese gen.

ALOPOLIPLOIDE: organismo poliploide, resultado de la

combinación de dos conjuntos distintos de cromosomas. En oposición a los autoploidios, en que los dos conjuntos de cromosomas son iguales.

ALOZIMA: forma alternativa de una enzima, codificada por alelos diferentes en un mismo locus.

AMINOÁCIDOS: compuestos orgánicos que contienen los grupos amino (NH_2) y carboxilo (COOH) que se polimerizan para formar proteínas.

ANEUPLOIDE: célula, tejido u organismo que tiene deficiencia o exceso de uno o más cromosomas en relación al número diploide. Monosómico ($2n-1$); nulisómico ($2n-2$); trisómico, ($2n+1$).

B

BACTERIA: son microorganismos unicelulares, procariotas y, por lo tanto, a diferencia de las células eucariotas, no tienen el núcleo definido.

BACTERIÓFAGO: virus considerado como parásito intracelular obligado, que infecta exclusivamente a las bacterias.

BASENUCLEOTÍDICA: estructura plana en forma de anillo compuesta por nitrógeno, carbono, oxígeno e hidrógeno, que forma parte de los nucleótidos de la cadena de ácidos nucleicos. Las bases son de dos tipos: púricas

(adenina y guanina) y pirimidicas (citosina, timina y uracilo).

BIBLIOTECA GENÓMICA: colecciones de material genético en forma de semillas, tejidos o células reproductoras de plantas o animales. También se considera como biblioteca genómica la colección de fragmentos clonados del ADN de un genoma, mantenidos dentro de bacterias o levaduras.

BIODIVERSIDAD: también conocida como diversidad biológica, refleja la cantidad, variedad y variabilidad de los organismos vivos. Incluye la diversidad dentro de una especie (diversidad específica), entre especies distintas (diversidad de especies) y entre ecosistemas (diversidad de ecosistemas).

BIOFÁRMACO: producto farmacéutico que se produce por biotecnología. Se refiere a un amplio grupo de moléculas, incluyendo las proteínas recombinantes, anticuerpos monoclonales, y moléculas usadas en terapia génica.

BIOLOGÍA MOLECULAR: rama de las ciencias biológicas, que estudia los fenómenos vitales a nivel molecular.

BIOTECNOLOGÍA: toda aplicación tecnológica que utilice sistemas biológicos y organismos vivos o sus derivados, para la creación o modificación de productos o procesos de interés para el hombre.

C

CARGA GENÉTICA: proporción en la cual la adaptabilidad del genotipo óptimo disminuye por la presencia y expresión de alelos deletéreos.

CARIOTIPO: complemento cromosómico de una especie o individuo encontrado en el núcleo de las células somáticas. La representación diagramática de los cromosomas, ilustrando sus tamaños relativos y apariencia, recibe el nombre de Idiograma.

CÉLULA GERMINAL: célula sexual capaz de dar origen a un gameto en animales multicelulares. Generalmente se origina muy temprano en el desarrollo.

CÉLULA: la unidad funcional de la materia viva que se encuentra rodeada por una membrana que la separa del ambiente externo. Contiene ácidos nucleicos que almacenan la información génica, ribosomas, donde se construyen las proteínas y demás organelos y mecanismos que convierten la energía de una forma a otra.

CIGOTO: célula diploide resultado de la fusión de dos gametos.

CITOCALASINA B: una de varios metabolitos producidos por mohos del género *Helminthosporidium*, que puede inhibir la formación de microfilamentos, durante el proceso de división celular. Es muy utilizada en la formación de organismos poliploides

CITOPLASMA: sistema coloidal que se encuentra en el interior de la célula, rodeado por la membrana plasmática. Está formado por diversas sustancias en una solución acuosa (citósol) y donde se ubican los organelos celulares.

CLONACIÓN DE GENES: método mediante el cual un fragmento de ADN que contiene un gen, se trasfiere a un microorganismo para producir millones de copias idénticas de este ADN.

CÓDIGO GENÉTICO: tripletas consecutivas de nucleótidos del ADN y del ARN que se traducen en secuencias de aminoácidos en las células vivas durante el proceso de síntesis de proteínas.

CODÓN: grupo de tres nucleótidos cuyo ordenamiento preciso codifica la incorporación de un aminoácido específico en una cadena polipeptídica durante la síntesis de proteínas. Existen además, codones que no codifican para aminoácido alguno y actúan como señales de inicio o término de lectura.

COEFICIENTE DE SELECCIÓN (S): expresión que indica la selección relativa contra un determinado genotipo.

CROMOSOMAS: estructuras subcelulares, que consisten de masas condensadas de cromatina, visibles al microscopio óptico en células que se encuentran en procesos de división. Los cromosomas pueden ser sexuales o autosómicos.

CROMATINA: material cromosómico en estado de interfase. Conjunto formado por el ADN, las histonas y proteínas no histónicas que se encuentran en el núcleo de las células eucarióticas.

D

DEFICIENCIA O DELECCIÓN: pérdida de un segmento de material genético de un cromosoma, que puede variar desde un solo nucleótido a secciones que contienen varios genes.

DERIVA GENÉTICA: fluctuaciones al azar de las frecuencias génicas de generación en generación. Aunque ocurre en todas las poblaciones, sus efectos son más notorios en poblaciones pequeñas.

DISYUNCIÓN: la separación de los cromosomas homólogos (en el caso de la mitosis y la meiosis I) o de las cromátidas (en el caso de la meiosis II) durante la anafase de la división celular.

DOBLE HÉLICE: Estructura molecular para el ADN propuesta por Watson y Crick, que consta de dos hélices afines unidas por enlaces de hidrógeno que se establecen entre las bases apareadas.

DOMINANCIA GENÉTICA: predominio de la expresión de un alelo sobre la de su alternativo (llamado recesivo), ocultando sus efectos.

DUPLICACIÓN: cambio en la estructura del cromosoma, donde un segmento del mismo aparece repetido. Esta considerado como una aberración cromosómica.

E

ECOSISTEMA: un complejo dinámico de comunidades vegetales, animales y de microorganismos y su medio no viviente, que interactúan como una unidad funcional.

EFFECTO FUNDADOR: efecto genético en el que uno o unos pocos individuos de una especie originan una población. Estos fundadores, no representan todo el pool génico de la población original y pueden presentar caracteres diferentes.

ELECTROFORESIS: técnica para separar moléculas presentes en una solución, según su tamaño y carga eléctrica. La solución es incorporada en un medio estabilizador, como papel o geles en lugares específicos, de forma tal que, al ocurrir la migración por efecto del campo eléctrico se separan las diferentes proteínas. La identificación de la posición final de una determinada molécula se obtiene por el empleo de tinciones específicas.

ENZIMAS DE RESTRICCIÓN: también conocidas como endonucleasas de restricción, son enzimas que reconocen una secuencia particular de ADN y cortan los enlaces fosfodiéster. Son extraídas de organismos procarióticos

(bacterias), donde actúan como un mecanismo de defensa, para degradar material genético extraño que entre en la célula.

ENZIMA: proteína que actúa como catalizador en una reacción química específica.

EPISTÁSIS: interacción de genes no alélicos.

EQUILIBRIO GENÉTICO: situación en la cual las frecuencias de dos o más alelos de un gen permanecen constantes de generación en generación.

EUCARIONTE: organismo superior compuesto, de células con núcleos bien definidos (rodeados por membranas). Por el contrario, los procariontes son organismos inferiores (virus, bacterias, algas verde azules) que no tienen un núcleo bien definido.

EUPLOIDE: célula u organismo con un número cromosómico múltiplo exacto del número haploide (o monoploide) n . Los términos empleados para identificar diferentes niveles en una serie euploide son: diploides ($2n$), triploides ($3n$), tetraploides ($4n$).

EXÓN: secuencia de codificación para la síntesis de proteínas de los genes. En los eucariontes están separados por los intrones que son secuencias que no codifican.

EXPRESIVIDAD: grado en el cual un gen produce un efecto fenotípico.

F

F1: la primera generación filial obtenida cuando se cruzan dos organismos. La generación paterna que produce la F1 se denomina P1. El cruce de miembros de la F1 produce la generación F2, la segunda generación filial.

FECUNDACIÓN: fusión de los gametos femenino y masculino para formar el cigoto.

FENOTIPO: caracteres de un organismo resultado de la expresión del genotipo modificado por las influencias del ambiente. Originalmente el término se empleó para referirse a las características observables, tales como forma, color, conducta, forma; pero ahora se usa en sentido más extenso e incluye caracteres moleculares y microscópicos.

FIJACIÓN DE ALELOS: estado en el cual todos los miembros de una población son homocigotos o hemicigotos para un determinado alelo.

FLUJO GÉNICO: movimiento de alelos de una población a otra. Este flujo permite el aumento de la variación genética en la población receptora.

FRECUENCIA GÉNICA (O ALÉLICA): la proporción en la cual se presentan alelos alternativos de un gen, en una población.

G

GAMETOGÉNESIS: proceso de formación de gametos: espermios y óvulos.

GEN: unidad básica hereditaria formada por una secuencia de ADN que ocupa una posición fija (locus) en un cromosoma.

GENÉTICA DE POBLACIONES: rama de la genética que estudia el comportamiento de los genes en las poblaciones; también puede definirse como la rama de la genética que describe en términos matemáticos, las consecuencias de la herencia mendeliana a nivel poblacional.

GENÉTICA: rama de la biología que estudia la herencia y la variación.

GENOMA: conjunto total de genes que lleva un gameto, o está presente en el núcleo de la célula haploide de un determinado organismo.

GENOTIPO: constitución genética total de un organismo o de uno o más loci.

GÓNADAS: tejidos involucrados directamente con la producción de células reproductivas: ovarios y testículos.

H

HÁBITAT: lugar o tipo de ambiente en el que existen naturalmente un organismo o una población.

HEMICIGÓTICO: la condición en la cual solamente un alelo de un par está presente, como los alelos de los cromosomas sexuales o resultantes de delección.

HERENCIA CITOPLASMÁTICA: transmisión de caracteres hereditarios por medio del citoplasma.

HERENCIA: transmisión de genes de padres a la prole.

HERMAFRODITAS: individuos que poseen órganos reproductivos masculinos y femeninos. En algunos casos, un órgano aparece antes que otro: **hermafroditismo secuencial** (organismos protándrico y protogínicos); en otros se presentan ovarios y testículos al mismo tiempo: **hermafroditismo simultáneo o funcional**.

HETEROCIGOSIDAD: condición en que se tiene uno o más alelos diferentes en genes determinados. Se acostumbra usar el término en relación a un locus, al individuo o a la población.

HOMOCIGOSIDAD: condición en la cual ambos miembros de un par de alelos son idénticos, o muchos pares de alelos en loci diferentes son idénticos. Se acostumbra usar el término en relación a un locus, al

individuo o a la población.

HORMONAS: moléculas orgánicas sintetizadas en un tejido, cuyo efecto se ejerce sobre otro(s) tejido(s). Sustancias secretadas por células especializadas, localizadas en glándulas de secreción interna o glándulas endocrinas (carentes de conductos), o también por células epiteliales e intersticiales cuyo fin es la de afectar la función de otras células.

HUSO ACROMÁTICO: estructura compuesta por microtúbulos que aparece en células eucarióticas al comienzo de la división nuclear y es responsable por la separación ordenada de los cromosomas, los cuales se unen a las fibras del huso por sus centrómeros.

I

INGENIERÍA GENÉTICA: parte de la biotecnología que se basa en la manipulación genética de los organismos para hacerlos más aprovechables por el hombre.

INTROGRESIÓN: movimiento de genes de una especie a otra a consecuencia de un proceso de hibridación interespecífica.

INTRÓN: secuencia no traducida de la secuencia codificadora de un gen. Estas secuencias son transcritas en ARNm, pero luego son eliminadas y no son representadas en el mensaje durante la síntesis de

proteínas.

INVERSIÓN: rearrreglo de un grupo de genes en un cromosoma de forma tal que su orden en el cromosoma es invertido. Pueden ser paracéntricas, que es una inversión en uno de los brazos del cromosoma y no incluye el centrómero, o pericéntricas, que incluyen el centrómero.

ISOZIMAS (ISOENZIMAS): formas múltiples alternativas de una determinada enzima presente en un organismo.

L

LIGAMIENTO GENÉTICO: asociación de loci genéticos que tienden a heredarse juntos.

LIGASA: tipo de enzima que puede unir de nuevo un enlace fosfo-diéster roto en un ácido nucléico.

LÍNEAS PURAS O CONSANGUÍNEAS: poblaciones de organismos que son homocigotos como resultado de un proceso continuo de consanguinidad.

LOCUS (pl.loci): sitio específico de un cromosoma donde está localizado un gen.

M

MATERIAL GENÉTICO: todo material de origen vegetal,

animal o microbiano que contenga unidades funcionales de la herencia.

MENDELISMO: la herencia de los genes de acuerdo a las leyes de Mendel.

MIGRACIÓN: movimiento de individuos de una población a otra, que resulta en la transferencia de material que puede cambiar las frecuencias génicas en la población receptora.

MITOCONDRIA: pequeño corpúsculo citoplasmático, especializado en la transformación de la energía química proveniente de diversas fuentes en una biológicamente utilizable. Este organelo contiene ADN y es capaz de multiplicarse independientemente de la división celular.

MONOHÍBRIDO: organismo que, de acuerdo a un determinado cruce, es heterocigoto para un solo par de alelos.

MONÓMERO: una molécula simple de peso molecular relativamente bajo. Cuando se unen dos monómeros se forma un dímero, trímeros, tres subunidades, etc.

MOSAICO: organismo, parte del cual está constituido por tejido genéticamente diferente del resto.

MUTACIÓN: proceso mediante el cual un gen o un cromosoma sufren un cambio en su estructura, a menudo originados durante la replicación del mismo. Si la mutación

ocurre en los gametos es heredada por las siguientes generaciones.

MUTACIÓN CROMOSÓMICA (ABERRACIÓN CROMOSÓMICA): mutación que comprende una gran cantidad de ADN o sus rearrreglos y a menudo son visibles al microscopio, tales como inversiones, deleciones, duplicaciones, translocaciones.

MUTACIÓN PUNTUAL: cambio en la estructura de un gen que no es detectable al microscopio, pero resulta en errores de lectura en uno o más codones con los consiguientes errores en la secuencia aminoacídica de la proteína involucrada.

N

NÚCLEO: parte de una célula que contiene los genes, rodeada por una membrana nuclear que lo separa del citoplasma.

NUCLÉOLO: estructura dentro del núcleo de algunas células, sitio de almacenamiento de ARN ribosómico.

NUCLEÓTIDO: moléculas orgánicas formadas por la unión covalente de un monosacárido de cinco carbonos (pentosa), una base nitrogenada y un grupo fosfato. El nucleósido es la parte del nucleótido formado únicamente por la base nitrogenada y la pentosa.

O

ORGANISMO GENÉTICAMENTE MODIFICADO (OGM) Ó TRANSGÉNICO: organismo que lleva en su genoma copias de construcciones de ADN que han sido introducidas mediante tecnología de ingeniería genética.

P

PANMIXIA: condición en la cual los cruces en una determinada población ocurren al azar.

PARTENOGENÉISIS: el desarrollo de un nuevo individuo de un óvulo sin fertilizar.

PLÁSMIDO: pequeño fragmento circular de ADN presente en bacterias. Algunos contienen secuencias de ADN que codifican para genes de resistencia a varios antibióticos o que determinan la virulencia o transmiten información sobre rutas bioquímicas.

PLEIOTROPÍA: Condición en la que un solo gen influye en más de un rasgo fenotípico de un organismo.

POBLACIÓN: grupo de organismos de la misma especie que comparten un "pool" génico y existen en un tiempo y área geográfica definida.

POBLACIÓN MENDELIANA: comunidad de individuos que poseen reproducción sexual y donde se aplican los

principios mendelianos a la transmisión de genes.

POBLACIÓN PANMÍTICA: es aquella en la cual los individuos se cruzan al azar y cada individuo tiene la misma oportunidad de cruzarse con otro del sexo opuesto.

POLIGEN: grupo de genes que afectan un carácter cuantitativo, como velocidad de crecimiento por ejemplo.

POLIMERASA: enzima que lleva a cabo la síntesis de un ácido nucleico, usando un molde pre-existente y los nucleótidos apropiados (es decir, ribonucleótidos para el ARN y desoxirribonucleótidos para el ADN).

POLÍMERO: molécula compuesta por subunidades repetidas o monómeros.

POLIMORFISMO: existencia en una población de múltiples alelos de un gen. Aquellos polimorfismos que afectan a la secuencia codificante o reguladora y que producen cambios importantes en la estructura de la proteína o en el mecanismo de regulación de la expresión, pueden traducirse en diferentes fenotipos (por ejemplo, el color de las conchas de algunas especies de moluscos).

POLIPLOIDE: célula, tejido u organismo con más de dos conjuntos de cromosomas, triploides (3n), tetraploides (4n), etc. -

POZA GÉNICA O "POOLGÉNICO": la suma total de todos los alelos de los gametos de una población, en un

tiempo determinado.

PRESIÓN DE SELECCIÓN: fuerza que le da sus características a los organismos a medida que evolucionan, debido a mutaciones, deriva génica y selección natural.

PRINCIPIO DE HARDY -WIENBERG: establece que si formas alternas de un gen autosómico están presentes en una gran población panmítica, en ausencia de mutación, selección o migración diferencial, las proporciones originales (frecuencias génicas) se mantendrán de generación en generación, y luego de una generación la proporción de genotipos alcanzará un estado de equilibrio.

PROMOTOR. Región del ADN que controla la iniciación de la transcripción de dicho gen a ARN. El promotor está presente tanto en procariontes como eucariontes.

PRONÚCLEO FEMENINO: núcleo haploide de un óvulo producido por divisiones meióticas. Los otros núcleos resultantes de estas divisiones son eliminados como corpúsculos polares. Su fusión con el núcleo del espermio resulta en la formación del cigoto.

PRONÚCLEO MASCULINO: núcleo haploide del gameto masculino.

R

RECESIVO: miembro de un par de alelos que se

expresa en el estado homocigoto pero no en el heterocigoto. En el heterocigoto, su expresión fenotípica es enmascarada por el alelo dominante.

RECOMBINACIÓN: formación de nuevas combinaciones de genes como resultado de la segregación en los cruces entre padres genéticamente diferentes. Constituye un proceso natural que genera diversidad genética.

RECURSOS GENÉTICOS: conjunto de genes de una población, especie etc. que constituye la materia prima para la adaptación a los cambios del medio ambiente.

REGIONES FLANQUEANTES: secuencias de ADN que se extienden a uno y otro lado de un gen o de un locus.

REPETICIÓN EN TÁNDEM: copias múltiples de una misma secuencia de bases en un cromosoma.

RIBOSOMAS: estructuras globulares compuestas de ribonucleoproteínas, que actúan durante la síntesis de proteínas en la etapa de traducción.

S

SECUENCIA COMPLEMENTARIA: secuencia de las bases de ácidos nucleicos que dan forma a la estructura de doble cadena con otro fragmento, siguiendolas reglas de A se aparea con T y C con G. Por ejemplo, la secuencia

complementaria CTAG es CATG.

SECUENCIAR: determinar el orden de los nucleótidos en una molécula de ADN o de ARN, o el orden de los aminoácidos en una proteína.

SEGREGACIÓN: la separación de los cromosomas paternos y maternos en la meiosis y la correspondiente separación de alelos.

SELECCIÓN: cualquier proceso natural o artificial que favorezca la supervivencia y reproducción de ciertos individuos.

SELECCIÓN NATURAL: proceso mediante el cual los organismos mejor adaptados desplazan lentamente a los organismos menos adaptados. Conduce a la acumulación lenta de cambios genéticos favorables en una población.

SOBREDOMINANCIA: condición en que los heterocigotos son superiores a los homocigotos.

STOCK: término utilizado en pesquería y acuicultura para describir un grupo de individuos que comparten un "pool génico".

SUBESPECIE: subdivisión de una especie aislada geográficamente que tienen caracteres distintivos pero no está reproductivamente aislada.

T

TAXÓN: unidad de rango taxonómico en cualquier nivel de la escala jerárquica.

TRADUCCIÓN: síntesis de proteínas con una secuencia aminoacídica dictada por el código de tripletes de bases en el ARN mensajero. Los sitios de la traducción son los ribosomas. Una molécula de ARN se asocia normalmente a varios ribosomas, denominándose al grupo como polisoma.

TRANSFERENCIA HORIZONTAL DE GENES: movimiento de genes de un individuo a otro de la misma o diferente especie, generalmente por medios distintos al cruzamiento.

TRANSCRIPCIÓN: el proceso a través del cual se trasfiere la información contenida en el ADN al ARN.

TRANSPOSÓN: secuencia de ADN que puede moverse de manera autosuficiente a diferentes partes del genoma de una célula, un fenómeno conocido como transposición. En este proceso, se pueden causar mutaciones y cambio en la cantidad de ADN del genoma.

U

UNIVALENTE: cromosoma no apareado en meiosis.

V

VARIACIÓN GENÉTICA: distintas variantes del material genético de una población o especie. Los procesos que afectan la variabilidad genética son la selección natural y la deriva genética.

VARIEDAD: grupo de organismos dentro de una especie, con uno o más características distintivas. A menudo se mantienen solamente por domesticación y selección artificial, ejemplo una nueva variedad de maíz.

VECTOR: en genética, agente que transfiere información genética, de un organismo a otro. Un ejemplo son los plásmidos, con los que es posible insertar genes foráneos al núcleo de una célula. También se les puede considerar vectores genéticos a todo tipo de virus, puesto que su principal función es insertar información genética en otras células.

VIABILIDAD: cualidad de ser viable. Que tiene probabilidad de llevarse a cabo o de concretarse gracias a sus características.

VIRUS. Partícula no celular, constituida por un ácido nucleico y una envoltura proteica; es parásita y sólo se reproduce en el interior de las células vivas.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ADAMKEWICK, L. & M. CASTAGNA. 1988. Genetics of shell colour and pattern in the bay scallop *Argopecten irradians*. *J. Heredity*. 79: 14 - 17.

AGRESTI J. J., S. SEKI, A. CNAANI, S. POOMPUANG, E. M. HALLERMAN, N. UMIEL N, G. HULATA, G. A. E. GALL & B. MAY. 2000. Breeding new strains of tilapia: development of an artificial center of origin and linkage map based on AFLP and microsatellite loci. *Aquaculture*. 185: 43-56.

ALFONSI, C. & J. E. PÉREZ. 1995. Control de la determinación sexual en organismos acuáticos cultivados. *Saber*. 6: 11 - 20.

ALFONSI, C., O. NUSETTI & J. E. PÉREZ. 1995. Heterozygosity and metabolic efficiency in the scallop *Euvola ziczac* (L 1758). *J. Shellfish Res.* 14(2): 389-393.

ALLEN, S. K. JR. & S. L. DOWNING. 1991. Consumers and "experts" alike prefer the taste of sterile triploid over gravid diploid Pacific oysters (*Crassostrea gigas* Thunberg, 1793). *J. Shellfish Res.* 10: 19 - 22.

ALLEN, S. K. JR. 1988. Triploids oysters ensure year-mund supply. *Oceanus*. 31: 58-63.

ALMEIDA ALOISE, D., F. MAIA-LIMA, R. MEDEIROS DE OLIVEIRA, T. MELO CABRAL & W. F. MOLINA. 2011.

Ploidy manipulation and polyploid detection in the white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone 1931) (Decapoda, Penaeidae). *Mar Biotechnol.* 13:41-47.

AMIRI-MOGHADDAM, J., F. MANIEI, N. MAHBOOBI-SOOFIANI & S. ASADOLLA. 2010. Use of 17 α -methyltestosterone for production of male secondary sexual characteristics in the adult female green swordtail (*Xiphophorus hellerii*). *AAACL Bioflux.* 3 (1): 1-8.

ANONIMOA. 2010. Frankenfish. How genetically engineered salmon could hurt our health and environment. Food & Water Watch, Septiembre 2010. Disponible en: www.foodandwatch.org

ANONIMOB. 2010. Development of more muscular trout could boost commercial aquaculture. Science Daily, marzo 2012. Disponible en: www.sciencedaily.com/releases/2012/03/10031011.htm

BABUCHKINE, Y. 1987. La selection d'une carpe resistant a l'hiver. Proc. World Symp. on Selection, Hybridization and Genetic Engineering in Aquaculture, Bordeaux 1986. 1: 447-454. Berlin 1987.

BAGHURST, B. C., & J. G. MITCHELL. 2002. Sex-specific growth and condition of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg). *Aquac. Res.* 33: 1253-1263.

BAGLEY, M. J., S. L. ANDERSON & B. MAY. 2001. Choice of methodology for assessing genetic impacts of

environmental stressors: polymorphism and reproducibility of RAPD and AFLP fingerprints. *Ecotoxicology* 10: 239-244.

BALON, E. K. 2006. The oldest domesticated fishes, and the consequences of an epigenetic dichotomy in fish cultura. *J. Ichthyol.* 11(2): 47-86.

BEARDMORE, J. A. & J. S. PORTER. 2003. Genetically modified organisms and aquaculture. FAO Fisheries Circular. No. 989. Rome, FAO. 38p.

BEATTIE, J. H., J. PARDUE, W. HERSBBERGER & K. CHEW. 1987. Effects of inbreeding on growth in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *J. Shellfish Res.* 6: 25-28.

BEAUMONT, A. P. & E. ZOUROS. 1991. Genetics of Scallops. In: *Scallops: Biology, Ecology and Aquaculture.* (S.E. Shumway, Ed.). pp: 585-623. Elsevier, Amsterdam.

BEAUMONT, A. R. & J. E. FAIRBROLHER. 1991. Ploidy manipulation in molluscan shellfish: A review. *J. Shellfish Res.* 10: 1-18.

BEAUMONT, A. R. & M. BUDD. 1983. Effects of self fertilization and other factors on the early development of the scallop, *Pecten maximus*. *Mar. Biol.* 76: 285-289.

BEGEMAN, G. 2009. Literature Review and Commentary. *Zebrafish.* 6 (4): 457-461.

BENZIE, J., M. KENWAY & L. TROTT. 1997. Estimates for the heritability of size in juveniles *Penaeus monodon* prawns for half-sib matings. *Aquaculture*. 152(1-4): 49-53.

BETANCOURT, R., J. E. PÉREZ, A. VELEZ, M. BRAVO, & L. FREITES. 1995. Efectos de la consanguinidad en la vieira *Euvola ziczac*. *Bol. Inst. Oceanogr. Venezuela*. 34: 69-75

BETANCURTT, J. J., A. F. MONTOYA, T. MIRA, F. A. ROJAS & A. M. OLIVERA. 2008. Estandarización del manejo y la crío preservación de semen de hembras masculinizadas de Trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). *Rev. Colomb. Cienc. Perú*. 21:340-350.

BHISE, M. P. & T. A. KHAN. 2002. Androgenesis: The Best Tool for Manipulation of Fish Genomes. *Turk J Zool*. 26: 317-325

BIDWELL, C. A., G. L. CHRISMAN & O. LIBEY. 1985. Polyploidy induced by heat shock in channel catfish. *Aquaculture*. 51: 25-32.

BLANCO, W. & I. FRAGA. 2003. Efecto de la ablación ocular en el crecimiento de juveniles de Langosta (*Panulirus argus*). II Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura. CIVA: 865-70. Disponible en:<http://www.civa2003.org>.

BØHN, T., T. TRAAVIK & R. PRIMICERIO. 2010. Demographic responses of *Daphnia magna* fed

transgenic Bt-maize. *Ecotoxicology*. 19:419-430.

BOSSDORF, O., C. L. RICHARDS, M. PIGLIUCCI. 2008. Epigenetics for ecologist. *Ecol. Lett.* 11: 106-115.

CAPOZZA TEBALDI, P. & H. AMARAL JUNIOR. 2009. Production of tetraploid Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by the application of thermal shock. *REDVET* 10 (10): 1-13. *Revista electrónica de Veterinaria*. ISSN: 1695-7504.

CARVAN, M. J., T. P. DALTON, G. W. STUART & D.W. NEBERT. 2000. Transgenic zebrafish as sentinels for aquatic pollution. *Ann. N Y Acad Sci*. 919:133-47.

CASTILLO-CAMPOS, L. F. 2006. Tilapia roja: Una evolución de 25 años, de la incertidumbre al éxito. Disponible en <http://www.industriacuicola.com/biblioteca/tilapia/tilapia%roja%20200>.

CHAKRABORTY, S. B. & S. BANERJEE, S. 2009. Culture of monosex Nile tilapia under different traditional and non-traditional methods in India. *W. J. Fish and Mar. Scienc.* 1(3): 212-217.

CHARO-KARISA, H., M. REZK, H. BOVENHUIS & H. KOMEN. 2005. Heritability of cold tolerance in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* juveniles. *Aquaculture*. 249(1-4): 115-123.

CHAVES HERNÁNDEZ, E. J., P. MORENO & H. HURTADO GIRALDO. 2008. Estudio morfológico e

histológico de la reversión sexual inducida en hembras espadas adultas *Xiphophorus helleri*, por tratamiento con 17 alfa metil testosterona. Rev. Fac. Cienc. Bás. 1 (1): 112-121.

CHEVASSUS, B., R. GUYOMARD, D. CHOURROUT & E. QUILLET. 1983. Production of viable hybrids in salmonids by triploidization. Gen. Sel. Evol. 15: 519-532.

CHOURROUT, D. 1984. Pressure induced retention of second polar body and suppression of first cleavage in rainbow trout: production of all triploids, all tetraploids and heterozygous and homozygous diploid gynogenetics. Aquaculture. 36: 111-126.

CHOURROUT, D., B. CHEVASSUS & R. GUYONARD. 1988. La mejora genética de los peces. Mundo Marino. 6: 1078-1080.

CHONG, L.K., S.G. TAN, K. YUSOFF & S.S. SIRAY. 2000. Identification and characterization of Malaysian river catfish *Mystus nemurus*: RAPD and RFLP analysis. Biochem. Genet. 38 (3-4): 63-76.

COLES, C., F. FIGUEROA, F. F. SÁNCHEZ, S. JORGE & C. LILIAN. 2006. Triploidía natural en *Rhamdia quelen* y *Prochilodus lineatus* (Pisces). Univ. Nac. Noreast. Com. Cient. Tecnol. 15:1-2

COMAN, F. E., M. J. SELLARS, B. J. NORRIS, G. J. COMAN & N. P. PRESTON. 2008. The effects of triploidy

on *Penaeus (Marsupenaeus) japonicus* (Bate) survival, growth and gender when compared to diploid siblings. Aquaculture. 276: 50-59.

CORONADO, M. C., P. GONZALEZ & J. E. PÉREZ. 1991. Genetic variation in Venezuelan molluscs *Pecten ziczac* and *Lyropecten nodosus* Pectinidae. Carib. J. Sci. 27: 71 -74.

COTTER, J. 2009. GM insect-resistant (Bt) maize in Europe: a growing threat to wildlife and agricultura. Greenpeace. Tech. Note. 10 pp.

CUNHA, C. H. & L. M. OSHIRO. 2010. The influence of eyestalk ablation on the reproduction of the freshwater *Macrobrachium acanthurus* shrimp in captivity. Acta Scient. Biol. Scien. 32 (3): 217-221.

DANZMANN, R. G., M. M. FERGUSON & F. W. ALLENDORF. 1988. Heterocigosity and components of fitness in a strain of rainbow trout. Biol. J. Linn. Soc. 33: 285-304.

DENG, Y., S. FU, X. DU & Q. WANG. 2009. Relized heritability and genetic estimates of larval shell lenght in the chinese pearl oyster *Pinctada martensii* as three different salinities. North Amer. J. Aquac. 71 :302-306.

DESROSIERS, R. R., A. GÉRARD, J. M. PEIGNON, Y. NACIRI, L. DUFRESNE, J. MORASSE, C. LEDU, P. PHELIPOT, P. GUERRIER & F. DUBÉ 1993. A novel

method to produce triploids in bivalve molluscs by the use of 6-dimethylaminopurine. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 170(1):29-43

DEVLIN, R. H., L. YESAKI, C. A. BIAGI & E. M. DONALDSON. 1994. Extraordinary salmon growth. *Nature*. 371: 209-210.

DEVLIN, R., M. D'ANDRADE, M. UH & C. A. BIAGI. 2004. Population effects of growth hormone transgenic coho salmon depend on food availability and genotype by environment interactions. *PNAS* 101 (25): 9303-9308.

DÍAZ, N. F. & R. NEIRA. 2005. *Biología Aplicada a la Acuicultura I. Biotecnologías clásicas aplicadas a la reproducción de especies cultivadas.* *Cien. Inv. Agr.* 32(1): 45-59.

DIEHL, W.J. & R.K. KOEHN. 1985. Multiple locus heterozygosity, mortality and growth in a cohort of *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.* 33 : 341-34.

DONALDSON, E. M. & C. A. HUNTER. 1982. Sex control in fish with particular reference for salmonids. *Can. J. Fish. Aquatic. Sci.* 39: 99-106

DUNHAM, R. A. 1987. American catfish breeding program. *Proc. World Symp. on Selection, Hybridization and Genetic Engineering in Aquaculture, Bordeaux 1 986. Vol II:* 407-4 16. Berlin 1987.

DUNHAM, R. A, K. MAJUMDAR, E. HALLERMAN, D. BARTLEY, G. MAIR, G. HULATA, Z. LIU, N. PONGTHANA, J. BAKOS, D. PENMAN, M. GUPTA, P. ROTHLSBERG & G. HOERSTGEN-SCHWARK. 2001. Review of the status of aquaculture genetics. In R.P. Subasinghe, P. Bueno, M.J. Phillips, C. Hough, S.E. Mcgladdery & J.R. Arthur, Eds. *Proceedings of the Conference on Aquaculture in the Third Millennium, Bangkok, Thailand, 20-25 February 2000.* pp. 137-166.

DUNHAM, R. A. 1990. Production and use of monosex or sterile fishes in aquaculture. *Rev. Aquat. Sci.* 2: 1-17.

DUNHAM, R. A. 2004. *Aquaculture and Fisheries Biotechnology Genetic Approaches.* Department of Fisheries and Allied Aquacultures. Auburn University Alabama. USA. 385pp.

DUNHAM, R. A (1990). *Reviews in Aquatic Sciences, Vol 2. Issue 1:* 1-17. by CRC Press, INC.

ESTRADA, M. P., J. M. LUGO, J. ACOSTA, Y. CARPIO, I. BORROTO, Y. MORERA, O. GONZÁLEZ, T. RODRÍGUEZ, L. RAMOS & A. HUBERMAN. 2007. Efectos del ARN de interferencia en las funciones génicas de organismos acuáticos. *Biotec. Aplic.* 24 (2): 172-177.

EZAZ, M. T., S. C. HARVEY, C. BOONPHAKDEE, A. J. TEALE, B. J. MCANDREW & D. J. PENMAN. 2004. Isolation and Physical Mapping of Sex-Linked AFLP Markers in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) *Mar.*

FAO. 2010. Agricultural biotechnologies in developing countries: Options and opportunities in crops, forestry, livestock, fisheries and agro-industry to face the challenges of food insecurity and climate change (ABDC-10).

FELIP K. & W. P. YOUNG. 2005. An AFLP approach for the identification of sex-linked markers in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*247: 35-43

FELIP, A., G. MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, F. PIFERRER, M. CARRILLO & S. ZANUY. 2000. AFLP analysis confirms exclusive maternal genomic contribution of meiogynogenetic sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Mar. Biotechnol.*2: 301-306.

FERGUSON, M. & M. DRAHUSHCHAK. 1990. Disease resistance and enzyme heterozygosity in rainbow trout. *Heredity*. 64: 413-4 17.

FETZNER, J. W. & K. A. CRANDALL. 1999. Genetic variability within and among populations of the golden crayfish (*Orconectes luteus*) determined using amplified fragment length polymorphisms (AFLPs). *Freshwat. Crayfish*12: 396-412.

FLETCHER, C. L, M. A SHEARS, M. J. KING, P. L DAVIES & C. L. HEW. 1988. Evidence for antifreeze protein gene transfer in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 45: 352-357.

FOX, J. L. 2010. Transgenic salmon inches toward finish line. *Nature Biotech.* 28: 1141-1142.

GABILLARD, J., C. RALLIÈRE, N. SABIN & P. Y. RESCAN. 2010. Therproduction of fluorescent transgenic trout to study in vitro myogenic cell differentiation. *Biotechnology*. 10(39): 1-6.

GADEA, J. & F. A. GARCÍA-VÁZQUEZ. 2010. Métodos de generación de cerdos transgénicos. *ITEA*. 106 (1): 15-29

GALEANO, P., C. MARTÍNEZ DEBAT, F. RUIBAL, L. FRANCO FRAGUAS, G. A. GALVÁN. 2009. Interpolinización entre cultivos de maíz transgénico y no transgénico comerciales en Uruguay. Programa Uruguay Sustentable. REDES-AT. 12 pp.

GALLI, L. 2002. Genetic modification in aquaculture. A review of potential benefits and risks. Bureau of Rural Sciences, Canberra. Disponible en <http://www.affa.gov.au/output/ruralscience.html>

GAO, Z., W. WANG, K. ABBAS, X. ZHOU, Y. YANG , J. S. DIANA, H. WANG, H. WANG, Y. LI & Y. SUN. 2007. Haematological characterization of loach *Misgurnus anguillicaudatus*: Comparison among diploid, triploid and tetraploid specimens. *Comp. Biochem. Physiol. A* .147: 1001-1008.

GARCÍA-VÁZQUEZ, F. A., A. GUTIÉRREZ-ADÁN & J. GADEA. 2009. Evaluation of binding sperm-exogenous DNA

in ejaculate and epididymary porcine spermatozoa. Arch Med. Vet. 41: 131-138.

GOMELSKY, B. 2003. Chromosome set manipulation and sex control in common carp: a review. Aquat. Living Resour. 16: 408-415.

GÓMEZ-UCHIDA, D., D. WEETMAN, L. HAUSER, R. GALLEGUILLOS & M. RETAMAL. 2003. Allozyme and AFLP analyses of genetic population structure in the hairy edible crab *Cancer setosus* from the Chilean Coast. J. Crust. Biol. 23: 486-494.

GONG, Z., H. WAN, T. L. TAY, H. WANG, M. CHEN & T. YAN. 2003. Development of transgenic fish for ornamental and bioreactor by strong expression of fluorescent proteins in the skeletal muscle. Biochem. Biophys. Res. Commun. 308(1):58-63.

GONZÁLEZ, J. A. & B. HEREDIA 1989. El Cultivo de la cachama (*Colossoma macropomun*). FONAIAP. Est. Exp. Guárico Guanapito, 124 pp.

GUERRA, R., R. CARBALLADA & P. ESPONDA. 2005. Transfection of spermatozoa in bivalve mollusks using naked DNA. Cell Biol. Internat. 29(2): 159-164.

GUSTIANO, R. 2004. Biometric analysis of the artificial hybridization between *Pangasius djambal* Bleeker, 1846 and *Panagasionodon hypophthalmus*, Sauvage, 1878. Indon. J. Agric. Sci. 5(2): 70-74.

GUTIÉRREZ, T. 1994. Hibridación entre las ostras *Crassostrea virginica* y *C. rhizophorae*. Trabajo de Grado. Licenciatura en Biología. Universidad de Oriente.

GUTIÉRREZ, L., M. C. CORONADO & J. E. PÉREZ. 1989. Genetic variation in Venezuelan molluscs. *Crassostrea rhizophorae* and *C. virginica*. Bol. Inst. Oceanogr. Venezuela. 28: 171-175.

HAFFRAY, P., J.S. BRUANT, J.M. FACQUEUR & A. FOSTIER. 2003. Effect of triploidy in gilthead seabream *Sparus aurata* (L.). Genetics in Aquaculture VIII. Puerto Varas, Chile. Book of Abstracts, p.60.

HAMMED, A. M., H. A. FASHINA-BOMBATA & A. O. OSINAIKE. 2010. The use of cold shock in inducing triploidy in African mud catfish (*Clarias gariepinus*). Afric. J. Biotechnol. 9 (12): 1844-1847.

HAN, K. & B. ELY. 2002. Use of AFLP analyses to assess genetic variation in *Morone* and *Thunnus* species. Mar. Biotechnol. 4: 141-145

HANIFFA, M. A., M. DHANARAJA, C. MUTHU RAMAKRISHNAN, R. A. MANJU, Y. A. KUMAR & S. V. ARUM SINGH. 2009. Hybridization between threatened freshwater catfish *Mystus gulio* (Hamilton & Buchanan) and *Mystus montanus* (Jerdon) by artificial fertilization. Ind. J. Experim. Biol. 47: 679-683.

HÄRTEL, S., R. ROJAS, C. RÄTH, M. I. GUARDA, O.

GOICOECHEA. 2005. Identificación de di- y triploidización por análisis multiparamétrico de imágenes: Un nuevo método para la cuantificación de la tasa de triploidización en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). Arch. Med. Vet. 37(2): 147-154.

HE, M., Y. GUAN, P. YUAN & H. ZHANG. 2008. Realized heritability and response to selection for shell height in the pearl oyster *Pinctada fucata* (Gould). Aquac. Res. 39(8): 801-805.

HEDGECK, D., R. A. SHLESER & K. NELSON. 1976. Application of biochemical genetic to aquaculture. J. Fish. Res. Bd. Canada. 33: 1108-1119.

HEDTKE, S. M., K. STANGER-HALL, R. J. BAKER & D. M. HILLIS. 2008. All-male asexuality: origin and maintenance of androgenesis in the asian clam *Corbicula*. Evolution 62:1119-1136.

HERSHBERGER, W. K. & M. A. HOSTUTTLE. 2007. Protocols for more effective induction of tetraploid Rainbow Trout. North Amer. J. Aquac. 69: 367-372.

HETZEL, D., P. CROCOS, G. DAVIS, S. MOORE & N. PRESTON. 2000. Response to selection and heritability for growth in the Kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. Aquaculture. 181(3-4): 215-223.

HOWELL, W.M. & D.A. BLACK. 1980. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with protective

colloidal developer: a 1 step method. Experimentia. 36: 1014-1915.

HSIEH, J. C., C. Y. PAN & J. Y. CHEN. 2010. Tilapia hepcidin (TH) 2-3 as a transgene in transgenic fish enhances resistance to *Vibrio vulnificus* infection and causes variations in immune-related genes after infection by different bacterial species. Fish & Shellfish Immunol. 29: 430-439

HUSSAIN, M. G., A. CHATTERJI, B. J. MCANDREW & R. JOHNSTONE. 1991. Triploidy induction in Nile tilapia, *Oreochromys niloticus* using pressure, heat and cold shocks. Theor. Appl. Genet. 81: 6-12.

IANNACONE, J. 2007. Transgenic fish: risk or benefits? Biologist. 5 (1): 4-6.

JABLONKA E. & GRAZ (2009) Transgenerational epigenetic inheritance: prevalence, mechanisms, and implications for the study of heredity and evolution. Quart. Rev. Biol. 131-176.

JAENISCH, R. & A. BIRD. 2003. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. Nature Genetics 33: 245-254.

JENSEN, C. L & W. L. SHELTON. 1979. Effects of strogens on *Tilapia aurea* implications for production of monosex genetic male tilapia. Aquaculture. 16: 233-238.

KALBASSI, M. R., S. DORAFSHAN, M. POURKAZEMI & B. M. AMIRI. 2009. Triploidy induction in the Caspian salmon, *Salmo truttacaspicus*, by heat shock. *J. Applied Ichthyol.* 25(1): 104-107.

KAPUSCINSKI, A. R. 2005. Current scientific understanding of the environment biosafety of transgenic fish and shellfish. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 24: 309-322.

KARDONG, K.V. 2003. Epigenomics: the new science of functional and evolutionary morphology. *Anim. Biol.* 53: 225-243

KENWAY, M., M. MACBETH, M. SALMON, C. MCPHEE, J. BENZIE, K. WILSON & W. KNIBB. 2006. Heritability and genetic correlations of growth and survival in black tiger prawn *Penaeus monodon* reared in tanks. *J. Aquacul.* 259 (1-4): 138-145.

KOCHER, T. D., W. J. LEE, H. SOBOLEWSKA, D. PENMAN & B. MCANDREW. 1998. A genetic linkage map of a cichlid fish, the tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Genetics* 148: 1225-1232.

KOCOUR, M. S. MAUGER, M. RODINA, D. GELA, O. LINHART & M. VANDEPUTTE. 2007. Heritability estimates for processing and quality traits in common carp (*Cyprinus carpio*) using a molecular pedigree. *Aquaculture.* 270(1-4) : 43-50.

KOEHN, R. K. & S. E. SHUMWAY. 1982.A

geneticphysiological explanation for differential growth rate among individuals of the American oyster, *Crassostrea virginica*. *Mar. Biol. Letts.* 3: 35-42.

KOSSOWSKI, C. 1991. Experiencias iniciales sobre la hibridación de *Lelarius marmoratus* (Cill) 1871 por *Pseudoplatystoma fassciatus* (Linnaeus) 1766 (Pisces, Siluriformes, Pimelodidae). *Acta Cient. Venezolana.* 42: 48-50.

KOSSOWSKI, C. 2001. Hibridación del bagre zamurito *Calophrysus macropterus* (Pisces, Pimelodidae). *Bioagro.* 13(2):71-77.

KOSSOWSKI, C., N. OTTOLINA DE BRACAMONTE & J. QUERO. 1983. Cariotipo del híbrido de *Colossoma macropomus* (hembra) (Cuvier) 1818 x *Mylossoma dunventris* (macho) (Cuvier) 1818 y sus progenitores (Pisces, Cypriniformes, Characidae). *Acta Cient. Venezolana,* 34: 173-175.

KOZFKAY, J. R., E. J. WAGNER & D. APLANALP. 2005. Production of triploid lake trout by means of pressure treatment. *North Amer. J. Aquac.* 67: 93-97.

KRAEUTER, J., L. ADAMKEWICZ, M. CASTAGNA, R. WALL & R. KARNEY. 1984. Rib number and shell color in hybridized subspecies of the Atlantic bay scallop, *Argopecten irradians*. *Nautilus.* 98: 17-20.

KUCHARCZYK, D., A. SZCZERBOWSKI, M. J.

TUCZYNSKI, R. KUJAWA, A. MAMCARZ & K. TARGONSKA. 2007. Inducing gynogenetic development of the (*Leuciscus idus*) using semen of other fish species. *Pol. J. Natur. Sc.* 22(4): 714-721.

KURITA, K., S. M. BURGESS & N. SAKAI. 2004. Transgenic zebrafish produced by retroviral infection of in vitro-cultured sperm. *PNAS.* 101 (5):1263-1267.

KUSIK, B. W., M. J. CARVAN III & A. J. UDVADI. 2008. Detection of mercury in aquatic environments using EPRE. Reporter Zebrafish. *Mar Biotechnol.* 10:750-757.

LAMPERT, K. P., D. K. LAMATSCH, P. FISCHER & M. SCHARTL. 2008. A tetraploid amazon molly, *Poecilia formosa*. *J. Hered.* 99(2):223-226.

LE CURIEUX-BELFOND, O., L. VANDELAC, J. CARON & G. SÉRALINI. 2009. Factors to consider before production and commercialization of aquatic genetically modified organisms: the case of transgenic salmon. *Environm. Sci. Policy.* 12: 170-189.

LI, H. 2009. Development of techniques for production homozygous Pacific oysters. FRDC. Project No. 2002/2034.

LI, L., J. XIANG, X. LIU, Y. ZHANG, B. DONG & X. ZHANG. 2005. Construction of AFLP-based genetic linkage map for Zhikong scallop, *Chlamys farreri* Jones et Preston and mapping of sex-linked markers. *Aquaculture* 245: 63-

73.

LIANG, J., G. ZHNAG & H. ZHENG. 2009. Divergent selection and realized heritability for growth in the Japanese scallop *Patinopecten yessoensis* Jay. *Aquacul. Res.* 41(9): 1315-1321.

LIU, Z. J., A. NICHOLS & R. A. DUNHAM. 1998. Inheritance and usefulness of AFLP markers in channel catfish (*Ictalurus punctatus*), blue catfish (*I. furcatus*), and their F1, F2, and backcross hybrids. *Mol. Gen. Genet.* 258: 260-268.

LIU, Z. J., A. KARSI, P. LI, D. CAO & R. DUNHAM R. 2003. An AFLP-based genetic linkage map of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) constructed by using an interspecific hybrid resource family. *Genetics* 165: 687-694.

LIU, Z. J. & J. F. CORDES. 2004. DNA markers technology and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture* 238: 1-37.

LO PRESTI, R., C.LISA & L. DISTASIO. 2009. Molecular genetics in aquaculture. *Ital. J. Anim. Sci.* 8: 299-313.

LÓPEZ, C. A., D. L. CARVAJAL & M. C. BOTERO. 2007. Masculinización de tilapia roja (*Oreochromis spp*) por inmersión utilizando 17 alfa-metiltestosterona. *Rev. Col. Cienc. Pec.* 20:318-326.

LÓPEZ-HEYDECK, S. M., M. CAJERO-JUÁREZ, R. A.

ALONSO-MORALES, J. S. MARTÍNEZ-CASTAÑEDA, J. F. ROBLES-GONZÁLEZ, A. BARBABOSA-PLIEGO & J. C. VÁZQUEZ-CHAGOYÁN. 2009. La lipofeción incrementa la eficiencia de mutagénesis dirigida en células troncoembrionarias de ratón E14 TG2a. *Vet. Méx.* 40 (1):85-93.

LUO, K., J. XIAO, S. JUN LIU, J. WANG, W. HE, J. HU, Q. QIN, C. ZHANG, M. TAO & Y. LIU. 2011. Massive Production of all-female diploids and triploids in the Crucian Carp. *Int. J. Biol. Sci.* 7(4):487-495

LUTTIKHUIZEN, P. C. & J. DRENT. 2008. Inheritance of predominantly hidden shell colours in *Macoma balthica* (L.) (Bivalvia: Tellenidae). *J. Mollusc. Stud. Adv.* 74 (4): 363-371.

MACKENZIE, R. G. & S. B. ROBERTS. 2011. Beyond the Genome: Characterization of DNA methylation as a means of epigenetic regulation in the pacific oyster. *Plant & Animal Genomes. XIX Conference.* San Diego, USA

MACLEAN, N. & R. LAIGHT. 2000. Transgenic fish: an evaluation of benefits and risks. *Fish Fisheries.* 1: 146-172.

MALDONADO R., A. IBARRA, J.L. RAMÍREZ, S. AVILA, J.E. VAZQUEZ & L.M. BALDILLO. 2001. Induction of triploidy in pacific red abalone (*Haliotis rufescens*). *J. Shellfish Res.* 20(3): 1071-1075.

MALDONADO, R. A. IBARRA & J. L. RAMÍREZ. 2003. Inducción a la tetraploidia en la almeja Catarina *Argopecten*

ventricosus. *Cienc. Mar.* 29(2): 229-238.

MALECHA, S. 2012. The case for all-female freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (De Man) culture. *Aquacult. Res.* 43: 1038-1048.

MALECHA, S. R, P. A. NEVIN, P. HA, L. E. BARCK, Y. LAMADRID-ROSE, S. MASUNO & B. HEDGECOCK. 1992. Sex ratios and sex determination in progeny from crosses of surgically sex reversed fresh water prawns, *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture.* 105: 201-218.

MANOSPROL, J., K. PETCHJUL & A. MANOSROI. 2004. Effect of fluoxymesterone fish feed granule on sex reversal of the hybrid, the red tilapia (*Oreochromis niloticus* Linn. X *Oreochromis mossambicus* Linn.) *Asian Fish. Sci.* 17: 323-331.

MARTÍNEZ, P. 2005. Aplicaciones de la genética para la mejora de la acuicultura. *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.* 21 (1-4): 225-238.

MARTINO, G. 2002. Retrocruce de hembras híbridos (F1) (*Colossoma macropomum* x *Piaractus brachypomus*) con machos de las especies parentales. I Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura. CIVA 2002. 688-693 Disponible en: <http://www.civa2002.org>.

MCCOMBIE, H., C. LEDU, P. PHELIPOT, S. LAPÈGUE, P. BOUDRY & A. GÉRARD. 2005. A complementary method for production of tetraploid *Crassostrea gigas* using crosses between diploids and

tetraploids with cytochalasin b treatments. *Mar. Biotechnol.* 7(4):318- 330.

MOEN, T., J. J. AGRESTI, A. CNAANI, H. MOSES, T. R. FAMULA, G. HULATA, G. GALL & B. MAY. 2004a. A genome scan of a four-way tilapia cross supports the existence of a quantitative trait locus for cold tolerance on linkage group 23. *Aquacul. Res.*35: 893-904.

MOEN, T., K. T. FJALESTAD, H. MUNCK & L. GÓMEZ-RAYA. 2004b. A multi-stage testing strategy for detection of quantitative trait loci affecting disease resistance in Atlantic salmon. *Genetics.*167: 851-858.

MOEN, T., B. HOYHEIM, H. MUNCK & L. GÓMEZ-RAYA. 2004c. A linkage map of Atlantic salmon (*Salmo salar*) reveals an uncommonly large difference in recombination rate between the sexes. *Anim. Genet.*35: 81-92.

MONTAÑO-PÉREZ, E. VILLALPANDO-CANCHOLA & F. VARGAS-ALBORES. 2006. AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) y su aplicación en acuicultura. *Interciencia.* 31(8): 563-569.

MOORE, S. S., V. WHAN, G. DAVIS, K. BYRNE, D. J. HETZEL & N. PRESTON. 1999. The development and application of genetic markers for the Kuruma prawn *Penaeus japonicus*. *Aquaculture*173: 19-32.

MORENO, J. M., C. ALFONSI, J. E. PÉREZ & B.

GÓMEZ. 2004. Variaciones temporales de las frecuencias alélicas del locus ODH en *Euvola ziczac* (Linneo, 1758) (*Bivalvia: Pectinidae*). *Bol. Inst. Oceanogr. Venezuela.* 43 (1-2): 21-26.

MORITA, T., G. YOSHIZAKI, M. KOBAYASHI, S. WATABE & T. TAKEUCHI. 2004. Fish eggs as bioreactors: The Production of bioactive luteinizing hormone in transgenic trout embryos. *Transg. Res.* 13: 551-557.

MUÑOZ-FORCADA, I. 2006. Introducción de la tecnología de transferencia génica en lubina (*Dicentrarchus labrax*). Universidad de Valencia. Servei de Publicacions. 224 pp. Disponible en http://www.tdr.cesca.es/TESIS_UV/AVAILABLE/TDX-0301107-114318//mu%F1oz.pdf.

MYERS, J. M. 1986. Tetraploid induction in *Oreochromis* spp. *Aquaculture.* 57: 28 1-287.

MYRAND, B., R. TREMBLAY & J. M. SÉVIGNY. 2002. Selection against blue mussels (*Mytilus edulis* L.) Homozygotes under various stressfull conditions. *J. Hered.* 93 (4): 238-248.

NAIR, C. M., K. R. SALIN, M. S. RAJU & M. SEBASTIAN. 2006. Economic analysis of monosex culture of giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*): a case study. *Aquacul. Res.* 37: 949-954.

NAQVIA, S., C. ZHUA, G. FARREA, K. RAMESSARA, L. BASSIEA, J. BREITENBACHB, D. PEREZ CONESAC,

G. ROSC, G. SANDMANN, T. CAPELLA & P. CHRISTOU. 2009. Transgenic multivitamin corn through biofortification of endosperm with three vitamins representing three distinct metabolic pathways. PNAS. 106 (19): 7762-7767.

NARBÓN-FERNÁNDEZ, P. 2008. TRANSFERENCIA GÉNICA EN ANIMALES. Trabajo Final Experto Universitario de Biotecnología Aplicada a los Alimentos. UNED. España. 53 pp.

NARVAIZA, I., G. MAZZOLINI, C. QIAN, J. PRIETO & I. MELERO. 2003. Vectores adenovirales de primera generación, el vector por excelencia en inmunoterapia génica del cáncer. Inmunología. 22 (2): 225-242.

NEIRA, R., N. DÍAZ, G. GALL, J. GALLARDO, J. LHORENTE & A. ALERT, A. 2006. Genetic improvement in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). II : Selection response for early spawning date. Aquaculture. 257 (1-4): 1-8.

NICHOLS, K. M., W. P. YOUNG, R. G. DANZMANN, B. D. ROBISON, C. REXROAD, M. NOAKES, R. B. PHILLIPS, P. BENTZEN, I. SPIES, K. KNUDSEN, F. W. ALLENDORF, B. M. CUNNINGHAM, J. BRUNELLI, H. ZHANG, S. RISTOW, R. DREW, K. H. BROWN, P. A. WHEELER & G. H. THORGAARD. 2003. A consolidated linkage map for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Anim. Genet. 34: 102-115.

NIRCHIO, M., J. E. PÉREZ & H. CEQUEA. 1991. Allozyme variation for LAP loci in *Crassostrea rhizophorae* related to temperature and salinity. Scien. Mar. 55: 547-551.

NIRCHIO, M., J. E. PÉREZ & A. ANTÓN. 1987. Polimorfismo del sistema leucil aminopeptidasa (LAP) en *Crassostrea rhizophorae* de Laguna La Restinga. Cont. Cient. 15: 3-24.

NODARI, O. R. 2009. Calidad de los análisis de riesgo e inseguridad de los transgénicos para la salud ambiental y humana. Rev. Perú. Med. Exp. Sal. Pú. 26(1): 74-82.

NORRIS, B.J. & N.P. PRESTON. 2003. Triploid induction in the tropical abalone, *Haliotis asinina*, with 6-dimethylaminopurine. Aquacult. Res. 34 (3): 261-264.

ODEGARD, J., A. SOMMER & A. PRAEBEL. 2010. Heritability of resistance to viral nervous necrosis in Atlantic cod (*Gadus morhua*). Aquaculture. 300(1-4) : 59-64.

OKIMURA, S. ARAI, K., HARIGAYA, Y., EGUCHI, H., SAKAI, M., SENBOKUYA, H., FURUKAWA, S. & K. YAMAMORI. 2007. Highly efficient induction of triploid Pacific abalone *Haliotis discus hannai* by caffeine treatment. Fish. Sci. 73: 237-243.

PAN, X., H. ZHAN & Z. GONG. 2008. Ornamental expression of red fluorescent protein in transgenic founders of white skirt tetra (*Gymnocorymbus ternetzi*). Mar.

PANTE, MA. J., B. GJERDE, I. MCMILLAN & I. MISZTAL. 2002. Estimation of additive and dominance genetic variances for body weight at harvest in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*. 204(3-4): 383-392.

PENG, K. C., C. Y. PAN, H. CHOU & J. CHEN. 2010. Using an improved Tol2 transposon system to produce transgenic zebrafish with epinecidin-1 which enhanced resistance to bacterial infection. *Fish Shellfish Immunol*. 28(5-6): 905-91.

PEÑARANDA, M. A. & F. ASENSIO. 2006. Animales modificados genéticamente: (i) técnicas de obtención. *Biocología*: 22-30. Disponible en www.colvema.org/PDF/amg1.pdf.

PÉREZ, J. E., N. RAMÍREZ, E. BASOA, C. ALFONSI, O. NUSETTI & J. MORENO. 2000. Polymorphism of octopine dehydrogenase (Odh) in mollusks and implications for the neutralism-selectionism hypothesis. *Rev. Biol. Trop.* 48(1): 187-191.

PÉREZ, J. E., O. NUSETTI, N. RAMÍREZ & C. ALFONSI. 2000B. Allozyme and biochemical variation at the octopine dehydrogenase locus in the scallop *Euvola ziczac*. *J. Shellfish Res.* 19 (1): 85-88.

PÉREZ, J. E. & A. BEAUMONT. 1990. Mejoramiento genético en acuicultura. *Bol. Red. Reg. Acuí.* 4: 3-13.

PÉREZ, J. E. & C. ALFONSI. 1999. Selection and realized heritability for growth in the scallop *Euvola ziczac* (L). *Aquacult. Res.* 30: 211-214.

PÉREZ, J. E. 1987. Genetic variation in Venezuela molluscs, *Arca zebra*. *Bol. Inst. Oceanogr. Venezuela*. 26: 134-138.

PÉREZ, J. E. 1993. Programa de mejoramiento genético en moluscos. *Serie Ocasional Univ. Católica Norte, Chile*, 2: 297-302.

PÉREZ, J. E. 1996. Mejoramiento genético en acuicultura. Instituto Oceanográfico de Venezuela. Universidad de Oriente. Cumaná-Venezuela. 177 pp.

PIFERRER, F., A. BEAUMONT, J. C. FALGUIERE, M. FLAJSHANS, P. HAFFRAY & L. COLOMBO. 2009. Polyploid fish and shellfish: Production, biology and applications to aquaculture for performance improvement and genetic containment. *Aquaculture*. 293:125-156.

PIFERRER, F., R. M. CAL, B. ÁLVAREZ-BLÁZQUEZ, L. SÁNCHEZ, & P. MARTÍNEZ. 2000. Induction of triploidy in turbot (*Scophthalmus maximus*). I. Ploidy determination and the effects of cold shocks. *Aquaculture*. 188:79-90.

PIFERRER, F., R. M. CAL, C. GÓMEZ, C. BOUZA, & P. MARTÍNEZ. 2003. Induction of triploidy in the turbot (*Scophthalmus maximus*): II. Effects of cold shock timing

and induction of triploidy in a large volume of eggs. *Aquaculture*. 220:821-831.

PIGNEUR, L-M., S.M. HEDTKE, E. ETOUNDI & K. VAN DONINCK. 2012. Androgenesis: through the study of the selfish shellfish *Corbicula* spp. *Heredity* 108: 581-591.

POHAJDAK, B., M. MANSOUR, O. HRYTSENKO, J. M. CONLON, L. C. DYMOND & J. R. WRIGHT JR. 2004. Production of transgenic *Tilapia* with Brockmann bodies secreting [desThrB30] human insulin. *Transg. Res.* 13: 313-323,

POLLUX, B., D. MINCHIN D, G. VAN DER VELDE, T. VAN ALEN, S. Y. MOON-VAN DER STAAY & J. HACKSTEIN. 2003. Zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) in Ireland, AFLP-fingerprinting and boat traffic both indicate an origin from Britain. *Freshwat. Biol.*48: 1127-1139.

POMPA, L. A., J. ESPINOZA & J. E. PÉREZ. 1992. Genetic variation in Venezuelan molluscs. The mussel, *Perna perna*. *Bol. Inst. Oceanogr. Venezuela*. 29: 97-101.

POOMPUANG, S. & U. NA-NAKORN. 2004. A preliminary genetic map of walking catfish (*Clarias macrocephalus*). *Aquaculture* 232: 195-203.

PRADEEP, P.J., SRIJAYA T.C. PAPINI A. & ANIL C. H. 2012. Effects of triploidy induction on growth and masculinization of red tilapia [*Oreochromis mossambicus* × *Oreochromis niloticus*]. *Aquaculture*.344-349 : 181-187.

PRINS, N. 2011. A comparative analysis of growth traits in triploid and diploid genotypes of the South African abalone, *Haliotis midae*. *Trab. Grad. MSc. of Science in Genetics at the University of Stellenbosch*. 113 pp.

PUENTE-CARREÓN, E. 2004. Inducción a la triploidia en el camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Boone. 1931). *Trab. Grad. MSc. Instituto Politécnico. Centro Interdisciplinario de Ciencias del Mar (CICIMAR)*. 66pp.

PULLIN, R. S. V., A. E. ELCNATH, T. GJEDREM, M. TAYAMEN & T. A. ABELLA. 1991. The genetic improvement of farmed tilapias (GMT) proyect: The story so far. *Naga*. 14: 3-6.

PURDOM, C. E. 1986. Genetic engineering by the manipulation of chromosomes. *Aquaculture*. 3: 287-300.

RAMÍREZ, C. A. & J. E. PÉREZ. 1993. Inducción de triploidía en la vieira *Euvola ziczac* L. (1758). *Memorias VII Simposio Latinoamericano de Acuicultura*, 288-299.

RAMUSSEN, R. S. & M. T. MORRISSEY. 2007. Biothecology in aquaculture: transgenics and polyploidy. *Comp. Rev. Food. Sci. Food. Saf.* 6: 2-16.

RAVEN, P. A., M. UHA, D. SAKHRANI, B. R. BECKMAN, K. COOPER, J. PINTER, E. H. LEDER, J. SILVERSTEIN & R. H. DEVLIN. 2008. Endocrine effects of growth hormone overexpression in transgenic coho salmon.

ROBERTS, S. B., L. A. R. MCCAULEY, R. H. DEVLIN & F. W. GOETZ. 2004. Transgenic salmon overexpressing growth hormone exhibit decreased myostatin transcript and protein expression. *J. Exp. Biol.* 207: 3741-3748

RODHOUSE, P. G., J. H. MCDONALD, R. NEWELL & R. K. KOEHN. 1986. Gamete production, somatic growth and multiple-locus enzyme heterozygosity in *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.* 90:209-214.

RODRÍGUEZ, M. F., S. LAPATRA, S. WILLIAMS, T. FAMULA & B. MAY. 2004. Genetic markers associated with resistance to infectious hematopoietic necrosis in rainbow and steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) backcrosses. *Aquaculture* 241: 93-115.

ROSSI-MARSHALL, E. J., J. L. TANK, T. V. ROYER, M. R. WHILES, M. EVANS-WHITE, C. CHAMBERS, N. A. GRIFFITHS, J. POKELSEK & M. L. STEPHEN. 2007. Toxins in transgenic crop byproducts may affect headwater stream ecosystems. *PNAS.* 104 (41): 16204-16208.

RUNGSIN, W.; N. PAANKHAO & U. NA-NAKORA. 2006. Production of all-male stock by neofemale technology of the Thai strain of freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture.* 290: 47-52.

SAGI, A. & D. AFLALO. 2005. The androgenic gland and monosex culture of freshwater prawn *Macrobrachium*

rosenbergii (De Man). A biotechnological perspective. *Aquacul. Res.* 36: 231-237.

SAGI, A. & D. COHEN. 1990. Growth, maturation and progeny of sex reversed *Macrobrachium rosenbergii* males. *World Aquacul.* 21: 87-90.

SAILLANT, E., M. DUPONT-NIVET, P. HAFFRAY & B. CHATAIN. 2005. Estimates of heritability and genotype-environment interactions for body weight in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) raised under communal rearing conditions. *J. Aquacul.* 254 (1-4) : 139-147.

SALGADO-ZAMORA, H. & A. AZPEITIA-HERNÁNDEZ. 2008. Efecto anabólico y androgénico del esteroide acetato de trembolona en el guppy (*Poecilia reticulata*). *Vet. Mex.* 39(3): 269-277.

SÁNCHEZ DE BOCK, L. & L. S. LÓPEZ. 2010. Sex reversal and growth performance in juvenile females of the freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus* (Parastacidae): effect of the increasing temperature and androgenic gland extract in the diet. *Aquacul. Internat.* 18: 231-243.

SARMASIK, A. 2003. Application of gene transfer technology for genetic improvement of Fish. *Turk. J. Zool.* 27: 1-6.

SOUSA-SANTOS, C., M. J. COLLARES-PEREIRA & V. ALMADA. 2007. Fertile triploid males-An uncommon case among hybrid vertebrates. *J. Exp. Zool.* 307A: 220-

SAWATARI E., R. SEKI, T. ADACHI, H. HASHIMOTO, S. UJI, Y. WAKAMATSU, T. NAKATA & M. KINOSHITA. 2010. Overexpression of the dominant-negative form of myostatin results in doubling of muscle-fiber number in transgenic medaka (*Oryzias latipes*). *Comp. Biochem. Physiol. A.* 155(2):183-189.

SCARPA, J., J. E. TORO & K. T. WADA. 1994. Direct comparison of six methods to induce triploidy in bivalves. *Aquaculture.* 119: 119-133.

SCHEERER, P. D. & THORGAARD, G.H. 1983. Increased survival in salmonids hybrids by induced triploidy. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 40: 2040-2044.

SCHMALE, M. C., R. S. NAIRN & R. N. WINN. 2007. Aquatic animal models of human disease. *Comp Biochem Physiol C.* 145(1): 1-4.

SCOTT, A. G., G. C. MAIR, D. O. F. SKIBINSKI & J. A. BEARDMORE. 2008. "Blond": a useful new genetic marker in the tilapia, *Oreochromis niloticus* (L). *Aquacul. Res.* 18 (2) : 159-165.

SINGH, S.M. & E. ZOUROS. 1978. Genetic variation associated with growth in the American oyster (*Crassostrea virginica*). *Evolution.* 32: 342-353.

STANLEY, J. C., S. K. PILEN & H. HIDU. 1981. Polyploidy induced in the American oyster *Crassostrea*

virginica, with cytochalasin B. *Aquaculture.* 12: 1-10.

STUART, G. W., J. V. MCMURRAY & M. WESTERFIELD. 1988. Replication, integration and stable germ-line transmission of foreign sequences injected into early zebrafish embryos. *Development.* 103: 403-412.

SULLIVAN, J. P., S. LAVOU, M. E. ARNEGAR & C. D. HOPKINS. 2005. AFLPs resolve phylogeny and reveal mitochondrial introgression within a species flock of African electric fish (Mormyroidea: Teleostei). *Evolution* 58: 825-841.

SUN, Y., W. Q. SONG, R. S. ZHANG, T. J. ABATZOPOULOS & R. Y. CHEN. 1999. Diversity and genetic differentiation in *Artemia* species and populations detected by AFLP markers. *Int. J. Salt Lake Res.* 8: 341-350.

SUNDSTROM, F., M. LOHMUS, J. I. JOHNSON & R. H. DEVLIN. 2004. Growth hormone transgenic salmon pay for growth potential with increased predation mortality. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 271: S350-S352.

SUNDSTROM, F., M. LOHMUS, W. E. TYMCHUK & R. H. DEVLIN. 2007. Gene-environment interactions influence ecological consequences of transgenic animals. *PNAS.* 104 (10): 3889-3894.

TAVE, D. 1991. Effective breeding number and inbreeding. *Aquacul. Mag.* 17(4): 76-79.

TAVE, D. 1993. Hermaphrodites and the creation of supermales rainbow trout. *Aquacul. Mag.* 19(3): 85-89.

THIRIOT-QHIÉVREAU, C., G. H. POGSON & E. ZOURUS. 1992. Genetics of growth rate variation in bivalves: aneuploidy and heterozygosity effects in *Crassostrea gigas*. *Genome*. 35: 39-45.

THOMPSON, F. L., Y. LI, B. GÓMEZ-GIL, C. C. THOMPSON, B. HOSTE, K. VANDEMEULEBROECKE, G. S. RUPP, A. PEREIRA, M. M. DE BEM, P. SORGELOOS & J. SWINGS. 2003. *Vibrio neptunius* sp. nov., *Vibrio brasiliensis* sp. nov., and *Vibrio xuii* sp. nov., isolated from the marine aquaculture environment (bivalves, fish, rotifers and shrimps). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53: 245-252.

TORO, J. E. 2008. Programas de selección genética en bivalvos marinos con énfasis en el caso de Chile. En A. Lovatelli, A. Farias e I. Uriarte (eds). Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina. Taller Técnico Regional de la FAO. 20-24 de agosto de 2007, Puerto Montt, Chile. FAO Actas de Pesca y Acuicultura. No. 12. Roma, FAO. pp. 289-296.

TSAI, H. J. 2008. Use of transgenic fish possessing special genes as model organisms and potential applications. *J. Genet. Mol. Biol.* 19(1): 22-38.

TSUDA, J. R., V.P.O. DE MORAES, L. GIULIANO-

CAETANO & A.L. DIAS. 2010. Occurrence of natural triploidy in *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae). *Genet. Mol. Res.* 9 (3): 1929-1935.

VAN DEN BRANDHOF, E.J & S. BANUS 2009. Genetisch gemodificeerde siervissen in Nederland 'Een gloeiend probleem? RIVM- rapport 609021084/2009. Disponible en [http://www.vrominspectie.nl/images/Genetics%20gemodificeerde%20siervissen%20in%20Nederland/pdf](http://www.vrominspectie.nl/images/Genetics%20gemodificeerde%20siervissen%20in%20Nederland.pdf).

VAN EENENNAAM, A. & P. G. OLIN. 2007. La necesidad de una evaluación cuidadosa del riesgo para evaluar los peces transgénicos. *Calif. Agricul.* 60 (3): 126-131.

VANDENBERGHE, J., L. VERDONCK, R. ROBLES-AROZARENA, G. RIVERA, A. BOLLAND, M. BALLADARES, B. GÓMEZ-GIL, J. CALDERÓN, P. SORGELOOS & J. SWINGS. 1999. Vibrios associated with *Litopenaeus vannamei* larvae, postlarvae, broodstock, and hatchery probionts. *Appl. Envir. Microbiol.* 65: 2592-2597.

VANDENBERGHE, J., Y. LI, L. VERDONCK, J. LI, P. SORGELOOS, H. S. XU & J. SWINGS. 1998. Vibrios associated with *Penaeus chinensis* (Crustacea: Decapoda) larvae in Chinese shrimp hatcheries. *Aquaculture* 169: 121-132.

VANDEPUTTE, M., M. KOCOUR, S. MAUGER, M. DUPONT-NIVET, D. DE GUERRY, M. RODINA, D. GELA,

D. VALLOD, B. CHEVASSUS & O. LINHART. 2004. Heritability estimates for growth-related traits using microsatellite parentage assignment in juvenile common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture*. 235(1-4) : 223-236.

VANDEPUTTE, M., M. KOCOUR, S. MAUGER, M. RODINA & A. LAUNAY. 2008. Genetic variation for growth and two summers of age in the common carp *Cyprinus carpio*: heritability estimates and response to selection. *Aquaculture*. 277(1-2): 7-13.

VENTURA, T., R. MANOR, E. D. AFLALO, S. WEIL, S. RAVIV, L. GLAZER & A. SAGI. 2009. Temporal Silencing of an Androgenic Gland-Specific Insulin-Like Gene Affecting Phenotypical Gender Differences and Spermatogenesis. *Endocrinology*. 150(3):1278-1286.

VOLCKAERT, Y. & E. ZOURUS. 1989. Allozyme and physiological variation in the scallop, *Placopecten magellanicus* and a general model for the effects of heterozygosity on fitness in marine molluscs. *Mar. Biol.* 103: 51-61.

VOZZI P. A., SÁNCHEZ S., PERMINGEAT E.D. (2003) Inducción de triploidía en *Rhamdia quelen* (Pisces, Pimelodidae). *Bol. Inst. Pesca, São Paulo*. 29(1): 87-94.

WANG, Z.Y., K. H. TSOI & K. H. CHU. 2004. Applications of AFLP technology in genetic and phylogenetic analysis of penaeid shrimp. *Biochem. Syst. Ecol.* 32: 399-407.

WILSON, K., Y. LI, V. WHAN, S. LEHNERT, K. BYRNE, S. MOORE, S. PONGSOMBOON, A. TASSANAKAJON, G. ROSENBERG, E. BALLMENT, F. FAYAZI, J. SWAN, M. KENWAY M & J. BENZIE. 2002. Genetic mapping of the black tiger shrimp *Penaeus monodon* with amplified fragment length polymorphism. *Aquaculture* 204: 297-309.

WINKLER, F. M., B. F. ESTÉVEZ, L. B. JOLLÁN & J. P. GARRIDO. 2001. Inheritance of the general shell color in the scallop *Argopecten purpuratus* (Bivalvia: Pectinidae). *J. Hered.* 92(6): 521-525.

WLASOW, T. & D. FOPP-BAYAT. 2011. The effect of thermal shock on morphological characteristics of blood cells in Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) triploids. *Acta Vet. Brno*. 80: 215-218.

WOLFF, M. & J. GARRIDO. 1991. Comparative study of growth and survival of two color morphs of two Chilean scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck 1819) in suspended culture. *J. Shellfish Res.* 10: 47-53.

WOLLFARTH, C. W. & G. HULATA. 1983. Applied genetics of tilapias. ICLARM, Manila, Filipinas. 26 pp.

WOOD, A. T., G. J. COMAN, A. R. FOOTE & M. J. SELLARS. 2011. Triploid induction of black tiger shrimp, *Penaeus monodon* (Fabricius) using cold shock. *Aquac. Res.* 42: 1741-1744.

WOZNICKI, P. & H. KUZMINSKI. 2002. Chromosome number and erythrocyte nuclei length in triploid brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Caryologia* 55(4): 295-298.

YANG, H. & X. GUO. 2006. Polyploid induction by heat shock-induced meiosis and mitosis inhibition in the dwarf surfclam, *Mulinia lateralis* Say. *Aquaculture*. 252: 171- 182.

YU, Z., & X. GUO. 2003. Genetic linkage map of the eastern oyster *Crassostrea virginica* Gmelin. *Biol. Bull.*204: 327-38.

YU, Z. & X. GUO. 2004. Genetic analysis of selected strains of eastern oyster (*Crassostrea virginica* Gmelin) using AFLP and microsatellite markers. *Mar. Biotechnol.*6: 575-586.

YUE, G. H., Y. LI, L. C. LIM & L. ORBAN. 2004. Monitoring the genetic diversity of three Asian arowana (*Scleropages formosus*) captive stocks using AFLP and microsatellites. *Aquaculture*237: 89-102.

ZBIKOWSKA, H. M. 2003. Fish can be first - advances in fish transgenesis for commercial. *Transg. Res.* 12: 379-389.

ZHANG, P., M. HAYAL, C. JOYCE, L. I. GONZÁLEZ-VILLASEÑOR, C. M. UN, R. A. DUNHAM, T. T. CHEN & D. A. FOWER. 1990. Gene transfer, expression and inheritance of pRSV rainbow trout-CH cDNA in the common carp, *Cyprinus carpio* (Linnaeus). *Mol. Rep. Develop.* 25: 3-

ZHANG, L., X. KONG, Z. YU, J. KONG & L. CHEN. 2004. A survey of genetic changes and search for sex-specific markers by AFLP and SAMPL in a breeding program of Chinese shrimp (*Penaeus chinensis*). *J. Shellfish Res.*23: 897-901.

ZHANG, Q., H. YU, A. HOWE, A. CHANDLER & S. K. ALLEN JR. 2010. Cytogenetic mechanism for reversion of triploids to heteroploidy mosaics in *Crassostrea gigas* (Thunberg) and *Crassostrea ariakensis*. *Aquacult. Res.* 41(11): 1658-1667.

ZIMMERMAN, A. M. & P. A. WHEELER. 2005. Composite interval mapping reveals three QTL associated with pyloric caeca number in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*247: 85-95.

ZIMMERMAN, A.M., J. P. EVENHUIS, G. H. THORGAARD & S. S. RISTOW. 2004. A single major chromosomal region controls natural killer cell-like activity in rainbow trout. *Immunogenetics* 55: 825-835.