

Biología Aplicada a la Acuicultura

I. Biotecnologías clásicas aplicadas a la reproducción de especies cultivadas.

N. F. Díaz¹ y R. Neira¹

Departamento de Producción Animal

Facultad de Ciencias Agronómicas

Universidad de Chile

Casilla 1004. Santiago, Chile.

Abstract

N.F. Díaz, and R. Neira. Biotechnology applied to aquaculture. I. Classic biotechnologies applied to the reproduction of cultivated species. Beginning with a differentiation of what is considered classical biotechnologies, we review in this paper their application to the reproduction of cultivated species. Reproductive maturity control, fertility control, genetic sex control, and progenies sex ratio, are areas where the application of biotechnologies can increase productive capacity. Contributions made by different players regarding the application of biotechnologies of a physiological and/or genetic nature mainly in fish and mollusks have been analyzed. The feasibility of applying these techniques has been demonstrated in a wide range of species, mainly fish and mollusks, as well as cultured species in Chile. Many of these biotechnologies can be industrially applied, especially salmon culture, and it is expected that in the future, these technological strategies be applied also to other species, as long as results of research and technological transference are developed. Chile has a great potential to produce fish and mollusks, so it is extremely important to boost development and research projects related to this field.

Key words: Aquaculture, biotechnology, reproduction.

Cien. Inv. Agr. 32(1): 45-59. 2005

BIOTECNOLOGIA Y ACUICULTURA INTENSIVA

Biología:

“Any technique that uses living organisms to make or modify a product, to improve plants or animals or to develop microorganisms for specific uses”.

(US Congress Office of Technology Assessment).

Una definición amplia de biología como la anterior pone de manifiesto que se trata de tecnologías de antigua y amplia utilización. En tal sentido, se distingue una biología clásica en

que se actúa afectando características genéticas y/o funciones específicas de los organismos o sus progenies, con el propósito de utilizar y de cambiar algunas de sus propiedades.

Una biología moderna se inicia con resultados publicados por Cohen *et al.*, (1973), quienes desarrollaron métodos de ADN (ácido desoxirribonucleico) recombinante para transferir genes desde un dador a un hospedero, material que es incorporado y recombinado en el genoma del hospedero. Se trata por lo tanto de modificaciones genéticas que afectan características de los organismos y sus progenies, y que también abren la posibilidad de otras aplicaciones.

En la actualidad existe una beneficiosa interacción entre biotecnología, concebida como un conjunto de técnicas que utilizan o se aplican a organismos vivos para modificar o fabricar un producto de consumo o uso, y acuicultura, concebida como la producción de organismos acuáticos en sistemas controlados y con aplicaciones tecnológicas que permiten manejar densidades poblacionales mayores que las naturales, optimizando su manejo en los cultivos, lo que habla de una acuicultura intensiva.

La biotecnología y la acuicultura han tenido grandes avances en las últimas décadas; la primera a partir de la tecnología del ADN recombinante que permite interactuar más íntimamente y con mayor conocimiento en la genética de las especies. En el caso de la acuicultura, se ha incrementado cuantitativamente en la últimas cinco décadas gracias a una serie de aportes entre los cuales destaca el de la biotecnología en diversos ámbitos como reproducción, nutrición, patología y mejoramiento genético de las especies cultivadas.

De acuerdo a Hew y Fletcher (2001), la biotecnología puede proveer los medios para incrementar la intensidad y capacidad de la acuicultura para aumentar en varias veces su producción en los próximos años.

Este artículo tuvo el propósito de revisar y analizar la aplicación de biotecnologías clásicas utilizadas en la producción de peces y moluscos cultivados, con énfasis en aspectos reproductivos.

BIOTECNOLOGIAS APLICADAS A MEJORAR ASPECTOS DE LA REPRODUCCION

Control de la maduración reproductiva.

El proceso de maduración sexual es una etapa prolongada que en los diversos grupos de organismos suele representar, entre otros, cambios fisiológicos y morfológicos marcados que producen cambios en la calidad de los productos que de ellos se obtiene, lo que condiciona temporalmente las etapas finales del cultivo determinando las épocas de cosecha.

En animales, los principales objetivos al manejar la reproducción y que se pueden lograr a través de biotecnologías reproductivas son el control temporal de la maduración, el control de la fertilidad, el control del sexo genético, y el control de la proporción de sexos en la progenie.

En los peces, estos tienen una época de reproducción, que se entiende como el período del año en que la especie realiza la puesta natural. Este período suele ser corto, con una duración y época propias a cada especie. Sin embargo, para que la puesta tenga lugar es necesario que previamente, y en un proceso prolongado, se haya producido el desarrollo de las gónadas. Así el ciclo reproductivo de los salmónidos y otros peces involucra los eventos de pubertad, recrudescencia gonadal y maduración sexual, los que, modulados por factores ambientales y controlados por su sistema neuroendocrino, conducen a que los peces sean capaces de producir gametos y generar su descendencia.

Los salmónidos introducidos al hemisferio sur inician su recrudescencia estimulados por fotoperíodos crecientes después del solsticio de invierno, que estimulan la actividad neuroendocrina, y culminan desovando a fin del otoño o comienzo del invierno siguiente. Estas variaciones fotoperiódicas, y las de las temperaturas del agua, constituyen información fótica y térmica que los peces captan a través de los ojos. La glándula pineal, gracias a su capacidad fotoreceptora también percibe los estímulos lumínicos que transmite al hipotálamo, transformándolas en información química, pulsos de secreción y síntesis de neurotransmisores y de hormonas.

El sistema neuroendocrino involucra un conjunto de hormonas del hipotálamo, la hipófisis y las gónadas. El hipotálamo ejerce sobre la hipófisis un papel regulador, estimulador mediante la hormona liberadora de gonadotropina, Gn-RH e inhibidor por la dopamina. La hipófisis produce gonadotropina, GTH, que es la hormona más relevante en la maduración de los ovocitos, y está presente en las formas de GTH-I y GTH-II. La GTH-I actúa en el ovario sobre las células tecales y granulosas

de los folículos para la síntesis del esteroide 17β estradiol, que a su vez actúa sobre el hígado para iniciar y mantener la síntesis de vitelogenina en el ovocito. La GTH-II interviene en la captura de la vitelogenina sanguínea para incorporarla al ovocito. El 17β estradiol actúa también liberando la producción de gonadotropina, interviene en los procesos de maduración gonadal, y estimula el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios del pez. En la fase final de la maduración de los ovocitos se incrementa el nivel de GTH-I lo que estimula a las células tecales a producir la 17α 20β dihidroxiprogesterona que interviene en la haploidización previa a la ovulación.

En el caso de los machos, la GTH-I actúa sobre las células de Leydig iniciando la producción de 11 keto testosterona, hormona que inicia la maduración testicular vía espermatogénesis. Esta hormona está también relacionada con la manifestación de los caracteres sexuales secundarios de los machos, y su producción máxima coincide con la etapa de espermiación. Los niveles plasmáticos más altos de la GTH-I se alcanzan también durante la espermiación, lo que estimula la producción de la 17α 20β dihidroxiprogesterona para el control del transporte de sodio y potasio, este último requerido para mantener la inmovilidad de los espermatozoides.

A partir del conocimiento del funcionamiento endocrino se generan biotecnologías para adelantar o retrasar este proceso la maduración reproductiva, adelantando o retrasando la ovulación y la espermiación, y en consecuencia, controlar la disponibilidad de ovocitos y espermios. El funcionamiento endocrino de los peces ha sido descrito por Zanuy y Carrillo (1987) Para las principales especies de salmónidos de cultivo en Chile, Estay *et al.* (1995, 1998, 2003) han publicado una serie de trabajos que constituyen la base para aplicar biotecnologías en salmónidos que se cultivan en distintos países, en trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) y trucha café (*Salmo trutta*).

En los cultivos comerciales, la maduración natural

obliga a depender de la disponibilidad de gametos en épocas determinadas, la que a su vez condiciona la época en que se van a obtener las cosechas. En el caso de adelantar la maduración se pueden obtener ventajas de acceso temprano al mercado, y al retrasar se puede disponer de un mayor tiempo para el crecimiento de los peces y eventualmente una producción de *smolts* (fase hacia el final del alevinaje, cuando los peces están capacitados para ser transferidos al mar) de mayor tamaño. Con la combinación de las alternativas de adelantar o retrasar la maduración es posible además manejar en la piscicultura stock adelantados, normales y retrasados en sus desoves, y cubrir mayor parte del año con producción de ovas y cosechas, y una mayor eficiencia productiva al aprovechar mejor la infraestructura y personal.

Dos biotecnologías, de naturaleza fisiológica, están disponibles como parte de aquellas destinadas a la producción comercial de ovas, las que obviamente se aplicarán a los peces que han sido seleccionados para reponer el stock reproductor. Con estas se incide sobre el sistema endocrino, es decir sobre el funcionamiento del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas, y como tal afectarán la fisiología de los reproductores modificando esencialmente la época de su maduración, sin que esto se trasmita a sus descendientes, y ni siquiera se repita para estos mismos reproductores en una eventual maduración al año siguiente. En primer lugar, la inducción ambiental de la maduración, que se basa en el control externo del fotoperíodo para inducir la maduración, y que se debe aplicar antes del inicio de dicho proceso. La segunda es la inducción hormonal de la maduración, que se basa en la administración de hormonas naturales o sintéticas como la GnRHa, y que se aplica poco antes de la maduración final de los peces.

Manejos con fotoperíodo. Numerosos trabajos utilizan fotoperíodos artificiales para modificar, entre otras, la época de maduración en peces. Uno de los trabajos más antiguos corresponde a Hoover (1937) quien lo aplicó para adelantar el ciclo sexual en la trucha de arroyo (*Salvelinus fontinalis*). La gran mayoría de estas aplicaciones se

han estudiado en trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) y otros salmónidos; sin embargo, también existen estudios en peces planos como halibut del Atlántico, *Hippoglossus hipoglossus* (Bjornsson *et al.*, 1998), turbot, *Scophthalmus maximus* (Imsland *et al.*, 1997), lenguado, *Solea solea* (Girin and Devauchelle, 1978) y *Paralichthys dentatus* (Watanabe *et al.*, 1998). Otros peces también estudiados son el *European sea bass*, la lubina, *Dicentrarchus labrax* (Prat *et al.*, 1999); *red drum*, *Sciaenops ocellatus* (Arnold, 1988); *Atlantic cod*, el bacalao común, *Gadus morhua* (Karlsen *et al.*, 1999); *goldfish*, pez dorado, *Carassius auratus* (Kezuka *et al.*, 1989); *gilthead seabream*, dorada, *Sparus aurata* Kissil *et al.*, 2001; barbo, *Barbus barbatus* (Poncin, 1989) y *striped trumpeter*, *Latris lineata* (Morehead *et al.*, 2000).

En la mayor parte de los casos se ha aplicado para adelantar la maduración de los peces con fotoperíodo acelerado, pero también para retrasarla con ciclos fotoperiódicos prolongados. Por ejemplo, en trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) adelantos significativos de la fecha de desove se obtienen con regímenes de fotoperíodo acelerados de 9 y 6 meses (Bon *et al.*, 1997) y un retraso de desoves se logra con luz continua (Boulier y Billard, 1984).

En Chile, Paredes (1994) trabajando con trucha arcoiris obtuvo dos desoves en un grupo de peces sometidos a dos fases de fotoperíodo, aumentando las horas luz hasta alcanzar 16:8, h de luz (hl):horas de oscuridad (ho), y luego reduciendo a 6:18, hl:ho. Repitiendo este ciclo produjo un desove entre mayo-julio y un segundo desove entre enero-marzo siguiente. Leonardi y Klempau (2003) estudiaron el efecto del fotoperíodo en trucha arco iris en el sur de Chile, demostrando que ocurre una inmunosupresión durante el segundo mes de tratamiento con fotoperíodo, y que al término de la aplicación de este a los 60 días, el sistema inmune se normaliza rápidamente.

Existen otras posibles aplicaciones del manejo del fotoperíodo, por ejemplo, Clarke *et al.* (1989) demostró que salmónes coho y *chinook* rey ex-

puestos constantemente a días cortos durante dos meses desde la primera alimentación, uniformó la obtención de smolts S0 (los *smolts* S0 se obtienen antes del primer año de vida). Beacham (1993) describió que fotoperíodo corto aplicado por dos meses mejoró la esmoltificación en salmón de Atlántico en otoño, y produjo mejor supervivencia y crecimiento en invierno. Sigholt *et al.* (1995) describieron que en alevines de un año de salmón del Atlántico expuestos a 5-7 semanas de días cortos seguidos de luz continua, se desencadenaron cambios relacionados a la esmoltificación.

Clarke *et al.* (1981) obtuvo un crecimiento significativamente mayor en salmón coho, pero no en salmón rey, expuestos a un fotoperíodo cambiante vs. un fotoperíodo de 12 h de luz continuas. Según Forsberg (1995) el crecimiento post-smolts del salmón del Atlántico, en granjas terrestres, fue fuertemente influenciado por el fotoperíodo. La más reciente y más completa actualización sobre la regulación de la maduración aplicando fotoperíodo corresponde a Bromage *et al.* (2001) quienes revisaron, en peces, los efectos de la interacción entre el fotoperíodo y factores ambientales como temperatura, salinidad, estado nutricional y melatonina.

Cabe destacar que la producción de *smolts* S0, se puede lograr utilizando aguas de temperaturas adecuadas para el rápido crecimiento de los alevines. Esto ocurre en forma generalizada en la industria de salmón coho en Chile (Neira *et al.*, 1995), la que al utilizar aguas con temperaturas moderadas de lagos y fiordos logra salir con *smolts* al mar a los 8-9 meses de edad, logrando reducir el ciclo reproductivo de tres a dos años, como es habitual en el hemisferio norte.

Inducción hormonal de la ovulación. En una revisión reciente, Zohar y Mylonas (2001) resumieron el progreso en metodologías de aplicación de hormonas, que se inició con los trabajos de Hous-say (1930) quién demostró que los efectos de los extractos hipofisarios sobre la maduración sexual en peces y reptiles. Estos resultados permitieron el desarrollo de la hipofización, técnica que se

aplica en peces y consiste en inyectar extractos de hipófisis, los que contienen entre otros productos, hormonas inductoras de la maduración sexual. Desde la década de los años 1970 existen preparaciones hipofisarias de carpa y salmón, purificadas por cromatografía, disponibles para especies de peces filogenéticamente relacionadas.

También la década de los años setenta, comenzó la utilización de gonadotrofina coriónica humana hCG para controlar la maduración de peces, disponible como preparados clínicos sin limitaciones de especificidad. En la misma época se inició la utilización de hormonas liberadoras de gonadotrofina (GnRH), primero de mamíferos y luego de peces. Finalmente fue sintetizada químicamente; éstas últimas, conocidas como análogas o GnRHa, son más económicas y más eficientes en la inducción de maduración y se pueden inyectar o administrar mediante implante del producto peletizado.

De manera similar al uso del fotoperíodo, el uso de hormonas como la GnRHa ha permitido adelantar la fecha de desove en varias especies de peces, principalmente salmónidos, aunque por períodos inferiores a cuatro semanas, siendo la sincronización de los desoves la mayor utilidad de estas aplicaciones. Entre otros, Sower *et al.* (1984) demostraron que la inyección de GnRHa permite adelantar los desoves por 3 a 4 semanas en salmón coho; Mylonas *et al.* (1992) obtuvieron un adelanto de 9 días en la ovulación de truchas café inyectadas con GnRHa y en forma similar, Slater *et al.* (1995) redujeron los días a la ovulación y a la espermiación en salmón rojo (sockeye).

En Chile, Estay *et al.*, (1996) comprobaron la respuesta hormonal en truchas arco iris inyectadas con GnRHa, midiendo la producción de GtH II y la respuesta ovulatoria, la que se anticipó en 15 días respecto de peces control sin tratar. En el trabajo de Zohar y Mylonas (2001) además se incluyeron especies de *Carassius*, *Clarias*, *Cyprinus*, *Oreochromis*, *Perca*, *Solea* y *Sparus*. Por lo tanto, es evidente que en una gama de especies se obtienen respuestas positivas a la administración

exógena de la hormona, siendo posible adelantar la ovulación y espermiación. Sin embargo, esta respuesta a la inducción hormonal no está exenta de efectos negativos sobre la calidad de los gametos obtenidos, situación que es necesario evaluar antes de usarla.

Las investigaciones realizadas en Chile por Rubio (1996) en salmón coho muestran la respuesta de machos y hembras a la inducción con GnRHa. Se consignan los resultados para cuatro grupos experimentales con similar número de hembras: 1. Grupo I en que se inyectaron las hembras y los machos, 2. Grupo II en que sólo se inyectaron los machos, 3. Grupo III en que sólo se inyectaron las hembras, y 4. Grupo IV, grupo testigo, en que ni machos ni hembras fueron inyectados. Considerando que no hubo diferencias estadísticamente significativas en longitud, peso, fecundidad y diámetro de ovas entre las hembras de los cuatro grupos, en el Grupo I la supervivencia fue un 30% menor que en el Grupo IV, diferencia que se podrían atribuir a los efectos de la inducción hormonal.

En moluscos, el control de la maduración se ha orientado principalmente al desarrollo de técnicas para el acondicionamiento y estimulación de la maduración final y para el desove, utilizando inductores físicos y químicos. Por ejemplo en ostiones, se ha estudiado el uso de temperatura y serotonina (Vélez *et al.*, 1990), monoaminas y prostaglandinas (Martínez *et al.*, 1996a,b), dieta y temperatura (Martínez *et al.*, 2000). Trabajos similares se han realizado también con especies de *Ostrea*, *Crassostrea* y *Pecten* (Martínez *et al.*, 2000).

Control de la fertilidad.

Los cambios asociados a la maduración reproductiva antes analizados también justifican la importancia práctica de controlar la fertilidad de los peces en cultivos. En términos generales se postula que los cambios fisiológicos y morfológicos asociados a la maduración implican derivar una importante cantidad de la energía metabólica a esas actividades, lo que provoca una detención o

al menos una reducción en la tasa de crecimiento a partir del inicio de la maduración. Entonces, sería posible que al bloquear la maduración y obtener de esta manera individuos estériles, sin desarrollo gonadal, permita que los individuos mantengan una alta tasa de crecimiento, llegando a la cosecha con mayor tamaño, sin cambios de coloración y de calidad de la carne, atribuibles al desplazamiento de lípidos desde la musculatura hacia las gónadas y posterior hidratación del tejido muscular. Entre las alternativas más usadas para producir esterilidad está el uso de la poliploidización, probada en numerosas especies.

Poliploidía experimental. La poliploidía es una variación cuantitativa del genoma que afecta al conjunto de los cromosomas de las células, aumentando el número de juegos cromosómicos. En peces, la inducción experimental de poliploidías se realiza, evitando que se complete la meiosis II en la hembra, una vez que el ovocito es fecundado. De este modo se impide la reducción del número de cromosomas a la mitad (n). Por lo tanto, el embrión presentará una constitución cromosómica triploide ($3n$), formada por dos juegos cromosómicos maternos y uno paterno. Esta es una metodología económica, muy eficiente, con baja mortalidad, cuya única desventaja es la pobre respuesta por parte de los machos. No obstante, es muy útil cuando se manejan poblaciones constituidas sólo por hembras.

Los métodos experimentales utilizados para la obtención de poliploides corresponden a: 1. métodos físicos, ej. choques térmicos de calor o frío, choques de presión o termoeléctricos, 2. métodos químicos, ej. Aplicaciones de citocalasina B, colchicina o 6-dimetilaminopurina, y 3. métodos genéticos, ej. cruzamientos de hembras diploides con machos tetraploides.

Aplicaciones de la poliploidía experimental. En peces, las primeras inducciones exitosas de triploidías en salmónidos fueron los trabajos de Svardson (1945) y a partir de 1970, numerosas publicaciones describieron inducción de poliploidías en peces de importancia económica.

La producción de individuos poliploides tiene varias aplicaciones posibles. En el caso de los triploides, siendo éstos total o parcialmente estériles, tienen utilidad para aumentar la eficiencia de producción de carne al reducir el gasto de energía en el proceso de maduración sexual, incrementando el crecimiento, evitando el deterioro en la calidad de la carne y previniendo cambios en la coloración de la piel. Con la utilización de peces estériles se puede además retrasar las cosechas, logrando peces de mayor peso y edad. También se evita la aparición de machos precoces entre los peces destinados a cosecha. En el caso de los tetraploides con fertilidad normal, son potencialmente útiles en la producción de triploides mediante cruzamientos con individuos normales. Estos se obtienen impidiendo la primera segmentación mitótica del huevo; al impedir que la célula se divida (citodíresis), el núcleo del embrión al reconstituirse queda formado por el doble del número cromosómico normal de la especie, originándose de este modo un embrión tetraploide ($4n$).

Inducción de poliploidías. La inducción de poliploidías se ha aplicado a numerosas especies de peces. Por ejemplo, la revisión bibliográfica, abarcando estudios sobre triploidía en estos organismos desde 1943 a 1988, realizada por Benfey (1989), reveló la existencia de trabajos en las familias *Salmonidae*, *Characidae*, *Cyprinidae*, *Centrarchidae*, *Ciclilidae*, *Pleuronectidae*, con un claro predominio en la primera, con 29 especies sobre el total de 41 incluidas en dicha revisión.

Algunos trabajos recientes, que incluyen al turbot (*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. A su vez validan el uso del análisis de regiones de organización nucleolar (análisis NOR) para comprobar los niveles de ploidías en esta especie. También se ha analizado la utilización de choques térmicos fríos en la inducción comercial de triploides, investigando los efectos de la duración del choque térmico frío en la supervivencia y en los porcentajes de triploidías. El objetivo de es-

tas investigaciones ha sido obtener un 100 % de triploides, con la mejor supervivencia de larvas posible y comparar la supervivencia temprana y el crecimiento de triploides relación con diploides (Piferrer *et al.*, 2000, 2003).

La inducción de triploidías también se ha realizado en lenguado de cola amarilla (*Pleuronectes ferrugineus*). Manning y Crim (1999) investigaron los parámetros requeridos para la producción de larvas triploides, aplicando choques de presión hidrostática post fecundación. En *seabream* (*Sparus aurata*), 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. Algo similar ocurre en *red seabream* (*Pagrus major*).

De acuerdo con los trabajos publicados es poco evidente que en peces triploides exista un mejor crecimiento a la cosecha. No obstante, algunas evaluaciones productivas en salmónidos concluyen que con los peces triploides se logra un mayor crecimiento de juveniles al controlar la maduración temprana (Galbreath *et al.*, 1994). En algunos casos se logran mejores conversiones de alimento con reducción de costos, y se obtienen peces con buena calidad de carne para su procesamiento y ahumado (Pepper, 1991). Arai (2001) revisó la utilización de técnicas de manipulación cromosómica en peces en Japón, incluyendo la inducción de triploidías en trucha arco iris, salmón amago (*Oncorhynchus rhodurus*), salmón masu (*Oncorhynchus masou*), salmón yamame (*Oncorhynchus masou* de agua dulce) y locha (*Misgurnus anguillicaudatus*).

En Chile, se introdujo la inducción experimental de poliploidías en trucha arco iris, salmón coho y salmón del Atlántico, estandarizando las metodologías y adecuándolas a las diferentes especies. Los primeros trabajos describieron las metodologías de triploidización más adecuadas para las condiciones ambientales locales y la influencia de diversos factores físicos y fisiológicos en la eficiencia de la triploidización en trucha arco iris, informando eficiencias cercanas al 90% (Díaz *et*

al., 1993; Iturra *et al.*, 1990).

De acuerdo con Gosling (2003), la aplicación de manipulaciones cromosómicas en moluscos bivalvos comenzó al inicio de la década de 1980, siendo las ventajas de la triploidización muy similares al caso de peces, destacando el incremento del crecimiento somático al redestinar energía metabólica y evitar los deterioros en la calidad de la carne por efecto de la maduración. En bivalvos es posible inducir triploides por bloqueo de la meiosis I o II, debido a que los gametos se liberan previo a la expulsión del primer polocito. Esto se obtiene utilizando tratamientos físicos o químicos similares a los descritos para peces, y también producir tetraploides por bloqueo de la primera división mitótica. En el texto mencionado se cita especies de *Mytilus*, *Ruditapes*, *Placopecten*, *Pecten*, *Clamys*, *Crassostrea*, *Ostrea*, *Saccostrea*, y *Pinctada*, en las cuales se han logrado exitosos porcentajes de triploidización. En la revisión realizada por Arai (2001) sobre la utilización de técnicas de manipulación cromosómica en Japón, donde destacan especies de peces, se incluye también producción de ostras triploides. En Chile se han realizado trabajos de triploidización en *Mytilus* (Scarpa *et al.*, 1994; Toro y Sastre, 1995), y *Argopecten* (Canello *et al.*, 1992; Winkler *et al.*, 1993).

*Control de la proporción de sexos en la proge-
nie.*

Importancia del control de la proporción de sexos.

La maduración sexual determina el tiempo que los organismos se pueden ser mantener en condiciones de cultivo. Al comenzar este proceso biológico las características morfológicas y fisiológicas cambian notoriamente. En peces, se han descrito cambios de coloración de la piel y de la calidad de la carne debidos al desplazamiento de lípidos desde la musculatura hacia las gónadas y la posterior hidratación del tejido muscular. En algunas especies la maduración precoz de una fracción importante de la población es un problema adicional, que sucede generalmente en machos.

Otro aspecto importante son las diferencias en la tasa de crecimiento que pueden existir entre machos y hembras de una especie, que pueden determinar que el tamaño alcanzado en un determinado tiempo sea significativamente diferente, lo que haría preferir unos u otros desde el punto de vista productivo. Si el crecimiento es mayor y/o los peces de un determinado sexo maduran más tardíamente la alternativa sería favorecer el manejo con dicho sexo. Por ejemplo, si las hembras maduran más tardíamente que los machos, pueden ser una alternativa prolongar su estadía en el mar para obtener pesos mayores, o posponer su cosecha a períodos de mejor precio de mercado. Para enfrentar este tipo de situaciones se han desarrollado manipulaciones, algunas directas a nivel de la fisiología gonadal, e indirectas vía modificación del sexo genético, que permiten establecer distintas modificaciones al proceso de reproducción destinados a producir peces monosexo.

Producción directa de progenies monosexo vía reversión hormonal del sexo fisiológico. Existe una amplia gama de procedimientos para producir reversión de sexo, tanto para producir masculinización como feminización. Yamasaki (1983), Hunter y Donaldson (1983), y más recientemente Pandian y Sheela (1995) hacen una acabada revisión de los procedimientos empleados; particularmente estos últimos autores mencionan que estas reversiones han sido posibles utilizando 31 esteroides diferentes, en 47 especies de peces de las Familias *Cichilidae*, *Cyprinodontidae*, *Anabantidae*, *Poecilidae*, *Salmonidae* y *Cyprinidae*.

Básicamente existen dos formas para la administración de las hormonas: por inmersión o por ingestión. La segunda es la más practicada, incorporando la hormona en la dieta normal, con la cual los peces son alimentados por un período dado. Las variables a considerar son la naturaleza de la hormona, concentración en la dieta, lapso de tiempo del suministro y el momento del inicio del tratamiento.

En el caso de producir stocks todo macho aplicando la masculinización mediante el uso

de hormonas sexuales, entre los andrógenos empleados se encuentran algunos de origen natural como testosterona, 11 ketotestosterona y androstenediona. Entre los sintéticos, el más usado es 17 α -metiltestosterona, fácil de obtener, presenta gran estabilidad química, pero no necesariamente es el más potente.

La hormona se incluye en el alimento disuelta en etanol absoluto, el que se evapora posteriormente. El rango de concentración se ha determinado por ensayo y error; pero la tendencia es usar la menor concentración que permita tener un porcentaje apropiado de reversión. El nivel normal utilizado en la trucha arcoiris es de 3 mg·kg⁻¹ de alimento, lo que genera aproximadamente un 100 % de neomachos a partir de hembras genotípicas. Dosis de 1,0 y 0,5 mg·kg⁻¹ de alimento producen igualmente buenos porcentajes de neomachos (80%).

En la trucha arcoiris, los mejores resultados se obtienen al iniciar el tratamiento con la primera alimentación. En el caso del salmón coho, el tratamiento se debe iniciar cuando el 50% de las ovas están eclosionadas y por lo tanto el tratamiento debe realizarse por inmersión de las ovas en una solución de la hormona de 400 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Con relación al tiempo de suministro, las concentraciones señaladas para truchas arcoiris, los mejores resultados se obtienen con suministros entre 60 y 90 días. Tiempos superiores a 120 días producen porcentajes elevados de esterilidad, lo que también se produce al aumentar la concentración de la hormona. En el salmón coho, el mayor porcentaje de machos se produce al aplicar una sola inmersión a los 514 grados día en una solución de 400 μg de 17 α -metiltestosterona por un lapso de dos horas, obteniéndose un 78% de machos. En Chile Dazarola *et al.*, (1990), obtuvieron truchas monosexo por inmersión e ingestión de 17 α -metiltestosterona, alcanzando un 81% de machos. En tilapia del Nilo en un estudio reciente de Wassermann y Bertolla (2001) se ha utilizado la inmersión en andrógenos para revertir el sexo.

En peces también es factible la feminización (Yamamoto, 1953), mediante el tratamiento hormonal con un estrógeno, produciendo stocks todo hembra. Estos tratamientos son menos eficaces en revertir los machos a hembras y por lo tanto se necesitan dosis más elevadas para producir buenas tasas de reversión. Otra diferencia importante con la masculinización es que los tratamientos orales deben ser acompañados de inmersión en soluciones de estrógenos. El estrógeno más usado es el 17β - estradiol, que es de fácil obtención y gran estabilidad química. Este es incluido en el alimento en una solución de etanol absoluto el que se evapora posteriormente.

Para el caso de salmónidos, Purdom (1993) reúne resultados de feminización en *O. mykiss*, *O. kisutch*, *O. tshawytscha*, *Salmo trutta*, utilizando distintas dosis de estradiol por kilo de alimento o por litro de agua, y con diferentes tiempos de tratamientos para lograr resultados óptimos de reversión. Una completa revisión de estrategias de feminización en peces teleosteos fue publicada por Piferrer (2001) destacando su aplicación en al menos 56 especies, con tres estrógenos naturales y nueve sintéticos.

Producción indirecta de progenies monosexo vía reversión hormonal del sexo fisiológico. La aplicación de andrógenos o estrógenos producen directamente progenies todo macho o todo hembra. En el trabajo citado de Piferrer (2001) se analizan también formas indirectas de producir estas progenies, con la ventaja de la correspondencia entre el sexo genético y fisiológico de los individuos. Es así que en especies donde la hembra es cromosómicamente homogamética, se pueden producir progenies todo macho feminizando en una primera etapa una progenie de un cruzamiento normal, parte de la cual resultará ser machos revertidos a hembras (neohembras); del cruzamiento de estas con machos heterogaméticos resultará una fracción de machos homogaméticos, que al cruzarse con hembras homogaméticas generarán progenies todo macho.

En especies donde el macho es cromosómicamente homogamético, se pueden producir progenies

todo macho feminizando en un primer paso una progenie de un cruzamiento normal, parte de la cual serán neohembras, que al cruzarse con machos homogaméticos producirán progenies todo macho.

De manera equivalente pueden producirse progenies todo hembra. Es así que en especies donde la hembra es cromosómicamente homogamética, se pueden producir progenies todo hembra masculinizando en una primera etapa una progenie de un cruzamiento normal, parte de la cual resultará ser hembras revertidas a machos (neomachos); del cruzamiento de estos con hembras homogaméticas resultarán progenies todo hembra. Resultados de reversión de sexo en trucha arco iris para obtención de neomachos en pisciculturas chilenas han sido descritos por Díaz *et al.*, (2002), incluyendo la caracterización morfológica y cromosómica de los neomachos y la producción de progenies todo hembra.

En especies donde la hembra es cromosómicamente heterogamética, se pueden producir progenies todo hembra masculinizando en una primera etapa una progenie de un cruzamiento normal, parte de la cual resultará ser hembras revertidos a machos (neomachos); del cruzamiento de estos con hembras heterogaméticas resultará una fracción de superhembras, que al cruzarse con machos homogaméticos generarán progenies todo hembra.

Producción de progenies monosexo vía control del sexo genético. En primer lugar es importante recordar que la determinación del sexo genético ocurre al momento de la fecundación. En algunas especies de peces, entre las que se cuentan algunos salmónidos, el sistema de determinación del sexo genético es del tipo XX/XY y la diferenciación de los cromosomas sexuales es suficientemente evolucionada ya que permite el reconocimiento de estos cromosomas al examinar el cariotipo de los individuos.

Estas situaciones permiten utilizar mecanismos como la inducción artificial de partenogénesis

para controlar el sexo genético en la progenie de un cruzamiento determinado. Las formas de partenogénesis son la ginogénesis y la androgénesis, ambas posibles de inducir experimentalmente.

En la ginogénesis se producen individuos cuyo material genético procede sólo del progenitor hembra. Consiste en lograr el desarrollo del embrión activando ovocitos con espermatozoides inactivados genéticamente. La producción de ginogénéticos requiere combinar la inactivación del semen con la diploidización del complemento cromosómico materno. Vale decir, primero se induce el desarrollo haploide del huevo, previo tratamiento de los espermatozoides para eliminar su aporte genético, y luego, los huevos son sujetos a otro tratamiento, impidiendo la segunda división meiótica o la primera división mitótica, para duplicar su material genético.

La ginogénesis natural fue descrita por primera vez en los peces en *Poecilia formosa* y más tarde en otras especies de esta Familia (*Poeciliidae*), que se reproducen ginogénicamente en la naturaleza. En ellas lo que realmente sucede es una activación de los huevos por espermatozoides heterólogos, es decir, de otras especies. Estos, sin aportar su ADN, provocan el inicio del desarrollo del huevo. Se conocen también observaciones de ginogénesis en peces de otras Familias: peces planos (*Pleuronectidae*), esturiones (*Acipenseridae*), truchas (*Salmonidae*), carpas (*Cyprinidae*), pez gato (*Siluridae*), carasios (*Characidae*).

Existe información que da cuenta de inducción experimental de ginogénesis en peces desde hace ya muchos años: En *Salmo trutta fario*, trucha café, Opperman (1913) desarrolló alevines ginogénéticos utilizando espermios irradiados con radio. Más tarde se conocieron resultados de inducción de ginogénesis en locha, carpa y otras especies.

La ginogénesis experimental no se puede aplicar directamente a producir progenies todo hembra en la piscicultura, dada la alta consanguinidad y

alta mortalidad de las progenies así producidas. Por esas razones, se vincula la producción de ginogénéticos con la masculinización, produciendo neomachos, y a partir de ellos progenies todo hembra. En Chile se han realizado trabajos de inducción experimental de ginogénesis en trucha arco iris, salmón coho y salmón del Atlántico. Uno de los primeros fué la inducción en trucha arco iris (Colihueque *et al.*, 1992) estableciendo un protocolo para dicha especie.

Es interesante agregar la posibilidad de producir peces monosexo hembra estériles, una alternativa muy interesante para evitar los inconvenientes de la madurez sexual. Para la obtención de estos peces, es necesario utilizar semen de neomacho para la formación del cigoto más la aplicación del choque térmico para producir la triploidización. Arai (2001) ha revisado la utilización de técnicas de manipulación cromosómica para obtener progenies monosexo en peces en Japón, incluyendo especies como trucha arco iris, salmón amago, salmón masu, salmón yamame, salmón coho, ayu, char, e hirame. Predomina la producción de progenies todo hembra y en varios casos todo hembra triploides.

Alternativamente, la androgénesis permite sólo la herencia paterna, y experimentalmente puede ser producida inactivando cromosómicamente las ovas, fecundando con espermios normales, e inhibiendo la primera división mitótica del huevo. Este método ha sido efectivo en salmónidos como el salmón amago (Onazato, 1993), como también han sido exitosamente practicado en el esturión (Urbányi *et al.*, 1999) y en carpa (Bhise y Khan, 2002). En especies de tilapias cuyo sistema de determinación genética del sexo donde los machos son homogaméticos, Beardmore *et al.* (2001) han producido los androgenéticos mediante cruza- mientos y feminizaciones sucesivas.

Los peces androgenéticos también exhiben baja supervivencia; esta mejora cuando se utiliza espermatozoides diploides de tetraploides naturales o inducidos. La principal ventaja es una mayor

rapidez de crecimiento por menores tiempos generacionales de los machos en varias especies.

Control genético del sexo en moluscos. En moluscos, de acuerdo a Gosling (2003), la ginogénesis no ha sido lograda aún. No existe información respecto a inducción de androgénesis.

BIOTECNOLOGIAS EN LA NUTRICION Y EN EL CONTROL DE ENFERMEDADES DE PECES

En estas dos áreas la aplicación de biotecnologías clásicas es escasa y menos relevante en términos de efectos en la productividad. En el primer caso se puede citar el uso de promotores de crecimiento, aplicados por ejemplo para mejorar el peso y la conversión de alimento en camarones y salmónidos (Castro, 1992).

En el tema de enfermedades, las aplicaciones clásicas tienen que ver con el uso de inmunostimulantes utilizados para aumentar la respuesta inmune de los peces, tema revisado por Menéndez (2001) destacando una diversidad de compuestos aplicados por inyección, en forma oral, o por inmersión, a distintas especies de peces. Otra aplicación clásica son las vacunas, aplicando las tecnologías de anticuerpos monoclonales y de vacunas recombinantes, enfoque sintetizado por Landau (1992). Un aspecto más reciente es la búsqueda de péptidos antimicrobianos, en desarrollo en Chile por Marshall y Arenas (2003) como alternativa al uso de antibióticos.

CONCLUSIONES

En la reproducción de especies acuícolas cultivadas, existen biotecnologías, fisiológicas y genéticas, cuya aplicación puede producir efectos favorables para incrementar la capacidad productiva de especies económicamente importantes. La factibilidad de aplicación de estas técnicas se ha demostrado en una amplia gama de especies, principalmente en peces y moluscos, como asimismo en especies cultivadas en Chile. Varias de estas biotecnologías tienen plena aplicación industrial, sobre todo en salmonicultura, siendo esperable

que en el futuro se consolide la aplicación de estas estrategias tecnológicas en otras especies, en tanto se desarrolle la investigación y la transferencia tecnológica de los resultados. Por lo tanto, existe la necesidad de fomentar la realización de proyectos de investigación y desarrollo, relacionados con estas materias en Chile.

RESUMEN

A partir de una distinción respecto a lo que se consideran biotecnologías clásicas, se revisa en este artículo, su aplicación a la reproducción de especies cultivadas. Se establecen los desafíos que implica el control de la maduración reproductiva, el control de la fertilidad, el control del sexo genético y de la proporción de sexos en las progenies, como áreas en las que la aplicación de biotecnologías puede contribuir a incrementar la capacidad productiva. Se analiza las contribuciones de diversos autores en aplicar biotecnologías de naturaleza fisiológica y/o genética en dichas áreas, principalmente en peces y moluscos. La factibilidad de aplicación de estas técnicas se ha demostrado en una amplia gama de especies, principalmente en peces y moluscos, como asimismo en especies cultivadas en Chile. Varias de estas biotecnologías tienen plena aplicación industrial, sobre todo en salmonicultura, siendo esperable que en el futuro se consolide la aplicación de estas estrategias tecnológicas en otras especies, en tanto se desarrolle la investigación y la transferencia tecnológica de los resultados. Teniendo Chile un gran potencial de producción de peces y moluscos, resulta de primordial importancia fomentar la realización de proyectos de investigación y desarrollo, relacionados con estas materias.

Palabras clave: Acuicultura, biotecnología, reproducción.

LITERATURA CITADA

Arai, K. 2001. Genetic improvement of aquaculture finfish species by chromosome manipulation techniques in Japan. *Aquaculture* 197:205-228.

- Arnold, C.R. 1988. Controlled year-round spawning of red drum, *Sciaenops ocellatus* in captivity. Contributions on Marine Sciences 30:65-70.
- Beacham, T.D., and C.B Murray. 1993. Acceleration of maturity of pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*) using photoperiod control. Aquaculture 109:315-325.
- Beardmore, J.A., G.C. Mair, and R.I. Lewis. 2001. Monosex male production in finfish as exemplified by tilapia: applications, problems, and prospects. Aquaculture 197:283-301.
- Benfey, T.J. 1989. A bibliography of triploid fish, 1943 to 1988. Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences N°1682. 33 pp.
- Bhise, M.P., and T.A. Khan. 2002. Androgénesis: the best tool for manipulation of fish genomes. Turk Journal of Zoology 26:317-325.
- Bjornsson, B.T., O. Haldorsson, C.Haux, B. Norberg, and C. Brown. 1998. Photoperiod control of sexual maturation of Atlantic halibut (*Hippoglossus hipoglossus*): plasma thyroid hormone and calcium levels. Aquaculture 166:117-140.
- Bon, E., G. Corraze, S. Kaushik, and F. Le Menn. 1997. Effects of accelerated photoperiod regimes on the reproductive cycle of the female rainbow trout: I. Seasonal variations of plasma lipids correlated with vitellgenesis. Comparative Biochemistry and Physiology 188A:183-190.
- Boulier, A., and R. Billard. 1984. Delay of gametogenesis and spawning by constant illumination of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) during the first reproductive cycle. Canadian Journal of Zoology 62:2183-2187.
- Bromage, N., M. Porter, and C. Randall. 2001. The environmental regulation of maturation in farmed finfish with special reference to the role of photoperiod and melatonin. Aquaculture 197:63-98.
- Canello, F., L. Paredes y J. Toro. 1992. Inducción de triploidía en el ostión del norte, *Argopecten purpuratus*, por medio de shock térmico de calor. Investigación Pesquera 37:5-11.
- Castro, E. 1992. Promotores de crecimiento y productividad acuícola. Aquanoticias 13:4-6.
- Clarke, W.C., J.E. Shelbourn, and J.R. Brett. 1981. Effect of artificial photoperiod cycles, temperature, and salinity on growth and smolting in underyearling coho (*Oncorhynchus kisutch*), chinook (*O. tshawytscha*), and sockeye (*O. nerka*) salmon. Aquaculture 22:105-116.
- Clarke, W.C., J.E. Shelbourn, T. Ogasawara, and T. Hirano. 1989. Effect of initial daylength on growth, seawater adaptability and plasma growth hormone levels in underyearling coho, chinook, and chum salmon. Aquaculture 82:51-62.
- Cohen, S.N., A.C.Y Chang, H.W. Boyer, and R.B. Helling. 1973. Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. PNAS 70:3240-3244.
- Colihueque, N., P. Iturra, N.F. Díaz, A. Veloso, and F. Estay. 1992. Karyological analysis and identification of hetero-chromosomes in experimental gynogenetic offspring of *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Revista Brasileira de Genética 15:535-546
- Dazarola, G., Filp, M., Cerisola, H., Yany, G. y A. Gamonal. 1990. Producción de monosexo de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) por inmersión e ingestión de 17α -metiltestosterona. Invest. Marinas (Valparaíso) 18:81-91.
- Díaz, N.F., P. Iturra, A. Veloso, F. Estay, and N. Colihueque. 1993. Physiological factors affecting triploid production in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Aquaculture 114:33-40.
- Díaz, N.F., N. Colihueque y F. Estay. 2002. Manejos con «neomachos» aplicados al cultivo de peces. Avances en Producción Animal 26:95-102.
- Estay, F., N.F. Díaz, L. Valladares y G. Dazarola. 1995. Manejo reproductivo de salmónidos. Serie Publicaciones para la Acuicultura N°2. Santiago, Chile. 61 pp.
- Estay, F., A.M. Ronco y L.G. Cáceres. 1996. Respuesta ovulatoria y niveles séricos de GtHII alcanzados en hembras de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) inducidas a ovular con GnRH α D-Ala6. Archivos de Medicina Veterinaria 28:73-79.
- Estay, F., R. Neira, N.F. Díaz, L. Valladares, and A. Torres. 1998. Gametogenesis and

- sex steroid profiles in cultured coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*, Walbaum). *Journal of Experimental Zoology* 280:429-438.
- Estay, F., A. Díaz, R. Pedraza, and N. Colihueque. 2003. Oogenesis and plasma levels of sex steroids in cultured females of brown trout (*Salmo trutta* Linnaeus, 1758) in Chile. *Journal of Experimental Zoology* 298A:60-66.
- Forsberg, O.I. 1995. Empirical investigations on growth of post-smolt Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in land-based farms. Evidence of a photoperiodic influence. *Aquaculture* 133:235-248.
- Galbreath, P.F., St. Jean, W.S., Anderson, V., and G.H. Thorgaard. 1994. Freshwater performance of all female diploid and triploid Atlantic salmon. *Aquaculture* 128:41-49.
- Girin, M., and N. Devauchelle. 1978. Decalage de la periode de reproduction par raccourcissement des cycles photoperiodique et thermique chez des poissons marin. *Annals de Biologie Animal. Biophys* 18:1059-1066.
- Gosling, E. 2003. Bivalve Molluscs. Biology, Ecology and Culture. Fishing News Books. Blackwell Publishing. Oxford, U.K. 443 pp.
- Haffray, P., J.S. Bruant, J.M. Facqueur, and A. Fostier. 2003. Effect of triploidy in gilthead seabream *Sparus aurata* (L.). *Genetics in Aquaculture VIII*. Puerto Varas, Chile. Book of Abstracts, p.60.
- Hew, C.L., and G.L. Fletcher. 2001. The role of aquatic biotechnology in aquaculture. *Aquaculture* 197:191-204.
- Hoover, E.E. 1937. Experimental modification of the sexual cycle in trout by control of light. *Science* 86:425-426.
- Houssay, B.A. 1930. Acción sexual de la hipófisis en los peces y reptiles. *Revista de la Sociedad Argentina de Biología* 106:686-688.
- Hunter, G.A., and E.M. Donaldson. 1983. Hormonal sex control and its application to fish culture. p 223-303. *In*: Hoar, W.S., Randall, D.J. and Donaldson, E.M. (eds.). *Fish Physiology*. Vol IX. Reproduction, Part B. Behavior and Fertility control. Academic Press, N.Y., USA.
- Imsland, A.K., A. Folkvord, Ó.D.V. Jónsdóttir, and S.O. Stefansson. 1997. Effects of exposure to extend photoperiod during the first winter on long-term growth and age at first maturity in turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture* 159:125-141.
- Iturra, P., A. Veloso, N.F. Díaz, N. Colihuenque y F. Estay. 1990. Resultados preliminares de inducción de genomas triploides en trucha arco iris. *Biología Pesquera* 19:73-79.
- Karlsen, O., G.L. Taranger, R. Dahle, and B. Norberg. 1999. Effects of exercise and continuous light on early sexual maturation in farmed Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). p 328-330. *In*: Taranger, G.L., Norberg, B., Stefansson, S., Hansen, T., Kjesbu, O. and Anderson, E. (eds). *Proceedings of Vith International Symposium on Reproductive Physiology of Fish*. Bergen.
- Kezuka, H., M. Kobayashi, K. Aida, and I. Hanyu. 1989. Effects of photoperiod and pinealectomy on the gonadotropin surge and ovulation in goldfish *Carassius auratus*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 55:2099-2103.
- Kissil, G.W., I. Lupatsch, A. Elizur, and A. Zohar. 2001. Long photoperiod delayed spawning and resulting increased somatic growth in gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 200:363-379.
- Landau, M. 1992. *Introduction to Aquaculture*. John Wiley and Sons, Inc. N.Y., U.S.A. 440 pp.
- Leonardi, M.O., and A.E. Klempau. 2003. Artificial photoperiod influence on the immune system of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus kisutch*) in the Southern hemisphere. *Aquaculture* 221:581-591.
- Manning, A.J., and L.W. Crim. 1999. The induction of triploidy in the yellowtail flounder, *Pleuronectes ferrugineus* (Storer). *Proc. 6th International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish*. Bergen. 433 pp.
- Marshall, S., and G. Arenas. 2003. Antimicrobial peptides: a natural alternative to chemical antibiotics and a potential for applied biotechnology. *Electronic Journal of Biotechnology* 6:271-284.
- Martínez, G., C. Garrote, L. Mettifogo, and E. Uribe. 1996a. Monoamines and prostaglandin

- E2 as inducers of the spawning of the scallop, *Argopecten purpuratus* Lamarck. *Journal of Shellfish Research* 15:245-249.
- Martínez, G., F. Saleh, L. Mettifogo, E. Campos, and N. Inestroza. 1996b. Monoamines and the release of gametes by the scallop *Argopecten purpuratus*. *Journal of Experimental Zoology* 274:365-372.
- Martínez, G., C. Aguilera, and L. Mettifogo. 2000. Interactive effects of diet and temperatura on reproductive conditioning of *Argopecten purpuratus* broodstock. *Aquaculture* 183:149-159.
- Menéndez, A.M. 2001. Inmunoestimulantes. Seminario. Magister en Ciencias de la Acuicultura. Universidad de Chile. Santiago, Chile. 11 págs.
- Morehead, D.T., A.J. Ritar, and N.W. Pankhurst. 2000. Effect of consecutive 9 or 12 month photothermal cycles and handling on sex steroid levels, oocyte development and reproductive performance, in female striped trumpeter *Latris lineata* (*Latridae*). *Aquaculture* 189:293-305.
- Mylonas, C., J.M. Hinshaw, and C.V. Sullivan. 1992. GnRH α -induced ovulation of brown trout (*Salmo trutta*) and its effects on egg quality. *Aquaculture* 106:379-392.
- Neira, R., F.J. Estay, N.F. Díaz, and X. García. 1995. Characterization of a two year reproductive cycle for Coho Salmon (*O. Kisutch*) in Chile. Proceedings of the Fifth International Symposium of Fish Physiology of Fish. Austin, Texas 1995. 132 pp.
- Onazato, H. 1993. Direct production of the super male (YY) by androgenesis in amago salmon. *Biology International* 28:69-72.
- Opperman, K. 1913. Die Entwicklung von Vorelleneiern nach Befruchtung mit radiumbestrahlten Samenfadern. *Archiv Mikrosk. Anat.* 83:Abt110:141-189.
- Pandian, T.J., and S.G. Sheela. 1995. Hormonal induction of sex reversal in fish. *Aquaculture* 138:1-22
- Paredes, M.O. 1994. Inducción al desove por manipulación de fotoperíodo y sus efectos sobre la viabilidad de la ova en *Oncorhynchus mykiss*. Tesis para optar al título de Ingeniero Pesquero. Universidad Católica de Valparaíso. Valparaíso, Chile. 44 pp.
- Pepper, V.A. 1991. Proceedings of the Atlantic Canada Workshop on methods for production of non-maturing salmonids. Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences N° 1789.
- Piferrer, F. 2001. Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. *Aquaculture* 197:229-281.
- Piferrer, F., R.M. Cal, B. Alvarez-Blázquez, L. Sánchez, and 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, and 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.
- Poncín, P. 1989. Effects of different photoperiods on the production of the barbel, *Barbus barbus* (L.), reared at constant temperature. *Journal of Fish Biology*. 35:397-400.
- Prat, F., S. Zanuy, M. Carrillo, and N. Bromage. 1999. Effects of long term constant short and long photoperiod regimes on the spawning performance and sex steroid levels of both sexes of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) *Journal of Fish Biology* 54:125-137.
- Purdom, C.E. 1993. Genetics and fish breeding. Chapman and Hall, London, Glasgow and NY. USA. 277pp.
- Rubio, G. 1996. Características de las respuestas en parámetros reproductivos en salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) al implante de la hormona GnRH α . Tesis para optar al Título de Ingeniero en Acuicultura. Universidad Nacional Andrés Bello. Santiago, Chile. 45 pp.
- Scarpa, J.S., J.E. Toro, and K.T. Wada. 1994. Direct comparison of six methods to induce triploidy in bivalves. *Aquaculture* 119:119-133.
- Sigholt, T., M. Staurnes, H.J. Jakobsen, and T. Asgard. 1995. Effects of continuous light and

- short-day photoperiod on smolting, seawater survival and growth in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 130:373-388.
- Slater, C.H., C.B. Schreck, and D.F. Amend. 1995. GnRH α injection accelerates final maturation and ovulation / spermiation of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) in both fresh and salt water. *Aquaculture* 130:279-285.
- Sower, S.A., R.N. Iwamoto, W.W. Dickhoff, and A. Gorbman. 1984. Ovulatory and steroidal responses in coho salmon and steelhead trout following administration of salmon gonadotropin and D-Ala α , des Gly 10 gonadotropin-releasing hormone ethylamide (GnRH α). *Aquaculture* 43:35-46.
- Svardson, G. 1945. Chromosome studies in Salmonidae. *Rev.Swe.State Inst. Freshwater Fish Res.* 23; 151pp.
- Toro, J.E., and H.D. Sastre. 1995. Induced triploidy in the chilean blue mussel, *Mytilus chilensis* (Hupe, 1854), and performance of triploid larvae. *Journal of Shellfish Research.* 14:161-164.
- Urbányi, B., A. Horvath, M. Bercsényi, and L. Horvath. 1999. Androgénesis on sterlet (*Acipenser ruthenus*) using fresh and cryopreserved sperm. *Proceedings of the 6th International Symposium on the Reproductive Physiology of fish.* 410 pp.
- Vélez, A., E. Alifa, and O. Azuaje. 1990. Induction of spawning by temperature and serotonin in the hermafrodite tropic scallop, *Pecten ziczac*. *Aquaculture* 84:307-313.
- Wassermann, G.J., and L.O. Bertolla. 2001. Sex reversal in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* Linnaeus) by androgen immersion. *Aquaculture Research* 34:65-71.
- Watanabe, W.O., E.P. Ellis, S.C. Elis, and M.W. Feeley. 1998. Progress in controlled maturation and spawning of summer flounder *Paralichthys dentatus* broodstock. *Journal of the World Aquaculture Society* 29:393-404.
- Winkler, F., B. Ladrón de Guevara, B. Estévez y L. Jollán. 1993. Inducción de triploidía en *Argopecten purpuratus* Lamarck, 1819, mediante Citocalasina B. *Revista de Biología Marina (Valparaíso)* 28:239-246.
- Yamasaki, F. 1983. Sex control and manipulation in fish. *Aquaculture* 33:329-354.
- Yamamoto, T. 1953. Artificially induced sex-reversal in genotypic males of the medaka (*Oryzias latipes*). *Journal of Experimental Zoology* 123:571-594.
- Zanuy, S. y M. Carrillo. 1987. La reproducción de los teleósteos y su aplicación en acuicultura. p. 1-131. En: J. Espinoza de los Montoneros y U. Labarta. (eds). *Reproducción en Acuicultura*. Editorial CAICYT. Madrid, España.
- Zohar, Y., and C.C. Mylonas. 2001. Endocrine manipulations of spawning in cultured