

## Triploidía en trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*): posibilidades en Colombia

Hermes Pineda Santis<sup>1</sup>, Biol; Jorge E Jaramillo Pino<sup>2</sup>, Zoot ; Diego M Echeverri Echeverri<sup>2</sup>, Zoot ;  
Martha Olivera Angel<sup>1,2</sup> MV, Dr Sci Agr.

<sup>1</sup>Grupo de Fisiología y Biotecnología de la Reproducción – Corporación Biogénesis.

<sup>2</sup>Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia, AA 1226, Medellín.

hpinedas@agronica.udea.edu.co

(Recibido: 11 julio, 2003; aceptado: 3 diciembre, 2003)

### Resumen

*Colombia tiene una buena infraestructura para el cultivo de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*), con la cual se produce el 14% de la producción anual nacional, ubicándola en un tercer lugar después del híbrido de tilapia roja (*Oreochromis spp.*) y la cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) con 32% y 24%, respectivamente. En este momento, la producción de esta especie es relevante mediante los procedimientos tradicionales, pero siguen siendo insuficientes para satisfacer la demanda nacional e internacional. Para mejorar su producción, la biotecnología, proporciona las mejores ventajas en crecimiento y manejo debido al efecto de esterilidad producido por la poliploidía, a través de la manipulación cromosómica mediante choque térmico para obtener individuos triploides. Este texto presenta los conceptos biológicos básicos y los elementos técnicos apropiados para obtener un alto porcentaje de triploides en esta especie para Colombia.*

**Palabras clave:** biotecnología, manipulación, genética, peces, Salmonidae, triploides.

### Introducción

La trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) es una especie foránea con una continua renovación a través de las importaciones masivas de ovas desde los sitios de producción en Estados Unidos hacia zonas de cultivo de alta montaña en Colombia, convirtiéndola en una de las más importantes especies en la acuicultura de aguas continentales en nuestro país. Su introducción se realizó en 1939 para el repoblamiento de aguas de uso público en la zona Andina con fines de pesca deportiva, específicamente, en el Lago de Tota en Boyacá (27, 33). Actualmente, el departamento de Antioquia es el primer cultivador en el ámbito nacional seguido por los departamentos de Cundinamarca y Boyacá, quienes en conjunto producen aproximadamente el 60% de la producción nacional que asciende a 7.065 toneladas/año, situándola en tercer lugar, después del híbrido de tilapia roja (*Oreochromis spp.*) con 19.842 toneladas/año y la cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) con 13.446 toneladas/año (18). Los avances alcanzados en la producción de trucha arcoiris en el departamento

de Antioquia mediante los procedimientos tradicionales son relevantes, pero siguen siendo insuficientes para satisfacer la demanda nacional e internacional.

Colombia ha permanecido al margen de muchas de las aplicaciones biotecnológicas en peces como manipulación cromosómica (ginogénesis, androgénesis y poliploides), la tecnología de la expresión proteica, los análisis de caracterización genética poblacional, el mapeo génico, las vacunas de DNA, y los organismos modificados genéticamente (OMG). Muchos países, con amplia tradición pesquera en Asia, Europa y Norteamérica, reconocen la utilidad de estas metodologías en la acuicultura como una estrategia para el desarrollo de una mayor fuente de proteína animal para alimentar grandes grupos humanos, y crear otros derivados nutritivos para la dieta en animales de ceba (40).

Por lo tanto, la biotecnología, como metodología de trabajo, abre la posibilidad de aumentar la producción

bajo los parámetros de seguridad alimentaria y producción primaria a pequeños cultivadores en Colombia, proporcionando peces con mejores ventajas como mayor tamaño y peso corporal mediante la manipulación genética, y específicamente, la producción de individuos triploides. La ventaja que poseen los peces triploides para seguir siendo viables a pesar de tener un número superior de cromosomas, evento poco frecuente en otros animales superiores, los hacen muy apropiados para la manipulación cromosómica sin el uso de aditivos químicos, hormonas o complejos procesos de biología molecular (p.e. OMG), que en muchos casos, poseen restricción para el consumo humano en países importadores.

Debido al éxito de la trucha arcoiris (*O. mykiss*) en nuestro país, y a la carencia de una metodología establecida para la producción de triploides en Colombia, se propone un esquema general de tratamientos con choque térmico en caliente para obtener un alto porcentaje de ellos. Así mismo, se presentan los conceptos básicos para su comprensión e implementación.

### **Ventajas de los organismos triploides**

En salmónidos y tilapias, las hembras triploides tienen gónadas poco desarrolladas con muy pocos oocitos desarrollados, mientras la espermatogénesis si ocurre en machos triploides, pero la esterilidad ocurre debido a la segregación al azar de los trivalentes, los cuales producen semen con exceso o deficiencia de cromosomas (aneuploidía) (3, 17). Las anteriores anomalías reproductivas redundan en una ganancia en crecimiento y peso debido al retraso de la maduración sexual, evento que al hacerse presente conduce a una reducción en los índices de crecimiento, un incremento de la mortalidad y el deterioro de las características organolépticas de la carne (2, 34), tanto así que las hembras de salmónidos llegan a invertir hasta 30% de su peso corporal en el desarrollo gonadal, lo cual les confiere escaso valor comercial (11). El desarrollo de las gónadas en los organismos diploides, se acompaña de una drástica alteración endocrina con cambios en la composición corporal y en el comportamiento de los animales, acentuando su territorialidad, hechos que no sucede en peces triploides facilitando su manejo en cautiverio debido a la talla común en el lote (5, 6). La inducción de la triploidía permite una distribución de las ventas a lo largo del año con una mejor planeación de la producción anual.

### **Posibilidades biotecnológicas para manipulación cromosómica**

La biotecnología ha hecho grandes contribuciones en todas las disciplinas de las ciencias biomédicas, la agricultura y las industrias farmacéuticas en las últimas décadas, lo que posibilita su aplicación en la acuicultura. Los mejoramientos de estas características productivas han sido principalmente dirigidos por programas de selección genética y manejo sin aditivos aumentando sus ventajas comerciales. La mayoría de estas tecnologías están fuera del alcance de los acuicultores colombianos por los costos que implica la importación de equipos, y la falta de profesionales altamente capacitados en ciencias básicas que promuevan la investigación en este sentido.

Dentro de la manipulación cromosómica en peces, se destacan los avances realizados en ginogénesis, androgénesis y poliploidías en muchas especies de peces (1, 20), y de los cuales se darán algunos conceptos generales:

#### *Ginogénesis y Androgénesis*

Esta metodología involucra el desarrollo de un organismo con cromosomas solamente de origen materno, lo cual se obtiene mediante fertilización de semen irradiado con ovas normales (ginogénesis), o cromosomas de origen paterno, fertilización de ovas irradiadas con semen normal (androgénesis). Lo anterior produce un organismo haploide, al que se le debe restablecer su estado diploide a través de un choque térmico o por medio de la fusión de dos núcleos haploides. Así mismo, se puede hacer ginogénesis y androgénesis fertilizando ovas de hembras tetraploides con semen irradiado (ginogénesis), o fertilizar ovas cuyo material genético haya sido irradiado con semen de un macho tetraploide (androgénesis) (13, 20).

#### *Poliploidías*

Se puede definir la poliploidía como un tipo de variación numérica que afecta al conjunto de los cromosomas de las células aumentando o disminuyendo la cantidad de ellos (1, 24). Por lo tanto, la poliploidía inducida, como por ejemplo los triploides o tetraploides, se refiere a la producción de individuos con una composición extra de cromosomas, tres o cuatro, respectivamente. La manipulación cromosómica en peces se inició a principios de la década de los años

ochenta en Francia y los Estados Unidos, con buenos perfiles de crecimiento y producción en los cultivos tradicionales experimentales (9, 10, 39). La producción de poliploides mediante el tratamiento físico de los gametos se ha convertido en una importante herramienta comercial para la industria de la acuicultura mundial, centrada principalmente en la producción de individuos triploides en varias especies de peces (20).

El perfeccionamiento de las técnicas desarrolladas para la manipulación de la ploidía en peces ha venido acompañado de un aumento en el interés por la viabilidad y el rendimiento de los individuos triploides. Los efectos de la inducción de triploidía en el metabolismo (28, 29), la fisiología (2, 16, 42), los parámetros citogenéticos (22, 35), la estructura de órganos y tejidos (15, 23), el comportamiento (19, 21) y la calidad y conservación de la canal (14) han sido investigados en varias especies de teleósteos. Consideramos que la producción de peces triploides mediante choque térmico en caliente es una posibilidad biotecnológica viable para implementar en nuestras trucheras porque requiere de un bajo presupuesto, y los conocimientos fundamentales de un personal capacitado.

### **Inseminación artificial**

Recibe el nombre de inseminación artificial en peces, el proceso de mezclar el semen de un macho obtenido mediante leve presión abdominal con los óvulos y líquido folicular de una hembra obtenidos de igual forma en un recipiente externo. Como consecuencia de la puesta en contacto de los gametos, los óvulos son fecundados por los espermatozoides, originándose una célula denominada ova o cigoto, de cuyo desarrollo se forma un nuevo individuo. Este procedimiento se realiza en ausencia de agua recibiendo el nombre de método seco, cuyos resultados, en porcentaje de óvulos fecundados, son mucho mejores ya que en presencia de agua, tanto los espermatozoides como los oocitos, se activan rápidamente disminuyendo las posibilidades de fecundación (36). Se considera que la inseminación artificial en seco es la forma más adecuada para tener un mayor control sobre la manipulación cromosómica, ya que se debe controlar el momento de contacto de los gametos y el tiempo de fertilización para aplicar el tratamiento.

### **Mecanismo de la fecundación**

Con motivo de la penetración del espermatozoide, el oocito se activa y sigue a la telofase II de la meiosis para expulsar el segundo cuerpo polar (1). En el medio natural acuático, los oocitos emitidos absorben una gran cantidad de agua por ósmosis y pasan rápidamente de una cierta flacidez a una gran turgencia, haciendo que el micrópilo se cierre y el espermatozoide quede atrapado en el interior del oocito. En el transcurso de 20 a 30 minutos se completa la meiosis con el resultado final de la existencia de dos agrupaciones cromosómicas en el citoplasma, procedentes de cada uno de los progenitores los cuales poseen un número haploide de cromosomas. El pronúcleo portador del material cromosómico del macho se fusiona con el pronúcleo de la hembra dando origen a un organismo con un número de cromosomas diploide. En los casos de ginogénesis y androgénesis, la irradiación de uno de los dos gametos destruiría la información genética haploide, pero no su viabilidad por lo que el proceso de fecundación procede de igual manera a lo expuesto. Los procesos de mantenimiento y cuidado después de la fecundación en trucha arco iris (*O. mykiss*) son ampliamente conocidos y existe una extensa literatura al respecto en Colombia (32). Así mismo, se cuenta con la experiencia en muchas estaciones piscícolas que han mantenido el cultivo por largo tiempo en nuestro país, lo cual garantiza un alto porcentaje de éxito reproductivo.

### **Procedimientos para la manipulación cromosómica**

Aunque la poliploidía es un fenómeno de baja probabilidad en peces del medio natural, su frecuencia aumenta en la acuicultura donde los métodos selectivos para su inducción como choques térmicos, por presión o agentes químicos son de uso habitual. En este texto, sólo considerará el método de choque térmico por alta temperatura por ser el más fácil para cualquier acuicultor, ya que es posible disponer de los recursos logísticos para alcanzar un alto porcentaje de triploides, y particularmente ventajosos debido al gran número de ovas que pueden ser tratadas. El procedimiento para el choque térmico en caliente de forma experimental en trucha arco iris (*O. mykiss*) requiere de agua a temperatura graduada con termostato y un reloj con marcación de segundos. Por el contrario, los choques por presión requieren de equipos hidráulicos especializados y los choques por agentes químicos de

sustancias de alto costo y en algunos casos de obligada importación.

### Choques térmicos

El desarrollo del individuo desde el proceso de fertilización artificial hasta el levante de los alevinos esté regido por temperaturas muy definidas que denotan una continuidad en el proceso. El choque térmico consiste en dar un cambio, alto o bajo, de temperatura de forma drástica por poco tiempo, de tal forma que algunos procesos biológicos cambien, en este caso particular, el número de cromosomas del organismo. Ciertamente, el tiempo juega un papel importante en la aplicación del choque térmico ya que los extremos de temperaturas por períodos muy prolongados causan la muerte de los individuos. Aunque los choques térmicos próximos a los 0°C (choques fríos) han sido utilizados para la obtención de poblaciones triploides en esta especie, dichos tratamientos no han demostrado ser suficientemente efectivos en el porcentaje de triploides inducidos (8, 25). No sucede lo mismo con los choques térmicos calientes los cuales han aportado excelentes resultados en trucha arcoiris

(38), tilapias (30, 41), carpa común (7) y peces planos (31) con alta supervivencia de los descendientes (26).

### Choque con alta temperatura para ovas de trucha arcoiris (*O. mykiss*)

Los procedimientos de choque térmico en caliente para la producción de triploides, teniendo en cuenta la temperatura y la duración del choque térmico, así como tiempo después de la fertilización, han sido descritos por varios autores con diferentes porcentajes de éxito (véase Tabla 1). El procedimiento consiste en tomar los oocitos fecundados y colocarlos en un baño maría con temperatura alta constante (25–28°C) por un intervalo de tiempo apropiado (3 min.) para no permitir la migración de los cromosomas por daño del huso nuclear y alcanzar un alto porcentaje de triploides (38). Se pueden obtener tanto triploides (si el choque térmico se hace al poco tiempo después de la fertilización de tal forma que se retenga el segundo cuerpo polar - choque térmico meiótico o temprano), como tetraploides (si el choque térmico se hace una vez se han iniciado las divisiones mitóticas, de tal forma que se duplique el número cromosómico - choque térmico mitótico o tardío) (20).

**Tabla 1.** Condiciones apropiadas de choque térmico para un alto porcentaje de peces triploides en trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*).

Temperatura de choque (°C)	Tiempo de duración (min.)	Tiempo pos fertilización (min.)	Porcentaje	Referencia
25 ± 0.5	3	8	Alto diploides	Thorgaard, (2002) Com. personal
28 ± 0.5	3	8	Alto triploides	Thorgaard, (2002) Com. personal
31 ± 0.5	3	8	Alta mortalidad	Thorgaard, (2002) Com. personal
28 ± 0.5	3	10	Alto triploides	Cloud, (2002) Com. personal

### Mortalidad por efecto del choque térmico

Ciertamente, un efecto drástico del cambio de temperatura en el proceso de desarrollo embrionario ocasiona una mortalidad de un 50% en promedio, lo que es susceptible de reducir en cada una de las diferentes trucheras, mediante pruebas de ensayo y error de pequeñas cantidades de ovas bajo distintos tratamientos térmicos. Sin duda, cada cultivador debe estandarizar su procedimiento de producción de triploides según las condiciones reproductivas y de agua.

### Determinación de la poliploidía

Para conocer el porcentaje de poliploides en los lotes donde se hayan realizado los tratamientos térmicos, se han descrito tres metodologías, las cuales se encuentran establecidas en las Facultades de Medicina y de Ciencias Agrarias de la Universidad de Antioquia (Medellín, Colombia). Si bien la estandarización de estos procedimientos en peces no se ha realizado de forma rutinaria, su empleo estaría determinado por la demanda que los cultivadores establezcan como servicio para determinar la efectividad de sus tratamientos. Las técnicas son:

### *Cuantificación mediante citometría de flujo*

Esta técnica permite determinar la cantidad de ADN sobre células previamente teñidas con un colorante específico, el cual se hace fluorescente cuando es apropiadamente excitado por la luz de un láser, por lo tanto, la cantidad de fluorescencia es directamente proporcional a la cantidad de ADN en cada célula (11). De esta forma, si un organismo contiene en sus células una cantidad de ADN marcado para diploides, triploides o tetraploides, el citómetro de flujo definirá, bajo una gráfica, el porcentaje de células marcadas. Esta metodología consume tiempo en su estandarización e importación de fluorocromos, pero es la más confiable por la precisión de los resultados.

### *Citogenética*

Determina el número de cromosomas de una especie, el cual tiene un significado adaptativo y evolutivo. En el caso de la trucha arcoiris (*O. mykiss*) se ha determinado que su número diploide es  $2n=58-63$  cromosomas (37, 12). En citogenética, la determinación se realiza contando el número de cromosomas en la metafase de las células, lo que significa que para esta especie un organismo haploide tendría un número  $n=29-32$ , triploide  $3n=87-94$  y tetraploide  $4n=116-126$  cromosomas. El procedimiento está estandarizado para humanos en la Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia, y su aplicación en peces está siendo estandarizada para Sabaleta (*Brycon henni*) por el Grupo de Fisiología y Biotecnología de la Reproducción en la Facultad de Ciencias Agrarias.

### *Volumen de núcleo del eritrocito*

Debido al aumento de ADN nuclear en los individuos triploides o tetraploides, el volumen del núcleo celular de los eritrocitos se incrementa, proporcionando un valor comparativo con el núcleo de los individuos diploides (1). Para este efecto se cuenta, en el Laboratorio de Patología Animal, Facultad de Ciencias Agrarias, con un microscopio adaptado a un programa de analizador de imagen, IMAGE-PRO<sup>+</sup>V. 4.0, el cual permite capturar y congelar la imagen aumentada para hacer las mediciones correspondientes al diámetro mayor y menor del núcleo del eritrocito de la célula de la trucha arcoiris (*O. mykiss*), el cual presenta una forma esferoide. La fórmula propuesta para conocer el volumen promedio de los núcleos de los eritrocitos

para esta especie fue descrita por Bunge y Cussac (4), así:  $V = 4/3\pi ab^2$  \ donde: a= eje mayor ; b= eje menor.

### **Beneficios productivos y económicos de la triploidía**

Los beneficios de producir individuos triploides con la ayuda de la biotecnología son mucho más evidentes en los aspectos productivos y económicos ya que se obtendría un aumento de la producción a un menor costo. Así mismo, una independencia de las importaciones obligadas de ovas triploides o sólo hembras, que en algunos casos generan una incertidumbre respecto de su calidad.

Las ventajas de los organismos triploides respecto a los diploides en esta especie se encuentran reportados en Carrasco *et al* (5), en el cual se determinaron varios parámetros morfométricos de interés comercial, entre los que se destacan el peso corporal, de la canal eviscerada y gonadal en un período de observación de 50 meses en iguales condiciones de cultivo. Si bien el peso corporal de los dos grupos no muestran una diferencia significativa hasta los 44 meses después de la eclosión, no sucede lo mismo si se comparan los grupos dentro del mismo sexo, en el cual los peces triploides demuestran una ganancia de peso significativa a partir de los 20 meses, obteniéndose individuos de gran tamaño para venta de carne en filete. Adicionalmente, se debe probar si, efectivamente, las condiciones climáticas de cultivo en el trópico confieren una mayor ventaja en el crecimiento corporal hasta los nueve meses en los que se alcanza la talla comercial. Respecto al peso de la canal eviscerada se muestran las mismas ventajas que el peso corporal en los individuos que fueron tratados, ya que tanto las hembras como los machos triploides presentaron una diferencia significativa a los 20 y 44 meses después de la eclosión. Esta situación se debe tener en cuenta, si el propósito es participar en los mercados externos con carne fresca en filete. Indudablemente, la ventaja comercial de los triploides está definida por el sexo y especialmente por las hembras triploides, las cuales presentaron un menor peso gonadal a partir de los 20 meses, lo que resulta en un mayor desarrollo corporal. De otra parte, los tratamientos para la producción de organismos poliploides y su esterilidad reproductiva, llevan una contribución adicional como es el impedir un aumento del número de individuos en zonas naturales de alta montaña, restringiendo la competencia

ecológica y por alimento entre especies; así mismo, limitando una posible hibridación con especies nativas.

### Situación actual

Colombia cuenta con excelentes condiciones climáticas, topográficas, hidrológicas y edafológicas para desarrollar la acuicultura de aguas frías mediante el uso de la biotecnología para trucha arcoiris (*O. mykiss*). Aunque con poca tecnología, se ha alcanzado una importante producción anual que satisface las demandas internas y externas de forma conveniente, un mejoramiento de los actuales procedimientos aumentaría las posibilidades económicas de sus productores con miras a un mercado externo más competitivo. Consideramos que la posibilidad de realizar truchas triploides es viable en nuestro país, para lo cual se debe hacer una alianza entre la universidad y la empresa privada con miras a concretar estos beneficios.

### Posibilidades futuras

Una demanda constante de proteína animal para consumo humano a partir de los cultivos en estanques, y no por extracción directa del medio natural se abre paso como alternativa en países en desarrollo como forma de aliviar la presión por alimentación de una creciente población mundial. Esta oportunidad de suplir la gran demanda global, deja abierta la posibilidad de un mercado de carne de pescado muy prometedor para nuestro país si se consigue aumentar la producción de

esta especie por medios biotecnológicos. Por otro lado, el fomento del cultivo de especies nativas es una alternativa viable si se quiere una independencia de las grandes empresas distribuidoras de alevinos de trucha arcoiris (*O. mykiss*) y tilapias (*Oreochromis* spp.) en Norteamérica e Israel, respectivamente. Si bien los paquetes tecnológicos para nuestras especies están en ejecución, queda todavía mucho por hacer en identificación, clasificación y mantenimiento en cultivo de muchas especies con gran potencial en la acuicultura colombiana. Es entonces, menester pensar en fomentar grandes planes de desarrollo acuícola bajo los esquemas de las cadenas productivas que involucren todas las entidades gubernamentales y privadas para crear políticas a largo plazo en este sector.

### Conclusión

Mediante el conocimiento biológico básico y de la infraestructura necesaria para la obtención de peces triploides es posible aumentar la producción actual de trucha arcoiris (*O. mykiss*) en nuestro país, no sólo para suplir la necesidad interna de proteína, sino para aliviar la carga nutricional mundial. Es de tener en cuenta que este proceso biotecnológico es necesario también en especies endémicas de aguas cálidas incluidos en los programas nacionales de fomento de la acuicultura en Colombia, y que se encuentran poco exploradas. Indudablemente, los esquemas acuícolas deben ceñirse al esquema de desarrollo sostenible, el cual redundará en un mejor manejo y conservación de las especies nativas.

### Summary

#### *Triploidy in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: possibilities in Colombia*

*Colombia has a good hatchery facility for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) culture, which produces the 14% of the annual national production, ranking it on third place after the red tilapia hybrid (*Oreochromis* spp.) and the cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) with 32% and 24%, respectively. At this moment, the production of these species is relevant through the traditional procedures, but it continues being insufficient to satisfy the national and international demand. To improve its production, the biotechnology, gives the best advantages in growth and management due to the sterility effect produced by the poliploidy, through the chromosome manipulation using heat shock to obtain triploid individuals. This text display the basic biological concepts and the appropriate technical elements to obtain a high percentage of triploids in these species for Colombia.*

**Key words:** *biotechnology, fish, genetic, manipulation, Salmonidae, triploids.*

## Referencias

1. Arai K. Genetic improvement of aquaculture finfish species by chromosome manipulation techniques in Japan. *Aquaculture* 2000; 197:205-228.
2. Benfey T, Sutterlin A. Triploidy induced by heat shock and hydrostatic pressure in landlocked Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 1984; 36:359-367.
3. Benfey T, Solar I, de Jong G, Donaldson E. Flow-cytometric confirmation of aneuploidy in sperm from triploid rainbow trout. *Trans Am Fish Soc.* 1986; 115:838-840.
4. Bunge M, Cussac VE. Manipulaciones genéticas en el cultivo de trucha arco iris: posibilidades de aplicación. *Aquaculture* 1993; 33:329-351.
5. Carrasco LAP, Doroshov S, Penman D, Bromage N. A long-term, quantitative analysis of gametogenesis in autotriploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Rep Fert.* 1999; 113:197-210.
6. Cerisola H, Dazarola G. Morfología gonadal de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) tratada para la producción de monosexo y triploidia. *Arch Med Vet.* 1996; 28(2):81-86.
7. Cherfas NB, Hulata G, Kozinsky O. Induce diploid gynogenesis and polyploidy in ornamental (koi) carp (*Cyprinus carpio L.*). 2. Timing of heat shock during the first cleavage. *Aquaculture* 1993; 111:281-290.
8. Chevassus B, Quillet E, Chourrout D. La production de truites steriles par vote genetique. *La pisciculture francaise* 1984; 78:10-19.
9. Chourrout D. Thermal induction of diploid gynogenesis and triploidy in the eggs of the rainbow trout (*S gairdneri*) after fertilization with gamma irradiated sperm. *Reprod. Nutr Dev.* 1980; 20:719-726.
10. Chourrout D, Quillet E. Induced gynogenesis in the rainbow trout: sex and survival of progenies. Production of all triploid populations. *Theo Appl Genet.* 1982; 63:201-205.
11. Chourrout D, Chevassus B, Quillet E, Blanc JM, Guyomard R. et al. Improvement of salmonids: selective breeding or genetic manipulations. *Mimeo* 1988; 15pp.
12. Colihueque N, Iturra P, Estay F, Diaz NF. Diploid chromosome number variation and sex chromosome polymorphism in five cultured strains of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 2001; 198:63-77.
13. Devlin RH, Nagahama Y. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological and environmental influences. *Aquaculture* 2002; 208:191-364.
14. Ehira S, Maruoka A. Quality preservability of triploid freshwater fish. Freshness deterioration, lipid oxidation and protein denaturation during iced storage. *Bulletin of the National Research Institute of Fisheries Science* 1991; 2:1-14. (In Japanese with English abstract)
15. Greenlee AR, Kersten CA, Cloud JG. Effects of triploidy on rainbow trout myogenesis in vitro. *J. Fish Biology* 1995; 46: 381-388.
16. Happe A, Quillet E, Chevassus B. Early life history of triploid rainbow trout (*Salmo gairdneri Richardson*). *Aquaculture* 1988; 71:107-118.
17. Hussain MG, Penman DJ, McAndrew BJ. Effects of triploidy on sexual maturation and reproduction in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus L.*). ICLARM Conference proceedings, Makati City (Philippines). ICLARM. 1996. pp. 320-325.
18. Instituto Nacional de Pesca y Acuicultura (INPA). Boletín estadístico pesquero 1997-1999. Santafé de Bogotá. Colombia. 1999. pp 50.
19. Kavumparath S, Pandian TJ. Effects of induced triploidy on aggressive display in the fighting fish *Betta splendens* Regan. *Aquaculture and Fisheries Management* 1992; 23:281-290.
20. Khan TA, Bhise MP, Lakra WS. Chromosome manipulation in fish - A review. *Indian J. Anim. Sc.* 2000; 70(2):213-221.
21. Kitamura S, Ogata H, Onozato H. Triploid male masu salmon *Oncorhynchus masou* shows normal courtship behavior. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1991; 57: 2157-2159.
22. Konishi Y, Onozato H, Yamamoto A, Fujimori K. Glycogenosomes in hepatocytes of diploid and triploid masu salmon (*Oncorhynchus masou*), mimicking cytology of glycogen storage disease type II. *Agricultural and Biological Chemistry* 1991; 55: 1147-1149.
23. Krueger R, Kohlmann K. Histological comparison of liver and kidney tissue of diploid and triploid female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).

- Proceedings of the European Aquaculture Society 1993; 19:236.
24. Lacadena JR. Genética. 3ª. ed. Agesa Editores. Bogotá. 1981
  25. Lincoln RF, Aulstad D, Grammeltvedt A. Attempted triploid induction in Atlantic salmon (*Salmo salar L*) using cold shocks. Aquaculture 1974; 4:287-297.
  26. Lozano R, Ruiz-Rejon C, Ruiz-Rejon M. Manipulación cromosómica en organismos acuáticos. En: Genética en acuicultura. Espinosa de los Monteros J. y Labarta U. ed. Madrid. 1987.
  27. Martínez-Ibarra S. La acuicultura en Colombia. Anais do Aquicultura Brasil 1998; 1:365-373.
  28. Oliva-Teles A, Kaushik SJ. Metabolic utilization of diets by polyploid rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Comp Bioch and Phys. 1987; 88A: 45-47.
  29. Oliva-Teles A, Kaushik SJ. Effect of temperature on utilization of endogenous reserves during embryonic development of diploid and triploid rainbow trout (*Salmo gairdneri R.*). Aquaculture 1990; 84: 373-382.
  30. Penman DJ, Shah MS, Beardmore JA, Skibinnski DOF. Survival, growth rate and maturity in triploid tilapia (ed.) Tiews K. Proceedings of the World Symposium on selection, hybridization and genetic engineering in aquaculture, Vol. I: 27-30 May 1986. Bordeaux, France. 1987; 277-287.
  31. Purdom CE. Induced polyploidy in plaice (*Pleuronectes platessa*) and its hybrid with the flounder (*Platichthys flesus*). Heredity 1972; 29:11-24.
  32. Rosado-Puccini R, Erazo-Keller A. Aspectos básicos para el cultivo de la trucha arco iris. Consideraciones generales sobre la acuicultura. Ed. Horacio Salazar-Ariza, G. Fundamentos de acuicultura continental. I. Consideraciones generales sobre la acuicultura. Ed. Horacio Rodríguez-Gómez, Piedad Victoria Daza, Mauricio Carrillo Ávila. INPA. Bogotá. Colombia. 2001
  33. Salazar-Ariza G. Fundamentos de acuicultura continental. I. Consideraciones generales sobre la acuicultura. Ed. Horacio Rodríguez-Gómez, Piedad Victoria Daza, Mauricio Carrillo Ávila. INPA. Bogotá. Colombia. 2001.
  34. Siitonen L. Factors affecting growth in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) stock. Aquaculture 1986; 57:185-191.
  35. Small SA, Benfey TJ. Cell size in triploid salmon. J. of experimental zoology 1987; 241: 339-342.
  36. Soudakevicz T. Report on the progress of pisciculture in Russia. Reprod. U.S Commnr. Fish. 1974; 2:493-519.
  37. Thorgaard GH. Heteromorphic sex chromosomes in male rainbow trout. Science 1977; 196:900-902.
  38. Thorgaard GH, Jazmin ME, Stier AR. Polyploidy induced by heat shock in rainbow trout. Trans. Am. Fish. Soc. 1981; 110:546-550.
  39. Thorgaard GH, Rabinovitch PS, Shen MW, Gal GAE, Propp J, et al. Triploid rainbow trout identified by flow cytometry. Aquaculture 1982; 29:305-309.
  40. Tidwell JH, Allan GL. Fish as food: aquaculture's contribution. Ecological and economic impacts and contributions of fish farming and capture fisheries. EMBO reports 2001; 2(11):958-963.
  41. Varadaraj K, Pandian TJ. Induction of allotriploids in the hybrids of *Oreochromis mossambicus* female and red tilapia male. Proc. Of the Indian Acad. Sc. (Animal Science) 1989; 98:351-358.
  42. Virtanen E, Forsman I, Sundby A. Triploidy decreases the aerobic swimming capacity of rainbow trout (*salmo gairdneri*). Comp Bioch and Phys. 1990; 96a: 117-121.