

MANIPULACIÓN GENÉTICA EN EL CULTIVO DE MOLUSCOS EN MEXICO

Genetic Manipulation in cultured of Mollusks in Mexico

Faustino Rodríguez Romero¹ y Margarita Gasca Montes de Oca¹.

RESUMEN

La manipulación genética en moluscos de importancia para la maricultura tiene como fines la mejora genética de los reservorios poblacionales y la mas eficiente explotación de los recursos malacológicos por medio de la acuicultura. Esta manipulación genética se proyecta por dos vías: la manipulación de los cromosomas y el manejo de genes por técnicas de genética molecular.

Mediante la citogenética, se realiza la manipulación de conjuntos cromosómicos como en el caso de la producción de organismos triploides con fines comerciales.

Otros procedimientos como la formación de descendencia uniparental, a través de técnicas para la formación inducida del sexo, la ginogenética, la androgenética, el trasplante de núcleos y la fusión celular apenas se inician. Por otra parte, las técnicas moleculares para el manejo de genes de moluscos están por desarrollarse y la clonación de los genes con diversos fines, tales como la promoción del crecimiento, la fijación de larvas y como sondas de prueba, se presentan con un enorme potencial en beneficio del uso adecuado de estos recursos, a través del cultivo de moluscos comerciales.

Palabras clave: Acuicultura, manipulación genética, mejora genética, moluscos.

ABSTRACT

Genetic manipulation in cultured species of marine mollusks has the main purpose of stocks improvement for commercial exploitation. Cytogenetics and molecular techniques are at present, suitable approaches for genetic manipulation in these organisms.

At chromosome level, manipulation is attained by means of the cytogenetic procedures as in the case of triploids produced for commercial purposes.

Uniparental lineage, sex reversal, gynogenetics, androgenetics, nuclei transplant and cell fusion are procedures to be developed in mollusks. Cloning genes for growth, larval settlement and for their use as genetic probes, has an enormous potential in aquaculture. Initial advances promise spectacular results in the near future.

Key words: Aquaculture, genetic manipulation, genetic improvement, mollusks.

Introducción

En el mundo, la mayoría de los moluscos más comúnmente utilizados en acuicultura pertenecen a los pelecípodos y gasterópodos en donde se encuentran por ejemplo, especies de gran valor comercial como las madreperlas del género *Pinctada*, los ostiones de los géneros *Ostrea* y *Crassostrea*, los abulones del género *Haliotis* y los caracoles del género *Strombus*.

1. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México. Apartado Postal 70-305, México D. F. 04510, México.

En México, la mayor producción de moluscos por acuicultura pertenece a los ostiones *Crassostrea virginica*, del Golfo de México, con una cantidad aproximada a las 20,000 tons anuales, lo que significa mas o menos la mitad de la producción ostrícola nacional por año. Otros moluscos de los cuales se tienen referencias de su cultivo son: *Crassostrea gigas*, *Aequipecten circularis*, *Tivela stultorum* y *Pinna rugosa* (todos ellos pelecípodos; *Haliotis corrugata*, *Haliotis rufescens* (abulones) y *Strombus gigas* (Gasterópodos).

Por la diversidad y abundancia de especies comunes en México, se considera que el cultivo de moluscos en este país tiene un futuro promisorio. Información publicada (Acuavisión, 1989) señala que de 136 especies acuáticas susceptibles de cultivo, solo 26 son explotadas en forma comercial. De éstas, solo 2 pertenecen a moluscos (Juárez y Palomo, 1987). Al respecto, Baqueiro (1984) señala el aparente alto potencial del cultivo de moluscos en el país e identifica a 67 especies con caracteres comercial en la Costa del Pacífico mexicano. Por su parte, García-Cubas *et al.* (1987) reconocen a 92 especies comestibles pertenecientes a 22 familias de moluscos: 10 familias corresponden a bivalvos (47 especies), 9 a gasterópodos (37 especies) y 3 a cefalópodos (8 especies) presentes en las costas de México, las cuales con excepción de las que pertenecen a las clases Cephalopoda, el resto tienen posibilidades de ser comercializadas por acuicultura. De estas 92 especies, 59 tiene posibilidades de ser explotadas por acuicultura con fines alimenticios (Tabla 1). De lo anterior puede concluirse que actualmente en el país se explota comercialmente por cultivo apenas el 2.2% aproximadamente de las especies de moluscos que pueden ser utilizadas para incrementar la producción por cultivo en México.

El cultivo de moluscos es una actividad con un potencial importante que puede ayudar al desarrollo de las comunidades rurales ribereñas y que puede hacer aportes significativos a la producción pesquera mundial y a la satisfacción de necesidades de materias primas para la industria de alimentos y de ornamentación, ya que los atributos biológicos de las especies son explotables a corto plazo. Por la acuicultura, se facilita la tarea de captura y disposición de recursos para su comercialización debido a la factibilidad amplia de preparar la producción cría y engorda de los organismos en cultivo. El mejor desarrollo de las especies en cultivo, especialmente en casos en donde éste se realiza más allá del aspecto extensivo, dado que se puede tener el control de los parámetros ambientales, de alimentación y de enfermedades, cuando menos en alguna de sus fases biológicas. La mejora de lote de organismos en explotación, ya que la tendencia natural de la acuicultura es la producción de los cultivos por efectos de la manipulación direccional. La explotación razonada del recurso, lo que implica su preservación, en particular su cultivo se desarrolla con un apoyo multidisciplinario que promueva la producción más elevada a largo plazo sin erosionar sus recursos genéticos. La multiplicación

de organismos pertenecientes a especies de moluscos en peligro de extinción, con el fin de promover el repoblamiento de su hábitat natural y de la conservación de su genoma a través de bancos de genes.

Objetivos de la manipulación genética en moluscos

En general, el reto de la manipulación genética implica cuando menos los siguientes cinco objetivos principales:

- La obtención de líneas de organismos altamente seleccionados para genes específicos en el menor tiempo posible y bajo condiciones de estricto control.
- La preservación de la variabilidad genética a pesar de la selección direccional y el aumento de la heterocigocidad media en la población.
- La evaluación y catalogación de los recursos genéticos en poblaciones susceptibles de ser explotadas por acuicultura.
- La mejora de la relación genotipo-ambiente
- La conservación de genotipos a través de bancos de genes.

Los diversos procedimientos que constituyen la metodología actual de elección para la manipulación genética en moluscos se describen en la tabla 2. Estos procedimientos resultan especialmente prácticos en casos de organismos bivalvos sedentarios cuya ovogénesis tiene la peculiaridad de mantenerse detenida en meiosis I como es el caso de las ostras del género *Crassostrea*. Por sus posibilidades en la mejora de moluscos los más atractivos son:

La fusión celular. Se logra mediante el uso de sustancias como el polietilenglicol para obtener organismos diploides ginogenéticos biparentales a nivel interespecífico e intraespecífico.

El trasplante de núcleos. Es un sistema experimental que permite obtener expresión de genes en citoplasmas extraños mediante la micromanipulación de núcleos celulares. Se pueden obtener organismos con diferentes grados de ploidía.

La formación de organismos partenogenéticos. A partir de óvulos que son activados por medios artificiales, químicos o físicos, es posible inducir el desarrollo de los óvulos de moluscos bivalvos normalmente detenidos en profase o metafase I de la

Tabla 1. Número estimado de especies actuales con potencial para la acuicultura en México por provincias malacológicas (únicamente con fines alimenticios).

Autor	Californiana	Panamáica	Caribeana	Total
Baqueiro, 1987	3	25	5	33
G. Cubas, <i>et al</i> 1987	6	37	16	59

Tabla 2. Metodología para la manipulación genética en moluscos.

Nivel	Estrategia
Embrionario	1. Reversión del sexo en embriones ginogenéticos
	2. Formación de organismos triploides
	3. Formación de poliploides
Celular	1. Fusión de células
	2. Transplante de núcleos
Cromosómico	1. Formación de organismos partenogenéticos haploides
	2. Formación de organismos diploides uniparentales: Ginogénesis y Androgénesis
	3. Duplicación cromosómica por bloque de la meiosis I y II
	4. Duplicación cromosómica por bloque de la primera mitosis.
Molecular	1. Inserción de genes. Fusión de genes
	2. Producción de moléculas para la administración exógena
A diferentes niveles	1. Evaluación de los recursos genéticos
	2. Criopreservación y banco de genes

meiosis, al respecto, se ha determinado que un cambio en el pH interno del óvulo puede ser el mecanismo que desencadene su activación (Obata y Nemoto, 1984; Longo, 1983). Se ha demostrado experimentalmente que los óvulos de algunos bivalvos pueden ser activados por NH_4Cl y KCl (Dube y Guerrier, 1982; Zucker *et al.*, 1978).

Los óvulos de bivalvos también pueden ser activados por medios físicos exclusivamente, tales como:

La temperatura (32-35 °C durante 90 min), combinada con la aplicación de choques hipotónicos (Allen, 1986).

La presión hidrostática (de 8,000 a 14,000 psi por 5 min.) (Stiles *et al.*, 1983)

Formación de organismos diploides uniparentales.

- Ginogénesis. Es el procedimiento mediante el cual se induce la formación de organismos por la activación de un óvulo por un espermatozoide inactivo o heteroespecífico que no aporta su información genética al nuevo individuo. Los óvulos pueden ser activados ginogenéticamente por espermatozoides a los cuales se les ha inactivado su ADN mediante medios químicos o por irradiación. En el caso de los moluscos bivalvos solo se ha utilizado la radiación

con rayos X a dosis de 10-225 R (Stiles, 1978), o con luz ultravioleta (Arai *et al* 1984; Stiles *et al.* 1983).

Androgénesis. Se refiere a aquellos organismos formados por la activación de un óvulo cuyo ADN ha sido inmovilizado por vía de un espermatozoide activo genéticamente. Únicamente ha sido publicado un trabajo sobre androgénesis en *Crasostrea virginica* (Stiles *et al* 1983).

Duplicación cromosómica de huevos activados.

Se realiza normalmente en organismos partenogenéticos, androgenéticos y ginogenéticos con el fin de conseguir la diploidización del genoma materno o paterno que permita la obtención de descendencia viable.

1. Inducción por diploidización.

2. Por supresión de una división meiótica. Al respecto, Allen (1986) sugieren la siguiente terminología: Para aquellos huevos en los cuales se ha bloqueado la primera división meiótica o reduccional, propone que los organismos que se producen se les nombre meioginos reduccionales; mientras que aquellos huevos a los que se les ha suprimido la segunda división meiótica o ecuacional, se les llame meioginos ecuacionales.

- Por supresión de la primera división mitótica del cigoto, el mismo autor sugiere el nombre de mitoginos.

La diploidización puede ser inducida por agentes químicos o físicos. Para el caso de agentes químicos, las sustancias más utilizadas son: Metilxantinas, Cafeína, Citochalasina B

Formación de organismos triploides.

En moluscos bivalvos, el éxito en la formación experimental de organismos triploides depende del control de la fertilización y de los eventos meióticos en el huevo y el porcentaje obtenible de triploides depende de que se mantenga la temperatura constante.

Mecanismos de inducción de la triploidía.

Inducción química en moluscos. La mayoría de las investigaciones publicadas se refieren a la obtención de organismos triploides por el uso de la Citochalasina B para inhibir la expulsión del glóbulo polar. Por este medio Stanley *et al* (1981) han producido triploides en ostiones *Crassostrea virginica*, Allen *et al* (1982) en *Mya arenaria*, Tabarini (1984) en *Argopecten irradians*, Beaumont (1986) en *Mercenaria mercenaria* y *Pecten maximus* y Downing y Allen (1986) en *Crassostrea gigas*.

La Citochalasina B, que es un producto del metabolismo de los hongos *Phoma exigua* y *Helminthosporium dematioideum* (Tamm, 1978), tiene la propiedad de inhibir la motilidad celular y la citocinesis en forma independiente de la duplicación de los cromosomas y de la división del núcleo celular (Carter, 1967). La experiencia en el uso de esta sustancia ha indicado que la dosis más común para obtener triploidías en invertebrados como los moluscos bivalvos es de 1 mg por litro, aplicando durante 20 minutos, con lo cual normalmente se puede esperar un éxito del 88% de organismos triploides.

Inducción por presión. La presión hidrostática ha sido utilizada en forma efectiva en la manipulación de cromosomas de una variedad de especies (Allen y Meyers, 1985; Benfey y Sutterlin, 1984; Lou y Purdom, 1984; Streisinger *et al.*, 1981; Guillespie y Armstrong, 1979, 1980; Tompkins, 1978). En bivalvos, Chaiton y Allen (1985) produjeron triploides en *C. gigas* mediante el tratamiento de huevos con presiones hidrostáticas de 6,000-8,000 psi durante 10 minutos, aplicadas después de la fertilización. La más alta proporción de triploides obtenida por este método

fue de 57%. Sin embargo, se ha señalado que la presión hidrostática probablemente no sea la forma óptima para la producción comercial de triploides porque la presión, cuando es aplicada, bloquea todos los procesos del desarrollo que ocurren en la población de huevos y solo se afectará aquellos cigotos que se encuentren en un estado vulnerable que es el de la formación del segundo glóbulo polar. Cuando la presión termina, el desarrollo se reanuda.

Inducción térmica. Una técnica de gran utilidad potencial y versatilidad es la que hace uso de los choques térmicos en huevos en desarrollo. Es ampliamente utilizada para producir triploides en peces teleósteos (Thorgaard, 1983). Quillet y Panelay (1986) produjeron triploides de *C. gigas* al someter huevos recientemente fertilizados a choques térmicos de 30, 32, 35 ó 38 °C durante 10 minutos. Los tratamientos más adecuados se encuentran a las dos temperaturas más altas durante lapsos entre 10 y 35 minutos después de la fertilización. Los choques con una duración de 20 minutos produjeron alrededor de 60% de triploides.

La ventaja de este procedimiento es su fácil aplicación, con mayor aceptación por parte de los consumidores si se compara con los triploides que se producen por los métodos químicos y su practicabilidad aún en los sistemas de cultivo más sencillos. No obstante, existe la desventaja de la producción reducida de triploides porque este tratamiento detiene todo el desarrollo como en el caso del tratamiento con presión y solo son afectados aquellos cigotos que se encuentren vulnerables. El máximo obtenido es de un 60% mientras que con la Citochalasina B, se ha podido lograr un 100% (Downing y Allen, 1986).

Para valorar los efectos de los tratamientos y conocer la proporción de organismos triploides obtenidos, es preciso conocer el nivel de ploidías de los organismos tratados. Dos métodos son recomendables: 1) mediante la aplicación de la citometría de flujo a una muestra poblacional de 25 laminillas de ostiones de cada lote de producción y 2) la determinación de los números cromosómicos a través del análisis de preparaciones cromosómicas a partir de larvas trocóforas. Otra posibilidad interesante, puede ser el uso de la tecnología del "Coulter Counter" para medir el núcleo de células de ostiones diploides, triploides y poliploides de varias edades, ya que este procedimiento ha probado ser de utilidad en la discriminación de peces diploides de triploides (Allen y Wattendorf, 1986; Benfey *et al.*, 1984; Johnson *et al.*, 1984).

De estudios anteriores realizados al respecto, sobre todo en peces, se ha desprendido que los organismos triploides presentan esterilidad reproductiva (Thorgaard y Allen, 1986; Purdom, 1972, 1983; Thorgaard, 1983; Allen y Stanley, 1981). En el caso de los moluscos bivalvos, la esterilidad tiene un impacto muy significativo en su fisiología general y en particular durante el proceso reproductivo.

Mortalidad. Se han reportado para algunas especies de moluscos valores elevados de mortalidad temprana en triploides inducidos con Citochalcasina B (Beaumont, 1986; Tabarini, 1984; Allen *et al.*, 1982; Stanley *et al.*, 1981); no obstante se considera que esto no menoscaba las perspectivas comerciales, en especial para los grupos muy fecundos como en los casos de los mejillones almejas y ostiones. Después de superada la etapa larvaria, en adelante hasta el adulto, la supervivencia de organismos triploides es elevada, similar a la de los controles (Chaiton y Allen, 1985; Stanley *et al.*, 1984; Tabarini, 1984 e incluso superior como se lo ha señalado Allen y Downing (1986) en el caso de *C. gigas*.

Crecimiento. El crecimiento de bivalvos triploides ha sido estudiado en 3 especies. Stanley *et al.*, (1984) encontraron que triploides de *C. virginica* tratados durante la liberación del primer glóbulo polar crecieron mas rápido y tuvieron 40% mas de carne que los controles diploides; los triploides inducidos durante la liberación del segundo glóbulo polar no crecieron mas rápido que los controles. El crecimiento mas rápido en ostiones tratados mas temprano fue atribuido al incremento en la heterocigocidad, la cual fue 12% mayor que la de los controles. En *A. irradians*, los pesos del cuerpo total de las gónadas y del músculo abductor fueron significativamente mayores que los diploides (Tabarini, 1984). Organismos triploides de *C. gigas* de un año de edad fueron muestreados durante el periodo gametogénico. El incremento general en peso seco de carne en los triploides fue de 172% comparado con el 34% en los diploides (Allen y Downing, 1986).

Inserción de genes. La inserción de genes es un recurso que puede ser utilizado para la transformación de gametos o líneas de células germinales de embriones, aunque no se asegura que los genes insertados se expresen en un 100%. La expresión de los genes se logra de manera mas eficiente si se realiza la adición de una secuencia de regulación inducible al elemento estructural deseado.

Producción de moléculas para la administración exógena. La clonación de genes para la producción

masiva de moléculas relacionadas con la ovulación, la reproducción, la fijación larvaria, la metamorfosis, el crecimiento, etc. Constituye un recurso hasta ahora muy prometedor en la maricultura ya que con ello se puede permitir el tratamiento de poblaciones de organismos de diferentes edades por administración externa en beneficio del carácter que se quiere amplificar en forma controlada

Criopreservación.

Los métodos para el almacenamiento por congelación de espermatozoides de peces por tiempo indefinido eran, hasta hace poco exitosos únicamente en salmónidos (Scott y Baynes, 1980). En la actualidad esta posibilidad se ha ampliado a una gran mayoría de especies de peces marinos, estuarinos y dulceacuícolas como consecuencia de la simplificación y estandarización de los procedimientos de congelación con nitrógeno líquido.

Dentro de los objetivos generales de la criopreservación, se incluyen: almacenaje, catalogación de cualidades genéticas y certificación de vialidad.

Su aplicación de acuerdo con Harvey (1986), la formación y manejo de los bancos de genes constituyen gran potencial para acciones de:

- Hibridación intra e interespecífica

- Crianza selectiva

- Ginogenética

- Domesticación

- Conservación de los recursos genéticos de las poblaciones

Para el caso de los moluscos, Lannan (1971) ha señalado la utilidad del uso de gametos criopreservados de ostiones en estudios de autofecundación y es por medio de la criopreservación que se pueden lograr las cruza de especies o poblaciones asincrónicas y resolver el problema de dotación estacional de la semilla necesaria para los cultivos, a través del uso de espermatozoides y de embriones almacenados por congelación.

La metodología actual para la conservación por congelación de espermatozoides de *C. virginica* incluye el uso de dimetilsulfóxido (DMSO) como protector, junto con una solución de Hanks a pH 8.0. Después de 68 días de almacenamiento, se ha logrado un 91% de fertilización, que es muy similar al 92% obtenido en los controles (Allen 1986): Al respecto,

Zell *et al.*, (1979) han señalado que se deben esperar porcentajes parecidos aún después de varios años de conservación de los gametos masculinos.

Evaluación de los recursos genéticos

En último término, la evaluación de los recursos malacológicos para la acuicultura, debe incluir la evaluación de los recursos genéticos de las especies y poblaciones que se pretende comercializar. Por ello, es indispensable la identificación previa de los organismos, ya que éste es de fundamental importancia para el manejo correcto de los recursos. Al respecto, la citogenética ha aportado información valiosa a través de la citotaxonomía y ayudado a establecer de manera mas segura las relaciones de parentesco entre especies cercanas, como en el caso de los ostiones comerciales (Rodríguez Romero, 1981, 1990; Rodríguez-Romero *et al.*, 1979a, 1979b, 1979c, 1978; Longwell *et al.*, 1967) y otros bivalvos comunes de las costas de México (Rodríguez Romero y Gasca Montes de Oca, 1998a, 1998 b Durán *et al.*, 1984; Rodríguez Romero *et al.*, 1983, 1987).

En cuanto a la variabilidad genética, se ha considerado a ésta como el indicador adecuado que permite conocer la factibilidad de explotación de poblaciones por medio de la pesca y de la acuicultura (Rodríguez-Romero, 1990; 1989). El criterio se configura a través del análisis de los fenotipos expresados por genes en el polimorfismo proteico por medio de la electroforesis, y del análisis de la variabilidad de segmentos de ADN mitocondrial; adicionalmente, el manejo estadísticos de los zimogramas que caracterizan a diferentes entidades taxonómicas, puede brindar criterios para su discriminación y grado de parentesco a niveles de poblaciones y especies distintas en términos de similitudes a distancia genética (Nei, 1972). En el caso de la prospección de los recursos malacológicos de las costas mexicanas, que son de interés para la acuicultura, en particular la ostricultura, el estudio de la variabilidad genética ha probado su aplicabilidad para el establecimiento de políticas de explotación de bancos ostrícolas (De la Rosa y Rodríguez Romero, 1988, 1989).

Literatura citada

Allen, Jr. S.K., 1986. Genetic manipulations-critical review of methods and performances, Shellfish. EIFAC/FAO Symp. On Selection, Hybridization and

Genetic Engineering in Aquaculture of Fish and Shellfish for Consumption and Stocking. Bordeaux France. 27-30 mayo 1986.

Allen, Jr. S.K., y J.G. Stanley, 1981. Polyploidy and gynogenesis in the culture of fish and shellfish. *International Council for the Exploration of the Sea Coop. Res. Rep. Ser. B. C. M. 1981/F:28*, 18 pp.

Allen, Jr. S.K y J.M. Meyers, 1985. Chromosome set manipulation in three species of salmonids using hydrostatic pressure. In: Iwamoto R. Y S. Sower (Eds.) *Salmonid Reproduction: An International Symposium.* Washington Sea Grant Program, p. 64.

Allen, Jr. S.K y S. L. Downing, 1986. Performance of triploid oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg), I. Survival, growth, glycogen content, and sexual maturation in yearlings. *J. Exp. Mar. Ecol.*, 102 (2/3):197-208.

Allen, Jr. S.K y R. J. Wattendorf, 1986. A review of production and quality control of triploid grass carp and progress in implementing "Sterile" triploids as management in the U.S. *Aquaculture*, 57:359.

Allen, Jr. S.K, P:S: Gagnon y H.Hidu, 1982. Induced triploidy in the soft-shell clam: Cytogenetic and allozymic confirmation. *J. Heredity*, 73:421-428.

Anónimo, 1989. Política, estrategia y líneas de acción para el desarrollo de la acuicultura 1989-1994. *Acuavisión*, (17):10-12

Arai, K., F. Naito, H. Sasaki y K. Fujino, 1984. Ginogenesis with ultraviolet ray irradiated sperm in the Pacific abalone. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 50:2019-2023.

Baqueiro, C. E., 1984. Status of molluscan aquaculture on the Pacific coast of Mexico. *Aquaculture*, 39:83-93.

Benfey, T.J. y A.M. Sutterlin, 1984. Triploid induced by heat shock and hydrostatic pressure in landlocked Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 36:359-367.

Benfey, T.J. y A.M. Sutterlin y R. J. Thompson, 1984. Use of erythrocyte measurements to identify triploid salmonids. *Can. J. Fish. Aq. Sci.*, 41(6):980-984.

Beaumont, A.R., 1986. Genetic aspects of hatchery rearing of the scallop, *Pecten maximus* (L). *Aquaculture*, 57:99-110.

Carter, S.B., 1967. Effects of cytochalasin B on mammalian cells. *Nature*, 213:261-264.

- Chaiton, J.A. y S.K. Allen Jr., 1985.** Early detection of triploidy in the larvae of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, by flow cytometry. *Aquaculture*, 48:35-43.
- De la Rosa, V. J. y F. Rodríguez-Romero, 1989.** Enfoque genético para el análisis de poblaciones de recursos pesqueros: El caso de la población ostrícola de la Laguna de Términos, Campeche. Cap. 9: 225-284. In: De la Rosa V.J. y F. Gonzalez-Farías (Eds.). *Temas de Oceanografía Biológica en México*. Ensenada, 337 pp.
- De la Rosa, V. J. y F. Rodríguez-Romero, 1988.** Aplicability of genetic variability measurements to the fishery of the american oyster *Crassostrea virginica* Gmelin in the Gulf of Mexico. *Ciencias Marinas*, 14(4):43-56.
- Downing S.L., y Allen Jr., S.K., 1986.** Induced triploidy in the Pacific oyster with cytochalasin B: Optimal treatments depend on temperature. *Aquaculture*, 61:1-15.
- Dube, F. Y P. Guerrier, 1982.** Activation of *Barnea candida* (Mollusca, Pelecypoda) oocytes by sperm of KCl, but not by NH₄Cl, requires a calcium influx. *Dev. Biol.*, 92:408-417.
- Duran, A., F. Rodríguez-Romero y A. Laguarda, 1984.** Polimorfisme cromosomique et numero diploide dans une population de *Isognomon alatus*. *Malacological Review*, 17:85-92.
- García-Cubas, A., Z. Castillo-Rodríguez, A. Álvarez-Herrera y R. Muñoz-Chagin, 1987.** Moluscos comestibles de las costas de México. *Mem. III Reun. Nal. De Malacoly Conquiliol. Monterrey, N.L. México*. 6-9 oct. 1986. p. 429-456.
- Gillespie, L.L. y J. B. Armstrong, 1979.** Induction of triploid and gynogenetic diploid axolotls (*Ambystoma mexicanum*) by hydrostatic pressure. *J. Exp. Zool.*, 210:117-122.
- Gillespie, L.L. y J. B. Armstrong, 1980.** Production of androgenetic diploid axolotls by suppression of first cleavage. *J. Exp. Zool.*, 213:423-425.
- Harvey, B.J., 1986.** Gamete banking and applied genetics in aquaculture. *EIFAC/FAO Symp. On Selection, Hybridization and Genetic Engineering in Aquaculture of Fish and Shellfish for Consumption and Stocking, Bordeaux France*, 27-30 mayo 1986.
- Johnson, O.W., P.R. Ravinovich y F.M. Utter, 1984.** Comparison of the reliability of a Coulter Counter with a flow cytometer in determining ploidy in Pacific salmon. *Aquaculture*, 43:99-103.
- Juárez, P.J.R. y G.G. Palomo, 1987.** La acuicultura en México: Antecedentes y desarrollo alcanzado hasta 1982. In: Gomez S. y V. Arenas, (Eds). *Contribuciones en Hidrobiología*, UNAM, p 37-89.
- Lannan, J.E., 1971.** Experimental self-fertilization of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, utilizing crypreserved sperm. *Genetics*, 68:599-601.
- Lannan, J.E., G. E. Gall, J. E. Thorpe, C. E. Nash y B. E. Ballachey, 1989.** Genetic Resources management of fish. *Genome*, 31:798-804.
- Longo, F.J., 1983.** Meiotic maturation and fertilization. In: Wilburt, K. (Ed). *The Mollusca*, Academic Press, N.Y. Vol. 3, p 49-89.
- Longwell, A.C., S.S. Stiles y D.G. Smith, 1967.** Chromosome complement of the american oyster *Crassostrea virginica* as seen in meiotic and cleaving eggs. *Can J. Genetic. Cytol.*, 9:845-856.
- Lou, Y.D. y C.E. Purdom, 1984.** Polyploidy induced by hidrostatic pressure in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish Biol.*, 25:345-351.
- Nei, M., 1972.** Genetic Distance between populations. *Am. Nat.*, 106:283-292.
- Obata, C. Y S. Nemoto, 1984.** Artificial parthenogenesis in starfish eggs: production of parthenogenetic development through suppression of polar body formation by methylxantines. *Biol. Bull.*, 166:525-536.
- Purdom, C.E., 1972.** Induced polyploidy in plaice (*Pleuronectes platessa*) and its hybrid with the flounder (*Platichthys flesus*). *Heredity*, 29:11-24.
- Purdom, C.E., 1983.** Genetic engineering by the manipulation of chromosomes. *Aquaculture*, 33:287-300.
- Quillet, E. Y P.J. Panelay, 1986.** Triploidy induction by thermal shocks in japanese oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquaculture*, 57:271-279.
- Rodríguez-Romero, F., 1981. Estudios cromosómicos y de expresión génica en moluscos bivalvos de importancia económica de las costas mexicanas. Tesis Doctoral, Fac. Ciencias, UNAM. 122 p.
- Rodríguez-Romero, F., 1989.** Perspectivas de la genética aplicada a la camaronicultura. In: Martínez, L.R. (Ed). *Camaronicultura, Bases técnico científicas para el cultivo de camarones peneidos*. Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad Sonora. AGT Editor, S.A. p 221-233.

- Rodríguez-Romero, F., 1990.** Estado actual y perspectivas de la genética en la acuicultura. *Mem. IV Congreso Nal. De Acuicultura, Hermosillo, Sonora, México.* Abril 4-6 de 1990.
- Rodríguez-Romero, F., M. Uribe y A. Laguarda, 1978.** Cytogenetic study of an oyster population of *Crassostrea virginica* Gmelin from Tabasco, México. *Jap. Jour. Malac. (Venus)*, 37(2):83-86.
- Rodríguez-Romero, F., Uribe, M., Laguarda, A. & Diupotex, M. (1979a).** The karyotype of *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828). *Jap. Jour. Malac. (Venus)*, 38:135-140.
- Rodríguez-Romero, F., Laguarda, A. y Uribe, M. (1979b).** Comparative analysis of the karyotype of two oyster species of the genus *Crassostrea* from Mexico: *C. virginica* and *C. corteziensis*. *An. Centro Cienc. del Mar y Limnol. Univ. Nal. Autón. México*, 6:19-24.
- Rodríguez-Romero, F., M. Uribe y A. Laguarda, 1979c.** The Karyotype of *Crassostrea Corteziensis* (Hertlein). *An. Centro Cienc. Del Mar y Limnol. Univ. Nal. Auton. México.* 6(1):15-18.
- Rodríguez-Romero, F., A. Laguarda y A. García-Cubas, 1983.** The karyotype of *Isognomon alatus*. *Can. J. Genet. Cytol.*, 25(2):85-87.
- Rodríguez-Romero, F., A. Laguarda y E. Diupotex, 1987.** Estudios citogenéticos en la almeja *Rangia cuneata* (Gray) de las costas del sureste de México. *Mem. III Reun. Nal. Malac. y Conquiliol. Monterrey, N.L. México.* Octubre de 1986.
- Rodríguez-Romero, F., and M. Gasca Montes de Oca, 1998.** Chromosome complements of the experimental interspecific hybrid of the oysters *Crassostrea virginica* (Gmelin) vs *Crassostrea corteziensis* (Hertlein). *Marine Research.* En prensa.
- Rodríguez-Romero, F., y M. Gasca Montes de Oca, 1998.** Los cromosomas del híbrido experimental de *Crassostrea virginica* Gmelin 1791 y *Crassostrea rhizophorae* Guilding 1828 (Pseudolamellibranchiata: Ostreidae). *Ciencias Marinas*, 24(1):55-63.
- Scott, A.P. y S.M. Baynes, 1980.** A review of the biology handling and storage of salmonid spermatozoa. *J. Fish. Biol.*, 17:707-739.
- Stanley J.G., S.K Allen, Jr. y H. Hidu, 1981.** Polyploidy induced in the American oyster, *Crassostrea virginica*, with cytochalasin B. *Aquaculture*, 23:1-10.
- Stanley J.G., S.K Allen, Jr. y H. Hidu, 1984.** Growth of American oyster increased by polyploidy induced by blocking meiosis I but not meiosis II. *Aquaculture*, 37:147-155.
- Stiles, S., 1978.** Conventional and experimental approaches to hybridization and inbreeding research in the oysters. In: Avault J.W. (DE). *Proceedings of the Ninth Annual Meeting, World Mariculture Society*, p 577-586.
- Stiles, S., A. Choromanski y A. Longwell, 1983.** Cytological appraisal of prospects for successful gynogenesis, parthenogenesis and androgenesis in the oysters. *International Council for Exploration of the Sea Mariculture Committee Paper F*: 10.
- Streisinger, G., C. Waker, N. Dower, D. Knauber y F. Singer, 1981.** Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). *Nature*, 291:193-296.
- Tabarini, C.L., 1984.** Induced polyploidy in the bay scallop, *Argopecten irradians*, and its effects on growth and gametogenesis. *Aquaculture*, 42:151-160.
- Tamm, C., 1978.** Chemistry and biosynthesis of cytochalasins. In: Tananbaun, C.W. (Ed.). *Cytochalasins biochemistry and cell biological aspects*, Elsevier/North-Holland, Amsterdam, Cap. 2: 15-51.
- Thorgaard, G.H., 1983.** Chromosome set manipulation and sex control in fish. In: Hoar W.S., D.J. Randall y E.M. Donaldson (Eds.). *fish Physiology*. Academic Press, N.Y., Vol. IX B, p. 405-434.
- Thorgaard, G.H., y S.K. Allen Jr., 1986.** Chromosome manipulation and markers in fishery management. In: Ryman, N. Y F.M. Utter (Eds). *Populations genetics and its application to fisheries management*, University of Washington Sea Grant, Seattle.
- Tompkins, R., 1978.** Triploid and gynogenetic diploid *Xenopus laevis*. *J. Exp. Zool.*, 203:251-256.
- Zell, S.R., M.H. Bamford y H. Hidu, 1979.** Cryopreservation of spermatozoa of the American oyster, *Crassostrea virginica* Gmelin. *Cryobiology*, 16:448-460.
- Zucker, R.S., R.A. Steinhard y M.M. Winkler, 1978.** Intracellular calcium release and the mechanisms of parthenogenetic activation of the sea urchin egg. *Developmental Biology*, 65:285-295.