

**VIABILIDAD Y CRECIMIENTO
DE POBLACIONES DIPLOIDES Y TRIPLOIDES
DE TILAPIA NILOTICA,
Oreochromis niloticus, LINEA GHANA**

**HECTOR A. MARTINEZ D., CESAR CELIS M.
& PLUTARCO CALA**

Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional
de Colombia, A.A 14490, Bogotá

RESUMEN

La triploidía se obtuvo aplicando choques térmicos calientes (41.4 - 42 °C) a oocitos durante 3.5 - 4 minutos, 3.5 min. después de la fertilización, y choques térmicos fríos (10.8 - 11.3 °C) a oocitos durante una hora, 5 minutos de su fertilización. La triploidía se comprobó por análisis cromosomal en larvas y alevinos. Luego se monitoreó la tasa de crecimiento y sobrevivencia de los huevos fertilizados. Los resultados indican que los choques calientes y fríos fueron eficientes para producir ciento por ciento de triploidía, con tasas variables de sobrevivencia. Se observaron deformidades de peces triploides (25.5% con choques fríos, y 32.5% con choques calientes). No se encontraron diferencias significativas en el crecimiento entre poblaciones triploides y diploides luego de tres meses de cultivo.

SUMMARY

The principal aim of this research was to produce triploid offspring of *O. niloticus*, applying warm thermic shocks (41,4-42 °C) to eggs during 3,5-4 min., 3,5 min. after fertilization, or cold shocks (10,8-11,3 °C) to oocytes during one hour, 5 min after their fertilization. The best tissue to confirm triploids was kidney and brain of larvae and alevines. Then, the survival of fertilized eggs and growth rate were determined. The results show that the warm and cold shocks are efficient to produce 100% triploids, with different

rates of survival. Also, that 25,5% offspring was deformed when cold shocks were applied, and 32,5% deformities with warm shocks. There were not significant differences in growth between triploid and diploid populations after three months of age.

Palabras-Clave: Crecimiento poblaciones. *Oreochromis*. Triploidía. Piscicultura.

INTRODUCCION

En los últimos años, la ingeniería genética ha sido instrumento para el mejoramiento de especies acuícolas con alta fecundidad, viabilidad, tasa de crecimiento, eficiencia de conversión alimenticia, tolerancia al estrés biológico, físico y químico, resistencia a enfermedades, y fácil crianza. Los principales avances se han realizado en la inducción de poliploidía, ginogénesis y androgénesis. La triploidía, es una gran alternativa que mediante técnicas apropiadas conduce a incrementar los niveles de producción. Individuos triploides de tilapia nilótica no han sido cultivados comercialmente en Colombia.

Este trabajo esboza algunas técnicas y ensayos en reproducción, fertilización artificial, incubación, citogenética y obtención de triploides. Igualmente, se hace un análisis de crecimiento y viabilidad de los diploides y triploides durante el levante.

Generalidades

Oreochromis niloticus es un pez cíclido oriundo del Africa Central y Oriental (Trewavas, 1982). Se ha introducido a Israel, algunos países de Latinoamérica, Indonesia, Tailandia, China, Taiwan, Estados Unidos, India y Asia Suroriental. A Colombia fue introducida en 1978 (Cala, 1989).

Esta especie se adapta a diversas condiciones ecológicas, y de ahí su gran dispersión geográfica. Esta diferencia de habitats le confieren resistencia a variaciones en parámetros físicos del agua (profundidad, velocidad de corriente, turbidez, temperatura), y de composición química, especialmente de salinidad, pH, oxígeno disuelto. Es una especie muy prolífica y de fácil reproducción natural en cautiverio.

Las tilapias aprovechan bien la más variada alimentación suplementaria que pueda suministrárseles. Estas pueden alimentarse de numerosos vegetales, harinas y desperdicios. La alimentación suplementaria se realiza principalmente con concentrado comercial, el cual tiene en promedio 25% de proteína cruda para la fase de engorde y 50% de proteína cruda para el levante de alevinos (Piedrahita & Montoya, 1988).

La dieta corriente característica de los adultos de *O. niloticus* en habitat natural consiste principalmente de plancton bentónico, detritus y fitoplancton (95%), especialmente algas del grupo de las diatomeas, restos vegetales y otros microorganismos (4.3%) y zooplancton (1.2%). Es decir, una especie omnívora con preferencia por el microplancton, fitoplancton bentónico y detritus.

Control de reproducción

Uno de los principales problemas que presenta el cultivo comercial de tilapia nilótica es su alta prolificidad, que ocasionan altas pérdidas económicas. Por esto, la necesidad de cultivos monosexos (machos), híbridos y triploides estériles.

La hibridación de dos especies de tilapias, para obtener una población de solo machos, fue iniciada por Hickling (1960, citado por Pandian & Varadaraj, 1987), quien describió la hibridización entre hembras de *O. mossambicus* y machos de *O. Hornorum*, dando como resultado toda la progenie macho.

Triploidización

La triploidía en peces presenta variaciones cromosomales numéricas que alteran el pool de cromosomas provocando aumento del número de juegos cromosómicos presente en cada una de las células. Esto debido a que el segundo cuerpo polar queda dentro del huevo fertilizado, por esto el huevo contiene tres núcleos haploides (n); el núcleo del oocito, el núcleo del espermatozoide y el núcleo del cuerpo polar. Estos se fusionan para formar un cigoto con un núcleo triploide ($3n$); dos juegos proceden de la madre y uno del padre (Chrisman et al., 1983; Pandian & Varadaraj 1990; Tave, 1990).

Se espera que los individuos triploides sean de mayor tamaño que los individuos diploides de acuerdo a las hipótesis de Fankhauser (1945) y Swarup (1959), citados por Chrisman et al. (1983), según la cual el tamaño del volumen nuclear se incrementa en proporción al número de cromosomas en tanto que la relación nucleo-citoplasma se mantiene. Chrisman et al. (1983), señalan que el volumen celular aumenta en peces triploides mientras que el número de células por órgano disminuye.

La triploidía al perturbar el desarrollo de la meiosis, impide la elaboración de células sexuales funcionales, especialmente sobre los oocitos, el individuo queda estéril, y se reduce la producción de hormonas sexuales (Chourrout et al., 1987; Yamazaki, 1983). Debido a que los triploides son estériles, y presentan 33 % más de genes que los diploides,

no hay gasto de glicógeno para la producción de sus gametos, lo cual genera mayor ganancia de peso, mejores tasas de conversión alimenticia y un crecimiento más rápido (Chourrout et al., 1987; Don & Avtalion, 1986; Lincoln & Bye, 1984; Perez & Beaumont, 1990).

MATERIALES Y METODOS

Una parte de los estudios experimentales, se llevó a cabo en la Estación Piscícola de Apulo (EPA) perteneciente a la Corporación Autónoma Regional de las Cuencas de los ríos Bogotá, Ubaté y Suárez (CAR), municipio de Apulo, Cundinamarca, a 550 m de altitud y 25 °C promedio anual. La parte final se ejecutó en la Estación Piscícola Alto Magdalena (EPAM), Instituto Nacional de Pesca y Acuicultura (INPA), en Gigante, Huila, a 930 m de altitud y 24 °C promedio anual. El conteo cromosomal se realizó en el Laboratorio de Inmunología y Genética del Hospital Universitario San José en Bogotá.

Se midieron los parámetros fisicoquímicos básicos del agua, como el oxígeno disuelto, la alcalinidad, el pH, el amonio, la turbidez y la temperatura. En los reservorios experimentales, estos se midieron a las 24 horas postfertilización, durante el periodo de levante de larvas y alevinos.

Los reproductores se mantuvieron en estanques rectangulares previamente lavados y desinfectados con formol al 0.08%. La alimentación de los animales se realizó con concentrado comercial del 45% de proteína cruda. También se usó un tanque de 2 m de diámetro según RANA (1988, 1990a), y se le dió el mismo manejo de los tanques de concreto rectangulares. Se hizo recambio de agua diariamente entre el 60 y el 80% del volumen total.

Finalmente, se usaron cuatro acuarios con substrato arenoso, aireación y calefacción para observar el comportamiento reproductivo, según Chourrout & Itskovich (1983), Rothbard & Pruginin (1975), Valenti (1975). Los peces se alimentaron con Tetramin del 50% de proteína, y se cambió el 90% del volumen de agua semanalmente.

Dadas las dificultades de conseguir un lote sincronizado de hembras listas para desovar, se probó en la EPA la reproducción inducida según las recomendaciones de Harvey & Hoar (1980), en la cual se trabajaron los peces con extracto de hipófisis heteroplástico de carpa, producida por Crescent Research Chemicals, previamente determinadas las características externas de predesove. Antes de iniciar el tratamiento se extrajeron unos pocos huevos para observar la migración del núcleo,

mediante soluciones aclaradoras con las siguientes composiciones: 1) 60% de etanol al 98%, 30% de formol al 40% y 10% de ácido acético glacial al 96%; 2) 60% de etanol al 98%, 35-39% de formol al 40%, y 1-5% de ácido sulfúrico al 98%; 3) 60% de etanol al 98%, 35-39.5% de formol al 40%, y 0.5-5% de ácido clorhídrico al 98%

La inducción para la tilapia nilótica se efectuó con dosis compuestas por 80% de suero fisiológico al 0.9% de NaCl, 20% de Conceptal u Ovalyse como disolventes, y la cantidad de extracto de hipófisis de carpa. Las inyecciones se aplicaron intraperitoneal y/o intramuscularmente.

Para la extrusión y fertilización de los huevos se usó el método "en seco". El semen se diluyó con suero fisiológico (Chourrout & Itskovich, 1983; Varadaraj & Pandian, 1988), o con solución Buffer fosfatada 1x (PBS) modificada. Estos dos diluyentes fueron agregados a razón de 10 a 20 ml, dependiendo del volumen de esperma y del número de ovas.

Los huevos y el semen se mezclaron para la fertilización durante 1 a 2 minutos con una pluma de ganso desinfectada y seca. Luego se agregó agua para hidratar los huevos, se agitó por espacio de un minuto, se hizo recambio de agua con el fin de eliminar residuos. A las dos horas de la fertilización, se tomaron muestras al azar de las ovas y se observó al estereoscopio el porcentaje de fertilización, el cual se determinó de acuerdo al número de huevos que mostraban división celular (2 a 4 células).

Métodos para inducir triploidía

Se utilizaron los choques térmicos que consisten en sumergir los huevos recién fertilizados en agua fría o caliente. El tiempo post-fertilización, la duración y la temperatura del choque térmico se debe determinar para cada especie (Cassani & Caton, 1985; Chourrout, 1986a).

Choque frío

El shock se aplicó a los 4-5 minutos después de la fertilización del huevo, a 11 °C durante una hora sin aclimatación, según recomendaciones de Don & Avtalion (1988a, 1988c) y Valenti (1975). Los huevos fueron sumergidos en vasos de precipitado de 600 ml, con agua hervida y/o esterilizada. El vaso se colocó a su vez en otro recipiente aislante del calor agregado de agua helada y hielo, con el fin de mantener la temperatura requerida dentro del vaso (11 °C ±0.5). La temperatura se controló constantemente antes y durante el choque. Antes de introducir los huevos se agregó 0.1 mg/ml de oxitetraciclina con el fin de evitar

contaminación bacterial (Pandian & Varadaraj, 1988). El agua del choque se mantuvo constantemente oxigenada con un difusor, al cual se le insuflaba aire empleando un pequeño motor, para mantener un ligero movimiento de los huevos, asegurar suficiente provisión de oxígeno a cada uno y mantener estable la temperatura del agua en toda la columna.

Transcurrido el tiempo del choque los huevos se sacaron sin aclimatación (Valenti, 1975) y se dejaron en reposo durante dos horas más en las cajas de Petri. Se les cambió constantemente el agua. Se extrajeron los huevos muertos y los otros se dividieron en grupos en las incubadoras con temperatura dependiente del sistema de incubación utilizado.

Choque caliente

El shock se aplicó 3.5 minutos después de la fertilización, colocando los huevos entre 40.5 y 42 °C durante 3.5-4 minutos (Chourrout & Itskovihc, 1983; Don & Avtalion, 1986, 1988a; Penman et al., 1987a, 1987b; Shah, 1986), en un baño serológico marca Equitron y en una incubadora marca Blue M, con termostatos. Los demás parámetros se manejaron de igual forma que en el choque frío.

Evaluación de la eclosión

Para cada sistema de incubación se evaluó la viabilidad o eclosión de diploides y triploides en porcentaje relativo, según la fórmula sugerida por Don & Avtalion (1986):

$$V (\%) = (n * 10^4) / (i * c)$$

Para determinar la eficiencia de la incubación, o tasa de producción de alevinos, se utilizó la fórmula según Rana (1986):

$$P a (\%) = (K f * K e * K s) / 10000$$

Los desoves con 100% de mortalidad de los huevos tratados con choques térmicos, o donde no hubo eclosión alguna, no se tuvieron en cuenta en los resultados de viabilidad.

Sistemas de incubación artificial

Se utilizaron 8 sistemas diferentes de incubación, los cuales diariamente se observaron para extraer los peces muertos y determinar el porcentaje de viabilidad:

1. Doce botellas plásticas verticales con flujo de aire con un volumen de 1500 ml (Moreno, 1985), provistas de pequeños embudos de vidrio (5 ml) para la entrada de aire, suspendidas verticalmente. Diariamente se les cambió el 70 % del agua. El sistema se manejó de acuerdo a las recomendaciones de Penman et al. (1987b) y Valenti (1975).
2. Las mismas botellas del experimento anterior, pero colocadas horizontalmente dentro de acuarios de 84 litros, provistos de termostatos, filtros externos de agua y difusores de aire para mantener constante la temperatura, buena calidad de agua y movimiento de las botellas. Las botellas se suspendieron a 5 cm bajo el nivel de agua, colgándoles pesas. Los acuarios e implementos se desinfectaron cada dos días con formol al 0.08% de concentración y con 0.02 g de Permanganato de Potasio por litro de agua (Rodríguez et al., 1988). Se adicionó 3.45 mg de Oxitetraciclina por litro de agua y 0.05 mg de Neoterramicina por litro después de la limpieza y desinfección del acuario (Valenti, 1975).
3. Canasta de malla con tela "toul" de 0.8 m² de área total. La forma de este sistema de incubación la daban 4 pesas ubicadas sistemáticamente formando un cajón donde se alojaban los huevos en una sola capa a 10 cm 2 bajo el nivel de agua. Estos huevos se mantuvieron en continuo movimiento gracias al flujo de aire inducido en el fondo del acuario con una bomba de aire a través de piedras difusoras. Los acuarios estaban provistos de termóstatos y filtros de agua. El agua fue previamente filtrada y esterilizada con una lámpara de 20 vatios de luz ultravioleta marca phillips, colocada a 10 cm sobre la corriente de agua. Se adicionó 60 ppm de sal mineral y la mezcla de antibióticos arriba mencionada. Los acuarios se recubrieron totalmente con plástico negro para evitar la contaminación y la incidencia de luz sobre los huevos.
4. Embudos de decantación con flujo de agua de 250 ml de capacidad, conectados para algunos desoves, directamente a los grifos de agua mediante mangueras, y para los otros desoves, el agua de alimentación fue tomada por gravedad desde los reservorios de agua de donde llegaba filtrada y esterilizada. El flujo de agua fue de 0.5 0.1 L/min. El agua se pasó a través de un lecho filtrante vertical de flujo

descendente, con capas de gravilla, carbón activado, Zeolita, arena fina y lana de Perlón. Una vez filtrada era esterilizada con lámparas de luz ultravioleta de 20 y 30 vatios.

5. Incubadoras cilíndricas según Rana (1986, 1988). Al agua no se le aplicó ningún tratamiento profiláctico, dadas las dificultades para hacerlo.
6. Incubadoras cilindro-cónicas (Woynarovich) de 60 litros de capacidad con aros recubiertos en malla para impedir la fuga de larvas (Cassani & Caton, 1985), y con filtros en lycra en cada unión de la tubería de alimentación de agua hasta la entrada de la incubadora. El agua fue filtrada y esterilizada.
7. Seis incubadoras cónicas con flujo de agua ascendente, tipo Woynarovich, en forma cónica de 1125 litros de capacidad, fabricadas en nalgono. El agua de alimentación se almacenó previamente en un tanque de concreto para decantar los sólidos en suspensión, de allí se pasó por un filtro vertical de flujo descendente marca Edospina. La temperatura se controló con tres calentadores marca Haceb de 105 litros de capacidad. El agua se bombeó hasta un tanque aéreo para que llegara por gravedad al equipo de esterilización de luz ultravioleta marca Acuaculture.
8. Seis embudos de vidrio con flujo de aire marca Pirex con capacidad de 175 ml cada uno (Valenti, 1975), colocados dentro de un acuario para controlar la temperatura con termoreguladores. Se usó agua hervida, con recambio cada día y medio.

Profilaxis de las ovas

Los huevos muertos se extrajeron diariamente de cada incubadora. En los sistemas de incubación donde no se utilizó agua filtrada y esterilizada, se aplicó verde de malaquita en concentración de 2 ppm sin detener el flujo de agua (Subasinghe & Sommerville, 1985) ó 65 mg por litro durante 30 segundos cada 24 horas (Wolters et al., 1981a).

Levante de larvas

Luego de la reabsorción del saco vitelino las larvas fueron trasladadas a sitios de levante. Se usaron cuatro confinadores:

- Acuarios de 84 litros de volumen, con temperatura y calidad de agua controladas según recomendaciones de Moreno (1985).

- Tanques de concreto de 1,5 m de ancho, 2,5 m de largo y 1 m de profundidad, provistos de calentadores de 100 vatios y agua filtrada. El nivel del agua fue mantenido entre 25 y 30 cm. La limpieza se realizó cada dos días por sifoneo.
- Estanques en tierra con un área de 105 m². Atendiendo la sugerencia de Moreno (1985), se dividieron en dos secciones con malla de 1 mm de diámetro, para alojar en cada lado a los diploides o triploides. El estanque se encaló con 44 g de cal dolomítica/m². Se adicionó gallinaza a razón de 36 g/m² inicialmente y 24 g/m² cada 15 días. Se hizo recambio de agua (10% del volumen total) diariamente.
- Jaulas de 1,5 x 1,5 x 0,5 m, con ojo de malla de 3 mm, inmersas en un estanque en tierra separadas 1 m entre sí, para no cambiar las condiciones experimentales de los triploides y diploides.

Alimentación

En la EPA las larvas, una vez reabsorbieron su saco vitelino, se les suministró Tetramin con 50% de proteína cruda cuatro veces al día (Moreno, 1985; Rana, 1990b). Las larvas en la EPAM fueron alimentadas con una mezcla de truchina con 50% de proteína cruda y leche en polvo del 27% de proteína cruda en relación de 80:20. Diariamente se les suministró plancton capturado con malla para plancton de 50 micras de ojo. Además se les suministró *Artemia* con 65% de proteína cruda marca Argent poco después de agregado el plancton (Moreno, 1985). Todos los alimentos fueron suministrados *ad libitum* cada dos horas, para un total de siete raciones al día desde las 7 AM hasta las 7 PM.

Los animales que se trasladaron al estanque en tierra y a las jaulas fueron alimentados cuatro veces al día (7 & 11 AM, 2 y 5 PM) con concentrado Truchina 50, molido y tamizado. El concentrado Se suministró a saciedad.

Toma de muestras

Se contó el número de individuos deformes durante la incubación hasta el momento de la reabsorción del saco vitelino. Se tomaron muestras de peces correspondiente al 20% de la población total de los lotes que tuvieron la más alta viabilidad. Las medidas tomadas fueron: peso y longitud después de la reabsorción del saco vitelino. Se usó una balanza analítica Mettler H54AR y un vernier marca Scheer Tumico. La tasa específica de crecimiento (TEC) se evaluó según la recomendación de Watanabe et al. (1992), quienes aplican la siguiente fórmula:

$$\text{TEC} = \frac{[\text{Peso final(g)} - \text{Peso inicial(g)}] \times 100}{\text{Tiempo (días)}}$$

Identificación de ploidia

Se emplearon básicamente las técnicas de Baksi & Means (1988), Kligerman & Bloom (1977). Se capturó el 10% de larvas al día siguiente de la reabsorción del saco vitelino y se colocaron en cajas de Petri con solución de colchicina al 0,01-0,02%, por espacio de 2-4 horas (Cassani & Caton, 1985; Chourrout et al., 1986; Don & Avtalion 1986; Varadaraj, 1990). Luego de quitarles la cabeza y aletas, se maceraron en solución búfer salina fosfatada (PBS) (Carvajal et al., 1991). Las células se colocaron en solución hipotónica de cloruro de potasio (KCl) 0,075 M durante 20-45 min agitando frecuentemente. Después se centrifugó durante 10 min a 950-1050 rpm, se adicionaron 6 ml de solución de Carnoy, y las células se dejaron 40 min en la solución. Luego se centrifugó a 1000-1300 rpm durante 10 min. Se hicieron de dos a tres fijaciones más por 20-30 min con su respectiva centrifugación. Finalmente, se adicionó ácido acético glacial en concentración del 48% y se tomaron gotas de la muestra sobre láminas precalentadas a 50 ºC. Las láminas se dejaron secar al aire y luego fueron teñidas con colorante Giemsa 10-15 min. Los excesos de colorante se lavaron con agua corriente, y las láminas se secaron al aire. Las metafases se observaron al microscopio a 100 y 1000 aumentos.

A los alevinos triploides se les inyectó intraperitoneal o intramuscularmente colchicina a razón de 25 microgramos por gramo de peso, dejando actuar por 1-6 horas (Cassani et al., 1984). Luego el pez se sacrificó para la extracción de riñón y cerebro. Cada tejido fue macerado en PBS, según procedimiento arriba descrito. Se prepararon cinco láminas por espécimen y por tejido. Se contaron 50 metafases por lámina. Las mejores metafases fueron microfotografiadas con microscopios Zeiss y Leiss.

Análisis estadístico

Los datos se analizaron aplicando un diseño completamente al azar con arreglo factorial 2x7. El modelo estadístico es el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + \tau_j + i + \Omega_i + (\tau\epsilon)_{ji} + \epsilon_{ijk}$$

Los datos recopilados fueron analizados empleando el programa SAS (Statistical Analysis System). Las interacciones que resultaron estadísticamente significativas se analizaron por la prueba SNK (Student-Newmann-Keuls). Para el ANAVA y la prueba SNK se definió un nivel de significancia del 5%

RESULTADOS Y DISCUSION

Parámetros físico-químicos

Estos mostraron gran variación mensual durante el transcurso de los ensayos realizados. La estación de Apulo mostró las mayores variaciones respecto a la estación de Gigante, quizás debido a esto hubo más mortalidad en la estación piscícola de Apulo.

Los cambios físicoquímicas promedio más variables en las 8 incubadoras fueron la alcalinidad (47 - 105 ppm) y la turbidez (32 - 92 cm). El oxígeno promedio varió entre 6.9 y 10 ppm; la temperatura entre 26 y 28.3 °C , y el pH entre 7.4 y 8.

Manejo de reproductores

Los mejores sistemas fueron los estanques de cemento en Apulo y los estanques excavados en tierra en Gigante. Los estanques en concreto en Gigante dieron escasa cantidad de hembras maduras. Los acuarios de 80 litros no dieron óptimos resultados por su reducida área. Rothbard & Pruginin (1975) y Valenti (1975) usaron acuarios de 500 litros de capacidad, los cuales presentan mayor espacio, que mejora las condiciones de los padrotes para el apareo. Es de anotar la ausencia de luz artificial en el presente ensayo por lo cual las horas luz se reducen a 10-12 horas, mientras que Don & Avtalion (1986), Rana (1986), Galman & Avtalion (1989), pudieron garantizar 14-16 horas luz/día, aspecto que influye en la excitación sexual de los reproductores.

Cuando el nivel del agua en los estanques de concreto en Apulo superaba los 60 cm los peces exhibían mejor comportamiento reproductivo y comían mejor que a niveles de agua menores. Cuando se adicionó gravilla al fondo de los estanques, los machos excavaron nidos. Esta modificación facilitó la visualización de las parejas listas para un desove.

Reproducción inducida

De las tres soluciones aclaradoras preparadas para observar la migración nuclear en el oocito, la que mejor se comportó fue la que contenía, además del etanol y el formol, ácido clorhídrico o sulfúrico. Presentan como inconveniente la rapidez de acción, razón por la cual se hizo necesario utilizar bajas concentraciones de los ácidos. La composición ideal establecida, con la cual los huevos no se queman y se pueden observar bien, es la siguiente: 1) etanol 60,0%, Formol 39,5%, ácido clorhídrico 0,5%, y 2) etanol 60,0%, formol 39,0%, ácido sulfúrico 1,0%

En todos los ensayos de inducción el resultado fue negativo, coincidiendo con lo reportado por Srisakultiew & Wee (1988), quienes tampoco lograron reproducción inducida de *O. niloticus* con extracto de pituitaria de carpa china, con dosis de 1 mg, 2,5 mg y 5 mg por kg de peso. Los animales tratados y colocados en acuarios mostraron notorios síntomas de estrés. En los estanques de concreto la respuesta fue de rechazo del macho. Las hembras presentaron reabsorción de los oocitos, y todas presentaron involución de las características secundarias reproductivas.

Los animales en los estanques de concreto presentaron comportamiento similar al descrito por Rothbard & Pruginin (1975). Las características de reproducción observadas fueron las mismas descritas por Rothbard & Pruginin (1975), y Hephher & Pruginin (1989).

Si se toma como parámetro bueno de fertilización promedia el propuesto por Chourrout & Itskovich (1983) de 63,7%, entonces el promedio de fertilización obtenido en este trabajo ($80,91\% \pm 11,48$) es bastante satisfactorio. El resultado obtenido concuerda con el de Valenti (1975), quien obtuvo un porcentaje de fertilización del 80% en *O. aureus*.

Desarrollo embrionario

A lo largo de todas las incubaciones de los desoves manuales se pudo observar una eclosión más precoz de los diploides respecto a los triploides inducidos por choque térmico (Tabla 1). Este desarrollo retardado de los triploides puede ser debido al estrés físico al cual son sometidos los cigotos, presentándose un desarrollo metabólico más lento.

TABLA No. 1		
DESARROLLO EMBRIONARIO DE DIPLOIDES Y TRIPLOIDES <i>O. NILOTICUS</i>, LINEA GHANA, INCUBADOS EN EL LABORATORIO A 25.21 ± 1.05 °C		
ETAPA DE DESARROLLO	EDAD (DÍAS/GRADOS)	
	DIPLOIDES	TRIPLOIDES
2 Células	1.06-3	2-3.4
4 Células	3-4.35	3.4-4.62
8 Células	4.35-5.68	4.62-5.91
16 Células	5.68-7.73	5.91-8.53
32 Células	7.73-11.2	8.53-11.93
Blástula	12.68-13.33	13.86-14.4
Gástrula	25-26.2	25.81-27
Anillo germinal	38.4-40.1	40-40.85
Formación cabeza	52.8-54	54.18-56.2
Melanóforos	88.5-90	90.66-92.8
Eclosión	100.8-112.6	113.9-122.66

Eficiencia de los sistemas de incubación

Las incubadoras que mejor eficiencia presentaron para los diploides fueron los embudos de vidrio (35,49%), embudos de decantación (32,84%) y canasta de malla (28,75%). Los triploides mostraron una tendencia de mejor viabilidad en los embudos de vidrio (12,7%), embudos de nalgeno (5,8%) y botellas plásticas horizontales (4,18%).

Al comparar la viabilidad de la eclosión obtenida en este estudio, con respecto a la obtenida por otros autores, se nota una baja eficiencia. En la incubación de diploides los mejores resultados se obtuvieron con canastas de malla y embudos de decantación. Las altas mortalidades en la incubación se deben a la gran fluctuación de la calidad del agua, principalmente en Apulo, donde la calidad del agua fue deficiente. Es de anotar la falta de un sedimentador y filtros de agua en la Estación Piscícola de Apulo y el asentamiento humano kilómetros antes de la bocatoma de agua de la estación, población que arroja los desechos de alcantarillado al río, causa de altos recuentos bacterianos en el agua. En varias ocasiones se realizaron análisis biológicos del agua, encontrándose gran cantidad de cocos, bacilos, protozoarios, larvas de insectos, materia orgánica y otros.

Con el fin de mejorar la calidad del agua en Apulo, se hizo necesario crear sistemas rudimentarios de filtración y desinfección a base de materiales como carbón activado, zeolita y gravilla. En general, cuando las

condiciones del agua se mejoraron, aumentó la viabilidad de los huevos. Aunque la luz ultravioleta y la filtración fueron efectivas para aumentar la viabilidad, no se logró alcanzar los promedios de otros autores (Tabla 2), debido a que usaron sistemas de recirculación de agua con filtros de alta efectividad y varias lámparas ultravioleta, o grandes cantidades de antibióticos de amplio espectro (Penicilina G y Sulfato de Estreptomicina).

TABLA No. 2 PORCENTAJE DE VIABILIDAD O ECLOSION DE TRIPLOIDES DE CUATRO LINEAS DE <i>O. NILOTICUS</i> EPA = ESTACION PICICOLA DE APULO, EPAM = ESTACION PISCICOLA ALTO MAGDALENA			
LINEA	CHOQUE (°C)	VIABILIDAD (%)	AUTOR
Africana (Kenya)	39.5-41.5	69.54	Chourrout & Iskovich (1983)
	39.5-41.5	61.93	"-
	39.5-41.5	55.15	"-
	39.5-41.5	31.73	"-
Egipcia	40.8-41.1	31.91	Penman et al. (1987b)
Filipina (Israel)	40.4-41.5	8	Don & Avtalion (1988a)
	11	45.5	"-
	40.5	14	Don & Avtalion (1988b)
	11	50	"-
Ghana (EPA)	41.5	49.57	Este trabajo
	11.3	1.10	"-
(EPAM)	42	5.97	"-
	11	30.90	"-
	10.8	1.81	"-
	11	3.60	"-

La quimioterapia aumentó las tasas de viabilidad

Los ensayos con mezcla de antibiótico presentaron buenos índices de eclosión. Cuando se agregaron antibióticos o antimicóticos se observó un aumento de los vasos que recubren el corión; es muy posible una absorción del medicamento. Huevos incubados con antimicótico (Micostatina, 500 mg/80 litros de agua) presentaron bajas mortalidades. Se probaron baños de formol al 1% en huevos de 48 horas de la fertilización, que aparentemente dieron resultados.

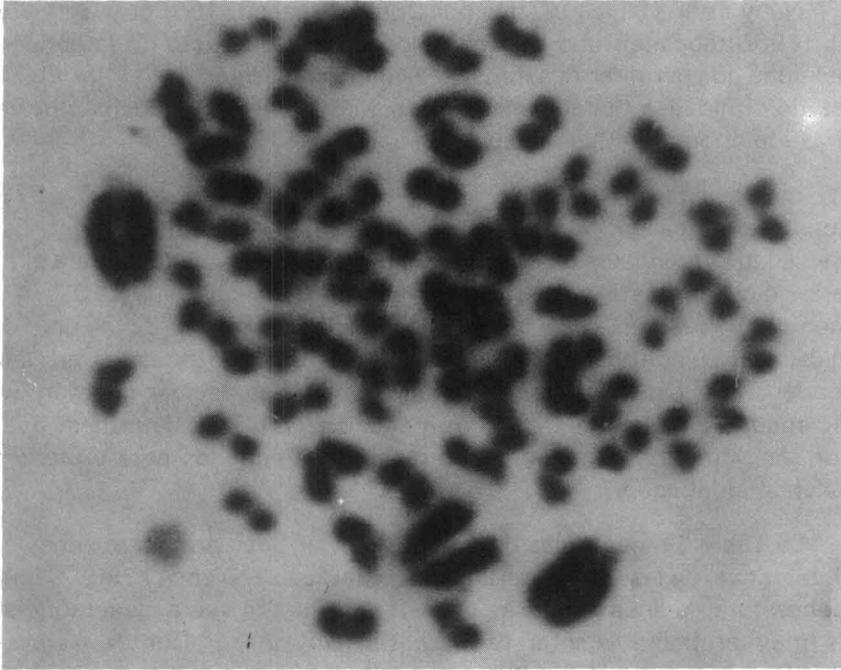


FIGURA No. 1 Metafase triploide ($3n = 66$) en riñón de *O. niloticus*. Obsérvese la repetición 3 veces del cromosoma 1 (más grande)

La profilaxis, inmersión de implementos en permanganato de potasio ($KMnO_4$), azul de metileno, el uso de sal en el agua de incubación y la 'total' esterilidad en los desoves dieron por lo general buenos resultados.

Inducción de triploidía

Todas las larvas y alevinos sometidos a estudio citogenético fueron triploides (Fig. 1). Esto indica la efectividad de los choques térmicos fríos y calientes para inducir la triploidia. La inducción de triploidia causó gran cantidad de individuos deformes (porcentajes promedio de $16,34 \pm 3,45$ en choque frío y $19,32 \pm 5,3$ con choque caliente), como desviaciones de la columna vertebral (escoliosis, lordosis, cifosis), cuerpos desproporcionados, animales sin boca, ojos y aletas, larvas carentes de aletas. Otros autores obtuvieron proporciones variables de peces triploides deformes, ocasionados por los choques térmicos en tilapias (e. g. Pandian & Varadaraj, 1988, obtuvieron anomalías del 15%; Varadaraj & Pandian, 1989, 2-6%; Varadaraj & Pandian, 1990, 13-75%).

Nagy et al. (1978, citados por Don & Avtalion, 1988c) y Gervai et al. (1980) sugieren que las deformidades son producto de la consanguinidad que permiten la expresión de genes recesivos letales. También, las deformidades pueden ser debidas a mutaciones producidas por el drástico choque térmico al cual son sometidos los huevos.

La viabilidad por el choque térmico fue variable (8,4% a 74,37% con choque caliente, y 0,879% hasta 49,37% con choque frío). Las viabilidades posteclosión de los triploides siguieron una tendencia similar al diploide hasta los 20 días (41.5 °C) y 30 días (11 y 10.8 °C), momento en el cual se observó un descenso vertiginoso de la curva de viabilidad. En contraposición, la viabilidad del diploide muestra una clara tendencia a estabilizarse. Las mortalidades posteclosión están relacionadas directamente con la producción de larvas deformes, pues son las primeras en morir, presentándose dificultades para el nado y balance en el agua.

La Tabla 2 muestra las diferencias de viabilidad en cuatro líneas de *O. niloticus*, de las siete reportadas por MacClean & Dizon (1990). Según la literatura, la línea Ghana se ensayó por primera vez a nivel mundial. Es muy probable aceptar la hipótesis lanzada por Don & Avtalion (1988a), y Solar et al. (1984), que la mortalidad es debida al diferente origen de las líneas. Cassani & Caton (1985) piensan que la retención del cuerpo polar o su susceptibilidad a choques diversos dependen de tendencias genéticas. A esto, y a la calidad de los huevos, Rana (1988) atribuye los distintos resultados en comparación con otros autores.

La línea Ghana presentó resultados muy extremos, especialmente entre las dos estaciones, posiblemente debido a la diversa consanguinidad que a su vez afecta la cantidad de genes recesivos letales. En Apulo se presume un alto coeficiente de consanguinidad, dado el mal manejo de la reproducción, en contraste con la estación Alto Magdalena en Gigante donde la reproducción se lleva a cabo mediante grupos cruzados evitando en algo el alto grado de consanguinidad. Se cree que las líneas más puras y especializadas se adaptan mejor al choque frío. Otra hipótesis que se abre paso es la de la diferencia de hembras usadas en peso y edad. Según Rana (1985), Rana & Macintosh (1988) y Rana (1990a), la calidad del huevo y su viabilidad a factores externos dependen del peso y edad de la hembra. Hembras pequeñas producen muchos huevos, pero pequeños y frágiles (Cassani & Caton, 1985).

Los triploides eran lentos, asustadizos, aturdidos, lerdos. En comparación con los diploides, no presentaron gran avidez por la comida a la hora de la alimentación. Quizá estas causas provocaron la mayor

mortalidad en el primer mes de edad. También la mortalidad se atribuye a la cantidad de vitelo contenido por los triploides durante sus primeras etapas, lo cual se relaciona directamente con el crecimiento y supervivencia del alevino.

Penman et al. (1987a) reportan aumento de la mortalidad de *O. niloticus*, línea egipcia, a la quinta semana al cambiarlos de medio. Valenti (1975) menciona una gran mortalidad alrededor de la sexta semana de edad de los animales tratados con choques térmicos en su etapa zigótica. Los alevinos triploides, al mes de nacidos, se introdujeron en jaulas en el estanque en tierra. La mortalidad se inició 10 días después de ser introducidos. Cabe anotar que los ensayos de crecimiento hechos por otros autores (e.g. Penman et al., 1987b; Rana, 1990a), han sido en estanques con control del ambiente y de la temperatura, parámetros que no fueron controlados en el presente trabajo, por lo que se piensa que los triploides obtenidos por este drástico sistema son susceptibles de morir en condiciones de cultivo comercial, sin la temperatura óptima del agua.

La mayoría de autores (e. g. Valenti, 1975; Shah, 1986; Penman et al., 1987b; Don & Avtalion, 1988a), en diversas especies de tilapias, observaron diferencias en viabilidad, principalmente desde el choque hasta la reabsorción del saco vitelino. Muchos piensan que ésta depende del choque, del tiempo de aplicación, de la calidad del huevo, de la línea genética y de otros factores que es necesario estudiar con más profundidad.

Crecimiento

El crecimiento, según el análisis de varianza, a un nivel de significancia $p < 0,05$, demostró ser igual en triploides y diploides. Cada variable de respuesta mostró no ser significativa. El incremento en peso fue igual para las dos poblaciones ($p = 0,3529$). La longitud total ($p = 0,2272$) y la longitud estándar ($p = 0,2377$) fueron similares en cada población analizada. Sin embargo, se observó un aparente mayor incremento en el peso y tasa específica de crecimiento de los triploides respecto al diploide, explicable por la mayor mortalidad de las colas del grupo de triploides (Tabla 3).

Penman et al. (1987b), en *O. niloticus*, línea egipcia, registran menor crecimiento en triploides que en diploides a las 21 y 25 semanas de edad, con un aumento de mortalidad a la quinta semana. Shah (1986) en *O. niloticus*, línea egipcia, indica una inferioridad general de los triploides a las 32 semanas de edad.

TABLA No. 3 TASA ESPECIFICA DE CRECIMIENTO (TEC) Y GANANCIA DE PESO DE TRIPLOIDES Y DIPLOIDES DURANTE EL LEVANTE					
EDAD (días)	PESO (g)	LONGITUD TOTAL (cm)	LONGITUD STANDAR (cm)	TEC (%)	GANANCIA PESO (g)
TRIPLOIDES					
10	0.0127	0.94	0.81		
35	0.0732	1.63	1.26	0.242	0.0605
50	0.1156	2.06	1.6	0.26	0.0423
65	4.4475	6.05	4.9	8.06	4.3318
75	13.785	8.16	6.65	21.2	9.3371
92	21.623	10.06	8.23	26.35	7.8384
104	26.563	10.99	9	28.24	4.9395
DIPLOIDES					
10	0.0109	1.03	0.83		
35	0.0884	1.68	1.27	0.31	0.07749
50	0.1398	2.12	1.7	0.322	0.05134
65	4.2154	5.72	4.65	7.64	4.07564
75	13.7846	7.53	6.30	19.55	8.5055
92	18.1530	9.913	8.07	22.12	5.4321
104	22.3300	10.41	8.45	23.71	4.1471

En otras especies los diploides y triploides crecen igualmente en las etapas de prelevante y levante, i. e. *Cyprinus carpio* (Gervai et al., 1980), *Ctenopharyngodon idella* (Cassani & Caton, 1986), *Ictalurus punctatus* (Chrisman et al., 1983) y *Oncorhynchus mykiss* (Espinosa De Los Monteros & Labarta, 1987; Chourrout et al., 1986; Solar et al., 1984).

Chourrout (Com. per.) recomienda producir tetraploides machos para cruzarlos con hembras diploides. Estos triploides presentan menos estrés que los obtenidos por los diferentes choques, los cuales pueden llegar a edades avanzadas y observarse mejor sus características de esterilidad y producción.

Estudio citogenético

El método de análisis cromosomal empleado en esta investigación fue eficiente para la identificación de la triploidía. Se comprobó el número diploide ($2n = 44$ cromosomas) y el triploide ($3n = 66$ cromosomas) (Fig. 1 y 2), en donde la mayoría de cromosomas son subtelocéntricos. De igual forma se observa el cromosoma tres veces más grande, el cual confirma la triploidia (Fig. 1). El mejor tejido para la preparación de láminas resultó ser el de riñón, confirmando lo estudiado por Kligerman & Bloom (1977), Cassani et al. (1984), y Carvajal et al.

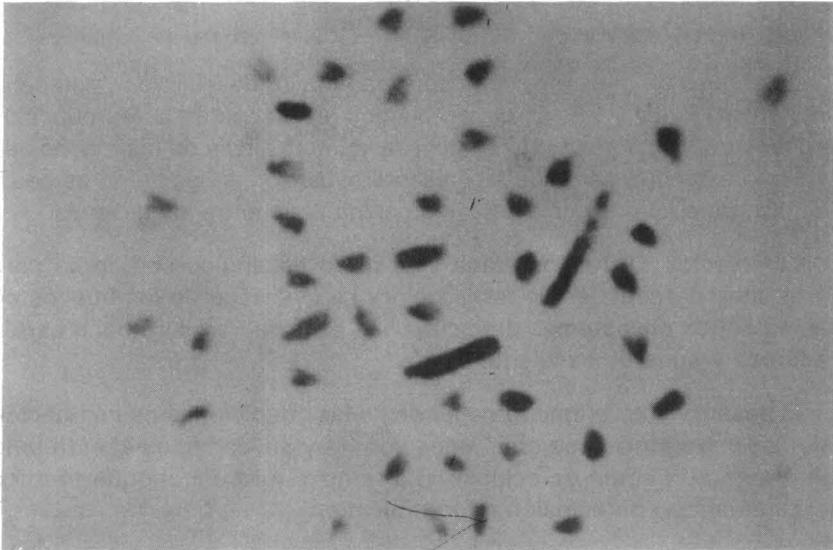


FIGURA No. 2 Metafase diploide ($2n = 44$) en riñón de *o. niloticus*.

(1991). Con este tejido se obtuvieron hasta 600 metafases por lámina en comparación a otros tejidos como cerebro y larva macerada, donde se lograron hasta 200 metafases. Los peores tejidos para obtener alto índice mitótico fueron los de hígado, branquias, corazón, gónadas e intestino (menos de 50 metafases por lámina).

Ensayos realizados en embriones con concentraciones de colchicina de 0,01-0,03%, inmersos durante dos horas dieron resultados negativos, presentándose cristalización de la parte energética del huevo, lo que impidió su resuspensión. Esta característica es reportada por Baksi & Means (1988), pero ellos obtuvieron buenos resultados en huevos de *Cyprinodon variegatus*. Chourrout & Itskovich (1983) y Don & Avtalion (1986), de igual forma lograron excelentes metafases en embriones de 40 horas de edad.

En prelarvas y larvas se lograron excelentes resultados usando concentraciones de colchicina de 0,01 - 0,02% en inmersión. Baksi & Means (1988), Cassani & Caton (1985), y Varadaraj (1990) logran resultados similares con carpa y tilapia.

Se logró establecer que se necesitan tres o más fijaciones en solución Carnoy para obtener un buen preparado, de igual forma que el tiempo en solución hipotónica 0,075M debe ser de 20-35 minutos.

Conclusiones

Estanques de concreto, con capacidad mayor de 80 litros y temperaturas entre los 26 y 28 °C, dieron buenos resultados en la reproducción de *Oreochromis niloticus*. No es necesaria la presencia de los machos en el mismo estanque para que se presente ovulación en las hembras de *O. niloticus*, pero su presencia influye en el intervalo entre los desoves.

La solución Buffer fosfatada y el suero fisiológico son aptos para lograr altos porcentajes de fertilización. La viabilidad de los huevos de tilapia nilótica en sistemas de incubación artificial requiere poco estrés mecánico y agua de excelente calidad.

El desarrollo embrionario depende de las condiciones de incubación y de la temperatura. Los embriones son muy susceptibles al estrés, lo que afecta su tiempo de eclosión. La temperatura del choque térmico afecta el tiempo de eclosión en la triploidía.

Los choques térmicos calientes y fríos fueron eficientes en la producción de triploides de *O. niloticus*, línea Ghana. El choque produce deformidades en los peces. El choque térmico afecta la vitalidad, el apetito y la rusticidad de las larvas.

La viabilidad de los triploides depende del choque, la línea tratada, la consanguinidad, la edad y el peso de la hembra, la madurez exacta de los huevos, y otros factores del medio ambiente. Hembras mayores de un año, con pesos superiores a los 300-400 g producen mejor calidad de oocitos. No hubo diferencia significativa en el crecimiento de larvas y alevinos de triploides y diploides.

Agradecimientos

Parte del trabajo se realizó en el Departamento de Biología y Facultad de Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia. Sinceros agradecimientos para C. Restrepo y N. Contreras, del Laboratorio de Genética del Hospital San José y Colegio Mayor de Nuestra Señora del Rosario, por su colaboración financiera y asesoría en la estandarización de los cariotipos y determinación de la triploidía. Para J. Berdugo, por su colaboración y orientación en la estandarización del conteo cromosomal. Para C. Useche y demás personal de la Estación Piscícola del Alto Magdalena (INPA), por el apoyo en la realización parcial experimental del presente trabajo. Para N. Martínez, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia, por su asesoría en la estadística. Al personal adscrito a la Sección de Hidrobiología de la CAR por su colaboración durante los ensayos preliminares realizados en la Estación Piscícola de Apulo.

BIBLIOGRAFIA

- BAKSI, S. M. y J. C. MEANS. 1988. Preparation of chromosomes from early stages of fish for cytogenetic analysis. *J. Fish Biol.* 32: 321-325.
- CALA, P. 1989. Sinopsis sobre la problemática de la acuicultura en Colombia, en relación con las especies exóticas. Mem. Taller Introd. Especies Hidrobiol. Acuicult., Red. Nal. Acuicult., Colciencias, Bogotá oct. 1989. 29-33 pp.
- CARVAJAL, S. C. ALZATE y G. HURTADO. 1991. Análisis cariológico de dos especies icticas que habitan la parte alta del río Cauca: *Pimelodus grosskopfii* y *Pimelodus clarias*. Trabajo presentado en el XXVI Congreso Nacional de Ciencias Biológicas - Barranquilla. Universidad del Cauca, Popayan, 20-26 pp.
- CASSANI, J. y W. E. CANTON. 1985. Induced triploidy in grass carp, *Ctenopharyngodon idella* VAL. *Aquaculture*, 46: 37-44.
- CASSINI, J. y W. E. CANTON. 1986. Efficient production of triploid grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) utilizing hydrostatic pressure. *Aquaculture*, 55: 43-50.
- CASSANI, J. R., W. E. CANTON y B. CLARK. 1984. Morphological comparisons of diploid and triploid hybrid grass carp, *Ctenopharyngodon idella* ♂ X *Hypothalmichthys nobilis* ♀. *J. Fish Biol.*, 25: 269-278.
- HOURROUT, D. 1986a. Genetic manipulations in fish; review of methods. INRA. Institute National de la Recherche Agronomique. Laboratoire de Génétique des Poissons. JOSAS, Francia, 26 p.
- CHOURROUT, D. y J. ITSKOVICH. 1983. Three manipulations permitted by artificial insemination in *Tilapia*: induced diploid gynogenesis, production of all triploid populations and intergeneric hybridization. In L. FISHELSON and Z. YARON (eds.) Proceedings International Symposium on *Tilapia* in Aquaculture. Tel-Aviv, Israel. 246-255 pp.
- CHOURROUT, D., B. CHEVASSUS, F. KRIEG, A. HAPPE, G. BURGER y P. RENARD. 1986. Production of second generation triploid and tetraploid rainbow trout by mating tetraploid males and diploid females - potential of tetraploid fish. *Theor. Appl. Genet.* 72: 193-206.
- CHOURROUT, D., B. CHEVASSUS y R. GUYOMARD. 1987. La mejora genética de los peces. *Mundo Científico* 63 (6): 1078- 1088.
- CHRISMAN, C. L., W. R. WOLTERS y G. S. LIBEY. 1983. Triploidy in channel catfish. *J. World Maricult. Society.* 14: 279-293.
- DON, J. y R. R. AVTALIAN. 1986. The induction of triploidy in *Oreochromis aureus* by heat shock. *Theor. Appl. Genet.* 72: 186-192.
- DON, J. y R. R. AVTALIAN. 1988a. Comparative study on the induction of triploidy in *Tilapias*, using cold and heat shock techniques. *J. Fish Biol.* 32: 665-672.

- DON, J. y R. R. AVTALIAN. 1988b. Productions of viable tetraploid Tilapias using the cold shock technique. The Israel Journal of Aquaculture-Bamidgeh, 40 (1): 17-21.
- DON, J. y R. R. AVTALION. 1988c. Production of F1 and F2 diploid gynogenetic Tilapias and analysis of the "Hertwig curve" obtained using ultraviolet irradiated sperm. Theor. Appl. Genet. 76: 253-259.
- ESPINOSA DE LOS MONTEROS, J. y U. LABARTA (Eds.) 1987. Genética en acuicultura. Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica (CAICYT). U. Madrid, España. 339 p.
- GALMAN, O. R. y R. R. AVTALION. 1989. Further study of the embryonic development of *Oreochromis niloticus* (Cichlidae, Teleostei) using scanning electron microscopy. J. Fish Biol., 34: 653-664.
- GERVAI, J., S. PETER, A. NAGY, L. HORVATH y U. CSANYI. 1980. Induced triploidy in carp, *Cyprinus carpio* L. J. Fish Biol., 17: 667-671.
- HARVEY, B. J. y W. S. HOAR. 1980. Teoría y práctica de la reproducción inducida en los peces. Ottawa, Canada. 48 p.
- HEPHER, B. y Y. PRUGININ. 1989. Cultivo de peces comerciales. Limusa, México D. F. 380 p.
- KLIGERMAN, A. D. y S. E. BLOOM. 1977. Rapid chromosome preparation from solid tissues of fishes. J. Fish Res. Board Can. 34: 266-269.
- MACLEAN, J. L. y L. DIZON (eds). 1990. Report. International Center for Living Aquatic Resources Management (ICLARM), Manila. 95 p.
- MORENO Q., J. M. 1985. El uso de hormona (17-alfa metiltestosterona) en alevinos de Tilapia nilótica para la producción de tilapias monosexuales en Panamá. Rev. Lat. Acuí. 24 (44): 22-29.
- PANDIAN, T. J. y K. VARADARAJ. 1988. Techniques for producing all-male and all-triploid *Oreochromis mossambicus*. In the Second International Symposium on Tilapia in Aquaculture. Conference Proceedings 15: 243-249. Department of Fisheries, Bangkok, Thailand, and International Center for Living Aquatic Resources Management, Manila, Philippines.
- PANDIAN, T. J. y K. VARADARAJ. 1990. Techniques to produce 100% male Tilapia. NAGA The ICLARM. Quarterly 13 (3): 3-17.
- PENMAN, D. J., M. S. SHAH, J. A. BEARDMORE y D. O. F. SKIBINSKI. 1987. Sex ratios of gynogenetic and triploid Tilapia. Proc. World Symp. on Selection, Hybridization and Genetic Engineering in Aquaculture, Berlin. 267-276.
- PENMAN, D. J., D. O. F. SKIBINSKI y J. A. BEARDMORE. 1987. Survival, grown rate and maturity in triploid Tilapia. Proc. World Symp. on Selection, Hybridization and Genetic Engineering in Aquaculture, Berlin, 277-288 pp.
- PEREZ, J. y A. BEAUMONT. 1990. Mejoramiento genético en acuicultura. Boletín Red Acuicultura, 4(2): 3-13.

- PIEDRAHITA, H. y A. MONTOYA. 1988. Manual de piscicultura. Secretaria de Agricultura de Antioquia, Medellin. 51 p.
- RANA, K. J. 1985. Influence of egg size on the growth, onset of feeding, point-of-no-return, and survival of unfed *Oreochromis mossambicus* fry Aquaculture, 46: 119-131.
- RANA, K. J. 1986. An evaluation of two types of containers for the artificial incubation of *Oreochromis* eggs. Aquaculture and fisheries management, 17: 139-145.
- RANA, K. J. 1988. Reproductive biology and the hatchery rearing of Tilapia eggs and fry. In J. F. Muir, and R. J. Roberts (eds.) Recent advances in aquaculture, Vol (3): 344-405. Cambridge. Great Britain
- RANA, K. J. 1990a. Influence of incubation temperature on *Oreochromis niloticus* (L.) eggs and fry I. Gross embryology, temperature tolerance and rates of embryonic development. Aquaculture 87: 165-181.
- RANA, K. J. 1990b. The influence of maternal age and delayed initial feeding on the survival and growth of previously unfed *O. niloticus* (L.) and *O. mossambicus* (Peters) fry Aquaculture, 91: 295-310.
- RANA, K. J. y D. J. MACINTOSH. 1988. A comparison of the quality of hatchery-reared *Oreochromis niloticus* and *O. mosambicus* fry. In RSV Pullin, T. Bhukaswan, K. Tonguthai, and J. L. Maclearn (eds.) The Second International Symposium on Tilapia in Aquaculture. ICLARM Conference Proceedings 15: 499-502. Department of Fisheries, Bangkok, Thailand, and International Center for Living Aquatic Resources Management, Manila, Philippines.
- RODRIGUEZ, G. H., E. ANZOLA y C. LARA. 1988. Prevención y tratamiento de las enfermedades de los peces. INDERENA. 39 p.
- ROTHBARD, S. y Y. PRUGININ. 1975. Induced spawning and artificial incubation of Tilapia. Aquaculture, 5: 315-321.
- SHAH, M. S. 1986. Triploid tilapia (*Oreochromis niloticus*) and their growth performance with normal diploid. Proc. of the 11th anual Bangladesh Science Conference section 2. Dhaka, Bangladesh. 24 p.
- SOLAR, I. I., E. M. DONALDSON y G. A. HUNTER. 1984. Induction of triploidy in rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) by heat shock, and investigation of early growth. Aquaculture, 42: 57-67.
- SRISAKULTIEW, P., y K. L. WEE. 1988. Synchronous spawning of nile tilapia through hypophysation and temperature manipulation. In R. S. Pullin, T. Bhukaswan, K. Tonghutai, and J. MaClean (eds.) The 2nd. International Symposium on Tilapia in Aquaculture. ICLARM, Conference Proceeding 15: 275-284. Department of Fisheries Bangkok, Thailand and ICLARM.
- SUBASINGHE, R. P. y C. SOMMERVILLE. 1985. Disinfection of *Oreochromis mossambicus* (Peters) eggs againts commonly occurring potentially pathogenic bacteria and fungi under artificial hatchery conditions. Aquacult. fish. Man. 16: 121-127.

- TAVE, D. 1990. Genetics and breeding: chromosomal manipulation. *Aquaculture Management*, 16 (1): 62-65.
- TREWAVAS, E. 1982. Tilapias: taxonomic and speciation. In R. S. V. Pullin, and R. H. Lowe McConnell (eds.) *The Biology and culture of Tilapias*. ICLARM Conference Proceedings 7:3-13. International Center for Living Aquatic Resources Management, Manila, Philippines.
- VALENTI, R. J. 1975. Induced poliploidy in *Tilapia aurea* (Steindachner) by means of temperature shock treatment. *J. Fish Biol.* 7: 519-528.
- VARADARAJ, K. 1990. Dominant red color morphology used to detect paternal contamination in batches of *Oreochromis mossambicus* (Peters) gynogens. *Aquaculture and Fisheries Management*, 21: 163-172.
- VARADARAJ, K. y T. J. PANDIAN. 1988. Induction of triploids in *Oreochromis mossambicus* by thermal, hydrostatic pressure and chemical shocks. *Proc. Aquaculture International Congress and exposition*. 531-535.
- VARADARAJ, K. y T. J. PANDIAN. 1989. Induction of allotriploids in the hybrids of *Oreochromis mossambicus* female X red tilapia male. *Proc. Indian acad. sci. (Anim. Sci.)*, 98 (5): 351-358.
- VARADARAJ, K. y T. J. PANDIAN. 1990. Production of all-female sterile-triploid *Oreochromis mossambicus*. *Aquaculture*, 84: 117- 123.
- WATANABE, W. O., S. J. SMITH, R. I. WICKLUND y B. L. OLLA. 1992. Hatchery production of florida red tilapia seed in brakishwater tanks under natural-mouthbrooding and clutch-removal methods. *Aquaculture*, 102: 77-88.
- WOLTERS, W. R., C. L. CHRISMAN, and G. S. LIBEY. 1981. Lymphocyte culture for chromosomal analyses of channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Copeia* 2: 503-504.
- YAMAZAKI, F. 1983. Sex control and manipulation in fish. *Aquaculture*. 33: 329-354.