

Inducción a la tetraploidía en almeja catarina, *Argopecten ventricosus* (Sowerby II, 1842)

Induction to tetraploidy in catarina scallop, *Argopecten ventricosus* (Sowerby II, 1842)

Rosalío Maldonado

Ana M. Ibarra*

José L. Ramírez

Laboratorio de Genética Acuícola
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
Apartado postal 128
La Paz, CP 23000, Baja California Sur, México
*E-mail: aibarra@cibnor.mx

Recibido en agosto de 2002; aceptado en febrero de 2003

Resumen

La inducción a la tetraploidía por inhibición de la extrusión del primer cuerpo polar en huevos producidos por diploides y fertilizados por esperma haploide produjo un porcentaje reducido de larva-D tetraploide, pero no resultó en la presencia de semilla o adultos tetraploides. La inhibición de la primera división celular del cigoto resultó principalmente en larva anormal. Cuando la inducción a la tetraploidía se realizó inhibiendo el primer cuerpo polar en huevos de triploides fertilizados con esperma haploide, se obtuvo un alto porcentaje de larva-D tetraploide en una de las inducciones. De las progenies tetraploides, seis sobrevivieron hasta talla adulta. El análisis de hemolinfa, por medio de citometría de flujo, de los supervivientes indicó que cinco eran tetraploides y uno era mosaico ($2n$ y $4n$). Con base en estos resultados, los esfuerzos futuros para la producción de tetraploides de almeja catarina deberán de centrarse en la utilización de ovocitos de triploides (fecundados con esperma haploide), inhibiendo el primer cuerpo polar.

Palabras clave: almeja catarina, *Argopecten ventricosus*, tetraploide, poliploide.

Abstract

Induction to tetraploidy by inhibition of the first polar body and first cellular division in fertilized eggs from diploids produced an occasional small percentage of tetraploid D-larvae, but was not successful in multiple experiments with individual or combined spawns in producing juvenile or adult tetraploids. However, when inhibition of the first polar body in eggs from triploids was done, a larger percentage of tetraploids was evidenced by flow cytometry of D-larvae, and viable larvae were obtained in one out of six induced batches. Six individuals survived to pre-adult size, five being tetraploids and one a mosaic (diploid-tetraploid). Based on these results, further efforts in producing tetraploid catarina scallop should be centered on the method involving inhibition of the first polar body in eggs from triploids, fertilized with haploid sperm.

Key words: scallop, *Argopecten ventricosus*, tetraploid, polyploid.

Introducción

La inducción a la poliploidía en moluscos es una realidad en nuestros días, especialmente cuando se considera a la triploidía. Los moluscos triploides se caracterizan por presentar un mejor crecimiento o calidad de carne que los diploides. Esto se debe principalmente a que la condición del triploide resulta en una esterilidad parcial o total, de tal forma que la energía disponible para la formación de gametos y la maduración de los mismos puede ser utilizada en el crecimiento (Allen y Downing, 1986). Uno de los problemas de esta tecnología es que, para la producción de triploides, se tienen que utilizar métodos de inducción ya sean químicos o físicos, los cuales resultan, ambos, en una mortandad alta de los huevos

Introduction

Induction to polyploidy in mollusks is a reality today, especially when triploidy is considered. Triploid mollusks are characterized by their better growth rate or meat quality than diploids. Improved growth or quality in triploids is a consequence of partial or total sterility, such that at maturation age, triploids continue growing whereas diploids allocate their energy for gamete development (Allen and Downing, 1986). In as much as triploid technology has proven its advantages in mollusk production, some problems still remain. Among them is the need to use methods (chemical or physical) that result in large mortalities to the induced eggs. An alternative for obtaining triploid organisms is through “natural” matings

sometidos a estos tratamientos. Una alternativa para obtener organismos triploides para la producción de moluscos en cultivos es por medio de la utilización de apareamientos “naturales” entre organismos tetraploides y diploides (Guo *et al.*, 1996). Debido a que los organismos tetraploides no existen en forma natural entre los moluscos, tienen que ser producidos primero de manera artificial.

La producción de tetraploides ha demostrado ser difícil, aunque algunos se han producido en forma accidental al inhibir la extrusión del primer cuerpo polar en huevos de diploides (Stephens y Downing, 1988; Diter y Dufy, 1990; Gendreau y Grizel, 1990; Guo *et al.*, 1992; Scarpa *et al.*, 1993; Allen *et al.*, 1994; Cai y Beaumont, 1996; Yang *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2000). La ploidía esperada cuando se inhibe el primer cuerpo polar en huevos de diploides fertilizados con espermatozoides haploides es un cigoto triploide. Por ello, cuando se observan tetraploides se suponen consecuencia de un evento aleatorio raro, como la segregación de los cromosomas en un arreglo tri y unipolar (en contraste con uno bipolar), en donde un juego completo de cromosomas es liberado en el segundo cuerpo polar y tres juegos completos son retenidos. Ocasionalmente, también cuando se inhibe el primer cuerpo polar, se han observado progenies pentaploides (Cooper y Guo, 1989; Diter y Dufy, 1990; Scarpa *et al.*, 1993; Yang *et al.*, 2000), lo cual es una consecuencia de la inhibición no inducida del segundo cuerpo polar, adicionalmente al primer cuerpo polar inducido.

Mientras que en plantas la obtención de tetraploides provocados por la inhibición de la primera división celular con colchicina se ha logrado con éxito (Norstog y Long, 1976; Klug y Cummings, 1996; Gardner *et al.*, 1998; Tamarin, 1999), los intentos de producir tetraploides de moluscos por inhibición de la primera división celular no han mostrado resultados satisfactorios (Diter y Dufy, 1990; Guo, 1991, citado por Guo y Allen, 1994; Guo *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 1997). Solamente una metodología (Guo y Allen, 1994) ha demostrado su factibilidad en la producción de tetraploides viables de ostión japonés. Ésta consiste en la utilización de huevos producidos por triploides, los cuales son fecundados con espermatozoides haploides, inhibidos en la extrusión del primer cuerpo polar, pero permitiendo la liberación del segundo cuerpo polar. En huevos de triploides la segregación de cromosomas en la meiosis I es impar, resultando en aneuploidía. Al inhibir la meiosis I, la probabilidad de una segregación balanceada en la meiosis II se incrementa ya que la división que ocurre en la meiosis II es de tipo equitativo, en donde todos los cromosomas duplicados se alinean en la metafase y, al separarse los centrómeros, una de cada una de las cromátidas hermanas segrega al segundo cuerpo polar, reteniendo el ovocito tres juegos completos de cromosomas. Un ovocito que contribuye con tres juegos cromosómicos cuando es fecundado con un espermatozoides haploides resultará en un cigoto tetraploide, como ha sido demostrado que ocurre en el ostión japonés (Guo y Allen, 1994) y en la ostra perlera asiática (He *et al.*, 2000).

between tetraploid and diploid mollusks (Guo *et al.*, 1996). However, tetraploids would have to be produced first for this alternative to be real, because tetraploid mollusks do not exist naturally.

Tetraploid production has proven to be difficult, although tetraploid mollusks have been accidentally obtained when inhibiting the extrusion of the first polar body in eggs from diploids (Stephens and Downing, 1988; Diter and Dufy, 1990; Gendreau and Grizel, 1990; Guo *et al.*, 1992; Scarpa *et al.*, 1993; Allen *et al.*, 1994; Cai and Beaumont, 1996; Yang *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2000). Because the expected zygote ploidy from inhibiting the first polar body in eggs from a diploid fertilized with haploid sperm is a triploid zygote, the occurrence of tetraploid zygotes is thought to be a consequence of a rare event after inhibiting polar body I: the segregation of all chromosomes in an even tripolar-unipolar arrangement (rather than bipolar), with one complete set of chromosomes being released in the second polar body and three complete sets being retained. Occasionally, pentaploids are also observed when inhibiting the first polar body (Cooper and Guo, 1989; Diter and Dufy, 1990; Scarpa *et al.*, 1993; Yang *et al.*, 2000), which is most probably a consequence of the second polar body also being inhibited.

Whereas tetraploids in plants have been produced by inhibition of first cell division with colchicine (Norstog and Long, 1976; Klug and Cummings, 1996; Gardner *et al.*, 1998; Tamarin, 1999), the production of tetraploids through inhibition of first cell division has proven inadequate for mollusk species (Diter and Dufy, 1990; Guo, 1991, cited by Guo and Allen, 1994; Guo *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 1997). In the last decade, a new methodology was demonstrated to produce viable tetraploids in Pacific oyster (Guo and Allen, 1994). It consists of inhibiting the release of the first polar body in eggs produced by non-sterile triploid oysters, fertilized with sperm from diploids, and allowing the second polar body to be expelled. In eggs from triploids (fertilized with haploid sperm), chromosome segregation results in the production of aneuploid gametes. However, when meiosis I is inhibited in eggs from triploids, the probability of an even segregation of chromosomes at meiosis II is improved, as only a mitotic-type chromosome reduction in which all replicated chromosomes align at the metaphase will occur at meiosis II. This should result in an egg that contributes three chromosome sets, which when fertilized with haploid sperm allows for the occurrence of a tetraploid zygote, as has been demonstrated in the Pacific oyster (Guo and Allen, 1994) and the pearl oyster (He *et al.*, 2000).

Triploid catarina scallop has been successfully produced previously, showing that triploid scallops grew significantly larger than diploids and that the commercial body part, the adductor muscle or meat, in triploids could reach twice the weight of that in diploids (Ruiz-Verdugo *et al.*, 2000). Furthermore, the sterility in triploid catarina scallop is partial (Ruiz-Verdugo *et al.*, 2000), and estimates of the number of oocytes indicate that at least 20% of the eggs obtained from a diploid

En la almeja catarina la triploidía ha sido inducida en forma exitosa, encontrándose una ventaja significativa en el crecimiento del triploide cuando se compara con el diploide, especialmente cuando se considera la parte comercial de esta especie, esto es, el músculo aductor o callo que, en el triploide fue del doble del observado en el diploide (Ruiz-Verdugo *et al.*, 2000). Asimismo, se ha observado que la esterilidad en la gónada femenina es parcial (Ruiz-Verdugo *et al.*, 2000), de tal manera que al menos un 20% de los ovocitos en un diploide pueden ser obtenidos en desoves inducidos en triploides (Ruiz-Verdugo *et al.*, 2001). Estos ovocitos pueden ser utilizados para la evaluación de la producción de almeja catarina tetraploide, a través de la utilización del método desarrollado por Guo y Allen (1994) para el ostión japonés.

En este estudio reportamos los resultados sobre la inducción a la tetraploidía en almeja catarina *Argopecten ventricosus* Sowerby II, 1842, utilizando tres métodos diferentes: inhibición del primer cuerpo polar e inhibición de la primera división celular, en huevos de diploides, así como inhibición del primer cuerpo polar en huevos de triploides fecundados con esperma haploide.

Materiales y métodos

Reproductores y recolección de gametos

Las almejas catarina diploides y triploides, con una longitud aproximada de 7 cm, fueron acondicionadas para el desove siguiendo la metodología de Ramírez *et al.* (1999). Ésta consiste en proveer alimentación continua con un sistema de riego por goteo adaptado para este fin. Las almejas diploides alcanzaron la madurez después de 15 días, mientras que las triploides tardaron de 20 a 21 días. La madurez fue evaluada por medio de la escala visual de Sastry (1963), en la que se reconocen cuatro estadios: inmaduro, madurez parcial (tanto la sección femenina como masculina son identificadas fácilmente por su coloración, pero la gónada aún presenta espacios), maduro (la gónada se observa “llena”, con una coloración naranja-rojo brillante), y desovado. Los procedimientos de inducción al desove y la recolección de gametos fueron los mismos para todos los experimentos. El desove se indujo inyectando intramuscularmente 0.2 mL de una solución de serotonina al 0.5 mM. En esta especie hermafrodita funcional, la serotonina induce la liberación del esperma primero, seguido por el huevo. Una vez que las almejas iniciaron la liberación del huevo, éstas fueron enjuagadas con agua de mar y colocadas en vasos (1 L) individuales para la recolección del huevo.

En todas las inducciones a la poliploidía se utilizó citocalacina-B (CB) (Sigma C-6762), enjuagando después del tratamiento con DMSO (dimetil-sulfóxido a una concentración igual a la de la CB utilizada en esa inducción) durante 15 min para retirar la CB excedente (Allen *et al.*, 1989). La concentración de CB utilizada por litro varió entre inducciones y se indica en la descripción de cada experimento.

scallop could be obtained from a triploid (Ruiz-Verdugo *et al.*, 2001). Those oocytes from triploids can be used to evaluate the feasibility of producing tetraploids through triploid eggs, as was done by Guo and Allen (1994) for the Pacific oyster.

In this study, we report the results of the induction to tetraploidy in catarina scallop by the use of three different methods: inhibition of the first polar body and inhibition of first cell division in eggs from diploids, as well as inhibition of the first polar body in eggs from triploids fertilized with haploid sperm.

Materials and methods

Spawners and gamete collection

Adult diploid and triploid catarina scallops about 7 cm in length were conditioned for maturation following Ramírez *et al.*'s (1999) methodology, consisting of an adapted agricultural drip system for continuous feeding. Most diploid scallops were mature after 15 days, whereas triploid scallops took 20 to 21 days. Maturity was evaluated following the Sastry (1963) scale, in which four stages are visually recognized: immature, partially mature (both sections of the gonad are clearly seen because of their coloration, but the gonad still has spaces), mature (the gonad is “full”, with an orange-red color for the female part and a bright white color for the male part), and spawn. Spawning and gamete collection procedures were the same for all experimental inductions. Spawning was induced by intramuscular injection of 0.2 mL serotonin (0.5 mM). In this functional hermaphrodite species, this induces the release of sperm first and then the eggs. Once the scallops began releasing eggs, they were washed and placed in individual beakers (1 L) for egg collection.

For all inductions to polyploidy, cytochalasin-B (CB) (Sigma C-6762) was used, and after treatment, eggs were rinsed with dimethyl-sulphoxide (DMSO) at an equal concentration as that of CB, applied for 15 min to remove any remaining CB (Allen *et al.*, 1989). The CB concentration used per liter, and therefore the DMSO, varied between experimental inductions and is indicated for each experiment description.

Meiotic events inhibited and evaluated for induction to tetraploidy

- *Inhibition of first polar body in eggs from diploids*: For this method, treatment began 5–6 min post-fertilization, and ended when the first eggs in the control group showed extrusion of the second polar body (PB2). This corresponded to when 70% of eggs in the controls showed extrusion of the first polar body (PB1).
- *Inhibition of first cell division in diploid zygotes*: Treatment began when 50% of the oocytes in the control group showed the extrusion of PB2, and ended when 50% or more of the zygotes in the control group were in first cell division (1CD).

Eventos meióticos evaluados para la inducción a la tetraploidía

- *Inhibición del primer cuerpo polar (meiosis I) en huevos de diploides*: En este método, el tratamiento con CB se inició de 5 a 6 min después de la fertilización, y se concluyó cuando los primeros huevos en un grupo control mostraron la extrusión del segundo cuerpo polar (2CP). Esto correspondió a cuando el 70% de los huevos en el control mostraron la extrusión del primer cuerpo polar (1CP).
- *Inhibición de la primera división celular (mitosis) en cigotos diploides*: El tratamiento se inició cuando el 50% de los huevos en el grupo control mostraron la extrusión del 2CP, y se concluyó cuando 50% de los cigotos en el grupo control estaban en la primera división celular (1DC).
- *Inhibición del primer cuerpo polar en huevos de triploides fertilizados con espermatozoides haploides*: El tratamiento se inició 5 min después de la fertilización, y se concluyó cuando del 50% al 70% de los huevos en el grupo control mostraron la extrusión del 1CP.

Experimentos

Todos los experimentos descritos a continuación se hicieron utilizando agua de mar filtrada mediante filtros de polipropileno hasta 1 μm , y esterilizada con luz UV (180 W). La salinidad fue de 36 ppt y la temperatura de 21.5°C a 22°C, mantenida utilizando un sistema de enfriamiento comercial que trabaja por recirculación a una cisterna de 7000 L. El volumen de agua utilizado para los diferentes tratamientos con CB fue siempre de 250 mL, independientemente del número de huevos obtenido en cada experimento. Este volumen optimiza la cantidad de CB utilizada, y ha sido utilizado previamente con inducciones por individuo en esta especie con resultados satisfactorios (Ruiz-Verdugo *et al.*, 2001).

En el experimento I, los huevos de siete almejas se mantuvieron en forma individual, conformando siete réplicas. Cada réplica fue dividida en dos: un grupo control no tratado (aproximadamente 1/3 del total de huevos por hembra), y un grupo para la inhibición de la 1DC (el resto de los huevos obtenidos de cada hembra, aproximadamente 2/3) utilizando 0.5 mg CB L⁻¹. El número de huevos desovado por hembra varió de 448,000 a 1,683,000. En aquellas réplicas en las que se observó larva normal en el grupo control, se estimó el porcentaje de cada clase de ploidía (diploide, triploide, tetraploide, pentaploide) resultante por citometría de flujo, siguiendo los procedimientos descritos por Allen y Bushek (1992). En resumen, las larvas fueron concentradas en una suspensión de agua de mar de 1 mL, centrifugadas y teñidas con 0.5 mL de una solución de DAPI/detergente/DMSO. La concentración de DAPI en esa solución fue de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Posteriormente, las larvas fueron desagregadas macerando conchas y tejido. La suspensión de células obtenida fue filtrada en una malla con abertura diagonal de 30 μm , agregando 1.5 mL de la solución

- *Inhibition of first polar body in eggs from triploids fertilized with haploid sperm*: Treatment began 5 min after fertilization, and ended when 50–70% of the oocytes in the control group showed extrusion of PB1.

Experiments

All experiments were done using 1- μm filtered and UV-sterilized (180 W) seawater (36 ppt). Temperature was maintained at 21.5–22°C by means of a recirculation system to a chiller in a 7000-L cistern. All inductions were done using a seawater volume of 250 mL. This volume optimizes the CB used, and had been previously used with this species when multiple replication or small number of eggs are used (Ruiz-Verdugo *et al.*, 2001).

In experiment I, the eggs from seven individual scallops were kept separated. Each was divided into one untreated control group (approximately 1/3 of total eggs per female) and one treated group inhibiting 1CD (the rest of the eggs per female) using 0.5 mg CB L⁻¹. The number of eggs spawned per female was from a low 448,000 to 1,683,000. For those sets in which normal larvae occurred in the control group, the percentage of ploidy classes in D-larvae was determined by flow cytometry following the procedures described in Allen and Bushek (1992). In short, the larva was concentrated in a 1-mL seawater suspension, centrifugated and stained with 0.5 mL of a DAPI/detergent/DMSO solution. The DAPI concentration in the solution was 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The larva was disintegrated by macerating shell and meat, and the cell suspension obtained was filtered through a 30- μm screen, adding another 1.5 mL of the DAPI/detergent/DMSO solution 5 min before the cytometry assay (Ploidy Analyzer II, Partec, Germany). To estimate the percentage of each ploidy class in a sample, gates (lower and higher limits) for each ploidy class were established for all flow cytometry analyses, defining the lower gate for each ploidy class as the mean of that ploidy group minus three standard deviations (of the diploid mean) and the higher limit as the mean plus three standard deviations.

In experiment II, four sets were evaluated. Each set was made by pooling the eggs from six scallops and dividing into three treatment groups: control (untreated), inhibition of PB1, and inhibition of 1CD. The purpose of this experiment was to define if tetraploid catarina scallop could be produced in an alternate form than in experiment I, by inhibiting the PB1 and comparing this with the results obtained by inhibiting 1CD in the same batches of eggs. Based on the low number of eggs obtained per female in the first experiment, 450,000, and on the fact that three groups were needed, in this experiment a pool of eggs was used in each set. The number of eggs obtained between sets varied depending on the spawns per female. A total of 9,334,900 eggs were obtained in set 1; 5,962,000 eggs in set 2; 4,941,000 eggs in set 3; and 4,095,000 eggs in set 4. The CB concentrations were as those in experiment I (0.5 mg CB L⁻¹), and the ploidy analyses were also as described for that experiment and only done on those sets with normal larvae in the control group.

de DAPI/detergente/DMSO 5 min antes de la lectura por citometría de flujo (Ploidy Analyzer II, Partec, Alemania). Adicionalmente, para estimar el porcentaje de células en cada clase de ploidía se establecieron límites mínimos y máximos para cada clase. El límite mínimo se estimó como la media de esa ploidía menos tres desviaciones estándar y, el límite máximo, como la media más tres desviaciones estándar.

En el experimento II se evaluaron cuatro repeticiones. Cada repetición se conformó por el total de los huevos producidos por seis almejas. El propósito de este experimento fue definir si se podía producir almeja catarina tetraploide en forma alterna a la inhibición de la IDC, esto es, utilizando ahora la inhibición del ICP y comparando con los resultados obtenidos al inhibir la IDC. Basándonos en los datos de número de huevos desovados por hembra en el primer experimento, que indicó que éste puede ser tan bajo como 450,000, en el experimento II se utilizó una *pool* de huevos, ya que se requeriría dividir los huevos en tres grupos. Cada repetición se dividió en tres grupos: control (no tratado), inhibición del ICP (0.75 mg CB L⁻¹) e inhibición de la IDC (0.5 mg CB L⁻¹). El número de huevos varió entre repeticiones, dependiendo del número de huevos desovado por las seis hembras que conformaron cada repetición. En la repetición 1 se obtuvieron un total de 9,334,900 huevos, en la repetición 2, un total de 5,962,000 huevos, en la 3 un total de 4,941,000 huevos, y en la 4 un total de 4,095,000 huevos. En las repeticiones en las que se obtuvo larva normal en los grupos controles, se estimaron los porcentajes de ploidía que ocurrieron en cada grupo, analizados como en el experimento I.

En el experimento III se evaluaron cinco repeticiones, cada una formada al combinar los huevos de tres a cuatro almejas. El *pool* se utilizó por las mismas razones explicadas para el experimento anterior. El objetivo principal de este experimento fue evaluar si la inhibición del ICP resultaba en diferencias en la ploidía lograda, con respecto a la inhibición del 2CP, cuando en ambos casos se utilizaron 0.5 mg CB L⁻¹. Cada repetición se dividió en tres grupos: control (no tratado), inhibición del ICP e inhibición del 2CP. El número de huevos obtenido por repetición varió de 1,145,000 a 3,284,000. Independientemente del número total de huevos por repetición, aproximadamente 10% de los mismos fueron destinados al control, 45% para inhibición del ICP y 45% para inhibición de 2CP. La ploidía resultante en las repeticiones que presentaron larva normal en los controles se analizó por citometría de flujo tanto en larva-D como en algunas de las semillas logradas (repetición 2 de las que presentaron larva normal en el control). Para semilla, el análisis de citometría de flujo se hizo de acuerdo con el método de Allen (1983) y Allen y Bushek (1992), analizando cada semilla en forma individual. El número de semillas analizadas fue de 20 para el grupo control, 68 para las inhibidas en el ICP y 20 para las inhibidas en el 2CP.

El experimento IV se llevó a cabo para evaluar la inducción a la tetraploidía al inhibir el ICP en huevos de triploides fertilizados con esperma haploide. De 144 almejas triploides, 19 fueron seleccionadas, por observación macroscópica, por la

In experiment III, there were five sets, each formed by combining the eggs from three to four spawns. A pool of eggs was used in this experiment for the same reasons explained in experiment II. Each set was divided into two or three groups (depending on the number of eggs). The main purpose of this experiment was to determine whether inhibition of PB1 resulted in differences in the ploidy obtained from inhibition of PB2 when both were treated with the same CB concentration (0.5 mg CB L⁻¹). A control (untreated) group was kept. The number of eggs obtained varied between sets, from 1,145,000 to 3,284,000. Independently of the number of eggs per set, approximately 10% of those obtained in each set were used as controls, 45% were used to inhibit PB1, and the remaining 45% to inhibit PB2. Ploidy was analyzed by flow cytometry in both D-larvae (of sets with normal larvae in the control group) and surviving spat (only set 2 of those with normal larvae in the control group). For surviving spat, the flow cytometry was done according to Allen (1983) and Allen and Bushek (1992), analyzing each spat individually. The number of spat analyzed was 20 from the control group, 68 from those inhibited in PB1, and 20 from those inhibited in PB2.

Experiment IV was for induction to tetraploidy by inhibiting PB1 in eggs from triploids fertilized with haploid sperm. Out of 144 triploid scallops, 19 were selected for the visual observation of the largest number of eggs in the gonad; 6 of those 19 triploid scallops spawned and their eggs were kept separately. The number of eggs obtained from these triploid scallops was 446,000, 383,000, 536,000, 332,000, 244,000, and 526,000 for scallops 1 to 6, respectively. A sample of fertilized oocytes per individual spawn was kept as a control to establish the time of meiotic events. The rest of the oocytes from each scallop were individually treated with 0.5 mg CB L⁻¹ following Guo and Allen's (1994) methodology to induce to tetraploidy in oysters, with the suggestions given by Eudeline *et al.* (2000) to improve success in tetraploid induction when using eggs from triploids. In short, treatment of the oocytes from each spawned triploid scallop began 5 min post-fertilization and ended when 50–70% of the oocytes in a control group showed extrusion of PB1. The resulting ploidy in all spawns was analyzed by flow cytometry following the procedures described before for D-larva stages. For the surviving pre-adults, haemolymph samples (0.1 to 0.3 mL) were extracted with a 1-mL syringe from the adductor muscle of each scallop obtained from set 5, the only one that produced spat. The haemolymph cells were stained with 1.5 mL of the same DAPI/detergent/DMSO solution mentioned above, allowed to stand for 5 min and assayed by flow cytometry.

Results

Only those sets in which normal larvae occurred in the control group within all the experimental inductions are presented. Abnormal D-larvae were characterized by being rounded rather than having the *D* shape.

presencia del mayor número de huevos en la gónada; 6 de las 19 almejas desovaron. El número de huevos obtenido por almeja triploide fue de 446,000, 382,000, 536,000, 332,000, 244,000 y 526,000 para las almejas 1 a la 6, respectivamente. Los huevos se mantuvieron en forma individual. Cada desove se dividió en dos grupos: una muestra de 1/4 del total para un control que permitiera establecer tiempos de eventos meióticos, y el resto (3/4) de los huevos de cada almeja triploide fueron tratados con 0.5 mg CB L⁻¹, siguiendo la metodología de Guo y Allen (1994) para inducir tetraploidía en ostión, e introduciendo las sugerencias de Eudeline *et al.* (2000) para incrementar el éxito. El tratamiento de los huevos con CB se inició 5 min después de la fertilización, y se concluyó cuando del 50% al 70% de los huevos en el grupo control de ese desove mostraron la extrusión del 1CP. La ploidía resultante en larva-D de los seis desoves inducidos fue analizada como en los otros experimentos. Para aquellos organismos que alcanzaron tallas mayores (preadultos), la ploidía se analizó extrayendo de 0.1 a 0.3 mL de hemolinfa del músculo aductor de cada almeja con una jeringa de 1 mL. La repetición 5 fue la única que produjo semilla y preadultos. Las células obtenidas se tiñeron con 1.5 mL de la misma solución de DAPI/detergente/DMSO ya antes mencionada durante 5 min y se analizaron por citometría de flujo.

Resultados

La inhibición de la IDC resultó en 100% de larva-D anormal, no viable, independientemente del experimento. El uso de desoves individuales en el experimento I no tuvo mayor éxito que cuando se usaron desoves mezclados en el experimento II, en cuanto a la supervivencia a larva-D, cuando se inhibió la IDC. Asimismo, cuando se inhibió el 1CP en ovocitos de diploides, el porcentaje de larva-D anormal fue de 95% a 100%, con una sola excepción en el experimento III en la que se obtuvo solamente un 70% de larva anormal (repetición III.2). La inhibición del 2CP resultó en 50% a 100% de larva-D anormal dependiendo de la repetición. Estas anomalías en la larva-D se manifiestan principalmente por la forma de la concha, la cual se observa con una forma redondeada más que con la forma normal en *D* a la que atribuye su nombre.

En el experimento I, la supervivencia media hasta el estadio larva-D de los huevos inhibidos en la IDC, con relación al control, fue cero. En el experimento II, la supervivencia media de los huevos inhibidos en la IDC, así como en el 1CP fue también nula. En el experimento III la supervivencia media hasta larva-D, con relación al control, fue de 1.3% para los inhibidos en 1CP y de 18.3% para los inhibidos en el 2CP.

Ploidía estimada por citometría de flujo

En larva-D obtenida en los experimentos I a III

La ploidía obtenida en estos experimentos se resume en la tabla 1. La inhibición de la IDC con el propósito de producir

Inhibition of 1CD in eggs from diploids resulted in 100% abnormal and not viable D-larvae, irrespective of whether the induction was done on eggs from an individual spawn or on pooled eggs. As with 1CD, inhibition of PB1 resulted in high percentages (95–100%) of abnormal D-larvae, with a single exception in set 2 of experiment III, for which only 70% abnormal larvae was obtained. Inhibition of PB2 resulted in 50–100% abnormal D-larvae depending on the set.

Average survival (relative to the control group) to D-larvae in experiment I was zero for all eggs induced to inhibit 1CD. In experiment II, there was again zero survival for eggs inhibited in 1CD, but also for those eggs inhibited in PB1. Only experiment III had survivals larger than zero; 1.3% survival (relative to the control) for those inhibited for PB1 and 18.3% for those inhibited for PB2.

Ploidy estimated by flow cytometry

From D-larvae obtained in experiments I to III

The ploidy obtained in these experiments is presented in table 1. Inhibition of 1CD to produce tetraploids was not successful. The most common ploidy resulting from inhibition of 1CD were both diploids and triploids, although for the most part, inhibition of 1CD produced hypo- and hyperploidy in the treated larvae, evidenced by the lack of a definitive ploidy peak after flow cytometry, especially when compared with flow cytometry results observed for control groups. Inhibition of PB1 produced different combinations of ploidy in the resulting progeny (table 1) and was successful in producing tetraploid D-larvae. Besides the production of triploids in variable percentages in all PB1 induced sets, inhibition of PB1 produced tetraploids and pentaploids in three out of five induced spawns. The success in producing triploids by inhibiting PB1 was lower than that achieved by inhibiting PB2.

From spat obtained from experiment III

The ploidy estimated at spat size for the treated group in which PB1 was inhibited was 18% triploids and 82% diploids. No tetraploids were observed at this age, in spite of those observed at D-larva stage. For the treated group in which PB2 was inhibited, the ploidy in spat was 80% triploids and 20% diploids. There were only diploids in the control group.

From D-larvae and adult muscle haemolymph in experiment IV

The resulting ploidy after inhibiting PB1 in eggs from triploids is presented in table 2. Only one of the induced egg batches produced a significant amount (59%) of tetraploids (female 5), with the others resulting in percentages of tetraploids ranging from 10% to 26%. Female spawn 5 produced 6000 D-larvae, of which only 17 reached spat size. Of these spat, only six progenies survived to pre-adult size (2.5 cm). The haemolymph analysis by flow cytometry

Tabla 1. Resultados de la ploidía obtenida en los experimentos I a III para la producción de poliploides de *Argopecten ventricosus* por inhibición del primer y segundo cuerpo polar (1CP y 2CP), y primera división celular (1DC). Se incluye el control y la inhibición del 2CP con fines comparativos entre éste y 1CP. Cada clase de ploidía fue definida estableciendo límites (media de esa ploidía \pm tres desviaciones estándar).

Table 1. Ploidy results from experiments I to III when inducing to tetraploidy from diploids in *Argopecten ventricosus* by inhibition of the first polar body (1CP) and first cellular division (1DC). The second polar body (2CP) was also inhibited in experiment III to compare with ploidy reached by inhibiting the first polar body. The percentage in each ploidy class was defined by establishing gates (ploidy mean \pm three standard deviations).

Experimento y repetición	Tratamiento	Porcentaje de cada clase de ploidía en larva-D			
		Diploide 2N	Triploide 3N	Tetraploide 4N	Pentaploide 5N
I.1	Control	100	0	0	0
	1DC	69	31	0	0
I.2	Control	100	0	0	0
	1DC	44	56	0	0
I.3	Control	100	0	0	0
	1DC	69	31	0	0
II.1	Control	100	0	0	0
	1CP	0	34	44	22
	1DC	43	57	0	0
II.2	Control	100	0	0	0
	1CP	38	33	0	29
	1DC	27	73	0	0
II.3	Control	100	0	0	0
	1DC	32	68	0	0
III.1	Control	100	0	0	0
	1CP	28	43	29	0
	2CP	12	88	0	0
III.2	Control	100	0	0	0
	1CP	56	19	26	0
	2CP	0	100	0	0
III.3	Control	100	0	0	0
	1CP	83	11	0	6

Tabla 2. Resultados de la ploidía obtenida en el experimento IV para inducir a la tetraploidía en *Argopecten ventricosus* por inhibición del primer cuerpo polar en huevos de triploides fertilizados con espermatozoides haploides. Cada clase de ploidía fue definida estableciendo límites (media de la ploidía \pm tres desviaciones estándar).

Table 2. Ploidy results in experiment IV after inducing to tetraploidy in *Argopecten ventricosus* by inhibiting the first polar body in eggs from triploids fertilized with haploid sperm. The percentage in each ploidy class was defined by establishing gates (ploidy mean \pm three standard deviations).

Desove	Porcentaje de larva anormal	Porcentaje de ploidías observadas en larva-D			
		Haploide (1N)	Diploide (2N)	Triploide (3N)	Tetraploide (4N)
1	95	42	34	13	10
2	100	28	29	23	19
3	95	40	31	18	11
4	95	25	25	25	25
5	5	12	13	16	59
6	100	24	25	25	26

tetraploides no tuvo éxito. Al inhibir la IDC, las ploidías resultantes más comunes fueron diploides y triploides aunque, en forma general, la inhibición de la IDC resultó en larva hipo y hiperploide, lo cual se evidenció por la ausencia de un pico de fluorescencia definitivo durante la citometría de flujo, especialmente cuando se compara con los resultados de citometría observados para el grupo control. La inhibición del ICP produjo desde larva diploide hasta pentaploide, habiendo obtenido tetraploides en tres de cinco de los desoves inducidos. Únicamente se observó larva pentaploide cuando se inhibió el ICP. El éxito en la producción de triploides al inhibir el ICP fue menor que el alcanzado al inhibir el 2CP.

En semilla obtenida del experimento III

La ploidía estimada para la semilla superviviente del tratamiento de inhibición del ICP fue de 18% de triploides y 82% de diploides. No se detectaron tetraploides a esta edad, a pesar de los que fueron detectados durante el estadio larva-D. Para la semilla superviviente del tratamiento de inhibición del 2CP, la ploidía fue de 80% de triploides y 20% de diploides. En el grupo control sólo se detectaron diploides.

En larva-D y en la hemolinfa de los adultos producidos en el experimento IV

La ploidía resultante al inhibir el ICP en huevos de triploides se presenta en la tabla 2. Solamente uno de los desoves inducidos (hembra 5) produjo un alto porcentaje de tetraploides (59%), mientras que los otros desoves variaron en el éxito en la producción de tetraploides (10% a 26%). El desove de la hembra 5 produjo 6000 larvas-D, de las cuales solamente 17 llegaron a semilla. De esas semillas, solamente seis almejas sobrevivieron hasta una talla de preadulto (2.5 cm). El análisis de hemolinfa por citometría de flujo de esas seis almejas indicó que cinco eran tetraploides y una era mosaico de diploide-tetraploide. Los análisis de citometría de estas almejas se realizaron en forma repetida, separados por ocho días, encontrándose lo mismo en ambas evaluaciones.

Discusión

Nuestros resultados han demostrado que se puede inducir la tetraploidía en la almeja catarina, *A. ventricosus*, utilizando citocalacina-B para inhibir la liberación del ICP en huevos de almejas diploides y triploides. Sin embargo, de acuerdo con estudios previos desarrollados en otras especies, los tetraploides producidos al inhibir el ICP en diploides no alcanzan a sobrevivir hasta la talla de semilla o adulto, mientras que los producidos por la inhibición del ICP en huevos de triploides son viables hasta tallas adultas. La tecnología para la producción de moluscos tetraploides utilizando este último método fue desarrollada por Guo y Allen (1994) para el ostión japonés, *Crassostrea gigas*, y se ha demostrado que es factible para lograr la producción de larva tetraploide también en otra

indicado that five of the six presumed tetraploid scallops were tetraploid, as indicated by a DNA peak of twice that in the six controls, which were diploid. The fifth scallop in the presumed tetraploid group was a mosaic with cells falling into two DNA peaks, 2n and 4n. These data were checked twice for confirmation, running the cytometry eight days apart.

Discussion

Our results have shown that tetraploidy can be induced in catarina scallop, *A. ventricosus*, using cytochalasin-B to inhibit the release of PB1 in eggs from diploid and triploid scallops. However, as previously found in other species, the tetraploids produced by inhibiting PB1 in diploids are lost or do not survive to spat or adult sizes, whereas those produced by inhibiting PB1 in eggs from triploids were viable to pre-adult sizes. The technology for the production of tetraploid mollusks with this last method was developed by Guo and Allen (1994) working with Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, and it has proven adequate for at least one other species in which it has been tested, the pearl oyster, *Pinctada martensii* (He *et al.*, 2000), and now in this scallop. This technology will allow for the elimination of chemical and physical triploid induction methods in catarina scallop, allowing for the conformation of biological triploids as has been achieved for the Pacific oyster (Guo *et al.*, 1996), reducing the aquaculture impact of high mortalities associated with induction methods and the variable success in the percentage of triploids produced.

The presence of tetraploid mollusk larvae when inhibition of PB1 is done to produce triploids is considered an accidental event, with no probability associated with its occurrence. Therefore, it can happen in one batch of eggs but not in another, but the causes are still not fully understood and further cytological and chromosomal studies are needed. On the other hand, variation in the ploidy obtained between sets can be explained as a possible effect of different meiotic rates for the pooled oocytes. It is known that the meiotic rate is important for success in the production of tetraploids using triploids (Eudeline *et al.*, 2000), but the synchronization of meiotic events among the eggs induced is also important in diploids. Synchronization of meiotic rate depends on gamete quality (Gerard *et al.*, 1999), which in turn depends on the maturation condition of the females used, or even on the method used to induce spawning (Coates and Supan, 2000). The importance of egg quality in polyploid induction was first noted by Utting and Doyou (1992), who demonstrated that the existence of variation in egg quality in Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, can affect the success in triploid induction.

Lack of success in producing tetraploids directly from diploids has been reported for *R. philippinarum* (Diter and Dufy, 1990), *C. gigas* (Guo, 1991, cited by Guo and Allen, 1994; Guo *et al.*, 1994), and *Chlamys azumapekten* (Yang *et al.*, 1997). Guo (1991, cited by Guo and Allen, 1994) proposed that the cause for tetraploids produced directly with eggs from diploids in mollusks that are not viable might be associated

especie, la ostra perlera, *Pinctada martensii* (He *et al.*, 2000). Con el presente estudio se ha demostrado que el uso de esta tecnología es factible en tres especies de moluscos. Su uso permitirá eliminar la dependencia de métodos de inducción (química o física) a la triploidía, permitiendo la conformación de los denominados triploides biológicos de almeja catarina, tal y como se ha logrado para el ostión japonés (Guo *et al.*, 1996), eliminando dos factores de riesgo durante la producción de triploides: alta mortandad por la inducción y bajo éxito en el porcentaje de triploides logrados.

La ocurrencia de tetraploides cuando se inhibe el ICP con el fin de producir triploides (ver introducción) se considera un evento azaroso y, por lo tanto, no es de esperarse la ocurrencia del mismo en todas las inhibiciones del ICP. Para entender este fenómeno son necesarios más estudios a nivel citológico y cromosómico. Por otro lado, las variaciones en ploidía observadas entre las repeticiones de los diferentes experimentos en los que se inhibió el ICP en ovocitos de diploides pueden ser explicadas como un posible efecto de diferencias en las tasas meióticas de los ovocitos utilizados entre repeticiones. El éxito en la inhibición de eventos meióticos depende de la sincronización en el desarrollo de los huevos, la cual depende a su vez de la calidad de los gametos (Gerard *et al.*, 1999). Esto es, se sabe que la tasa meiótica es afectada por la condición de madurez del ovocito utilizado, observándose una asincronía en eventos meióticos entre ovocitos incluso cuando son del mismo origen, pero el método de obtención varía entre las hembras (Coates y Supan, 2000). La importancia de la calidad del huevo en las inducciones a la poliploidía fue denotada primero por Utting y Doyou (1992), quienes demostraron que la existencia de variación en la calidad del huevo de la almeja Manila, *Ruditapes philippinarum*, podía afectar el éxito en obtener la triploidía, y que esto es causado por una falta de sincronía en las tasas meióticas.

En relación con la falta de éxito en la producción de tetraploides directamente de diploides, ésta ha sido reportada para diferentes especies como *R. philippinarum* (Diter y Duffy, 1990), *C. gigas* (Guo, 1991, citado por Guo y Allen, 1994; Guo *et al.*, 1994) y *Chlamys azumapekten* (Yang *et al.*, 1997). Guo (1991, citado por Guo y Allen, 1994) propuso que la causa de la inviabilidad de tetraploides producidos directamente de huevos de diploides puede estar asociada con el tamaño del huevo y con las reservas energéticas existentes para el desarrollo y multiplicación de un cigoto diploide en comparación con un tetraploide, así como también el tamaño del núcleo que no es capaz de permitir la alineación correcta del doble de cromosomas durante la metafase. Esto podría explicar los resultados observados cuando se inhibió la IDC con el fin de producir tetraploides, en donde se observó un desarrollo de larvas anormales que, en su mayor parte, no alcanzaron la talla de semilla. En contraste, cuando se inhibió el ICP en huevos de triploides, los organismos tetraploides producidos si fueron viables, aunque en números reducidos. El tamaño del ovocito de un diploide *vs* el de un triploide de la almeja catarina ha sido documentado previamente para esta especie (Ruiz-Verdugo *et*

with egg size and the energetic reserves in a diploid zygote *vs* a tetraploid zygote to allow for growth, as well as the nucleus size possibly being unable to provide for correct alignment at metaphase. The size of oocytes produced by diploid and triploid catarina scallops has been evaluated previously (Ruiz-Verdugo *et al.*, 2001) and significant differences were found. Those differences could explain the results obtained in the present study, in which lack of success occurred when eggs from diploids were inhibited in IDC to produce tetraploids, but tetraploids were successfully produced when eggs from triploids were used by inhibiting PBI. Diploid catarina scallops produce oocytes with a mean diameter of 38 μm , whereas triploids produce oocytes with an average diameter of 43 μm . This difference translates into oocytes in triploids having a 55% larger cell volume than diploids, possibly with larger energetic reserves, but also triploids have a 109% larger nucleus volume than diploids, which would allow for a larger metaphase area for chromosomes to align.

In conclusion, these results corroborate previous observations on mollusks with regard to the production of tetraploids not being feasible directly from diploids, and provide additional support to Guo and Allen's (1994) methodology to produce tetraploids from triploids, indicating that further efforts to produce tetraploid mollusk should center on this last methodology.

Acknowledgements

This research was supported by CONACYT grant 28256-B to A.M. Ibarra. We thank Susana Avila for support in the cytometry analyses. We also thank Gabriel González and Juan M. Macliz for technical support during larval rearing. The first author is a CONACYT and SEP (DECYTM) Ph.D. fellow, and the results presented here are part of his thesis.

English translation by the authors.

al., 2001). El diploide presenta un ovocito de aproximadamente 38 μm de diámetro, mientras que el diámetro del ovocito del triploide es mayor, de 43 μm . Estas diferencias se traducen en que el ovocito del triploide tiene un volumen 55% mayor que el de un diploide, lo cual posiblemente resulta en una mayor cantidad de reservas energéticas. Más aun, el tamaño del núcleo de un ovocito de triploide es 109% mayor que el de un diploide, lo cual permitiría la alineación de todos los cromosomas durante la metafase.

En conclusión, nuestros resultados reafirman las observaciones previas de otros autores acerca de la producción de tetraploides en moluscos, la cual no es factible a partir de diploides, así como también corroboran la factibilidad de la metodología desarrollada por Guo y Allen (1994) para la producción de tetraploides a partir de triploides, indicando con ello que los esfuerzos futuros dirigidos a la producción de tetraploides en moluscos deberán centrarse en esa metodología.

Agradecimientos

Esta investigación fue apoyada por CONACYT, al proyecto 28256-B de A.M. Ibarra. Agradecemos el apoyo de Susana Ávila en los análisis de citometría de flujo, y el apoyo técnico de Gabriel González y Juan M. Macliz durante el cultivo larvario. El primer autor es estudiante de doctorado, becado por CONACYT y SEP (DECYTM), y los resultados presentados son parte de su tesis.

Referencias

- Allen, S.K. Jr. and Downing, S.L. (1986). Performance of triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg). I. Survival, growth, glycogen content, and sexual maturation in yearlings. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 102: 197–208.
- Allen, S.K. Jr. and Bushek, D. (1992). Large-scale production of triploid *Crassostrea virginica* (Gmelin) using “stripped” gametes. *Aquaculture*, 103: 241–251.
- Allen, S.K. Jr., Downing, S.L. and Chew, K.K. (1989). Hatchery manual for producing triploid oyster. Univ. Washington Press, 27 pp.
- Allen, S.K., Jr., Shpigel, M., Utting, S. and Spencer, B. (1994). Incidental production of tetraploid Manila clams, *Tapes philippinarum* (Addams and Reeve). *Aquaculture*, 128: 13–19.
- Cai, G. and Beaumont, R. (1996). Tetraploid induction in the mussel *Mytilus edulis* by application of 6-dimethylaminopurine (6-DMAP) during early development. *Tropic Oceanology/Redai Haiyang*, 15: 26–30.
- Coates, G.M. and Supan, J.E. (2000). Potential triploid production of oysters using second metaphase oocytes. *J. Shellfish Res.*, 19(1): 662.
- Cooper, K. and Guo, X. (1989). Polyploid Pacific oyster produced by inhibiting polar body I and II with cytochalasin B. *J. Shellfish Res.*, 8(2): 412 (abstract only).
- Diter, A. and Dufy, C. (1990). Polyploidy in the Manila clam *Ruditapes philippinarum*. II. Chemical induction of tetraploid embryos. *Aquat. Living Resour.*, 3: 107–112.
- Eudeline, B., Allen, S.K. Jr. and Guo, X. (2000). Optimization of tetraploid induction in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, using first polar body as a natural indicator. *Aquaculture*, 187: 73–84.
- Gardner, E.J., Simmons, M.J. y Snustad, D.P. (1998). Principios de Genética. 4ta ed. Noriega-Utea editores, México, D.F., 649 pp.
- Gendreau, S. and Grizel, H. (1990). Induced triploidy and tetraploidy in the European flat oyster *Ostrea edulis* L. *Aquaculture*, 90: 229–238.
- Gérard, A., Ledu, C., Phélipot, P. and Naciri-Graven, Y. (1999). The induction of MI and MII triploids in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* with 6-DMAP or CB. *Aquaculture*, 174: 229–242.
- Guo, X. and Allen, S.K. Jr. (1994). Viable tetraploids in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg) produced by inhibiting polar body I in eggs from triploids. *Mol. Mar. Biol. Biotech.*, 3: 42–50.
- Guo, X., Cooper, K., Hershberger, W. and Chew, K. (1992). Genetic consequences of blocking polar body I with cytochalasin B in fertilized eggs of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. I. Ploidy of resultant embryos. *Biol. Bull.*, 183: 381–386.
- Guo, X., Hershberger, W.K., Cooper, K. and Chew, K.K. (1994). Tetraploid induction with mitosis I inhibition and cell fusion in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg). *J. Shellfish Res.*, 13(1): 193–198.
- Guo, X., DeBrosse, G.A. and Allen, S.K. Jr. (1996). All-triploid Pacific oysters (*Crassostrea gigas* Thunberg) produced by mating tetraploids and diploids. *Aquaculture*, 142: 149–161.
- He, M., Lin, Y., Shen, Q., Hu, J. and Jiang, W. (2000). Production of tetraploid pearl oyster (*Pinctada martensii* Dunker) by inhibiting the first polar body in eggs from triploids. *J. Shellfish Res.*, 19: 147–151.
- Klug, W.S. and Cummings, M.R. (1996). Essentials of Genetics. 2nd ed. Prentice Hall, New Jersey, 559 pp.
- Norstog, K. and Long, R.W. (1976). Plant Biology. W.B. Saunders, Philadelphia, 585 pp.
- Ramírez, J.L., Avila, S. and Ibarra, A.M. (1999). Optimization of forage in two food-filtering organisms with the use of a continuous, low-food concentration, agricultural drip system. *Aquacult. Eng.*, 20: 175–189.
- Ruiz-Verdugo, C.A., Ramírez, J.L., Allen, S.K. Jr. and Ibarra, A.M. (2000). Triploid catarina scallop (*Argopecten ventricosus* Sowerby II, 1842): Growth, gametogenesis, and suppression of functional hermaphroditism. *Aquaculture*, 186: 13–32.
- Ruiz-Verdugo, C.A., Allen, S.K. Jr. and Ibarra, A.M. (2001). Family differences in success of triploid induction and effects of triploidy on fecundity of catarina scallop (*Argopecten ventricosus*). *Aquaculture*, 201: 19–33.
- Sastry, A.N. (1963). Reproduction of the bay scallop, *Aequipecten irradians* Lamarck. Influence of temperature on maturation and spawning. *Biol. Bull.*, 125: 146–153.
- Scarpa, J., Wada, K.T. and Komaru, A. (1993). Induction of tetraploidy in mussels by suppression of polar body formation. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 59: 2017–2023.
- Stephens, L.B. and Downing, S.L. (1988). Inhibiting first polar body formation in *Crassostrea gigas* produces tetraploids, not meiotic I triploids. *J. Shellfish Res.*, 7: 550–551.
- Tamarin, R.H. (1999). Principles of Genetics. 6th ed. WCB McGraw-Hill, New York, 686 pp.
- Utting, S.D. and Doyou, J. (1992). The increased utilization of egg lipid reserves following induction of triploidy in the Manila clam (*Tapes philippinarum*). *Aquaculture*, 103: 17–28.
- Yang, H., Wang, R., Guo, X. and Yu, Y. (1997). Tetraploid induction with cytochalasin B treatment in scallop *Chlamys azumapekten* F. 11th International Pectinid Workshop, La Paz, BCS, Mexico, 10 to 15 April 1997. Book of Abstracts, pp. 187–188.
- Yang, H., Zhang, F. and Guo, X. (2000). Triploid and tetraploid zhihong scallop, *Chlamys farreri* Jones et Preston, produced by inhibiting polar body I. *Mar. Biotechnol.*, 2: 466–475.
- Zhang, G., Wang, Z., Chang, Y., Song, J., Ding, J., Zhao, S. and Guo, X. (2000). Tetraploid induction in the Pacific abalone *Haliotis discus hannai* Ino with 6-DMAP and CB. *J. Shellfish Res.*, 19: 540–541.