



**INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS**



**“EFECTO DE LA TEMPERATURA
SOBRE LA GAMETOGÉNESIS EN
EL CALLO DE HACHA
Atrina maura(Sowerby, 1835)
(BIVALVIA: PINNIDAE)”**

TESIS

Que para obtener el grado de

**MAESTRO EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN CIENCIAS MARINAS
Departamento de Pesquerías y Biología Marina**

PRESENTA

Ma. del Carmen Rodríguez Jaramillo

La Paz, Baja California Sur, 2004



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
COORDINACION GENERAL DE POSGRADO E INVESTIGACION
ACTA DE REVISION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., siendo las 10:00 horas del día 23 del mes de Marzo del 2004 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICIMAR para examinar la tesis de grado titulada:

“EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA GAMETOGÉNESIS EN EL CALLO DE HACHA
***Atrina maura* (SOWERBY, 1835) (BIVALVIA: PINNIDAE)”**

Presentada por el alumno:

RODRÍGUEZ
Apellido paterno

JARAMILLO
materno

MARIA DEL CARMEN
nombre(s)

Con registro:

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 9 | 1 | 0 | 3 | 0 | 6 |
|---|---|---|---|---|---|

Aspirante al grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN CIENCIAS MARINAS

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA

Director de tesis
PRIMER VOCAL

DR. ALFONSO N. MAEDA MARTINEZ

PRESIDENTE

DR. OSCAR E. HÓLGUIN QUIÑONES

SECRETARIO

DR. FEDERICO ANDRÉS GARCÍA DOMÍNGUEZ
Co-Director

SEGUNDO VOCAL

MC. ARTURO TRIPP QUEZADA

TERCER VOCAL

MC. MARÍA TERESA SICARD

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO

DR. FRANCISCO ARREGUÍN SÁNCHEZ



L. P. N.
CICIMAR
DIRECCION

DEDICATORIA

A LA MEMORIA DE MI PADRE Rafael Rodríguez Aguilera †

Por el cariño y apoyo que siempre me diste, por infundir en mí la confianza y tenacidad que me ha sacado adelante en la vida por estar siempre a mi lado... gracias papá.

A MI MADRE Adelina Jaramillo Roaro

Por el amor, el ejemplo y el apoyo incondicional que toda la vida me has dado, por brindarme siempre lo mejor de ti. El poder de tu fe es grandioso, gracias por tus oraciones que me acompañan en todo momento... gracias mamá

A MI ESPOSO Francisco Javier Encarnación Ramírez

Por todo tu amor y comprensión, eres mi fortaleza en los momentos difíciles y un gran compañero en los momentos felices. Tu presencia en mi vida ha sido determinante en el logro de esta meta y espero retribuirte de la misma forma en el logro de las tuyas.

A MIS HIJAS Alejandra, Ángela y Galilea

Por ser mi más importante razón de existir, gracias por su amor, por disculpar tantas ausencias. Alex, gracias por cuidar de mis chiquitas, la ayuda que me has dado es invaluable, esta tesis es por ustedes, son el principal motivo para terminar lo que emprendimos tú y yo juntas hace tantos años, eres la estrella que llego a mi vida y que trajo consigo la realización de tantos sueños....

A MIS HERMANOS Guadalupe, Mónica y Manuel

A mi hermana Lupe, a quien le debo la lección de vida más valiosa que nadie me pudo haber dado, gracias por brindarme la oportunidad de estudiar una carrera, gracias a tu apoyo y sacrificio lo he logrado. A Moni, por tu dulce cariño y ayuda en los momentos más difíciles. A Manuel, por tus palabras de aliento que siempre recuerdo y que llevo en el alma, por que un día depositaste en mí tu confianza y compartiste por un instante, ese gran dolor que llevas dentro.

A MI TÍO Joel por el ser el mejor ejemplo en mi vida.

A LA FAMILIA ENCARNACION RAMIREZ Ma. de Jesús, Antonio, Silvia, Sonia, Alfredo y David. Mi familia de La Paz, por cuidar de mis hijas durante la realización de esta tesis, especialmente a mi suegra.

A LA FAMILIA NUÑEZ GUERRERO Edna, Lorenzo, Loredana, Roció y Adat

Por cuidar de Alex durante los cursos de la Maestría, gracias por todo el apoyo y cariño que nos dieron cuando más lo necesitábamos.

A MIS AMIGOS quienes me han brindado su valiosa amistad ... por los viejos tiempos que nunca olvidaré... a Silvia, Juan Gabriel, Daniel, Javier, Esperanza, Jorge Arturo, Rox, Juan Carlos, David, Leopoldo y tantos más. Por todo lo que he aprendido de ustedes y por los momentos que hemos compartido... Faby, Cony, Elena, Hortencia, Tere, Lucely, Liliana, Alejandra, Lucía, Eulalia, Ana Isabel, Cesar, Miguel, Pedro, Paty, José, Hervey, Rosy, Laura, Norma, Brenda, Vero, ... y a todos los demás compañeros y estudiantes del CIBNOR con quienes he convivido y de los que he aprendido tantas cosas....

A TODOS MIS FAMILIARES DE CELAYA

A MI FAMILIA DE MONTERREY QUE TANTO EXTRAÑO

A LA FAMILIA LEON MARTINEZ DE CELAYA

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer de manera muy especial al Dr. Alfonso N. Maeda Martínez, director del presente trabajo, por su asesoría y compromiso, por confiar en mí, pero sobre todo, por no dejar de insistir en que terminara este trabajo y por brindarme su apoyo desde el primer día que me conoció... GRACIAS!

Al Dr. Federico García Domínguez, co-director de esta tesis por sus valiosas sugerencias y asesoría, por su paciencia y buena disposición.

A mi comité de revisión de tesis, M. en C. María Teresa Sicard, Dr. Oscar Holguín Quiñones y M. en C. Arturo Tripp Quezada, por sus acertados comentarios y valiosas observaciones al manuscrito.

El presente trabajo se realizó gracias al apoyo de los proyectos CONACYT 1775P-B y G33593-B dirigidos por el Dr. Alfonso N. Maeda Martínez.

A la Dra. Fabiola Arcos, a quien tengo mucho que agradecerle y no se por donde empezar...por brindarme incondicionalmente su asesoría, por sus valiosos comentarios que enriquecieron este trabajo y por motivarme a seguir adelante.

Al Dr. Cesar Ruiz Verdugo y al Ocean. Miguel Robles por donar los reproductores del medio natural.

Al Instituto Politécnico Nacional (IPN), en particular al Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, por el apoyo brindado durante mi formación.

Al Programa Institucional de Formación de Investigadores (PIFI), por el soporte económico brindado durante la realización de los créditos de maestría.

A todo el personal del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste que me ayudaron en la realización de esta tesis. Especialmente mi agradecimiento para los M. en C. Ma. Teresa Sicard, Pablo Monsalvo Spencer y Daniel Prado Ancona, al Ocean. Miguel Robles, al Biol. Teodoro Reynoso, a los D.G. Gerardo Hernández, Adriana Landa y a los Lic. Edgar Yuen y Rubí Romero.

A la Dirección de Apoyo Técnico y a los Investigadores usuarios del Laboratorio de Histología por darme la oportunidad de terminar esta tesis.

INDICE

| | Página |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| LISTA DE FIGURAS | I |
| LISTA DE TABLAS | III |
| GLOSARIO | V |
| RESUMEN | IX |
| ABSTRACT | XI |
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 2. ANTECEDENTES | 8 |
| 2.1 POSICIÓN TAXONÓMICA | 11 |
| 2.2 DIAGNOSIS BIOLÓGICA | 11 |
| 3. JUSTIFICACIÓN | 14 |
| 4. HIPÓTESIS | 16 |
| 5. OBJETIVOS | 16 |
| 6. METODOLOGÍA | 18 |
| 6.1. Origen de los reproductores..... | 18 |
| 6.2. Gametogénesis de <i>Atrina maura</i> a 3 temperaturas..... | 18 |
| 6.3. Análisis histológico e histoquímico..... | 20 |
| 6.3.1. Validación del método histoquímico Sudán Negro B..... | 20 |
| 6.4. Análisis cualitativos y cuantitativos..... | 21 |
| 6.4.1. Índice lipídico..... | 23 |
| 6.4.2. Diámetro teórico..... | 23 |
| 6.4.3. Relación núcleo / citoplasma..... | 23 |
| 6.4.4. Análisis estadísticos..... | |
| 6.5. Calidad ovocitaria comparativa de reproductores de <i>Atrina maura</i> madurados en el medio natural y en el laboratorio, en el momento del desove..... | 24 |
| 6.5.1. Hembras del medio natural..... | 24 |
| 6.5.2. Hembras del laboratorio..... | 24 |
| 6.5.3. Histología e histoquímica de las hembras en desove..... | 25 |
| 6.5.4. Análisis estadístico de la calidad ovocitaria de hembras en desove..... | 26 |
| 7. RESULTADOS | 27 |
| 7.1. Validación del método histológico..... | 27 |
| 7.1.1. Tinción de triglicéridos y fosfolípidos por la técnica Sudán Negro B y cuantificación por análisis de imágenes..... | 27 |
| 7.2. Efecto de la temperatura en la inducción a la gametogénesis en el hacha <i>Atrina maura</i> | 29 |
| 7.2.1. Área de ovocitos..... | 29 |
| 7.2.2. Diámetro teórico..... | 33 |

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 7.2.3. Índice lipídico..... | 33 |
| 7.2.4. Relación núcleo/citoplasma..... | 35 |
| 7.2.5. Análisis integral..... | 35 |
| 7.2.5.1. Temperatura..... | 35 |
| 7.2.5.2 Tiempo..... | 36 |
| 7.3. Frecuencia de las categorías ovocitarias..... | 37 |
| 7.4. Análisis morfométrico y de calidad de ovocitos posvitelogénicos y atrésicos inducidos a la gametogénesis a tres temepaturas y tres fechas de muestreo..... | 39 |
| 7.4.1. Efecto de la temperatura sobre el diámetro teórico de los ovocitos posvitélogenicos..... | 40 |
| 7.4.2. Efecto de la temperatura sobre el Índice lipídico de los ovocitos posvitelogénicos | 40 |
| 7.5. Análisis comparativo de los ovocitos en proceso de desove, provenientes de hembras maduradas en el laboratorio y en el medio natural..... | 42 |
| 7.5.1. Descripción del desove..... | 42 |
| 7.5.2. Análisis morfométricos y de calidad de ovocitos provenientes de hembras maduradas en el laboratorio vs. medio natural..... | 43 |
| 7.5.3. Frecuencia de las categorías ovocitarias en hembras en proceso de desove maduradas en el laboratorio y en el medio natural..... | 44 |
| 7.5.4. Índice lipídico por categoría ovocitaria en ovocitos en desove..... | 46 |
| 8. DISCUSIÓN..... | 48 |
| 9. CONCLUSIONES..... | 56 |
| 10. RECOMENDACIONES..... | 58 |
| 11. LITERATURA CITADA..... | 59 |
| 12. ANEXOS..... | 71 |

LISTA DE FIGURAS

| | Página |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| Figura 1. Producción de callo de hacha en el período de 1985-1995. Tomado de Vélez-Barajas y Fajardo-León (1996). | 2 |
| Figura 2. Micrografía de ovario de <i>Atrina maura</i> . Corte por congelación a 10 μm de grosor teñido con Rojo Oleoso. Se observan los ovocitos posvitelogénicos (op), el núcleo (n) y los gránulos de lípidos (gl). 400X. Barra = 50 μm . | 7 |
| Figura 3. Sistema empleado para la para la inducción a la gametogénesis de <i>Atrina maura</i> , a 20, 25 y 30°C durante 43 días. | 19 |
| Figura 4. Efecto del tratamiento de extracción de lípidos por medio de cloroformo-metanol en una gónada femenina de <i>Atrina maura</i> inducida a la gametogénesis a 25°C durante 30 días. A) Corte tratado con cloroformo-metanol. Fosfolípidos (f) y B) Corte control sin tratamiento. Triglicéridos (t). Tinción SNB. 600 X = 25 μm . | 28 |
| Figura 5. Micrografías de cortes histológicos de las gónadas de <i>Atrina maura</i> inducidas a la gametogénesis durante 43 días a 20°C (A), 25°C (B), y 30°C (C). Ovocitos vitelogénicos (ov), ovocitos atrésicos (ova), núcleo (n), nucléolos (nc), triglicéridos (t). 400X. Tinción SNB. Barra = 50 μm . | 30 |
| Figura 6. Área de los ovocitos (μm^2) de <i>Atrina maura</i> durante 43 días de inducción a la gametogénesis a tres temperaturas en el laboratorio. Los valores son la media \pm el error estándar. $n=120$. | 32 |
| Figura 7. Diámetro teórico (μm) de los ovocitos de <i>Atrina maura</i> durante 43 días de inducción a la gametogénesis a tres temperaturas en el laboratorio. Los valores son la media \pm el error estándar. $n=120$. | 32 |
| Figura 8. Índice lipídico de ovocitos de <i>Atrina maura</i> durante 43 días de inducción a la gametogénesis a tres temperaturas en el laboratorio. Los valores son la media \pm el error estándar. $n=120$. | 34 |

| | | |
|------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 9. | Relación núcleo / citoplasma de los ovocitos de <i>Atrina maura</i> durante 43 días de inducción a la gametogénesis a tres temperaturas en el laboratorio. Los valores son la media \pm el error estándar. $n=120$. | 34 |
| Figura 10. | Frecuencia de las categorías ovocitarias presentes en las gónadas de <i>Atrina maura</i> inducidas a la gametogénesis a 20, 25 y 30°C, durante 15 (a), 30 (b) y 43(c) días. | 38 |
| Figura 11. | Diámetro teórico de los ovocitos posvitelogénicos a las tres temperaturas de inducción a la gametogénesis, independientemente de la fecha de muestreo. | 41 |
| Figura 12. | Índice lipídico de los ovocitos posvitelogénicos de <i>Atrina maura</i> inducidos a la gametogénesis a tres temperaturas a los 15, 30 y 43 días de muestreo. | 41 |
| Figura 13. | Micrografía de gónada de <i>Atrina maura</i> en proceso de desove madurada a 30°C durante 43 días. Tinción Hematoxilina-eosina. Se aprecian ovocitos con la vesícula germinal rota (VGR), células auxiliares (ca) libres de la pared del acino y ovocitos vitelogénicos (ov). 100X. Barra = 200 μ m. Tinción Hematoxilina-eosina. | 43 |
| Figura 14. | Micrografía de ovocitos de gónada de <i>Atrina maura</i> en proceso de desove. A) Hembra madurada en el laboratorio a 30°C durante 43 días. B) Hembra del medio natural. Ovocitos normales (on), ovocitos inmaduros (oi), ovocitos atrésicos (oa). 400X. Barra = 50 μ m. Tinción Sudán Negro B. | 45 |
| Figura 15. | Frecuencia de las categorías ovocitarias de <i>Atrina maura</i> en proceso de desove, maduras en el laboratorio a 30°C durante 43 días y en el medio natural. | 46 |

LISTA DE TABLAS

| | Página |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| Tabla 1. Efecto del tratamiento de extracción de lípidos mediante cloroformo-metanol sobre las variables área del ovocito, diámetro teórico, índice lipídico (triglicéridos), índice de lípidos polares (fosfolípidos) y la relación núcleo/citoplasma de una gónada de <i>Atrina maura</i> inducida a la gametogénesis a 25°C durante 30 días. $n = 30$. | 28 |
| Tabla 2. Área de los ovocitos (μm^2) de <i>Atrina maura</i> inducidos a la gametogénesis durante 15, 30 y 43 días a tres temperaturas. Los valores son la media \pm el error estándar. $n = 120$. | 31 |
| Tabla 3. Diámetro teórico (μm) de los ovocitos de <i>Atrina maura</i> inducidos a la gametogénesis durante 15, 30 y 43 días a tres temperaturas. Los valores son la media \pm el error estándar. $n = 120$. | 31 |
| Tabla 4. Índice lipídico de los ovocitos de <i>Atrina maura</i> inducidos a la gametogénesis durante 15, 30 y 43 días a tres temperaturas. Los valores son la media \pm el error estándar. $n = 120$. | 31 |
| Tabla 5. Relación núcleo/citoplasma de los ovocitos de <i>Atrina maura</i> inducidos a la gametogénesis durante 15, 30 y 43 días a tres temperaturas. Los valores son la media \pm el error estándar. $n = 120$. | 31 |
| Tabla 6. Efecto de la temperatura sobre las variables morfométricas y de calidad ovocitaria de <i>Atrina maura</i> . Los valores son la media \pm el error estándar. $n = 120$. | 36 |
| Tabla 7. Efecto del tiempo de inducción a la gametogénesis sobre las variables morfométricas y de calidad ovocitaria de <i>Atrina maura</i> , independientemente de la temperatura. Los valores son la media \pm el error estándar. $n = 120$. | 36 |
| Tabla 8. Variables morfométricas y de calidad de ovocitos posvitelogénicos (inmaduros y normales) y atrésicos. Los valores son la media \pm el error estándar. $n = 120$. | 40 |

| | | |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabla 9. | Diámetro teórico e índice lipídico de ovocitos en proceso de desove, madurados en el laboratorio y en el medio natural, independientemente de su categoría ovocitaria. Los valores son la media \pm el error estándar. $n = 300$. | 44 |
| Tabla10. | Índice lipídico de ovocitos en proceso de desove en las diferentes categorías ovocitarias, independientemente del origen de las hembras. Los valores son la media \pm el error estándar. $n=300$. | 47 |
| Tabla 11. | Comparación de las categorías ovocitarias de las hembras en proceso de desove (laboratorio y medio natural). ($P < 0.05$). | 47 |

GLOSARIO

Acinos: Aplicado en glándulas, son unidades estructurales de forma redondeada que forman las gónadas en donde se desarrollan los gametos, cuyas paredes están formadas por tejido germinal.

Atresias: Células en degeneración estructural y/o de reservas energéticas. Normalmente ocurre en gametos femeninos en etapas de vitelogénesis avanzadas, aunque puede ocurrir en previtelogénesis. Las células foliculares adquieren propiedades fagocitarias, reabsorbiendo al ovocito.

Análisis de imágenes: Método que permite mediante la integración automatizada de dispositivos electrónicos y digitales, visualizar, coleccionar y analizar los atributos de las imágenes de forma cualitativa y cuantitativa.

Bivalvos: Comprende a los moluscos que tienen dos valvas articuladas e incluye formas como las almejas, ostiones, mejillones y hachas, etc.

Gonocórico: Relativo a organismos del reino animal en los cuales los órganos reproductores femeninos y masculinos se encuentran en diferentes individuos.

Fotoperíodo: Duración relativa de los períodos de luz y oscuridad (horas / luz) al que están expuestos los organismos.

Gametos: Células sexuales que pertenecen a la estirpe germinal. Tienen una evolución propia que conducirá a la forma haploide gracias a la reducción cromosómica o meiosis. Su finalidad es el fenómeno de la

fecundación, que realiza la fusión de dos gametos, reestableciendo así la diploidía.

Gametogénesis: Se denomina así al proceso de formación de gametos o células sexuales femeninas y masculinas partir de las células del epitelio germinal.

Hermafroditismo: Tipo de reproducción sexual que presentan algunos organismos que poseen gametos femeninos y masculinos. En moluscos hermafroditismo funcional o ambisexualidad funcional, sexualidad consecutiva, sexualidad consecutiva rítmica y sexualidad alternativa.

Hermafroditismo protogínico: Tipo de reproducción sexual en el cual algunos individuos de la población maduran por primera vez como hembras y posteriormente se transforman en machos (hermafroditismo consecutivo).

Hermafroditismo protándrico: Tipo de reproducción sexual en el cual algunos individuos de la población maduran por primera vez como machos y posteriormente se transforman en hembras.

Histoquímica: Métodos que tienen por objeto localizar sustancias químicas conocidas en las células y los tejidos.

Índice lipídico: Indicador cuantitativo del contenido de triglicéridos o fosfolípidos en un ovocito.

Núcleoplasma: Núcleo de los gametos femeninos en el cual se encuentra el DNA y los nucléolos, contenidos por la vesícula germinal.

Sudán Negro B: Colorante o sustancia “lisocroma” capaz de teñir los constituyentes celulares disolviéndose en ellos, utilizado para la detección de lípidos, tiñe diferencialmente fosfolípidos de color gris y triglicéridos de azul a negro.

Oviducto: Conducto genital que forma la vía de paso de los óvulos originados en los ovarios o gónadas femeninas, que son evacuados hacia el exterior del organismo en el momento del desove.

Ovocito: Gameto o célula sexual femenina en desarrollo que se diferencia durante la ovogénesis.

Ovogénesis: Proceso de formación de gametos femeninos u óvulos, que se producen en las gónadas femeninas.

Ovogonia: Célula sexual femenina que prolifera del epitelio germinal, se multiplica por mitosis y se diferencian en óvulos durante la ovogénesis.

Ovoplasma: Matriz citoplasmática en la cual se encuentran los organelos y las inclusiones que se forman durante la vitelogénesis

Píxel: Señal digital resultado de la transformación de fotodos que liberan una carga a través de un dispositivo. El Dispositivo de Acoplamiento de Cargas o CCD, es una matriz de elementos de imagen, cuya unidad es el píxel, la cual registra diversas intensidades de luz, que es captada como energía lumínica obtenida mediante la transformación de un fotón en una carga eléctrica.

Profase: Etapa del ciclo celular tanto de la mitosis como de la meiosis (formas de división celular), en la meiosis se inicia a nivel del joven ovocito I y permanece bloqueada en el estadio de diploteno. El núcleo aumenta considerablemente de tamaño.

Relación núcleo /citoplasma: Progresión geométrica expresada de la siguiente forma: Área del núcleo / Área del citoplasma.

Vesícula germinal: Nombre que adquiere el núcleo que se encuentra inicialmente en el centro del ovocito. Este se rompe, y entonces el nucleoplasma se extiende por el ovoplasma durante la metafase.

RESUMEN

El presente estudio se realizó para comparar las variables morfológicas y de calidad de los ovocitos de hembras de *Atrina maura* inducidas a la gametogénesis a tres temperaturas (20, 25 Y 30°C) en condiciones del laboratorio. Por otra parte se realizó un análisis comparativo entre ovocitos de hembras maduras e inducidas al desove en el laboratorio, y hembras obtenidas del medio natural durante la temporada de desove. El desarrollo de los gametos femeninos fue evaluado en cortes teñidos con técnicas histológicas e histoquímicas (Hematoxilina-eosina y Sudán Negro B), examinados mediante el uso de análisis de imágenes. Se desarrolló la metodología para la obtención de un índice lipídico (IL) para indicar la cantidad de triglicéridos de cada ovocito, el cual se comparó contra otras variables como el área (AO), diámetro teórico (DT), y la relación núcleo / citoplasma (N/C) de los ovocitos, así mismo se clasificaron de acuerdo con el grado de desarrollo gametogénico en ovogonias, ovocitos previtelogénicos, vitelogénicos, maduros (posvitelogénicos) y atrésicos. La frecuencia de estos gametos fue estimada en tres regiones del ovario, contando el número de ovocitos presentes en un área predeterminada. El análisis comparativo de las variables medidas a las tres temperaturas mostró diferencias significativas, observando que la temperatura influye tanto en la talla de los ovocitos como en la cantidad de triglicéridos (IL). A la

temperatura de 20 °C se observaron ovocitos de mayor talla y con mayor IL. Los ovocitos atrésicos fueron más abundantes a las temperaturas de 25 y 30°C, así como en el desove de la hembra de campo. El análisis de las hembras en desove mostró la existencia de diferencias significativas en el contenido de lípidos de ovocitos normales, inmaduros y atrésicos de las hembras de laboratorio y campo. El IL de ovocitos de hembras del medio natural en desove fue más heterogéneo que el de las hembras maduradas en el laboratorio.

Se estandarizó y validó la técnica de Sudán Negro B para la cuantificación de triglicéridos con el sistema de análisis de imágenes Image Pro Plus.

ABSTRACT

This study compared morphometric and oocyte quality variables of females of *Atrina maura* induced to gametogenesis at three temperatures (20, 25 and 30°C) under laboratory conditions. In addition a comparison was made between the quality of these oocytes with those obtained from broodstock individuals brought directly from the field during the spawning season. Oocyte development was evaluated using histological and histochemical techniques (Hematoxylin-eosin and Black Sudan B) and the preparations were digitalized and later studied with an image analyzer. The oocytes were classified according to their gametogenic developmental stage (oogonia, previtelogenic, mature and atresia (reabsorption)). The frequency of oocytes in each stage was estimated, counting the number of oocytes appearing in a predetermined test area. A methodology to obtain a lipid index (LI) for each oocyte was developed, which was compared with other variables such as the oocyte theoretical diameter (TD), oocyte area (OA) and nucleus/cytoplasm ratio (N/C). Results show significant differences between LI at different temperatures. The analysis of each spawn showed significant differences in the lipid content of normal, immature and atretic oocytes from the field than in oocytes from broodstock matured in the hatchery. LI of oocytes from wild females was more heterogeneous than from females matured in laboratory. The comparative analysis of variables measured in oocytes at the three temperatures showed significant differences and we observed the influence of the temperature in both oocyte size and in the oocyte triglyceride content (LI as an index of quality), and the temperature of 20°C was that which induced the major size oocytes and major LI. The atretic oocytes were more abundant at the temperatures of 25 and 30 °C, as well as in wild females spawns. The quantification of triglycerides

oocyte per oocyte was standardized with the image analysis system Image Pro Plus.

1. INTRODUCCIÓN

Hasta hace tres décadas las actividades pesqueras en México se desarrollaban con un gran interés por los moluscos bivalvos debido a sus cualidades gastronómicas, su gran abundancia y fácil accesibilidad, (Holguín-Quiñones y González-Pedraza, 1994). Entre los moluscos, una de las pesquerías que tiene más impulso en México, es la de los bivalvos de la familia Pinnidae, cuyas especies son conocidas comúnmente como "hachas". Actualmente su extracción se lleva a cabo en los estados de Baja California Sur, Sonora y Sinaloa, y aunque en los estados del sur del país la explotación es menor, no deja de ser significativa en Michoacán, Jalisco, Guerrero y Oaxaca (Atlas Pesquero de México, 1994).

En los litorales del Pacífico Mexicano se encuentran cinco especies de esta familia. En el Golfo de California se distribuyen *Atrina maura* (Sowerby, 1835), localmente conocida como hacha china o hacha de riñón, *Atrina tuberculosa* llamada hacha espinosa o botijona (Sowerby, 1835) y *Pinna rugosa* (Sowerby, 1835) conocida como hacha larga. Dos especies más se encuentran en la costa oeste de la Península de Baja California: el hacha negra o lisa *Atrina oldroydii* (Sowerby, 1835), se distribuye desde el Sur de California a Bahía Magdalena, y *Atrina texta* (Sowerby, 1835) desde Banco Gorda frente al extremo de la Península de B.C. hasta Islas Galápagos (Keen, 1971).

La pesquería de callo de hacha en el estado de Baja California Sur, está constituida por tres especies; *Pinna rugosa*, *Atrina maura* y *Atrina oldroydii*. Representa aproximadamente el 20% de la captura de hachas a nivel nacional (Vélez-Barajas y Fajardo-León, 1996).

La parte del organismo que se comercializa es el músculo aductor posterior llamado "callo", que tiene una amplia demanda y precios altos en el mercado, llegando a alcanzar entre 12.8 y 15.7 dólares norteamericanos por kilogramo en 1996 (Vélez-Barajas y Fajardo-León,

1996). En 2002 alcanzó precios de 12 a 18 dólares al adquirirlo en la playa directamente con el pescador, aunque en el mercado sobrepasa los 25 dólares (González-Corona, 2003). Se comercializa principalmente en los estados de Sinaloa, Sonora, Baja California, Baja California Sur y en las grandes ciudades del interior como México, D. F., Guadalajara y Monterrey (Vélez-Barajas y Fajardo-León, 1996).

Durante los últimos 20 años, la explotación de hachas se intensificó, a tal grado que *A. maura* se encuentra a punto de desaparecer en algunas zonas del Pacífico Mexicano (Arizpe-Covarrubias y Félix-Uraga, 1986; Cardoza-Velazco y Maeda-Martínez, 1997). Los registros de captura de callo de hacha para Baja California Sur (*Atrina maura*, *Pinna rugosa* y *Atrina oldroydii*) en el período de 1985 a 1995 (Figura 1), indican una extracción máxima de 1,148 toneladas de producto fresco. A partir de 1991 la tendencia ha sido a la baja, llegando a una mínima extracción de 91 toneladas en 1995 (Vélez-Barajas y Fajardo-León, 1996).

En las fuentes oficiales de México, la captura de callo de hacha se incluye en la captura de callos de almeja. Entre 1966 y 2001, el callo de hacha constituyó el 3.0% de la producción de callos de almeja reportada por la Subdelegación de Pesca en B.C.S. (Diario Oficial de la Federación, 2004).

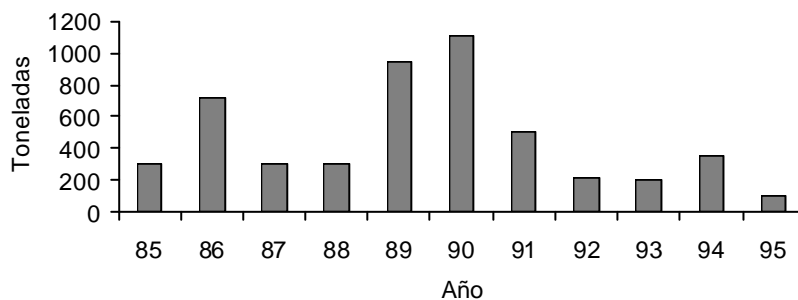


Figura 1 . Producción de callo de hacha en B.C.S., en el período de 1985-1995. Tomado de Vélez-Barajas y Fajardo-León (1996).

Debido a esta disminución y a la falta de desarrollo del cultivo, los niveles de producción actuales no pueden satisfacer la demanda del mercado nacional, por lo que los grupos de productores están buscando alternativas que les permitan explotar el recurso silvestre de forma sustentable, e incrementar los volúmenes de producción a través de la acuicultura.

La importancia de este recurso ha impulsado a varias instituciones como el Centro Reproductor de Especies Marinas del Estado de Sonora (CREMES) y al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), entre otras, a desarrollar una tecnología para su cultivo. Gracias a ello, las etapas de preengorda y engorda ya se encuentran dominadas técnicamente (Maeda-Martínez *et al.*, 1996) pero aún existen problemas en la producción de juveniles. Robles-Mungaray (2000), hizo una revisión histórica de los avances y los problemas encontrados en esta etapa, desde los primeros intentos de producción de juveniles en San Blas Nayarit en los años 80's, hasta las últimas producciones en el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR). Este autor menciona que tanto la inducción a la gametogénesis como algunos aspectos del cultivo de larvas, son temas que deberían ser estudiados con mayor profundidad.

En algunas especies de moluscos se ha logrado la inducción a la gametogénesis fuera de los periodos naturales de reproducción, controlando la temperatura y suministrando una alimentación adecuada (Loosanoff y Davis, 1963; Blake y Sastry, 1979; Devauchelle y Mingant, 1991). Por lo tanto, cuando se trabaja con especies nativas poco estudiadas como *A. maura*, es fundamental determinar el rango de temperatura en donde ocurra la transferencia de nutrientes necesaria para la vitelogénesis en los ovocitos (Sastry, 1968, 1970, Sastry y Blake, 1971; Blake, 1972, Sastry, 1979).

La cantidad y calidad de vitelo son muy importantes para asegurar un adecuado desarrollo larvario, ya que las larvas de la mayoría de los moluscos son inicialmente lecitotróficas y su desarrollo temprano depende de las reservas bioquímicas que son transferidas de las hembras a los ovocitos (Holland, 1978; Bayne y Newel, 1983; Marty *et al.*, 1992).

Así mismo se ha demostrado que durante la vitelogénesis, embriogénesis y el desarrollo larvario, los lípidos y particularmente los triglicéridos, juegan un papel de reserva energética (Racotta *et al.*, 2003b), mientras que los fosfolípidos participan en la formación de membranas celulares. Por ejemplo, en *Mercenaria mercenaria*, *Mytilus edulis* y *Pecten maximus*, la tasa de eclosión al estadio prodisoconcha I, varía directamente proporcional a la cantidad de triglicéridos encontrada en los ovocitos (Bayne *et al.*, 1975; Gallager y Mann, 1986; Le Pennec *et al.* 1990). Besnard (1988) demostró la importancia de los triglicéridos en la conversión energética durante el desarrollo embrionario y de los primeros estadios larvarios en *Pecten maximus*. En base a lo anterior, Gallager *et al.* (1986) y Fraser (1989) propusieron que la cuantificación de este tipo de lípidos podría servir como un índice de la condición fisiológica y predictivos del éxito en la metamorfosis larvaria en bivalvos y en otras larvas de moluscos, crustáceos y peces.

Los lípidos pueden ser detectados por métodos bioquímicos e histológicos. En el caso de los histológicos tradicionalmente, se realizan cortes por congelación supuestamente para evitar la disolución de los lípidos con los solventes (alcohol, xilol, etc.) que se emplean en la técnica de inclusión en parafina, y más tarde son teñidos con el colorantes como el Rojo Oleoso (RO) que tiñe de rojo específicamente estas biomoléculas (Gallager *et al.*, 1986; Le Pennec *et al.*, 1990) (Figura 2). Sin embargo, esta técnica presenta la limitante de que no permite distinguir entre los lípidos de reserva de los lípidos

estructurales. Además, con los cortes por congelación no es posible observar la frontera entre un ovocito y otro, en consecuencia, no es factible estimar el área del ovocito con fines cuantitativos. Por lo tanto, es necesario desarrollar un índice de calidad histológico que ayude a cuantificar los lípidos de reserva de manera rápida y confiable.

En el presente estudio se desarrolló un índice lipídico de calidad ovocitaria, empleando la propiedad del colorante Sudán Negro B (SNB) de teñir los lípidos de reserva o triglicéridos de color negro o azul oscuro y los fosfolípidos de color gris (Rodríguez-González, 2001; Burgos-Aceves, 2003; García-Guerrero, 2003; Martínez-Lagos, 2003). Durante el desarrollo de la técnica, se comprobó experimentalmente que los tejidos fijados en solución de Davidson (Shaw y Batle, 1957 citado en Howard y Smith, 1983), deshidratados con una serie de alcoholes de menor a mayor concentración, incluidos en parafina, cortados en secciones finas de 3 μm con el micrótomo y teñidos con SNB, conservaron los triglicéridos (ver Sección 7.1), lo cual no era esperable según lo mencionado anteriormente. Esto se comprobó comparando cortes no tratados y cortes tratados con una mezcla de cloroformo-metanol (Bancroft y Stevens, 1990). Por lo tanto, se logró la técnica histoquímica requerida para diferenciar los lípidos de reserva, separadamente de los estructurales.

Recientemente, la tecnología de análisis digital de imágenes ha convertido a la histología en una herramienta cuantitativa (Heffernan y Walker, 1989; Racotta *et al.*, 2003a; Ceballos-Vázquez *et al.*, 2003). Esto es posible gracias a que el analizador suma áreas de cobertura comunes por su color, densidad óptica o forma. Por ejemplo, si en la tinción SNB los triglicéridos se tiñen de color negro y azul oscuro, el analizador de imágenes es ajustado para cuantificar específicamente esas áreas de cobertura. Adicionalmente con el analizador de imágenes

se pueden medir las superficies de células completas (ovocitos) o partes de ellas (organelos), delineando su contorno con el indicador de la computadora. Con estas medidas se pueden estimar algunas variables morfométricas como el área del ovocito, el diámetro teórico (Saout *et al.*, 1999), y la relación núcleo/citoplasma (N/C). Esta última ha sido empleada como indicador de calidad de ovocitos en *A. maura* (Rodríguez-Jaramillo *et al.*, 2001), para distinguir entre células germinales y periféricas que dan origen y estructura a las gónadas de gasterópodos (Brisson y Regondaud, 1989), y para detectar anomalías celulares de fibroblastos en medicina humana (Maminishkis *et al.*, 1995). La N/C se fundamenta en que el núcleo alcanza su tamaño final al inicio de la gametogénesis en la fase de ovogonia (Raven, 1966), por lo tanto puede tomarse como referencia para el crecimiento de otras partes de la célula como el citoplasma, el cual continúa su crecimiento hasta la fase posvitelogénica. Si se cuenta con el área de cobertura de triglicéridos y la del ovocito, es factible por lo tanto calcular la cantidad relativa de triglicéridos por ovocito, la cual es equivalente al índice lipídico mencionado.

La reproducción de los moluscos bivalvos en su medio natural puede ser cíclica ya sea anual, semianual o continua (Sastry, 1979). En *A. maura*, González-Corona (2003) encontró que el proceso de gametogénesis ocurre entre enero y julio en el Canal del Infiernillo y Bahía de Kino, Sonora. Con el propósito de reducir costos de operación, es común que los acuicultores prefieran coleccionar reproductores durante la época natural de reproducción de las especies. Con ello se piensa que además de acortar el proceso de inducción a la gametogénesis, los gametos que se obtengan serán de mayor calidad que los madurados completamente en el laboratorio, por la mayor abundancia y diversidad del alimento disponible. Esta especulación se ha mantenido por mucho

tiempo y sería muy útil comparar la calidad de los ovocitos obtenidos de una u otra fuente.

En este trabajo se presenta el estudio del efecto de la temperatura sobre la gametogénesis del hacha *Atrina maura*. Este efecto fue medido en los gametos femeninos durante 43 días, estimando algunas variables morfométricas como el área del ovocito, el diámetro teórico, la relación núcleo/citoplasma, y una variable de calidad, el índice lipídico desarrollado. Este estudio se realizó en todas las categorías ovocitarias (ovogonias, ovocitos previtelogénicos, vitelogénicos, posvitelogénicos, y atrésicos) y posteriormente solo en ovocitos posvitelogénicos. Además, se describe el proceso celular del desove en esta especie, y se comparan las variables morfométricas y el índice lipídico de ovocitos en proceso de desove, provenientes de hembras maduradas en el laboratorio y en el medio natural, empleando la metodología estandarizada y validada en este trabajo.

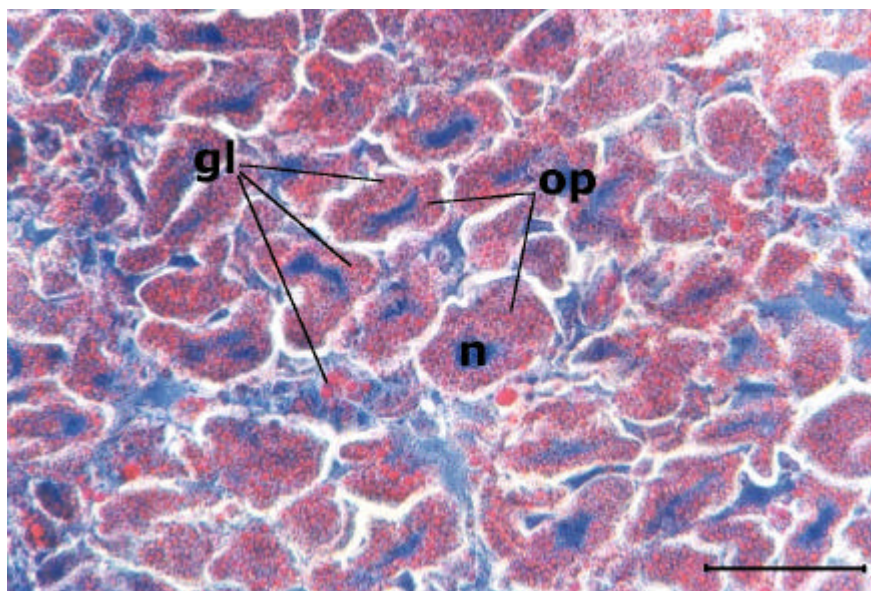


Figura 2. Micrografía de ovario de *Atrina maura*. Corte por congelación a 10 µm de grosor teñido con Rojo Oleoso. Se observan ovocitos posvitelogénicos (op), el núcleo (n) y los gránulos de lípidos (gl). 400X. Barra = 50µm.

2. ANTECEDENTES

En 1988 se produjeron los primeros juveniles de *A. maura* en el Centro Reproductor de Especies Marinas del Estado de Sonora (CREMES). En 1991 se realizó un nuevo intento con resultados alentadores por el aumento en el número de juveniles producidos. A finales de 1994 y principios de 1995 se obtuvo la primera producción comercial de juveniles en ese laboratorio, con más de 800,000 individuos entre 15 y 25 mm de longitud. Al año siguiente, la producción se incrementó al doble, pero hubo mortalidad masiva cuatro o cinco días antes de ser entregada al productor (Robles-Mungaray *et al.*, 1996).

Existen algunas investigaciones sobre la biología reproductiva en *A. maura* (Baqueiro y Castagna, 1988; Arizpe-Covarrubias, 1995; Reynoso-Granados *et al.*, 1996; Robles Mungaray *et al.*, 1996; Rodríguez-Jaramillo *et al.*, 2001; Enríquez-Díaz *et al.*, 2003; González-Corona, 2003). Particularmente se han realizado estudios citológicos de la gónada en algunos miembros de la familia Pinnidae durante la ovogénesis y espermatogénesis, como en *Pinna nobilis* (de Gaulejac *et al.*, 1995a, b), *Atrina pectinata* (Fang y Qi, 1988) y *A. maura* (Rodríguez-Jaramillo *et al.*, 2001; Enríquez-Díaz *et al.*, 2003). En *P. nobilis* se identificaron y describieron seis estadios de desarrollo gonádico en hembras a nivel ultra estructural: protogonia, ovogonia, ovocitos previtelogénicos, vitelogénicos, postvitelogénicos y en degeneración (atresias). En machos determinaron cinco estadios de desarrollo: espermatogonia, espermatocitos primarios, espermatocitos secundarios, espermatidas y espermatozoides. En *A. maura* la evolución citológica a nivel histológico ultra estructural de las gónadas, es similar al descrito en *P. nobilis* (Enríquez-Díaz *et al.*, 2003), y en consecuencia, Rodríguez-Jaramillo *et al.* (2001) propusieron una escala reproductiva también de seis estadios de desarrollo gonádico para esta especie.

Enríquez-Díaz (2000) determinó las variaciones en la concentración de proteínas y lípidos en la gónada, glándula digestiva y músculo aductor de *A. maura* durante el proceso de maduración. Sus resultados indicaron a diferencia de otros moluscos, que la energía utilizada en el proceso de maduración gonádica fue proporcionada por el alimento suministrado, ya que no encontró evidencia de la aportación de nutrientes de otros compartimentos somáticos. Un resultado similar fue encontrado en el pectínido *Nodipecten subnodosus* (Racotta *et al.*, 2003a). Esto contrasta con otros estudios que indican que los moluscos bivalvos toman la energía para la reproducción de sustratos almacenados en órganos y tejidos (Ansell 1974; Bayne, 1976; Gabbot, 1975; Bayne *et al.*, 1982; MacDonald y Thompson, 1986; Barber y Blake, 1991; Mathieu y Lubet, 1993) y específicamente de la glándula digestiva (Taylor y Venn, 1979), el músculo aductor (Ansell, 1974) o el manto (Barber y Blake, 1981). Esta movilización de nutrientes almacenados en tejidos como el músculo, glándula digestiva y el manto, ha sido poco analizadas en almejas (Lodeiros *et al.*, 2001).

Partiendo de las experiencias en la aplicación de diversas metodologías para el estudio de la biología reproductiva en otros moluscos, el conocimiento de los mecanismos naturales de regulación y de las estrategias reproductivas de las especies, ha implicado el uso de diversos métodos de estudio que van desde la determinación de índices gonádicos y de condición, utilización de escalas morfocromáticas de desarrollo gonádico, hasta el análisis histológico de la gónada. Este último es considerado como el más adecuado para determinar la cinética del desarrollo gamético (Giese y Pearse, 1974). Sin embargo, la evaluación de la calidad de los gametos requiere de metodologías que permitan no sólo la caracterización morfológica sino su relación con la cantidad de reservas que indiquen la condición fisiológica de los organismos.

Varios conceptos y términos que se utilizan para evaluar la calidad y la condición fisiológica de los organismos en la acuicultura, han sido analizados por Racotta *et al.* (2003b). Estos autores clasifican los indicadores de desempeño reproductivo en indicadores productivos asociados a la reproducción e indicadores de la condición fisiológica de los organismos, conocida frecuentemente como calidad (Arcos-Ortega, 2003).

Por otra parte, la reproducción está regulada por factores endógenos, que a su vez dependen de factores exógenos (ambientales), los cuales sincronizan y regulan los eventos reproductivos. Dentro de los factores exógenos se incluyen marea, oleaje, fotoperíodo, disponibilidad de alimento y temperatura, siendo estos dos últimos los más importantes (Sastry, 1963; Loosanoff y Davis, 1963; Sastry, 1966, 1968; Giese y Pearse, 1974; Lowe *et al.*, 1982; Taylor y Capuzzo, 1983; Barber y Blake, 1991). Paulet (1990) señala que existe una temperatura crítica en la cual los organismos de las poblaciones de reproducción sincrónica inician el desove más significativo de su ciclo anual para un área determinada. La maduración de la gónada es estimulada durante el período de aumento de la temperatura para numerosos invertebrados marinos. Barber y Blake (1983) observaron en *Argopecten irradians*, que el inicio de la gametogénesis se asocia a un incremento de la temperatura del mar y a un incremento en el índice gonádico. En *A. maura*, la temperatura óptima de maduración en el laboratorio es de 20 °C (Enríquez-Díaz, 2000; Rodríguez-Jaramillo *et al.*, 2001). Sin embargo, estos autores difieren en el tiempo para lograr la fase máxima de madurez (posvitelogénicos) ya que los primeros la alcanzaron en 20 días, y los segundos en más 30 días. A esta temperatura y tiempo de inducción Rodríguez-Jaramillo *et al.* (2001) encontraron mayores tallas de ovocitos maduros y ausencia de ovocitos atrésicos. En ese estudio aplicaron el concepto de la relación núcleo/citoplasma como un indicador de calidad del ovocito. La

temperatura óptima para la maduración reproductiva en *A. maura* es diferente a la temperatura óptima para el crecimiento (29 °C) reportada por Leyva-Valencia (1999) en juveniles de 1.3-3.3 cm de longitud de la misma especie.

2.1 Posición taxonómica

La taxonomía del callo de hacha según Keen (1971) es:

Phyllum: Mollusca (Linnaeus, 1758)

Clase: Bivalvia

Subclase: Lamellibranchia

Orden: Anisomyaria

Familia: Pinnidae

Género: *Atrina*

Especie: *Atrina maura* (Sowerby, 1835)

2.2 Diagnósis biológica

La especie *Atrina maura* (Sowerby, 1835) se distribuye desde Baja California hasta el sur de Perú (Keen, 1971).

Son organismos bentónicos que se localizan en zonas intermareales en bahías protegidas con fondos limo-arcillosos, lodo-arenosos, arenoso-calcáreos o areno-rocosos, en densidades de 7-9 individuos/m². Se pueden encontrar desde el límite inferior de la marea hasta un máximo de diez metros, aunque se han encontrado en algunas bahías a más de 45 m de profundidad (Noguera y Gómez-Aguirre, 1972). Se encuentran generalmente enterrados con el extremo anterior en sustratos blandos adheridos a elementos duros. Las valvas de forma triangular están

unidas por medio de dos músculos aductores, de los cuales el posterior es de mayor tamaño y diámetro. En la región anterior se localiza el músculo anterior que es más pequeño. Estos organismos presentan un pequeño orificio bucal situado cerca de la base del pié, el cual se comunica con un estrecho canal de forma circular, que desemboca en el estómago. El intestino y la glándula digestiva se encuentran incluidos dentro de la masa gonádica cuando ésta se encuentra desarrollada. El sistema renal se localiza a un lado del músculo aductor posterior. Las branquias están formadas por cuatro láminas largas y delgadas que se originan cerca de los palpos labiales. El manto se encuentra rodeando al organismo. El pie es una estructura muscular y por encima de él se encuentra la glándula bisal que secreta una serie de fibrillas delgadas y fuertes (el biso), con los cuales el organismo se fija al sustrato (Keen, 1971; Brusca, 1980).

El callo de hacha es filtrador omnívoro que se alimenta principalmente de diatomeas, microflagelados, copépodos, protozoarios y detritus. Frecuentemente, coexiste con ostiones y madreperlas. Sus depredadores más comunes son jaibas, cangrejos, pulpos, caracoles y algunos peces (Ruíz-Durá, 1990).

La Familia Pinnidae presenta tanto reproducción gonocórica como hermafrodita, pudiendo existir la inversión de sexos como en *Pinna rugosa* (Noguera y Gómez-Aguirre, 1972). Sin embargo, hasta el momento no se ha reportado hermafroditismo funcional. En *A. maura* la reproducción es gonocórica, cuyos cigotos resultan de la unión de gametos femeninos y masculinos provenientes de organismos con sexos separados. La fecundación es externa y su desarrollo larvario es planctónico con larvas trocófora y veliger (Barnes y Ruppert, 1996). El sexo y estado de madurez sexual de los callos de hacha se ha determinado macroscópicamente por la coloración de la gónada. En las hembras se presenta un color rosa cuando la gónada inicia su desarrollo, y se vuelven

de color naranja intenso en la madurez. La gónada masculina es de color blanquecino-cremoso.

De acuerdo con los resultados de prospecciones y evaluaciones, *A. maura* forma bancos no muy densos, principalmente en bahías y lagunas costeras en ambos litorales de Baja California Sur. En el litoral occidental, se distribuye en las lagunas de Guerrero Negro, Ojo de Liebre y San Ignacio, en los esteros El Dátil, el Bateque y San José de Gracia, así como en las Bahías Magdalena, Almejas y Santa María. Por el litoral oriental, se encuentra en la Ensenada y Bahía de La Paz, en el Canal de San Lorenzo, en la Isla San José, Puerto Escondido, Bahía Concepción y Bahía de Santa Inés (Baqueiro *et al.*, 1982). Existen estudios sobre la colecta de juveniles en el Golfo de California (Cendejas *et al.*, 1985; Ruíz-Verdugo y Cáceres-Martínez, 1990).

La explotación de estos moluscos se basa en bancos naturales. Esta es de tipo artesanal y la extracción se lleva a cabo por buceo semiautónomo. La parte del organismo que se comercializa es el músculo aductor conocido como "callo", que se vende fresco enhielado, en el mercado local, regional o nacional.

3. JUSTIFICACIÓN

Uno de los principales problemas que existen para lograr la producción controlada de una especie, es la disponibilidad de reproductores maduros que produzcan gametos de calidad que garanticen la obtención de larvas con altas posibilidades de supervivencia.

Actualmente no se dominan todos los aspectos técnicos del cultivo de juveniles de hacha *Atrina maura*, incluyendo la inducción a la maduración artificial de reproductores, los métodos de inducción al desove, la fertilización y el cultivo larvario (Maeda-Martínez *et al.*, 1996). La información obtenida a partir de experimentos realizados *in situ* y en el laboratorio señalan la falta de conocimientos sobre la fisiología de la reproducción de esta especie. Para resolver este problema es necesario conocer los diferentes factores endógenos y exógenos que intervienen durante el desarrollo gonádico hasta la expulsión de los gametos. La condición fisiológica y calidad de los gametos se refleja en la talla y composición bioquímica, éstos son un indicador predictivo del buen funcionamiento o anomalías del desarrollo larvario que se refleja en las tasas de sobrevivencia.

En moluscos bivalvos se puede lograr la madurez artificial fuera del periodo reproductivo natural de campo mediante el control de la temperatura y el alimento (Loosanoff y Davis, 1963). Para ello, es necesario conocer el umbral de temperatura óptima en donde ocurra la transferencia de nutrientes necesaria para el crecimiento de los ovocitos durante la vitelogénesis (Sastry, 1968; 1970; Sastry y Blake, 1971; Blake, 1972; Sastry, 1979).

La cantidad de reservas almacenadas en el ovocito es el resultado final ya sea exitoso o deficiente, de la transferencia de energía del reproductor a su progenie, es por ello que en el presente trabajo se

propone un método de evaluación individual de gametos, que puede ser de utilidad en la evaluación de resultados de los métodos acuícolas para la producción de juveniles.

Por lo anterior, un primer paso es conocer el desarrollo gonádico de ésta especie a diferentes temperaturas en condiciones experimentales y su efecto sobre el desarrollo de los gametos, así como sobre la última etapa (madurez) antes de la fecundación, con el fin de comprender los factores que determinan la calidad de los ovocitos. En este estudio se intenta definir por una parte, la temperatura a la que se obtiene un desarrollo gonádico óptimo comparado con organismos del medio natural y por otro, un indicador de calidad (denominado índice lipídico) estimado por el contenido de triglicéridos de los ovocitos como un indicador de la condición fisiológica y potencial para una metamorfosis exitosa.

4. HIPÓTESIS

La temperatura afecta la calidad de los ovocitos durante la gametogénesis. La calidad de los ovocitos depende a su vez de la cantidad de reservas lipídicas (triglicéridos), y del tamaño y la forma del ovocito.

5. OBJETIVOS

5.1 General

Comparar las variables morfométricas y de calidad de los ovocitos de hembras de hacha *Atrina maura*, inducidas a la gametogénesis en tres temperaturas (20, 25 y 30°C), y comparar la calidad de los ovocitos de hembras de cultivo contra hembras del medio natural inducidas al desove en el laboratorio.

5.2 Particulares

1.-Validar el método histoquímico para la obtención del índice lipídico en cortes de parafina con la técnica de tinción Sudán Negro B, comparando ovocitos en cortes no tratados contra cortes tratados para la extracción de lípidos neutros (triglicéridos) con una mezcla de cloroformo-metanol. Cuantificar la cantidad de lípidos entre cortes tratados y no tratados por medio de análisis digital de imágenes.

2.-Determinar las variables morfométricas área, diámetro teórico, relación núcleo/citoplasma y de calidad (índice lipídico) de ovocitos inducidos a la gametogénesis a tres temperaturas (20, 25 y 30 °C) durante 15, 30 y 43 días.

3.-Determinar la frecuencia de las categorías ovocitarias, clasificando y cuantificando los ovocitos de hembras inducidas a la gametogénesis en cinco categorías (ovogonias, ovocitos previtelogénicos, vitelogénicos, posvitelogénicos y atrésicos).

4.-Determinar el efecto de la temperatura sobre las variables morfométricas y de calidad de los ovocitos posvitelogénicos y atrésicos.

5.-Describir el proceso de desove de hembras maduras en el laboratorio y de las del medio natural inducidas con "shock" térmico.

5.-Clasificar los ovocitos en desove, según su morfología en tres categorías: Inmaduros, maduros y atrésicos, y determinar su área, diámetro teórico, índice lipídico y relación núcleo/citoplasma.

6.- Determinar la frecuencia de las categorías ovocitarias en hembras en proceso de desove maduras en el laboratorio y en el medio natural.

7.-Comparar las variables morfométricas y de calidad de ovocitos en desove (reinicio de la meiosis), provenientes de hembras maduras en el laboratorio contra las del medio natural.

6. METODOLOGÍA

6.1. Origen de los reproductores

Los organismos fueron producidos en el Centro de Reproducción de Especies Marinas (CREMES) del Estado de Sonora, y fueron enviados a la granja de acuicultura Rancho Bueno, localizada al sur de Bahía Magdalena, en las costas del Pacífico de Baja California Sur, México. En este sitio los organismos se cultivaron en canastas Nestier suspendidas en un "longline" de 100 m. Después de 6 meses los organismos se encontraron con gónadas desarrolladas, alcanzando la talla de primera madurez a los 8.5 cm de longitud de la concha (Maeda-Martínez, comunicación personal).

Noventa animales de 98 ± 1 mm de longitud de concha fueron seleccionados y transportados al laboratorio de ecofisiología del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. Los organismos fueron inducidos al desove exponiéndolos a desecación por un período aproximado de una hora, y posteriormente fueron colocados en un tanque de 60 L con agua de mar a 25 °C. Durante la exposición al aire, los organismos abrieron las valvas y de esa forma se pudo identificar el sexo, usando como indicador la coloración de la gónada (naranja para hembras, blanca-cremosa para machos). Bajo estas condiciones todos los organismos desovaron.

6.2. Gametogénesis inducida en *Atrina maura* a 3 temperaturas

Los organismos desovados se dividieron en tres grupos de 30 organismos y fueron colocados en tres tanques de fibra de vidrio conteniendo 700 L de agua de mar a 37‰ y a 20, 25 y 30 °C respectivamente. Los animales se mantuvieron en un sistema automático de flujo continuo cuya circulación del alimento fue

controlada por un turbidímetro Hach modelo 7210C (Figura 3). Cada tanque recibió un flujo constante de agua marina a 37‰ con alimento a razón de 1,800 L/día. El alimento consistió en una mezcla de tres microalgas en proporciones iguales de *Isochrysis galbana*, *Monochrysis lutheri* y *Chaetoceros gracillis*, a una concentración de 130-155 céls/ μL^{-1} . La temperatura en el tanque a 20 °C fue mantenida con un enfriador de agua Acrytec de 1/8 HP, mientras que la del tanque a 25°C se reguló con el sistema de aire acondicionado del laboratorio. La temperatura del tanque de 30 °C se mantuvo con 6 calentadores de inmersión con termostato integrado Ebo-jager de 200 Watts. Diariamente, las heces fueron extraídas por sifón.

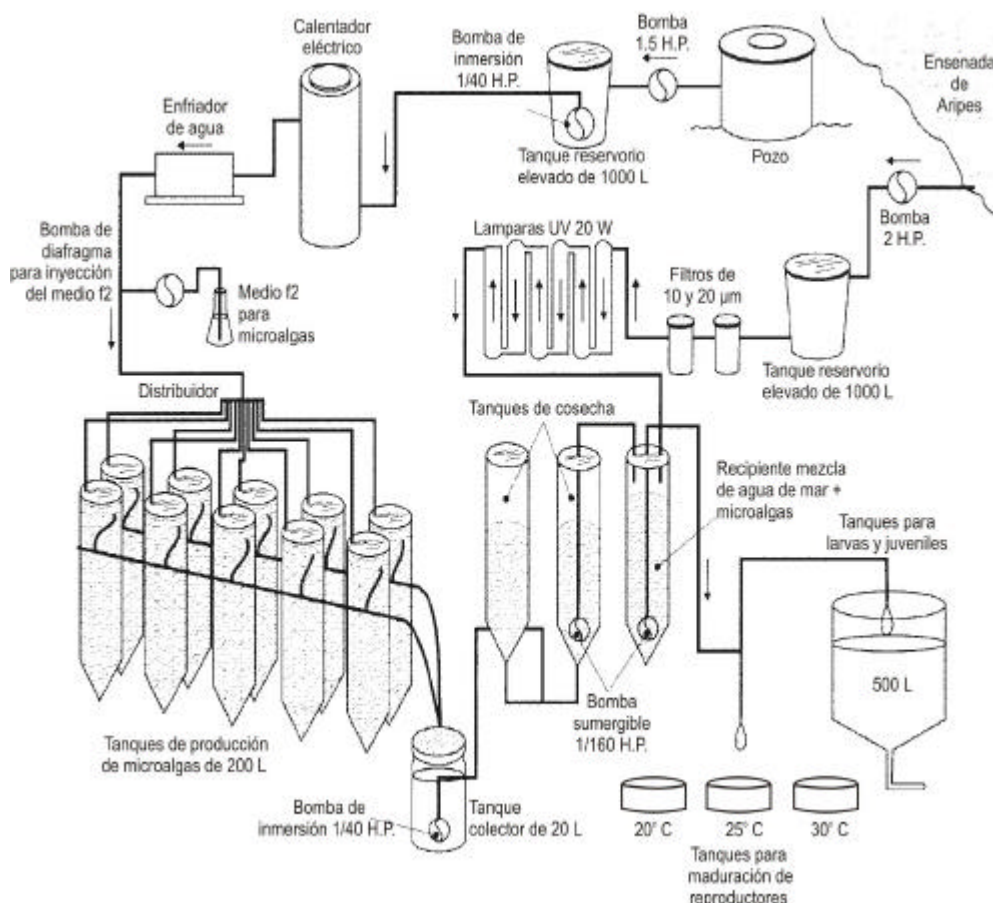


Figura 3. Sistema empleado para la inducción a la gametogénesis de *Atrina maura*, a 20, 25 y 30 °C durante 43 días.

6.3. Análisis histológico e histoquímico

Al inicio del experimento (tiempo 0) se tomaron 6 organismos para determinar la condición de los reproductores después del desove.

Para determinar la influencia de cada temperatura en el proceso de gametogénesis se realizó un muestreo aleatorio de 6 especímenes de cada temperatura cada quince días, tomando en total 54 organismos. A cada organismo se le midió el peso total, longitud, peso húmedo de los tejidos y se identificó el sexo por la coloración de la gónada. El resto de la gónada y el cuerpo de los organismos se fijó en la solución de Davidson (Shaw y Battle, 1957 citado en Howard y Smith, 1983). La composición de los fijadores se presenta en el (Anexo 1). Posteriormente se diseccionaron secciones transversales debajo del riñón de toda la región media de los organismos. Cada sección fue colocada en casetes para deshidratar los tejidos en una serie de alcoholes de menor a mayor concentración (70, 80, 90, y 100%). Después los tejidos fueron aclarados en xileno e incluidos en Paraplast X-Tra con punto de fusión de 54-56 °C (Anexo 2). De las inclusiones en parafina se obtuvieron 2 cortes de cada gónada a 3 µm de grosor con un micrótopo de rotación Leica RM 2125. Para el estudio histológico e histoquímico se emplearon las técnicas de tinción Hematoxilina-eosina (H-E) y Sudán Negro B (SNB).

Los cortes teñidos con H-E (Sheehan y Hrapchak, 1973; Humason, 1979) (Anexo 3) se emplearon para la clasificación de los ovocitos en cinco categorías ovocitarias de desarrollo (ver Sección 6.4).

6.3.1 Validación del método histoquímico Sudán Negro B.

En el presente trabajo se realizó la estandarización y validación de la técnica de tinción SNB (Bayliss, 1984; Pearse, 1985; Spicer y Schulte, 1992) para la detección y cuantificación de lípidos insolubles en cortes de parafina. Específicamente, esta técnica tiñe diferencialmente

triglicéridos y fosfolípidos (Anexo 4). La especificidad de la reacción se verificó comparando cortes teñidos con SNB no tratados contra otros expuestos a una mezcla de metanol-cloroformo (v/v) durante 24 horas a 60 °C (Bancroft y Stevens, 1990). Para ello se empleó la gónada de una hembra inducida a la gametogénesis durante 30 días a la temperatura de 25 °C. El grosor de los cortes (3 µm) y los tiempos de tinción con la técnica SNB (15 min) fueron estandarizados para que las preparaciones del tejido gonádico fueran comparables.

6.4. Análisis cualitativos y cuantitativos

Los cortes de tejidos teñidos con las técnicas de tinción descritas fueron analizados con un sistema de análisis de Imágenes Image Pro Plus (versión 4.5.19), integrado por un microscopio compuesto marca Olympus BX41 y una cámara digital CoolSNAP-Pro conectada a una computadora Pentium III. Las imágenes de los tejidos fueron digitalizadas con el objetivo de 40X.

De las preparaciones histológicas teñidas con H-E, los ovocitos fueron clasificados en cinco categorías ovocitarias de acuerdo al estadio de desarrollo gametogénico a los diferentes tiempos de muestreo y temperaturas experimentales, considerando la descripción morfológica de Rodríguez-Jaramillo *et al.* (2001): ovogonias, ovocitos previtelogénicos, vitelogénicos, posvitelogénicos y atrésicos. Los ovocitos posvitelogénicos fueron reclasificados en inmaduros y normales para el análisis particular de sus variables morfométricas y de calidad, con el objeto de evaluar solo los ovocitos que potencialmente pueden ser desovados ya que han llegado al final de la vitelogénesis y se encuentran libres en el lumen de los acinos. Esta clasificación está basada en la morfología que presentan, los ovocitos inmaduros son piriformes, y los normales son poligonales y redondos. Estos criterios

morfológicos serán retomados en la sección 6.5 para el análisis de ovocitos en proceso de desove.

La frecuencia de estas categorías ovocitarias fue estimada en tres regiones del ovario, contando el número de ovocitos presentes en un área predeterminada de 0.3 mm² (Briarty, 1975). El área total del ovocito y las áreas del nucleoplasma y del ovoplasma fueron determinados en las tres regiones de cada ovario, usando el analizador de imágenes Image Pro Plus. Solamente los ovocitos que mostraron nucleoplasma, cortados aproximadamente en el plano ecuatorial fueron considerados en el análisis. Las mediciones se realizaron de la siguiente forma:

- 1.- La calibración del sistema de análisis de imágenes se hizo mediante una reglilla micrométrica para el objetivo 40x.
- 2.- De las 3 imágenes de cada gónada se seleccionaron 20 ovocitos con nucleoplasma bien definido, delimitando el perímetro de cada ovocito y de su nucleoplasma de forma manual con el cursor. El programa calculó automáticamente el área del ovocito y del nucleoplasma. Una vez que el ovocito quedó definido, se utilizó la herramienta del programa que identifica sólo los colores azul oscuro y negro y cuantifica mediante la suma de píxeles del área ocupada por estos tonos de color, correspondientes a los triglicéridos. Las áreas de cada ovocito ocupadas por píxeles azul oscuro y negro quedaron registradas en una hoja de cálculo. En la validación del método por extracción de lípidos se evaluaron 30 ovocitos tratados y 30 ovocitos control sin extracción de lípidos.

6.4.1. Índice lipídico

El índice lipídico (IL) se calculó dividiendo la sumatoria de las áreas ocupadas por los gránulos lipídicos (triglicéridos) entre la superficie total del ovoplasma, expresada en porcentaje:

$$IL = \frac{\text{Sumatoria del área de cobertura de lípidos}}{\text{Área del ovoplasma}} \times 100$$

6.4.2. Diámetro teórico

Con los resultados obtenidos del área de los ovocitos (AO) se calculó el diámetro teórico (DT) que propone Saout *et al.* (1999) estandarizando las medidas con base a la fórmula de la circunferencia, que se deduce de la siguiente forma:

$$Dt = \sqrt{4A/\pi}$$

6.4.3. Relación núcleo/citoplasma

$$N/C = \text{Área del núcleo} / \text{Área de citoplasma}$$

6.4.4. Análisis estadísticos

Para evaluar y diferenciar el efecto de la temperatura (20, 25 y 30°C) y el efecto del tiempo de inducción sobre la gametogénesis (15, 30 y 43 días) se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) para cada uno de dichos factores, considerando como variables dependientes las morfométricas: área de los ovocitos (AO), diámetro teórico (DT), relación núcleo citoplasma (N/C) y la variable de calidad: índice lipídico (IL). Los valores en porcentajes fueron transformados a arco-seno (arco-senovP) con el fin de normalizar los datos y realizar los análisis estadísticos (Zar, 1993). Los valores fueron retransformados y se presentan como la media \pm el error estándar.

Cuando se obtuvieron diferencias significativas ($P < 0.05$), se realizó una prueba de comparación de medias de Tukey (Zar, 1993).

Los análisis estadísticos fueron realizados al 95% de confianza, mediante el software Statistica versión 5.5, utilizando el modelo lineal general (GLM).

6.5. Calidad ovocitaria comparativa de reproductores de *Atrina maura* maduras en el medio natural y en el laboratorio, en el momento del desove.

6.5.1. Hembras del medio natural

Un lote de 20 organismos de 17 ± 1.9 cm de longitud fueron colectados en la Laguna San Ignacio (El Cardón) y transportados en una hielera sin agua al laboratorio. Después fueron colocados en un tanque de fibra de vidrio de 1,200 L, a temperatura de 21°C e inducidos al desove por shock térmico en un tanque de 70 L, bajando la temperatura de 21°C a 18°C durante 30 minutos, y posteriormente incrementada a 26°C. Una vez que los organismos iniciaron la expulsión de los gametos, se seleccionaron tres hembras que fueron retiradas del tanque y fueron fijadas en solución de Davidson durante 48 h.

6.5.2. Hembras de laboratorio

A los 43 días de iniciado el experimento, seis hembras de cada tratamiento de temperatura se colocaron en un recipiente de 70 L a 21°C y se indujeron al desove siguiendo el mismo tratamiento de shock térmico. Tres de los seis ejemplares provenientes del tratamiento a 30°C desovaron y fueron los que se analizaron. Estos tres ejemplares se fijaron en la solución de Davidson durante 48 h y posteriormente se trataron como se indica enseguida.

6.5.3 Histología e histoquímica de las hembras en desove

Las hembras fijadas fueron disecadas en 10 secciones transversales desde el umbo hasta el extremo posterior del músculo aductor, sin separar el tejido gonadal de los tejidos que lo rodean, con el objeto de no modificar la anatomía de la gónada y los órganos con los que se encuentra estrechamente relacionada. Cada sección fue procesada histológicamente y los cortes fueron teñidos con H-E y SNB como se indicó en la sección 6.3.

Se evaluaron 100 ovocitos de cada una de las 6 hembras (300 de laboratorio y 300 del medio natural) a 400 aumentos. Los ovocitos medidos fueron sólo aquellos que se encontraron en la fase de reinicio de la meiosis con la vesícula germinal rota (VGR), lo cual indicó que se encontraba en desove (Lora-Vilchis *et al.*, 2003). El área de los ovocitos, diámetro teórico y el área ocupada por triglicéridos (IL) fue calculada de la misma forma descrita en la sección 6.4.

Para la comparación de los ovocitos en proceso de desove de diferente origen, las categorías ovocitarias fueron diferentes a las mencionadas en la sección 6.4, ya que se tomó la clasificación de Dorange *et al.* (1989) por tratarse únicamente de ovocitos en reinicio de la meiosis. Esta clasificación está basada en la morfología de los ovocitos, representada por tres categorías: Inmaduros (ovocitos piriformes), normales (ovocitos poligonales y redondos) y atrésicos (ovocitos de forma irregular con prolongaciones citoplasmáticas). Estas categorías ovocitarias se expresaron en frecuencias. El IL fue calculado como se indica en la sección 6.4.1.

6.5.4. *Análisis estadístico de la calidad ovocitaria de hembras en desove*

Para poder determinar diferencias en cuanto a la calidad de los ovocitos provenientes de hembras maduradas en medio natural contra aquellas maduradas en laboratorio, se realizó un ANOVA de una sola vía en donde la variable independiente fue el origen de las hembras (medio natural contra laboratorio) y las variables dependientes fueron el área de los ovocitos (AO), diámetro teórico (DT) y el índice lipídico (IL). Posteriormente se realizó una prueba de comparación de medias de Tukey.

Los valores en porcentajes fueron transformados a arco-seno (arco-senovP) con el fin de normalizar los datos y realizar los análisis estadísticos (Zar, 1993).

Los valores de las variables se presentan expresadas como la media \pm el error estándar. Un valor de $P < 0.05$ fue considerado como estadísticamente significativo. Los análisis estadísticos se realizaron usando el modelo lineal general (GLM) del software Statistica versión 5.5.

7. RESULTADOS

7.1 Validación del método histoquímico

7.1.1 Tinción de triglicéridos y fosfolípidos con la técnica Sudán Negro B y cuantificación por análisis de imágenes.

En este trabajo se demostró que la técnica SNB empleada para el cálculo del índice lipídico, permitió distinguir entre la concentración relativa de triglicéridos y la de fosfolípidos sin afectar las variables morfométricas de los ovocitos. Para ello, se comparó el área del ovocito (AO), diámetro teórico (DT), índice lipídico de triglicéridos (IL), y la relación núcleo citoplasma (N/C) de cortes de una gónada de *A. maura* inducida a la gametogénesis a 25°C durante 30 días, tratados para extracción de triglicéridos con una mezcla de cloroformo-metanol a 60°C (Figura 4a), contra las de cortes no tratados (Figura 4b). Los resultados (Tabla 1) muestran que el tratamiento de extracción de triglicéridos (Bancroft y Stevens, 1990), no afectó a las variables AO, DT, pero redujo significativamente el IL ($P < 0.05$), de 39.3 a 3.1 %. Según esta técnica los triglicéridos son teñidos de color azul oscuro y negro. El mismo análisis aplicado a estos cortes pero seleccionando con el analizador de imágenes únicamente los tonos de gris correspondientes a la fracción fosfolipídica (lípidos polares), se observó que el tratamiento produjo un incremento en el valor relativo de esta fracción, de 43.24% en el corte no tratado, a 65.25% en el corte tratado (Tabla 1), siendo este incremento significativo al $P < 0.05$. Este resultado se debe al manejo de valores relativos (%). Con estos resultados se concluye que la técnica empleada en este trabajo es adecuada para cuantificar relativamente los triglicéridos, y en base a ellos calcular el índice lipídico.

Tabla 1. Efecto del tratamiento de extracción de lípidos mediante cloroformo-metanol sobre las variables área del ovocito, diámetro teórico, índice lipídico (triglicéridos), índice de lípidos polares (fosfolípidos) y la relación núcleo/citoplasma de una gónada de *Atrina maura* inducida a la gametogénesis a 25°C durante 30 días. Los datos son la media \pm el error estándar. $n = 30$.

| Variable | Muestra no tratada | Muestra tratada | ANOVA P |
|--------------------------------------|------------------------------|------------------------------|---------|
| Área del ovocito (μm^2) | 1,581 \pm 68 ^a | 1,454 \pm 3 ^a | 0.106 |
| Diámetro teórico (μm) | 44.7 \pm 0.9 ^a | 42.9 \pm 0.4 ^a | 0.109 |
| Índice lipídico (triglicéridos) (%) | 39.3 \pm 0.9 ^a | 3.1 \pm 0.2 ^b | 0.000 |
| Índice de lípidos polares (%) | 43.2 \pm 0.9 ^a | 65.2 \pm 1.3 ^b | 0.000 |
| Relación N/C | 0.47 \pm 0.01 ^a | 0.41 \pm 0.01 ^b | 0.029 |

Valores con diferente superíndice en la misma fila son significativamente diferentes

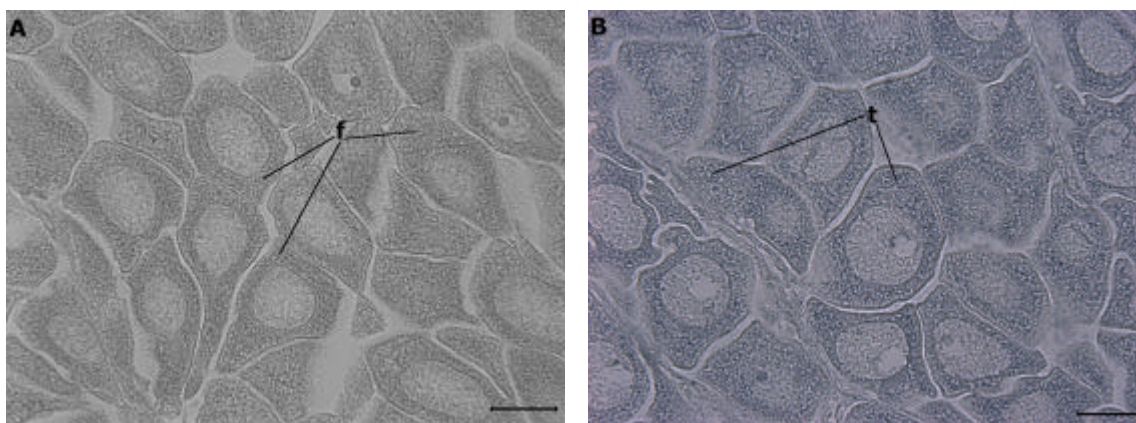


Figura 4. Efecto del tratamiento de extracción de lípidos por medio de cloroformo-metanol en una gónada femenina de *Atrina maura* inducida a la gametogénesis a 25°C durante 30 días. A) Corte tratado con cloroformo-metanol. Fosfolípidos (f) y B) Corte control sin tratamiento. Triglicéridos (t). Tinción SNB. 600X. Barra = 25 μm .

7.2. Efecto de la temperatura y el tiempo sobre la inducción a la gametogénesis en el hacha *Atrina maura*.

El análisis de los cortes de parafina teñidos con SNB, reveló la localización de los lípidos neutros en forma de triglicéridos, que se tiñeron de azul oscuro y negro, y los fosfolípidos de color gris (Figura 5). Las imágenes de las muestras teñidas con ésta técnica permitieron realizar los análisis cuantitativos, ya que se observó claramente la forma de los ovocitos y su núcleo. En las Tablas 2 a 5 se presentan los resultados del área del ovocito (AO), diámetro teórico (DT), índice lipídico (IL) y la relación núcleo/citoplasma (N/C) con relación a la temperatura y al tiempo de inducción a la gametogénesis

7.2.1. Área de ovocitos

En la Figura 6 se muestra la evolución del (AO) de *A. maura* a 20, 25 y 30°C. Aquí se puede observar que el tamaño del ovocito tiene un rápido crecimiento a 25 y 30°C alcanzando más de 1000 μm^2 a los primeros 15 días. Posteriormente, a 30°C los ovocitos continuaron su crecimiento hasta alcanzar más de 1,500 μm^2 al mes de iniciado el experimento, para después decrecer hasta las 1,173 μm^2 a los 43 días. Sin embargo, a 25°C el AO ya no varió durante el resto del experimento después de los 15 días. El crecimiento en AO a 20°C a los 15 días fue inicialmente más lento en contraste con los otros dos tratamientos. Sin embargo, los ovocitos siguieron creciendo hasta alcanzar su máxima talla a los 30 y 43 días. En la Tabla 2, se muestran los promedios de AO a las tres temperaturas y fechas de muestreo. La prueba de Tukey confirmó el lento crecimiento de los ovocitos a 20°C durante los primeros 15 días con respecto al resto de las temperaturas de inducción a la gametogénesis, e indicó diferencias significativas entre el AO a las tres temperaturas de maduración a los 30 días.

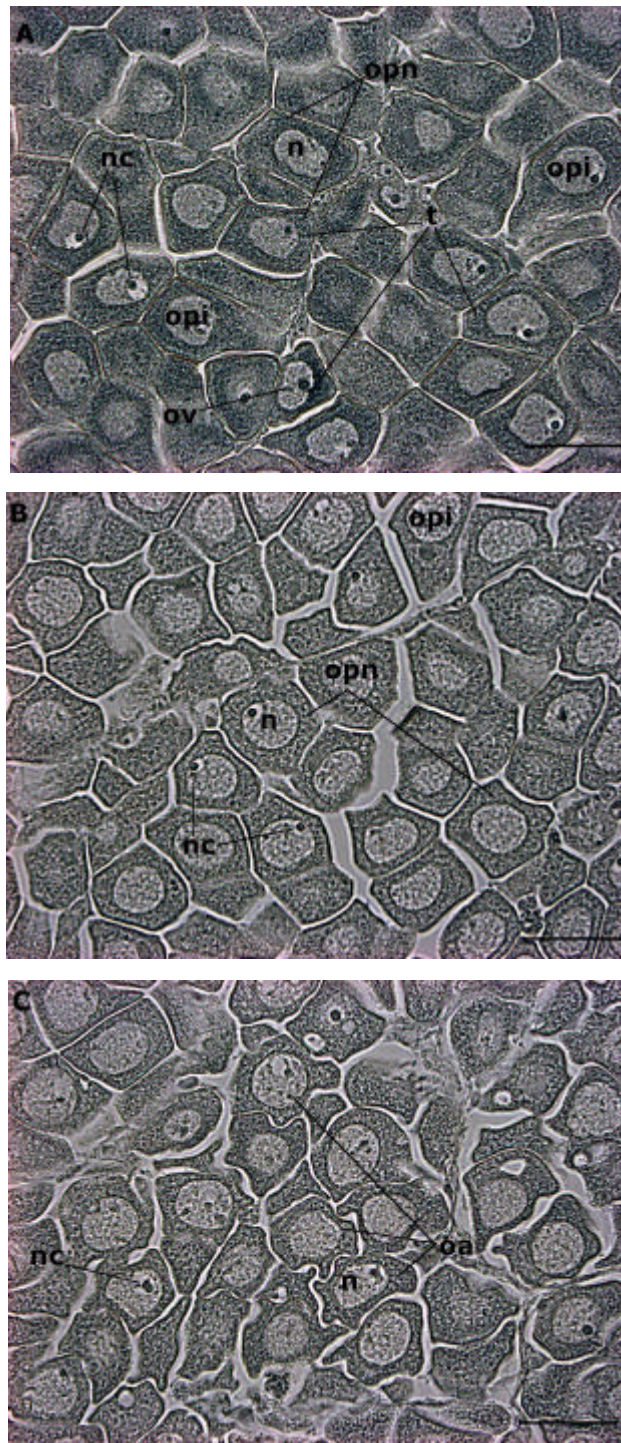


Figura 5. Micrografías de cortes histológicos de las gónadas de *Atrina maura* inducidas a la gametogénesis durante 43 días a 20°C (A), 25°C (B), y 30°C (C). Ovocitos vitelogénicos (ov), ovocitos posvitelogénicos normales (opn), ovocitos posvitelogénicos inmaduros (opi), ovocitos atrésicos (ova), núcleo (n), nucléolos (nc), triglicéridos (t). Tinción SNB. 400 X. Barra = 50 μ m.

Tabla 2 Área de los ovocitos (μm^2) de *Atrina maura* inducidas a la gametogénesis a tres temperaturas durante 15, 30 y 43 días. Los valores son la media \pm el error estándar. $n = 120$.

| Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) | 15 días | 30 días | 43 días |
|------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| 20 | 457.9 \pm 57.9 ^a | 1,265.2 \pm 89.9 ^a | 1,195.3 \pm 52.8 ^a |
| 25 | 1,008.9 \pm 99.4 ^b | 999.0 \pm 67.1 ^b | 958.2 \pm 44.7 ^b |
| 30 | 1,039.5 \pm 76.1 ^b | 1,577.4 \pm 56.4 ^c | 1,173.8 \pm 49.9 ^a |

Tabla 3 Diámetro teórico (μm) de los ovocitos de *Atrina maura* inducidas a la gametogénesis a tres temperaturas durante 15, 30 y 43 días. Los valores son la media \pm el error estándar. $n = 120$.

| Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) | 15 días | 30 días | 43 días |
|------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| 20 | 22.3 \pm 1.4 ^a | 38.7 \pm 1.6 ^a | 37.4 \pm 0.9 ^a |
| 25 | 34.8 \pm 1.9 ^b | 34.3 \pm 1.5 ^b | 33.1 \pm 1.0 ^b |
| 30 | 35.0 \pm 1.5 ^b | 44.5 \pm 0.7 ^c | 37.4 \pm 0.8 ^a |

Tabla 4 Índice lipídico de los ovocitos de *Atrina maura* inducidas a la gametogénesis a tres temperaturas durante 15, 30 y 43 días. Los valores son la media \pm el error estándar. $n = 120$.

| Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) | 15 días | 30 días | 43 días |
|------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| 20 | 47.1 \pm 1.7 ^a | 46.4 \pm 1.0 ^a | 41.8 \pm 0.8 ^a |
| 25 | 36.4 \pm 0.7 ^b | 40.3 \pm 1.6 ^b | 41.0 \pm 1.0 ^a |
| 30 | 39.0 \pm 1.5 ^b | 43.1 \pm 0.6 ^a | 29.9 \pm 0.8 ^b |

Tabla 5 Relación núcleo/citoplasma de los ovocitos de *Atrina maura* inducidas a la gametogénesis a tres temperaturas durante 15, 30 y 43 días. Los valores son la media \pm el error estándar. $n = 120$.

| Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) | 15 días | 30 días | 43 días |
|------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 20 | 0.28 \pm 0.008 ^a | 0.27 \pm 0.006 ^a | 0.29 \pm 0.005 ^a |
| 25 | 0.29 \pm 0.010 ^a | 0.27 \pm 0.007 ^a | 0.30 \pm 0.005 ^a |
| 30 | 0.28 \pm 0.009 ^a | 0.33 \pm 0.008 ^b | 0.32 \pm 0.004 ^b |

Valores con diferente superíndice en la misma columna son significativamente diferentes. $P < 0.05$.

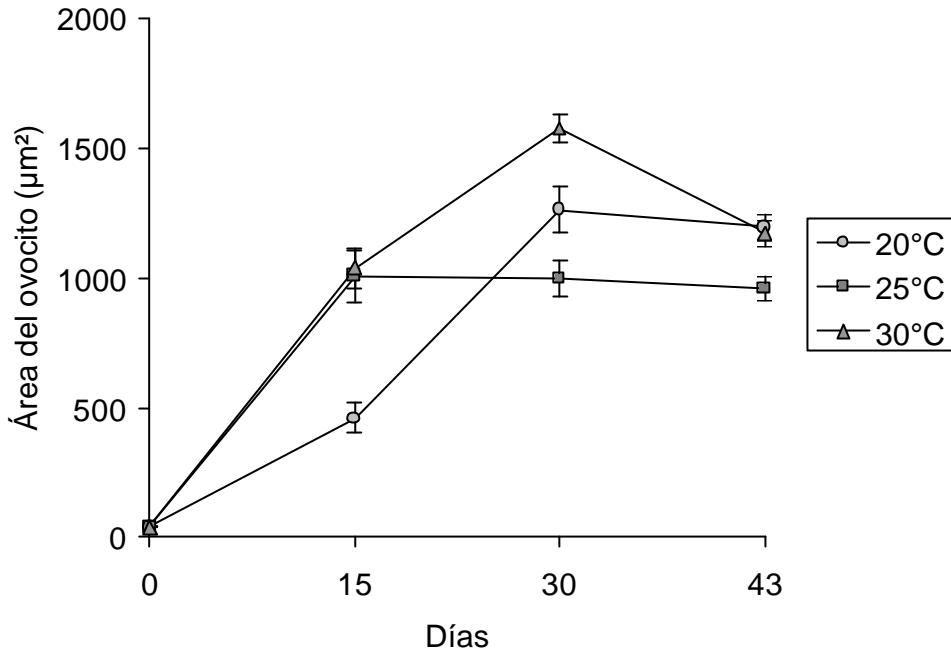


Figura 6. Área de los ovocitos (μm^2) de *Atrina maura* durante 43 días de inducción a la gametogénesis a tres temperaturas en el laboratorio. Los valores son la media \pm el error estándar. $n = 120$.

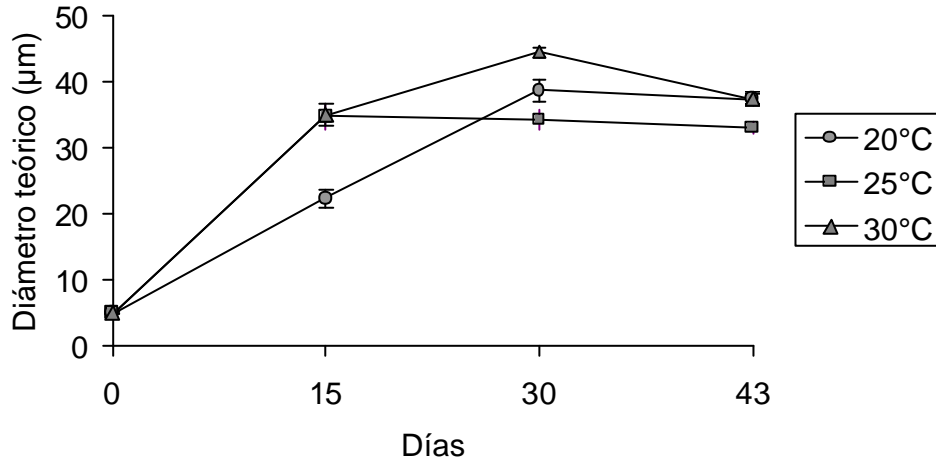


Figura 7. Diámetro teórico (μm) de los ovocitos de *Atrina maura*, durante 43 días de inducción a la gametogénesis a tres temperaturas en el laboratorio. Los valores son la media \pm el error estándar. $n = 120$.

Finalmente, se observa que el AO fue estadísticamente similar a 20 y 30°C a los 43 días de tratamiento.

7.2.2. *Diámetro teórico*

Los resultados del cálculo del diámetro teórico (DT) de los ovocitos a diferentes temperaturas y tiempos de inducción, se muestran en la Figura 7 y en la Tabla 3. El DT siguió el mismo patrón que el área del ovocito, en donde se observa un crecimiento inicial más lento a 20°C que en las dos temperaturas más altas. A los 30 días de iniciada la maduración, el DT fue diferente en los tres tratamientos y finalmente fue mayor y estadísticamente diferente a 20 y 30°C que a 25°C.

7.2.3. *Índice lipídico*

El índice lipídico (IL) en ovocitos de *A. maura* inducidos a la gametogénesis a tres temperaturas, muestra un patrón diferente (Figura 8; Tabla 4). Aquí se puede observar que a 20°C el IL fue el más alto, ocupando los triglicéridos entre el 41.8 y el 47.1 % del área del ovoplasma durante todo el experimento. El IL a 25 °C fue ligeramente menor que a 20°C y tuvo una tendencia al incremento a lo largo del proceso de maduración. A 30°C el IL fue más elevado que a 25°C a los 15 y 30 días, sin embargo el IL decreció a 29.9 % a los 43 días.

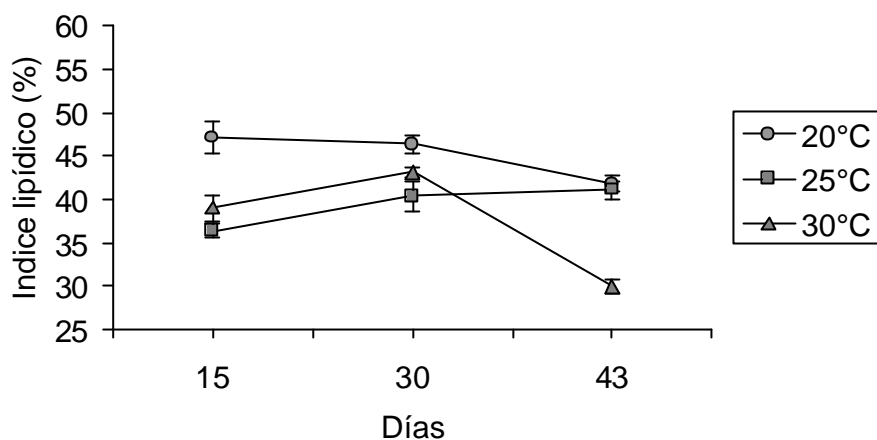


Figura 8. Índice lipídico de ovocitos de *Atrina maura* durante 43 días de inducción a la gametogénesis a tres temperaturas en el laboratorio. Los valores son la media \pm el error estándar. $n = 120$.

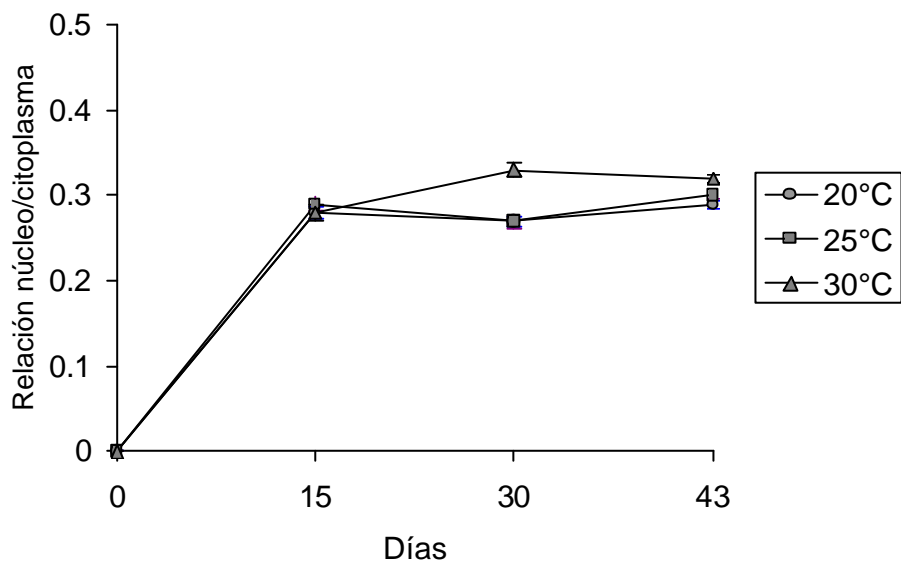


Figura 9. Relación núcleo/citoplasma de los ovocitos de *Atrina maura* durante 43 días de inducción a la gametogénesis a tres temperaturas en el laboratorio. Los valores son la media \pm el error estándar. $n = 120$.

7.2.4. Relación núcleo/citoplasma

Los resultados del cálculo de la relación núcleo citoplasma (N/C) se presentan en la Tabla 5 y en la Figura 9. Como se puede apreciar, este índice no sirvió como indicador de calidad tal y como se esperaba, ya que en lugar de ir disminuyendo conforme ocurrió el crecimiento de los ovocitos, éste aumentó. Posiblemente esto se debió a que el núcleo creció conforme aumentó el tamaño del ovoplasma, lo cual es contrario a lo establecido en la literatura (Raven, 1966). No obstante, la relación N/C fue útil para distinguir entre ovocitos posvitelogénicos atrésicos de los posvitelogénicos inmaduros, en donde la relación N/C fue significativamente ($P = 0.036$) mayor en los primeros (Tabla 8). Estos resultados coinciden con lo encontrado por Rodríguez-Jaramillo *et al.* (2001) en la misma especie.

7.2.5. Análisis integral

7.2.5.1. Temperatura

El análisis integral del efecto de la temperatura sobre las variables morfométricas y de calidad, se muestra en la Tabla 6. El análisis de varianza realizado indicó un efecto significativo ($P < 0.05$) de la temperatura sobre las variables morfométricas (AO, DT y N/C) y de calidad (IL). El AO se incrementó con la temperatura al igual que el DT, siendo estadísticamente diferente a 20°C que a 25 y 30°C. Sin embargo, los indicadores de calidad ovocitaria IL y N/C mostraron valores antagónicos a las temperaturas 20 y 25°C.

Tabla 6. Efecto de la temperatura sobre las variables morfométricas y de calidad ovocitaria de *Atrina maura*. Los valores son la media \pm el error estándar. $n = 120$.

| Variable | Temperatura (°C) | | | ANOVA <i>P</i> |
|------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------|
| | 20 | 25 | 30 | |
| Área ovocito (μm^2) | 959 \pm 58 ^a | 1,076 \pm 37 ^{a,b} | 1,134 \pm 46 ^b | 0.034 |
| Diámetro teórico (μm) | 32.6 \pm 1.1 ^a | 36.1 \pm 0.7 ^b | 36.8 \pm 0.8 ^b | 0.003 |
| Índice lipídico | 44.7 \pm 0.8 ^a | 41.4 \pm 1.0 ^b | 40.3 \pm 0.6 ^b | 0.000 |
| Relación N/C | 0.29 \pm 0.004 ^a | 0.30 \pm 0.005 ^a | 0.32 \pm 0.005 ^b | 0.000 |

Valores con diferente superíndice en la misma fila son significativamente diferentes.

7.2.5.2 Tiempo

El análisis integral de estos indicadores a los tres días de muestreo independientemente de la temperatura, muestra que hubo un efecto significativo ($P < 0.05$) del tiempo de inducción sobre el AO, DT y N/C excepto para el IL ($P = 0.26$) como se observa en la Tabla 7.

Tabla 7. Efecto del tiempo de inducción a la gametogénesis sobre las variables morfométricas y de calidad ovocitaria de *Atrina maura*, independientemente de la temperatura. Los valores son la media \pm el error estándar. $n = 120$.

| Variable | Tiempo (días) | | | ANOVA <i>P</i> |
|------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-------------------|
| | 15 | 30 | 43 | |
| Área ovocito (μm^2) | 801 \pm 51 ^a | 1,280 \pm 47 ^b | 1,042 \pm 42 ^c | 0.000 |
| Diámetro teórico (μm) | 29.9 \pm 1.1 ^a | 39.2 \pm 0.9 ^b | 35.4 \pm 0.8 ^c | 0.000 |
| Índice lipídico (%) | 42.2 \pm 0.5 | 41.7 \pm 1.0 | 43.3 \pm 0.7 | NS |
| Relación N/C | 0.304 \pm 0.003 ^a | 0.286 \pm 0.005 ^a | 0.296 \pm 0.005 ^b | 0.000 |

Valores con diferente superíndice en la misma fila son significativamente diferentes.

7.3. Frecuencia de las categorías ovocitarias.

La frecuencia de las categorías ovocitarias obtenidas a tres temperaturas y a los tres tiempos de muestreo durante la inducción a la gametogénesis, se muestra en la Figura 10. Aquí se puede observar que a los 15 días de iniciado el experimento, cerca del 60% de los ovocitos de los tratamientos 25 y 30°C, ya se encontraban posvitelogénicos, lo cual contrastó con lo observado a 20°C, en donde no se encontraron ovocitos en esa categoría (Figura 10a). A 25 y 30°C, se encontró un porcentaje muy bajo (<10%) de ovogonias, ovocitos previtelogénicos y vitelogénicos, y un porcentaje más elevado (aprox. 20%) de ovocitos atrésicos (en degeneración). A 20°C, los ovocitos vitelogénicos se presentaron con mayor frecuencia, seguidos por un 20% de previtelogénicos y 18% de ovogonias, lo cual indica un desarrollo gametogénico gradual pero más lento que a temperaturas superiores. El porcentaje de ovocitos posvitelogénicos y atrésicos fue nulo.

A los 30 días (Figura 10b), los ovocitos de *A. maura* inducidos a la gametogénesis a 20°C, mostraron un avance hacia la madurez, con un 60% de ovocitos posvitelogénicos y solamente >20% en las tres fases iniciales de desarrollo. A esta temperatura, la frecuencia de ovocitos atrésicos fue menor a 5%. A las temperaturas más elevadas, la frecuencia de ovogonias, previtelogénicos y vitelogénicos fue menor al 10%, y fue notoria la dominancia de ovocitos maduros que superaban el 70% de la frecuencia. A esas temperaturas, se mantuvo la presencia de ovocitos atrésicos cerca del 20%.

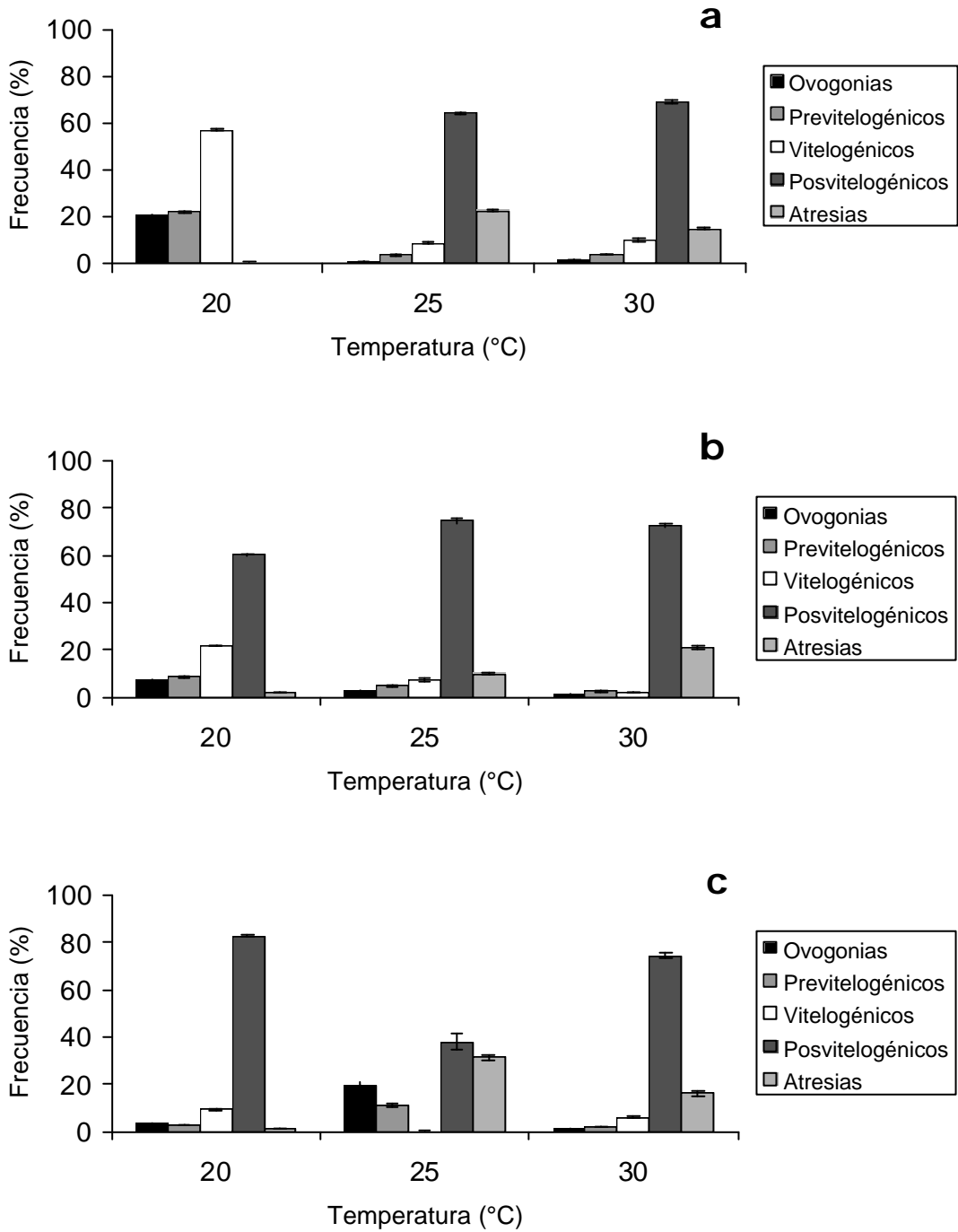


Figura 10. Frecuencia de las categorías ovocitarias presentes en las gónadas de *Atrina maura* inducidas a la gametogénesis a 20, 25 y 30°C, durante 15 (a), 30 (b) y 43(c) días.

A los 43 días (Figura 10c), el 80% de los ovocitos a 20 °C fueron posvitelogénicos, y las frecuencias de las ovogonias y ovocitos previtelogénicos cayeron a 5 y 10% respectivamente. A 25 °C, el patrón de frecuencias cambió notablemente como producto de un desove espontáneo ocurrido en el día 34. Aquí la frecuencia de ovogonias, ovocitos previtelogénicos y vitelogénicos fue de 20, 15 y 1% respectivamente, pero también se encontró un elevado porcentaje de posvitelogénicos (40%) y atrésicos (30%), indicando que los desoves fueron parciales. Las frecuencias de ovocitos a 30°C se mantuvieron sin cambio con respecto al día 30. Es importante señalar la presencia de ovogonias durante los 43 días de inducción en todos los tratamientos de temperatura probados.

7.4. Análisis morfométrico y de calidad de ovocitos posvitelogénicos y atrésicos inducidos a la gametogénesis a tres temperaturas y tres fechas de muestreo.

Los resultados de AO, DT, IL y N/C de ovocitos posvitelogénicos reclasificados según su forma en dos categorías ovocitarias (inmaduros y normales) y atrésicos, independientemente del tratamiento de temperatura y de las fechas de muestreo, se presentan en la Tabla 8. AO y DT fueron significativamente mayores en ovocitos normales que en el resto de las categorías ovocitarias. Con respecto al IL no hubo diferencias significativas entre ovocitos posvitelogénicos inmaduros y normales. Sin embargo, si existieron diferencias entre estos y los ovocitos atrésicos. La relación N/C fue significativamente diferente entre inmaduros y atrésicos, pero la N/C de ovocitos normales fue similar a los inmaduros y a los atrésicos a una $P = 0.036$.

Tabla 8 Variables morfométricas y de calidad de ovocitos posvitelogénicos (inmaduros y normales) y atrésicos. Los valores son la media \pm el error estándar. $n = 120$.

| Variable | Categoría ovocitaria | | | ANOVA P |
|----------------------------------|----------------------|------------------------|--------------------|------------|
| | Inmaduros | Normales | Atrésicos | |
| Área ovocito (μm^2) | 924 ± 28^a | $1,792 \pm 42^b$ | $1,404 \pm 92^c$ | 0.000 |
| Diám. teórico (μm) | 32.8 ± 0.6^a | 47.6 ± 0.6^b | 41.8 ± 1.3^c | 0.000 |
| Índice lipídico (%) | 43.0 ± 0.5^a | 43.2 ± 1.1^a | 33.1 ± 0.9^b | 0.000 |
| Relación N/C | 0.30 ± 0.003^a | $0.31 \pm 0.006^{a,b}$ | 0.32 ± 0.009^b | 0.036 |

Valores con diferente superíndice en la misma fila son significativamente diferentes.

7.4.1. Efecto de la temperatura sobre el diámetro teórico de los ovocitos posvitelogénicos

En la Figura 11 se muestra el efecto de la temperatura sobre el diámetro teórico de los ovocitos posvitelogénicos. Aquí se puede observar que el tamaño de los ovocitos posvitelogénicos del tratamiento a 20°C fue superior al de los dos tratamientos restantes ($P > 0.05$).

7.4.2. Efecto de la temperatura sobre el índice lipídico de los ovocitos posvitelogénicos

El IL de ovocitos posvitelogénicos a las distintas temperaturas y tiempos de inducción a la gametogénesis (Figura 12) fue superior a 20°C durante los 30 primeros días de inducción, e inferior a 30°C durante durante todo el experimento. Sin embargo, el IL fue superior a 25°C que a las dos temperaturas restantes al final del experimento (43 días), posiblemente como resultado de una mayor frecuencia de ovocitos posvitelogénicos y atrésicos con respecto a los vitelogénicos a esa temperatura y tiempo de inducción, como puede observarse en la Figura 10c.

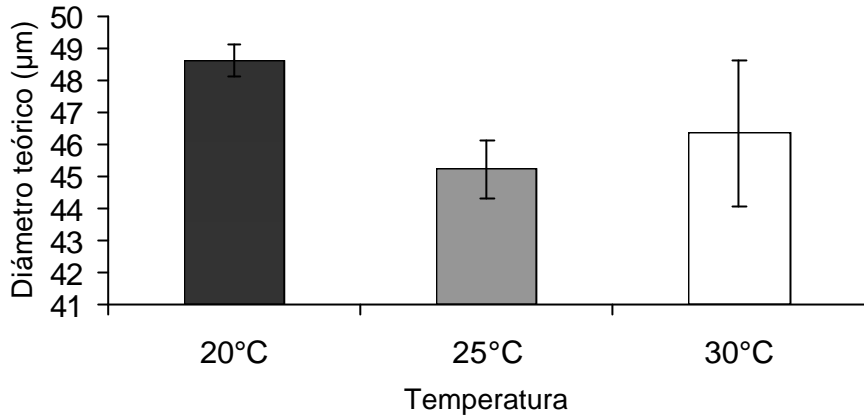


Figura 11. Diámetro teórico de los ovocitos posvitelogénicos a las tres temperaturas de inducción a la gametogénesis, independientemente de la fecha de muestreo.

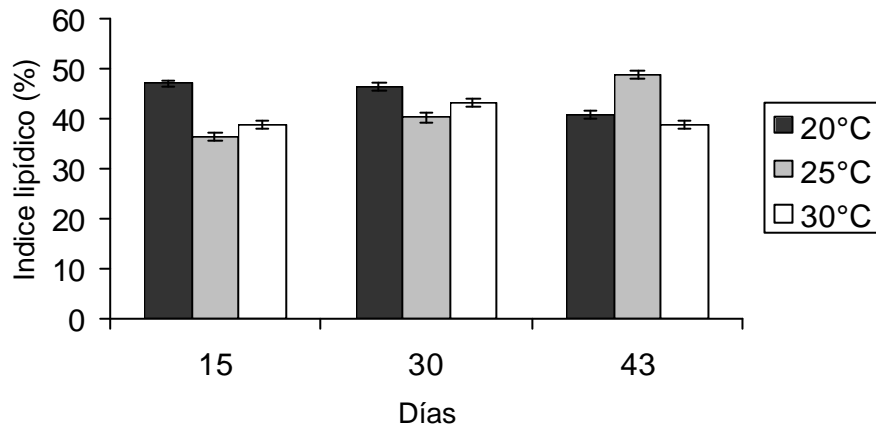


Figura 12. Índice lipídico de los ovocitos posvitelogénicos de *Atrina maura* inducidos a la gametogénesis a tres temperaturas a los 15, 30 y 43 días de muestreo.

7.5. Análisis comparativo de bs ovocitos en proceso de desove, provenientes de hembras maduradas en el laboratorio y en el medio natural.

7.5.1. Descripción del desove

Macroscópicamente la gónada cubre la región visceral, desde el músculo aductor posterior hasta la parte posterior del estómago. El análisis microscópico reveló una cápsula formada por tres capas de tejido que la rodean en su región más externa. La primera capa esta constituida por epitelio cúbico soportado por una membrana basal, seguida por una delgada capa de tejido conjuntivo que se entrelaza con tejido muscular liso. Este tejido perigonadal da soporte a los folículos o acinos. El extremo interior la gónada se encontró en estrecha relación con la glándula digestiva y el estómago unida por tejido conjuntivo. Durante el desove, la gónada conserva un arreglo glandular conformado por acinos rodeados de tejido conjuntivo interfolicular. Dentro de los acinos se observan escasos ovocitos previtelogénicos y vitelogénicos de forma pedunculada, abundantes ovocitos posvitelogénicos con un ovoplasma muy desarrollado, algunos se encuentran libres de la pared del acino (Figura 13). Estos ovocitos presentan la vesícula germinal rota (VGR) como indicio del reinicio de la meiosis (profase-dioteno). La VGR, ocurre de forma sincrónica entre ovocitos posvitelogénicos y atrésicos, mas no en ovocitos vitelogénicos. En la Figura 13 se observan además células auxiliares libres de la pared del acino, y ovocitos vitelogénicos unidos aún a las paredes de éste. Los ovocitos con la VGR presentaron las siguientes características morfológicas: ovocito normales de forma poligonal a redonda, ovocitos inmaduros piriformes adheridos a la pared del acino, y ovocitos atrésicos de escaso ovoplasma, con invaginaciones y prolongaciones de la membrana vitelina.

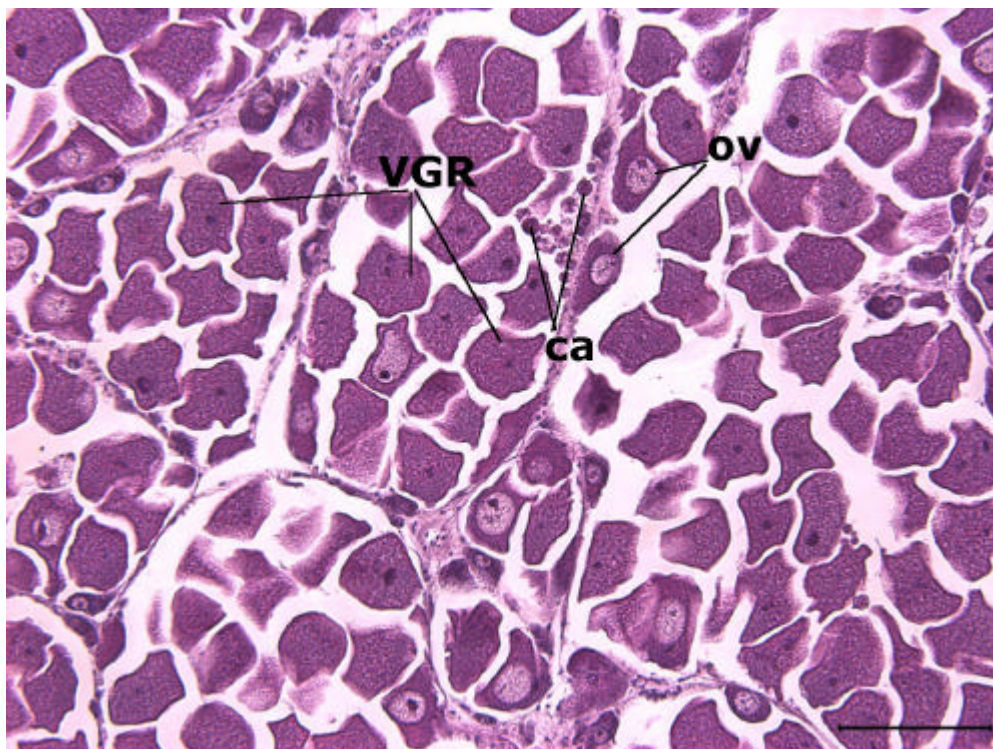


Figura 13. Micrografía de gónada de *Atrina maura* en proceso de desove madurada a 30°C durante 43 días. Se aprecian ovocitos con la vesícula germinal rota (VGR), células auxiliares (ca) libres de la pared del acino y ovocitos vitelogénicos (ov). 100X. Barra =200 µm. Tinción Hematoxilina-eosina.

7.5.2. Análisis morfométrico y de calidad de ovocitos provenientes de hembras maduras en el laboratorio vs. medio natural

En la Tabla 9 se muestra el DT y el IL de ovocitos en proceso de desove, provenientes de reproductores madurados en el laboratorio y en el medio natural. Aquí se puede apreciar que a pesar de que el tamaño del ovocito de la hembra del medio natural fue significativamente mayor, el IL fue muy superior en los ovocitos de laboratorio. Esto indica que el tamaño del ovocito no necesariamente es indicador de la cantidad de reservas energéticas disponibles en el ovocito, y se demuestra la utilidad del índice de calidad desarrollado.

Tabla 9. Diámetro teórico e índice lipídico de ovocitos en proceso de desove, madurados en el laboratorio y en el medio natural, independientemente de su categoría ovocitaria. Los valores son la media \pm el error estándar. $n=300$.

| Variable | Medio natural | Laboratorio | ANOVA |
|--------------------------------------|--------------------|--------------------|--------|
| | | | P |
| Diámetro teórico (μm^2) | 47.68 ± 0.7^a | 44.92 ± 0.8^b | 0.02 |
| Índice lipídico (%) | 17.38 ± 0.91^a | 34.58 ± 0.58^b | 0.0001 |

Valores con diferente superíndice en la misma fila son significativamente diferentes.

En la Figura 14 se muestran las preparaciones de ovocitos en proceso de desove madurados en el laboratorio y en el medio natural. Aquí se puede apreciar una gran similitud en cuanto a la morfología de los ovocitos, y en la distribución de los mismos en los acinos. También se observa en ambas imágenes la ocurrencia de ovocitos en las tres morfologías: inmaduros, normales y atrésicos.

7.5.3. Frecuencia de las categorías ovocitarias en hembras en proceso de desove maduradas en el laboratorio y en el medio natural

Los ovocitos que presentaron la VGR, fueron reclasificados por su forma en tres categorías de acuerdo a Dorange *et al.* (1989) en inmaduros, normales y atrésicos (Figura 15). Aquí se puede apreciar que los ovocitos normales tuvieron una mayor frecuencia que los pertenecientes a las dos categorías restantes independientemente de su origen, y que en las hembras maduradas en el laboratorio, el 65 % de los ovocitos fueron normales contra el 45 % en la hembra madurada en el medio natural. En esta figura, también se aprecia un mayor porcentaje (32%) de ovocitos atrésicos en las hembras del medio natural que en las del laboratorio (10%)

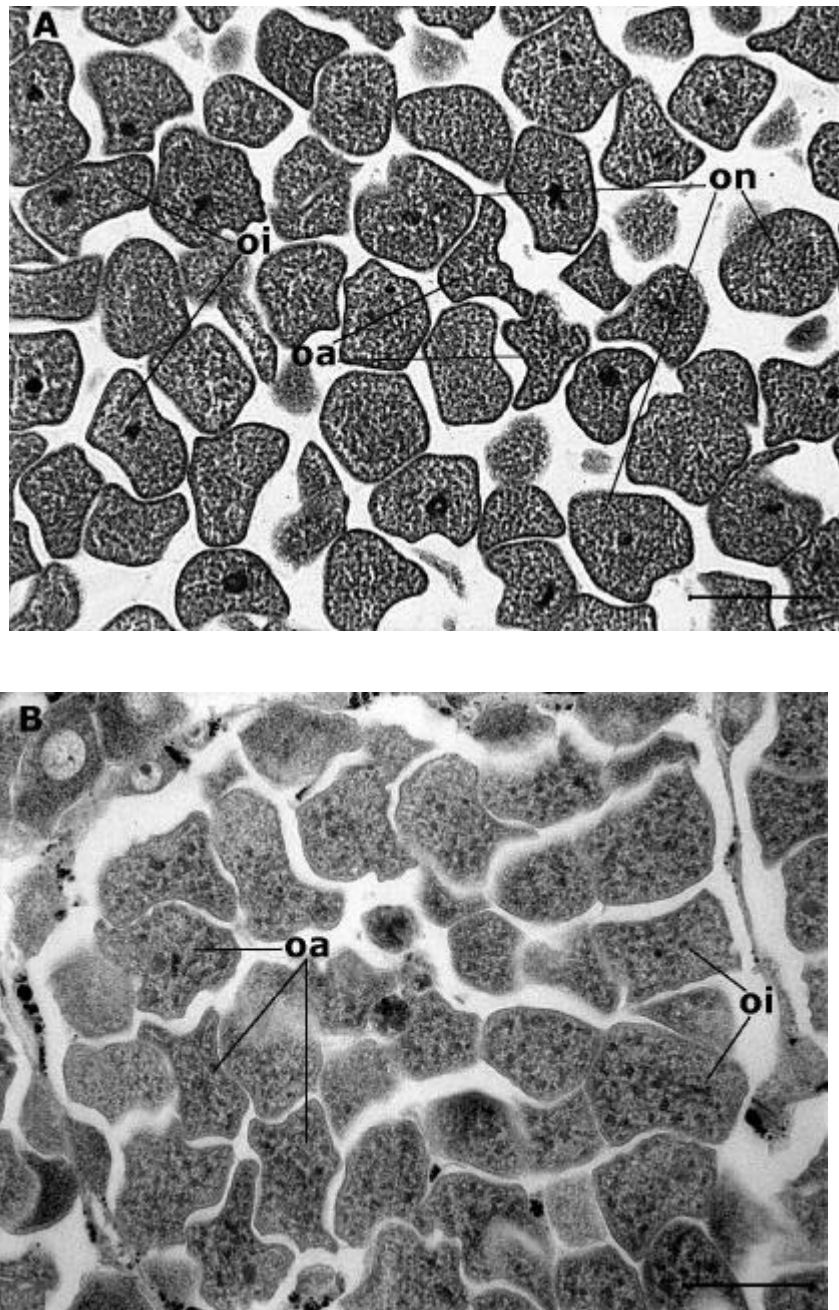


Figura 14. Micrografía de ovocitos de gónada de *Atrina maura* en proceso de desove. A) Hembra madurada en el laboratorio a 30°C durante 43 días. B) Hembra del medio natural. Ovocitos normales (on), ovocitos inmaduros (oi), ovocitos atrésicos (oa). 400X. Barra = 50 µm. Tinción Sudán Negro B.

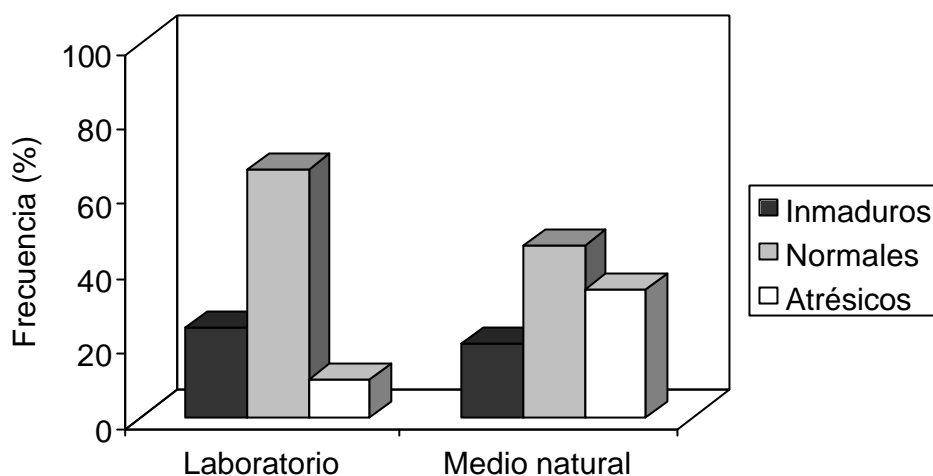


Figura 15. Frecuencia de las categorías ovocitarias de *Atrina maura* en proceso de desove, maduras en el laboratorio a 30°C durante 43 días y en el medio natural.

7.5.4. Índice lipídico por categoría ovocitaria en ovocitos en desove

En la Tabla 10 se observa un IL similar en ovocitos inmaduros y normales, y superior al obtenido en ovocitos atrésicos, independientemente del origen de los reproductores. Sin embargo, cuando el IL se calculó por categoría ovocitaria y tomando en cuenta el origen de los reproductores (Tabla 11), se observó que el índice fue significativamente mayor en las hembras de laboratorio que en las maduras en el medio natural en las tres categorías ovocitarias ($P > 0.00$). En la Tabla 11 también se puede observar que el IL de ovocitos atrésicos del laboratorio, fue significativamente menor que el de ovocitos inmaduros y normales del mismo origen. El coeficiente de heterogeneidad (varianza/media), indicó una alta heterogeneidad en los ovocitos de reproductores del medio natural.

Tabla 10. Índice lipídico de ovocitos en proceso de desove en las diferentes categorías ovocitarias, independientemente del origen de las hembras. Los valores son la media \pm el error estándar. $n=300$.

| Variable | Inmaduros | Normales | Atrésicos | ANOVA |
|---------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------|
| | | | | P |
| Índice lipídico (%) | 27.25 \pm 1.43 ^b | 27.08 \pm 1.22 ^b | 22.02 \pm 1.29 ^a | 0.02 |

Valores con diferente superíndice en la misma fila son significativamente diferentes.

Tabla 11. Comparación de las categorías ovocitarias de las hembras en proceso de desove (laboratorio y medio natural). ($P < 0.05$).

| Variable | Inmaduros | | Normales | | Atrésicos | |
|--------------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | Medio natural | Laboratorio | Medio natural | Laboratorio | Medio natural | Laboratorio |
| Índice lipídico (%) | 18.5 \pm 1.1 | 34.4 \pm 1.0 | 15.5 \pm 1.6 | 35.2 \pm 0.7 | 19.1 \pm 1.3 | 30.7 \pm 1.2 |
| Coefficiente de Heterogeneidad | 1.42 | 0.83 | 7.83 | 1.05 | 3.20 | 0.58 |
| <i>n</i> | 60 | 78 | 138 | 183 | 102 | 39 |

8. DISCUSIÓN

La evaluación histoquímica de las gónadas de *A. maura*, se realizó con el objetivo de establecer una metodología específica que nos permitiera una aproximación a la composición bioquímica de los gametos. Se pretende que dicha información apoye la evaluación oportuna de los desoves de organismos inducidos a la maduración y que estos sean comparados con los organismos provenientes del medio natural.

En el presente estudio se demostró la utilidad del fijador de tejidos Davidson en la aplicación de técnicas de tinción histoquímicas para lípidos neutros (triglicéridos) y lípidos polares (fosfolípidos) en cortes de parafina. Se seleccionó el colorante Sudán Negro B (SNB) por que es un lisocromo específico para triglicéridos y fosfolípidos. La validación del método aplicando la extracción de lípidos con la mezcla de cloroformo-metanol permitió cuantificar los lípidos de reserva en forma de triglicéridos y lípidos estructurales en forma de fosfolípidos en las muestras tratadas y no tratadas. Los resultados obtenidos indican que los triglicéridos son extraídos por este método y que los fosfolípidos no son susceptibles a ser eliminados por la mezcla de cloroformo-metanol en cortes histológicos.

La importancia de poder determinar la cantidad individual de triglicéridos por ovocito, radica en la facilidad de cuantificar estos componentes que han sido reportados por varios autores como el principal suministro de energía durante los primeros estadios de desarrollo larvario (Gallager y Mann, 1986; Fraser, 1989).

Los triglicéridos son lípidos de reserva energética que se transfieren de los progenitores a la progenie en moluscos (Holland, 1978). Besnard (1988) demostró que los lípidos, bajo la forma de triglicéridos, aseguran la conversión energética del desarrollo

embrionario y de los primeros estadios larvarios y Racotta *et al.* (2003b), indican que los triglicéridos son los lípidos más importantes para el almacenamiento de energía.

La técnica de tinción SNB en cortes de parafina ha sido aplicada en gónadas femeninas de otros grupos de organismos acuáticos, tanto moluscos como crustáceos y peces, dando resultados similares en cuanto a la reacción positiva de los triglicéridos contenidos en los ovocitos de *Cherax quadricarinatus* (Rodríguez-González, 2001; García-Guerrero, 2003) *Paralichthys californicus* (Burgos-Aceves, 2003), *Lutjanus argentiventris* (Martínez-Lagos, 2003), lo cual demuestra que esta técnica de tinción es específica para los triglicéridos que constituyen las lipoproteínas del vitelo de los ovocitos. Sin embargo esos trabajos solamente fueron cualitativos.

La evaluación cuantitativa de la histoquímica mediante el análisis digital de imágenes, es una metodología estandarizada y validada en este trabajo que nos permitió estudiar variables inaccesibles a métodos histológicos clásicos limitados a la apreciación cualitativa, la cual está sujeta a la capacidad visual del observador. A diferencia de las técnicas bioquímicas, ésta metodología provee información sobre la composición específica de las células sujetas a estudio, sin la fracción de las moléculas presentes en el tejido conjuntivo o bien otros tejidos presentes en los órganos analizados, ya que normalmente en los métodos bioquímicos no es posible separar las concentraciones de las biomoléculas por cada tipo celular presente en el tejido. Esta nueva herramienta tiene la ventaja de proporcionar más que un simple valor promedio, aportando precisión en la medición de los parámetros estudiados. Sin embargo, es necesario considerar la estandarización del método en cuanto a tiempos de tinción, grosor del corte y estado del colorante para poder contar con datos confiables. Además de considerar en la interpretación de los resultados, que el índice lipídico representa

una tasa de ocupación de lípidos en la superficie de la imagen que representa la distribución de los gránulos lipídicos en la superficie celular, por lo que es importante considerar el área del ovocito en el cálculo del IL y en otras variables derivadas del área como por ejemplo el diámetro. De acuerdo a lo anteriores se aplicó la metodología estándar propuesta por Saout *et al.* (1999), con la cual se obtiene el diámetro teórico a partir del área, evitando sesgo que pudiera darse al medir el eje mayor de los ovocitos debido a las formas irregulares que presentan durante la ovogénesis. Esta metodología evita caer en el error de establecer el diámetro de los ovocitos de forma arbitraria, ya que es muy usual tomar un eje mayor como el que se observa en los ovocitos vitelogénicos pedunculados que aún se encuentran unidos a la pared del acino. En éstos el eje mayor es superior al de cualquier ovocito maduro.

Como ha sido reportado en otros trabajos, la inducción a la gametogénesis y la maduración gonádica bajo condiciones de temperatura controlada, ha sido probada en varias especies de moluscos bivalvos, teniendo un efecto diferente para cada una de ellas con respecto al tiempo de inducción. Enríquez-Díaz (2000) indujo la gametogénesis en *A. maura* durante 20 días a 20°C y describió la generación de tres cohortes ovocitarias, además determinó que los ovocitos en degeneración se presentan a partir de los 30 días con un diámetro promedio de 58 µm (46-65 µm). En el presente estudio también se observan tres cohortes ovocitarias. Sin embargo, los ovocitos en degeneración o atrésicos (41.76 ± 1.32 µm), son más pequeños que los ovocitos normales (47.63 ± 0.57 µm) ($P = 0.000$). Estos resultados coinciden con de Gaulejac *et al.* (1995a), quien describe que los ovocitos atrésicos de *Pinna nobilis* son de diámetro pequeño. Por lo anterior existe la posibilidad de que se estén observando dos fenómenos diferentes en el proceso de degeneración

celular, uno que da cómo resultado el crecimiento anormal de ovocitos sobre madurados y otro que produzca ovocitos atrésicos.

La aplicación de las tres temperaturas fue efectiva para la inducción a la gametogénesis de *Atrina maura*. El efecto de la temperatura sobre las variables morfométricas y de calidad de los ovocitos fue demostrado cuantitativamente mediante todos los análisis estadísticos aplicados. Los resultados obtenidos sugieren que para que se efectúe la transferencia de nutrientes necesarios para el crecimiento de los ovocitos durante la vitelogénesis (Sastry, 1968; 1970, Sastry y Blake, 1971; Blake, 1972, Sastry, 1979), la temperatura óptima de maduración en *A. maura* es 20°C. A esta temperatura se observa un desarrollo gradual de la gametogénesis, y la aparición de los ovocitos atrésicos se presenta 30 días después del inicio de la inducción a la gametogénesis, además de que a 20°C el IL (44.79 ± 0.8) fue mayor que a 25°C (IL = 41.1 ± 1.0) y a 30°C (IL = 40.3 ± 0.6). No obstante, a la temperatura de 25°C el IL se incrementó de forma gradual, siendo mayor para el día 43. Esto podría ser importante considerarlo como una ventaja ya que la energía empleada en el crecimiento de los ovocitos y por consecuencia en la depositación de lípidos en el ovoplasma, sugiere que mayor eficiencia en el manejo de energía del organismo. Además, la frecuencia de ovogonias y ovocitos previtelogénicos es más elevada a 25°C que a otras temperaturas hasta el día 43. Esto podría ser un indicador de que esta temperatura es adecuada para la preparación de varias cohortes ovocitarias, y del potencial para producir varios desoves en un mismo período reproductivo. Sin embargo, a esta temperatura los ovocitos atrésicos se presentan a partir del día 15 y con mayor frecuencia hasta el día 43.

El IL más alto registrado durante la inducción a la gametogénesis se presentó a los 15 días a la temperatura de 20°C. Esto posiblemente

se debe a que la incorporación de lípidos al ovocito ocurre en etapas tempranas de la vitelogénesis, posiblemente durante la vitelogénesis exógena a esta temperatura, mientras que el crecimiento posterior del ovocito se da por la autosíntesis (vitelogénesis endógena). En otros moluscos como *Crassostrea virginica* la vitelogénesis ocurre a través de un proceso de autosíntesis, que involucra la combinación de la actividad del complejo de Golgi y el retículo endoplásmico rugoso, y la heterosíntesis en que precursores extraovéricos son incorporados al ovocito vía endocitosis, envolviendo la superficie basal del ovocito (Eckelbarger y Davis, 1996).

Los resultados obtenidos a las temperaturas de 25 y 30°C sugieren una aceleración del crecimiento de los gametos, efectiva en los primeros 15 días sobre todo en los ovocitos vitelogénicos. Sin embargo, esta aceleración produjo cambios en el volumen celular que se reflejaron en la talla, forma y cantidad de triglicéridos (IL) de cada ovocito.

Los ovocitos atrésicos o en degeneración son un fenómeno observado en los ovocitos de bivalvos que se presenta más comúnmente en ovocitos vitelogénicos (Lubet *et al.*, 1987; de Gaulejac *et al.*, 1995^a; Valdez-Ramírez *et al.*, 2002). La degeneración ocurre tanto a nivel estructural como de reservas vitelinas. Las principales características de estos ovocitos son la degeneración del retículo endoplásmico, el deterioro del núcleo y rompimiento de las membranas plasmática y vitelina. En los ovocitos atrésicos de *A. maura* se observó evidencia del deterioro de las membranas en la forma y el tamaño de los ovocitos atrésicos, siendo estos mas pequeños y con un IL inferior a los ovocitos normales. Tomando en cuenta el concepto de homeostasis celular, los ovocitos atrésicos posiblemente sufrieron un cambio funcional ante el efecto de un factor determinante como la temperatura. Los ovocitos atrésicos presentaron una alteración del volumen celular, lo que se

demostró en las tallas de los ovocitos más chicos a las temperaturas de 25 y 30°C, con la aparición de prolongaciones e invaginaciones de la membrana.

Estas respuestas morfológicas se ven reflejadas en la variabilidad del índice lipídico como resultado al cambio funcional de la célula. En *Pecten maximus* se ha encontrado que en los gametos donde la vitelogénesis está alterada, existe una polarización de lípidos (Le Pennec *et al.*, 1990). Dorange (1989) menciona que en *P. maximus* los ovocitos provenientes de progenitores originarios de la Bahía de St. Brieuc muestran frecuentes anomalías ultraestructurales, (ovocitos atrésicos). Diferencias similares han sido observadas por Paulet *et al.* (1988) en ovocitos provenientes de progenitores del medio natural. En este trabajo, los desoves de progenitores inducidos a la gametogénesis en el laboratorio produjeron un porcentaje inferior de ovocitos atrésicos, comparativamente con los provenientes del medio natural.

La revisión de los cortes en serie de las gónadas femeninas de *A. maura*, permitió conocer que el mecanismo de expulsión de gametos, es diferente al reportado para otras especies de bivalvos. Por ejemplo, la almeja catarina (*Argopecten ventricosus*) presenta glándulas unicelulares mucosas que facilitan el movimiento de los gametos a través de los conductos del desove (Lora-Vilchis *et al.*, 2003). En *A. maura* no se presentan conductos con células mucosas que ayuden a la expulsión de los gametos. El reinicio de la meiosis, también llamado maduración meiótica, caracterizado por el rompimiento de la vesícula germinal (Raven, 1966), fue observado en los ovocitos de *A. maura* durante el desove. Estos resultados permitieron observar que el reinicio de la meiosis puede ocurrir tanto en ovocitos libres en el lumen del acino como en ovocitos pedunculados unidos a la pared de este, que han alcanzado aparentemente la madurez, y también en ovocitos atrésicos.

Como se ha mencionado, el índice lipídico de los ovocitos en desove de las hembras maduras a 30°C, fue mayor que en los ovocitos de la hembra proveniente del medio natural, aún cuando a 30°C el AO y el IL presentaron valores bajos comparados con los obtenidos a las temperaturas de 20 y 25°C. Leyva-Valencia (1999) definió la temperatura óptima para el crecimiento en juveniles de 1.3-3.3 cm de longitud de esta misma especie en 29°C, basándose en algunos indicadores fisiológicos como el marco de actividad. Esta temperatura es superior a la encontrada en el presente estudio como óptima para la maduración reproductiva, lo cual sugiere que la temperatura óptima puede variar conforme a la edad y/o a la talla del individuo, o bien que las temperaturas óptimas para el crecimiento y para la maduración reproductiva sean diferentes. Por ejemplo, González-Estrada (2003) demostró en juveniles de almeja mano de león *Nodipecten subnodosus* cultivados a temperaturas entre 15 y 30°C, que la tasa de crecimiento de la concha no coincidió con el crecimiento en biomasa ni con el potencial del crecimiento. La tasa de crecimiento en biomasa y el potencial de crecimiento fueron máximos a 22°C y mínimos a 30°C, mientras que el crecimiento en concha fue similar a 22°C y a 30°C

El fundamento de la relación N/C es que en las células, el núcleo alcanza su mayor tamaño en algún momento de ciclo celular, en el caso de ovocitos esto ocurre hasta la fase posvitelogénica. Entonces el núcleo representa un patrón de referencia con respecto al crecimiento de otros organelos o componentes de la célula, como el citoplasma. En este estudio se encontró que la relación N/C es un indicador histológico de calidad útil para comparar ovocitos de la misma categoría, como fue el caso de los posvitelogénicos atrésicos e inmaduros, en donde la relación N/C fue significativamente ($P=0.036$) mayor en los primeros. Sin

embargo la relación N/C no es adecuada para comparar ovocitos de todas las tallas o categorías entre sí.

El coeficiente de heterogeneidad mostró que el IL es más variable en la gónada de las hembras provenientes del medio natural. Este resultado es importante considerarlo cuando se seleccionan los reproductores para la obtención de larvas, ya que es posible que se obtengan malos resultados cuando se utilicen organismos sin haberse madurado en el laboratorio, en donde se sincronizan los estadios de madurez ovocitaria y mejora la calidad de los gametos. Es importante evaluar si las variaciones que presentan las hembras del medio natural se deben al agotamiento de los organismos al final del período de reproducción o determinar que factores influyen en la variación de los indicadores morfológicos y de calidad. A pesar de que estos resultados provienen de 6 hembras en desove (3 del laboratorio y 3 del medio natural), representan un elevado grado de confiabilidad ya que se evaluaron 100 ovocitos por organismo (600 ovocitos en total).

Estos resultados pueden ayudar a explicar el poco éxito de los cultivos larvarios de esta especie. En este sentido, Robles-Mungaray (2004) encontró que los cultivos larvarios de *A. maura* que han dado mejores resultados, son aquellos provenientes de organismos madurados en el laboratorio. Resultados similares obtuvo Villegas-Carrasco (2004) quien evaluó 11 cultivos larvarios en la almeja mano de león *Nodipecten subnodosus*.

9. CONCLUSIONES

- El análisis de imágenes aplicado a los análisis histoquímicos permitieron obtener información cuantitativa de los ovocitos durante la gametogénesis inducida en *A. maura* a las tres temperaturas. De esta forma se identificaron diferencias en el índice lipídico (IL) de los ovocitos a cada temperatura, siendo la temperatura de 20°C la más adecuada para la inducción a la maduración, como lo demostraron los análisis de las variables de calidad y morfométricas de los ovocitos.
- La validación de la técnica de tinción Sudán Negro B empleada en cortes de parafina, permitió la cuantificación de lípidos neutros o de reserva (triglicéridos) y lípidos estructurales (fosfolípidos).
- El análisis de relación entre las variables morfométricas del ovocito (área, diámetro teórico, relación núcleo/citoplasma) y de calidad (índice lipídico) de las categorías ovocitarias, permitió identificar las diferencias entre los ovocitos en cada estadio de desarrollo gametogénico a las tres temperaturas de inducción a la gametogénesis.
- La temperatura de 20°C es la más adecuada para la inducción a la gametogénesis, como lo demostraron los análisis de las variables de calidad y morfométricas de los ovocitos
- El análisis individual de los ovocitos en desove, permitió identificar una alta heterogeneidad del contenido lipídico entre los ovocitos de las hembras del medio natural. Los ovocitos normales fueron mas heterogéneos en IL que los inmaduros y atrésicos.
- Las tres categorías de los ovocitos de las hembras del laboratorio fueron menos heterogéneos en IL .
- A pesar de que los ovocitos de las hembras en desove que fueron maduras a 30°C presentaron el menor IL promedio, éste fue

mayor que el IL de los ovocitos de las hembras silvestres. Esto debe ser considerado para la producción de juveniles en el laboratorio.

- Los ovocitos atrésicos se presentaron con mayor frecuencia durante la gametogénesis inducida las temperaturas de 25 y 30°C y permanecieron presentes hasta el momento de la emisión de los gametos en las hembras a 30°C.
- La talla de ovocitos en degeneración o atrésicos son diferentes a las tallas de los ovocitos sobremadurados reportados por Enriquez-Díaz *et al.* (2000) para esta especie, lo cual sugiere la ocurrencia de dos fenómenos de degeneración celular diferentes.
- Por los resultados obtenidos, no es recomendable utilizar gametos de reproductores recién colectados del medio natural para la producción de larvas en el laboratorio. La inducción a la maduración en condiciones controladas de alimento y temperatura pueden garantizar mejores resultados en los cultivos larvarios.

10. RECOMENDACIONES

- Se recomienda la inducción a la gametogénesis de *Atrina maura* a temperatura de 20°C.
- Se recomienda emplear organismos en la misma etapa de desarrollo gametogénico, y de ser posible permitir que los organismos hayan pasado por un período de reposo para evitar la mezcla de gametos residuales (atrésicos o en reabsorción).
- Es recomendable usar reproductores madurados en el laboratorio, ya que además de ser de mayor calidad, presentan mayor homogeneidad en cuanto al estadio de desarrollo de los ovocitos.
- Para la maduración de reproductores de *Atrina maura* se recomienda el uso de un sistema de flujo continuo y abierto como el empleado en este estudio, el cual dosifica el alimento a las concentraciones de microalgas deseadas durante largos periodos de tiempo.
- Para la determinación de las condiciones óptimas de maduración reproductiva en otras especies de moluscos, se recomienda el uso de la metodología de análisis de imágenes e histoquímica empleada en este estudio.

11. LITERATURA CITADA

- Ansell, A. D. 1974. Seasonal changes in biochemical composition of the bivalve *Chlamys septemradiata* from the Clyde Sea area. *Mar. Biol.* 25:85-99.
- Arcos-Ortega, F. G. 2003. Análisis fisiológico y genético del desempeño reproductivo del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Tesis de Doctorado, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, B.C.S., México, 255 pp.
- Arizpe-Covarrubias, O. y R. Félix-Uraga. 1986. Crecimiento de *Pinna rugosa* (Sowerby,1835) en la Bahía de La Paz, México. *An. Inst. Cien. Mar. Limnol.* Universidad Nacional Autónoma de México. 13(2):167-172.
- Arizpe-Covarrubias, O. 1995. Mortality, growth and secondary somatic production of the bivalve, *Pinna rugosa* (Sowerby), in suspended and bottom culture in Bahia de La Paz, México. *Aquac. Res.* 26:843-853.
- Anónimo. 1994. Atlas Pesquero de México. Instituto Nacional de la Pesca. SEPESCA. México. 234 pp.
- Baqueiro, E. y M. Castagna. 1988. Fishery and culture of selected bivalves in México: Present, past, and future. *J. Shellfish Res.* 7:433-443.
- Baqueiro, C. E., J. A. Massó y H. Guajardo. 1982. Distribución y abundancia de moluscos de importancia comercial en Baja California Sur, México. Instituto Nacional de la Pesca, México. Serie de Divulgación. (11):32 pp.
- Bancroft, J. D. y A. Stevens. 1990. Theory and practice of histological techniques. New York: Churchill Livingstone. 249 pp.

- Barber, B. J. y N. J. Blake. 1983. Growth and reproduction of the bay scallop, *Argopecten irradians* (Lamarck) at its southern distribution limit. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 66:247-256.
- Barber, B. J. y N. J. Blake. 1981. Energy storage and utilization in relation to gametogenesis in *Argopecten irradians concentricus* (Say). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 52:121-134.
- Barber, B. J. y N. J. Blake. 1991. Reproductive physiology. En: S.E. Shumway, (ed.). *Scallops: biology, ecology and aquaculture*. New York: Elsevier. pp. 377-428.
- Barnes, R. D. y E. E. Ruppert 1996. *Zoología de los Invertebrados*. México: McGraw-Hill Interamericana. 1114 pp.
- Bayliss, H. O. 1984. Lipid histochemistry (Microscopy handbooks 6). Department of pathology, Guy's Hospital Medical School London Oxford University Press. *Royal Microscopical Society* 68 pp.
- Bayne, B. L., P. A. Gabott y J. W. Widows. 1975. Some effects of stress in the adult on the eggs and larvae of *Mytilus edulis* L. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 55:675-689.
- Bayne, B. L. 1976. Aspects of reproduction in bivalve mollusks. En: M. Wiley (ed.), *Estuarine Processes*. Vol.1. London: Academic Press. pp. 432-448.
- Bayne, B. L., A. Bubel, P. A. Gabbott, D. R. Livingston, D. M. Lowe y M. N. Moore. 1982. Glycogen utilization and gametogenesis in *Mytilus edulis* L. *Mar. Biol.* 3:89-105.
- Bayne, B. y R. Newel. 1983. Bivalves. En: *Mollusca 1: Physiology*, Vol. 4, Verdonky A. N. y J. Van den Biggelaar, (eds.). New York: Academic Press. pp. 1-64.
- Besnard, J. Y. 1988. Etude des constituants lipidiques dans la gonade femelle et les larves de *Pecten maximus* L. (Mollusque Lamellibranche). Tesis de Doctorado, Université de Caen. Francia, 154 pp.

- Blake, N. J. 1972. Environmental regulation of neurosecretion and reproductive activity in the bay scallop, *Aequipecten irradians* (Lamarck). Tesis de Doctorado, University of Rhode Island, Kingston, 161 pp.
- Blake, N. J. y A. N. Sastry. 1979. Neurosecretory regulation of oögenesis in the bay scallop *Argopecten irradians* (Lamarck). En: E. Naylor y R. G. Hartnoll (eds.). Cyclic Phenomena in Marine Plants and Animals. New York: Pergamon Press. pp. 181-190.
- Briarty, L. G. 1975. Stereology methods for quantitative light and electron microscopy. *Sci. Prog.* 62:1-32.
- Brisson, P. y J. Regondaud. 1989. Origin and structure of the presumptive gonad in basommatophoran pulmonate gastropods. *Malacologia* 16 (2):457-466.
- Brusca, C. R. 1980. Common Intertidal Invertebrates of the Gulf of California. Tucson, Arizona: Univ. Arizona Press. 512 pp.
- Burgos-Aceves, M. A. 2003. Maduración gonadal de hembras del lenguado *Paralichthys californicus* en el medio natural. Tesis de Maestría, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, B.C.S., México, 100 pp.
- Cardoza-Velazco, F. y A. N. Maeda-Martínez. 1997. An approach to aquacultural production of the penshell *Atrina maura* Sowerby, 1835 (Bivalvia: Pinnidae) in northwest México. *J. Shellfish Res.* 16:311.
- Ceballos-Vázquez, B. P., I. S. Racotta y J. F. Elorduy-Garay. 2003. Qualitative and quantitative analysis of the ovarian maturation process of *Penaeus vannamei* after a production cycle. *Invert. Rep. Develop.* 43:9-18.

- Cendejas, J. M., M. G. Carvallo y L. M. Juárez. 1985. Experimental spat collection and early growth of the Pen shell, *Pinna rugosa* (Pelecypoda: Pinnidae) from the Gulf of California. *Aquaculture* 48:331-336.
- Diario Oficial de la Federación. 2004. Poder Ejecutivo. Secretaría de Seguridad Pública. (Segunda Sección).
- de Gaulejac, B., M. Henry y N. Vicente. 1995a. An ultrastructural study of gametogenesis of the marine bivalve *Pinna nobilis* (Linnaeus, 1758). I. Oogenesis. *J. Moll. Stud.* 61:375-392.
- de Gaulejac, B., M. Henry y N. Vicente. 1995b. An ultrastructural study of gametogenesis of the marine bivalve *Pinna nobilis* (Linnaeus, 1758). II Spermatogenesis. *J. Moll. Stud.* 61:393-403.
- Devauchelle, N. y C. Mingant. 1991. Review of the reproductive physiology of the scallop, *Pecten maximus*, applicable at intensive aquaculture. *Aquat. Living. Resour.* 4:1-11.
- Dorange, G., Y. M. Paulet., M. Le Pennec y J. C. Cochard. 1989. Critères histologiques d'évaluation de la qualité des ovocytes émis par *Pecten maximus* (Mollusque, Bivalve).C.R. *Adac. Sci. Paris* 309(3):113-120.
- Dorange, G. 1989. Les gametes de *Pecten maximus* L. (Mollusca, Bivalvia). Tesis de Doctorado, Universite de Bretagne Occidentale, Francia, 140 pp.
- Enríquez-Díaz, M.R. 2000. Estudios citológicos y químicos en el músculo, glándula digestiva y gónada durante la gametogénesis inducida de *Atrina maura* (Sowerby, 1835). Tesis de Maestría en Ciencias en Acuicultura, Universidad Autónoma de Baja California Sur, La Paz, B.C.S., México, 63 pp.

- Enriquez-Díaz, M., C. Cáceres-Martínez, J. Chávez-Villalba, G. Le Pennec y M. Le Pennec. 2003. Gametogenesis of *Atrina maura* (Bivalvia:Pinnidae) under artificial conditions. *Invert. Rep. Develop.* 43:151-161.
- Eckelbarger, K. J., y C. V. Davis. 1996. Ultrastructure of the gonad and gametogenesis in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. I. Ovary and oogenesis. *Mar. Biol.* 127:79-87.
- Fang, Y. y X. Qi. 1988. Studies on ultrastructure of oocyte in process of maturing in pen shell. *Acta Oceanologica Sinica* 7(3):459-472.
- Fraser, A. J. 1989. Triacylglycerol content as a condition index for fish, bivalve, and crustacean larvae. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 46:1868-1873.
- Gabbott, P. A. 1975. Storage cycles in marine bivalve mollusks: a hypothesis concerning the relationship between glycogen metabolism and gametogenesis. En: Barnes H. (ed.). 9th European Marine Biology Symposium, Aberdeen University Press. pp. 191-211.
- Gallager, S. M. y R. Mann. 1986. Growth and survival of larvae of *Mercenaria mercenaria* (L.) and *Crassostrea virginica* (Gmelin) relative to broodstock conditioning and lipid content of eggs. *Aquaculture* 56:105-121.
- Gallager, S. M., R. Mann y G.C. Sasaki. 1986. Lipid as an index of growth and viability in three species of bivalve larvae. *Aquaculture* 56:81-103.
- García-Guerrero, M. 2003. Análisis bioquímico y morfológico del desarrollo embrionario y postembrionario del acocil *Cherax quadricarinatus* (Von Martens, 1868); DECAPODA: PARASTACIDAE. Tesis de Doctorado, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, B.C.S., México, 103 p.

- Giese, A.C. y J. S. Pearse. 1974. Introduction: general principles. En: A.C. Giese y J. S. Pearse (ed.). *Reproduction of marine invertebrates*. New York: Academic Press. pp. 1-49.
- González-Corona, M. E. 2003. Estudio de la fisiología reproductiva y gametogénesis del callo de hacha *Atrina maura*, (Sowerby, 1835). Tesis de Maestría en Ciencias, Universidad de Sonora. Hermosillo, Son., México, 74 pp.
- González-Estrada, F. 2003. Temperaturas letales y temperaturas óptimas para crecimiento de una población de almeja mano de león (*Nodipecten subnodosus* Sowerby, 1835). Tesis de Maestría, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. La Paz, B.C.S., México, 90 pp.
- Heffernan, P. B. y R.L. Walker. 1989. Quantitative image analysis methods for use in histological studies of bivalves reproduction. *J. Moll. Stud.* 55: 135-137.
- Holguín-Quñones, O. y A. González-Pedraza, 1994. Moluscos de la Franja Costera de Michoacán, Colima y Jalisco, México. Instituto Politécnico Nacional. 153 pp.
- Holland, D.L. 1978. Lipid reserves and energy metabolism in the larvae of benthic marine invertebrates. *Biochem. Biophys. Pers. Mar. Biol.* 4:84-123.
- Howard, D. W. y C. S. Smith. 1983. Histological techniques for marine bivalve mollusks. National Oceanic and Atmospheric Administration. Technical Memorandum NMFS-F/NEC-25. U.S. Department of Commerce. 95 pp.
- Humason, L. G. 1979. *Animal Tissue Techniques*. San Francisco: W.H. Freeman and Company (ed.). Cuarta edición. 661 pp.

- Keen, M. A. 1971. Sea Shells of Tropical West America. Marine Mollusks from Baja California to Peru. Standford, California: Stanford University Press. 1064 pp.
- Krauter, J. N., M. Castagna y R. Van Dessel. 1982. Egg size and larval survival of *Mercenaria mercenaria* (L.) and *Argopecten irradians* (Lamarck). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 56:3-8.
- Leyva-Valencia, I. 1999. Termotolerancia, halotolerancia y temperatura óptima en juveniles de callo de hacha (*Atrina maura* Sowerby, 1835). Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Iztalaca, México, 54 pp.
- Le Pennec, M., F. Gueguen, J. C. Cochard, Y. M. Paulet y G. Dorange. 1990. Relations entre le contenu lipidique des ovocytes de *Pecten maximus* et les performances des larves en élevage. *Haliotis* 10: 101-113.
- Lodeiros, C. J., J. J. Rengel, H. Guderley, O. A. Nusetti y J. H., Himmelman. 2001. Biochemical composition and energy allocation in the tropical scallop *Lyropecten (Nodipecten) nodosus* during the months leading up to and following the development of gonads. *Aquaculture* 199:63-72.
- Loosanoff, V. L. y H. C. Davis. 1963. Rearing of bivalve molluscs. *Adv. Mar. Biol.* 1:1-36.
- Lora-Vilchis, M. C., P. Saucedo, C. Rodríguez-Jaramillo y A. Maeda-Martínez. 2003. Histological characterization of the spawning process in the catarina scallop, *Argopecten ventricosus* (Sowerby II, 1842) induced by thermal shock and serotonin injection. *Invert. Rep. Develop.* 44:79-88.
- Lowe, D. M., M. N. Moore y B. L. Bayne. 1982. Aspects of gametogenesis in the marine mussel *Mytilus edulis* L. *J. Mar. Biol. Ass. U. K.* 62:133-145.

- Lubet, P., J. Y. Besnard, R. Faveris y I. Robbins. 1987. Physiologie de la reproduction de la coquille St Jacques (*Pecten maximus* L.) *Oceanis* 13(3): 265-290.
- MacDonald, B. A., y R. J. Thompson, 1986. Influence of temperature and food availability on the ecological energetics of the giant scallop *Placopecten magellanicus*. III. Physiological ecology, the gametogenic cycle and scope for growth. *Mar. Biol.* 93:37-48.
- Maeda-Martínez, A., P. Monsalvo-Spencer y T. Reynoso-Granados. 1996. Acondicionamiento, inducción al desove y obtención de embriones de Callo de Hacha *Atrina maura* (Mollusca: Pinnidae). Lab. de Ecofisiología y Cultivos Marinos. Div. de Biología Marina. Informe Interno CIBNOR, La Paz, B. C. S., México. pp. 167-175.
- Maminishkis, A. A., N. K. Gorlina y A. N. Cheredeev. 1995. A model for assessment of fibroblast morphology. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika* 5:16-20.
- Mann, R. y S. M. Gallager. 1985. Physiological and biochemical energetics of larvae of *Teredo navalis* L. *Bankia gouldi* (Bartsch) (Bivalvia:Teredenidae). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 85:1-18.
- Marty, Y., F. Delaunay, J. Moal y J. F. Samain. 1992 Changes in the fatty acid composition of *Pecten maximus* (L) during larval development. *J. Exp. Biol. Ecol.* 163:221-234.
- Martínez-Lagos, R. A. 2003. Maduración y desove del pargo amarillo *Lutjanus argentiventris* en condiciones controladas de temperatura y fotoperiodo. Tesis de Maestría, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, B.C.S., México, 78 pp.
- Mathieu, M. y P. Lubet. 1993. Storage tissue metabolism and reproduction in marine bivalves-a brief review. *Invert. Rep. Develop.* 23:123-129.

- Noguera, F. O. y S. Gómez-Aguirre. 1972. Ciclo sexual de *Pinna rugosa* Sowerby (Lamellibranchia, Pinnidae) de la Paz, B.C.S. México. Memorias del IV Congreso Nacional de Oceanografía. México. 273-282.
- Paulet, Y. M., A. Lucas y A. Gérard. 1988. Reproduction and larval development in two *Pecten maximus* (L.) populations from Brittany. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 119:145-156.
- Paulet, Y. M. 1990. Role of reproduction in the determinism of recruitment in *Pecten maximus* (L) from the Bay of Saint Brieuc. Tesis de Doctorado, Universite de Bretagne Occidentale, Francia, 340 pp.
- Pearce, E. A. G., 1985. Histochemistry theoretical and applied. Vol. 2. New York: Churchill Livingstone. 237 pp.
- Racotta, I. S., J. L. Ramírez, A. M. Ibarra, M. C. Rodríguez-Jaramillo., D. Carreño y E. Palacios. 2003a. Growth and gametogenesis in the lion-paw scallop *Nodipecten (Lyropecten) subnodosus*. *Aquaculture* 217: 335-349.
- Racotta, I. S., E. Palacios y A. M. Ibarra. 2003b. Shrimp larval quality in relation to broodstock condition. *Aquaculture* 227:107-130.
- Raven, C. P. 1966. Morphogenesis: The Analysis of Molluscan Development, C.P. Raven (ed.). Oxford: Pergamon Press. 365 pp.
- Reynoso-Granados, T., A. N. Maeda-Martínez, F. Cardoza-Velasco y P. Monsalvo-Spencer. 1996. Cultivo de hacha. En: M. Casas-Valdez y G. Ponce-Díaz (eds.). Estudio del Potencial Pesquero y Acuícola de Baja California Sur. La Paz, B.C.S., México. CIBNOR. pp. 545-550.
- Robles-Mungaray, M., S. J. Serrano-Guzmán y F. Hoyos-Chaires. 1996. Cultivo de larvas y semillas de callo de hacha *Atrina maura* (Sowerby,1835) en el CREMES de Bahía Kino, Son. Méx. Resúmenes del XI Simposium Internacional de Biología Marina. La Paz, B.C.S. 25 al 30 de Nov.

- Robles-Mungaray, M. 2000. Antecedentes del cultivo de callo de hacha. Participación en el Foro Tecnológico de Acuicultura (camarón, ostión, y callo de hacha) organizado por la Universidad Autónoma de Baja California Sur. La Paz, B.C.S., 6 y 7 de Noviembre.
- Robles-Mungaray M. 2004. Desarrollo de la biotecnología para la producción de semilla diploide y triploide de callo de hacha *Atrina maura* en el laboratorio. Tesis de Maestría, Universidad Autónoma de Baja California Sur, La Paz, B.C.S., México, en preparación.
- Rodríguez-González, H. 2001. Efecto del nivel de proteínas y lípidos en el desarrollo de la gónada de hembras de la langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus* (Von Martens). Tesis de Maestría, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, B.C.S., México, 69 pp.
- Rodríguez-Jaramillo, C., A. N. Maeda-Martínez, M. E. Valdez, T. Reynoso-Granados, P. Monsalvo-Spencer, D. Prado-Ancona, F. Cardoza-Velasco, M. Robles-Mungaray y M. T. Sicard. 2001. The effect of temperature on the reproductive maturity of penshell *Atrina maura* (Sowerby, 1835) (Bivalvia:Pinnidae). *J. Shellfish Res.* 20(1):39-47.
- Ruiz-Verdugo, C. A. y C. Cáceres-Martínez. 1990. Estudio preliminar de captación de juveniles de moluscos bivalvos en la Bahía de La Paz, B.C.S. México. *Inv. Mar. CICIMAR* 15(1):29-38.
- Ruiz-Durá, M. 1990. Recursos Pesqueros de las costas de México. México, D.F. Ed. Limusa. 156 pp.
- Sastry, A. N. 1963. Reproduction of the bay scallop, *Aequipecten irradians* Lamarck. Influence of temperature on maturation and spawning. *Biol. Bull.* 125:146-153.

- Sastry, A. N. 1966. Temperature effects in reproduction of the bay scallops, *Aequipecten irradians* Lamarck. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 130:118-134.
- Sastry, A. N. 1968. Relationships among food, temperature and gonad development of the bay scallop, *Aequipecten irradians concentricus* Say, reared in the laboratory. *Bull. Mar. Sci.* 15:417-435.
- Sastry, A. N. 1970. Environmental regulation of oöcyte growth in the bay scallop *Aequipecten irradians* Lamarck. *Experientia* 26:1371-1372.
- Sastry, A. N. y N. J. Blake. 1971. Regulation of gonad development in the bay scallop, *Aequipecten irradians* Lamarck. *Biol. Bull.* 140:274-282.
- Sastry, A. N. 1979. Pelecypoda (excluding Ostraeidae). En: A. C. Giese y J. S. Pearse (eds.). *Reproduction of marine invertebrates*. New York: Academic Press. 297 pp.
- Saout, C., C. Quéré, A. Donval, Y. M. Paulet y J. F. Samain. 1999. An experimental study of the combined effect of temperature and photoperiod on reproductive physiology of *Pecten maximus* from the Bay of Brest (France). *Aquaculture* 172: 301-314.
- Sheehan, D. y B. B. Hrapchak. 1973. Theory and practice of Histotechnology. London: Mosby Company. 481 pp.
- Spicer, S.S. y B. A. Schulte. 1992. Diversity of cell glycoconjugates shown histochemically: a perspective. *J. Histochem. Cytochem.* 40(1):1-38.

- Taylor, R. y J. Capuzzo. 1983. The reproductive cycle of the Bay scallop *Aequipecten irradians irradians* (Lamarck), in a small coastal embayment on Cape Cod Massachusetts. *Estuaries* 6: 431-435.
- Taylor, A. C. y T. J. Venn. 1979. Seasonal variation in weight and biochemical composition of the tissue of the queen scallop, *Chlamys opercularis*, from the Clyde sea area. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 59:605-621.
- Valdez-Ramírez, M. E., A. Donval, y M. Le Pennec. 2002. Ultrastructural and histochemical criteria for determining normality in mature oocyte of the pacific oyster *Crassostrea gigas*. *J. Shellfish Res.* 21:707-714.
- Vélez-Barajas, J. A. y M. C. Fajardo-León. 1996. Pesquería de hacha. En: Casas-Valdez M. y Ponce-Díaz G. (eds.). I. Estudio del Potencial Pesquero y Acuícola de Baja California Sur. CIBNOR, La Paz, México. pp. 101-111
- Villegas-Carrasco, M. 2004. Evaluación de los cultivos larvarios de almeja mano de león *Nodipecten subnodosus* (Sowerby, 1835), realizados en el laboratorio del CIBNOR de 1998 a 2003. Tesis de Licenciatura, Universidad Autónoma de Baja California Sur, La Paz, B.C.S., México, en preparación.
- Zar J.H. 1999. Biostatistical Analysis. New Jersey: Prentice Hall. 663 pp.

12. ANEXOS

ANEXO 1

FORMULACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE DAVIDSON

(Shaw y Battle, 1957 citado en Howard y Smith, 1983)

| | |
|------------------------|--------|
| Glicerina | 100 ml |
| Formaldehído al 37-40% | 200 ml |
| Alcohol etílico 96% | 300 ml |
| Agua de mar filtrada | 300 ml |
| Ácido acético | 100 ml |

ANEXO 2

TECNICA HISTOLÓGICA PARA CORTES EN PARAFINA

DESHIDRATACIÓN Y ACLARAMIENTO

- 1.- Alcohol etílico 70° (una hora)
- 2.-Alcohol etílico 80° (1 hora)
- 3.- Alcohol etílico 90° (1 hora)
- 4.- Alcohol etílico 96° (1 hora)
- 5.- Alcohol etílico 100° (2 cambios de 1 hora en c/u)
- 6.- Mezcla de alcohol etílico absoluto-xilol 1:1 (20 minutos)
- 7.- Xilol absoluto (5 minutos)

INCLUSIÓN EN PARAFINA

- 8.- Parafina-xilol (1:1) (25 minutos)
- 9.- Paraplast X-Tra (3 cambios de 1 hora cada uno)

ANEXO 3

TECNICA DE HEMATOXILINA- EOSINA

(Humason, 1979; Sheehan y Hrapchak, 1973)

- 1.- Xilol (3 cambios de 10 minutos en cada uno)
- 2.- Alcohol etílico 96° (2 minutos)
- 3.- Alcohol etílico 70° (dos cambios de 2 minutos c/u)
- 4.- Agua destilada (5 minutos)
- 5.- Hematoxilina de Harris 1-2 min
- 6.- Agua destilada (dos cambios de 5 minutos c/u)
- 7.- Alcohol ácido (10 segundos)
- 8.- Agua destilada (5 minutos)
- 9.- Agua amoniaca (10 segundos)
- 10.- Agua destilada (5 minutos)
- 11.- Alcohol etílico 50° (2 minutos)
- 12.- Alcohol etílico 70° (2 minutos)
- 13.- Eosina-floxina (3 min)
- 14.- Alcohol etílico 96° (2 cambios de 2 minutos c/u)
- 15.- Alcohol etílico 100° (2 cambios de 1 minuto c/u)
- 16.- CitriSolv (sustituto de xilol) (5 min c/u)
- 17.- Montar en Entellan (resina sintética)

Resultados:

| | |
|-------------------|----------------|
| Núcleos | azul |
| Nucleolos | azul |
| Citoplasma | rosa o naranja |
| Tejido conjuntivo | rosa |

ANEXO 4

NEGRO SUDÁN B PARA CORTES EN PARAFINA

(Pearse, 1985; Spicer y Schulte, 1992; Bayliss, 1984)

Preparar una solución saturada de Sudán Negro B en alcohol etílico al 70%

Procedimiento:

- 1.- Desparafinar e hidratar
- 2.- Colocar los cortes en alcohol 70° (5 minutos)
- 3.- Teñir en la solución de Negro Sudán B (15 minutos)
- 4.- Diferenciar en alcohol al 70° (1 minuto)
- 5.- Lavar en agua corriente
- 7.- Lavar en agua destilada
- 8.-Montar en gelatina glicerinada

Resultados:

| | |
|---------------|--------------|
| Triglicéridos | azul a negro |
| Fosfolípidos | gris |