



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS



ESTUDIO DE LA REPRODUCCIÓN DE LA
ALMEJA MANO DE LEÓN *Nodipecten*
***subnodosus* (SOWERBY, 1835) (PECTINIDAE)**
EN UN SISTEMA DE CULTIVO EN SUSPENSIÓN
DE BAHÍA TORTUGAS, B.C.S., MÉXICO.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS

PRESENTA

MARCO ANTONIO ANGEL DAPA

LA PAZ, B.C.S., DICIEMBRE DE 2010



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., siendo las 12:00 horas del día 22 del mes de Noviembre del 2010 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 titulada:

"ESTUDIO DE LA REPRODUCCIÓN DE LA ALMEJA MANO DE LEÓN *Nodipecten subnodosus*
(SOWERBY, 1835) (PECTINIDAE) EN UN SISTEMA DE CULTIVO EN SUSPENSIÓN DE
BAHÍA TORTUGAS, B.C.S., MÉXICO"

Presentada por el alumno:

ANGEL

DAPA

MARCO ANTONIO

Apellido paterno

materno

nombre(s)

Con registro:

A	0	9	0	1	2	6
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante de:

MAESTRIA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS

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

LA COMISION REVISORA

Directores de Tesis

DR. MARCIAL ARELLANO MARTÍNEZ
Director de Tesis

DR. PEDRO ENRIQUE SAUCEDO LASTRA
Director de Tesis

DR. FEDERICO ANDRÉS GARCÍA DOMÍNGUEZ

DRA. BERTHA PATRICIA CEBALLOS VÁZQUEZ

M.C. MARCIAL TRINIDAD VILLALAJÓ FUERTE



PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

DR. RAFAEL CERVANTES DUARTE

**IPN
CICIMAR
DIRECCION**



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., el día 24 del mes Noviembre del año 2010
el (la) que suscribe B.M. MARCO ANTONIO ANGEL DAPA alumno(a) del
Programa de MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS
con número de registro A090126 adscrito al CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS
manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de tesis, bajo la dirección de:
DR. MARCIAL ARELLANO MARTÍNEZ y DR. PEDRO ENRIQUE SAUCEDO LASTRA
y cede los derechos del trabajo titulado:

"ESTUDIO DE LA REPRODUCCIÓN DE LA ALMEJA MANO DE LEÓN *Nodipecten subnodosus* (SOWERBY, 1835)
(PECTINIDAE) EN UN SISTEMA DE CULTIVO EN SUSPENSIÓN DE BAHÍA TORTUGAS, B.C.S., MÉXICO"
al Instituto Politécnico Nacional, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Éste, puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: angel@dapa@gmail.com - marellam@ipn.mx - psaucedo04@icibnor.mx
Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.


B.M. MARCO ANTONIO ANGEL DAPA
nombre y firma

**Sólo es posible avanzar cuando se mira
lejos.**

**Solo cabe progresar cuando se piensa en
grande.**

**A mi esposa San e hija Renata.
Por ser el motor que mueve mi vida.**

AGRADECIMIENTOS

A mi esposa, San. Muchas gracias por estar presente y apoyarme en la realización de mi tesis, por alentarme siempre a ser una mejor persona y por darme la mayor bendición que me haya podido ocurrir, el ser padre. Te amo

A mi hija, Renata. Muchas gracias por haber llegado a mi vida y ser un motor muy fuerte que me aliente a ser una mejor persona para poder darte lo mejor. Te amo

A toda mi familia, por apoyarme en esos momentos de dificultad, por alegrarse en mis momentos de felicidad y en preocuparse en mis momentos difíciles. Los amo.

Quiero agradecer a las autoridades del Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas (CICIMAR) que me apoyaron y me formaron en la realización de mi maestría. De la misma forma, agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y al Programa Institucional de Formación de Investigadores (PIFI R-22-07) por el apoyo económico brindado en el transcurso de la realización de mi maestría través de una beca. Así mismo a los proyectos de investigación que brindaron el apoyo económico para la realización de esta tesis: CONACYT 2009-2010 y SIP 20090876 y 20101187. A la Sociedad Cooperativa de Bahía Tortugas por todo el apoyo brindado en los muestreos

A las autoridades del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), por el apoyo brindado en la realización de esta investigación. Particularmente a la M. en C. Carmen Rodríguez Jaramillo, responsable del Laboratorio de Histología e Histoquímica, por el apoyo brindado en la parte histológica correspondiente a mi estudio.

A mis directores de tesis, Dr. Marcial Arellano Martínez y Dr. Pedro E. Saucedo Lastra por contribuir en mi formación, por sus consejos, por su paciencia, por esto y mucho más gracias!.

A mis amigos técnicos que contribuyeron en la colecta y disección de los organismos: B.M. Horacio Bervera, Juan José Ramírez (Jhonny), Enrique Calvillo

(Negro), Jorge Angulo, Mario Cota y Carlos A. Perez Martínez. Con su colaboración, el trabajo en el campo fue divertido y productivo a la vez, muchas gracias!!!.

Agradezco también el apoyo en las salidas de campo a la M. en C. Rossana Maguiño Napuri, quien me acompañó en la realización de los muestreos en Bahía Tortugas haciendo el trabajo más agradable y divertido, gracias rox!!!.

A la Dra. Bertha Patricia Ceballos, al Dr. Federico García Domínguez, a la Ma. Esther Uría Galicia y al Dr. Oliver López Villegas, por sus valiosas aportaciones las cuales contribuyeron de manera considerable en la realización de esta investigación.

Al C.P. Humberto Ceseña Amador Jefe del Depto. de Servicios Escolares del CICIMAR, por su eficiencia e interés, que lo hacen ser un eslabón muy importante en la administración de esta institución, gracias Doc.

A mis amigos, por brindarme esos momentos de distracción, cuando estábamos en el trabajo y nos buscábamos para relajarnos y agarrar fuerzas para seguir trabajando. Gracias chicos.

PREFACIO

A partir de la presente tesis se derivaron los siguientes artículos:

Artículos:

Angel-Dapa, M. A.; O., P. E., Saucedo; B. P., Ceballos-Vázquez; M., Arellano-Martínez*. 2010. **Study of the reproductive activity of the lions-paw scallop, *Nodipecten subnodosus* in a commercial culturing venture in Bahía Tortugas, northwestern Mexico.** Sometido.

Angel-Dapa, M. A.; E., Uría-Galicia; M., Arellano-Martínez; O., López-Villegas; B. P., Ceballos-Vázquez; P. E., Saucedo*. 2010. **Ultrastructural study of espermatogenesis in lions-spaw scallop *Nodipecten subnodosus* (SOWERBY, 1835).** En preparación.

Angel-Dapa, M. A.; O., López-Villegas; P. E., Saucedo; E., Uría-Galicia; B. P., Ceballos-Vázquez; M., Arellano-Martínez*. 2010. **Ultrastructural study of ovogenesis in lions-spaw scallop *Nodipecten subnodosus* (SOWERBY, 1835).** En preparación.

ÍNDICE

Glosario.....	VIII
Resumen.....	XII
Abstract.....	XIII
Índice de figuras	XIV
Índices de tablas.....	XVIII
1.- INTRODUCCIÓN.....	1
2.- ANTECEDENTES	3
2.1.- Generalidades de la especie	3
2.2. Aspectos reproductivos	4
2.3. Estudios de ultraestructura	8
2.4. Indicadores de calidad de gametos mediante análisis digital de imágenes.....	9
3.- JUSTIFICACIÓN	12
4.- HIPÓTESIS	13
5.- OBJETIVO	13
5.1 General.....	13
5.2 Particulares.....	13
6.- METODOLOGÍA.....	14
6.1. Recolecta de organismos.....	14
6.2. Análisis histológicos y ultraestructural de las gónadas.....	16
6.3.- Indicadores de calidad ovocitaria	17
6.3.1.- Área y diámetro de ovocitos.....	17
6.3.2.- Índice lipídico.....	17
6.4.- Índices morfofisiológicos	18
6.5. Tratamiento estadístico	19
7.- RESULTADOS	20
7.1.- Talla.....	20
7.2.- Parámetros ambientales	20
7.3.- Ultraestructura	21

7.3.1.- Espermatogénesis	21
7.3.2.- Ovogénesis	30
7.3.3.-Células foliculares	38
7.3.4.-Tejido conjuntivo.....	38
7.4.- Fases de desarrollo gonádico.....	40
7.5.- Reabsorción	43
7.6.- Ciclo reproductivo.....	44
7.7.- Índices de calidad ovocitaria.....	46
7.7.1.- Área y diámetro de ovocitos	46
7.7.2.- Contenido de lípidos	48
7.7.3.- Índice lipídico.....	50
7.8.- Índices morfofisiológicos	52
7.9.- Correlaciones entre variables	54
8.- DISCUSIÓN	55
8.1.- Medio ambiente y su relación con la reproducción.....	60
8.2.-Indicadores de calidad ovocitaria	55
8.3. – Ultraestructura	64
8.3.1.- Espermatogénesis	64
8.3.2.- Ovogénesis	67
9.- CONCLUSIONES.....	70
10.- BIBLIOGRAFÍA.....	72
11.- ANEXOS.....	90
Anexo A Preparación de la solución Davidson (Shaw y Battle, 1957).....	90
Anexo B Preparación del fijador glutaraldehído 2.5%.....	90
Anexo B Técnica de tinción Sudan negro B para cortes en parafina (Bayliss,	90
Anexo D Preparación de la resina epóxica EPON 812.....	91

GLOSARIO

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.

Ciclo gonádico: Evento que ocurre dentro de las gónadas en el cual se da la formación de los gametos. En general en un ciclo se presentan la fase vegetativa, de diferenciación celular, madurez, desove y posdesove.

Ciclo reproductivo: Frecuencia de aparición de las diferentes fases de desarrollo gonádico a través del año y que en general es cíclico (anual).

Espermátida: Célula sexual masculina resultante de la segunda división meiótica en el proceso de gametogénesis, las cuales darán lugar a los espermatozoides por medio de la espermiogénesis.

Espermatocito: Célula sexual masculina en desarrollo que se diferencia durante la espermatogénesis.

Espermatogénesis: Proceso de formación de los espermatozoides.

Espermatogonia: Células germinales especializadas en diferenciarse para dar lugar a los espermatozoides a través del proceso de espermatogénesis.

Espermatozoide: Célula haploide que constituye el gameto masculino de los animales, y su función es la formación de un cigoto totipotente al fusionarse su núcleo con el del gameto femenino, fenómeno que dará lugar, posteriormente, al embrión y al feto.

Estrategia reproductiva: Conjunto de tácticas reproductivas que presenta una especie para obtener un éxito reproductivo.

Fagocito: Célula sanguínea (hematocito) que se especializa en digerir cuerpos no reconocidos por el organismo.

Folículo: Capa de tejido conectivo que sostiene a las células germinales.

Gametogénesis: Es el proceso de formación de gametos por medio de la meiosis a partir de células germinales. Mediante este proceso, el número de cromosomas que existe en las células germinales se reduce de diploide a haploide, es decir, a la mitad del número de cromosomas que contiene una célula normal de la especie de que se trate.

Gametos: Células sexuales procedentes de la estirpe germinal. (ovocito o espermatozoides).

Gónada: Órgano en el cual tiene lugar el desarrollo de los gametos.

Hermafrodita funcional: Condición que presentan los organismos los cuales producen simultáneamente gametos femeninos y masculinos.

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

Índice gonadosomático: Método cuantitativo que se utiliza para estimar la condición reproductiva de los organismos, tanto machos como hembras.

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

Microscopía electrónica: Es la técnica en la que se utiliza el microscopio electrónico para un análisis utilizando electrones en lugar de fotones o luz visible para formar imágenes de objetos diminutos. Los microscopios electrónicos permiten alcanzar una capacidad de aumento muy superior a los microscopios convencionales debido a que la longitud de onda de los electrones es mucho menor que la de los fotones "visibles". Existen dos tipos principales de microscopios electrónicos: el microscopio electrónico de transmisión y el microscopio electrónico de barrido.

Microscopio electrónico de barrido: En el microscopio electrónico de barrido la muestra es recubierta con una capa de metal delgado, y es barrida con electrones enviados desde un cañón. Un detector mide la cantidad de electrones enviados

que arroja la intensidad de la zona de muestra, siendo capaz de mostrar figuras en tres dimensiones, proyectadas en una imagen de TV. Su resolución está entre 3 y 20 nm, dependiendo del microscopio. Permite obtener imágenes de gran resolución en materiales pétreos, metálicos y orgánicos. La luz se sustituye por un haz de electrones, las lentes por electroimanes y las muestras se hacen conductoras metalizando su superficie.

Microscopio electrónico de transmisión: El microscopio electrónico de transmisión emite un haz de electrones dirigido hacia el objeto cuya imagen se desea aumentar. Una parte de los electrones rebotan o son absorbidos por el objeto y otros lo atraviesan formando una imagen aumentada de la muestra. Para utilizar un microscopio electrónico de transmisión debe cortarse la muestra en capas finas, no mayores de un par de miles de ángstroms. Los microscopios electrónicos de transmisión pueden aumentar la imagen de un objeto hasta un millón de veces.

Ovario: Órgano genital femenino en donde se producen los ovocitos.

Ovocito: Célula sexual femenina en desarrollo que se diferencia durante la ovogénesis. El tamaño del ovocito aumenta conforme va madurando debido a la acumulación de sustancias de reservas energéticas.

Ovogonia: Células sexuales femeninas diferenciadas mediante el proceso de mitosis de las células germinales, las cuales se diferenciarán dando origen a los ovocitos.

Ovogénesis: Proceso de formación de gametos femeninos (ovocitos).

Reproducción: Proceso por el cual se perpetúan las especies.

Táctica reproductiva: Serie de aspectos fisiológicos y ecológicos cuya finalidad es la reproducción.

Tejido conjuntivo: Tejido que se encuentra dentro y fuera de los folículos, el cual provee soporte al tejido gonádico.

Testículo: Órgano reproductor masculino en donde se producen los espermatozoides.

Túbulos: Capa de tejido conectivo que sostiene a las células germinales, las cual a medida que maduran forman los gametos masculinos.

Vitelo: Material nutritivo de reserva de los ovocitos que se utiliza durante el desarrollo del embrión.

Vitelogénesis: Proceso de formación y acumulación del vitelo en el citoplasma de las células sexuales femeninas.

RESUMEN

La almeja mano de león *Nodipecten subnodosus* es una especie de importancia económica en el Noroeste de México; sin embargo, debido a la sobreexplotación, su pesquería está limitada a la Laguna Ojo de Liebre, B.C.S. Lo anterior ha ocasionado el interés en su cultivo, no obstante el conocimiento sobre los aspectos de su reproducción es todavía limitado, por lo que es necesario profundizar en los aspectos finos de la gametogénesis y su relación con las variables ambientales. El objetivo de este estudio es describir la ovogénesis y espermatogénesis a nivel ultraestructural mediante el uso de microscopía electrónica de transmisión y la cuantificación de los cambios en el área de cobertura de gotas de lípidos en los ovocitos de *N. subnodosus* y su relación con la temperatura y la disponibilidad de alimento. Durante un año, se colectaron mensualmente 30 almejas de un sistema de cultivo ubicado en Bahía Tortugas, B.C.S. De cada organismo se obtuvieron dos muestras de cada porción de la gónada (ovario y testículo), una para el cálculo del índice de lípidos y otra para análisis ultraestructural. Paralelo a esto, se tomaron datos morfométricos para el cálculo de índices de condición y se registraron las variables ambientales. Las muestras para el cálculo del índice de lípidos fueron preparadas por medio de histoquímica las cuales fueron procesadas mediante Sudan Negro B para la identificación de lípidos. Los análisis histológicos mostraron que presentaron un desarrollo gonádico sincrónico continuo, no presentando el periodo de inactividad reproductiva. El ciclo reproductivo mostró la presencia de organismos maduros, desovados y atrésicos en casi todos los meses de estudio teniendo un periodo de inicio de actividad gametogénica (abril 2009 y marzo 2010). Basado en las características ultraestructurales de la gónada, las células sexuales fueron divididas en cinco estadios. Espermatogénesis: Espermatogonia ($38.90\mu\text{m}^2, \pm 4.43$), Espermatocito primario ($15.50\mu\text{m}^2, \pm 1.01$), Espermatocito secundario ($7.48\mu\text{m}^2, \pm 0.10$), Espermatida ($2.33\mu\text{m}^2, \pm 0.31$) y Espermatozoide ($2.04\mu\text{m}^2, \pm 0.16$). En ovogénesis: Ovogonia primaria ($22.34\mu\text{m}^2, \pm 2.60$), Ovogonia secundaria ($42.75\mu\text{m}^2, \pm 2.42$), Ovocito previtelogénico ($61.97\mu\text{m}^2, \pm 0.96$), Ovocito vitelogénico ($971.70\mu\text{m}^2, \pm 344.22$) y Ovocito maduro ($1761.88\mu\text{m}^2, \pm 644.72$).

ABSTRACT

Study of reproduction of lions-paw scallop *Nodipecten subnodosus* (Sowerby, 1835) in a comercial culturing venture in Bahía Tortugas, Baja California Sur, México

The lion's paw scallop *Nodipecten subnodosus* is a species of economic importance in the Northwest of Mexico, however, due to overfishing, the fishery is limited to Laguna Ojo de Liebre, B.C.S. This has led to interest in their culture, however the knowledge on aspects of reproduction is still limited, making it necessary to delve into the finer aspects of gametogenesis and its relationship with environmental variables. The objective of this study is to describe the oogenesis and spermatogenesis at the ultrastructural level using transmission electron microscopy and quantification of changes in the coverage area of lipid droplets in oocytes of *N. subnodosus* and its relation to temperature and food availability. For a year, 30 clams were collected monthly from a culture system in Bahía Tortugas, B.C.S. In each agency, two samples of each portion of the gonad (ovary and testis), one for the calculation of the lipid and the other for ultrastructural analysis. Parallel to this, morphometric data were taken for the calculation of condition indices and environmental variables were recorded. Samples for calculation of the lipids were prepared by means of histochemistries which were processed by Sudan Black B for lipid identification. Histological analysis showed that showed a continuous synchronous gonadal development does not present the period of reproductive inactivity. The reproductive cycle showed the presence of mature organisms, spawning and atresic in almost every month of study having a period of gametogenic activity initiation in the months of April 2009 and March 2010. Based on the ultrastructural characteristics of the gonad, the sex cells were divided into five stages. Spermatogenesis: Spermatogonia ($38.90\mu\text{m}^2$, ± 4.43), primary spermatocytes ($15.50\mu\text{m}^2$, ± 1.01), secondary spermatocytes ($7.48\mu\text{m}^2$, ± 0.10), spermatid ($2.33\mu\text{m}^2$, ± 0.31) and sperm ($2.04\mu\text{m}^2$, ± 0.16). In oogenesis: primary oogonium ($22.34\mu\text{m}^2$, ± 2.60), secondary oogonium ($42.75\mu\text{m}^2$, ± 2.42), previtellogenic oocyte

(61.97 μm^2 , \pm 0.96), vitellogenic oocytes (971.70 μm^2 , \pm 344.22) and mature oocyte (1761.88 μm^2 , \pm 644.72).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.- Zona de cultivo de la almeja mano de león <i>N. subnodosus</i> en Bahía Tortugas, B.C.S., México.....	15
Figura 2.- Frecuencia en la longitud registrada en la concha de la almeja mano de león <i>N. subnodosus</i> de la localidad de Bahía Tortugas, B.C.S. México.....	20
Figura 3.- Variación temporal de la temperatura del agua y la concentraciones de seston total, orgánico e inorgánico registradas en Bahía Tortugas, B.C.S. Se muestra la media \pm el error estándar.....	21
Figura 4.- Arreglo de los túbulos seminíferos masculinos de <i>N. subnodosus</i> . Se observa la periferia tubular (pt). Como se observan en las figuras a, b y c las células asociadas a la pt presentaron un menor grado de desarrollo.....	22
Figura 5.- Espermatogonia (Esp) de <i>N. subnodosus</i> . Se observa la membrana basal (mb), núcleo central con heterocromatina (ht). En el citoplasma se observan organelos celulares como mitocondrias (mt) dentro del citoplasma. Proceso de mitosis de espermatogonia (c).	1
Figura 6.-Espermatocito primario de <i>N. subnodosus</i> . Se observa un núcleo central (nu) con heterocromatina condensada (ht) y la presencia de mitocondrias (mt) dentro de la matriz citoplasmática.	1
Figura 7.- Espermatocito secundario de <i>N. subnodosus</i> . Presenta núcleo (nu) central con heterocromatina condensada (ht), se observa la presencia de mitocondrias (mt) dentro de la matriz del citoplasma	1
Figura 8.- Espermatida de <i>N. subnodosus</i> . Se observa el núcleo (nu) con heterocromatina condensada (ht), las mitocondrias en posición basal (mt)......	27
Figura 9.- Arreglo de los espermatozoides de <i>N. subnodosus</i> dentro del túbulo seminífero (a) Forma general del espermatozoide (b) Arreglo del espermatozoide en tres regiones, cabeza (ca), cuello (cu) y cola (co), mostrándose las mitocondrias en el cuello del espermatozoide (c) Espermatozoide mostrando el arreglo acrosomal (ac) de la cabeza y mitocondrial (mt) del cuello y (d) Corte transversal de un	

espermatozoide, observándose el arreglo de las cuatro mitocondrias (mt) y el centriolo (ce).....	28
Figura 10.- Corte transversal del flagelo de <i>N. subnodosus</i> mostrándose el arreglo microtubular (mct) de un par central y nueve pares periféricos.....	29
Figura 11.- Ovogonia primaria de <i>N. subnodosus</i> . Mostrándose en la figura a el arreglo de las ovogonias primarias (Op) pegada a la pared folicular (pf). Las figuras by c muesrán un acercamiento al citoplasma celular observándose la presencia de mitocondrias (mt), retículo endoplasmático (re). En el núcleo se observa poca cantidad de heterocromatina condensada (ht).	31
Figura 12.- Ovogonia secundaria de <i>N. subnodosus</i> asociadas a la pared folicular (pf). Dentro del citoplasma se observa un aumento en la cantidad de mitocondrias (mt), retículo endoplasmático (re) y aparato de golgi (ag). Dentro del núcleo (nu) se observa la heterocromatina condensada (ht) y en la membrana nuclear se observa la presencia de poros (pn).....	32
Figura 13.- Ovocito previtelogénico de <i>N. subnodosus</i> asociadas a la pared folicular (pf). Dentro del citoplasma se observa un aumento en la cantidad de retículo endoplasmático (re). Dentro del núcleo se observa la heterocromatina condensada (ht).....	33
Figura 14.- Ovocito vitelogénico de <i>N.subnodosus</i> con forma de pera (a) y forma ahusada hacia el centro (b), se observa la presencia de un núcleo central (nu) con muy poca heterocromatina condensada (he), c.- En el citoplasma se observa la aparición de los componentes vitelinos (cv) como lípidos (li), material granular (mg) y vitelo proteico (vp), el número de organelos celulares se aumenta en número dificultándose su observación debido a la presencia del material vitelino. d.-Se muestra la membrana de microvellosidades (mmv) la cual parece a partir de este estadio de desarrollo, así mismo en la microfotografía se observa la presencia de vesículas (ve).	36
Figura 15.- Ovocito maduro de <i>N. subnodosus</i> mostrándose el núcleo grande en posición central (a, b, c y d). Los ovocitos vitelogénicos secundarios de forma poliédrica (b). Al incrementar la talla del ovocito, el número de organelos celulares se	

incrementa de manera recíproca mostrándose una gran cantidad de retículo endoplasmático (re) (c)..... 37

Figura 16.- Células foliculares (CF) (a y b), células del tejido conjuntivo (CTJ) (a y b) y vasos con hemolinfa (VH) (c y d) de *N. subnodosus*. En la célula folicular se observan la presencia de organelos celulares como mitocondrias (mt), retículo endoplasmático (re). Las CTJ se observan en el tejido conjuntivo de la membrana folicular, en el núcleo se observa la heterocromatina condensada, el citoplasma celular no se observa la presencia de organelos celulares. En el tejido conjuntivo de la membrana folicular se observa la presencia de vasos con hemolinfa (VH) los cuales presentan gránulos de vitelo (gv)..... 1

Figura 17.- Microfotografías de las diferentes fases de desarrollo gonádico de *Nodipecten subnodosus*. en la porción femenina a) indiferenciado b) inicio de desarrollo c) desarrollo avanzado d) madurez e) desove parcial f) posdesove..... 41

Figura 18.- Microfotografías de las diferentes fases de desarrollo gonádico de *Nodipecten subnodosus* en la porción masculina a) indiferenciado b) inicio de desarrollo c) desarrollo avanzado d) madurez e) desove parcial f) posdesove..... 42

Figura 19.- Microfotografías de la fase de reabsorción gonádica de *N. subnodosus* en la porción femenina (a) donde se muestran ovocitos maduro residuales (OR) y masculina (b) donde se muestran túbulos con espermatozoides en reabsorción (ER). 43

Figura 20.- Frecuencias mensuales de las diferentes fases de desarrollo gonádico de *N. subnodosus* durante el periodo de estudio de Bahía Tortugas, B.C.S. México. a) Hembras y b) Machos y su relación con la temperatura del agua y el IGS. Se muestra la media \pm el error estándar para la temperatura del agua y el IGS. 45

Figura 21.- Frecuencia en el área y diámetro de los ovocitos registrados para el tiempo de estudio en los organismos de *N. subnodosus* de la localidad de Bahía Tortugas, B.C.S. México..... 47

Figura 22.- Variación del área y diámetro de los ovocitos de *N. subnodosus* durante el periodo de estudio en Bahía Tortugas, B.C.S. México. Se muestra la media \pm el error estandar..... 48

Figura 23.- Variación del contenido de lípidos de los ovocitos de <i>N. subnodosus</i> procedentes de Bahía Tortugas, B.C.S. México y su relación con la temperatura del agua y el IGS. Se muestra la media \pm el error estándar.....	49
Figura 24.- Relación entre el contenido de lípidos y el área de los ovocitos por intervalos de talla de <i>N. subnodosus</i> de Bahía Tortugas, B.C.S. México. Se muestra el promedio \pm el error estándar.	50
Figura 25.- Variación temporal del índice de lípidos en los ovocitos de <i>N. subnodosus</i> de Bahía Tortugas, B.C.S. México y su relación con la temperatura del agua y el IGS. Se muestra el promedio \pm el error estándar.....	51
Figura 26.- Relación del área de los ovocitos y el índice lipídico de <i>N. subnodosus</i> de Bahía Tortugas, B.C.S. México. Se muestra el promedio \pm el error estándar.	52
Figura 27.- Variaciones temporales del índice gonadosomático de <i>N. subnodosus</i> y la temperatura del agua de Bahía Tortugas, B.C.S. Se muestra la media \pm el error estándar.	53
Figura 28.- Variación temporal de los valores medios de los índices de glándula digestiva, del músculo aductor y del manto de <i>N. subnodosus</i> . Se muestra la media \pm el error estándar.....	54

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.- Correlación entre indicadores reproductivos y temperatura del agua de <i>N. subnodosus</i> de Bahía Tortugas, B.C.S. México	54
---	----

1.- INTRODUCCIÓN

Dentro del grupo de los moluscos bivalvos, los pectínidos son particularmente importantes desde el punto de vista comercial y económico, ya que su producción mundial se estimó en el año 2003 en alrededor de 1,700,000 toneladas (concha entera), de las cuales unas 700,000 toneladas procedieron de la acuicultura y 1,000,000 de toneladas de los bancos naturales (FAO, 2005). En México, la producción de pectínidos es baja (6.9 t) y proviene totalmente de poblaciones naturales (FAO, 2005). De las 400 especies de pectínidos distribuidas a lo largo de los mares del mundo, 67 se encuentran en la región Iberoamericana (Lodeiros *et al.*, 2001), con 28 representantes en las costas del Pacífico Mexicano, y de ellas tres son de importancia comercial, la almeja catarina (*Argopecten ventricosus*), la almeja voladora (*Euvola vogdesi*) y la almeja mano de león (*Nodipecten subnodosus*) (Keen & Coan, 1974). La almeja mano de león es una de las especies de pectínidos más grandes y es altamente apreciada en el mercado nacional e internacional gracias al buen sabor que presenta el músculo aductor, comúnmente conocido como “callo”, el cual puede pesar hasta 260 gramos (Beltrán-Lugo, 2005). Sin embargo, debido a la sobreexplotación sus poblaciones disminuyeron drásticamente en los diversos cuerpos de agua del noroeste del pacífico mexicano, y en la actualidad solo se extrae en la Laguna Ojo de Liebre en donde se localizan varias sociedades cooperativas que aprovechan el recurso de forma ribereña o regional. Además del sabor y el tamaño que alcanza su callo y su rápido crecimiento (Villalejo-Fuerte *et al.*, 2004), las ventajas de esta especie sobre otros pectínidos son notables. Por ejemplo, 1 kg de callo de almeja catarina se obtiene a partir de 170 organismos de 5 cm de altura de la concha, en aproximadamente 12 meses de cultivo, y tiene un valor comercial de 2.6 dólares en el mercado norteamericano al mayoreo. En cambio, 1 kg de callo de almeja mano de león se produce a partir de 40 ejemplares de 12 cm de altura de la concha en 18 meses de cultivo, vendiéndose a 6.25 dólares en el mercado norteamericano al mayoreo (Sea Food Price Current, 2001). Estas características hacen de esta especie un organismo de gran interés para la acuicultura, por ello, en respuesta a las demandas actuales, el recurso se encuentra orientado a su producción acuícola. Por lo anterior se han llevado a cabo diferentes estudios sobre

su biología en poblaciones silvestres y en cultivo, incluyendo la descripción del ciclo reproductivo (Racotta *et al.*, 2003; Arellano-Martínez *et al.*, 2004a; Villalejo-Fuerte *et al.*, 2004), análisis del uso de energía para la gametogénesis (Arellano-Martínez *et al.*, 2004b; Maldonado-Amparo *et al.*, 2004; Palacios *et al.*, 2005; Palacios *et al.*, 2007), aspectos relacionados con el crecimiento (García-Esquivel *et al.*, 2000, Barrios-Ruiz *et al.*, 2003; Racotta *et al.*, 2003; Arellano-Martínez *et al.*, 2010); los cuales son de gran importancia para lograr un mejor manejo de la especie en condiciones de cautiverio para fines de producción de semilla. No obstante, algunos aspectos de la reproducción deben profundizarse con el fin de asegurar el éxito reproductivo de la especie. En este sentido, el conocimiento detallado de la ovogénesis y espermatogénesis es esencial.

Además de la histología, que representa una de las herramientas clásicas para el estudio de la reproducción de todo tipo de vertebrados e invertebrados marinos, en los últimos 25 años la herramienta de la microscopía electrónica se ha extendido a un gran número de investigaciones con estos organismos. Esto ha permitido incrementar de manera considerable el grado de resolución en el análisis de tejidos, lo que evita en algunos casos la subjetividad que conllevaba a una errónea interpretación de estructuras celulares, así como la revelación de algunos caracteres micromorfológicos que no pueden ser detectados con las técnicas habituales de microscopía óptica (Avendaño & Le-Pennec, 1998).

En los moluscos bivalvos, el empleo de la microscopía electrónica aplicada al estudio de morfología y ultraestructura gonadal proporciona actualmente un mayor entendimiento en los eventos de gametogénesis, tanto ovogénesis como espermatogénesis en diversas especies de moluscos bivalvos de importancia comercial (Pipe, 1987; Dorange & Le-Pennec, 1989; Avendaño & Le-Pennec, 1998; Ortíz., *et al.*, 2003; Ortíz-Ordoñez., *et al.* 2006; Yung, 2007). Así, dentro de la gametogénesis, el uso del microscopio electrónico permite conocer a detalle la evolución de diversas categorías celulares y de confirmar algunos tipos de células particulares que se encuentran acompañando el desarrollo de los gametos masculinos y femeninos (Avendaño & Le-Pennec, 1998).

Como parte de la gametogénesis, la ovogénesis, y en particular la vitelogénesis, reviste mayor relevancia debido a que son los ovocitos las células encargadas de almacenar la mayor parte de los compuestos metabólicos indispensables para asegurar la viabilidad y supervivencia de los embriones y larvas (Ruíz-Durá, 1988). Como parte del vitelo, los lípidos constituyen quizá el componente de reserva más importante, por lo que la estimación de su contenido en los ovocitos ha sido empleada como indicador confiable de calidad gonádica (Holland, 1978; Gallager *et al.*, 1986; Fraser, 1989).

Con base en lo anterior, el presente trabajo está dirigido a caracterizar histológica y ultraestructuralmente la ovogénesis y espermatogénesis de la almeja mano de león a lo largo de un ciclo anual en un sistema de cultivo en Bahía Tortugas, B.C.S., relacionando los eventos de diferenciación, crecimiento, liberación y reabsorción de los gametos con factores ambientales como la temperatura del agua y el seston.

2.- ANTECEDENTES

2.1.- Generalidades de la especie

La almeja mano de león *N. subnodosus* es una de las especies más grandes dentro de la familia Pectinidae en las aguas del Océano Pacífico (Félix-Pico *et al.*, 1999). Se distribuye desde las costas de la península de Baja California hasta las costas de Perú (Keen, 1971). Dentro de la Península de Baja California, la almeja mano de león es una de las especies históricamente explotadas comercialmente a lo largo de las décadas (Baqueiro *et al.*, 1982) y es considerada como una de las especies con un gran potencial de cultivo (Reyes-Sosa, 1990; García-Domínguez *et al.*, 1992; Félix-Pico *et al.*, 1999; Maeda-Martínez *et al.*, 2001). Debido a esta importancia, en los últimos años los esfuerzos por ampliar el marco teórico con el que se cuenta para esta especie se ha incrementado de manera considerable. En su mayoría los esfuerzos se han dirigido hacia aspectos relacionados con la producción para acuicultura, analizando principalmente la producción con diferentes tipos de cultivo (Koch *et al.*, 2005; Taylor *et al.*, 2006; Osuna-García *et al.*, 2008), la influencia

de factores ambientales en el desarrollo y sobrevivencia (Rupp & Parsons, 2004; Rupp *et al.*, 2005), aspectos nutricionales en larvicultura. (García-Esquivel *et al.*, 2000; Luna-González *et al.*, 2002; Uriarte & Farías, 2002) y aspectos de bioquímica, como la fluctuación de monoaminas o lípidos en el ciclo reproductivo (Palacios *et al.*, 2007; López-Sánchez *et al.*, 2009), cambios postmortem en la composición del músculo aductor (Pacheco-Aguilar *et al.*, 2008), composición textura, propiedades físicas y microestructurales del músculo aductor (Beltrán-Lugo *et al.*, 2005; Beltrán-Lugo *et al.*, 2006; Márquez-Ríos *et al.*, 2009), efectos por exposición a ciertos dinoflagelados. (Luna-González *et al.*, 2003; Estrada *et al.*, 2007; Campa-Córdova *et al.*, 2009); y muy pobremente aspectos genéticos, ecológicos y moleculares (Roldán-Carrillo *et al.*, 2005; Ibarra *et al.*, 2006; Petersen *et al.*, 2008; Racotta *et al.*, 2008). Así, aspectos relacionados a su actividad reproductiva y su estado fisiológico no han sido ampliamente estudiados a pesar de que el conocimiento de estos aspectos es crítico en el entendimiento de los ciclos de vida y de las estrategias reproductivas de cualquier especie debido a que forman las bases necesarias para poder desarrollar programas de manejo sustentable del recurso, como su cultivo (Barber & Blake, 1991).

2.2.- Aspectos reproductivos

N. subnodosus es una especie hermafrodita funcional, que tiene la particularidad de que tanto los gametos femeninos como los masculinos maduran al mismo tiempo, pero que no son desovados a la vez (Arellano-Martínez *et al.*, 2004a). Se sabe que durante la gametogénesis, la proliferación y el crecimiento de los gametos se realizan en el interior de los folículos, en los cuales suelen verse pequeños núcleos alargados, basófilos de aproximadamente 8 μm de diámetro, correspondiente a las células basales. Microscópicamente, los folículos femeninos y masculinos se encuentran separados y localizados en diferentes regiones, aunque esta separación es incompleta puesto que existen pequeñas masas de tejido espermático entre los folículos ováricos y viceversa (Arellano-Martínez *et al.*, 2004a).

Aunque puede variar notablemente en función del objetivo del estudio, así como de especie en especie, el desarrollo de las gónadas suele dividirse en un número variable de fases que describen la diferenciación, crecimiento, maduración, liberación y reabsorción de los gametos (Barber & Blake, 1991). Arellano-Martínez *et al.*, (2004a), dividió el ciclo reproductivo de *N. subnodosus* en siete fases de desarrollo, a partir de una modificación de la propuesta por Reinecke-Reyes (1996):

- Indiferenciación: Se caracteriza por presentar poco o nulo material folicular y una total ausencia de gametos. El tejido conectivo es abundante, conteniendo diferentes tipos de granulocitos y fagocitos.
- Inicio de desarrollo: Esta es una fase de diferenciación de las células germinales en espermatogonias y ovogonias. Se caracteriza por una rápida proliferación de gametos caracterizada por la expansión de los folículos, los cuales son de forma irregular conteniendo ovogonias (13-22 μ m de diámetro) o espermatogonias se encuentran pegadas a las paredes de los folículos. El tejido interfolicular disminuye un poco en esta fase. Se presenta un lumen central en cada folículo.
- Desarrollo avanzado: En ambos sexos se presenta una reducción del número de gonias y un incremento de gametos maduros. Conforme el desarrollo avanza aumenta el número de ovocitos esféricos vitelogénicos (45 μ m diámetro promedio) y espermatozoides. Los espermatoцитos y espermátidas están estrictamente unidos a la pared folicular, la cual se va haciendo más delgada conforme avanza el desarrollo. Algunos gametos maduros aparecen en el lumen central
- Madurez: Los folículos están ensanchados y densamente llenos con ovocitos de forma poligonal principalmente. Los ovocitos alcanzan su máximo tamaño (51 μ m de diámetro promedio). A su vez, en el lumen central de los folículos testiculares se localizan densas masas de espermatozoides. En esta fase el tejido conectivo está casi ausente.
- Desove parcial: Existen cantidades variables de folículos están parcial o totalmente vacíos, dependiendo del grado de avance del desove. En algunos casos, se pueden apreciar ovocitos previtelogénicos muy pequeños o

espermatozoides embebidos en la pared folicular de los folículos vacíos, lo cual indica que las gónadas están entrando en un proceso de remaduración después del desove principal, como un indicador de que las condiciones ambientales siguen siendo favorables.

- Postdesove: Caracterizada por la presencia de gónadas con folículos rotos. Algunos ovocitos y espermatozoides comienzan a ser fagocitados. No hay evidencia de actividad gametogénica.
- Reabsorción: En esta fase las gónadas tienen las mismas características micro y macroscópicas de la fase de madurez, pero presentan grandes cantidades de ovocitos vitelogénicos o espermatozoides en proceso de reabsorción. Se observan numerosos fagocitos (hemocitos macrófagos) entre y dentro de los folículos.

Los ciclos reproductivos se encuentran regulados por una compleja interacción de factores bióticos y abióticos, de entre los cuales las interacciones genéticas (Mackie, 1984), la temperatura, disponibilidad de alimento, salinidad y fotoperiodo son los más importantes (Giese & Pearse, 1974; Sastry, 1979; Mackie, 1984; Barber & Blake, 1991; Román *et al.*, 2001; Gosling, 2004). A su vez, existe otro componente de control de la reproducción que es el neuroendócrino, que está controlado por neurotransmisores (Sastry, 1979). En este sentido Jaramillo & Navarro (1995) sugieren que eventos como los desoves pueden ser inducidos por una combinación de factores internos y ambientales, cuya interacción puede variar estacionalmente produciendo así variaciones anuales en inicio e intensidad. Por tanto, se ha observado que los ciclos reproductivos pueden presentarse de manera anual o continua y varía dependiendo de las características específicas donde habita cada población; incluso se pueden presentar diferencias interanuales en el ciclo reproductivo de la misma población debido a las diferencias ambientales que se presentan entre años (Sastry, 1979; Román *et al.*, 2001). En este sentido, en *N. subnodosus* se ha observado que en la Laguna Ojo de Liebre el ciclo reproductivo se puede dividir en cuatro periodos principales: reposo (diciembre a marzo), inicio de actividad reproductiva (abril a mayo), máxima madurez (desde junio a septiembre) y desove (desde septiembre a noviembre) (Arellano-Martínez *et al.* 2004a). Este patrón

reproductivo concuerda con estudios previos realizados en la misma localidad (Reinecke-Reyes, 1996), pero muestra diferencias con lo observado en Bahía Magdalena (Racotta *et al.*, 2003) en donde los organismos en desove y en maduración se presentan de julio a septiembre y en abril. Así mismo, en Bahía Los Ángeles (Yee-Duarte, 2009) el patrón reproductivo fue completamente distinto, el periodo de reposo no fue observado y los organismos maduros y en desove parcial se presentaron en casi todo el año. Se ha comprobado que en una misma especie, e incluso en una misma población pueden existir diferencias en el ciclo reproductivo, lo cual es dependiente de la latitud y de las condiciones ambientales particulares (Andrew, 1979; Sastry, 1979).

Otro aspecto regulador de la reproducción en los moluscos bivalvos, incluyendo la almeja mano de león, es la relación que existe entre el almacenamiento y utilización de reservas nutritivas durante la gametogénesis (Racotta *et al.*, 2003; Arellano-Martínez *et al.*, 2004b; Saucedo & Sauthgate., 2008). Esta relación se encuentra ligada a las variaciones del ambiente. Se sabe que muchas especies almacenan sus reservas energéticas en forma de carbohidratos, lípidos y proteínas en distintos tejidos corporales y que esta energía es transferida a la gónada y utilizada durante periodos de alta demanda energética como los procesos de vitelogénesis o periodos de escases de alimento (Barber & Blake, 1991; Mathieu & Lubet, 1993; Gosling, 2004). En *N. subnodosus* se han realizado estudios dirigidos a analizar el ciclo de almacenamiento y utilización de reservas y estos han arrojado resultados contrastantes. Así, se ha observado que el almacenamiento de energía y su utilización no son siempre evidentes, cuando la disponibilidad del alimento es abundante y puede soportar el costo energético de la gametogénesis en condiciones ambientales óptimas, tal como ocurre en Bahía Magdalena (Racotta *et al.*, 2003) y en Bahía de los Ángeles en B.C.S. (Yee-Duarte, 2009). En estas localidades *N. subnodosus* presenta una estrategia oportunista, esto es, que la energía para asegurar la maduración de los gametos la obtiene, casi toda la temporada reproductiva del alimento disponible. Por el contrario, Arellano-Martínez *et al.* (2004b) encontraron que esta especie se comporta de manera conservativa en Laguna Ojo de Liebre B.C.S., debido a que esta área presenta poca disponibilidad de alimento,

por lo que la energía necesaria para la maduración gonádica la obtiene de las reservas almacenadas previamente, y su ciclo reproductivo ocurre de manera estacional.

2.3.- Estudios de ultraestructura

Como se mencionó anteriormente, los estudios de gametogénesis en los moluscos bivalvos han sido de una gran importancia debido a la alta demanda comercial que presenta este grupo de organismos a nivel mundial (Maeda-Martínez, 2008). En los años 70's se dio una generalización en el uso del microscopio electrónico para la observación de los procesos reproductivos en diversas especies de bivalvos, lo que ha permitido conocer a detalle la evolución de diversas categorías celulares y de confirmar la presencia de ciertas células que pueden estar involucradas de manera trascendental en la formación de los ovocitos y espermatozoides (Bozzola & Russell, 1998).

En este sentido, en el estudio de la ovogénesis, la microscopía electrónica ha contribuido en la descripción de diversos organelos celulares como mitocondrias, retículo endoplasmático y aparato de Golgi, así como la caracterización de su grado de participación en las diferentes fases de desarrollo. En el proceso de la vitelogénesis, se han determinado la biosíntesis de cuatro tipos de organelos o estructuras (inclusiones de lípidos, gránulos de vitelo, gránulos corticales e inclusiones no determinadas) y se han observado los cambios que ocurren durante el curso del desarrollo de los ovocitos a través de la gametogénesis en especies de bivalvos como *Mytilus edulis* (Pipe, 1987), *Pecten maximus* (Dorange & Le-Pennec, 1989), *Bathymodiolus childressi* (Eckerlbarger & Young, 1999) y *Meretrix lusoria* (Yung 2007); y en otras especies de moluscos como *Bolinus brandaris* (Amor *et al.*, 2004) y en el gasterópodo *Haliotis varia* (Najmudeen, 2008).

En el caso de la espermatogénesis, la microscopía electrónica ha permitido caracterizar con exactitud las diferentes fases de desarrollo de los gametos, identificando la variación en el tipo y cantidad de organelos celulares. Por ello, se ha

logrado determinar que la morfología de los espermatozoides se encuentra relacionada con el modo en que realizan la fertilización ya sea de manera interna o externa en cada especie (Franzén, 1955). Igualmente, se ha descrito el arreglo mitocondrial y la forma del acrosoma la cual está relacionada con el tipo de vida que presenten los organismos, así como con las diferencias entre los ciclos de diferentes especies de bivalvos como *M. edulis* (Pipe, 1987), *P. maximus* (Dorange & Le-Pennec, 1989), *Pinctada margaritifera* (Thielley et al., 1993), *Crassostrea angulata* (Sousa & Oliveira, 1994), *Pinna nobilis* (De Gaulejac et al., 1995), *C. virginica* (Eckelbarger & Davis, 1996), *Anadara tuberculosa* (Ortíz et al., 2003), *Chione californiensis* (Ortíz-Ordoñez et al., 2006) y *C. gigas* (Franco et al., 2008).

En estudios de células somáticas en los que se ha utilizado la microscopía electrónica, se han revelado detalles importantes que pueden presentar una transferencia gradual de nutrientes a las células sexuales de *M. edulis* (Pipe, 1987). Detalles de la ultraestructura de las células foliculares han sido descritos para algunas especies de bivalvos, como en *M. edulis* (Pipe, 1987), *P. maximus* (Dorange & Le-Pennec, 1989), *C. virginica* (Eckelbarger & Davis, 1996), *Argopecten purpuratus* (Avenidaño & Le-Pennec, 1998), *Bathymodiolus childressi* (Eckelbarger & Yung, 1999) y *M. lusoria* (Yung, 2007). Dentro de los detalles que se han observado con microscopía electrónica, destacan el rol que juegan las células foliculares en el proceso de la vitelogénesis y particularmente en la degeneración de los ovocitos en algunas especies de bivalvos como *P. maximus* (Dorange & Le-Pennec, 1989). Los autores reportan, que en esta especie este tipo de células se encuentran restringidas a las regiones del tallo. No obstante, en *B. childressi* se ha observado que las células foliculares no participan de manera importante en la síntesis de vitelo (Eckelbarger & Young, 1999).

2.4.- Indicadores de calidad de gametos mediante análisis digital de imágenes

Existen muchos estudios referentes a la importancia que reviste el estado físico general de los organismos que se encuentran maduros (Desai et al., 1979;

Bayne *et al.*, 1982; Couturier & Newkirk, 1991; Kang *et al.*, 2000; Lodeiros *et al.*, 2001; Saucedo *et al.*, 2002a), la cantidad de energía destinada a los gametos (Gabbott, 1975; Barber & Blake, 1981; Epp *et al.*, 1988; Faveris & Lubet, 1991; Martínez & Mettifogo, 1998; Racotta *et al.*, 2003; Arellano-Martínez, 2004b), la obtención de índices para la evaluación del desarrollo gametogénico (Robinson *et al.*, 1981; Gallagher & Mann, 1986; Lango-Reynoso *et al.*, 2000), la influencia de las variables ambientales en la gametogénesis (MacDonald & Thompson, 1985; MacDonald *et al.*, 1987; Paulet & Boucher, 1991) y la supervivencia larval (Holland, 1978; Lannan *et al.*, 1980; Gallagher *et al.*, 1986; Barber & Blake, 1991; Le-Pennec *et al.*, 1998; Leonardos & Lucas, 2000). En las gónadas femeninas, la acumulación de lípidos durante la vitelogénesis es primordial debido a que la cantidad y calidad del vitelo aseguran un adecuado suministro energético para el desarrollo larvario (Holland, 1978; Fraser, 1989). En los moluscos bivalvos la mayoría de las larvas presentan un desarrollo lecitotrófico y las primeras etapas de desarrollo depende de las reservas energéticas existentes en el vitelo del huevo (Holland, 1978; Bayne & Newel, 1983; Palacios *et al.*, 2005; Palacios *et al.*, 2007). De entre estas reservas, los lípidos son precisamente la principal reserva acumulada durante la vitelogénesis para el desarrollo larvario (Racotta *et al.*, 2003). Dentro de ellos los triglicéridos y los ácidos grasos, son de primordial importancia puesto que están relacionados con la condición fisiológica de las larvas cuando éstas, bajo condiciones de estrés, son incapaces de obtener suficientes reservas energéticas del medio (Gallagher & Mann, 1986; Gallagher *et al.*, 1986; Fraser, 1989). Gallagher *et al.* (1986) reportaron para *Mercenaria mercenaria*, *Crassostrea gigas* y *Ostrea edulis* que una alta supervivencia larvaria estaba relacionada con altos niveles de lípidos, por lo que sugirieron el uso de un índice lipídico como indicador de condición fisiológica adecuada para una metamorfosis exitosa. Entre los lípidos, los autores confirmaron la importancia de los triglicéridos durante los primeros estadios larvarios, dada la partición de estos componentes en la conversión energética durante la embriogénesis y primeras etapas larvarias. Ante la evidente importancia que juegan los lípidos durante la gametogénesis y el desarrollo embrionario y larvario, los

autores cuantificaron estos elementos de reserva para utilizarlos como un indicador de la condición fisiológica de estas especies.

Por su parte, Fraser (1989) menciona que la vida larvaria temprana en muchos organismos marinos está caracterizada por la total dependencia hacia las reservas endógenas puesto que bajo estrés ambiental son incapaces de obtener energía suficiente a partir de fuentes exógenas (alimento) y que la mayoría de dichas reservas están en forma de triglicéridos. También menciona que el almacenamiento de triglicéridos es de particular importancia dada la correlación que existe entre éstos y la condición larvaria. Sin embargo, se debe tener precaución al hacer esta aseveración puesto que el contenido absoluto de triglicéridos en una larva depende del tamaño de ésta (Fraser, 1989). Con su estudio, el autor propone determinar un índice de condición fisiológica para peces, bivalvos y crustáceos basado en la composición lipídica de los huevos y larvas. De esta manera, el índice lipídico ha sido un indicador de la calidad ovocitaria, la cual es definida como la capacidad o potencial de éstos para desarrollar larvas viables. La determinación de este índice lipídico se ha realizado por medio de análisis bioquímicos, no solo en gónadas femeninas, sino también en los tejidos especializados que participan en los ciclos de partición y uso de reservas energéticas.

Rodríguez-Jaramillo *et al.* (2001) estandarizó la técnica de determinación de un índice lipídico de calidad ovocitaria en invertebrados y vertebrados marinos utilizando un sistema digital de imágenes, el cual se basa en muestras teñidas con Sudan Negro B (SNB) para identificación de reservas de lípidos (triglicéridos y fosfolípidos). Este método ha sido utilizado en diversos estudios de bivalvos de importancia comercial como el callo de hacha *Atrina maura* (Rodríguez-Jaramillo., 2004; Angel-Dapa *et al.*, 2010) y la madre perla *Pinctada mazatlanica* (Gómez-Robles *et al.*, 2005). En estos estudios se utilizó este método para analizar el efecto de la temperatura del agua sobre el desarrollo gonadal en condiciones controladas en el laboratorio, cuantificando los cambios del contenido de lípidos durante la ovogénesis en relación con los cambios de temperatura y el contenido de seston en el agua de mar en organismos silvestres. Con lo anterior se concluyó que la

histoquímica cuantitativa y el análisis digital de imágenes representan una combinación de técnicas confiables para la evaluación de procesos reproductivos, crecimiento de ovocitos y calidad ovocitaria.

3.- JUSTIFICACIÓN

La almeja mano de león (*N. subnodosus*) es una de las especies de pectinidos más importantes en México; la cual fue sometida a una explotación irracional y poco sustentable a lo largo de las últimas décadas, lo que ocasionó que sus poblaciones naturales se encuentren actualmente reducidas o agotadas casi por completo. Actualmente se ha incrementado el interés por el cultivo de *N. subnodosus*, ya que podría ser rentable pues alcanza su talla comercial en relativamente poco tiempo (Morales-Hernández & Cáceres-Martínez, 1996), debido a su rápido crecimiento (Villalejo-Fuerte *et al.*, 2004), y al gran tamaño de su músculo aductor, el cual llega a pesar hasta 260 g (Chávez-Villalba & Cáceres-Martínez, 1992). Por lo anterior, actualmente se ha incrementado el interés por el cultivo de estos organismos.

El conocimiento amplio del proceso reproductivo de esta especie es esencial para el buen manejo de las poblaciones naturales y las actividades acuícolas, particularmente aquellas dirigidas a garantizar una producción suficiente y consistente de semilla en laboratorio. Así, con la ayuda combinada de las herramientas de histología tradicional y microscopía electrónica, existe la posibilidad de complementar significativamente la información con la que se cuenta hasta este momento sobre algunos procesos o fases de la espermatogénesis y ovogénesis de la especie. Evitando así en algunos casos, caer en la subjetividad que llevaría a una errónea interpretación y ayudando a la detección de estructuras que no pueden ser observadas de utilizar únicamente la técnica habituales de microscopía óptica convencional.

Aunado a esto, el conocimiento de la variación de la calidad de los tejidos somáticos y gametos obtenido mediante índices morfofisiológicos y lipídico permitirá inferir con cierto nivel de precisión, la condición fisiológica de los organismos y la

cantidad de energía que estos podrían estar aportando a la actividad reproductiva. Esto es importante en estudios de larvicultura, ya que podría permitir más adelante obtener gametos de buena calidad para asegurar la obtención de larvas sanas y viables capaces de alcanzar la metamorfosis y fijarse como semilla.

4.- HIPÓTESIS

Debido a que la información con la que se cuenta al momento sobre la biología reproductiva de la almeja mano de león *N. subnodosus* ha quedado limitada únicamente a nivel histológico, el conocimiento sobre la ultraestructura de la espermatogénesis y ovogénesis y el índice de lípidos permitirá estimar con precisión su condición fisiológica y la calidad de sus a través de diferentes etapas de su ciclo reproductivo.

5.- OBJETIVO

5.1.- General

Caracterizar histológica y ultraestructuralmente la ovogénesis y espermatogénesis de la almeja mano de león *N. subnodosus* a lo largo de un ciclo anual en Bahía Tortugas, B.C.S., relacionando la información obtenida con las variaciones de algunos factores ambientales.

5.2.- Particulares

- Describir el ciclo reproductivo de *N. subnodosus* en Bahía Tortugas y su relación con las variables ambientales.
- Caracterizar la ovogénesis de *N. subnodosus* mediante microscopía electrónica de transmisión, describiendo los elementos celulares que participan en los procesos de diferenciación, desarrollo, liberación y reabsorción de los ovocitos.
- Caracterizar la espermatogénesis de *N. subnodosus* mediante microscopía electrónica de transmisión, describiendo los elementos celulares que

participan en los procesos de diferenciación, desarrollo, liberación y reabsorción de los espermatozoides.

- Determinar la condición fisiológica de los reproductores mediante diversos índices morfofisiológicos, así como la calidad gonadal mediante un índice lipídico obtenido por medio de análisis digital de imágenes e histoquímica.
- Establecer la relación entre variables histológicas, ultraestructurales y ambientales relacionadas con la reproducción de *N. subnodosus*

6.- METODOLOGÍA

6.1.- Recolecta de organismos

Los organismos de *N. subnodosus* fueron obtenidos mensualmente durante un año (abril 2009-marzo de 2010) de un sistema de cultivo en suspensión ubicado en Bahía Tortugas, B.C.S., México (114°53'45" W y 27°41'30" N; Fig.1). En cada tiempo muestreo se recolectaron al azar un promedio de 30 especímenes adultos por medio de buceo semiautónomo a una profundidad de entre 4 y 10 m y fueron trasladados a las instalaciones de la Cooperativa Bahía Tortugas, en donde fueron limpiados de epifauna. De cada organismo se registró la altura y longitud de la concha (0.1 mm), así como los pesos húmedo total (0.1 g), del músculo aductor, de la glándula digestiva, del manto y de la gónada. Una vez registradas las medidas biométricas, se extrajo un pedazo de gónada que incluyera las porciones femenina y masculina, las cuales se fijaron en solución de Davidson (Anexo A) durante 48 hrs para la adecuada preservación de tejidos y biomoléculas como los lípidos. Al mismo tiempo, se seleccionaron 4 organismos al azar de los cuales se extrajo otra porción de la gónada femenina y masculina, las cuales se fijaron en glutaraldehído al 2.5% (Anexo B) preparado con agua de mar con un pH de 8 durante 48 hrs, para su posterior análisis con microscopía electrónica.

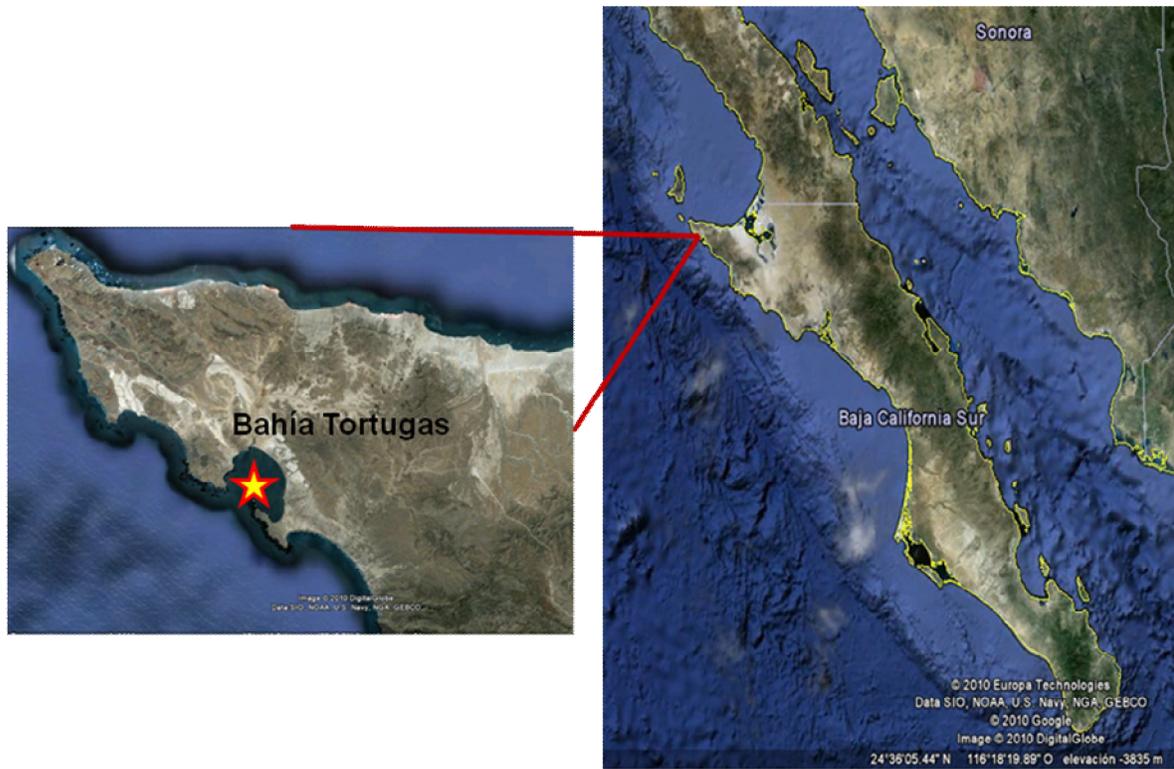


Figura 1.- Zona de cultivo de la almeja mano de león *N. subnodosus* en Bahía Tortugas, B.C.S., México

Paralelo a la recolecta de los organismos, se registró la temperatura del agua de mar en la zona de estudio, con la ayuda de un termógrafo (HOBO® mod. U22) colocado en las artes de cultivo. Igualmente, se tomaron muestras de agua de mar de 3 L por triplicado, las cuales se procesaron de acuerdo al protocolo de Luna-González *et al.* (2002) para la determinación de la concentración de seston. Primeramente el agua se filtró a través de una malla de Nitex de 200 μm para eliminar el zooplancton y partículas grandes antes del análisis (Park *et al.* 2001), posteriormente se filtró con una bomba de vacío en filtros Whatman GF/C (47 mm) previamente lavados con agua destilada, secados en una estufa a 100 °C, quemados en una mufla a 450 °C por 4 h (para eliminar toda la materia orgánica) y finalmente pesados en una balanza analítica (0.001 g). La muestra obtenida se liofilizó por 32 h para su deshidratación y esta fue nuevamente pesada. A estos valores que corresponden al peso de la muestra (seston) junto con el filtro, se les restó el peso del filtro quemado para obtener el contenido del seston total (ST). Los filtros con las muestras secas de ST se colocaron en papel aluminio y posteriormente se quemaron

en una mufla a 450 °C durante 4 h. Una vez finalizado ese proceso, los filtros se colocaron en una cámara de vacío hasta enfriarse y se pesaron para obtener el valor del seston inorgánico (SI). Por su parte, el seston orgánico (SO) se obtuvo mediante la diferencia entre el ST y el SI.

6.2.- Análisis histológico y ultraestructural de las gónadas

Las muestras de gónadas fijadas en Davidson, se procesaron de acuerdo a la técnica histológica convencional descrita en Howard & Smith (1983), que consiste en la deshidratación de tejidos en una serie de alcoholes de concentración ascendente (70–100%), inclusión en Paraplast XT® y corte a 4 µm en un micrótopo de rotación Leica (mod. mod. RM 2155). Una vez obtenidos los cortes, se tiñeron con el colorante Sudán Negro B (SNB) (Anexo C) específico para la identificación de lípidos (Bayliss, 1984). Las laminillas fueron observadas con un microscopio compuesto Olympus BX 41 en aumentos de 10×, 20× y 40× para diferenciar los diferentes estadios de desarrollo gonadal y de ovocitos presentes (ver sección 6.3). Para determinar el ciclo reproductivo de *N. subnodosus* se utilizaron las fases de desarrollo previamente descritas para esta especie: inicio de desarrollo, desarrollo avanzado, madurez, desove y posdesove, así como la reabsorción (Arellano-Martínez *et al.*, 2004a).

Para el análisis ultraestructural de las gónadas, las muestras fijadas en glutaraldehído se lavaron por 48 h con bicarbonato de sodio al 2.5% y se postfijaron con tetróxido de osmio durante 1 h de acuerdo al protocolo de Buckland *et al.* (1986). Posteriormente, se deshidrataron en concentraciones graduales de etanol (tres cambios a razón de 10 min cada cambio) y se realizaron dos cambios de óxido de propileno por 20 min cada uno. Hecho esto, las piezas se infiltraron en una solución 1:1 de óxido de propileno y resina epóxica, incluyéndose a continuación en EPON 812 (Anexo D). Una vez secas las muestras se realizaron cortes ultrafinos de 70 nm, los cuales se montaron sobre rejillas de cobre y se contrastaron en acetato de uranilo y citrato de plomo para su observación bajo el microscopio electrónico de transmisión

(Jeol-100SX) del Departamento de Morfología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del I.P.N. en la ciudad de México, D.F.

6.3.- Indicadores de calidad ovocitaria

6.3.1.- Área y diámetro de ovocitos

De cada corte histológico se digitalizaron alrededor de 5 campos visuales tomados al azar, de las cuales se seleccionaron 30 ovocitos también al azar. Las imágenes se analizaron mediante un sistema digital de imágenes (ADI) integrado por un microscopio compuesto Olympus BX41, una cámara digital CoolSnap-Pro y una computadora Pentium III cargada con el programa Image Pro Plus® (versión 5.1, Media Cybernetics, E.U.A.). Las imágenes se capturaron en aumentos de 40x.

Se midieron solo los ovocitos seccionados a través de núcleo. El área de estos ovocitos (μm^2) se trazaron individualmente y el programa calculó automáticamente sus valores correspondientes. Respecto al diámetro (μm), se calcularon las longitudes de los ejes mayor y menor, de los cuales, el promedio de ambas dimensiones se consideró como el diámetro estimado del ovocito. Posteriormente de cada indicador se calculó un promedio mensual.

6.3.2.- Índice lipídico

Para cada ovocito se delimitó la superficie de cada estructura de manera manual con el ratón de la computadora y el cursor del monitor. Posteriormente se procedió a realizar la segmentación, la cual consiste en medir la concentración absorbida por el tejido en función de la tinción (SNB), donde se identificó el rango de tonalidades de color absorbido por la muestra. Durante la segmentación, el programa marcó con un color específico aquellos componentes celulares que presentan una coloración entre azul oscuro y negro, correspondientes a los triglicéridos teñidos con el SNB, obteniendo de esta manera, la sumatoria del área de cobertura de las gotas

lipídicas denominado como el contenido lipídico (CL). La unidad empleada en el analizador de imágenes es el pixel.

De los datos anteriormente calculados, se utilizaron posteriormente para determinar el *índice lipídico* (IL) mediante la fórmula:

$$IL = CLGF / AO * 100$$

donde,

CLGF = sumatoria del área de cobertura de gotas lipídicas

AO = área del ovocito

6.4.- Índices morfofisiológicos

La condición reproductiva de las almejas también se analizó mediante el cálculo del índice gonadosomático (IGS), establecido como la razón entre del peso húmedo de la gónada y el peso húmedo sin concha (Sastry, 1975):

$$IGS = \frac{\text{Peso húmedo de la gonada (g)}}{\text{Peso húmedo sin concha (g)}} \times 100$$

El fundamento del IGS establece que valores promedio altos indican madurez gonádica, en tanto que la disminución de los valores promedio indica un posible desove (Akaboshi & Illanes, 1983). Adicionalmente, estos valores se contrastaron con los resultados histológicos para determinar si el IGS es un buen indicador de la época de reproducción de la especie.

Además del IGS, se calcularon los índices de la glándula digestiva (IGD), del manto (IM) y del músculo aductor (IMA) de acuerdo con la siguiente formulación genérica:

$$\text{Índice tisular} = \frac{\text{Peso húmedo del tejido (g)}}{\text{Peso húmedo sin concha (g)}} \times 100$$

Para establecer su relación con la reproducción, estos índices se correlacionaron con el índice gonadosomático.

6.5. Tratamiento estadístico

Se realizaron análisis de varianza de una vía (ANOVA) con el fin de identificar la existencia de diferencias significativas en la talla de ovocitos (área y diámetro) y contenido e índice lipídico de los mismos en función del tiempo. En los casos donde se encontraron diferencias significativas se realizaron pruebas *a posteriori* de comparación múltiple de rangos de Tukey para identificar grupos homogéneos (Snedecor & Cochran, 1989).

Igualmente, se realizaron análisis de correlación entre algunos parámetros histoquímicos, ambientales y morfofisiológicos (e.g. talla de ovocitos vs contenido lipídico, índice lipídico vs. contenido lipídico, talla de ovocitos e índice de lípidos vs. IGS). Sin embargo, debido a que algunas de estas variables no estaban expresadas en las mismas unidades, cuando fue necesario se realizaron transformaciones empleando la fórmula del *arcoseno* (Snedecor & Cochran, 1989):

$$p' = \arcsin \sqrt{p}$$

Donde:

p' = medida transformada (en radianes)

\arcsin = coseno del ángulo deseado cuyo valor debe estar entre 1 y -1

p = medida original

Todos los análisis estadísticos se realizarán usando el programa Statistica (vers. 7.0, Stat Sofá, E.U.A.). Para todos los análisis se fijó un nivel de significancia de (α) de 0.05.

7.- RESULTADOS

7.1.- Distribución de talla

El rango de longitud de la concha de las almejas muestreadas fue de 74 mm a 129 mm. Su distribución presenta claramente una distribución unimodal en la que la mayor frecuencia de organismos correspondieron al intervalo con 96-101.5 mm de longitud (Fig. 2).

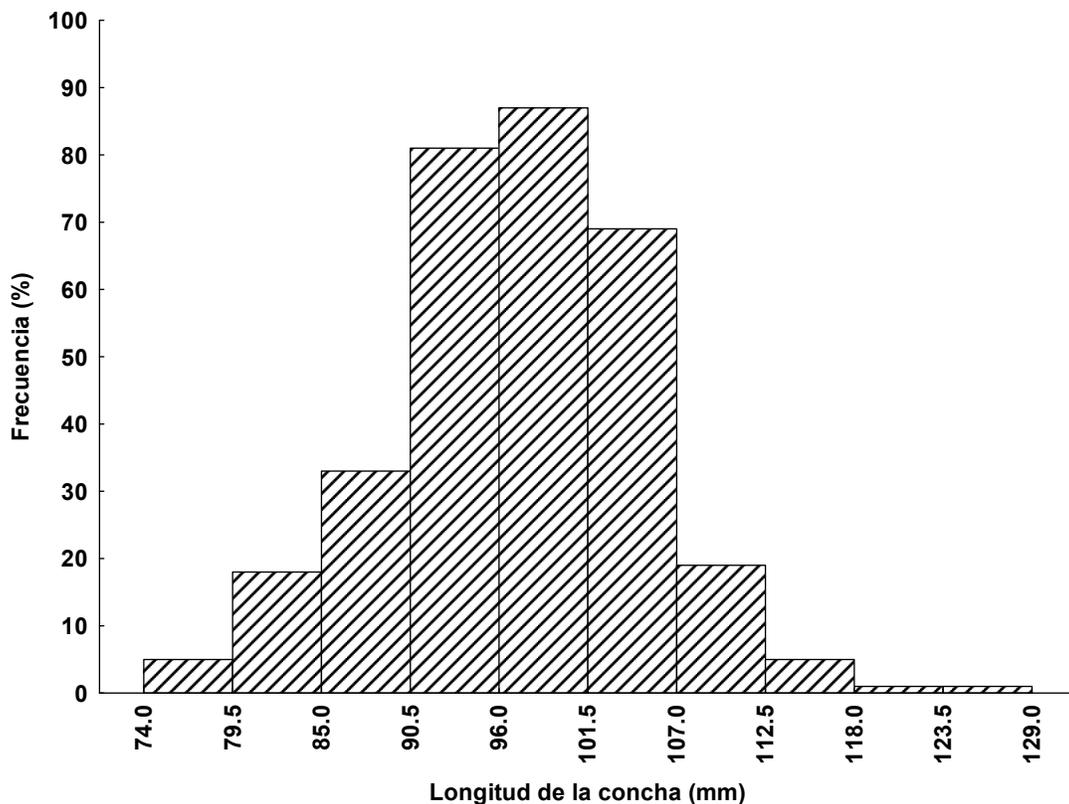


Figura 2.- Distribución de frecuencias de longitud de la concha de la almeja mano de león *N. subnodosus* de la localidad de Bahía Tortugas, B.C.S. México.

7.2.- Factores ambientales

La variación de la temperatura y de la concentración de seston registrados para la localidad de Bahía Tortugas, B.C.S. durante el periodo de abril de 2009 a marzo de 2010 se presenta en la figura 3. La temperatura del agua mostró una marcada variación estacional, con un valor mínimo en mayo de 2009 (13.1 °C) y un máximo durante septiembre–octubre de 2009 (24.8 °C). En el caso de la

concentración de seston, se observó un comportamiento similar para el seston inorgánico y total, con los valores más altos en febrero de 2010 (ST: 15.4 mg/L y SI: 12.3 mg/L) y los más bajos en julio de 2009 (ST: 7.24 mg/L y SI: 2.42 mg/L). En el caso del seston orgánico, los valores máximos fueron registrados en junio de 2009 (7.27 mg/L) y los mínimos en febrero de 2010 (2.47 mg/L).

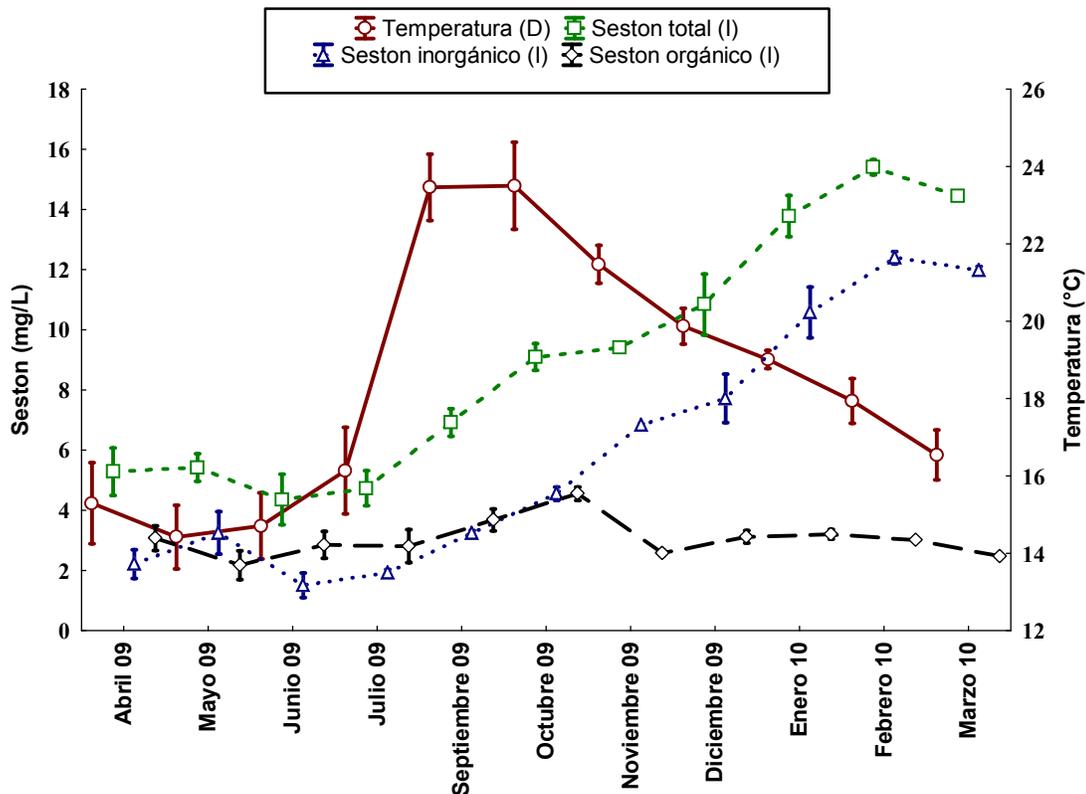


Figura 3.- Variación temporal de la temperatura del agua y las concentraciones de seston total, orgánico e inorgánico registradas en Bahía Tortugas, B.C.S. Se muestra la media \pm el error estándar.

No se encontró una correlación significativa entre la temperatura del agua del mar y la concentración del seston a lo largo de la temporada de estudio ($r=0.117$, $p>0.05$).

7.3.- Ultraestructura

7.3.1.- Espermatogénesis

La espermatogénesis en *N. subnodosus* fue dividida en tres fases de desarrollo:

1. Espermatocitogénesis, la cual se encuentra relacionada con la multiplicación mitótica y la maduración de las espermatogonias.
2. Meiótica, la cual comprende las divisiones meióticas sucesivas que sufren los espermatocitos como parte del proceso de maduración
3. Espermiogénesis, que abarca la transformación y término de maduración de las espermátidas en espermatozoides funcionales y viables.

La ultraestructura de la gónada masculina revela que los túbulos seminíferos están compuestos por una población de células sexuales en diferentes fases de desarrollo, así como de células de soporte usualmente denominadas células de Sertoli. El arreglo de los túbulos seminíferos presenta un patrón irregular, en el que células con un menor grado de desarrollo se encuentran asociadas a la periferia tubular y las células más desarrolladas ubicadas hacia el centro o lumen de los túbulos. No se observó que dicho arreglo guardara una estricta separación de capas hacia el lumen, pudiéndose encontrar las células mezcladas unas con otras (Fig. 4a y b).

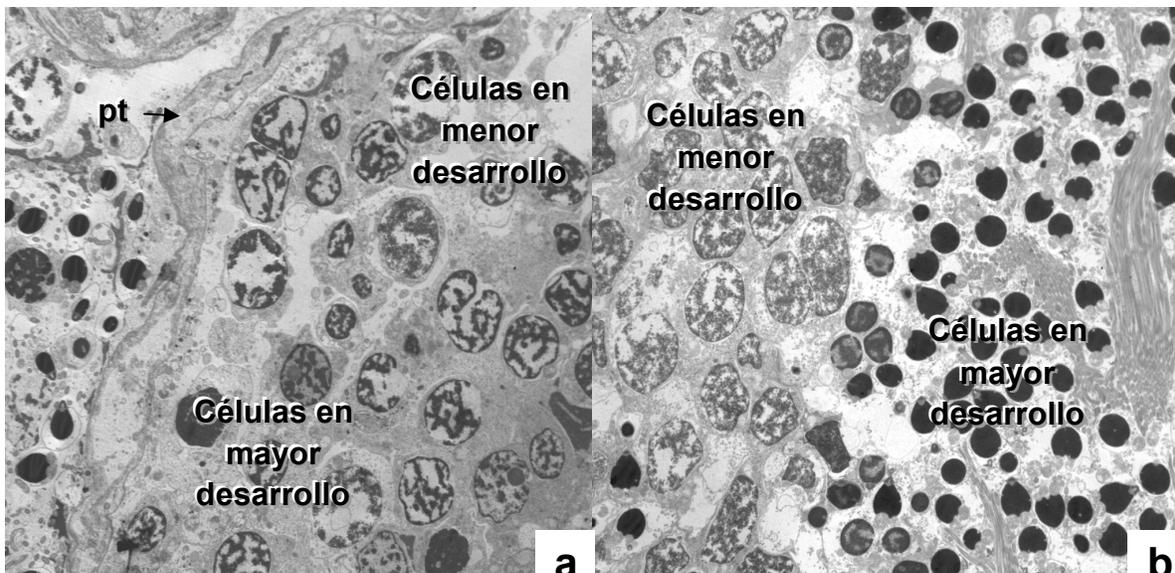


Figura 4.- Arreglo de los túbulos seminíferos de *N. subnodosus*. Se observa la periferia tubular (pt). Como se observan en las figuras a y b las células asociadas a la pt presentaron un menor grado de desarrollo.

Como parte del proceso de desarrollo y maduración de los gametos masculinos, las espermatogonias son las células más grandes de la línea germinal, ya que poseen un área promedio de $38.9 \pm 4.43 \mu\text{m}^2$ y una longitud promedio de $6.4 \pm 1.94 \mu\text{m}$ (Fig. 5a y b). Este tipo de células son de forma irregular, se encuentran en contacto directo con la membrana basal o pared de los túbulos seminíferos y se caracterizan por presentar un núcleo grande en posición central de forma esférica, cuya área aproximada es de $11.55 \pm 0.33 \mu\text{m}^2$. Las espermatogonias poseen pocos gránulos de heterocromatina de tamaño diverso, los cuales se encuentran esparcidos a lo largo de todo el nucleoplasma, en donde se observa que los espacios claros dentro de la matriz nuclear son abundantes ($35 \pm 0.36\%$ de ocupación por heterocromatina). En el citoplasma existen escasos organelos celulares, con excepción de las mitocondrias, que en esta fase de desarrollo son abundantes y presentan un área aproximada de $0.33 \pm 0.06 \mu\text{m}^2$. Se observó una predominancia de espermatogonias durante el estadio de inicio de desarrollo, el cual ocurrió durante los meses de marzo y abril cuando la temperatura del agua presenta valores bajos ($\sim 17^\circ\text{C}$) y la concentración de seston presenta una disminución de sus valores máximos en febrero al mínimo en junio.

Las espermatogonias se diferencian de los espermatocitos primarios únicamente por el proceso de mitosis, como se muestra en la figura 5c. Al iniciarse este proceso, el grado de acumulación de heterocromatina dentro del nucleoplasma es mayor ($47.96 \pm 0.06\%$) que el observado con la espermatogonia, la cual no ha entrado aún en del proceso de mitosis.

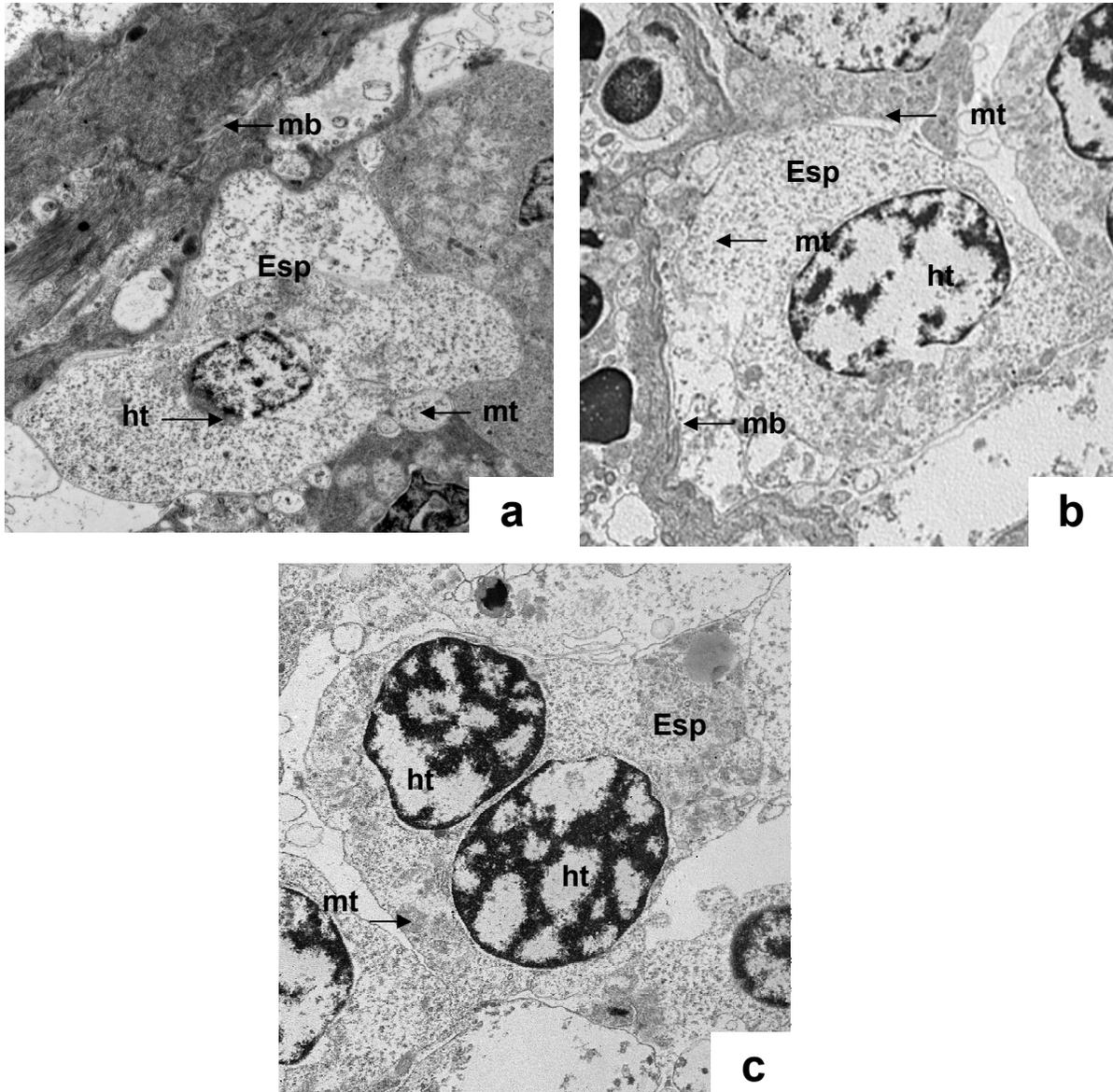


Figura 5.- ay b) Espermatogonia (Esp) de *N. subnodosus*. Se observa la membrana basal (mb), núcleo central con heterocromatina (ht). Se observan organelos celulares como mitocondrias (mt) dentro del citoplasma. c) Proceso de mitosis de espermatogonia.

Los espermatocitos primarios son más pequeños (aproximadamente la mitad) que las espermatogonias (Fig. 6) su área promedio es de $15.50 \pm 1.01 \mu\text{m}^2$. Presentan un núcleo grande en posición central de aproximadamente $6.18 \pm 0.42 \mu\text{m}^2$. Dentro del nucleoplasma, la heterocromatina condensada es más abundante con respecto a las espermatogonias ($55 \pm 4\%$ de ocupación), y se observa que los espacios claros comienzan a disminuir en su porcentaje de cobertura. En su citoplasma, este tipo de línea germinal presenta una menor cantidad de mitocondrias con respecto a las espermatogonias, aunque de tamaño similar ($0.33 \pm 0.06 \mu\text{m}^2$). En

general, los espermatocitos primarios al igual que las espermatogonias predominaron durante el estadio de desarrollo inicial, el cual ocurrió durante la primavera de marzo y abril cuando la temperatura del agua presenta valores bajos ($\sim 17^{\circ}\text{C}$) y la concentración de seston presenta una disminución de sus valores máximos en febrero al mínimo en junio.

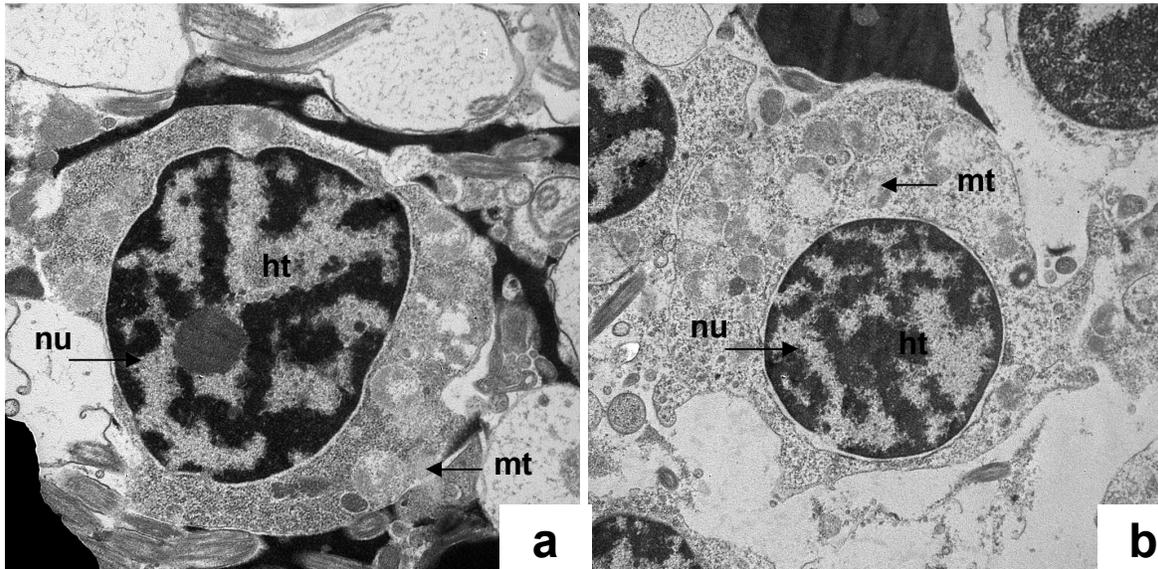


Figura 6.-Espermatocitos primarios de *N. subnodosus*. Se observa un núcleo central (nu) con heterocromatina condensada (ht) y la presencia de mitocondrias (mt) dentro de la matriz citoplasmática.

A partir de los espermatocitos primarios, mediante un proceso de meiosis se forman los espermatocitos secundarios (Fig. 7), los cuales se caracterizan por presentar una mayor condensación de la heterocromatina ($68 \pm .45\%$ de ocupación), así como una distribución periférica del núcleo y parte central del mismo dentro del nucleoplasma, asemejando la forma de una dona. El núcleo es más pequeño en comparación con el de los espermatocitos primarios, ya que el área promedio es de $2.06 \pm 0.4 \mu\text{m}^2$. El área celular ocupa un área aproximada de $7.48 \pm 0.10 \mu\text{m}^2$. El citoplasma presenta un menor número de mitocondrias, las cuales presentan el mismo tamaño en comparación con los dos estadios de desarrollo anteriores. Este tipo celular se registró de abril a noviembre de 2009 y en marzo de 2010, donde las máximas frecuencias observadas correspondieron con una temperatura de $\sim 23^{\circ}\text{C}$ y concentración de seston total entre 7 y 8 mg/L.

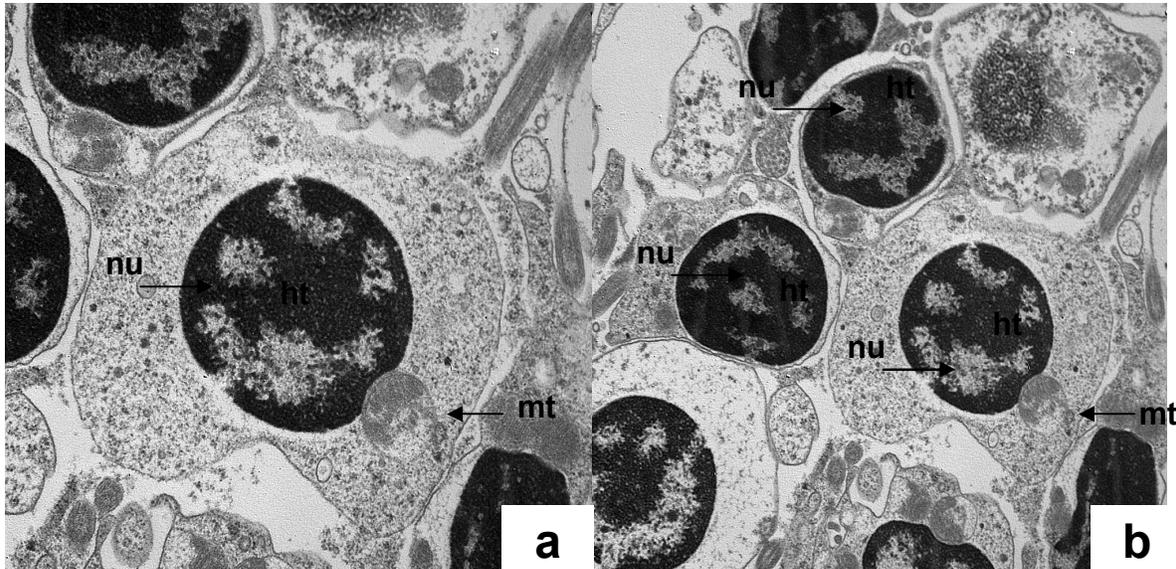


Figura 7.- Espermatoцитos secundario de *N. subnodosus*. Presenta núcleo (nu) central con heterocromatina condensada (ht), se observa la presencia de mitocondrias (mt) dentro de la matriz del citoplasma.

Continuando con el desarrollo de la línea germinal masculina, las espermatidas se forman a partir de los espermatoцитos secundarios. Estas células se caracterizan por presentar un núcleo esférico central con un área de $2.33 \pm 0.31 \mu\text{m}^2$. El núcleo en las primeras etapas de espermatida ocupa casi la totalidad del citoplasma. Igualmente, se observa que únicamente quedan cuatro mitocondrias que comienzan a migrar hacia el polo basal del núcleo (Fig. 8a), lo cual conlleva a una reducción de su tamaño ($0.09 \pm 0.01 \mu\text{m}^2$). En las espermatidas con un mayor grado de diferenciación, el citoplasma queda únicamente como un halo alrededor del núcleo (Fig. 8b) y las mitocondrias ya están acomodadas en posición basal. La heterocromatina en esta fase ocupa casi la totalidad el núcleo (cerca del $90\% \pm 0.4$ aproximadamente). Las espermatidas fueron mayormente observadas durante el estadio de desarrollo avanzado al igual que los espermatoцитos secundarios, el cual se encontró representado de abril a noviembre de 2009 y en marzo 2010, donde las máximas frecuencias observadas correspondieron con una temperatura de $\sim 23^\circ\text{C}$ y concentración de seston total entre 7 y 8 mg/L.

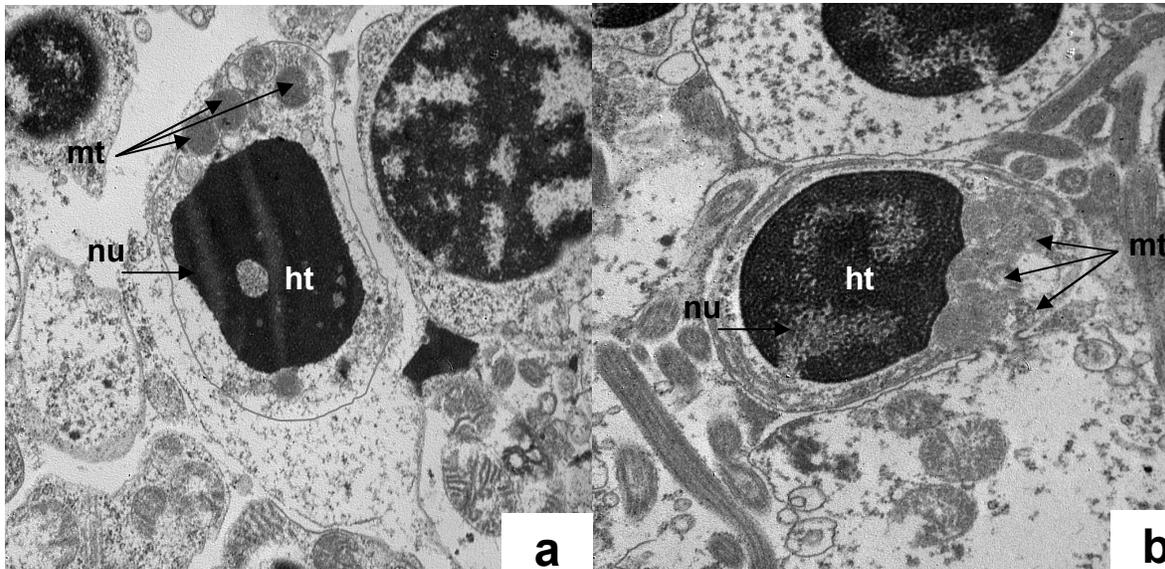


Figura 8.- Espermátidas de *N. subnodosus*. Se observa el núcleo (nu) con heterocromatina condensada (ht), las mitocondrias en posición basal (mt).

Las espermátidas son las células que collevan el proceso denominado espermiogénesis el constituye una compleja transformación anatómica y funcional para dar origen a los espermatozoides, cuyas estructuras distintivas son el acrosoma y el flagelo. Los espermatozoides migran hacia la luz de los túbulos seminíferos (Fig. 9a) y en ellos se distinguen claramente la cabeza, el cuello y el flagelo (Fig. 9b). La cabeza contiene al núcleo de forma esférica con heterocromatina granular electrodensa, la cual ocupa la totalidad de su matriz (área promedio de $2.04 \pm 0.16 \mu\text{m}^2$). El acrosoma es de forma piramidal, convexo hacia la parte apical de la célula y cóncavo hacia el núcleo y el espacio entre el acrosoma y el núcleo está ocupado por la sustancia subacrosomal (Fig. 9c). En la parte del cuello se encuentran cuatro mitocondrias con crestas bien desarrolladas y dispuestas en forma circular, mismas que en comparación con las mitocondrias de las espermátidas, son de un mayor tamaño (área promedio de $0.27 \pm 0.03 \mu\text{m}^2$). El centriolo se encuentra entre las mitocondrias (Fig. 9d) y está compuesto por un número constante de microtúbulos dispuestos en un par central y nueve pares periféricos. A partir de este último se forma el flagelo, que también tiene el mismo arreglo de microtúbulos rodeados por la membrana plasmática (Fig. 10). Los espermatozoides fueron el tipo celular representativo del estadio de madurez y estuvieron representados en casi todos los meses de muestreo, con máximas frecuencias en octubre y noviembre,

correspondiendo con temperaturas $\sim 22^{\circ}\text{C}$ y concentraciones altas de seston total 9 mg/L.

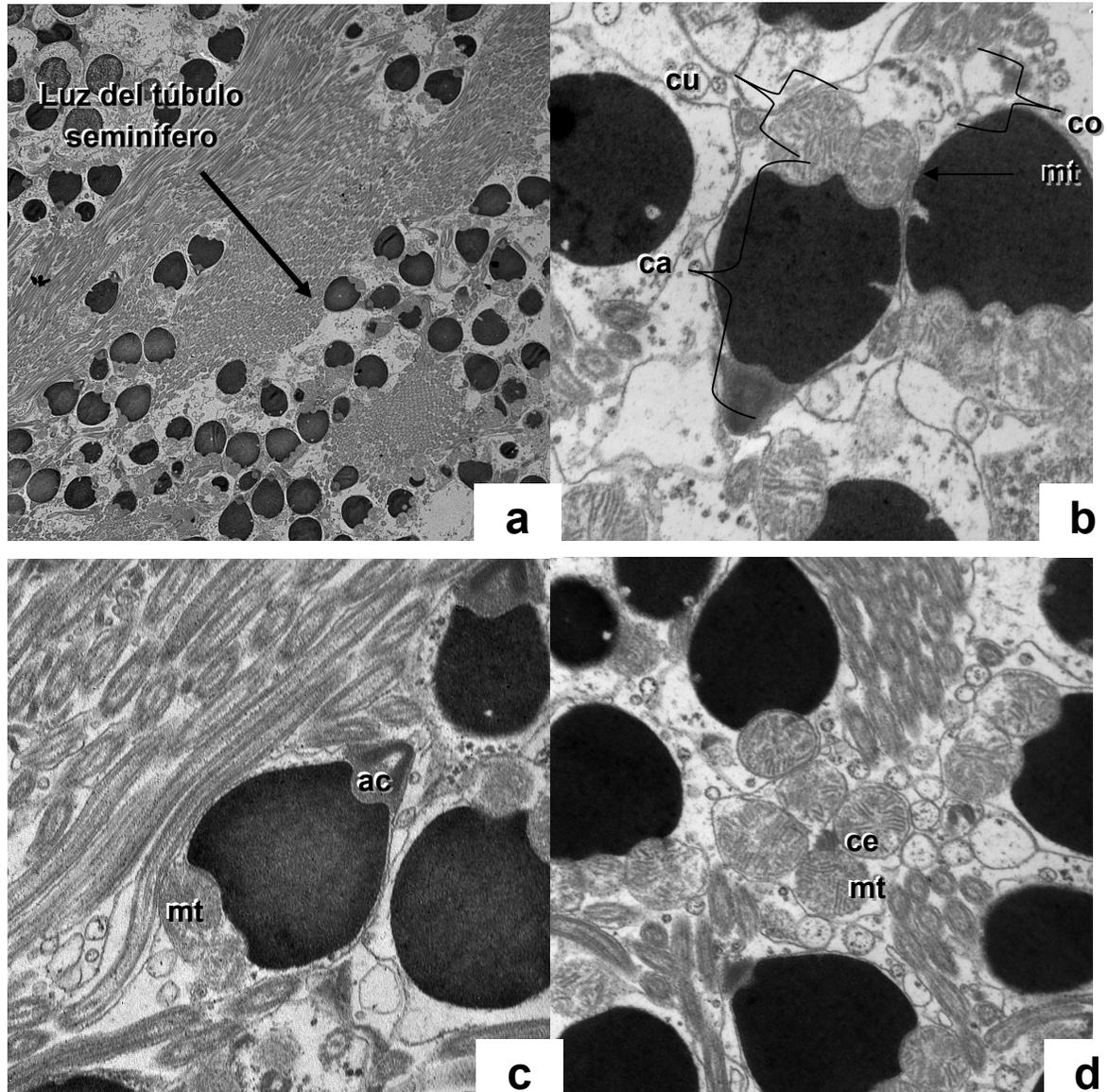


Figura 9.- Arreglo de los espermatozoides de *N. subnodosus* dentro del túbulo seminífero a) Forma general del espermatozoide b) Arreglo del espermatozoide en tres regiones, cabeza (ca), cuello (cu) y cola (co). c) Espermatozoide mostrando el arreglo acrosomal (ac) de la cabeza y mitocondrial (mt) del cuello y d) Corte transversal de un espermatozoide, observándose el arreglo de las cuatro mitocondrias (mt) y el centriolo (ce).

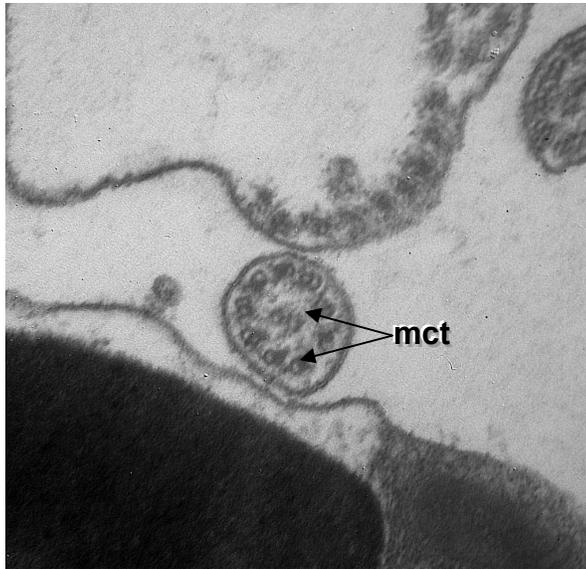


Figura 10.- Arreglo microtubular (mct) del flagelo de *N. subnodosus* en un par central y nueve pares periféricos

7.3.2.- Ovogénesis

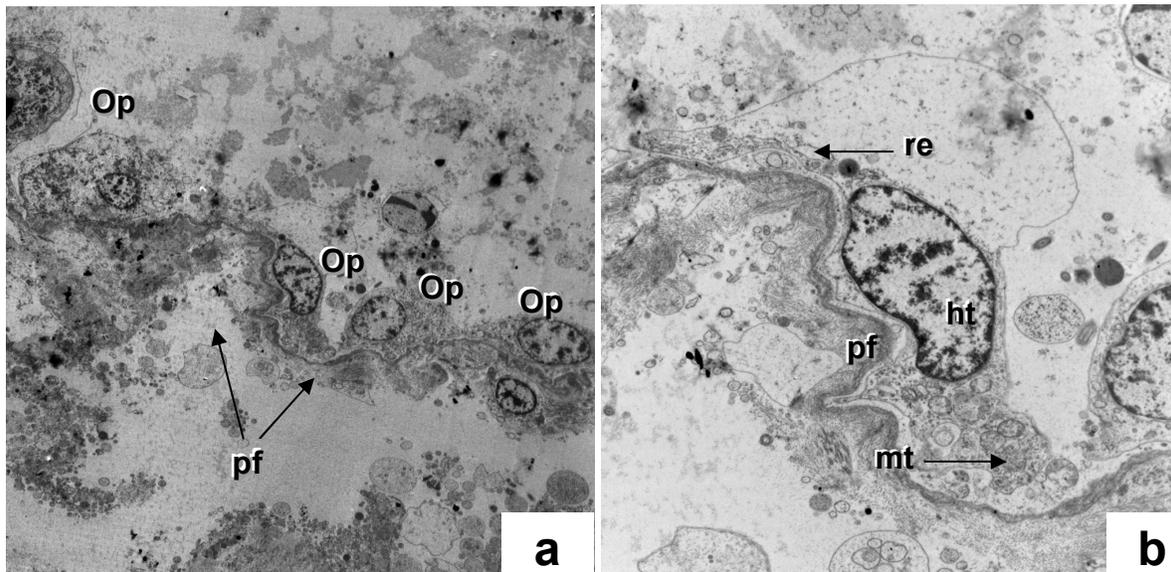
La ovogénesis de *N. subnodosus* puede ser sintetizada en tres etapas muy bien diferenciadas:

1. Premeiótica, caracterizada porque todas las divisiones celulares son únicamente mitóticas.
2. Previtelogénica, caracterizada por presentar divisiones meióticas sin entrar las células al proceso de vitelogénesis.
3. Vitelogénica, la cual se caracteriza por que las células entran en proceso de vitelogénesis (acumulación de reservas).

La ultraestructura de los folículos ováricos se encontró compuesta por células sexuales en diferentes grados de desarrollo, Las características ultraestructurales en cada fase de desarrollo se describen a continuación.

Dentro de la etapa premeiótica encontramos a las ovogonias primarias (Fig. 11), consideradas las más pequeñas dentro de la línea celular ($22.34 \mu\text{m}^2 \pm 2.60$). Se caracterizan por encontrarse asociadas a la pared folicular (Fig. 11a), presentar un núcleo esférico central que mide $7.54 \mu\text{m}^2 \pm 3.53$, el cual cuenta con poca cantidad de

heterocromatina condensada dentro de la matriz del nucleoplasma ($18.4\% \pm 1.13$ de ocupación de heterocromatina). En el citoplasma celular se observa una muy poco número de organelos (Fig. 11b y c) como mitocondrias (de forma esférica), una apenas visible cantidad de retículo endoplasmático y aparato de golgi. Las ovogonias se encontraron representadas en el estadio de inicio de desarrollo, el cual ocurrió en marzo y abril, donde la temperatura del agua presentó valores bajos ($\sim 17\text{ }^{\circ}\text{C}$) y la concentración de seston presenta una disminución de sus valores máximos en febrero al mínimo en junio.



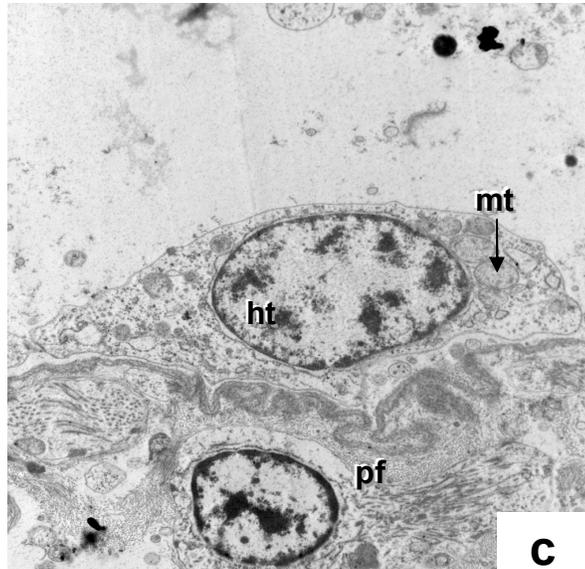


Figura 11.- Ovogonias primarias de *N. subnodosus*. a) arreglo de las ovogonias primarias (Op) pegada a la pared folicular (pf). b y c) acercamiento al citoplasma celular observándose la presencia de mitocondrias (mt) y retículo endoplasmático (re). En el núcleo se observa poca cantidad de heterocromatina condensada (ht).

Las ovogonias primarias mediante un proceso de mitosis dan origen a las secundarias, las cuales al igual que las ovogonias primarias se encuentran asociadas a las paredes foliculares. Las ovogonias secundarias se muestran en la figura 12, presentan un ligero aumento de tamaño ($42.75 \mu\text{m}^2 \pm 2.42$), un núcleo central con un área aproximada de $13.57 \mu\text{m}^2 \pm 1.42$, y una concentración de heterocromatina muy similar al estadio de las ovogonias primarias ($18.97\% \pm 0.22$). Asimismo, en el núcleo se observa la aparición de poros localizados en la membrana nuclear (Fig. 12c). En el citoplasma celular, encontramos un aumento en el número de retículo endoplasmático, aparato de golgi y mitocondrias el cual se hace bastante evidente como se muestra en la figura 12a y b. Al igual que las ovogonias primarias, las ovogonias secundarias se encontraron representadas en el estadio de desarrollo inicial, el cual ocurrió durante marzo y abril con valores bajos de temperatura ($\sim 17^\circ\text{C}$).

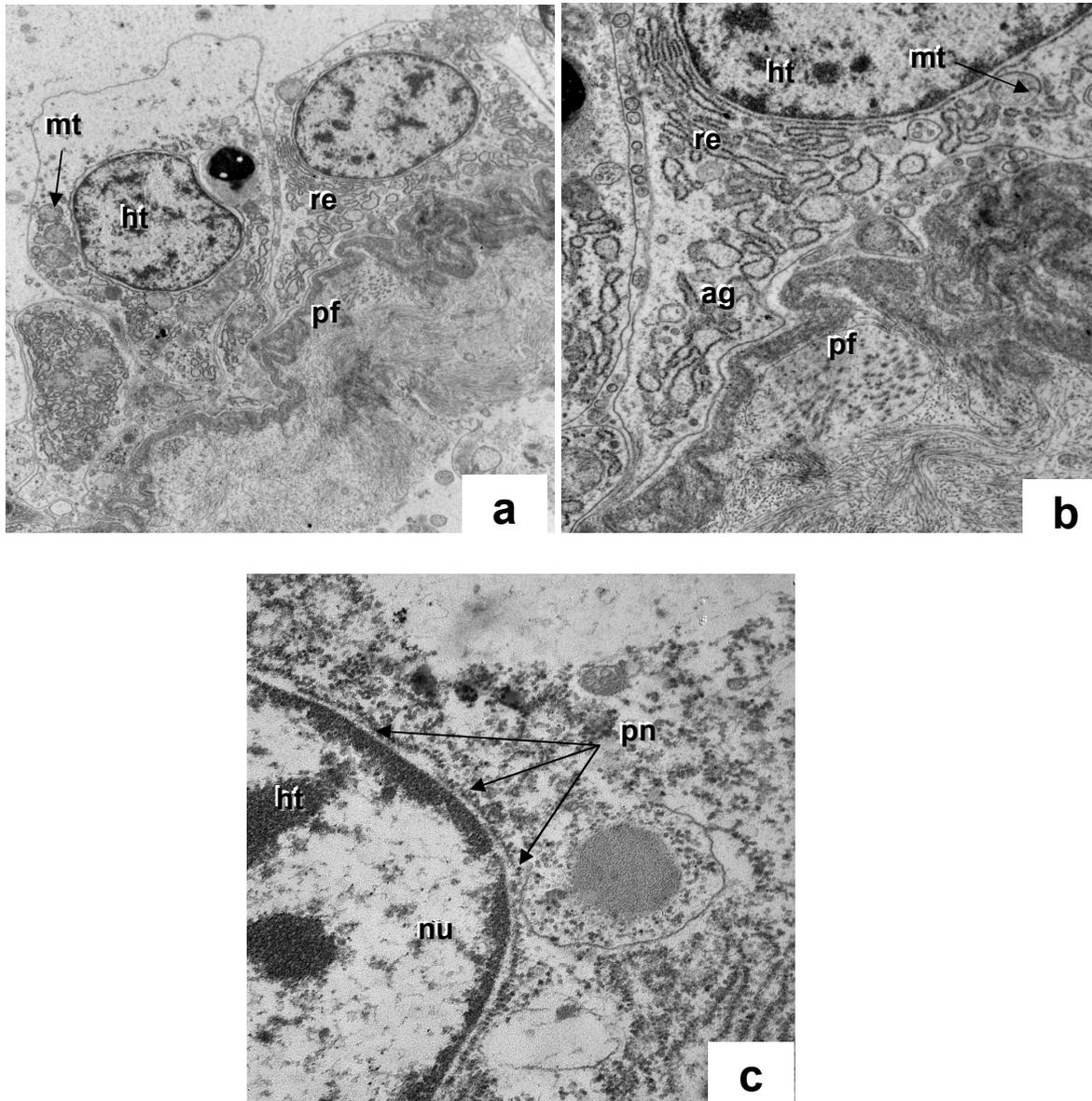


Figura 12.- Ovogonias secundarias de *N. subnodosus* asociadas a la pared folicular (pf). Dentro del citoplasma se observa un aumento en la cantidad de mitocondrias (mt), retículo endoplasmático (re) y aparato de golgi (ag). Dentro del núcleo (nu) se observa la heterocromatina condensada (ht) y en la membrana nuclear se observa la presencia de poros (pn).

En esta etapa, las ovogonias secundarias entran en la primera profase de meiosis dando origen a los ovocitos previtelogénicos. Estos se caracterizan por presentar un área aproximada de $61.97 \mu\text{m}^2 \pm 0.96$. El núcleo es grande en posición central, con un área aproximada de $15.62 \mu\text{m}^2 \pm 1.66$; y dentro de la matriz nuclear la heterocromatina condensada presenta un porcentaje de ocupación muy similar a las anteriores estadios de desarrollo ($18.82\% \pm 0.21$). Dentro del citoplasma se observa un aumento muy evidente en la cantidad de organelos celulares como se muestra en

la figura 13a y b. Los ovocitos previtelogénicos, fueron característicos del estadio de desarrollo avanzado de abril a noviembre de 2009, volviéndose a presentar en marzo de 2010, con las máximas frecuencias correspondiente con la temperatura de 23°C y concentración de seston total entre 7 y 8 mg/L.

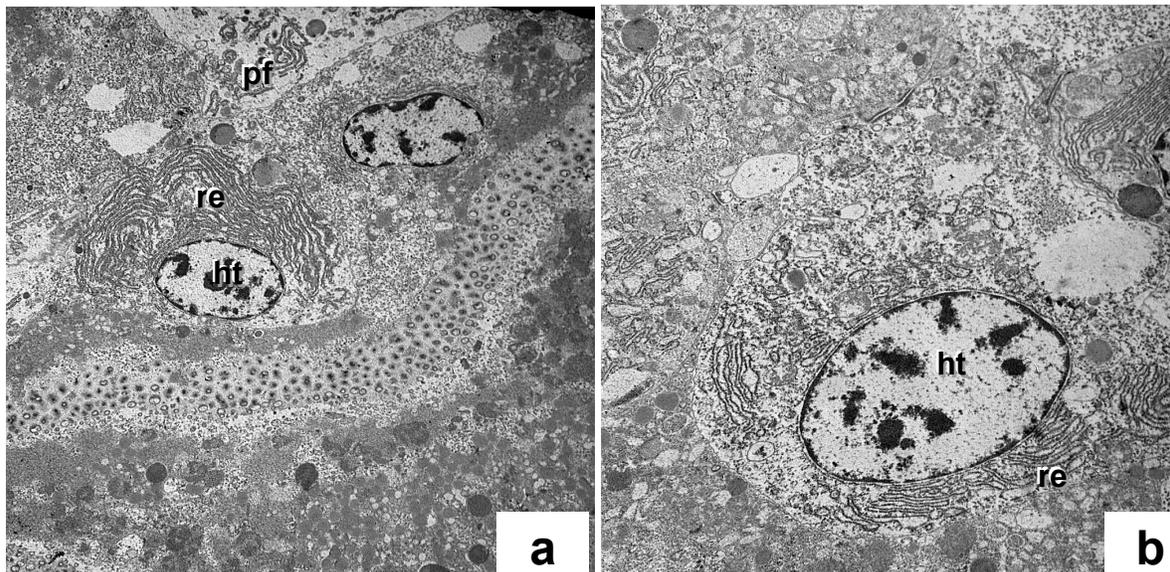


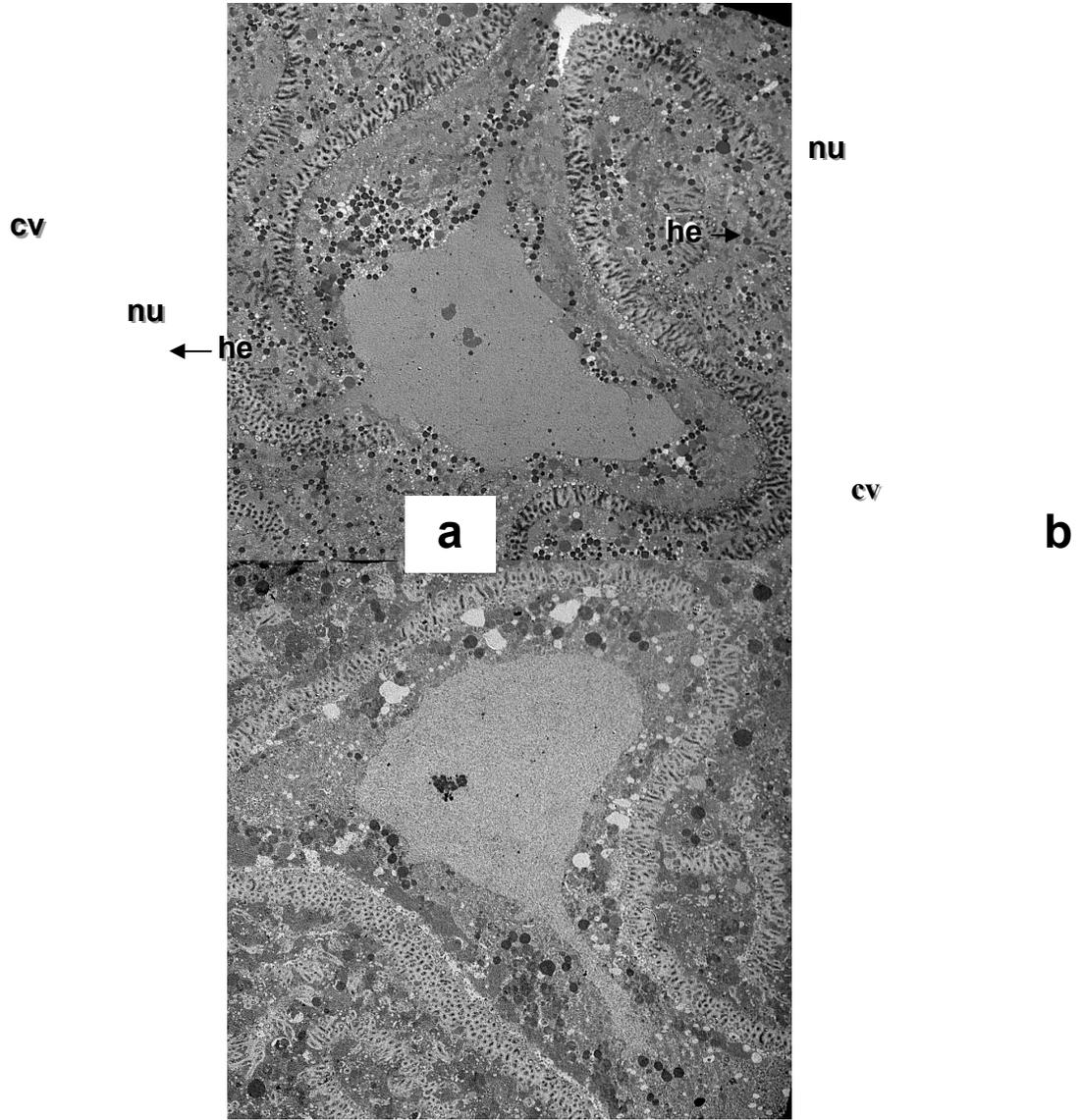
Figura 13.- Ovocitos previtelogénico de *N. subnodosus* asociados a la pared folicular (pf). Dentro del citoplasma se observa un aumento en la cantidad de retículo endoplasmático (re). Dentro del núcleo se observa la heterocromatina condensada (ht).

Los ovocitos vitelogénicos se caracterizan por el inicio del proceso de síntesis de vitelo y un aumento de tamaño considerable con respecto a las ovocitos previtelogénicos. Tienen un área aproximada de $971.70 \mu\text{m}^2 \pm 344.22$ y un núcleo grande ubicado en posición central, en el cual se observa la presencia de muy poca cantidad de heterocromatina condensaada en el nucleoplasma ($< 2\%$), como se muestra en la figura 14a y b.

Los ovocitos vitelogénicos se encuentran aún asociados a las paredes foliculares, por medio de un pedúnculo, por lo que los podemos observar con formas asemejando a una pera o ahusadas hacia el centro como se muestra en la Figura 13a y b. Dentro del citoplasma celular, se observa la presencia de gotas de lípidos material granular y vitelo proteico de diversos tamaños repartidos heterogéneamente (Fig. 14c). Las mitocondrias aumentan en número, mientras que el retículo endoplasmático y aparato de golgi presentan un gran desarrollo, dificultándose su observación debido a la presencia de inclusiones lipídicas (Fig. 14c).

Otra característica distintiva dentro de este estadio, es la formación de una membrana tipo corion posterior a la membrana plasmática (Fig. 14d) la cual presenta un grosor aproximado de $1.78 \mu\text{m} \pm 0.29$. En esta membrana se observa la presencia de microtúbulos que la atraviesa y una gran cantidad de vesículas en la región basal y región central de la membrana, están siendo incorporadas por medio de endocitosis.

Los ovocitos vitelogénicos, fueron el tipo celular representativo del estadio de madurez, los cuales estuvieron representados en casi todos los meses de muestreo, con máximas frecuencias en octubre y noviembre, correspondiendo con temperaturas $\sim 22^{\circ}\text{C}$ y concentraciones altas de seston total (9 mg/L).



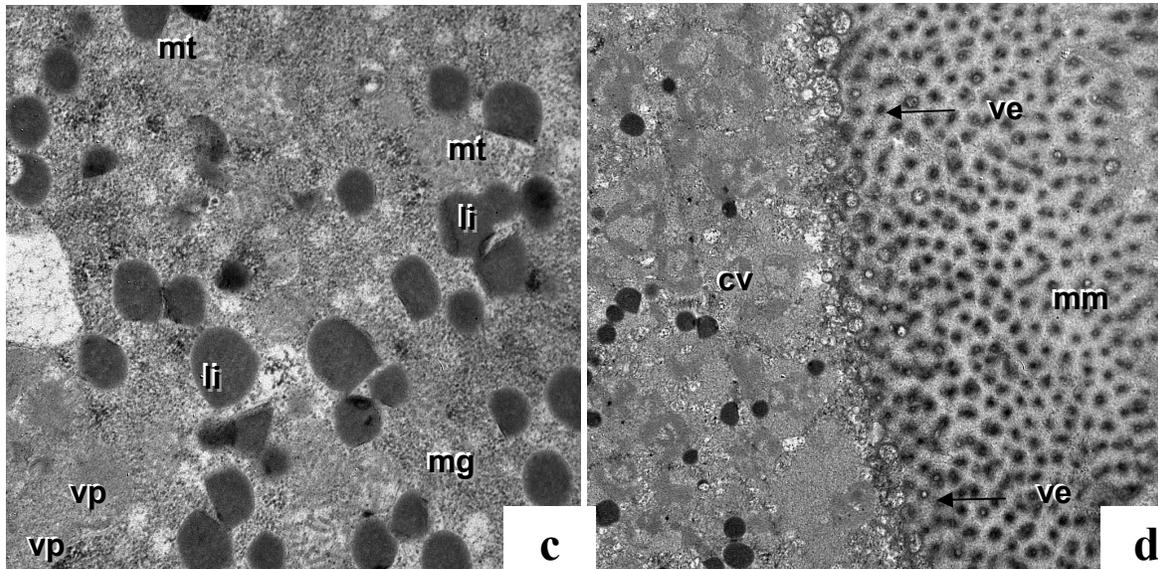


Figura 14.- Ovocitos vitelogénicos de *N.subnodosus* con forma de pera a) y forma ahusada hacia el centro b), se observa la presencia de un núcleo central (nu) con muy poca heterocromatina condensada (he), c) en el citoplasma se observa la aparición de los componentes vitelinos (cv) como lípidos (li), material granular (mg) y vitelo proteico (vp), el número de organelos celulares aumenta dificultándose su observación debido a la presencia del material vitelino. d.-Se muestra la membrana de microvellosidades (mmv) la cual aparece a partir de este estadio de desarrollo. Se observa la presencia de vesículas (ve).

Los ovocitos vitelogénicos continúan su desarrollo dando origen a los ovocitos maduros, los cuales presentan un aumento del tamaño con un área aproximada de $1761.88 \mu\text{m}^2 \pm 644.72$ (Fig. 15a, b y c). Dentro del citoplasma se observa un aumento en la cantidad de gránulos de vitelo proteico, gotas de lípidos y material granular. El núcleo se observa grande en posición central con un área aproximada de $204.81 \mu\text{m}^2 \pm 45.32$, donde se muestra la heterocromatina condensada en un solo punto dentro del núcleo como se muestra en la figura 15a y c. Los ovocitos postvitelogénicos ya no se encuentran asociados a las paredes foliculares, por lo que las células toman formas poliédricas como se muestra en la figura 15b. Con el aumento de tamaño de los ovocitos, la cantidad de organelos celulares presentes en el citoplasma se incrementa o se desarrolla (Fig. 15a). La membrana tipo corion al igual que el ovocito vitelogénico primario tiene un grosor de $1.78 \mu\text{m} \pm 0.29$.

Al igual que los ovocitos vitelogénicos, los ovocitos postvitelogénicos son el tipo celular representativo del estadio de madurez, estuvieron en casi todos los meses de muestreo, con máximas frecuencias en octubre y noviembre, correspondiendo con temperaturas $\sim 22^\circ\text{C}$ y concentraciones altas de seston total (9 mg/L).

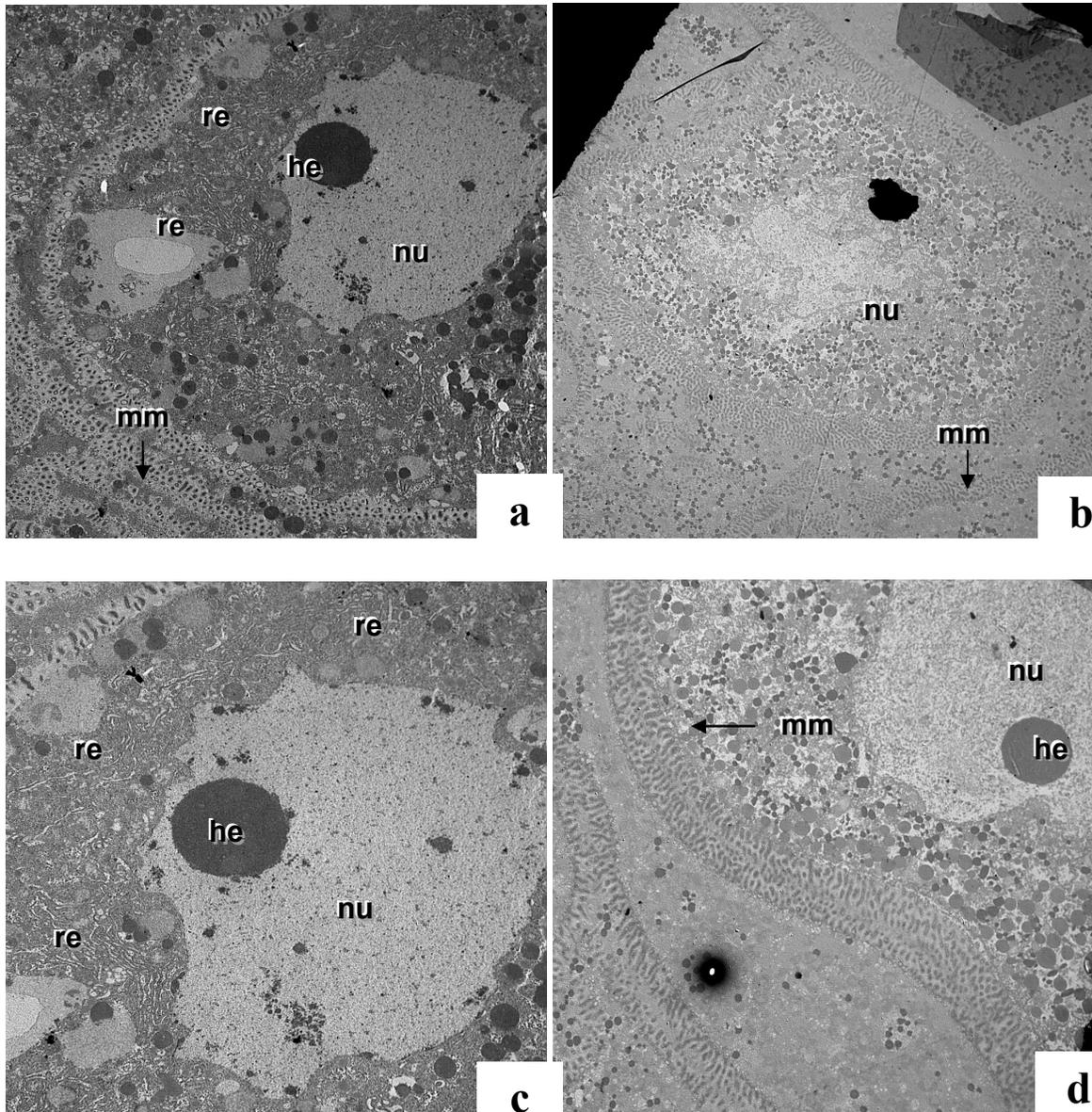


Figura 15.- Ovocitos maduros de *N. subnodosus* mostrándose el núcleo grande en posición central. Los ovocitos vitelogénicos secundarios de forma poliédrica. Al incrementar la talla del ovocito, el número de organelos celulares se incrementa de manera recíproca mostrándose una gran cantidad de retículo endoplasmático (re).

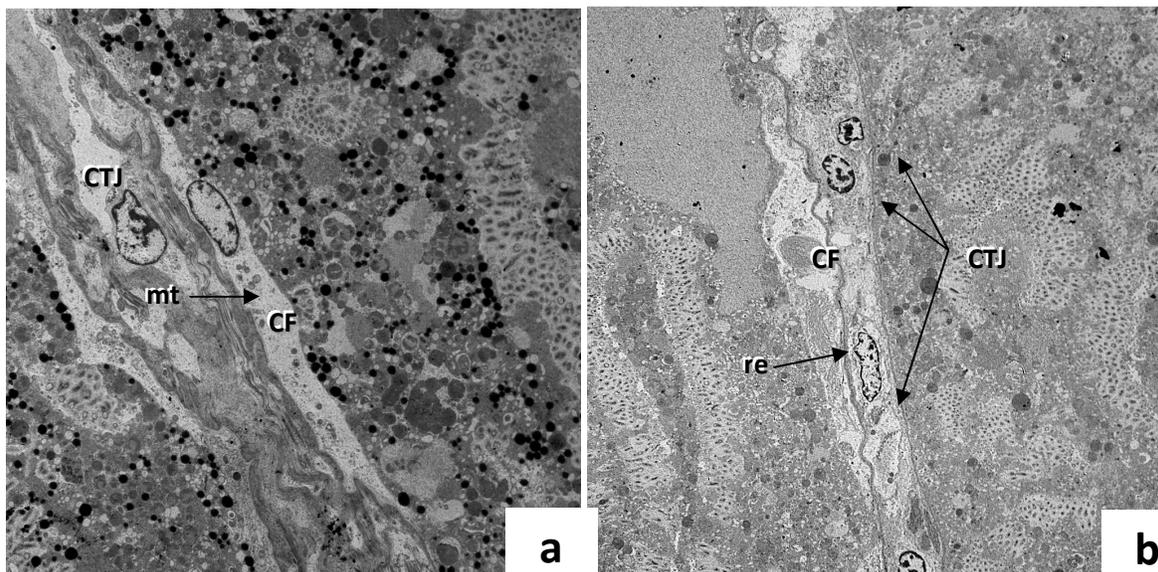
7.3.3.- Células foliculares

A partir de los estadios de vitelogénesis se observó la presencia de células alargadas asociadas a la pared folicular estando estas en contacto con los ovocitos vitelogénicos. Estas células denominadas foliculares presentan un área aproximada

de $60.76\mu\text{m}^2 \pm 10.81$ (Fig. 16a y b), con un núcleo de forma ovalada de un área aproximada de $7.25 \mu\text{m}^2 \pm 0.49$. El nucleoplasma presentó heterocromatina condensada hacia la periferia del mismo. Dentro de citoplasma encontramos escasos organelos celulares, como el retículo endoplasmático, vesículas y mitocondrias.

7.3.4.- Tejido conjuntivo

El tejido conjuntivo que se encuentra a continuación de la membrana basal de los folículos contiene células de tipo fibroblastos, las cuales son de forma alargada con un núcleo de la misma forma con poca cantidad de heterocromatina condensada hacia la periferia y de tamaño reducido, este tipo celular presenta un área aproximada de $38.78 \mu\text{m}^2 \pm 10.81$ (16a y b). Además, se encuentran en el mismo tejido fibras tipo colágenas y vasos que presentan un transporte de hemolinfa y gránulos lipídicos como se muestra en la figura 16c y d.



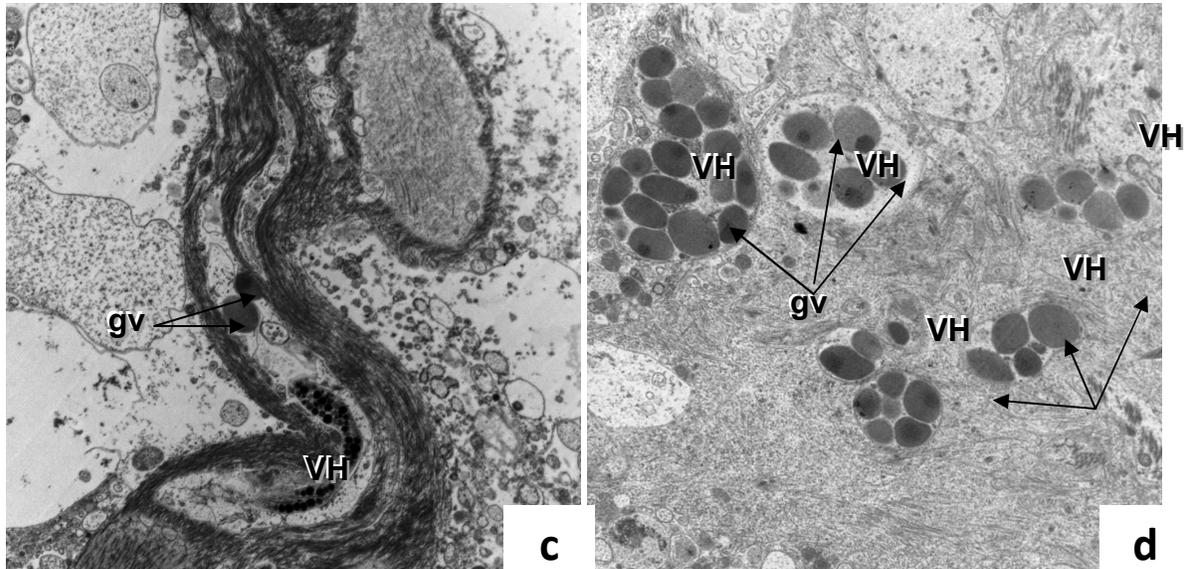


Figura 16.- Células foliculares (CF) (a y b), células del tejido conjuntivo (CTJ) (a y b) y vasos con hemolinfa (VH) (c y d) de *N. subnodosus*. En la célula folicular se observan la presencia de organelos celulares como mitocondrias (mt), retículo endoplasmático (re). Las CTJ se observan en el tejido conjuntivo de la membrana folicular, en el núcleo se observa la heterocromatina condensada, el citoplasma celular no se observa la presencia de organelos celulares. En el tejido conjuntivo de la membrana folicular se observa la presencia de vasos con hemolinfa (VH) los cuales presentan gránulos de vitelo (gv).

7.4.- Fases de desarrollo gonádico

De acuerdo a las observaciones de los cortes histológicos y a las descripciones de las fases de desarrollo gonadal propuestas por Arellano-Martínez (2005), *N. subnodosus* presento las siguientes características de desarrollo en Bahía Tortugas, B.C.S.:

Indiferenciación.- Se caracterizó por presentar nulo o poco material folicular, y una total ausencia de gametos (Fig. 17a y 18a). Presenta una gran cantidad de tejido conectivo difuso.

Inicio de desarrollo.- Comienza la proliferación de gametos masculinos y femeninos dentro de los folículos, los cuales comenzaron a engrosarse y ramificarse ligeramente. En el caso del tejido ovárico, las tallas de los gametos oscilaron entre los 124.3 a 1968 μm^2 (área) y 6.9 a 47.9 μm (diámetro), las cuales corresponden a células de menor grado de desarrollo dentro de la línea germinal de ovogonia primaria a ovocitos previtelogénicos (Fig. 17b). En el caso del tejido testicular, los gametos presentes fueron de tipo espermatogonia y espermatoцитos de primero y

segundo orden, los cuales se observaron pegados a la pared de los túbulos y a medida que se avanzó en el desarrollo, se fueron dirigiendo hacia el lumen de los mismos (Fig. 18b).

Desarrollo avanzado.- Para ambos sexos, se presenta una marcada disminución de la matriz de tejido inter-conectivo y un incremento gradual en el grado de desarrollo de los gametos. En el caso del tejido ovárico, los ovocitos comenzaron a empaquetarse gradualmente en el lumen del ovario y su área osciló entre los 1059.8 y 2553 μm^2 , así como el diámetro entre los 36.2 a 77.2 μm (Fig. 17c). En el tejido testicular, el tipo celular representativo es la espermatida y numerosos grupos de espermatozoides con sus flagelos empaquetados paralelamente en el lumen de los túbulos seminíferos (Fig. 18c).

Madurez.- Los folículos y túbulos están completamente ensanchados, ramificados y empaquetados con ovocitos postvitelogénicos y espermatozoides maduros. Para el caso del tejido ovárico, el área ovocitaria oscila entre 1034.5 y 5474.6 μm^2 y diámetros entre 36.2 y 94.8 μm (Fig. 17d y 18d). El tejido conectivo se encuentra restringido a su mínima expresión y mayormente en la periferia del tejido testicular y ovárico.

Desove parcial.- A consecuencia de la liberación de los gametos, los folículos están rotos y parcialmente vacíos, aunque todavía ensanchados dependiendo de la intensidad y grado de desove. En el ovario, se aprecia la presencia de ovocitos todavía maduros y ahora llamados residuales, cuya área varió entre 954 y 2536 μm^2 y diámetro entre 30.4 a 71.3 μm . En algunos casos, dependiendo de las condiciones ambientales, existen ovocitos previtelogénicos embebidos a la pared y comenzando un nuevo desarrollo (Fig. 17e y 18e).

Posdesove.- Las gónadas presentan folículos y túbulos rotos y delgados. Comienza a proliferar nuevamente el tejido inter-conectivo. Se observa la presencia de ovocitos y espermatozoides residuales, los cuales comienzan a ser destruidos por fagocitos (Fig. 17f y 18f). Los ovocitos presentaron áreas y diámetros muy variables entre 982 a 2948 μm^2 y 30.4 a 65.5 μm .

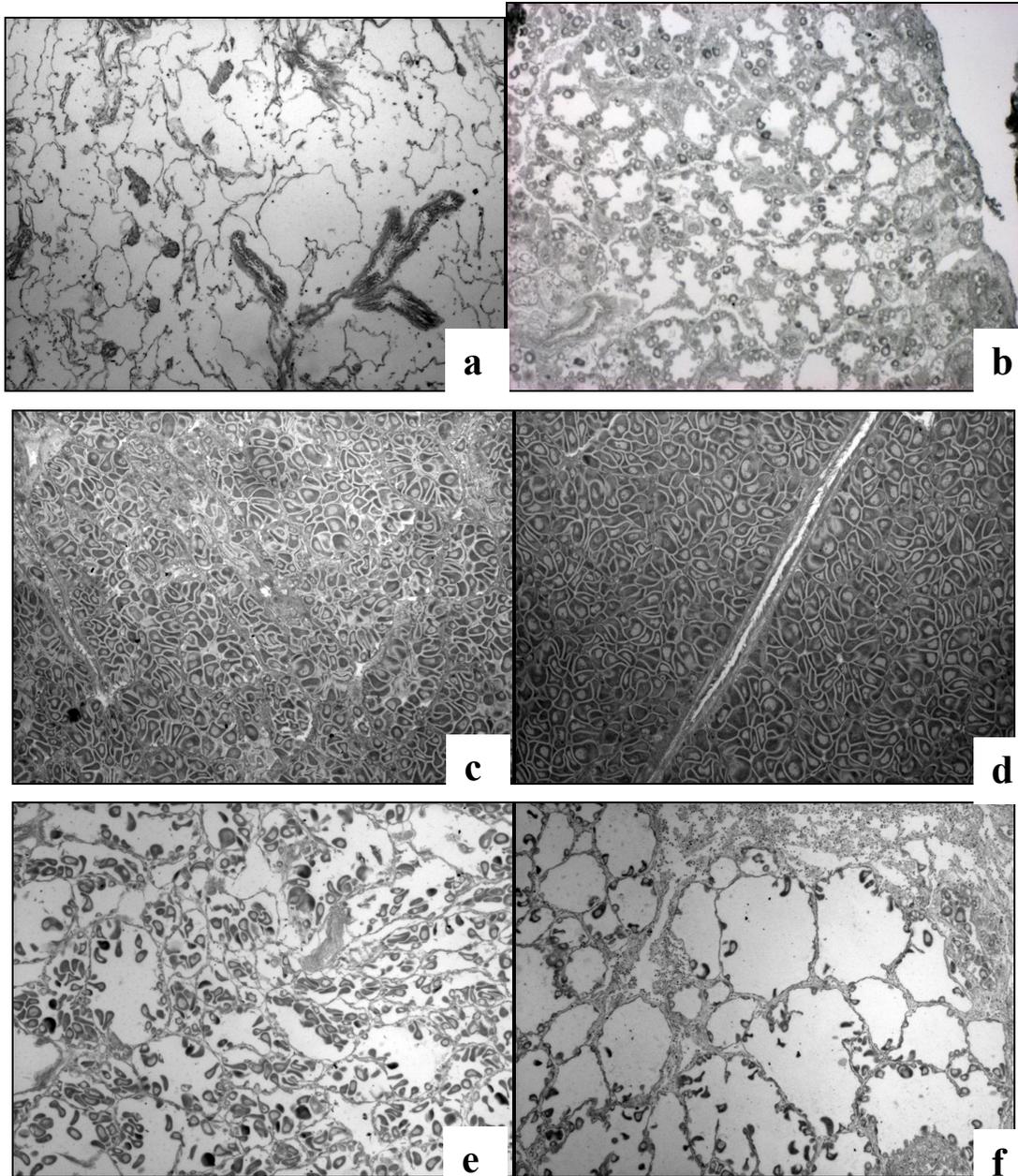


Figura 17.- Microfotografías de las diferentes fases de desarrollo ovárico de *Nodipecten subnodosus*. a) indiferenciado b) inicio de desarrollo c) desarrollo avanzado d) madurez e) desove parcial f) posdesove.

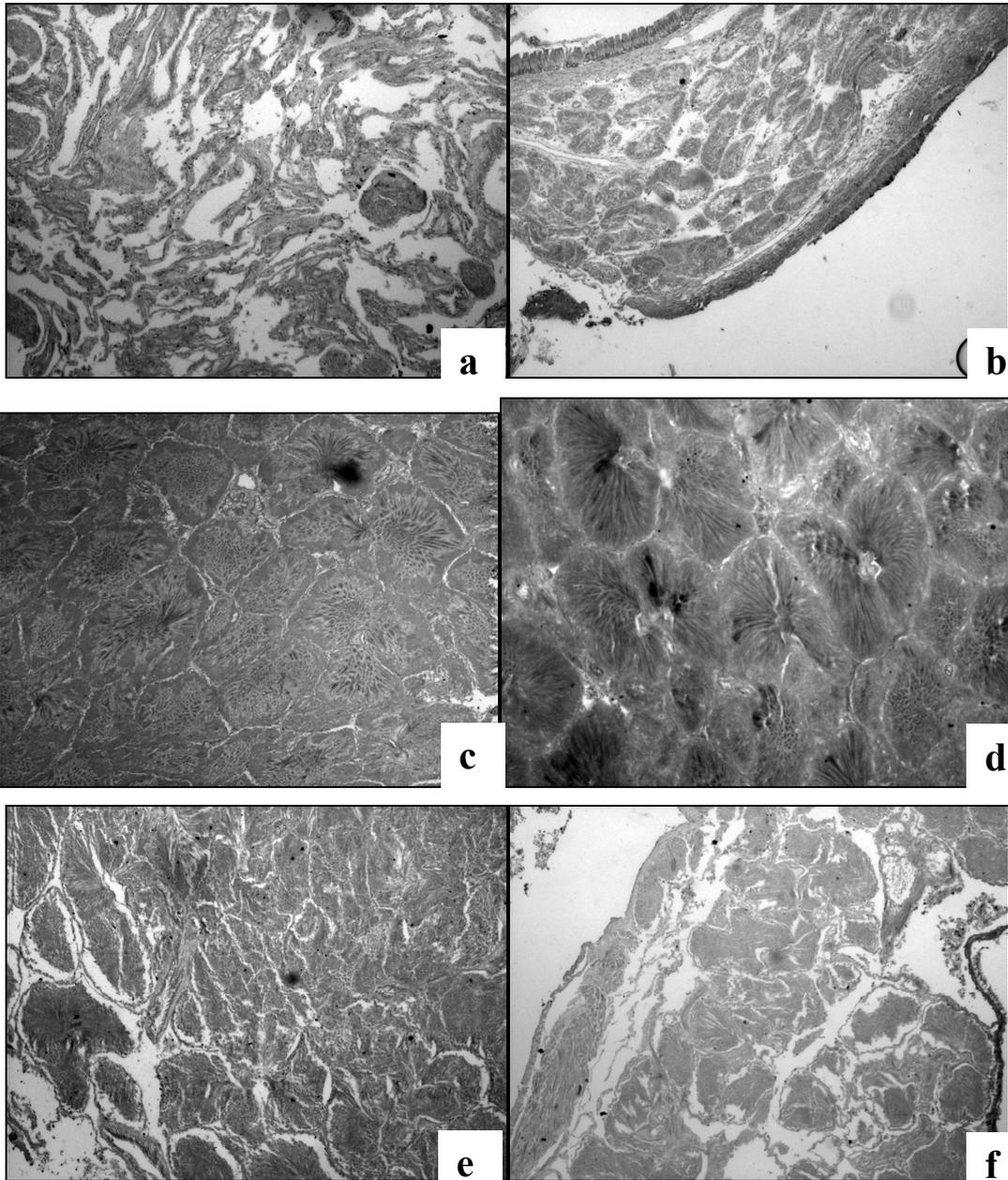


Figura 18.- Microfotografías de las diferentes fases de desarrollo espermatogénico de *Nodipecten subnodosus*. a) indiferenciado b) inicio de desarrollo c) desarrollo avanzado d) madurez e) desove parcial f) posdesove.

7.5.- Reabsorción

Adicionalmente encontraron organismos con reabsorción gonádica (Fig. 19a y b), estas gónadas presentan las mismas características que en la fase de madurez, con la presencia de grandes cantidades de ovocitos y espermatozoides en proceso de reabsorción.

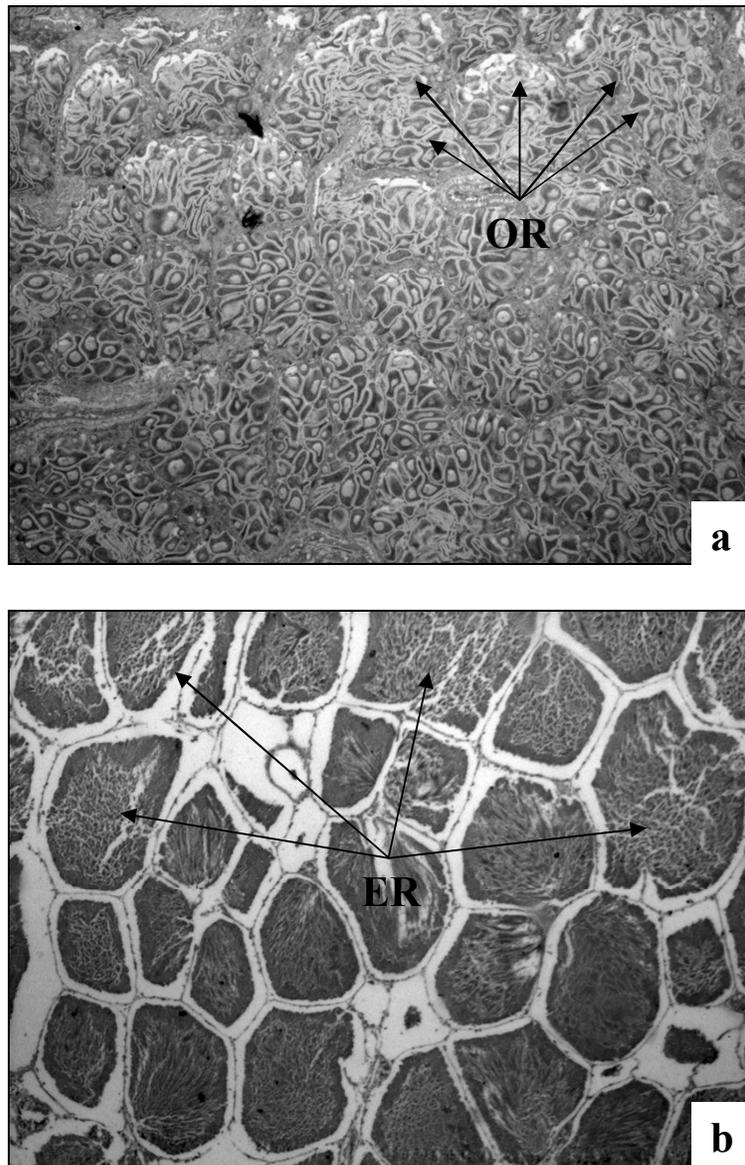


Figura 19.- Microfotografías de la reabsorción gonádica de *N. subnodosus*. En la porción femenina(a) se muestran ovocitos maduros en reabsorción (OR) y en la masculina (b) se muestran túbulos con espermatozoides en reabsorción (ER).

7.6.- Ciclo reproductivo

El ciclo reproductivo de *N. subnodosus* en Bahía Tortugas, B.C.S. se muestra en la figura 20. En abril del 2009 se registró una alta incidencia de organismos en etapa de desarrollo inicial, representando el 62% del tejido ovárico y 53% del tejido testicular. A partir de aquí, se observaron organismos en desarrollo avanzado casi todo el año (a excepción de enero, febrero y marzo de 2010) y maduros todo el año, con una mayor incidencia en octubre (62% en el tejido ovárico; 23.8 °C) y noviembre de 2009 (80% en el caso del tejido testicular; 21.8 °C). Igualmente, el desove ocurrió casi todo el año, no obstante se detectaron dos picos, uno de menor intensidad de julio a octubre 2009 (23% en el ovario y 22% en el testículo) cuando la temperatura se incrementa de 16 a 24 °C, y otro de mayor intensidad de diciembre de 2009 a febrero 2010 (76% en el ovario y 75% en el testículo) cuando la temperatura del agua disminuyó de 20 a 18°C. En el caso del tejido ovárico, los organismos en etapa de postdesove se observaron de noviembre a febrero con un máximo porcentaje en enero de 2010 (20%). Para el caso del tejido testicular, los organismos en postdesoves se presentaron de diciembre de 2009 a marzo de 2010, con máximo porcentaje en diciembre de 2008 (18.8%). Finalmente, el proceso de reabsorción de la gónada se registró en las hembras de abril a noviembre, y alcanzó un máximo en junio (76%) concordando con el comienzo del incremento de la temperatura promedio mensual (14.73 °C). Para el caso de los machos, el comportamiento fue muy similar, sin embargo la mayor incidencia de gónadas en reabsorción ocurrió en julio (35%) concordando a su vez, con el incremento de la temperatura promedio mensual (15.90 °C).

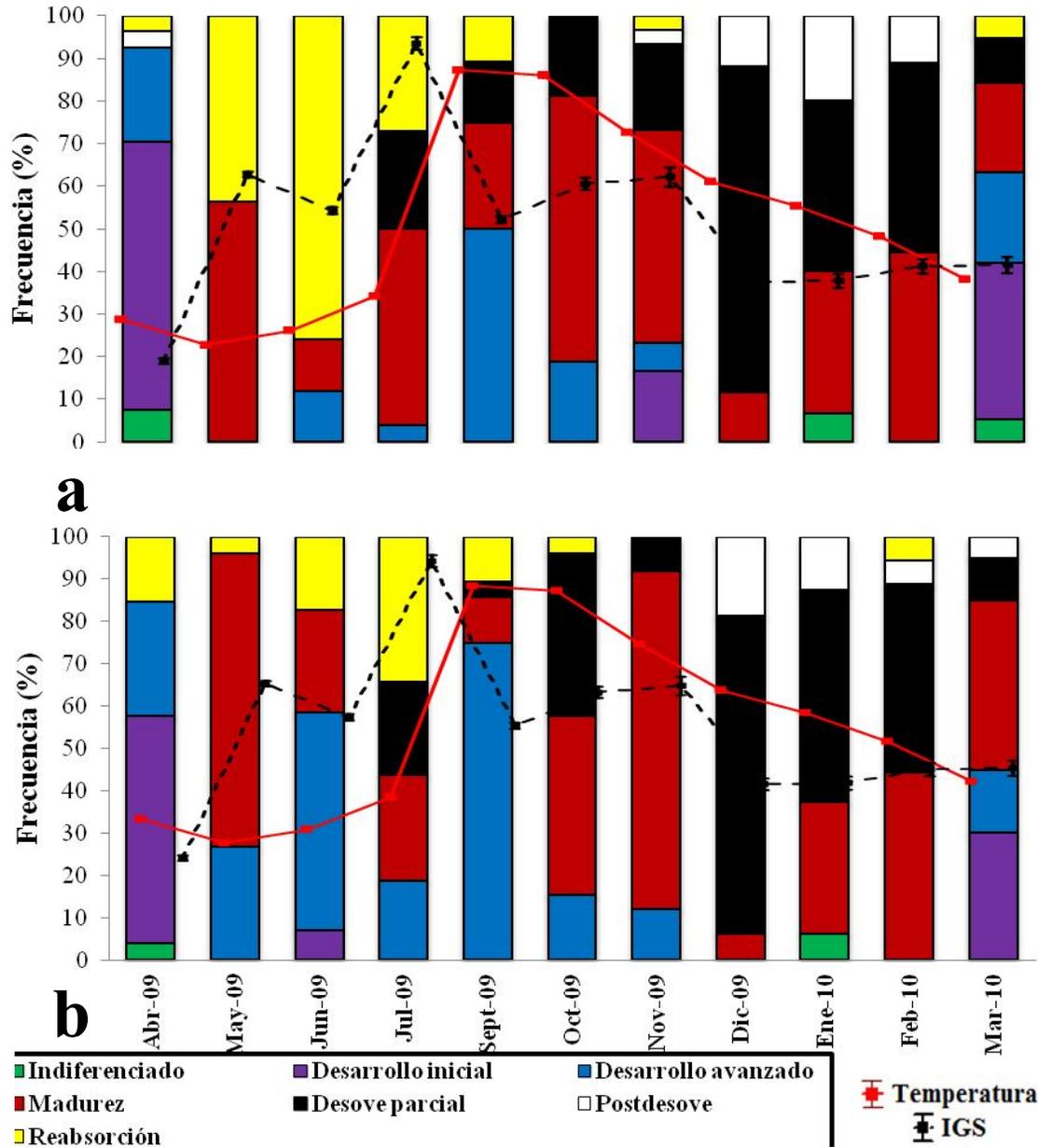
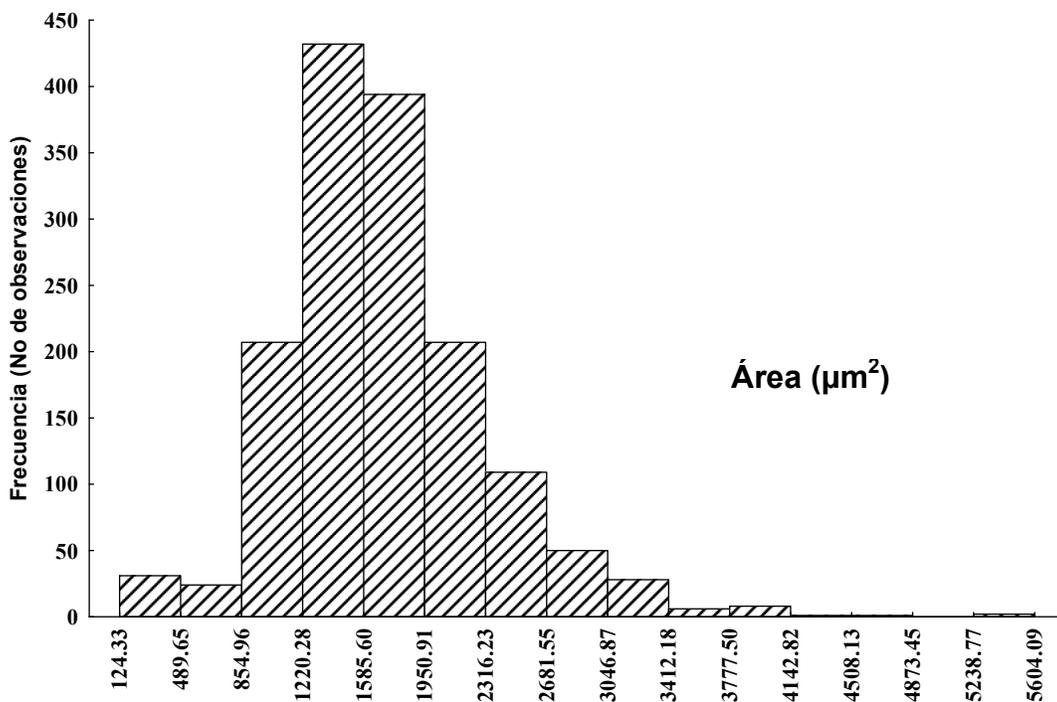


Figura 20.- Frecuencias mensuales de las diferentes fases de desarrollo gonádico de *N. subnodosus* durante el periodo de estudio. a) Ovario y b) Testículo y la variación de la temperatura del agua y del IGS. (media \pm el error estándar).

7.7.- Índices de calidad ovocitaria

7.7.1.- Área y diámetro de ovocitos

El cálculo del área y diámetro de los ovocitos por intervalos de tallas se muestra en la figura 21. Se aprecia claramente una distribución unimodal en la que la mayor frecuencia de ovocitos presumiblemente postvitelogénicos se obtuvo en el intervalo 1191.09-1436.49 μm^2 (área) y en el intervalo 47.92-53.77 μm (diámetro) presentando diferencias significativas, que es donde se asume que el proceso de vitelogénesis ocurre de manera más intensa y representativa en el ciclo reproductivo. Por el contrario, los ovocitos con menor frecuencia se registraron en los intervalos de los extremos, mismos que pueden corresponder a los ovocitos en desarrollo incipiente o en proceso de atresia o reabsorción.



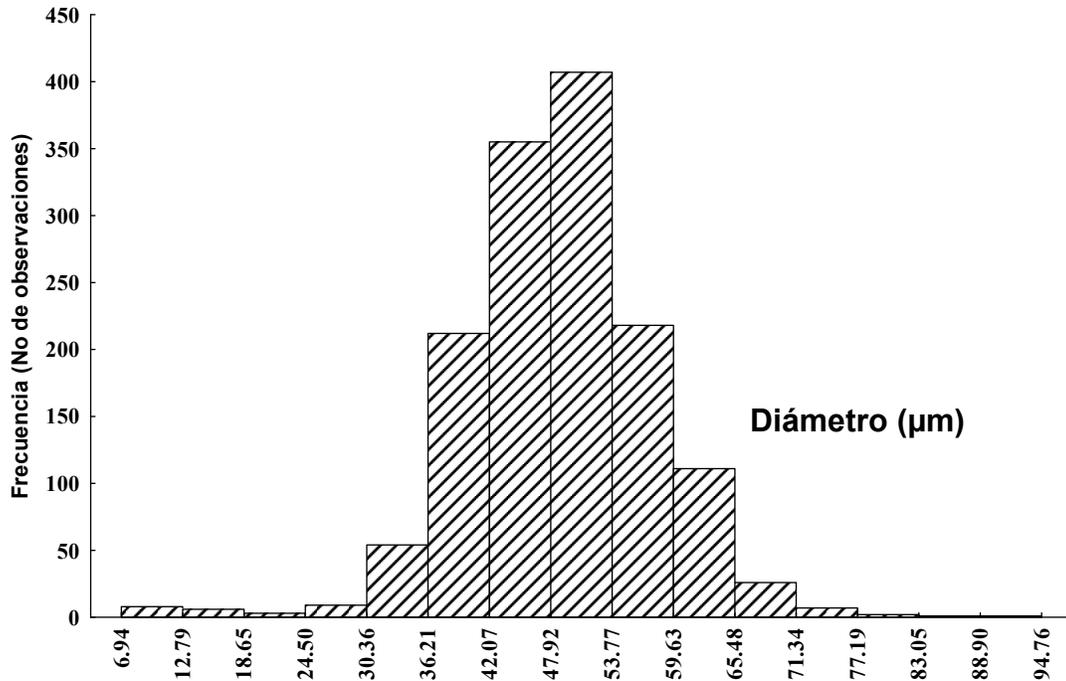


Figura 21.- Frecuencia en el área y diámetro de los ovocitos registrados para el tiempo de estudio en los organismos de *N. subnodosus* de la localidad de Bahía Tortugas, B.C.S. México.

En la figura 22 se muestran las variaciones del área y diámetro de los ovocitos a lo largo del estudio. Se puede observar claramente dos picos o incrementos en el área y diámetro de los ovocitos, el primero presentó los valores máximos en julio de 2009 ($2037.48 \mu\text{m}^2 \pm 751.44$ de área y $53.75 \mu\text{m} \pm 9.39$ de diámetro) y el segundo en enero 2010 ($1648.46 \mu\text{m}^2 \pm 447.30$ de área y $50.37 \mu\text{m} \pm 7.01$) siendo significativos (prueba a posteriori Tukey), mientras que los mínimos en marzo de 2010 ($1428.10 \mu\text{m}^2 \pm 453.04$ de área) y abril 09 ($43.35 \mu\text{m} \pm 10.18$ de diámetro) siendo significativos (prueba a posteriori Tukey). Estas variaciones en el área y diámetro de los ovocitos fueron significativas con respecto al tiempo (área: $F=14.62$, $p<0.05$; diámetro: $F=19.26$, $p<0.05$).

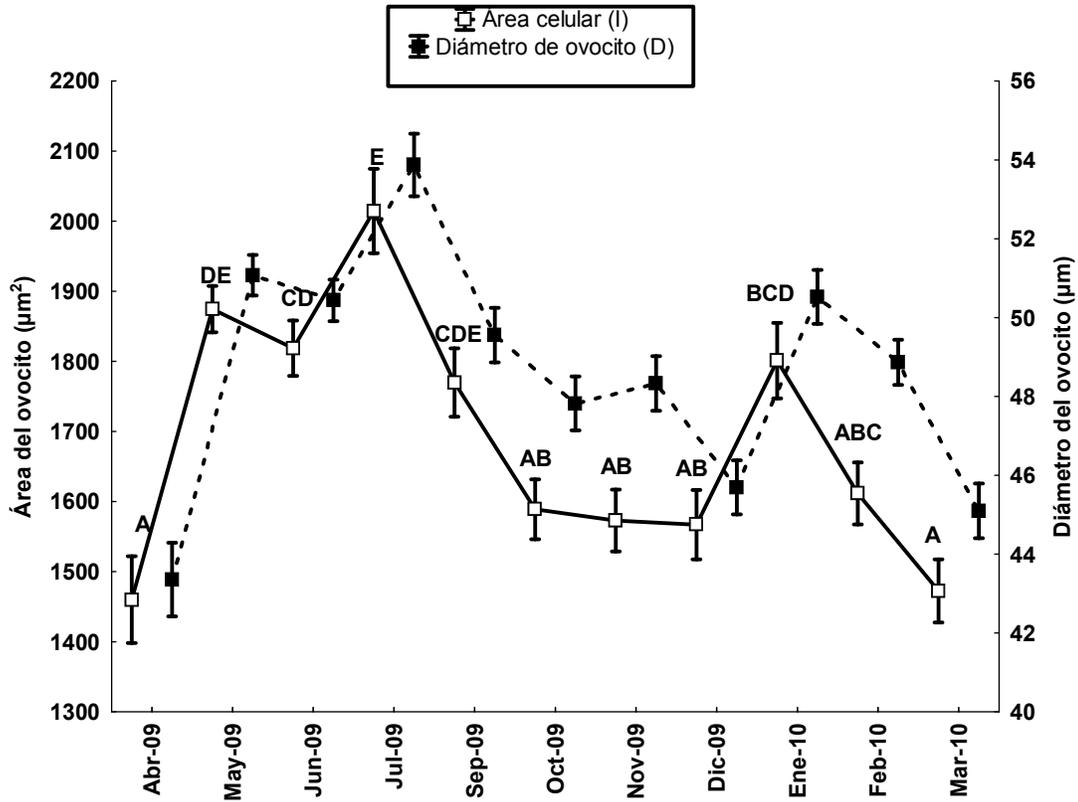


Figura 22.- Variación del área y diámetro de los ovocitos de *N. subnodosus* durante el periodo de estudio en Bahía Tortugas, B.C.S. México. Se muestra la media \pm el error estandar.

7.7.2- Contenido de lípidos

Las variaciones del contenido de lípidos en los ovocitos de *N. subnodosus* con respecto al tiempo siguieron un claro patrón estacional (Fig. 23). Se pueden observar con claridad dos picos o incrementos en el contenido de lípidos; el primero y más intenso en julio de 2009 (1165.4 ± 431.73) y el segundo y menos conspicuo en enero de 2010 (1034.87 ± 358.08) siendo significativamente mayor (prueba a posteriori Tukey). Por el contrario, los valores mínimos en el contenido de lípidos se registraron en abril de 2009 (529.5 ± 341.73) siendo significativamente menor (prueba a posteriori Tukey). El contenido de lípidos varió significativamente a lo largo del ciclo anual ($F=38.24, p<0.05$).

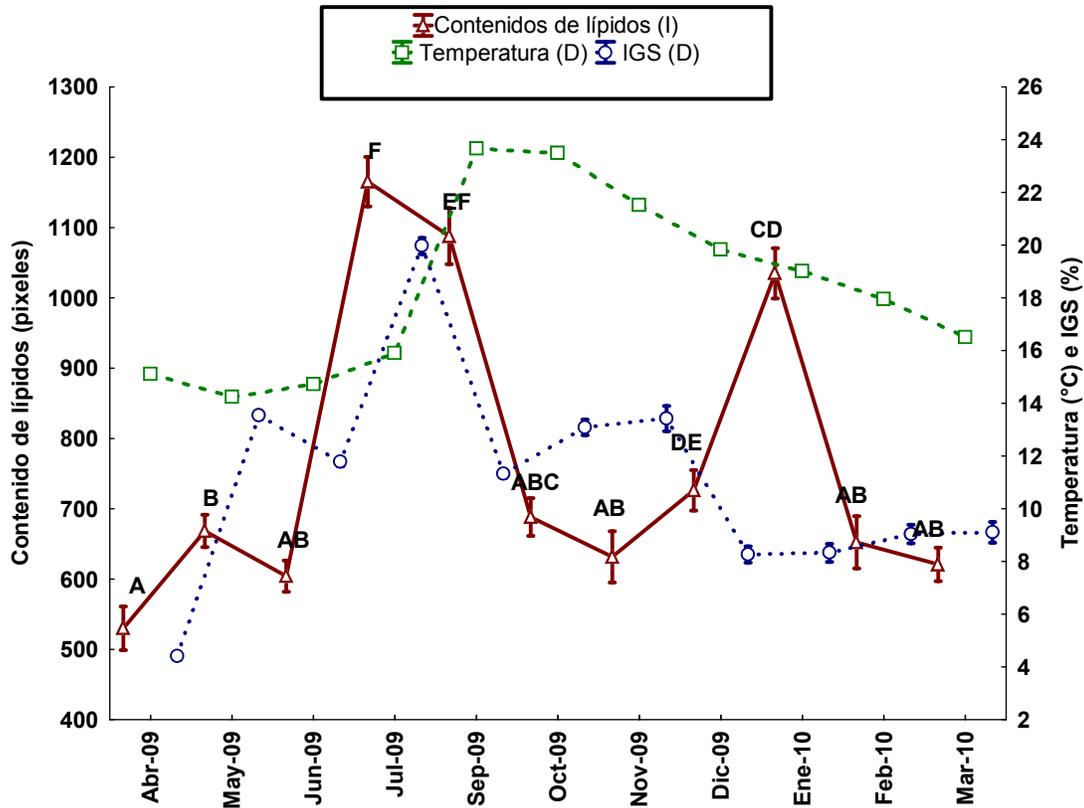


Figura 23.- Variación del contenido de lípidos de los ovocitos de *N. subnodosus* y su relación con la temperatura del agua y el IGS. Se muestra la media \pm el error estándar.

La figura 24 muestra la relación entre el área de los ovocitos y el contenido de gotas de lípidos del citoplasma de *N. subnodosus*. Se aprecia que el mayor contenido de gotas de lípidos se presenta en los ovocitos más grandes hasta el intervalo $3970-4514 \mu\text{m}^2$, en donde incrementos en talla ya no corresponden a mayor contenido de lípidos. Por el contrario, el menor contenido de gotas lipídicas se registró en el intervalo de tallas $158-702 \mu\text{m}^2$.

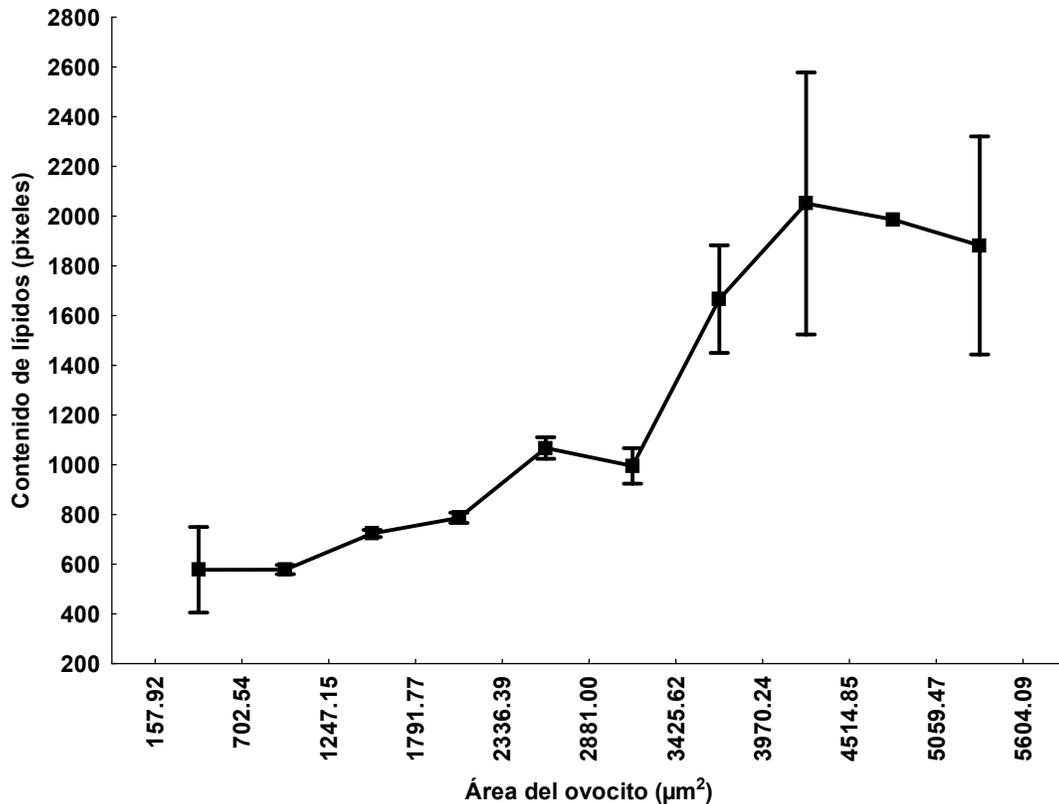


Figura 24.- Relación entre el contenido de lípidos y el área de los ovocitos de *N. subnodosus* de Bahía Tortugas, B.C.S. México. Se muestra el promedio \pm el error estándar.

7.7.3- Índice lipídico

El registro de los cambios temporales en el índice lipídico se muestra en la figura 25. La tendencia observada con este indicador es muy parecida a la que se observó con el contenido de lípidos, es decir, existen dos picos bien definidos a lo largo del año. El primero en septiembre de 2009 ($63.3 \pm 36.35\%$), y el segundo en enero de 2010 ($62.6 \pm 28.32\%$) en esos meses el índice lipídico fue significativamente más alto ($p < 0.05$). Por el contrario los valores significativamente más bajos ($p < 0.05$) del índice lipídico se registraron en julio de 2009, con un promedio de 33.8 ± 15.77 . Las variaciones en el índice lipídico fueron significativas con respecto al tiempo ($F=32.27$, $p < 0.05$).

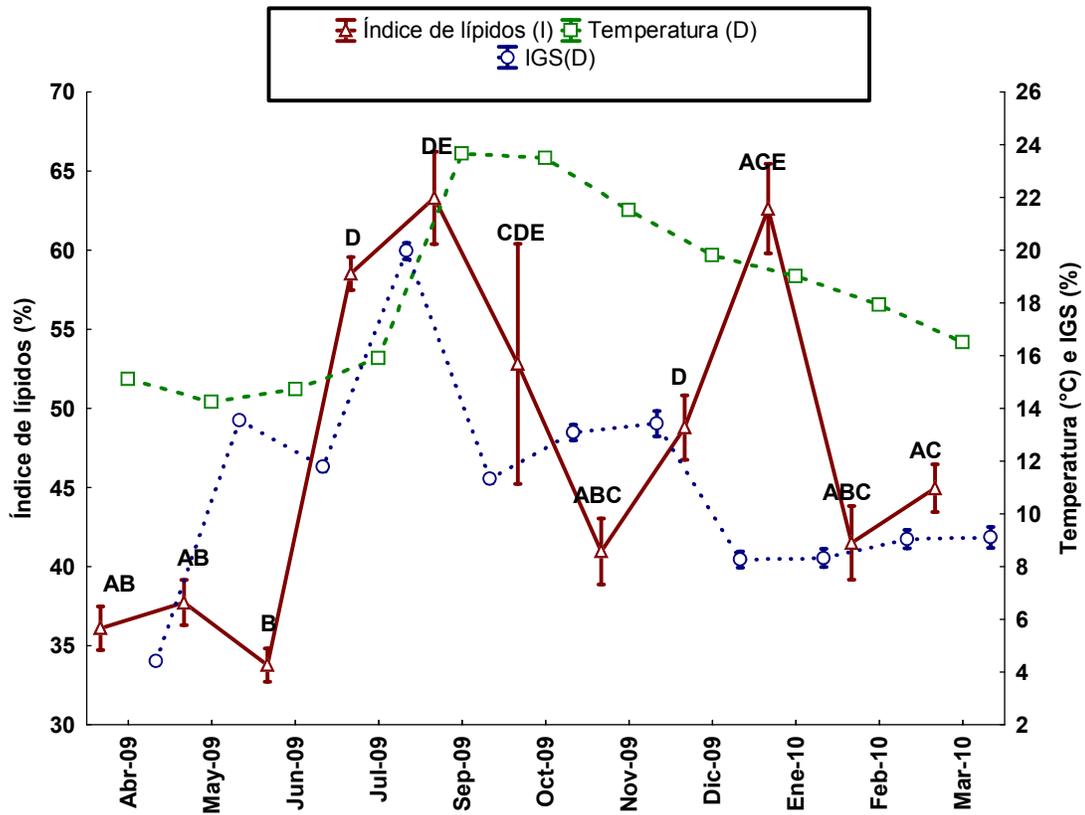


Figura 25.- Variación temporal del índice de lípidos en los ovocitos de *N. subnodosus* de Bahía Tortugas, B.C.S. México y su relación con la temperatura del agua y el IGS. Se muestra el promedio \pm el error estándar.

La relación entre el índice lipídico y el área de los ovocitos se muestra en la figura 26. Aunque la tendencia de esta relación es errática, los valores más altos del IL se registraron en los intervalos de tallas 3970–4515 μm^2 y 702–1247 μm^2 , mientras que los más bajos en el intervalo 2881–3426 μm^2 .

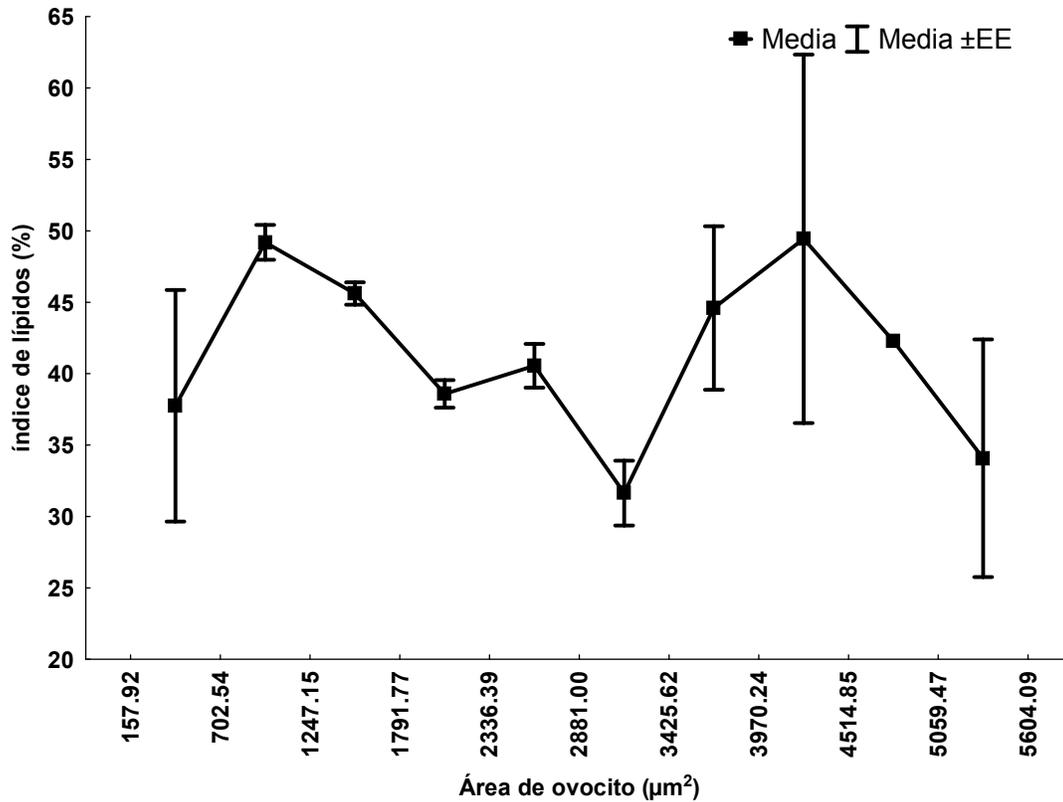


Figura 26.- Relación del área de los ovocitos y el índice lipídico de *N. subnodosus* de Bahía Tortugas, B.C.S. México. Se muestra el promedio \pm el error estándar.

7.8.- Índices morfofisiológicos

Como se puede apreciar en la figura 27, los valores del IGS mostraron un marcado patrón estacional, donde el valor más bajo se obtuvo en abril de 2009 (4.48%) y el valor máximo en agosto de 2009 (32.14%). No hubo correlación entre la temperatura del agua y el IGS ($r=0.003$, $p>0.05$).

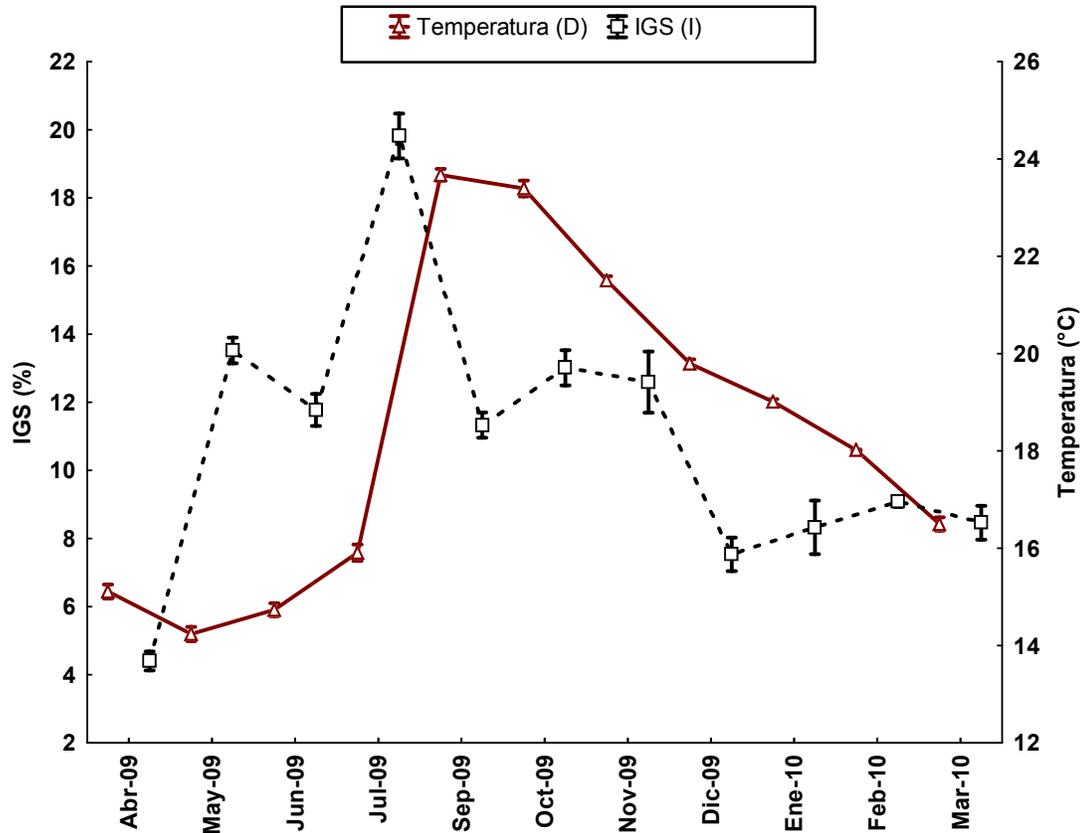


Figura 27.- Variaciones temporales del índice gonadosomático de *N. subnodosus* y la temperatura del agua de Bahía Tortugas, B.C.S. Se muestra la media \pm el error estándar.

(Fig. 28) Los valores del IM presentan un patrón estacional. En julio se alcanzó el máximo valor (49.9%) y el mínimo en noviembre (30.2%). Por otra parte los valores del IGD y el IMA no presentaron una variación marcada a lo largo del estudio. El IGD presentó sus valores máximo y mínimo en septiembre (11.60%) y en enero (8.90 %), mientras que el IMA tuvo sus máximos y mínimos en marzo (21.59 %) y diciembre (17.32%). No hubo correlación entre el IGS y el IM ($r= 0.01$, $p>0.05$).

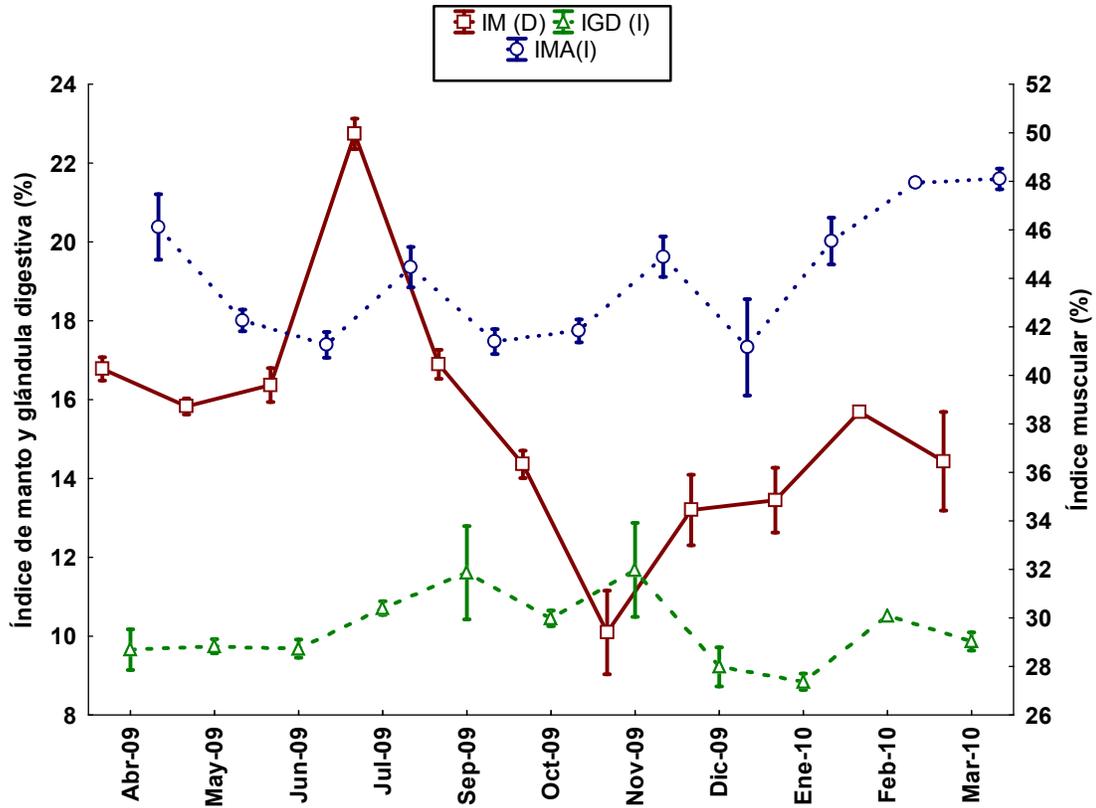


Figura 28.- Variación temporal de los valores medios de los índices de glándula digestiva, del músculo aductor y del manto de *N. subnodosus*. Se muestra la media \pm el error estándar.

7.9.- Correlaciones entre variables

La tabla 1 muestra los resultados de los análisis de correlación efectuados entre algunos indicadores reproductivos y variables ambientales relacionadas con la gametogénesis de *N. subnodosus*. Se obtuvieron ajustes significativos entre casi todas las variables exceptuando a la temperatura vs diámetro, temperatura vs IGS y diámetro vs índice de lipídico.

Tabla 1.- Correlación entre indicadores reproductivos y temperatura del agua de *N. subnodosus* de Bahía Tortugas, B.C.S. México

Variables	Temperatura	Diámetro	Área	IGS	Contenido de lípidos	Índice de lípidos
Temperatura	xxxxx					
Diámetro	r=0.04, p>0.05	xxxxx				

Área	r=0.06, p<0.05	r=0.62, p<0.05	xxxxx			
IGS	r=0.04, p>0.05	r=0.19, p<0.05	r=0.18, p<0.05	xxxxx		
Contenido de lípidos	r=0.15, p<0.05	r=0.30, p<0.05	r=0.38, p<0.05	r=0.19, p<0.05	xxxxx	
índice de lípidos	r=0.19, p<0.05	r=0.03, p>0.05	r=0.20, p<0.05	r=0.09, p<0.05	r=0.74, p<0.05	xxxxx

8.- DISCUSIÓN

8.1.-Medio ambiente y su relación con la reproducción

Actualmente se sabe que la reproducción de los bivalvos marinos está regulada por una compleja interacción de factores exógenos y endógenos, las cuales dependen de la distribución geográfica (latitudinal) y hábitat particular que cada especie ocupa (Giese & Pearse, 1974). Por ello, especies con una amplia distribución geográfica pueden presentar variaciones en sus tácticas reproductivas (duración del ciclo reproductivo, dinámica del almacenamiento y transferencia de nutrientes para soportar la gametogénesis, talla de primera madurez, etc.), ocasionadas como una respuesta adaptativa a determinado microambiente. Los organismos procedentes de ambientes templados y subtropicales se encuentran adaptados para maximizar su actividad reproductiva durante cortas temporadas del año (de uno a tres meses) denominados picos reproductivos y de desove (Giese & Pearse, 1974; Bayne, 1976; MacDonald & Thompson, 1985). Estos picos reproductivos suelen manifestarse mediante algunos cambios marcados de diversos factores exógenos, donde la disponibilidad del alimento y la temperatura del agua son los factores generalmente más influyentes.

Los resultados obtenidos mediante los análisis histológicos, mostraron que los adultos de *N. subnodosus* presentaron un desarrollo gonádico sincrónico continuo en la localidad de Bahía Tortugas, B.C.S., con desarrollo gonadal y desoves presentes casi todo el año y sin presencia del periodo de inactividad reproductiva típico de muchas otras especies. Este comportamiento es similar al reportado para la especie en Bahía de Los Ángeles, B.C. (Yee-Duarte, 2009) y Bahía Magdalena, B.C.S. (Racotta *et al.*, 2003) y que en ambos casos refleja una estrategia reproductiva de

tipo oportunista para regular la gametogénesis a partir de la energía tomada del alimento (Bayne, 1976). En contraste, Arellano-Martínez *et al.* (2004a) reporta que *N. subnodosus* de la Laguna Ojo de Liebre, B.C.S. presenta un periodo de desove marcado de septiembre a noviembre, así como un periodo de inactividad reproductiva de diciembre a marzo. En este caso, el comportamiento de la especie corresponde a una estrategia reproductiva de tipo conservativa en el que la gametogénesis se sustenta básicamente de las reservas almacenadas en tejidos somáticos. Estas diferencias en la adopción de una u otra estrategia reproductiva por parte de *N. subnodosus* pueden deberse a las características fisicoquímicas de cada localidad donde la especie habita la población; la Laguna Ojo de Liebre, por ejemplo, es considerada una zona de baja productividad primaria (Millán *et al.*, 1987) y baja calidad de alimento (Arellano-Martínez *et al.*, 2004a), mientras que Bahía de Los Ángeles presenta una alta productividad primaria casi todo el año (Álvarez-Borrego & Lara-Lara, 1991); Bahía Magdalena es una laguna eutrófica también con una alta productividad primaria (Gómez-Gutiérrez *et al.*, 2001), recayendo sus diferencias principalmente en la disponibilidad del alimento.

Se ha reportado ampliamente que la disponibilidad de alimento además es uno de los factores que más pueden afectar a la reproducción de los bivalvos marinos (MacDonald & Thompson, 1985; Ruiz *et al.*, 1992; Jaramillo *et al.*, 1993; Urrutia *et al.*, 2001; Campodónico *et al.*, 2008). A la temperatura se le atribuye normalmente la responsabilidad de controlar el inicio o término de la mayoría de los procesos reproductivos (e.g. desarrollo gonadal, desove, reabsorción de nutrientes), mientras que la duración de éstos se ha asociado a la disponibilidad de alimento (Bayne, 1976; MacDonald & Thompson, 1985). Al contar los organismos con una constante disponibilidad de alimento, obtienen la energía suficiente para el soporte de la maduración de gametos, sin tener que recurrir a las reservas energéticas almacenadas en otros órganos, teniendo así, una continua actividad reproductiva (Baron, 1992). Arellano-Martínez *et al.* (2010) mencionan que la disponibilidad del alimento es un factor que influye en aspectos importantes en la reproducción de *N. subnodosus*, como la edad y talla de la primera maduración gonádica, de acuerdo a lo reportado para la especie en diferentes sitios del noroeste de México (García-

Domínguez *et al.*, 1992; Racotta *et al.*, 2003; Villalejo-Fuerte *et al.*, 2004; Koch *et al.*, 2005; Osuna-García *et al.*, 2008; Ramírez-Arce *et al.*, 2009). Así mismo, se ha reportado que la gametogénesis se relaciona paralelamente con el incremento de la temperatura del agua en *N. subnodosus* bajo condiciones de cultivo (Racotta *et al.*, 2003; Arellano-Martínez *et al.*, 2010), asegurando la presencia de organismos en maduración en el transcurso del verano con desoves en el otoño en organismos silvestres (Arellano-Martínez *et al.*, 2004a y b).

Por otra parte, en el ciclo reproductivo se observó la presencia de organismos en fase reabsorción gonádica (atresia ó lisis gamética) de abril a noviembre, la cual ya ha sido reportada para la especie en otras localidades (Arellano-Martínez *et al.*, 2004a; Yee-Duarte, 2009) y en otras especies de pectínidos, tales como *P. magellanicus* (Beninger, 1987); *A. irradians* (Epp *et al.*, 1988); *P. maximus* (Dorange & Le-Pennec, 1989); *P. jacobaeus* (Mestre, 1992); *A. purpuratus* (Avendaño & Le-Pennec, 1997; Cantillanez *et al.*, 2005). Igualmente, este proceso de atresia ha sido documentado en otros grupos de bivalvos, como el pinnido *P. nobilis* (De Gaulejac *et al.*, 1995), algunos miembros de las familias Solenidae como *Enzis arcuatus* (Darriba *et al.*, 2004), Mytilidae como *M. galloprovincialis* (Suárez *et al.*, 2005), Pteriidae como *P. mazatlanica* y *P. sterna* (Saucedo & Monteforte, 1997), Veneridae como *Ruditapes philippinarum* (Delgado & Pérez-Camacho, 2003, 2005). Las atresias reportadas para *N. subnodosus* se han relacionado directamente con el incremento de las temperaturas del agua en las diferentes localidades donde se han realizado estudios sobre su reproducción. Por ejemplo, en Laguna Ojo de Liebre, de enero a mayo del segundo año de estudio, se detectaron la presencia de organismos en reabsorción (7.7–35.7%), relacionándose a una anomalía de la temperatura con respecto a lo registrado normalmente. En los organismos de Bahía de Los Ángeles, este proceso fue reportado en una mayor proporción debido a que las temperaturas más altas que se registraron oscilaron entre los 26 y 30 °C, llegando en el mes de octubre al 100% de organismos en reabsorción. En la localidad de Bahía Tortugas, los organismos en reabsorción fueron encontrados desde abril a noviembre del 2009, volviendo a registrarse en febrero y marzo del 2010, donde la máxima proporción de organismos en reabsorción estuvieron en junio (76%) (considerando el tejido ovárico) y en julio

(34%) (tejido testicular). La presencia de organismos en reabsorción en casi todos los meses para el caso de *N. subnodosus* en Bahía Tortugas, debe estar relacionada a una combinación de baja disponibilidad de alimento (por debajo de los 10mg/L) y temperaturas por encima de los 20°C afectó la reproducción de los organismos al punto de generar la presencia de atresias.

Por otro lado, los organismos en cultivo presentaron una gran cantidad de fauna de acompañamiento o epibiontes y presentándose también en las artes de cultivo. Debido a esto, las valvas mostraron severos daños (tipo perforaciones) ocasionados, probablemente, por poliquetos que retardan el crecimiento e incrementan la mortalidad de los organismos en los sistemas de cultivo (Ciocco, 1990; Basilio *et al.*, 1995). Estas condiciones, trajeron probablemente como consecuencia una interrupción en la gametogénesis de *N. subnodosus*.

En materia de reproducción, existen otros indicadores que se han utilizado por décadas como reflejo de la actividad gonadal, como el IGS. En el presente estudio, los valores del IGS mostraron un claro patrón estacional que se correlacionó positivamente con las variaciones en el diámetro y área de ovocitos. Sin embargo, la tendencia de este indicador guardó una relación estrecha con el ciclo reproductivo, aunque valores altos de IGS no siempre coincidieron con la presencia de organismos maduros, coincidieron con organismos con la presencia de atresias. Una explicación a este comportamiento es que la reabsorción que presenta *N. subnodosus* es una reabsorción generalizada en gónadas maduras que no alcanzan a desovar, al respecto, se ha reportado que la lisis de gametos provee una fuente de energía (nutrientes) que se reenvían a tejidos somáticos de almacenamiento y puede ser rehusada o reciclada rápidamente para la generación de nuevos gametos cuando el alimento es escaso y las condiciones ambientales no son las adecuadas (Dorange & Le-Pennec, 1989). Sin embargo, esto no ocurrió de manera clara con *N. subnodosus* en Bahía Tortugas, debido a que la disponibilidad de alimento en una parte del año es suficiente para proveer la energía necesaria para el inicio y sustento de la gametogénesis. Así mismo, debemos tener en cuenta la presencia de fenómenos de atresia masiva en los meses con presencia de altas temperaturas y por ello el IGS no

fue un buen indicador de la actividad reproductiva de la especie en esta localidad. Este mismo comportamiento se observó en *N. subnodosus* de Bahía de Los Ángeles (Yee-Duarte, 2009),

Referente al IMA e IGD, los valores obtenidos en este estudio fueron bastante estables y no reflejaron un cambio marcado a lo largo del año. Por el contrario, el comportamiento del IM sí presentó una clara variación estacional de forma muy parecida al IGS. Esta combinación de resultados permite sugerir que bajo condiciones de cultivo en Bahía Tortugas, mientras el manto y la glándula digestiva no juegan un papel muy activo como sitios de almacenamiento y movilización de energía a la gónada para el sustento de la gametogénesis, el músculo aductor sí lo hace de forma relevante. Este resultado coincide ampliamente con lo reportado para la mayor parte de los miembros de la familia Pectinidae, en donde el músculo aductor es reconocido como el órgano primordial de almacenamiento de energía en forma de glucógeno y proteína (Taylor & Venn, 1979; Barber & Blake, 1983, 1991; Epp *et al.*, 1988; Martínez, 1991; Román *et al.*, 2002; Arellano-Martínez *et al.*, 2004b; Chantler, 2006). Esta importancia del músculo aductor también se ha reportado en Mitílidos (Gabbott, 1975) y Pteridos (Saucedo *et al.*, 2002b; Cáceres-Puig *et al.*, 2007; Vite-García & Saucedo, 2008; Saucedo & Southgate, 2008). De hecho, en la mayoría de estos estudios se ha confirmado que el músculo puede perder entre el 30 y 40% de su peso seco por motivos de movilización continua de energía hacia la gónada durante los momentos de máxima actividad en el ciclo reproductivo de los organismos (). Por lo tanto, a la par que este órgano pierde peso durante la gametogénesis, la gónada lo gana gradualmente como consecuencia de la producción de gametos.

8.2.- Indicadores de calidad ovocitaria

Como se sabe, los ovarios de los bivalvos, específicamente los ovocitos presentan un almacenamiento de reservas energéticas gradual a lo largo de la ovogénesis, particularmente durante el proceso de vitelogénesis (Holland, 1978; Gallager & Man, 1986; Gallager *et al.*, 1986; Fraser, 1989). El vitelo es una molécula muy compleja de tipo glico-lipo-protéica, por lo que queda claro que las sustancias

que se incorporan como nutrientes durante la vitelogénesis son carbohidratos, lípidos y proteínas básicamente (Pipe, 1987; De Gaulejac *et al.*, 1995; Dorange & Le-Pennec, 1989). De todas estas, los lípidos, y de estos los triglicéridos en particular, son quizá los más importantes (Gallager *et al.*, 1986; Fraser, 1989). Por otro lado, se ha demostrado que las sustancias incorporadas como nutrientes sirven como combustible para garantizar el crecimiento y supervivencia del embrión, así como de todas las subsiguientes etapas del desarrollo de los organismos. En todo este proceso, la viabilidad de los embriones y larvas depende enteramente de la calidad de los gametos, particularmente de los ovocitos (De Gaulejac *et al.*, 1993; Le-Pennec *et al.*, 1990). En este estudio, la calidad de los gametos se evaluó con base en las variaciones en la talla de ovocitos, en su contenido de lípidos e índice lipídico y en la relación núcleo:citoplasma. Diversos aspectos se pueden discutir con detalle de estos puntos:

Las fechas en las que se registraron los máximos valores de índice de lípidos y contenido de lípidos corresponden con los momentos en que se observaron las mayores tallas de ovocitos, aunque su correspondencia con los picos reproductivos de la especie no sea tan evidente. Esto puede deberse a la presencia de organismos maduros, desovados y en proceso de reabsorción casi todo el año. Por el contrario, los meses en los que se registraron los menores valores del índice y contenido de lípidos corresponden a las etapas en que los ovocitos tuvieron las tallas más pequeñas. Esto, a su vez, coincidió con los meses de mayor incidencia de organismos en estadio de inicio de gametogénesis, en los que los ovocitos presentaron tallas muy variables, desde aquellos grandes y maduros, hasta otros pequeños inmaduros (previtelogénicos) y en proceso de maduración (vitelogénicos). Este resultado refleja lo complejo del proceso de desarrollo ovocitario y podría relacionarse con cierta prudencia con momentos de buena y mala calidad de gametos.

En cuanto al análisis del contenido de lípidos de los ovocitos, se observó una tendencia estacional típica, con el pico principal en el verano (julio), así como un claro patrón al alza de la talla de los ovocitos. En el invierno (enero) se detectó

también un pico de menor intensidad en el contenido lipídico. Ambos picos podrían ser el reflejo del efecto del ambiente, particularmente la abundancia de alimento y que probablemente permitió cubrir el mínimo requerido de energía para asegurar el proceso de maduración de los ovocitos en términos de sustrato lipídicos indispensable para la gametogénesis. Reportes previos de otros autores apoyan este punto. Por ejemplo, Ziolkowski & Kozlowski (1983) y Paulet & Boucher (1991) indican que los bivalvos de ambientes templados asimilan cantidades limitadas de energía para mantener separados los procesos de crecimiento somático y reproducción y maximizarlos de esta forma. Navarro *et al.* (1989) reportan también que los bivalvos presentan mecanismos fisiológicos que los ayudan a aprovechar al máximo la calidad de partículas capturadas y mantener un balance óptimo entre la energía adquirida y la utilizada para crecimiento, reproducción y mantenimiento de la maquinaria enzimática y celular. Sin embargo, queda claro también que las estrategias por las que la energía asimilada es distribuida para crecimiento y reproducción varía entre especies y poblaciones de la misma especie (Ramírez-Llodra, 2002).

Por otro lado, se ha relacionado la viabilidad de los ovocitos con el diámetro observado y el porcentaje de IGS (Arellano-Martínez *et al.*, 2010). Organismos viables observados en la zona de la Laguna Ojo de Liebre (Arellano-Martínez *et al.*, 2004a), presentaron valores de 51 μm de diámetro y 27.7% de IGS, presentándose valores bajos y ovocitos no viables en la Laguna Guerrero Negro (Arellano-Martínez *et al.*, 2010) con 42.6 μm de diámetro y 4.39% de IGS. Esta no viabilidad es apoyada con el hecho de que los organismos con una edad de 16 meses en la Laguna Guerrero Negro mostraron los patrones reproductivos, las características histológicas de la gónada, el diámetro de los ovocitos y los valores de IGS comparables con los reportados para las poblaciones naturales de la Laguna Ojo de Liebre (Arellano-Martínez *et al.*, 2004a). En la zona de Bahía Tortugas se registraron valores de 49.2 μm de diámetro con 11.05% de IGS, considerándose valores bajos, lo cual sugiere que los ovocitos de *N. subnodosus* bajo condiciones de cultivo en Bahía Tortugas, fueron no viables.

Respecto al índice lipídico, éste mostró un patrón muy parecido al del contenido de lípidos, con dos incrementos bien marcados, uno en septiembre del 2009 y otro en enero de 2010, los cuales coincidieron, con un desfase de un mes, con el contenido lipídico. La relación entre el índice lipídico y la talla de los ovocitos siguió un patrón algo irregular, lo cual no ocurre para el caso de la relación entre el contenido lipídico y la talla de los ovocitos. En algunas especies como el callo de hacha *A. maura*, se ha observado que la relación entre estos indicadores puede ser contradictoria, ya sea inversamente proporcional entre el índice lipídico y la talla de los ovocitos, o directamente proporcional entre el contenido de lípidos y el área de los ovocitos (Angel-Dapa *et al.*, 2010). Al respecto, se sabe que este tipo de relaciones están expresadas en porcentajes y son un reflejo de la tasa de ocupación de las gotas de lípidos del ovoplasma de los ovocitos con respecto a la superficie de la imagen digital del tejido. Debe tomarse en cuenta que los lípidos están conformados en su mayoría por triglicéridos y pequeñas cantidades de fosfolípidos y colesterol (Allais *et al.*, 1964; Troy *et al.*, 1975; Briegel, 1990; Kawooya *et al.*, 1988), actuando los primeros como fuente directa de energía para el desarrollo embrionario de las especies (Beenackers *et al.*, 1981) y los segundos como compuestos estructurales para la formación de las membranas celulares (Luzbens *et al.*, 1981). Ziegler & Van Antwerpen (2007) encontraron que durante la incorporación de nutrientes, la cantidad de fosfolípidos y triglicéridos variaba a lo largo de la ovogénesis, aunque no se logró establecer la concentración exacta que se incorporaba mediante ambos mecanismos. Además, es importante recordar también que durante las etapas tempranas de la vitelogénesis, la incorporación de reservas lipídicas ocurre de manera más activa y abundante que conforme se acerca el final de este evento, que es cuando la carga nutricia del huevo se ha completado y se incrementa la incorporación de fosfolípidos para culminar el proceso de formación de las membranas celulares. Esto representa una estrategia para fortalecer a los ovocitos que serán liberados al medio. En este estudio, la técnica de tinción con Sudan Negro revela la localización de los lípidos neutros en forma de triglicéridos, los cuales se tiñen de color azul oscuro y negro, en tanto que los lípidos polares o fosfolípidos lo hacen de color gris. Por ello, durante el análisis digital de las imágenes, el programa

Image Pro Plus separa automáticamente mediante la suma de píxeles el área ocupada por todas aquellas estructuras que están formadas por triglicéridos y se tiñen de colores oscuros (ovocitos) y deja fuera las que se tiñen de tonos claros y están constituidas por fosfolípidos (membranas). Debido a lo anterior, se observó que el índice de lípidos reflejó con claridad dos periodos de máxima incorporación de triglicéridos a los ovocitos de acuerdo a su talla; el primero en el rango de $700 \mu\text{m}^2$ aproximadamente (que podría corresponder a ovocitos vitelogénicos) y el segundo en el rango de $4500 \mu\text{m}^2$ aproximadamente (en coincidencia con ovocitos maduros). Se observó también que después del segundo intervalo de tallas, la incorporación de triglicéridos a los ovocitos comenzó a disminuir. A partir de lo anterior, se esperaría en estos momentos que los fosfolípidos, en caso de que se hubieran cuantificado de alguna manera, comenzarán a incrementarse y guardarán una relación inversamente proporcional con respecto al patrón de los triglicéridos. Otro detalle a observar es la amplitud del error estándar calculado para el índice de lípidos en tallas de ovocitos de $4500 \mu\text{m}^2$, lo cual puede explicarse recordando que los periodos de reabsorción celular fueron únicamente identificados en el estadio de madurez, donde se presentaron las mayores tallas. Así, la calidad de los ovocitos encontrados en este estadio pudiera no ser la adecuada, debido a la gran variación de tallas de estos.

Los cálculos del índice de lípidos y contenido de lípidos fueron solamente realizados en la porción femenina de la gónada de *N. subndosus*, debido a que se ha reportado que los niveles de lípidos en la porción masculina disminuyen significativamente en paralelo con el proceso de maduración y su concentración se correlaciona negativamente con el IGS (Arellano-Martínez *et al.*, 2004b). Como ocurre para el caso de las proteínas, los lípidos (especialmente los triglicéridos) pueden ser transferidos desde la porción del testículo a la porción del ovario durante el proceso de maduración, para la acumulación de vitelo en los ovocitos (Arellano-Martínez *et al.*, 2004b). Se ha reportado que el contenido de lípidos en los ovarios fue más alto que en la porción testicular en organismos maduros de especies como *P. magellanicus* (Thompson, 1977; Robinson *et al.*, 1981; Couturier & Newkirk, 1991), *Chlamys septemradiata* (Ansell 1974) y *A. purpuratus* (Martínez, 1991).

La información que se presenta sobre variaciones y relación entre el contenido de lípidos e índice lipídico de los ovocitos, y de ahí sobre la calidad de éstos, podría permitir seleccionar desoves que aseguren incrementar la viabilidad y supervivencia larvaria, así como la producción de semilla en condiciones de cautiverio.

8.3. – Ultraestructura

8.3.1.- Espermatogénesis

En la almeja mano de león las fases que comprenden la espermatocitogénesis, desde la diferenciación de espermatogonia a espermatocito primario y de éste a espermatocito secundario, así como la fase de meiosis que abarca la diferenciación de espermatocito secundario a espermátida, presentan características generales muy similares a las que se han reportado para otras especies de bivalvos, como *A. granosa* (Parnrong, 1999), *A. tuberculosa* (Ortíz *et al.*, 2003) y *Chione californiensis* (Ortíz-Ordoñez *et al.*, 2006).

Las espermatogonias son las células más grandes que se observan como parte de la gametogénesis y se tiene reportado que existen especies en donde los espermatocitos primarios crecen aún más que las espermatogonias (Rastogi *et al.*, 1988; Santos de Souza, 2007).

En las espermátidas, las características observadas en este estadio de desarrollo (la condensación de la heterocromatina, la reducción del citoplasma, el crecimiento de las mitocondrias y la migración de éstas hacia el polo basal del núcleo) concuerdan con lo reportado para *A. granosa* (Suwanrajat & Parnrong, 1999), *A. tuberculosa* (Ortíz *et al.*, 2003), y *C. californiensis* (Ortíz-Ordoñez *et al.*, 2006).

Los espermatozoides de los moluscos pueden ser de dos tipos: el tipo primitivo y el tipo modificado (Franzen, 1955). Diversos autores mencionan que los espermatozoides de los moluscos son generalmente del tipo primitivo, pues se caracterizan por presentar una cabeza de longitud variable, con mitocondrias simples en el cuerpo del espermatozoide y una cola con arreglo de microtúbulos 9 +2

(Hodgson & Bernard, 1988; Franzen, 1983; Bao *et al.*, 1998). Los espermatozoides de la almeja mano de león *N. subnodosus* corresponden efectivamente a los de tipo primitivo, que se presentan en organismos con fertilización externa, ya que estos organismos liberan sus gametos en el agua. Igualmente, la forma del acrosoma de los espermatozoides en la almeja mano de león es de forma piramidal, la cual corresponde a lo reportado para organismos que presentan fertilización externa. En las especies de bivalvos con fertilización interna la forma del acrosoma se presenta notablemente reducida (Franzen, 1955; Wilbur, 1964; Garrido, 1966). La substancia subacrosomal es de material granular denso, lo cual coincidió también con lo reportado para *A. tuberculosa* (Ortíz *et al.*, 2003) y *A. granosa* (Suwanrajat & Parnrong, 1999). Usualmente, el acrosoma se deriva del complejo de Golgi (Popham, 1979), el cual tiene la función de disolver las diversas capas de los ovocitos, de manera que permite la fusión de los pronúcleos (Colwin & Colwin, 1967; Franklin, 1970; Longo, 1973).

Se ha reportado que los espermatozoides en especies hermafroditas pueden ser distinguidos de los de especies gonocóricas (que presentan sexos separados) por la morfología de sus núcleos. En este sentido, se reporta que las especies hermafroditas pueden presentar núcleos ovoides, pentagonales o en forma de bala, mientras que los de especies gonocóricas presentan núcleos cónicos caracterizados por su punta electro-translúcida (Harrison, 1985; Steiner, 1998). De acuerdo a lo anterior, *N. subnodosus* presenta espermatozoides cuyo núcleo es de forma ovoidal, lo cual concuerda con lo reportado para los espermatozoides de organismos hermafroditas (Steiner, 1998).

Las mitocondrias son de forma esférica y se ubican en el cuello del espermatozoide, lo cual es típico de organismos con fertilización externa (Ortíz-Oroñez *et al.*, 2006). Suwanrajat & Parnrong (1999) mencionan que el número de mitocondrias encontradas en los espermatozoides puede ser un carácter específico de cada especie. Para el caso de *N. subnodosus* se identificaron 4 mitocondrias en el cuello del espermatozoide rodeando al centriolo, lo cual coincide con el patrón común de *C. californiensis* (Ortíz-Ordoñez *et al.*, 2006). Por el contrario, en *A. tuberculosa* se reporta la existencia de 5 mitocondrias en el cuello espermático (Ortíz *et al.*, 2003).

Este resultado niega el hecho de que el número de mitocondrias presentes en los espermatozoides sea un carácter específico de cada especie, y se relaciona más bien con el tipo de movimiento flagelar necesario para asegurar el desplazamiento del espermatozoide en el medio.

Suwanrajat & Parnrong (1999) menciona que la formación del flagelo se inicia a partir del estadio de espermatocito. Para el caso de *N. subnodosus* este hecho no fue observado, ya que la presencia del flagelo se registró en el último estadio de desarrollo, es decir, el de espermatozoide. El arreglo de los microtúbulos varió un poco con respecto a la estructura general reportada para algunos moluscos bivalvos, como *C. californiensis* (Ortíz-Orodoñez *et al.*, 2006). Estos autores reportan que los microtúbulos están conformados por un par central rodeado de nueve pares periféricos.

Con respecto a la condensación de la heterocromatina, se ha reportado que ésta se va incrementando conforme avanza la espermatogénesis, relacionándose con una alta actividad sintética en el núcleo de proteínas-ribonucleares provenientes del citoplasma (Davenport & Davenport, 1965). La heterocromatina puede ser dividida en dos tipos: la constitutiva y la facultativa. La heterocromatina facultativa es cromatina que puede presentarse tanto como eucromatina, con actividad transcripcional o sin ella, y esto varía en función del momento en el que se encuentre el ciclo celular. La heterocromatina constitutiva es la cromatina más clásicamente entendida como desierto génico (región del ADN con muy poca cantidad de genes) y su función suele considerarse meramente estructural. En estudios recientes han puesto en evidencia que la heterocromatina constitutiva tiene un alto valor en la reproducción, el cual es mayor al que comúnmente se creía, pues se ha reportado que presenta una multitud de genes de importancia crucial para el desarrollo en algunas fases en la formación de los organismos (Dimitri *et al.*, 2009). Siendo así, se puede asumir que en la mano de león *N. subnodosus*, la heterocromatina condensada en el macho contribuye en gran parte con la actividad génica en la transcripción al momento de la reproducción, ya que cuando la espermátida se desarrolla en espermatozoide, dentro del núcleo solamente queda heterocromatina condensada.

8.3.2.- Ovogénesis

En términos generales, la ovogénesis en los moluscos puede ser dividida en dos fases, la primera denominada generativa (proliferación) y la segunda denominada fase vegetativa (crecimiento) (Anderson, 1974). Durante la primera, el número de ovogonias se incrementa en la zona germinal por multiplicación mitótica; mientras que en la fase vegetativa o de desarrollo, el crecimiento del ovocito es considerable, principalmente durante la vitelogénesis, que requiere una substancial entrada de nutrientes para la síntesis de vitelo a partir de precursores y proteínas como la vitelina y vitelogenina (Pipe, 1987).

La clasificación de la ovogénesis específicamente en la almeja mano de león *N. subnodosus* fue dividido en cinco estadios de desarrollo celular, donde los mayores cambios observados ocurrieron durante la vitelogénesis. Las ovogonias primarias y secundarias fueron las células más pequeñas y jóvenes dentro de la línea germinal femenina y se caracterizaron por presentar un núcleo grande con poca cantidad de heterocromatina condensada. En la membrana nuclear se encuentra la presencia de poros, los cuales se sugiere que se encuentran relacionados con el transporte de proteínas-ribonucleares provenientes del citoplasma, de acuerdo a lo reportado para otros moluscos (Davenport & Davenport, 1965; Durfort, 1973); Popham, 1975; Jong-Brink *et al.*, 1983; Swenson *et al.*, 1987; Amor *et al.*, 2004) y algunos invertebrados (Coimbra & Azevedo, 1984; Larkman, 1984; Ribes, 1986; Sciscioli *et al.*, 1991). La presencia de los poros en la membrana nuclear es un indicador de diferenciación celular, particularmente de ovogonias a los ovocitos de mayor grado de desarrollo (Verhey & Moyer, 1967; Najmudeen, 2008). En *N. subnodosus* se observó la presencia de estos poros en la membrana nuclear desde los primeros estadios de desarrollo. De hecho, dentro del núcleo la heterocromatina electrodensa se observó agrupada cerca de los poros, de la misma forma que en los abulones *Haliotis varia* (Najmudeen, 2008) y *H. asinina*. Este material fue clasificado como un tipo de partículas vinculadas a los ribosomas (Apisawetakan *et al.*, 2001). Dentro del citoplasma, el material se encuentra disperso presentando escasos

organelos celulares, lo cual es un indicador de una baja actividad sintética que puede relacionarse únicamente con la producción y transporte de proteínas-ribonucleares al núcleo.

Los ovocitos previtelogénicos, a diferencia de las ovogonias primarias y secundarias, aumentaron considerablemente la cantidad de organelos celulares, particularmente como retículo endoplasmático, aparato de Golgi y mitocondrias. Este incremento se relaciona directamente con la preparación de la célula para la vitelogénesis, en la cual se generará una gran actividad sintética. Se conoce que en el estadio de vitelogénesis, la formación de vitelo puede ocurrir a través de dos procesos separados: autosintéticamente y heterosintéticamente, de acuerdo a lo establecido por Eckelbarger & Davis (1996). Los autores hacen evidente que estos procesos pueden actuar de manera combinada como se ha observado en algunas especies de moluscos (Eckelbarger & Young, 1999; Matsumoto *et al.*, 2003; Amor *et al.*, 2004). El proceso de autosíntesis en la formación de vitelo involucra una actividad combinada del complejo de Golgi, mitocondrias y retículo endoplasmático (Yung *et al.*, 2008), lo cual coincide con el proceso de autosíntesis observado en *N. subnodosus* debido al aumento y desarrollo en sus organelos celulares en los ovocitos vitelogénicos. En contraste, Pipe (1987) reporta una actividad endocítica en los ovocitos de *M. edulis*, al tiempo que Eckelbarger & Davis (1996) sugieren una evidencia de la formación de vitelo por heterosíntesis en los ovocitos de *Crassostrea virginica*. Yung (2008) encuentran precursores extraováricos que se incorporan a los ovocitos por endocitosis en la región basal de los ovocitos vitelogénicos. En *N. subnodosus* se observó la presencia de vesículas en la región basal de la membrana plasmática (Fig. 4d), las cuales se prevé que están siendo incorporadas dentro del citoplasma celular por medio de endocitosis. En conclusión, la presencia de estas vesículas en *N. subnodosus* permitiría confirmar que la formación de vitelo ocurre por medio de heterosíntesis.

Existen reportes de la presencia de inclusiones lipídicas en los ovocitos de otras especies de moluscos marinos durante los estadios tempranos de desarrollo (Hodgson & Eckelbarger, 2000; Pal & Hodgson, 2002). En el caso particular de *N. subnodosus*, las inclusiones lipídicas se observaron únicamente a partir del estadio

de vitelogénesis. Una característica distintiva respecto a la formación de inclusiones lipídicas en el estadio de vitelogénesis, es la formación de una membrana tipo corion posterior a la membrana plasmática. En este estudio, la evidencia de microvellosidades de la membrana (Fig. 4d) sugiere su participación en el transporte de material nutritivo que se incorpora a los ovocitos, así como la protección de los ovocitos al ser liberados al medio. A lo largo de toda la membrana tipo corion se observa la presencia de vesículas que se intuye contribuyen en el desarrollo de los ovocitos. En numerosas especies de invertebrados, incluyendo los moluscos, estas vesículas han sido identificadas como cuerpos vitelinos o corpúsculos de Balbiani (Guraya, 1979), los cuales juegan un papel importante en la síntesis endógena de nutrientes que participan en la vitelogénesis. Tal es el caso de los bivalvos *M. edulis* (Pipe, 1987), *B. brandaris* (Amor *et al.*, 2004), *P. mazatlanica* (Gómez-Robles *et al.*, 2005) y el abulón *H. varia* (Najmudeen, 2008).

En la transición entre el estadio de vitelogénesis y el estadio de madurez, la cantidad de heterocromatina condensada dentro del núcleo decreció en la periferia, quedando condensada en un solo punto. De acuerdo a Amor *et al.* (2004), esta disminución es un indicativo de una disminución del número de poros nucleares y por ende de la actividad nuclear (incorporación de nutrientes) del ovocito, Por tanto, los organelos celulares se extienden por todo el citoplasma, así como los gránulos de glucógeno, gotas de lípidos, material granular y plaquetas vitelinas, que hacen que el ovocito crezca hasta alcanzar su máximo tamaño en el estadio de madurez.

Otro tipo de estructuras celulares que se observaron en los ovocitos son las células foliculares y las células del tejido conjuntivo (VCT). Las primeras solo fueron observadas a partir del estadio de vitelogénesis, mientras que las segundas a lo largo de todo el curso de la gametogénesis. Yung *et al.* (2008) mencionan que estas células se encuentran relacionadas directamente con el proceso de heterosíntesis en la formación de vitelo por endocitosis, asumiendo que las células foliculares pueden estar involucradas en el abastecimiento de nutrientes a los ovocitos vitelogénicos. Pipe (1987), Chung (2007) y Yung *et al.* (2008) establecen una relación entre las células foliculares y la formación de la membrana tipo corion y reportan que una vez que las células foliculares dejan de ser observadas, aparecen las microvellosidades a

lo largo del citoplasma. En este estudio este fenómeno no fue observado, ya que las células foliculares fueron encontradas a lo largo de todo el estadio de vitelogénesis y de madurez, siempre en asociación con las paredes foliculares y las membranas tipo corion de los ovocitos. Al respecto, Eckelbarger & Davis (1996) mencionan que las células foliculares no son la fuente primaria de los precursores del vitelo en *C. virginica*, mientras que Pipe (1987) sugiere que las VCT representan la mayor fuente de precursores del vitelo durante la vitelogénesis, en comparación con las células foliculares en *M. edulis*. En el presente estudio, fueron observados en el tejido conjuntivo de la membrana folicular vasos de transporte de hemolinfa (Fig. 16c y d), los cuales contenían una gran cantidad de gotas de lípidos. Debido a ello, se piensa que los nutrientes transportados por los vasos portadores de hemolinfa pueden ser transferidos a las VCT y posteriormente de éstas a los ovocitos para participar en la vitelogénesis. En contraste, otros autores como Chung *et al.* (2002) y Chung *et al.* (2006) no encontraron una relación de las VCT con la ovogénesis.

9.- CONCLUSIONES

- Debido a la alta disponibilidad de alimento en Bahía Tortugas, el desarrollo gametogénico de *N. subnodosus* no presenta la fase de inactividad reproductiva y el desarrollo de sus gametos es continuo. Esto último se ve apoyado por la presencia de gónadas en desove parcial y madurez en casi todo el ciclo reproductivo
- La actividad reproductiva de *N. subnodosus* en Bahía Tortugas es afectada por la temperatura del agua, la disponibilidad del alimento y la presencia de organismos epibiontes. Se presenta un periodo de lisis masiva durante las temperaturas más altas y las concentraciones más bajas de seston.
- El índice gonadosomático resultó un buen indicador de la época reproductiva de *N. subnodosus* en Bahía Tortugas.
- Los índices de la glándula digestiva y el manto, no presentan una relación clara con los índices de gónada y musculo aductor, por lo que no son un buen indicador del ciclo de almacenamiento y transferencia de energía.

- Se observó la presencia de características específicas en la espermatogénesis: espermatozoides del tipo primitivo con acrosoma de forma piramidal, con substancia subacrosomal de material electrodensó granular, cuatro mitocondrias rodeando al centriolo. Este último se observó en la última fase de desarrollo y no en etapas tempranas como en otras especies
- Se observó la presencia de características específicas en la ovogénesis: a partir del estadio de vitelogénesis la presencia de vesículas, a partir de este estadio se produce la formación de una membrana tipo corion posterior a la membrana plasmática la cual contribuye en la incorporación de vesículas para el desarrollo del vitelo.
- Se observaron también células foliculares (a partir de estadio de vitelogénesis) y de tejido conjuntivo (todo el desarrollo).
- La almeja mano de león presenta en el tejido conjuntivo vasos sanguíneos con aportación de grandes cantidades de gotas de lípidos

10.- BIBLIOGRAFÍA

- Akaboshi, S. & J. E. Illanes. 1983. Estudio experimental sobre la captación, pre-cultivo y cultivo en ambiente natural de *Chlamys (Argopecten) purpuratus*, Lamark 1819, en Bahía Tongoy IV región, Coquimbo, Chile. 233-256. *En: Simposium Internacional Avances y Perspectivas de la Acuicultura en Chile*. Universidad del Norte, Coquimbo, Chile.
- Álvarez-Borrego, S. & J. R. Lara-Lara. 1991. The physical environment and primary productivity of the Gulf of California, 47: 555-567. *En: The Gulf and the peninsular province of the Californias*. A. A. P. G. Special Volumes.
- Allais, J. P., J. Bergerard, J. Etienne & J. Polonovsky. 1964. Nature et évolution des lipides au cours d' embryogénese de *Locusta migratorioides* (R. et L.). *J. Insect Physiol.*, 10: 753-772.

- Andrew, J. D. 1979. Pelecypoda: Ostreidae. 5: 293-341. *En: Giese A. C. & J. S. Pearse. Reproduction of marine invertebrates, Molluscs: pelecypods and lesser classes.* (Ed) Academic Press, New York.
- Angel-Dapa, M. A., C. Rodríguez-Jaramillo, C. J. Cáceres & P. E. Saucedo*. 2010. Changes in lipid content of oocytes of the penshell *Atrina maura* as a criterion of gamete development and quality: a study of histochemistry and digital image analysis. *J. Shellfish Res.* 29(2): 1-7.
- Ansell, A. 1974. Seasonal changes in biochemical composition of the bivalve *Chlamys septemradiata* from the Clyde Sea area. *Mar. Biol.*, 25:85-99.
- Amor, M. J., M. Ramón & M. Durfort. 2004. Ultrastructural studies of oogenesis in *Bolinus brandaris* (GASTROPODA: MURICIDAE). *Sci. Mar.*, 68: 343-353.
- Andrew, J.D. 1979. Pelecypoda: Ostreidae. In: Giese AC, Pearse JS (eds) *Reproduction of marine invertebrates. Vol. V. Molluscs: pelecypods and lesser classes.* Academic Press, New York, pp 293-341.
- Apisawetakan, S., V. Linthong, C. Wanichanon & S. Panasophonkul. 2001. Ultrastructure of female germ cells in *Haliotis asinina* Linnaeus. *Invertebr. Reprod. Dev.*, 39:67–79
- Arellano-Martínez, M. 2005. Características ecofisiológicas de la reproducción de *Nodipecten subnodosus* (Sowerby, 1835) (PECTINIDAE) en la Laguna Ojo de Liebre, B.C.S., México. Tesis doctoral. CICIMAR, IPN.
- Arellano-Martínez, M., B. P. Ceballos-Vásquez, C. Ruíz-Verdugo, E. Pérez de León, R. Cervantes-Duarte & P. M. Domínguez-Valdéz. 2010. Growth and reproduction of the lion's paw scallop *Nodipecten subnodosus* in a suspended culture system at Guerrero Negro lagoon, Baja California Sur, Mexico. *Aquacult. Res.*, Aceptado.
- Arellano-Martínez, M., B. P. Ceballos-Vásquez, M. Villalejo-Fuerte, F. García-Domínguez, J. F. Elorduy-Garay, A. Esliman-Salgado & I. S. Racotta. 2004^{*a}. Reproduction of the lion's paw scallop *Nodipecten subnodosus* sowerby, 1835

- (Bivalvia: Pectinidae) from Laguna Ojo de Liebre, B.C.S., México. *J. Shellfish Res.*, 23: 723-729.
- Arellano-Martínez, M., I. S. Racotta, B. P. Ceballos-Vázquez & J. F. Elorduy-Garay. 2004^{ab}. Biochemical composition, reproductive activity and food availability of the lion's paw scallop *Nodipecten subnodosus* in the Laguna Ojo de Liebre, Baja California Sur, Mexico. *J. Shellfish. Res.*, 23: 15-23.
- Avendaño, M. & M. Le Pennec. 1997. Intraspecific variation in gametogénesis in two populations of the Chilean molluscan bivalve, *Argopecten purpuratus* (Lamarck). *Aquacult. Res.*, 28: 175-182.
- Avendaño, M. & M. Le Pennec. 1998. Presencia de células auxiliares en la gametogénesis del ostión del norte, *Argopecten purpuratus* (LAMARCK, 1819), (MOLLUSCA, BIVALVIA, PECTINIDAE). *Estud. Oceanol.*, 17:16-16.
- Baqueiro, E., J. A. Massó & H. Guajardo. 1982. Distribución y abundancia de moluscos de importancia comercial en Baja California Sur. *Serie de divulgación. CRIP-La Paz. INP* 11:7-32.
- Bao, Z. M., J. J. Lu, M. Jiang & X. Y. Liu. 1998. Ultrastructure of the spermatozoa of the Abalone (*Haliotis discus hannai*). *J. Ocean Univ. China, Qing-dao, China*, 28: 283–287.
- Barber, B. J. & 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. & N. J. Blake. 1983. Growth and reproduction of the bay scallop, *Argopecten irradians* (Lamarck) at its southern distributional limit. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 66:247-256.
- Barber, B. J. & N. J. Blake. 1991. Reproductive physiology. *En: Shumway, S. E. (ed.), Scallops: Biology, Ecology and Aquaculture*. Developments in Aquaculture and Fisheries Science, Elsevier Science, The Hague, Holland. 21: 377-409.

- Barrios-Ruiz, D., J. Chávez-Villalba & C. Cáceres-Martínez. 2003. Growth of *Nodipecten subnodosus* (Bivalvia: Pectinidae) in La Paz Bay, Mexico. *Aquacult. Res.*, 34: 633-639.
- Basilio C. D., J. I. Cañete & N. Rozbaczylo. (1995). *Polydora* sp. (Spionidae) un poliqueto perforador de las valvas del ostión *Argopecten purpuratus* (Bivalvia: Pectinidae) en Bahía Tongoy, Chile. *Rev. Biol. Mar. Valparaíso*, 30: 71-77.
- Bayliss, H. O. 1984. Lipid histochemistry. Department of pathology, Guy's Hospital Medical School London, Oxford University Press. 68 p.
- Bayne, B. L. 1976. Aspects of reproduction in bivalve molluscs. Pp. 432-448. *En: Wiley, M. L. (ed.). Estuarine Processes. New York: Academic Press.*
- Bayne, B. L. & R. C. Newell. 1983. Physiological energetics of marine mollusks. *En: Wilburg, K. M. & A. S. M. Saleuddin (eds.). The Mollusca. Academic Press, Londres, 4: 407-415*
- Bayne, B. L., A. Bubel, P. A. Gabbott, D. R. Livingstone, D. M. Lowe & M. N Moore. 1982. Glycogen utilization and gametogenesis in *Mytilus edulis*. *L. Mar. Biol. Lett.*, 3: 89-105.
- Beenackers, A. M., H. Chino & J. H. Law. 1988. Lipophorin nomenclature. *Insect Biochem.*, 18: 1-2.
- Beltrán-Lugo, A. I., A. Maeda-Martínez, R. Pacheco-Aguilar, H. G. Nolasco-Soria & V. M. Ocaño-Higuera. 2005. Physical, textural and microstructural properties of restructured adductor muscles of 2 scallop species using 2 cold-binding systems. *J. food science*. 70: 78:84.
- Beltrán-Lugo, A. I., A. N. Maeda-Martínez, R. Pacheco-Aguilar, & H. G. Nolasco-Soria. 2009. Seasonal variations in chemical, physical, textural properties of adductor muscle of Pacific lion-paw scallop (*Nodipecten subnodosus*). *Aquaculture*, 258: 619-632.

- Beltrán-Lugo, A. I., A. Maeda-Martínez, R. Pacheco-Aguilar & H. Nolasco-Soria. 2006. Seasonal variations in chemical, physical, textural, and microstructural properties of adductor muscles of Pacific lions-paw scallop (*Nodipecten subnodosus*). *Aquaculture*. 258:619–632.
- Beninger, P. G. 1987. A qualitative and quantitative study of the reproduction cycle of the giant scallop, *Placopecten magellanicus* in the Bay of Fundy (New Brunswick, Canada). *Can. J. Zool.* 65: 495-498.
- Bozzola, J. J. & L. D. Russell. 1998. Electron microscopy. Principles and Techniques for Biologists. Second edition. Jones and Bartlett Publishers. Massachusetts, U.S.A. 670 p.
- Briegel, H. 1990. Metabolic relationship between female body size, reserves, and fecundity of *Aedes aegypti*. *J. Insect Physiol.* 36: 165–172.
- Buckland, N. J. & S. Ch. Fu. 1986. Fine structure of Sertoli cells in three marine snails with a discussion on the functional morphology of Sertoli cells in general. *Cell Tissue Res.* 245:305–313.
- Cáceres-Puig, J. I. 2007. Dinámica anual del esfuerzo reproductivo de *Pteria sterna* (Gould, 1851) en la Bahía de la Paz, B.C.S., México. Tesis de maestría. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
- Campa-Córdova, A. I., E. J. Núñez-Vázquez, A. C. Luna-González, M. J. Romero-Geraldo & F. A. Ascencio. 2009. Superoxide dismutase activity in juvenile *Litopenaeus vannamei* and *Nodipecten subnodosus* exposed to the toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima*. *Toxi. and Pharma.* 149: 317-322.
- Campodónico, S., G. Macchi, B. Lomovasky & M. Lasta. 2008. Reproductive cycle of the Patagonian scallop *Zygochlamys patagonica* in the south-western Atlantic. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.*, 88: 603-611.
- Cantillán, M., M. Avendaño, G. Thouzeau & M. Le Penec. 2005. Reproductive cycle of *Argopecten purpuratus* (Bivalvia: Pectinidae) in La Rinconada marine

- reserve (Antofagasta, Chile): response to environmental effects of El Niño and La Niña. *Aquaculture*, 246: 181-195.
- Ciocco, N. F. 1990. Infestacion de la vierira tehueleche (*Chlamys tehueca* (Dórbingy)) por *Polydora websteri* Hartman (Polychaeta: Spionidae) en el Golfo de San José (Chabout, Argentina): un enfoque cuantitativo. *Biol. Pesq.* 19: 9-18.
- Coimbra, A. & C. Azevedo. 1984. Structure and evolution of nucleolus during oogenesis. *En: Van Blerkmon, J. & P. M. Motta (Eds). Ultrastructure of reproduction.* Martinus Nijhoff, Boston. 127-139.
- Colwin, L. H. & A. L. Colwin. 1967. Membrane fusion in relation to sperm-egg association. *En: Locke, M. (Ed) Fertilization.* New York: Academic Press. 295–367.
- Couturier, C. Y. & G. F. Newkirk. 1991. Biochemical and gametogenic cycles in scallops, *Placopecten magellanicus* (Gmelin, 1791), held in suspension culture. *En: Shumway, S. E. & P. A. Sandifer (Eds.). An International Compendium of Scallop Biology and Culture.* The World Aquaculture Society, U.S.A. 107-117.
- Darriba, S., F.S. Juan, A. Guerra, 2004. Reproductive cycle of the razor clam, *Ensis arcuatus* (Jeffreys, 1865) in northwest Spain and its relation to environmental conditions. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 311: 101– 115.
- Davenport, R. & J. C. Davenport. 1965. Cytoplasmic basic proteins of three species of Mollusks. *Exp. Cell Res.*, 3: 974-980.
- De Gaulejac, B. 1993. Ecophysiological study of the Mediterranean bivalve mollusk *Pinna nobilis*. L. Reproduction; growth; respiration. Marseille, France Univ. Aix. 221 p.

- De Gaulejac, B., M. Henry & N. Vicente. 1995. An ultrastructural study of gametogenesis of the marine bivalve *Pinna nobilis* (Linnaeus 1758). I. Oogenesis. *Moll. Stud.*, 61: 375-392.
- Delgado, M. & A. Pérez-Camacho. 2003. A study of gonadal development in *Ruditapes decussates* (Mollusca, Bivalvia), using image analysis techniques: Influence of food ration and energy balance. *J. Shellfish Res.*, 22: 435-441.
- Delgado, M. & A. Pérez-Camacho. 2005. Histological study of the gonadal development of *Ruditapes decussates* (Mollusca: Bivalvia) and its relationship with available food. *Sci. Mar.*, 69: 87-97.
- Desai, K., G. Hirani & D. Nimavat. 1979. Studies on the pearl oyster, *Pinctada fucata* (Gould): Seasonal Biochemical Changes. *Ind. J. Mar. Sci.* 8: 49-50.
- Dimitri, P., R. Caizzi, E. Giordano, M. C. Accardo, G. Lattanzi & G. Biamonti. 2009. Constitutive heterochromatin: a surprising variety of expressed sequences. *Chromosoma*. 118: 419-435.
- Dorange, G. & M. Le Pennec. 1989. Ultrastructural study of oogenesis and oocytic degeneration in *Pecten maximus* from the Bay of St. Brieuc. *Mar. Biol.*, 103:339-348.
- Dufort, M. 1973. Ultraestructura de la gónada femenina de algunos moluscos. Tesis de doctorado. Universidad de Barcelona.
- Eckerlbarger, K. J. & C. M. Young. 1999. Ultrastructure of gametogenesis in a chemosynthetic mytilid bivalve (*Bathymodiolus childressi*) from a bathyal, methane seep environment (northern Gulf of Mexico). *Mar. Biol.*, 135:635-646.
- Eckelbarger, K. J. & C. V. Davis. 1996. Ultrastructure of the gonad and gametogenesis in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. II. Testis and spermatogenesis. *Mar. Biol.* 127: 89–96.

- Epp, J., V. M. Bricelj & R. E. Malouf. 1988. Seasonal partitioning and utilization of energy reserves in two age classes of the bay scallop *Argopecten irradians* (Lamarck). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 121: 113-136.
- Estrada, N. A., M. A. de Jesús Romero, A. A. Campa-Córdova, A. B. Luna & F. A. Ascencio. 2007. Effects of the toxic dinoflagellate, *Gymnodinium catenatum* on hydrolytic and antioxidant enzymes, in tissues of the giant lions-paw scallop *Nodipecten subnodosus*. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.*, 146: 502-510.
- FAO. 2005. Estadísticas Mundiales de Pesca. Roma FAO.
- Faveris, R. & P. Lubet. 1991. Energetic requirements of the reproductive cycle in the scallop *Pecten maximus* (Linnaeus, 1758) in Baine de Seine (Channel). *En: Shumway, S. E. & P. A. Sandifer (eds.). An International Compendium of Scallop Biology and Culture*. The World Aquaculture Society, U.S.A. 67-73.
- Félix-Pico, E. F., M. Villalejo-Fuerte, A. Tripp-Quezada & O. Holguín-Quiñones. 1999. Growth and survival of *Lyropecten subnodosus* (Sowerby, 1835) in suspended culture at the national marine park of Bahía de Loreto, B.C.S. Mexico. *Book of Abstracts 12th International Pectinid Workshop*, Bergen, Norway. Strand. University of Bergen, Bergen, Norway. 39-40.
- Franco, R., F. Esposito, M. Fedele, G. Liguori, G. M. Pierantoni, G. Botti, D. Tramontano, A. Fusco & P. Chieffi. 2008. Detection of high-mobility group proteins A1 and A2 represents a valid diagnostic marker in post-pubertal testicular germ cell tumours. *J. Pathol.*, 214: 58-64.
- Franklin, L. E. 1970. Fertilization and the role of the acrosomal region in nonmammals. *Biol. Rep. Sup.*, 2: 159-176.
- Franzen, A. 1955. Comparative morphological investigation into the spermatogenesis among Mollusca. *Zoo. Bidr. Upp.*, 30: 339-456.

- Franzen, A. 1956. On spermiogenesis, morphology of spermatozoon, and biology of fertilization among invertebrates. *Zool. Bidr. Uppsala*. 31: 355-482.
- Franzen, A. 1970. Phylogenetic aspects of the morphology of spermatozoa and spermiogenesis. *En: Baccetti, B. (Ed). Comparative spermatology*. Acad. Naz, di Lincei, Rome, 26-50.
- Fraser, A. J. 1989. Triacylglycerol content as a condition index for fish, bivalve, and crustacean larvae. *Can. J. Fish. Aqua. Sci.*, 46:1868-1873.
- Gabbott, P. A. 1975. Storage cycles in marine bivalve molluscs: A hypothesis concerning the relationship between glycogen metabolism and gametogenesis. *En: Barnes, H. Proceedings of the 9th European Marine Biology Symposium*. Aberdeen University Press, Aberdeen Scotland. 191-211.
- Gallager, S. M. & R. Mann. 1986. Growth and survival of larvae of *Mercenaria mercenaria* and *Crassostrea virginica* (Gmelin) relative to broodstock conditioning and lipid content of eggs. *Aquaculture*, 56:105-121.
- Gallager, S. M., R. Mann & G. C. Sasaki. 1986. Lipid as an index of growth and viability in three species of bivalve larvae. *Aquaculture*, 56: 81-103.
- García-Domínguez, F. A., P. Castro-Moroyoqui & E. F. Félix-Pico. 1992. Spat settlement and early growth of *Lyropecten subnodosus* (Sowerby, 1835) in Laguna Ojo de Liebre, B.C. México, 1989-1990. *Book of Abstracts Triennial Meeting National Shellfisheries Association*, Orlando, Florida. *J. Shellfish Res.*, 11:195.
- García-Esquivel, Z., G. Pares-Sierra & L. García-Pamanes. 2000. Effect of flow speed and food concentration on the growth of juvenile scallops *Nodipecten subnodosus*. *Ciencias Marinas*. 26 (4): 621-641.
- Garrido, O. & Gallardo, C.S. 1996. Ultrastructure of sperm in bivalve molluscs of the Mytilidae family. *Inv. Rep.Dev.*, 29: 95-102

- Giese, A. & J. Pearse. 1974. Introduction: General Principles. *En: A. Giese y J. Pearse (Eds). Rep. Mar. Inv.* Nueva York: Academic Press. 1-49 pp.
- Gómez-Gutiérrez, J., R. Palomares-García, S. Hernández-Trujillo & A. Carballido-Carranza. 2001. Community structure of zooplankton in the main entrance of Bahía Magdalena, México during 1996. *Rev. Biol. Trop.*, 49: 545-558.
- Gómez-Robles, E., C. Rodríguez-Jaramillo & P. E. Saucedo, 2005. Digital image analysis of lipid and protein histochemical markers for measuring oocyte development and quality in pearl oyster *Pinctada mazatlanica* (Hanley, 1856). *J. Shellfish Res.*, 24: 1197-1202.
- Gosling, E. 2004. Reproduction, settlement and recruitment. *En: E, Gosling (Ed). Bivalves Mollusks. Biology, Ecology and Culture.* Oxford: Elsevier. 131-168 p.
- Guraya, S. S. 1979. Recent advances in the morphology, cytochemistry and function of Balbiani's vitelline body in animal oocytes. *Int. Rev. Cytol.*, 59:249-321.
- Hodgson, A. N. & R. T. Bernard. 1986. Ultrastructure of the sperm and spermatogenesis of three species of Mytilidae (Mollusca: Bivalvia). *Gamete Res.* 15: 123–135.
- Holland, D. L. 1978. Lipid reserves and energy metabolism in the larvae of benthic marine invertebrates. *En: Malins, D. C. & J. R. Sargent (Eds.) Biochemical and biophysical perspectives in marine biology.* Academic Press, London, 4:85-123.
- Howard , D. W. & C. S. Smith. 1983. Histological techniques for marine bivalve mollusk. NOAA Technical Memorandum NMFS-F/NEC-25:NOOA, Woods Hole, Massachusetts, USA.
- Ibarra, A. M., J. L. Petersen, T. R. Famula & B. B. May. 2006. Characterization of 35 microsatellite loci in the Pacific lion-paw scallop (*Nodipecten subnodosus*) and their cross-species amplification in four other scallops of the Pectinidae family. *Mol. Eco. Notes*, 6: 153-156.

- Jaramillo, R. & J. Navarro. 1995. Reproductive cycle of the Chilean ribbed mussel *Aulacomya ater* (Molina, 1982). *J. Shellfish Res.*, 14:165-171.
- Jong-Brink, M., H. H. Boer & J. Joose. 1983. Mollusca. *En: Adiyodi, K. G. & R. G. Adiyodi (Eds): Reproductive Biology of Invertebrates. Oogenesis, Oviposition and Oosorption.* Wiley and Sons, London. 1: 297-320.
- Kang, C. K., M. S. Park, P. Y. Lee, W. J. Choi & W. C. Lee. 2000. Seasonal variations in condition, reproductive activity, and biochemical composition of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg) in suspended culture in two coastal bays of Korea. *J. Shellfish Res.*, 19: 771-778.
- Kawooya, J. K., O. E. Osir & J. H. Law. 1988. Role of lipophorin in lipid transport to the insect egg. *J. Biol. Chem.*, 163: 8748–8753.
- Keen, A. M. 1971. Seashells of tropical west America. Marine Mollusks from Baja California to Peru. CA: Stanford University Press. 1025 p.
- Keen, M. A. & E. Coan. 1974. Marine Molluscan Genera of Western North American. 2nd Ed. Stanford University Press, Stanford, California , 208 p.
- Koch, V. A., J. M. Suástegui, F. C. Sinsel, M. R. Mungaray & D. D. Dunn. 2005. Lion's paw scallop (*Nodipecten subnodosus*, Sowerby 1835) aquaculture in Bahía Magdalena, Mexico: Effects of population density and season on juvenile growth and mortality. *Aqua. Res.*, 36: 505-512.
- Lango-Reynoso, F., J. Chávez-Villalba, J. C. Cochard & M. Le Penec. 2000. Oocyte size, a means to evaluate the gametogenic development of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture*, 190: 183-199.
- Lannan, J. E., A. Robinson & W. P. Breese. 1980. Broodstock management of *Crassostrea gigas*. II Broodstock conditioning to maximize larval survival. *Aquaculture*, 21: 337-345.
- Larkman, A. U. 1984. The fine structure of mitochondria and the mitochondrial cloud during oogenesis on the sea anemone *Actina*. *Tissue Cell*, 16: 393-404.

- Le Pennec, M., R. Robert & M. Avendaño. 1998. The importance of gonadal development on larval production in pectinids. *J. Shellfish Res*, 17: 97-101.
- Le Pennec, M., F. Gueguen, J. C. Cochard, Y. M. Paulet & G. Dorange. 1990. Relations entre le contenu lipidique des ovocytes de *Pecten maximus* et les performances des larves en élevage. *Haliotis*, 10:101-113.
- Leonardos, M. & I. A., Lucas. 2000. The use of larval fatty acids as an index of growth in *Mytilus edulis* L. larvae. *Aquaculture*, 184: 155-166.
- Lodeiros, C. J., J. J. Rengel, H. Guderley, O. A. Nusetti & 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.
- Longo, F. J. 1973. An ultrastructural analysis of polysperm in the surf clam, *Spisula solidissima*. *J. Exp. Zoo.*, 183: 153–180.
- López-Sánchez, J. A., A. N. Maeda-Martínez, R. P. Croll & H. Acosta-Salmón. 2009. Monoamine fluctuations during the reproductive cycle of the Pacific lion's paw scallop *Nodipecten subnodosus*. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.*, 154: 425–428.
- Luna-González, A., A. N. Maeda-Martinez, J. C. Sainz-González & F. Ascencio-Valle. 2002. Comparative susceptibility of veliger larvae of four bivalve mollusks to a *Vibrio alginolyticus* strain. *Diseases of Aquatic Organisms. Dis. Aquat. Org.* 49: 221-226.
- Luna-González, A. A., A. N. Maeda-Martínez, F. B. Vargas-Albores, F. A. Ascencio-Valle & M. A. Robles-Mungaray. 2003. Phenoloxidase activity in larval and juvenile homogenates and adult plasma and haemocytes of bivalve mollusks. *Fish Shell. Immun.*, 15: 275-282.
- Luzbens, E., A. Tietz, M. Pines & S. W. Applebaum. 1981. Lipid accumulation in oocytes of *Locusta migratoria migratorioides*. *Insect Biochem.*, 11: 323–329.

- MacDonald, B. & R. J. Thompson. 1985. Influence of temperature and food availability on ecological energetics of the giant scallop *Placopecten magellanicus*. I. Growth rates of shell and somatic tissue. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 25:279-294.
- MacDonald, B. A., R. J. Thompson & B. L. Bayne. 1987. Influence of temperature and food availability on the ecological energetics of the giant scallop *Placopecten magellanicus* IV. Reproductive effort, value and cost. *Oecologia*, 72: 550-556.
- Mackie, G. L. 1984. Bivalves. *En: Wilbur, K.M. (Ed). The Mollusc, Vol. 7 Reproduction*. Orlando: Academic Press.
- Maeda-Martínez, A., P. Lombeida, L. Freitas, C. Lodeiros & M. T. Sicard. 2001. Cultivo de pectinidos en fondo y estanques. *En: Maeda-Martínez A. N. (Ed). Los moluscos pectinidos de Iberoamerica: Ciencia y Acuicultura*. Noriega editores México, 213–231.
- Maeda-Martínez, A. N. & C. Lodeiros. 2008. Los moluscos pectínidos del género *Nodipecten*. First edition, Limusa, Mexico City.
- Maldonado-Amparo, R., J. L. Ramírez, S. Ávila & A. M. Ibarra. 2004. Triploid lion-paw scallop (*Nodipecten subnodosus* Sowerby); growth, gametogenesis, and gametic cell frequencies when grown at a high food availability site. *Aquaculture*, 235: 185-205.
- Marquez-Rios, E. A., V. M. Ocaño-Higuera, A. N. Maeda-Martínez, M. E. Lugo-Sánchez, M. G. Carvallo-Ruiz & R. A. Pacheco-Aguilar. 2009. Citric acid as pretreatment in drying of Pacific Lion's Paw Scallop (*Nodipecten subnodosus*) meats. *Food Chemistry*, 112: 599-603.
- Martínez, G. & L. Mettifogo. 1998. Mobilization of energy from adductor muscle for gametogenesis of the scallop, *Argopecten purpuratus* Lamarck. *J. Shellfish Res.*, 17: 113-116.

- Martínez, G. 1991. Seasonal variations in biochemical composition of three size classes of the Chilean scallop *Argopecten purputatus* Lamarck, 1819. *The Veliger*, 34:335-343.
- Mathieu, M. & P. Lubet. 1993. Storage tissue metabolism and reproduction in marine bivalves-A brief review. *Inver. Reprod. Develop*, 23:123-129.
- Matsumoto, M., K. Fukutani & T. Okano. 2003. Low-Energy electron diffraction study of the phase transition of Si(001) surface below 40k. *Phys. Rev. Lett.*, 90:103-106.
- Mestre, S. 1992. Ciclo gametogénico y de almacenamiento de reservas en una población natural de *pecten jacobaeus* (Bivalvia: Pectinidae) en las costas de Castellón. Tesis Doctoral, Universidad de Valencia, España. 411 p.
- Millán, N. R., E. Ripa & L. Aguirre. 1987. Preliminary study of the composition and abundance of the phytoplankton and chlorophytes in laguna Ojo de Liebre, B.C.S. *Cienc. Mar.*, 13:30-38.
- Morales-Hernández, R. & C. Cáceres-Martínez. 1996. Pesquería de almeja mano de león *Lyropecten subnodosus*. En: Casas-Valdéz, M. & G. Ponce-Díaz (Eds). *Estudio del potencial pesquero y acuícola de Baja California Sur, Vol. I*. SEMARNAP, FAO, INP, UABCS, CIBNOR, CICIMAR, UECYTM, La Paz, B.C.S., México, 87–100 p.
- Najmudeen, T. M. 2008. Ultraestructural studies of oogenesis in the variable abalone *Haliotis varia* (Vetigastropoda:Haliotidae). *Aquatic Biology*, 2: 143-151.
- Navarro, E., J. I. Iglesias & A. Larrañaga. 1989. Interannual variation in the reproductive cycle and biochemical composition of the cockle *Cerastoderma edule* from Mundaca Estuary (Biscay, North Spain). *Mar. Biol.*, 101: 503-511.
- Ortíz, E., E. Uría-Galicia, A. Silva-Olivares, V. Tsutsumi & M. Shybayama. 2003. Estudio de la ultraestructura de la espermatogénesis de *Anadara tuberculosa*

- (Sowerby, 1833) (MOLLUSCA:PELICIPODA:ARCIDAE). *Hidrobiológica*. 13: 145-150.
- Ortíz-Ordoñez, E., E. Uría-Galicia, A. Silva-Olivares, V. Tsutsumi & M. Shybayama. 2006. Ultrastructure of spermatogenesis in the white clam *Chione californiensis* (Broderip, 1835) (MOLLUSCA:PELECIPODA). *J. Shellfish Res.* 25: 399-401.
- Osuna-García, M., A. Hernández-Llamas & J. M. Mazón-Suástegui. 2008. Production dynamics of the giant lions-paw scallop *Nodipecten subnodosus* cultivated off-bottom. *Aquaculture*. 274: 260-267.
- Pacheco-Aguilar, R. A., E. A. Márquez-Ríos, M. E. Lugo-Sánchez, G. A. García-Sánchez, A. N. Maeda-Martínez & V. M. Ocaño-Higuera. 2008. Postmortem changes in the adductor muscle of Pacific lions-paw scallop (*Nodipecten subnodosus*) during ice storage. *Food Chemistry*. 106: 253-259.
- Pal, P. & A. N. Hodgson. 2002. An ultrastructural study of oogenesis in a planktonic and a direct-developing species of *Siphonaria* (Gastropoda: Pulmonata). *J Molluscan Stud.*, 68: 337–344.
- Palacios, E., I. S. Racotta, E. Kraffe, Y. Marty, J. Moal & J. F. Samain. 2005. Lipid composition of the giant lion's-paw scallop (*Nodipecten subnodosus*) in relation to gametogenesis: I. Fatty acids. *Aquaculture*. 250: 270-282.
- Palacios, E., I. S. Racotta, O. Arjona, Y. Marty, J. R. Coz, J. Moal & J. F. Samain. 2007. Lipid composition of the pacific lion-paw scallop, *Nodipecten subnodosus*, in relation to gametogenesis. 2. Lipid classes and sterols. *Aquaculture*, 266: 266-273
- Park, M. S., C. K. Kang & P. Y. Lee. 2001. Reproductive cycle and biochemical composition of the ark shell *Scapharca broughtonii* (Schrenck) in a southern coastal bay of Korea. *J. Shellfish Res.*, 20:177-184.

- Parnrong S. 1999. Biology, life history, and secondary production of the mayfly *Austrophlebioides marchanti* Parnrong & Campbell (Ephemeroptera: Leptophlebiidae) from forest and pasture sites of two Victorian streams: the influence of land-use. Tesis doctoral, Monash University, Melbourne. 269 p.
- Paulet, Y. M. & J. Boucher. 1991. Is reproduction mainly regulated by temperature or photoperiod in *Pecten maximus*? *Inv. Repro. Dev.*, 19: 61-70.
- Petersen, J. L., A. M. Ibarra, J. L. Ramírez & B. A. May. 2008. An induced mass spawn of the hermaphroditic lion-paw scallop, *Nodipecten subnodosus*: Genetic assignment of maternal and paternal parentage. *J. Heredity*, 99: 337-348.
- Pipe, R. K. 1987. Oogenesis in the marine mussel *Mytilus edulis*: an ultrastructural study. *Mar. Biol.* 95:405-414.
- Popham, J. D. 1975. The fine structure of the oocyte of *Bankia australis* (Teredinidae, Bivalvis) before and after fertilization. *Cell. Tissue Res.*, 157: 521-534.
- Popham, J. D. 1979. Comparative spermatozoon morphology and bivalve phylogeny. *Malac. Rev.*, 12: 1-20.
- Racotta, I. S., E. Palacios, A. M. Ibarra, J. L. Ramírez, F. Arcos & O. Arjona. 2008. Comparative biochemical composition of ploidy groups of the lion-paw scallop (*Nodipecten subnodosus* Sowerby) supports the physiological hypothesis for the lack of advantage in triploid mollusc's growth in food-rich environments. *Mar. Bio.*, 153: 1245-1256.
- Racotta, I. S., J. L. Ramírez, A. M. Ibarra, M. C. Rodríguez-Jaramillo, D. Carreño & E. Palacios. 2003. Growth and gametogenesis in the lion-paw scallop *Nodipecten (Lyropecten) subnodosus*. *Aquaculture*, 217: 335-349.
- Ramírez-Arce, J. L. 2009. Evaluación de la ventaja reproductiva y grado de esterilidad en triploides de almeja mano de león *Nodipecten subnodosus* (sowerby 1835) como una alternativa para el cultivo en el parque nacional de

- Bahía de Loreto, Golfo de California. Tesis de maestría, Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, Instituto Politécnico Nacional, La Paz, B.C.S., México. 94 p.
- Ramírez-Llodra, E. 2002. Fecundity and life-history strategies in marine invertebrates. *Adv. Mar. Biol.*, 43: 87-170.
- Rastogi, R. K., J. T. Bagnara, L. Lela & M. A. Krasovich. 1988. Reproduction in the mexican leaf frog, *Pachymedusa dactylos*. IV. Spermatogenesis: a light and ultrasonic study. *J. Morphol.* 197: 277-302.
- Reinecke-Reyes, M. A. 1996. Madurez y desove de la almeja mano de león *Lyropecten subnodosus* Sowerby, 1835 (Bivalvia: Pectinidae) en la laguna Ojo de Liebre, B.C.S. México. *En: Castro-Aguirre, C. E. (Ed). Boletín Pesquero SEMARNAP/INP-CRIP-La Paz, B.C.S., México.* 3:17-20.
- Reyes-Sosa, C. 1990. Cultivo de Pectínidos en México. Serie científica. UABCS, México, 1: 25-29.
- Ribes, E. 1986. La gametogénesis de *Hemidiaptonus roubaui*, Richard, 1988 (Copeopoda, Calanoidea). Tesis doctoral. Universidad de Barcelona.
- Robinson, W. E., W. E. Wehling, M. P. Morse & G. C. McLeod. 1981. Seasonal changes in soft-body component indices and energy reserves in the Atlantic deep-sea scallop, *Placopecten magellanicus*. *Fish. Bull.* 79: 449-458.
- Rodríguez-Jaramillo, M. C. 2004. Efecto de la temperatura sobre la gametogénesis en el callo de hacha *Atrina Maura* (Sowerby, 1835) (Bivalvia: Pinnidae). Tesis de maestría. Instituto Politécnico Nacional. Centro Interdisciplinaria de Ciencias Marinas, La Paz, B. C. S. 74 p.
- Rodríguez-Jaramillo, C., A. N. Maeda-Martínez, M. E. Valdez, T. Reynoso-Granados, P. Monsalvo-Spencer, M. Prado-Ancona, F. Cardoza-Velasco, M. Robles-Mungaray & M. T. Sicard. 2001. The effect of temperature on the reproductive

- maturity of the penshell *Atrina maura* (Sowerby, 1835) (Bivalvia: Pinnidae). *J. Shellfish Res.*, 20: 39-47.
- Roldán-Carrillo, L. M., A. N. Maeda-Martínez, A. B. Massó-Rojas & M. T. Sicard-González. 2005. Salinity tolerance and resistance of the Pacific lion's paw scallop (*Nodipecten subnodosus*) and the relationships with species distribution and density in a coastal lagoon. *J. Shellfish Res.*, 24: 353-361.
- Román, G. G., G. Martínez, G. García & L. Freitas. 2001. Reproducción. *En: Maeda-Martínez, A. N. (Ed.), Los Moluscos Pectínidos de Iberoamerica: Ciencia y Desarrollo*. Limusa Noriega editores. México. 27-59 p.
- Román, G., M. J. Campos, J. Cano, C. P. Acosta, P. Iglesias & O. García. 2002. Reproductive and reserve storage cycles in *Aequipecten opercularis* (L. 1758) in Galicia, NW Spain. *J. Shellfish Res.*, 21: 577-584.
- Ruiz, C., M. Abad, F. Sedano, L. O. García-Martín & J. L. Sánchez-López. 1992. Influence of seasonal environmental changes on the gamete production and biochemical composition of *Crassostrea gigas* (Thunberg) in suspended culture in El Grove, Galicia, Spain. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 155: 249-262
- Ruiz-Durá, M. 1988. Fundamentos de Embriología y Fisiología de la Reproducción. Universidad Autónoma Nacional de México, México, D.F. 374 p.
- Rupp, G. S. & G. J. Parsons. 2004. Effects of salinity and temperature on the survival and byssal attachment of the lion's paw scallop *Nodipecten nodosus* at its southern distribution limit. *J. Exp. Mar. Bio. Eco.*, 309:173-198.
- Santos de Souza, R. 2007. Reproductive Cycle of Males of *Dendropsophus minutus* (Anura, Hylidae). Abstracts in *Biota neotropica*. 7: 3.
- Sastry, A.N. 1975. Physiology and ecology of reproduction in marine invertebrates. pp. 279-299. *En: Vernberg, F. J. (Ed). Physiological Ecology of Estuarine Organisms*. Columbia: University of South Carolina Press.

- Sastry, A. N. 1979. Pelecypoda (excluding Ostreidae). *En: Giese, A. C. & J. S. Pearse. Reproduction of Marine Invertebrates*. New York: Academic Press, 113-292 p.
- Sastry, A. N. & N. J. Blake. 1971. Regulation of gonad development in the bay scallop, *Aequipecten irradians* Lamarck. *Biol. Bull.*, 149:274-283.
- Saucedo, P. y M. Monteforte. 1997. Breeding cycle of pearl oyster *Pinctada mazatlanica* y *Pteria sterna* (Bivalvia:Pteriidae) at Bahía de La Paz, Baja California Sur, México. *J. Shellfish Res.* 16:103-110.
- Saucedo, P. E, I. S. Racotta, H. Villarreal & M. Monteforte. 2002a. Seasonal changes in the histological and biochemical profile of the gonad, digestive gland, and muscle of the Calafia mother-of-pearl oyster *Pinctada mazatlanica* (Hanley, 1856). *J. Shellfish Res.*, 21: 127-135.
- Saucedo, P., C. Rodríguez & M. Monteforte. 2002b. Microscopic anatomy of gonadal tissue and storage cells associated with oogenesis and spermatogenesis in *Pinctada mazatlanica*. *J. Shellfish Res.*, 21: 213-222.
- Saucedo, P. E. & P. C. Southgate. 2008. Growth, Development and Reproduction. *En: Southgate, P. C., J. S. Lucas (Eds). The Pearl Oyster: Biology and Culture*. Elsevier, 1a Edición, Holanda. 129–184.
- Sciscioli, M., S. Scalera, L. Liaci, E. Leporo, M. Gherardi & T. L. Simpsom. 1991. Ultrastructural study of the mature eggs of the marine sponge *Strelletta grubii* (Porifera Demospongiae). *Mol. Repro. Dev.*, 28: 346-350.
- Sousa, M. y E., Oliveira. 1994. An ultrastructural study of *Crassostrea angulata* (Mollusca, Bivalvia) spermatogenesis. *Mar. Bio.*, 120: 545–551.
- Snedecor, G. W. & W. G. Cochran. 1989. Statistical methods. Iowa State University Press, USA. 8th edition. 503 p.

- Suárez, M. P., C. Alvarez, P. Molist & F. San Juan. 2005. Particular aspects of gonadal cycle and seasonal distribution of gametogenic stages of *Mytilus galloprovincialis* cultured in the estuary of Vigo. *J. Shellfish Res.*, 24: 531-540.
- Suwanrajat, J. & S. Parnrong. 1999. Reproductive cycles of *Anadara granosa* L. in Jebilung Satun Province. *J. Sci. Tec.*, 12: 341-351
- Taylor, A. C. & 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. Assoc. U. K.*, 59:605-621.
- Taylor, M. H., V. B. Koch, M. A. Wolff & F. C. Sínsel. 2006. Evaluation of different shallow water culture methods for the scallop *Nodipecten subnodosus* using biologic and economic modeling. *Aquaculture*, 254: 301-316.
- Thielley, M., M. Weppe & C. Herbaut. 1993. Ultrastructural study of gametogenesis in the French Polynesian black pearl oyster *Pinctada margaritifera* (Mollusca, Bivalvia). I. Spermatogenesis. *J. Shellfish Res.*, 12: 41-47.
- Thompson, R. J. 1977. Blood chemistry, biochemical composition, and annual reproductive cycle of the giant scallop, *Placopecten magellanicus*, from southeast Newfoundland. *J. Fish. Res. Board. Canada*, 34:2104-2116
- Troy, S., W. A. Anderson & A. Spielman. 1975. Lipid content of maturing ovaries of *Aedes aegypti* mosquitoes. *Comp. Biochem. Physiol.*, 50: 457-461.
- Uriarte y Farías. 2002. Nutrición en larvicultura de pectinidos: Relevancia de proteínas y lípidos. Instituto de acuicultura. Universidad Austral de Chile.
- Urrutia, G. X., J. M. Navarro, E. Clasing & R. A. Stead. 2001. The effects of environmental factors on the biochemical composition of the bivalve *Tagelus dombeii* (Lamarck, 1818) (Tellinacea: Solecurtidae) from the intertidal flat of Coihúin, Puerto Monte, Chile. *J. Shellfish Res.*, 20:1077-1087.
- Verhey, C. A. & F. H. Moyer. 1967. Fine structure changes during sea urchin oogenesis. *J. Exp. Zool.*, 164: 195-226.

- Villalejo-Fuerte, M., M. Arellano-Martínez, B. P. Ceballos-Vázquez & F. García-Domínguez. 2000. Ciclo reproductivo de la almeja chocolata *Megapitaria squalida* (Sowerby, 1835) (Bivalvia: Veneridae) en Bahía Juncalito, Golfo de California, México. *Hidrobiología*, 102: 165-168.
- Villalejo-Fuerte, M., M. Arellano-Martínez, M. Robles & B. P. Ceballos-Vázquez. 2004. Growth of lion-paw *Nodipecten* (= *Lyropecten*) *subnodosus* (Sowerby, 1835) maintained in suspended culture in Bahía de Juncalito, Golfo de California, Mexico. *Hidrobiológica*, 14:1-5.
- Vite-García, M. N. & P. E. Saucedo. 2008. Energy storage and allocation during reproduction of Pacific winged pearl oyster *Pteria sterna* (Gould, 1851) at Bahía de La Paz, Baja California Sur, Mexico. *J. Shellfish Res.* 27: 375-383.
- Wilbur, M. K. & M. C. Yonge. 1964. *Physiology of Mollusca*. Academic Press. New York.
- Yee-Duarte, J. A. 2009. Estrategia reproductiva de la almeja mano de león *Nodipecten subnodosus*, Sowerby 1835 en Bahía de Los Ángeles, B.C. México. Tesis de maestría. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas. Instituto Politécnico Nacional. 83 p.
- Yung, E. C. 2007. Oogenesis and sexual maturation in *Meretrix lusoria* (Roding, 1798) (BIVALVIA: VENERIDAE) in western Korea. *J. Shellfish Res.*, 26: 71-80.
- Ziegler, R. & R. Van Antwerpen. 2007. Lipid uptake by insect oocytes. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 36: 264–272.
- Ziolko, M. & J. Kozlowski. 1983. Evolution of body size: an optimization model. *Math. Biosci.*, 64: 127-143.

11.- ANEXOS

Anexo A Preparación de la solución Davidson (Shaw y Battle, 1957)

Para 1 L de solución:

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

Anexo B Preparación del fijador glutaraldehído 2.5%.

- Glutaraldehído 25%(10ml)
- Solución amortiguadora de Sonrensen (90ml)

Preparación de solución amortiguadora de Sorensen

- Na₂HPO₄ (2.84 g) Agua destilada (100 ml) [Solución A]
- NaH₂PO₄H₂O (2.76 g) Agua destilada (100 ml) [Solución B]
- 40.5ml Solución A + 9.5 ml Solución B= 50 ml + 50 ml de Agua bidestilada

Anexo C Técnica de tinción Sudan negro B para cortes en parafina (Bayliss, 1984)

1984).

Soluciones:

- Solución de sudan negro B a saturación, en alcohol etílico al 70%.
- Xilol 3 cambios de 10 minutos c/u
- Alcohol etílico 96° 2 minutos
- Alcohol etílico 70° 2 cambios de 2 minutos c/u
- Agua destilada 5 minutos
- Colocar los cortes en alcohol 70% 5 minutos
- Teñir con la solución Sudán negro B 5 minutos

Diferenciar en alcohol 70% 1 minuto

Lavar en agua corriente

Lavar en agua destilada

Montar en gelatina glicerinada

Resultados:

Triglicéridos Azul a negro

Fosfolípidos Gris

Anexo D Preparación de la resina epóxica EPON 812.

Preparación de 50 ml de solución final

Solución A= 5.74 ml Epón 812 + 9.25 ml DDSA

Solución B= 18.51 mL Epón 812 + 16.48 ml NMA

Solución A + Solución B + DMP30 0.75ml