

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



CICLO REPRODUCTIVO DEL QUITÓN *Chiton virgulatus* SOWERBY, 1840 EN DOS
LOCALIDADES DE LA BAHÍA DE LA PAZ, B. C. S., MÉXICO

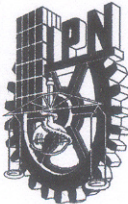
TESIS

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

PRESENTA

MÓNICA NURENSKAYA VÉLEZ ARELLANO

LA PAZ, B.C.S., JUNIO DE 2012

**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL****SECRETARÍA 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 04 del mes de Mayo del 2012 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:

"CICLO REPRODUCTIVO DEL QUITÓN *Chiton virgulatus* SOWERBY, 1840

EN DOS LOCALIDADES DE LA BAHÍA DE LA PAZ, B.C.S., MÉXICO"

Presentada por el alumno:

VÉLEZ

Apellido paterno

ARELLANO

materno

MÓNICA NURENSKAYA

nombre(s)

Con registro:

A	1	0	0	1	0	9
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante de:

MAESTRÍA 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

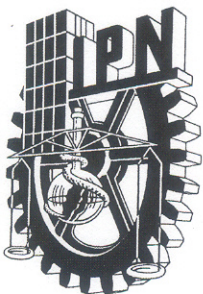
DR. FEDERICO ANDRÉS GARCÍA DOMÍNGUEZ

Director de Tesis

DR. MARGIAL ARELLANO MARTÍNEZ

2º. Director de Tesis

DR. ENRIQUE HIPARCO NAVA SÁNCHEZ**DR. GERMÁN PONCE DÍAZ****DRA. MATILDE MINEKO SHIBAYAMA SALAS****PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES**
DRA. MARÍA MARGARITA CASAS VALDEZ



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., el día 22 del mes Mayo del año 2012
el (la) que suscribe BIOL. MÓNICA NURENSKAYA VÉLEZ ARELLANO alumno(a) del
Programa de MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS
con número de registro A100109 adscrito al CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS
manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de tesis, bajo la dirección de:
DR. FEDERICO ANDRÉS GARCÍA DOMÍNGUEZ y DR. MARCIAL ARELLANO MARTÍNEZ
y cede los derechos del trabajo titulado:

"CICLO REPRODUCTIVO DEL QUITÓN *Chiton virgulatus* SOWERBY, 1840
EN DOS LOCALIDADES DE LA BAHÍA DE LA PAZ, 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: nurens@hotmail.com - fdoming@ipn.mx - marellam@ipn.mx

Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

BIOL. MÓNICA NURENSKAYA VÉLEZ ARELLANO

AGRADECIMIENTOS

Al Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas del Instituto Politécnico Nacional, por todas las facilidades otorgadas para la realización de este trabajo.

Ala Secretaria de Investigación y Posgrado del Instituto Politécnico Nacional por el apoyo suministrado a través de los proyectos “Biología reproductiva del mejillón *Modiolus capax* (Conrad, 1837) y de los quitones *Acantochitona exquisita* (Pilsbry, 1893) y *Chiton virgulatus* Sowerby, 1840 en San Juan de La Costa Baja California Sur, México” (SIP-IPN, clave 20091254) y “Ultraestructura de la gametogénesis de *Chiton virgulatus* (Sowerby, 1840)” (SIP-IPN, clave 20110757) y por el otorgamiento de la beca institucional del posgrado modalidad beca tesis.

Al Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional Unidad México, por todas las facilidades prestadas durante mi estancia como el uso del microscopio electrónico.

A la Coordinación de Cooperación Académica del Instituto Politécnico Nacional, por la beca de movilidad otorgada, para la realización de mi estancia en el Cinvestav

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el proyecto “Ciclo reproductivo de los quitones, *Acantochitona exquisita* (Pilsbry, 1893) y *Chiton virgulatus* (Sowerby, 1840) en la bahía de La Paz, B.C.S., México” (CONACYT, clave 91424) y por la beca de estudios.

A la Comisión de Operación y Fomento de Actividades Académicas del Instituto Politécnico Nacional por los estímulos económicos.

Al Programa Institucional de Formación de Investigadores del Instituto Politécnico Nacional por el apoyo económico otorgado durante mis estudios.

A la Residencia de Investigadores Visitantes del Instituto Politécnico Nacional por la amable hospitalidad durante mi estancia.

A la M. en C. Sandra Robles Gil, responsable de la Estación Meteorológica de la Comisión Nacional del Agua por proporcionar los datos de la temperatura del aire.

Al Dr. Federico Andrés García Domínguez por brindarme la oportunidad de ser partícipe del proyecto y por el apoyo brindado para la elaboración de este trabajo que va más allá de lo profesional.

Al comité revisor, Dr. Federico Andrés García Domínguez, Dr. Marcial Arellano Martínez, Dr. Enrique Hiparco Nava Sánchez, Dr. Germán Ponce Díaz y a la Dra. Mineko Shibayama Salas, por sus observaciones y aportaciones a esta tesis.

Al Dr. Maclovio Obeso Nieblas, al Dr. Oscar Efraín Holguin Quiñones, a la Dr. Berta Patricia Ceballos y a la Maestra Esperanza Ortiz Ordoñez por las aportaciones hechas a este documento.

Gracias a los miembros del Laboratorio 2 del Cinvestav-México principalmente a la Dra. Mineko Shibayama y al Dr. Víctor Tsusumi por recibirme, aconsejarme y apoyarme en todos los sentidos durante mi estancia.

Gracias a la M. en C. Dora Angélica Silva Olivares por el apoyo técnico en el procesamiento de las muestras para microscopía electrónica de transmisión, así como en la observación de estas.

Gracias a la M. en C. Karla Montserrat Gil Becerril y a la QFB Silvia Galindo Gómez por el apoyo técnico durante mi estancia en el laboratorio, pero también por su compañerismo y solidaridad.

A la QFB Sirenia González Pozos de la Central de Microscopía en el Cinvestav-México por el apoyo técnico en la operación del microscopio electrónico de transmisión.

A Ariel Arturo Cruz Villacorta, por la toma de imágenes en el microscopio electrónico de barrido, también por su asesoría en la técnica de microscopía electrónica de barrido, uso del microscopio, así como su agradable compañía, pláticas y chistes malos durante este proceso, gracias.

A José Manuel García Rangel “El topo”, quiero agradecer su amabilidad durante la convivencia en el campo, por ser mi fiel acompañante.

A mis maestros, que dentro y fuera de las aulas me han transmitido su conocimiento que formará parte de mi quehacer profesional.

A mis compañeros y amigos, porque todo trabajo resulta más ligero con su compañía, estando siempre en el momento preciso a pesar de las distancias.

A mi familia, por todos el apoyo, los buenos deseos y la confianza que me impulsaron cada día a seguir adelante principalmente a mis papas y mis hermanas, que aunque lejos, siempre juntos.

ÍNDICE

GLOSARIO.....	i
LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABLAS.....	viii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	x
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	5
Estudios en especies mexicanas.....	5
Ciclo reproductivo	5
Factores ambientales que afectan los ciclos reproductivos	6
Gametogénesis.....	7
JUSTIFICACIÓN	8
HIPÓTESIS	9
OBJETIVO.....	9
Objetivo general.....	9
Objetivos específicos	9
MATERIAL Y MÉTODOS	10
Área de estudio.....	10
Metodología de campo	10
Metodología de Laboratorio	11
Técnica de microscopía electrónica de transmisión.....	12
Técnica de microscopía electrónica de barrido	13
Técnica histológica.....	13
Ciclo reproductivo	13
Análisis de la variación en la talla de los ovocitos.....	14
Índice Gonádico	14
Proporción de sexos	15
Talla de reclutamiento a la reproducción.....	15
Análisis estadísticos	15
RESULTADOS	16
Anatomía macroscópica de la gónada.....	18
Morfología y ultraestructura de los gametos	18
Hembras.....	18
Machos.....	25
Ciclo reproductivo	34
Diámetro de los ovocitos.....	36
Índice gonádico.....	38
Variación de los factores ambientales y su relación con el ciclo reproductivo	39
Talla de reclutamiento a la reproducción	44
DISCUSIÓN	46
CONCLUSIONES.....	53
REFERENCIAS.....	54

GLOSARIO

Abisal: Pertenece a las grandes profundidades del océano, generalmente por debajo de los 3700 m.

Acrosoma: Estructura en el extremo apical de un espermatozoide animal que es la primera en fusionarse con la membrana del ovocito y entrar en la célula.

Batial: Pertenece a las profundidades oceánicas entre 180 y 3700 m o al fondo del océano entre esas profundidades; algunas veces es idéntico al ambiente del talud continental.

Biofilm: Es una estructura colectiva de microorganismos que se adhiere a superficies vivas o inertes y está revestida por una capa protectora segregada por los propios microorganismos.

Caleta: Una entrada dentada de una costa, tal como una bahía o boca de arroyo; es un tipo de playa con concavidades conspicuas en la línea de costa y de extensión limitada.

Ciclo gametogénico o gonádico: Evento repetitivo dentro de las gónadas que conduce a la producción de gametos (ovocitos y espermatozoides).

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

Conglomerado: Son rocas formadas por fragmentos de otras de distintos tipos, depositados después de una fase de transporte y cementados.

Desove: Expulsión de los gametos por el organismo.

Dioico: Se dice del organismo que tiene los sexos masculino y femenino en distintos individuos o colonias.

Endémico: Se aplica a un taxón originario y exclusivo de una región más o menos extensa.

Espermatocito: Los espermatocitos son células diploides derivadas del proceso de espermatogénesis formadas por el aumento en tamaño de las espermatogonias.

Espermatóforo: Sacos, normalmente gelatinosos, que aglutinan gran cantidad de gametos masculinos (espermatozoides).

Espermatogonias: Células reproductoras masculinas primarias y diploides.

Espermatozoides: Células reproductoras masculinas haploides y maduras, que han pasado por una serie de modificaciones que la hacen viable para alcanzar y perforar la membrana del óvulo, y se caracterizan por su movilidad por medio de un flagelo.

Familia: Categoría taxonómica de la clasificación biológica en que se dividen los órdenes. Las familias se dividen en géneros.

Fases de desarrollo gonádico: Se refiere a la división artificial del proceso de maduración de las gónadas femeninas y masculinas a partir de las células del epitelio germinal.

Formación Comondú: Esta formada por areniscas y conglomerados volcanoclásticos, tobas riolíticas, lahares andesíticos y flujos de lava coronando la secuencia. Presenta un color salmón típico, tiene una edad que va del Mioceno Superior al Plioceno y presenta un espesor superior a los 500 m.

Gametogénesis: Proceso de formación de gametos o células reproductoras.

Gametos: Células sexuales que pertenecen a la estirpe germinal. Tienen una evolución propia que conducirá a la forma haploide gracias a la reducción cromosómica o meiosis. Su finalidad es el fenómeno de la fecundación, que realiza la fusión de dos gametos, para restablecer así la diploidía.

Género: Categoría taxonómica de la clasificación biológica en que se dividen las familias. Los géneros se dividen en especies.

Gónada: Órgano en el que tiene lugar el desarrollo de las células reproductoras.

Gonocórico: Individuo que posee estructuras reproductoras únicamente femeninas o masculinas.

Lahar: Un flujo turbulento que está compuesto de agua y de material volcánico (material piroclástico y bloques de lava) previamente depositado. Dichos flujos se mueven por fuerzas gravitacionales y pueden llegar muy lejos del centro de emisión, hasta su depósito final.

Larva: Estado inicial de desarrollo de un animal, generalmente libre, que sufre una serie de cambios de forma, tamaño y hábitos de vida (metamorfosis) para transformarse en el estado adulto que es marcadamente distinto; es habitual en los animales acuáticos y los insectos. En animales marinos esta larva puede presentar un desarrollo directo, sin fase planctónica, o desarrollarse dentro del plancton.

Lecitotrófico: Aquellas larvas que presentan un aporte nutricional inicial (vitelo) por parte de sus progenitores, suficiente, o casi suficiente, para completar su desarrollo sin apoyo exógeno.

Mesolitoral: Región litoral afectada por las mareas y el barrido de las olas. Se encuentra comprendida entre el límite superior de la pleamar viva y el límite inferior de la bajamar viva.

Mioceno: Una división de la escala temporal geológica, es la cuarta época geológica de la era Cenozoica y a la primera época del periodo Neógeno. En este periodo continua la elevación de cordilleras como los Pirineos, los Alpes y el Himalaya. Comenzó hace 23 millones de años y terminó hace 5 millones.

Ovocito: Gameto o célula sexual femenina en desarrollo.

Ovogonias: Células reproductoras femeninas primarias y diploides.

Plioceno: En una división de la escala temporal geológica, es la época geológica que comienza hace 5 millones de años y termina hace 2 millones de años.

Rádula: Estructura característica de los moluscos que forma parte de su aparato bucal, a modo de órgano raspador. Consiste en una membrana flexible dotada de numerosos dientes colocados en filas transversales y longitudinales.

Secreción apocrina: Una parte del citoplasma apical se pierde junto con el producto de secreción.

Tejido conjuntivo o conectivo: Tejido que provee soporte estructural y transporte de nutrientes. En este caso se encuentra rodeando y atravesando la gónada en forma radial.

Tinción: Proceso histológico que tiene como función resaltar ciertas estructuras celulares por medio de la utilización de colorantes naturales o artificiales, y que permite una clara observación del tejido al microscopio.

Toba: Variedad de rocas calcáreas blandas y porosas, con restos orgánicos.

Trocófora: Tipo de larva de los moluscos, anélidos y otros grupos con el cuerpo larvario rodeado por un cinturón de cilios.

UPS: Unidades prácticas de salinidad, es un término aplicado desde 1978, que define la salinidad en términos de una razón o cociente de conductividades, en esta definición, la salinidad es un cociente y símbolo $^{\circ}/_{\text{‰}}$ es innecesario, y dado los cálculos efectuados, el antiguo valor de $35^{\circ}/_{\text{‰}}$ corresponde al valor de 35 en la salinidad práctica (UPS).

Vitelo: Material nutritivo de reserva de los ovocitos que se utiliza durante el desarrollo del embrión, por lo general rico en proteínas y lípidos.

Vitelogénesis: Formación y acumulación del vitelo en el citoplasma de las células.

Veliger: Larva planctotrófica de los moluscos, que sigue a la trocófora y en la que ya aparecen la concha, el pie, el velo y otras estructuras.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Localización del área de estudio.	11
Figura 2. Proporción de sexos de <i>Chiton virgulatus</i>	17
Figura 3. Gónada de <i>Chiton virgulatus</i>	18
Figura 4. Ovocito previtelogénico de <i>Chiton virgulatus</i>	19
Figura 5. Ovocito previtelogénico de <i>Chiton virgulatus</i> . Microscopía electrónica de transmisión.	20
Figura 6. Células foliculares de <i>Chiton virgulatus</i> . Microscopía electrónica de transmisión.	20
Figura 7. Ovocitos vitelogénicos inmaduros de <i>Chiton virgulatus</i> . Se observan las prolongaciones del casco del ovocito.	21
Figura 8. Ovocito vitelogénico inmaduro de <i>Chiton virgulatus</i> se observan los poros en la base de la prolongación. Microscopía electrónica de barrido.	22
Figura 9. Ovocito vitelogénico inmaduro de <i>Chiton virgulatus</i> . Microscopía electrónica de transmisión.	22
Figura 10. Prolongación del casco del ovocito. Microscopía electrónica de transmisión.	23
Figura 11. Ovocitos vitelogénicos maduros de <i>Chiton virgulatus</i>	24
Figura 12. En A) se observa la morfología de un ovocito vitelogénico maduro de <i>Chiton virgulatus</i> . En B) se visualizan las prolongaciones del casco del ovocito (flecha). Microscopía electrónica de barrido.	24
Figura 14. Espermatogonia de <i>Chiton virgulatus</i> . Microscopía electrónica de transmisión.	26
Figura 15. Espermatocito primario de <i>Chiton virgulatus</i> . Microscopio electrónico de transmisión.	27
Figura 16. Espermatocitos secundarios de <i>Chiton virgulatus</i> . Microscopía electrónica de transmisión.	28
Figura 17. Espermátida de <i>Chiton virgulatus</i> . Microscopía electrónica de transmisión.	29
Figura 18. Espermatozoide de <i>Chiton virgulatus</i> . Microscopía electrónica de transmisión.	29

Figura 19. Filamento nuclear del espermatozoide de <i>Chiton virgulatus</i>	30
Figura 20. A) Corte transversal de flagelos de <i>Chiton virgulatus</i> , B) corte transversal del espermatozoide. Microscopía electrónica de transmisión.	30
Figura 21. Gónada de <i>Chiton virgulatus</i> en etapa de indiferenciación. A) técnica Tricrómica de Masson 20X. B) técnica Hematoxilina-eosina 40X.	32
Figura 22. Gónada de <i>Chiton virgulatus</i> en etapa de desarrollo. A) macho teñido con la técnica Tricrómica de Masson 20X. B) hembra teñida con la técnica Hematoxilina-eosina 10x.....	32
Figura 23. Gónada de <i>Chiton virgulatus</i> en etapa de madurez. A) macho teñido con la técnica Tricrómica de Masson 20X,. B) hembra teñida con la técnica Hematoxilina-eosina 10x.....	33
Figura 24 Gónada de <i>Chiton virgulatus</i> en etapa de desove. A) macho teñido con la técnica Tricrómica de Masson 10x. B) hembra teñida con la técnica Tricrómica de Masson 10x.....	33
Figura 25. Frecuencia de las fases de desarrollo gonadico de <i>Chiton virgulatus</i> en El Califín.....	34
Figura 26. Frecuencia de las fases de desarrollo gonadico de <i>Chiton virgulatus</i> en Balandra.....	35
Figura 27. Variación del diámetro promedio mensual de los ovocitos de <i>Chiton virgulatus</i> en El Califín.....	36
Figura 28. Variación del diámetro promedio mensual de los ovocitos de <i>Chiton virgulatus</i> en Balandra.....	37
Figura 29. Variación del Índice gonádico de <i>Chiton virgulatus</i> en El Califín.....	39
Figura 30. Frecuencia de las fases de desarrollo gonádico de <i>Chiton virgulatus</i> y variación de factores ambientales en El Califín.....	41
Figura 31. Frecuencia de las fases de desarrollo gonádico de <i>Chiton virgulatus</i> y variación de factores ambientales en Balandra.	43
Figura 32. Talla de reclutamiento a la reproducción de <i>Chiton virgulatus</i> en El Califín. Septiembre de 2008 – septiembre de 2009.	45
Figura 33. Talla de reclutamiento a la reproducción de <i>Chiton virgulatus</i> en Balandra. Febrero de 2010 – febrero de 2011	45

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Número de hembras (H), machos (M) y organismos indiferenciados (I), de <i>Chiton virgulatus</i> . Valor de χ^2 , valor de probabilidad asociado (P), en rojo, los valores de χ^2 son significativamente diferentes de la proporción esperada.	16
Tabla 2: Descripción de los estadios del ciclo gonádico de <i>Chiton virgulatus</i>	31
Tabla 3: Diámetro promedio (μm) mensual y desviación estándar (DE) de los ovocitos de <i>Chiton virgulatus</i>	38
Tabla 4: Longitud media y desviación estándar (DE), talla mínima y máxima por mes de <i>Chiton virgulatus</i>	44

RESUMEN

Los poliplacóforos o quitones son moluscos estrictamente marinos que se distribuyen en el litoral rocoso desde la zona entre mareas, hasta la abisal. Su captura es una actividad que realizan de manera temporal o complementaria habitantes de algunas zonas costeras de México. *Chiton virgulatus* es una especie endémica de las costas del Pacífico mexicano, de la que no existen estudios sobre su biología. El conocimiento del ciclo reproductivo es esencial para la administración de las pesquerías de invertebrados marinos y es regulado por factores endógenos y exógenos, por lo que el objetivo de este trabajo es analizar el ciclo reproductivo de *C. virgulatus* y su relación con el fotoperiodo, el ciclo de marea y la temperatura, así como describir la morfología y la ultraestructura de los gametos. Para ello, se recolectaron en promedio 20 organismos por mes en dos localidades de la Bahía de La Paz, (a) al suroeste en El Califín (septiembre 2008- septiembre 2009) y (b) al sureste en Balandra (febrero 2010- febrero 2011). Las gónadas fueron analizadas mediante microscopía óptica (técnica histológica), microscopía electrónica de transmisión y de barrido. Se describen tres tipos de ovocitos: previtelogénicos, vitelogénicos inmaduros y vitelogénicos maduros y cinco tipos celulares espermáticos: espermatogonias, espermatoцитos primarios, secundarios, espermátidas y espermatozoides. Para el ciclo gonádico se describen cuatro fases de desarrollo gonádico: indiferenciación, desarrollo, madurez y desove. *C. virgulatus* es un desovador parcial, que presenta un pico reproductivo en verano-otoño en ambas localidades, sin embargo, la intensidad de desove fue mayor en Balandra. La mayor frecuencia de desove en El Califín se correlacionó con las mareas más altas, mientras que en Balandra con las más bajas. La longitud de la primera madurez fue de 31.42 mm en El Califín y 37.45 mm en Balandra. No se encontró diferencia significativa en la proporción de sexos para ambos sitios. Se concluye que las diferencias de la estacionalidad de las fases del ciclo entre las dos localidades, podrían ser afectadas por el conjunto de los factores ambientales locales (temperatura, fotoperiodo y ciclo de mareas) así como la configuración de la línea de costa.

ABSTRACT

The polyplacophorans or chitons are strictly marine molluscs that spread over the rocky shoreline from the intertidal zone to the abyss. His capture is a temporary complementary activity carried out by inhabitant of some coastal areas of Mexico. *Chiton virgulatus* is endemic to the Mexican Pacific coast, there are no studies related on its biology. The knowledge of the reproductive cycle is essential for fisheries management of marine invertebrates and such a reproductive cycle is regulated by exogenous and endogenous factors thus, the objective of the present work is to analyze the reproductive cycle of *C. virgulatus* and its relationship with the photoperiod, tidal cycle and temperature; also to describe the morphology and ultrastructure of gametes. For this purpose, we collected an average of 20 organisms per month in two locations within the Bay of La Paz; (a) in El Califín on the southwest (September 2008 – September 2009) and (b) in Balandra on southeast (February 2010- February 2011). The gonads were observed with light microscopy (histology), transmission electron microscopy and scanning electron microscopy. We describe three types of oocytes: previtellogenic oocytes, vitellogenic immature oocytes, vitellogenic mature oocytes and five kinds of cells of spermatogenesis: spermatogonia, primary spermatocytes, second spermatocytes, spermatid and spermatozoid. The gonadal cycle describes four stages of gonadal development: undifferentiated, development, ripeness and spawning. *C. virgulatus* is a partial spanner which has a reproductive peak during summer and autumn at both sites, however, the intensity of spawning in El Califín is correlated to the highest tides, while in Balandra is correlated to the lowest. The length at first maturity was 31.42mm in El Califín and 37.45 mm in Balandra. There was no significant difference in the sex ratio for both sites. We conclude that differences in the seasonal cycle phases between the two locations could be affected by local environmental factors, as well as the different values on the hydrological variables (photoperiod, tidal cycle and temperature) and coastline morphology.

INTRODUCCIÓN

Los moluscos es uno de los grupos de invertebrados más estudiados, se han descrito entre 65,000 y 100,000 especies (Brusca, 1980), son habitantes terrestres y acuáticos, se caracterizan por tener el cuerpo blando, una concha calcárea secretada por la epidermis subyacente de la pared del cuerpo (manto). Al menos en una etapa de su vida, la mayoría de los moluscos presentan un pie musculoso, respiración branquial, sistema circulatorio abierto, sistema digestivo abierto, larvas trocófora y veliger (Ruppert & Barnes, 1996). Los moluscos se dividen en siete clases: Monoplacophora, Polyplacophora, Solenogastres, Caudofoveata, Gastropoda, Bivalvia, Scaphopoda y Cephalopoda (WoRMS, 2011).

Los Polyplacophora o Amphineura, son un grupo de moluscos estrictamente marinos, mejor conocidos como quitones, se encuentran representados aproximadamente por 875 especies (Gracia *et al.*, 2005). Se distribuyen en áreas de sustrato rocoso, se fijan sobre las rocas y debajo de ellas, desde la zona entre mareas, hasta profundidades batiales. Son organismos de forma ovalada que presentan simetría bilateral, una concha constituida por ocho placas imbricadas (conocidas como ceramas), rodeadas por el borde del manto que forma una estructura gruesa y dura denominada cinturón, cuya superficie puede estar cubierta por una delgada cutícula que puede ser lisa o estar dotada de escamas, espinas o espículas calcáreas. Presentan un patrón corporal deprimido (aplanados dorsoventralmente) (Eernisse & Reynolds, 1994; Ruppert & Barnes, 1996). Presentan hábitos nocturnos y la mayoría de las especies se encuentran en aguas someras, o en la zona entre mareas, son organismos de gran resistencia al oleaje y desecación, lo que es favorecido por su forma aplanada, algunas especies como *Sypharochiton pelliserpentis* poseen la capacidad de soportar hasta un 75% de pérdida de agua corporal, durante periodos de mareas bajas (Boyle, 1970). Otras especies tienen la capacidad de sobrevivir ante condiciones ambientales desfavorables como baja temperatura y baja salinidad, tal es el caso de algunas especies del género *Tonicella* (Sirenko, 1998).

Los quitones en general son dioicos aunque se han reportado casos de hermafroditismo en *Lepidochitona caverna* (Eernisse, 1988), *L. fernaldi* (Eernisse, 1988) y en *Plaxiphora aurata* (Scarano & Ituarte, 2009). Presentan una sola gónada central, situada debajo de la segunda y séptima ceramas, frente a la cavidad pericárdica. Estos moluscos no copulan, sino que los gametos salen con las corrientes exhalantes y la fecundación sucede en el agua o dentro de la cavidad del manto de la hembra. Sus hábitos gregarios facilitan este tipo de fecundación, los óvulos y el esperma son expulsados envueltos en una matriz gelatinosa que facilita su unión. Una vez que se han fertilizado externamente, desarrollan una larva trocófora libre nadadora lecitotrófica. Estos moluscos no desarrollan una larva veliger, fenómeno que ha sido interpretado por muchos autores como la prueba de que el grupo de los quitones es muy antiguo. Posteriormente las larvas ya desarrolladas se adhieren al sustrato (Brusca & Brusca, 2002). Aun no se conoce la metamorfosis o las señales que promueven el asentamiento de larvas. Se sabe que aunque la metamorfosis no es muy drástica, implica unos cambios importantes, como el inicio de la biomineralización de las valvas y la rádula que se origina de la alimentación activa de los juveniles recién metamorfoseados (Eernisse, 2007).

La boca se encuentra situada en la superficie ventral delante del pie y se abre en una cavidad bucal revestida de quitina llamada rádula, que es muy larga y tiene 17 dientes en cada fila transversal, de los que algunos están recubiertos de magnetita (un mineral rico en hierro) (Eernisse, 2007). Esta es de gran importancia ya que la dieta de muchos quitones consiste en diatomeas, radiolarios, foraminíferos, larvas de crustáceos y poliquetos, pero incorporan en sus dietas también partículas orgánicas del sedimento, que raspan de las rocas (Gracia *et al.*, 2005; Eernisse, 2007).

El quitón *Chiton virgulatus*, también llamado “cochinilla de mar”, pertenece a la familia Chitonidae del orden Chitonida. Algunos autores reportan que se distribuye desde Bahía Magdalena BCS en el Pacífico hasta Bahía Kino, Sonora en el Golfo de California (Keen, 1971; González, 1993; Reyes-Gómez, 2004), mientras que otros han reportado su distribución desde Bahía Magdalena a Panamá (Abbott, 1974) y se ha registrado su presencia en Costa Rica (Willis & Cortés, 2001). Sin embargo, esta

especie se considera endémica de México (González, 1993), lo que ha sido confirmado por Reyes-Gómez (2004). Se caracteriza por ser ovalado, relativamente elongado, con pendientes laterales rectas o débilmente convexas, posee la inserción de las placas muy desarrollada, con menos de 35 costillas longitudinales en el área central de las ceramas. El área anterior y posterior cuenta con cerca de 50 costillas, cada área lateral presenta de ocho a doce costillas, el cinturón presenta escamas pequeñas, las ceramas son opacas de color verde a café, con vetas negruzcas, dispuestas longitudinalmente en el área pleural, concéntricas en las ceramas del final. La cerama apical es semicircular, el margen posterior ligeramente en forma de “V”, casi en línea recta en algunas muestras, y su interior es azul a verde. Su longitud máxima es de 50 a 70 mm (Abbott, 1974).

En México los quitones forman parte importante en la dinámica costera del litoral (Reyes-Gómez, 1999). Algunas especies como *C. articulatus* conocida como “cucaracha de mar”, es explotada intensamente y sin restricciones en algunos estados de México, como Guerrero, Oaxaca, Jalisco, Colima y Michoacán, se utiliza como alimento, como carnada y para elaborar artesanías por los pobladores de la región (Ríos-Jara *et al.*, 2006). La cucaracha de mar, al igual que otras especies comerciales, tuvo poblaciones importantes en la franja costera rocosa, pero la extracción inmoderada de esta especie, ha mermado las poblaciones, especialmente en los individuos de tallas mayores a los 60 mm (Holguin-Quiñones, 2006), aunque en estados como Michoacán, Colima y Jalisco constituye una pesca organizada, en el estado de Guerrero existe una pesquería bien establecida (Rojas-Herrera, 1988).

La determinación del ciclo reproductivo es muy importante, ya que permite identificar la temporada de desove de una especie, cuyo conocimiento permite establecer algunas medidas de manejo pesquero necesarias para la administración racional de los recursos. En México, la administración o regulación de las pesquerías de invertebrados bentónicos, se basa principalmente en tres medidas regulatorias, todas basadas en conocimiento del ciclo reproductivo: 1) el establecimiento de dos tipos de vedas: la veda reproductiva, que impide la captura durante la época de máxima actividad reproductiva y la veda prohibitiva, que no permite la captura en

ningún momento; 2) la determinación de la talla mínima de captura, que se fija con base en la talla de primera reproducción; 3) establecimiento de zonas de reserva, que se aplica a recursos con hábitos de agregación reproductora (Baqueiro *et al.*, 1992).

Uno de los métodos para el estudio de la reproducción de muchos invertebrados marinos es el examen histológico del tejido gonádico, que es el más confiable para determinar los cambios gonádicos estacionales, con este análisis se determina la frecuencia y duración del desove en una población natural (Jaramillo & Navarro, 1995). Otra manera de evaluar el ciclo reproductivo es mediante la estimación del índice gonádico, un aumento en los valores de este índice se considera como indicador de la gametogénesis, mientras una disminución se interpreta como ocurrencia de desove (Barber & Blake, 1991; Villalejo-Fuerte & Ceballos-Vázquez, 1996). La microscopia de luz es una herramienta fundamental en el estudio. Sin embargo, la invención del microscopio electrónico en la década de los años 30, ha permitido obtener una mayor resolución y magnificación (Peter *et al.*, 1992), lo cual ha permitido profundizar en el estudio de la biología reproductiva, a través del estudio de la ultraestructura y morfología de los gametos. Estos estudios también son de gran importancia en el conocimiento taxonómico y de procesos tales como la fecundación (Eernisse & Reynolds, 1994; Sotil, 2004; Buckland-Nicks & Brothers, 2008).

Actualmente no existen en México trabajos sobre ciclos reproductivos de ninguna especie de quitón. La cochinilla de mar, *C. virgulatus* podría ser utilizada para elaborar artesanías, para consumo humano, o como carnada en la extracción de langosta y otros organismos, tal como sucede con otras especies de quitón en otros estados de la república mexicana, y sabiendo que en México la administración o regulación de las pesquerías de invertebrados bentónicos, se basa en parte en el conocimiento del ciclo reproductivo, y a que aún no existen estudios sobre la biología, ni la reproducción de esta especie, este trabajo pretende contribuir al conocimiento de la biología reproductiva de *C. virgulatus*, y con esto proporcionar elementos para establecer algunas de las medidas necesarias para la administración de este recurso.

ANTECEDENTES

Estudios en especies mexicanas

La única especie mexicana en la que se han efectuado algunos trabajos biológicos es *Chiton articulatus*, entre los que destacan el de Rojas-Herrera (1988) quien realizó un estudio pesquero en Acapulco, Guerrero; el de Holguin-Quñones y Michel-Morfín (2002) quienes estudiaron la distribución, abundancia y las relaciones peso-longitud en las islas Revillagigedo y el de Flores-Campaña *et al.* (2007) sobre la estructura poblacional en la Bahía de Mazatlán, Sinaloa. Sin embargo, no se ha estudiado la biología reproductiva, ni de *C. articulatus*, ni de ninguna otra especie de quitón en las costas de México.

Los trabajos de *C. virgulatus* han sido únicamente de taxonomía y distribución geográfica (Keen, 1971; Reyes-Gómez, 1999; Willis & Cortés, 2001; Reyes-Gómez & Salcedo-Vargas, 2002; Reyes-Gómez, 2004; García & Alvarez, 2007), así como su mención en listados de moluscos endémicos de México (González, 1993).

Ciclo reproductivo

Se han documentado numerosos estudios acerca de los ciclos reproductivos en diferentes especies de quitones como *Katherina tunicata* (Giese, 1959; Himmelman, 1978), *Mopalia hindsii* (Giese, 1959), *Acanthopleura japonica* (Yoshioka, 1987a, 1987b), *Lepidochitona dentiens*, *L. hartwegii*, *L. berryana*, *L. thomasi*, *L. caverna*, *L. fernaldi* (Eernisse, 1988), *C. cumingsii* (Ishiyama, 1995), *A. gemmata* (Fathy *et al.*, 1996). Más recientemente Barbosa *et al.* (2009), determinaron por medio de histología cinco etapas gonádicas en el ciclo reproductivo del quitón *A. gemmata* (recuperación, desarrollo, maduración, desove parcial y desove) con lo que establecieron la época reproductiva y lo compararon con el índice gonadosomático, ambos análisis demostraron que *A. gemmata* presenta múltiples periodos de desove que comienzan en noviembre y continúan en mayo, con una mayor liberación de gametos en marzo.

Factores ambientales que afectan los ciclos reproductivos

Los ciclos reproductivos de los invertebrados marinos pueden estar determinados por interacciones entre factores exógenos como el fotoperiodo, el nivel de mareas y la temperatura (Rose *et al.*, 1990; López *et al.*, 2005) o factores endógenos de tipo endocrino y neuronal (López *et al.*, 2005). De esta manera la periodicidad con que se reproducen estos organismos, aunque está regulada por el genoma, depende también de las variaciones en los factores abióticos (Mackie, 1984) que actúan como señales ambientales para la maduración gonadal, mas aun cuando se tiene en cuenta que las zonas intermareales habitadas por los quitones son ambientes que continuamente presentan variaciones (Sakker, 1986; Yoshioka, 1987a). Así, los ciclos reproductivos pueden ser anuales, bianuales, estacionales o continuos, dependiendo de la localidad y la especie (Sastry, 1979).

Se ha reportado que la temperatura es un factor que influye directamente en la reproducción de algunos moluscos como en el bivalvo, *Pteria sterna* (Hernández-Olalde *et al.*, 2007); el gasterópodo, *Tegula eiseni* (Vélez-Arellano *et al.*, 2009); el cefalópodo, *Octopus hubbsorum* (Pliego-Cárdenas *et al.*, 2011) y en quitones como *A. gemmata* (Barbosa *et al.*, 2009), especies en las que el aumento de la temperatura coincide con la época reproductiva. En otras especies, como *C. cumingsii* la época reproductiva es determinada por los cambios en la temperatura superficial del mar, tanto el aumento, como la disminución (Ishiyama, 1995).

Se han realizado trabajos acerca de la influencia del fotoperiodo en el ciclo reproductivo de invertebrados marinos, tal es el caso de la estrella de mar *Pisaster ochraceus*, donde se demostró que en los días más largos esta especie presenta un aumento en el desarrollo de la gónada (Pearse & Eernisse, 1982). También el efecto del fotoperiodo en la reproducción ha sido mostrado en algunos caracoles y babosas terrestres y de agua dulce (Hideharu & Hiroko, 2009), como el control de la ovoposición en el “caracol panteonero” *Lymnaea palustis* (Jenner, 1951). En contraste esto ha sido muy poco publicado para moluscos marinos, con excepción de *Aplysia californica* que en condiciones de laboratorio, el fotoperiodo mostro una menor importancia en la regulación de la reproducción en comparación con la

temperatura (Wayne&Block, 1992). En la almeja *Pecten maximus* se encontró que al aumentar la temperatura y el fotoperiodo existía un mayor desarrollo de la gónada, aunque aún no se sabe cuál de los dos factores es responsable de esta estimulación. En el pulpo común *Octopus vulgaris*, los machos producen un mayor número de estiletes de espermátóforos en los días largos que en los días cortos (Hideharu & Hiroko, 2009). Sin embargo, Yoshioka (1987b) menciona que en *A. japonica* el fotoperiodo no tiene efecto en la gametogénesis y la temperatura determina la reproducción. En relación a lo anterior Hideharu & Hiroko (2009) mencionan que el fotoperiodo juega un papel secundario al papel de la temperatura en el ciclo reproductivo, sin embargo en sentido estricto, el fotoperiodo no determina los cambios en la reproducción de las especies marinas, ya que la temperatura del agua de mar es más variable que la temperatura del aire o del agua dulce.

Se sabe que los cuerpos celestes afectan a las aguas oceánicas en cierto grado debido a su atracción mutua, tal es el caso de la luna, durante el ciclo de fases lunares, la marea asciende y desciende más durante las sicigias (luna nueva y luna llena) o asciende y desciende menos durante las cuadraturas (cuarto menguante y cuarto creciente) (Neuman & Pearson, 1966; Neshyba, 1987). Así, se ha encontrado que en equinodermos los desoves ocurren entre la luna nueva y la luna llena, es decir durante las mareas más altas (Ilfie & Pearse, 1982). El coral, *Paramuricea clavata* desova entre tres y seis días después de la luna llena o luna nueva (Coma *et al.*, 1995) y *Favia fragum*, 18 días después de la luna nueva (Szmant-Froelich *et al.*, 1985). En moluscos, autores como Nishida *et al.* (2006), observaron que en los meses en que las mareas son más altas, el índice de condición en moluscos era mayor, lo que atribuyen a que en esa época, la disponibilidad de alimento era mayor.

Gametogénesis

Existen numerosos trabajos que describen la gametogénesis en moluscos, tanto ovogénesis (Amor *et al.*, 2004; Najmudeen, 2008), como espermatogénesis (Jespersen & Lützen, 2000; Ortiz-Ordoñez *et al.*, 2006). En cuanto a estudios de la gametogénesis para poliplacóforos, se sabe que durante la ovogénesis los ovocitos

desarrollan elaborados revestimientos extracelulares de mucopolisacáridos y proteínas, excretados por las células foliculares y por el propio ovocito, se conocen como casco del ovocito ("egg hull"), se caracterizan por presentar proyecciones conspicuas en forma de cúpulas, tazas, conos, aletas o espinas (Eernisse & Reynolds, 1994; Sotil, 2004; Buckland-Nicks & Brothers, 2008; Buckland-Nicks & Reunov, 2009). También se ha reportado que en algunas especies de la familia Lepidochitonidae, las prolongaciones del casco del ovocito, se han alisado casi completamente (Eernisse, 1988). Por otro lado, los espermatozoides son muy diferentes a otros espermatozoides, presentan un acrosoma reducido a una pequeña vesícula en la punta de un filamento nuclear alargado (Buckland-Nicks *et al.*, 1990; Buckland-Nicks & Brothers, 2008) que podría estar relacionado con la fertilización (Sakker, 1986) y un cuerpo basal acéntrico que comprende los dos centriolos fusionados (Buckland-Nicks & Brothers, 2008).

JUSTIFICACIÓN

Debido a que *Chiton virgulatus* es una especie endémica del Golfo de California, que podría ser utilizada para elaborar artesanías, para consumo humano, o como carnada en la extracción de langosta y otros organismos, tal como sucede en otros estados de la República Mexicana, y sabiendo que en México la administración o regulación de las pesquerías de invertebrados bentónicos, se basa en parte en el conocimiento del ciclo reproductivo, y a que aun no existen estudios biológicos sobre esta especie, este trabajo pretende contribuir al conocimiento de la biología de *C. virgulatus* y con esto dar elementos para establecer algunas de las medidas necesarias para la administración de este recurso.

HIPÓTESIS

Debido a que la duración, frecuencia e intensidad de las fases gonádicas de los moluscos bentónicos de la zona entre mareas están relacionadas y reguladas por factores exógenos como la temperatura, el fotoperiodo y el nivel de mareas, se espera que en la época del año en la que la temperatura es más alta, el fotoperiodo más prolongado y las mareas son más altas, las fases de madurez y desove de *Chiton virgulatus*, en la Bahía de La Paz, B. C. S., México, sean más frecuentes e intensas y que en la época del año en que la temperatura es más fría, el fotoperiodo más corto y las mareas más bajas, sean más frecuentes e intensas las fases de indiferenciación y desarrollo de la gónada.

OBJETIVO

Objetivo general

Describir el ciclo reproductivo y la gametogénesis de *Chiton virgulatus* Sowerby, 1840 en dos localidades de la Bahía de La Paz, B. C. S., México, durante un ciclo anual, así como su relación con el fotoperiodo, el nivel de mareas y la temperatura del ambiente.

Objetivos específicos

1. Describir la morfología y ultraestructura de la ovogénesis y espermatogénesis de *C. virgulatus*.
2. Describir las fases de desarrollo gonádico de *C. virgulatus*.
3. Describir y analizar el ciclo reproductivo de *C. virgulatus*.
4. Determinar la relación del ciclo reproductivo de *C. virgulatus* con la temperatura superficial del mar y del aire, ciclo de mareas y fotoperiodo.
5. Determinar la proporción de sexos de *C. virgulatus* durante un ciclo anual y en particular para cada uno de los meses.
6. Estimar la talla de reclutamiento a la reproducción de *C. virgulatus*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Área de estudio

La Bahía de La Paz se localiza desde los 24.1 hasta los 24.8°N y de los 110.2 a los 110.8° W (Fig. 1). Es la bahía más grande en la costa este de la Península de Baja California, cuenta con aguas profundas en casi toda su extensión. Al este se encuentran la Isla Espíritu Santo y al sureste el Canal de San Lorenzo, mediante el cual existe comunicación al Golfo de California (Obeso-Nieblas, 1993). El patrón de mareas en la bahía depende de la co-oscilación con la marea del Golfo de California y ésta a su vez, con la del Océano Pacífico. El régimen de mareas es mixto, predominantemente semi-diurno (Anónimo, 1985).

Los muestreos se realizaron en dos localidades, una situada al suroeste de la Bahía de La Paz, en la playa “El Califín”, en la porción sur del abanico delta a los 110° 38′27″W, 24°19′16″N, (Fig. 1). Ésta es una playa rocosa que tiene dominancia de gravas, guijarros y peñascos de forma redonda-sub-redonda, la línea de costa está influenciada por agua de la zona profunda de la Bahía de La Paz (Cruz-Chávez, 2008). La segunda localidad fue la playa “Balandra”, situada a los 110°19′45″ W, 24°19′22″ N (Fig.1), al sureste de la Bahía de La Paz, en la saliente de la parte norte del complejo caleta-lagunar. Es un acantilado de lahar andesítico de la Formación Comondú del Mioceno Superior fuertemente erosionado por la acción de las olas, se encuentra influenciado por agua somera de la laguna y de la corriente tangencial del Canal de San Lorenzo, por lo que es una zona con intercambio de agua constante (Gutiérrez-Sánchez, 1987).

Metodología de campo

Los ejemplares de *C. virgulatus*, se recolectaron en la playa rocosa “El Califín” de septiembre de 2008 a septiembre de 2009 y en la playa rocosa de Balandra de febrero de 2010 a febrero de 2011. Se recolectaron en promedio 20 organismos mensuales de forma manual, en la zona entre mareas. Al momento de la recolecta se midió la temperatura superficial del mar (TSM) con un termómetro de mercurio. La

temperatura del aire se obtuvo del Meteorológico de la Ciudad de La Paz, el fotoperiodo y el nivel de marea (NM) del programa MARv09 que proporciona el Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California.

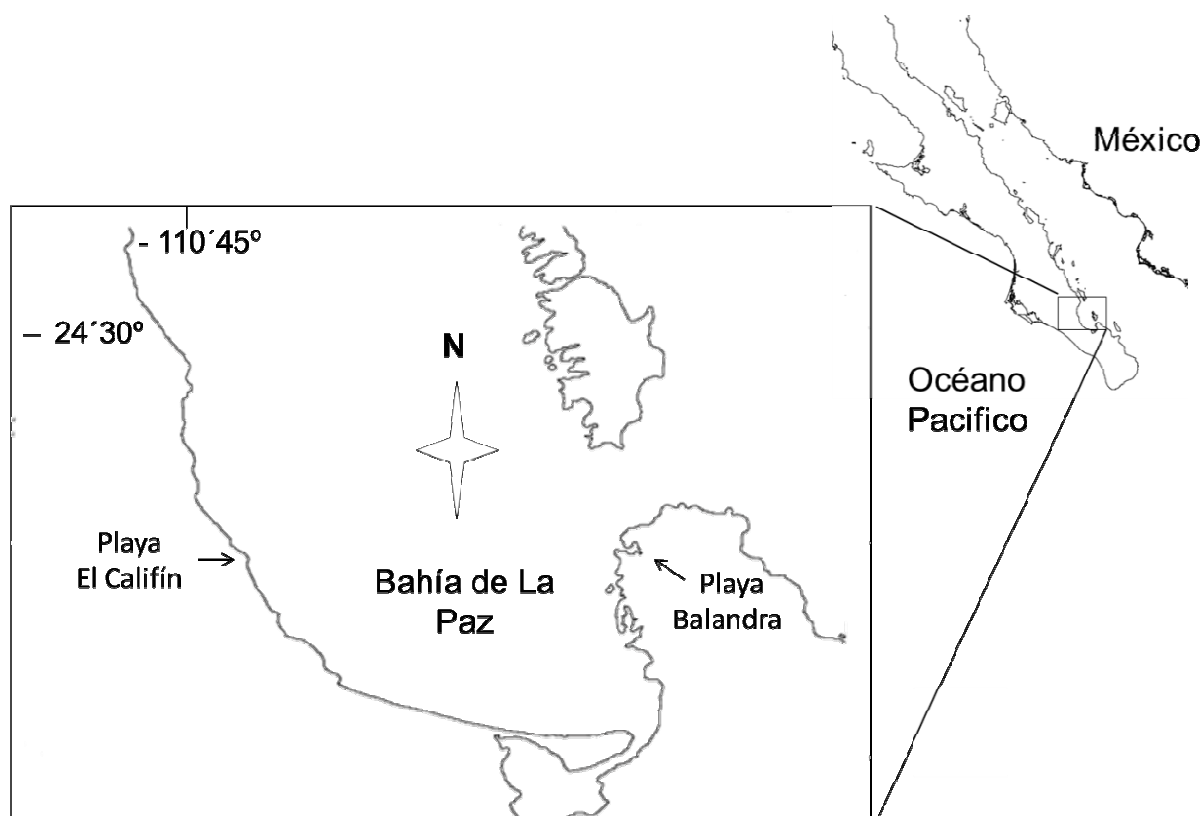


Figura 1. Localización del área de estudio.

Metodología de Laboratorio

Después de registrar la longitud de cada ejemplar con una regla de un milímetro de precisión y el peso húmedo del organismo con concha y sin concha con una balanza electrónica de 0.01 mg de precisión, se realizó la disección para obtener la gónada. El total de los organismos recolectados en El Califín fue procesado únicamente con la técnica histológica convencional, para analizar el ciclo gonádico, el crecimiento mensual de los ovocitos, el índice gonádico y la talla de primera madurez. Las gónadas de los organismos recolectados en Balandra además de procesarlas con la técnica histológica para analizar las mismas variables, también se procesaron con la técnica de microscopia electrónica de barrido, para describir la

morfología de los gametos y con la técnica de microscopia electrónica de transmisión, para analizar la ultraestructura de los gametos.

Técnica de microscopía electrónica de transmisión

Para esto se tomaron muestras de tejido aproximadamente de 1 mm³ de la gónada de cada organismo, se fijaron en glutaraldehído al 2.5% en amortiguador de cacodilato de sodio 0.1 M durante 2 horas, posteriormente se lavó tres veces en cacodilato de sodio 0.1 M por 15 minutos para así realizar la posfijación con tetraóxido de osmio al 2%. Posteriormente se lavaron con cacodilato de sodio 0.1 M, se deshidrató el tejido mediante una serie de alcoholes, de 40% a alcohol etílico absoluto, en agitación suave, se hizo un cambio de óxido de propileno en agitación suave, con la finalidad de proporcionar un medio intermediario entre el alcohol y la resina. Se adicionó en una mezcla 1:1 de resina spurr y óxido de propileno en agitación suave, posteriormente una mezcla de 1:3 de resina spurr y óxido de propileno en agitación suave, a continuación se hicieron dos cambios de resina spurr, para incluirlos en moldes cilíndricos y colocarlos en una incubadora a 65°C, con el fin de que la resina se polimerizara.

Una vez polimerizada la resina, se procedió a tallar el bloque hasta obtener una forma de pirámide. Se obtuvieron cortes semifinos de 0.3 µm de espesor utilizando un ultramicrotomo (MT-7000) con una cuchilla de vidrio, estos se recogieron con ayuda de un asa para su tinción con azul de toluidina.

Posteriormente se observaron los cortes semifinos en un microscopio óptico Nikon H550L (10X, 60X). Se seleccionaron áreas representativas de la gametogénesis para posteriormente tomar fotografías y realizar los cortes finos (50-80 nm de espesor) y se colocaron sobre rejillas de cobre de 200 mallas.

Se contrastaron los cortes con acetato de uranilo al 8%. Las rejillas se lavaron con agua bidestilada y se secaron con papel filtro. Posteriormente se colocaron en citrato de plomo al 1%, finalmente se lavaron con agua bidestilada y se secaron con papel filtro. Por último los cortes finos contrastados se observaron con un microscopio electrónico de transmisión modelo Jeol-1400X.

Técnica de microscopía electrónica de barrido

Se fijaron 5 mm³ de tejido gonádico en glutaraldehído al 2.5% en agua de mar filtrada a un pH de 7.4, se lavaron utilizando cambios decrecientes de solución salina, de 37 ups a agua destilada, después se realizó una pre-deshidratación con cambios graduales de alcohol etílico de 30 a 100%, se secaron a punto crítico de CO₂ con un aparato de secado marca Tousimis modelo Samdri-PVT-3B. Las muestras se colocaron en una cámara saturada con vapor de osmio, posteriormente se les dio un baño de paladio en un evaporador de metal Danton vacuum Desk II y finalmente se observaron y capturaron imágenes, utilizando un microscopio electrónico de barrido modelo Hitachi S-3000N, y un procesador de imágenes Quartz PCI.

Técnica histológica

Una porción de la gónada de cada organismo fue fijada en formol al 10% preparado con agua de mar durante 48 horas, posteriormente se efectuó un lavado del fijador con agua corriente durante 24 horas y cada pieza se deshidrató mediante cambios graduales de alcohol de menor a mayor concentración, iniciando con alcohol etílico de 70% para terminar con alcohol absoluto. Después se paso por alcohol-CitriSolv (1:1), y se aclaró con CitriSolv, para posteriormente ser incluido en parafina; este proceso se inició con un cambio en Parafina-CitriSolv para que la penetración de la misma fuera gradual, continuando con dos cambios de parafina. El tejido se incluyó en parafina de punto de fusión de 56 a 58 °C. Los cortes histológicos se hicieron de 5 µm de grosor. Una vez obtenidos, se desparafinaron, hidrataron y tiñeron con las técnicas Hematoxilina-eosina (Humason, 1979) y Tricrómica de Masson (Uría & Mora, 1996). Finalmente se montaron en láminas de vidrio con resina sintética.

Ciclo reproductivo

Una vez obtenidas las preparaciones histológicas, el método consistió en dividir el ciclo completo en categorías arbitrarias (indiferenciación, desarrollo,

maduración y desove), basadas en características morfológicas de acuerdo al criterio de Barbosa *et al.* (2009). Con los datos obtenidos se elaboró una gráfica de área de las frecuencias relativas de cada fase asignada. Los meses con mayor frecuencia de madurez y desove indicaron la temporada o época reproductiva.

Análisis de la variación en la talla de los ovocitos

Con base al estudio histológico, se aplicó un análisis del crecimiento de los ovocitos, que consistió en efectuar un seguimiento del diámetro promedio mensual de los ovocitos (DPMO) (Grant & Tyler, 1983). De las preparaciones histológicas, se seleccionaron las correspondientes a hembras con ovocitos diferenciables (desarrollo, madurez y desove), se fotografiaron con un fotomicroscopio marca Leica DMLS y por medio de un programa de cómputo (Sigma Scan Pro Versión 5), se midió el diámetro de todos los ovocitos en los que se observó el nucléolo. Con los datos obtenidos se determinó el diámetro promedio. Cuando el tamaño promedio de los ovocitos es el mayor, se consideró que la gónada está en su fase de máxima madurez, y cuando se observó una caída brusca del tamaño promedio de los ovocitos, se consideró que se efectuó un desove.

Índice Gonádico

Como una medida de la madurez gonádica se calculó el Índice Gonádico ($IG = \text{peso gonadal} \times 100 / \text{peso total del organismo sin concha}$). La curva resultante del IG se interpretó de acuerdo al criterio de Villalejo-Fuerte & Ceballos-Vázquez (1996). Los valores más bajos son considerados como evidencia de inactividad gametogénica o posdesove, mientras que un aumento sostenido del IG es indicador de actividad gametogénica, los puntos máximos en la curva son considerados como evidencia de madurez y una disminución sostenida es considerada como evidencia de que la población está en desove.

Proporción de sexos

El sexo de cada ejemplar se determinó mediante la observación microscópica del tejido gonadal. La proporción sexual se estimó dividiendo el número total de hembras entre el número total de machos. Para conocer si esta proporción difiere de una proporción 1:1 se aplicó una prueba de χ^2 (Zar, 2010).

Talla de reclutamiento a la reproducción

Se estableció como talla de reclutamiento a la reproducción aquella en la cual el 50% de los organismos están sexualmente maduros, es decir los que presenten estadios gonádicos de madurez y desove. Se calculó la frecuencia relativa y la frecuencia relativa acumulada por intervalo de longitud (2 mm) y a partir de esta última se ajustó a un modelo logístico para conocer la talla en la que se presenta el 50% de los organismos maduros.

Análisis estadísticos

Para determinar la relación entre la frecuencia relativa de organismos en cada fase del ciclo reproductivo con la temperatura, el fotoperiodo y el nivel de marea, se aplicó un análisis de correlación de rangos de Spearman. Antes de aplicar los análisis de correlación, se llevaron a cabo transformaciones de arcoseno a las frecuencias de las fases del ciclo reproductivo, y se estandarizaron junto con los datos de los factores ambientales. Se realizaron análisis de variancia de una vía en el IG y el DPMO, para determinar si existe diferencia entre las medias de cada uno de los meses, seguidos por una prueba de comparación de medias de Duncan para detectar en que meses se observaron esas diferencias (Sokal & Rohlf, 1995). Para comparar la talla tanto de los organismos, como del diámetro promedio mensual de los ovocitos entre localidades, se realizó un análisis de varianza de una vía, mediante el programa R versión 2.14.1. (R Development Core Team, 2011).

RESULTADOS

En total se recolectaron 540 organismos adultos de *Chiton virgulatus* de los que 325 corresponden a El Califín, de éstos 112 fueron indiferenciados, en Balandra se recolectaron 215 y solo 17 fueron indiferenciados. Una prueba de χ^2 demostró que no existe diferencia significativa de 1:1 en la proporción de sexos en el total de las muestras para ambas localidades. Sin embargo, en Balandra, al analizar la proporción de sexos para cada uno de los meses se encontraron diferencias significativas en marzo de 2010 y febrero de 2011 (4.5H:1M y 10H:1M), con una mayor proporción de hembras. En junio y agosto (0.23H:1M y 0.28H:1M, respectivamente), se encontró una mayor proporción de machos (Tabla 1, Fig. 2).

Tabla 1: Número de hembras (H), machos (M) y organismos indiferenciados (I), de *Chiton virgulatus*. Valor de χ^2 , valor de probabilidad asociado (P); en rojo, los valores de χ^2 significativamente diferentes de la proporción esperada.

El Califín 2008-2009						Balandra 2010-2011					
mes	H	M	I	χ^2	p	mes	H	M	I	χ^2	p
septiembre	13	7	5	1.8	0.179	febrero	6	7	1	0.07	0.781
octubre	11	6	8	1.47	0.225	marzo	9	2	3	4.45	0.034
noviembre	9	5	11	1.14	0.285	abril	5	11	1	2.25	0.133
diciembre	1	5	19	2.66	0.102	mayo	9	10	0	0.05	0.818
enero	1	0	24	1	0.317	junio	3	13	0	6.25	0.012
febrero	1	0	24	1	0.317	julio	6	11	0	1.47	0.225
marzo	4	7	14	0.81	0.363	agosto	4	14	0	5.55	0.018
abril	10	14	1	0.66	0.414	septiembre	7	9	0	0.25	0.617
mayo	8	16	1	2.66	0.102	octubre	3	9	0	3	0.083
junio	11	12	1	0.04	0.834	noviembre	13	6	0	2.57	0.108
julio	9	15	0	1.5	0.220	diciembre	6	11	1	1.470	0.225
agosto	7	16	2	3.52	0.060	enero	6	7	5	0.07	0.781
septiembre	11	14	0	0.36	0.548	febrero	10	1	6	7.36	0.006
total	96	117	110	2.07	0.150	total	87	111	17	2.90	0.088

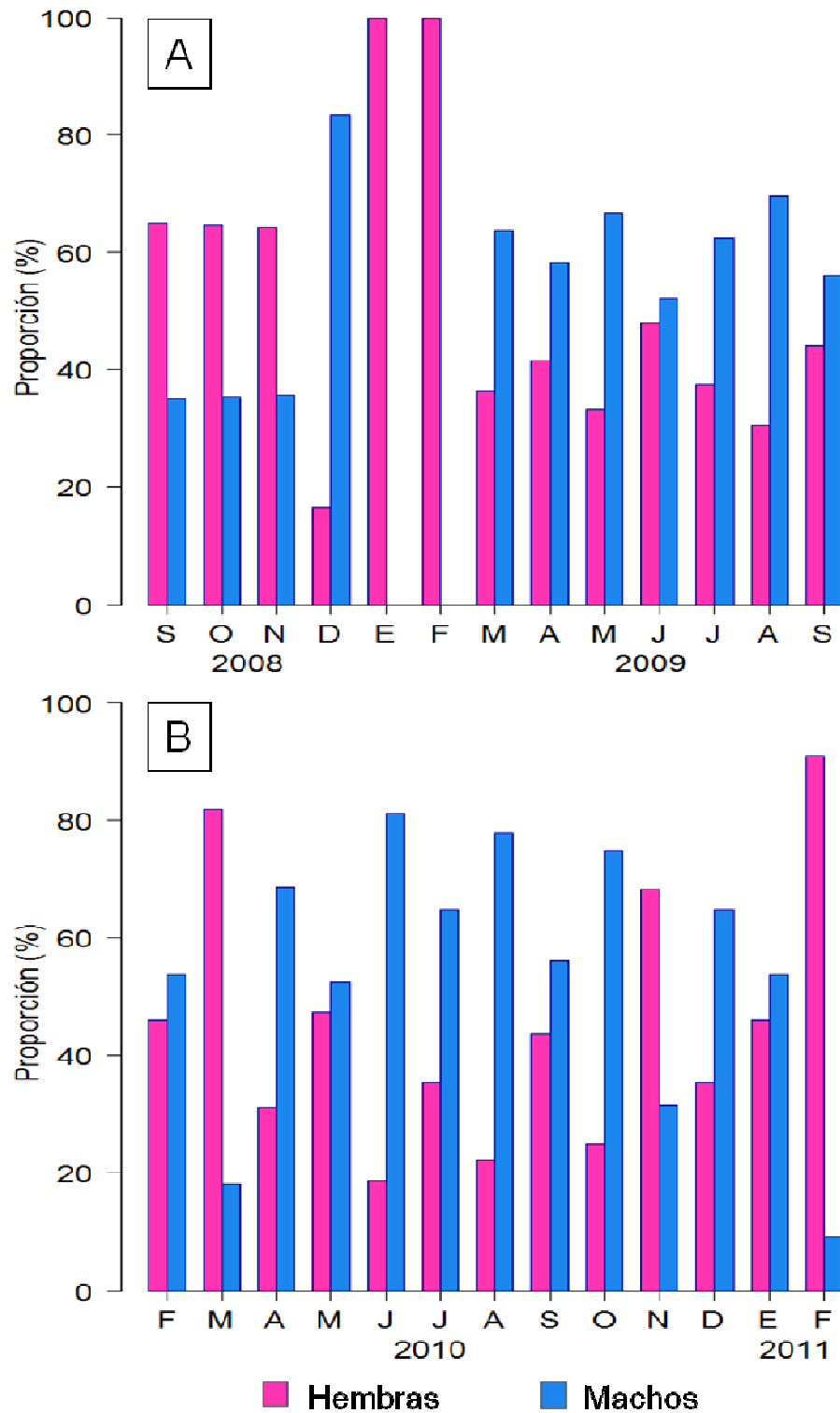


Figura 2. Proporción de sexos de *Chiton virgulatus*. A) El Califín, B) Balandra.

Anatomía macroscópica de la gónada

La gónada de *C. virgulatus* es cilíndrica, de color verde a café en el caso de las hembras, en tanto que en los machos es de color crema a rosa, las diferentes tonalidades dependen del grado de madurez (Fig. 3).

Histológicamente la gónada de ambos sexos se encuentra rodeada de tejido conjuntivo, que forma invaginaciones proyectadas hacia el centro de la gónada (cordones medulares), éste muestra un arreglo radial a la misma, a partir de este tejido conjuntivo, se forma el tejido germinal en donde crecen las células germinales, que al desarrollarse se desprenden y los gametos se acumulan en el centro de la gónada.

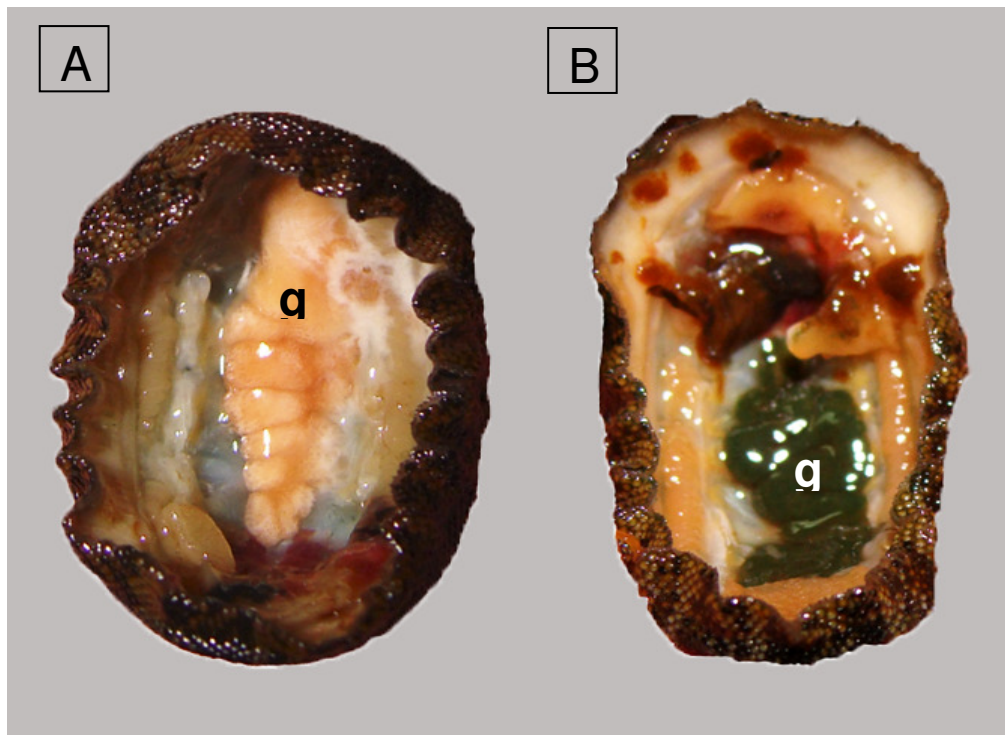


Figura 3. Gónada de *Chiton virgulatus*, A) macho. B) hembra. Gónada (g).

Morfología y ultraestructura de los gametos

Hembras

La ovogénesis en *C. virgulatus* comienza en el tejido germinal adyacente a las invaginaciones de tejido conjuntivo que se proyectan hacia el centro de la gónada.

Mediante divisiones meióticas que sufren las células diploides ($2n$) que se encuentran asentadas en el tejido conjuntivo, se forman los ovocitos previtelogénicos y vitelogénicos. En este trabajo se describen de acuerdo a su morfología y ultraestructura tres tipos de ovocitos: ovocitos previtelogénicos (Figs. 4, 5 y 6), ovocitos vitelogénicos inmaduros (Figs. 7, 8 y 9) y ovocitos vitelogénicos maduros (Figs. 10, 11 y 12).

Ovocitos previtelogénicos: Se caracterizan por presentar un diámetro entre 19 y 140 μm , un promedio de $50 \pm 20.45 \mu\text{m}$, son basófilos, al interior del citoplasma contienen una gran cantidad de vacuolas, que enmascaran los organelos y se observan mitocondrias formando pequeños grupos (Fig. 5). Los ovocitos previtelogénicos se encuentran rodeados por células foliculares que presentan forma alargada y un tamaño de aproximadamente 5 μm (Fig. 6), presentan un núcleo aplanado y abundante retículo endoplásmico liso.

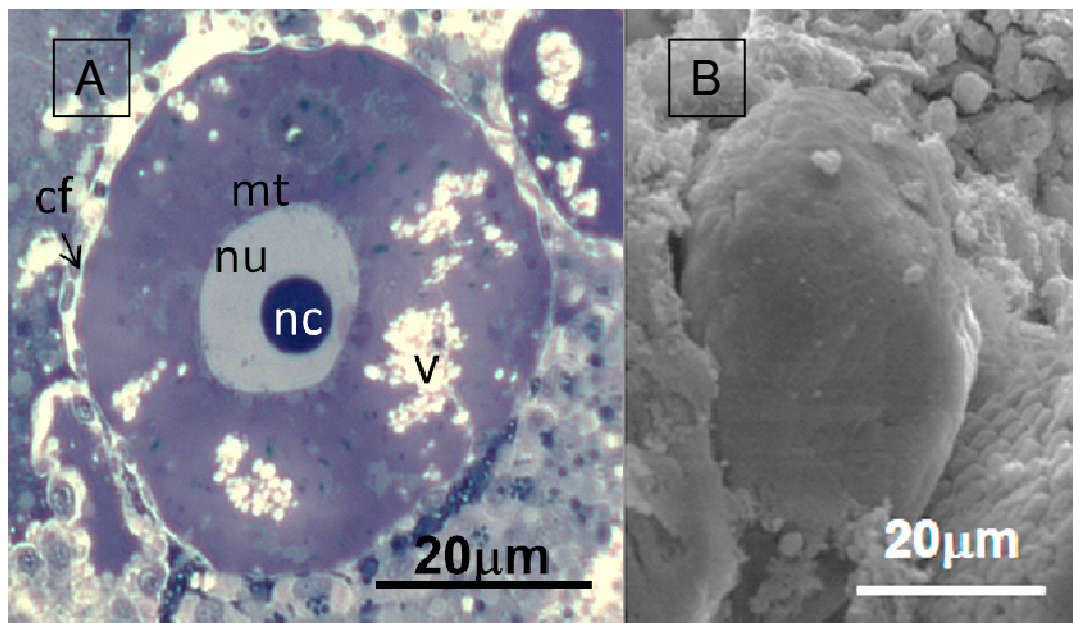


Figura 4. Ovocito previtelogénico de *Chiton virgulatus*. En A) se observa teñido con azul de toluidina, (nu) núcleo, (nc) nucléolo, (v) vacuola, (mt) mitocondria, (cf) célula folicular. B) morfología del ovocito previtelogénico observado con microscopía electrónica de barrido.

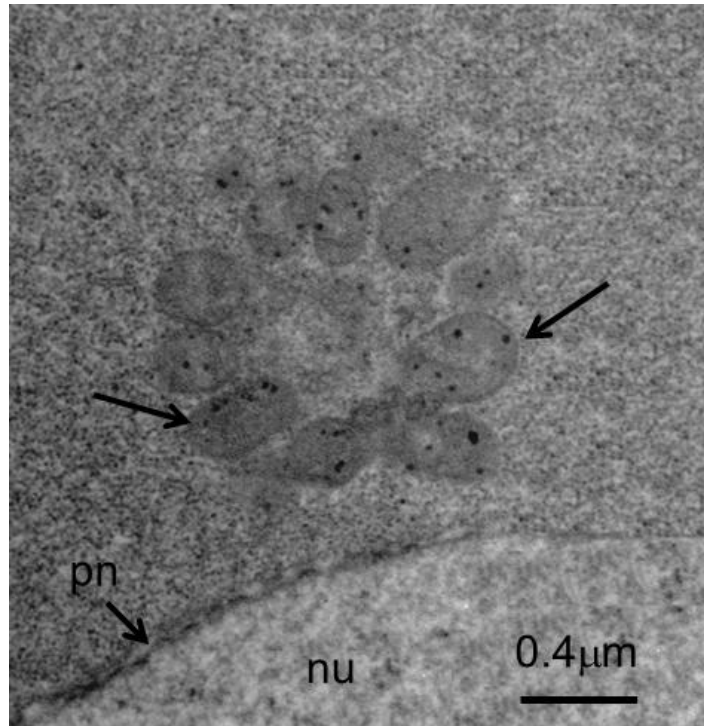


Figura 5. Ovocito previtelogénico de *Chiton virgulatus*. Grupo de mitocondrias (flechas) en el citoplasma del ovocito, (nu) núcleo, (pn) poro nuclear. Microscopía electrónica de transmisión.

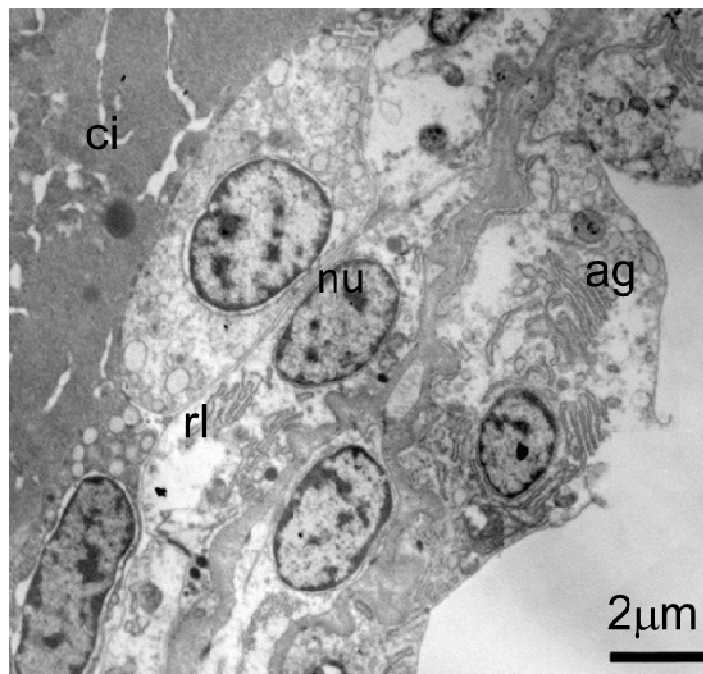


Figura 6. Células foliculares de *Chiton virgulatus*, (nu) núcleo, (rl) retículo endoplásmico liso, (ag) aparato de Golgi, (ci) citoplasma del ovocito. Microscopía electrónica de transmisión.

Los ovocitos vitelogénicos inmaduros (Fig. 7). Son de tipo acidófilo, el diámetro de éstos es de 74 a 160 μm , el promedio es de $113 \pm 15.3 \mu\text{m}$, se caracterizan por presentar pequeñas prolongaciones citoplasmáticas, conformadas por una serie de filamentos tubulares, que indican el desarrollo del casco del ovocito, al ir creciendo éstas prolongaciones, deforman a las células foliculares las cuales adquieren la forma de la prolongación. También se pueden distinguir las tres capas que constituyen la prolongación (capa interior, media y exterior), mientras que en la zona basal donde crece la prolongación citoplasmática se observan microvellocidades, asimismo adyacentes a cada prolongación se presentan poros, (Fig. 8). Las vacuolas citoplasmáticas disminuyen en cantidad con respecto al ovocito previtelogénico, dado que se comienzan a desarrollar plaquetas vitelinas de diferentes formas y tamaños, dependiendo del grado de madurez del ovocito (Figs. 9 y 10).

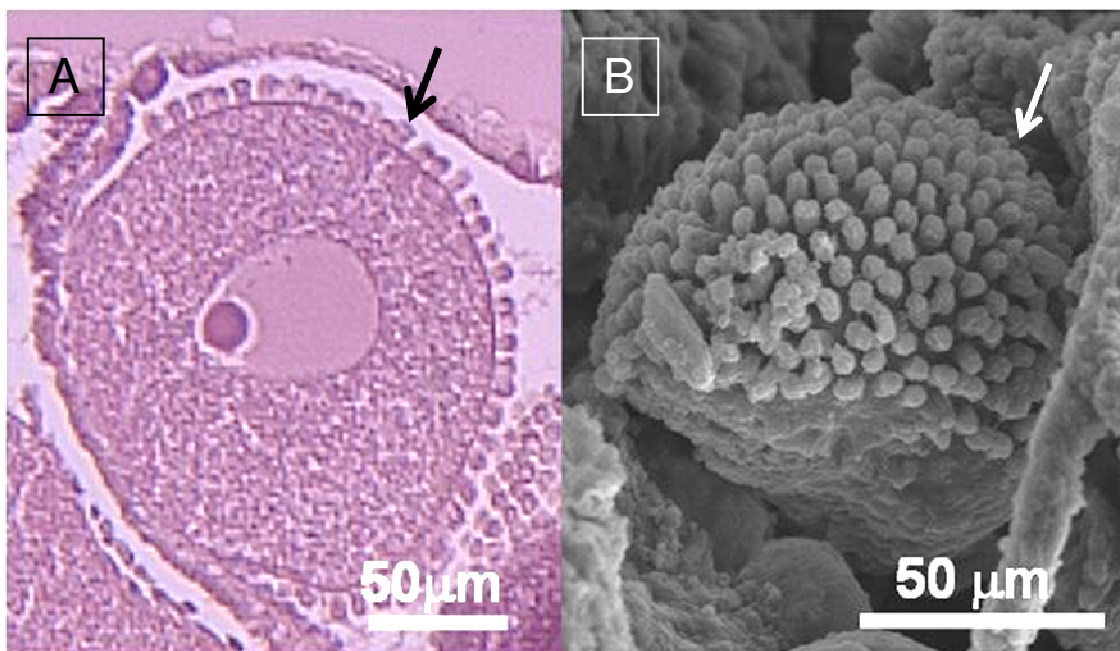


Figura 7. Ovocitos vitelogénicos inmaduros de *Chiton virgulatus*. En A) se tiñeron con hematoxilina-eosina. B) Las mismas muestras se procesaron para microscopía electrónica de barrido. En ambas figuras se observan las prolongaciones del casco del ovocito (flechas).

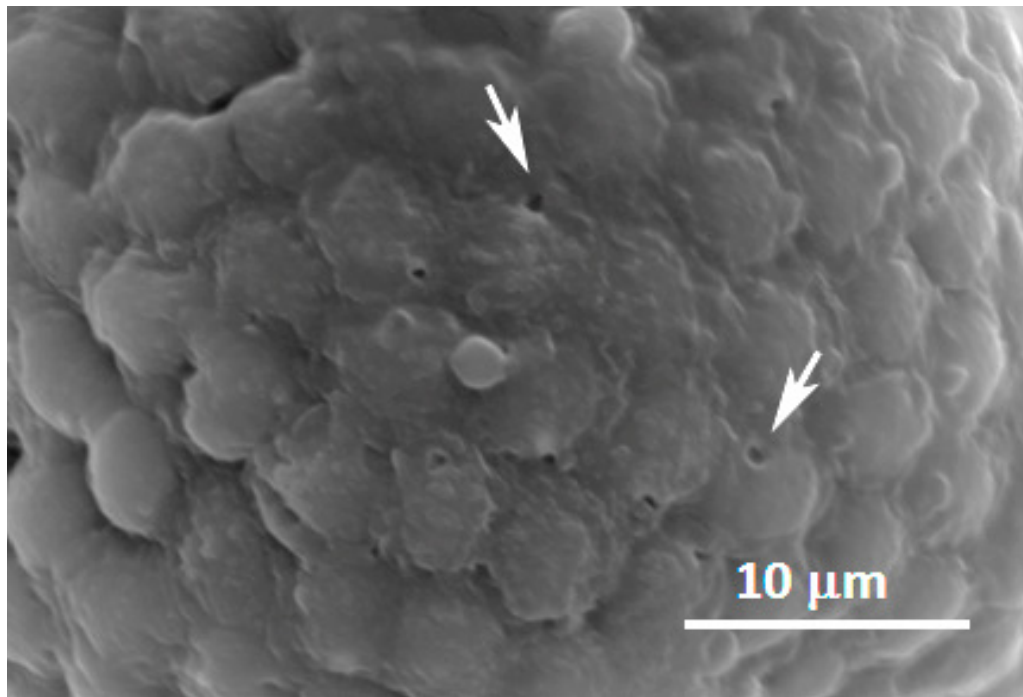


Figura 8. Ovocito vitelogénico inmaduro de *Chiton virgulatus*. Se observan los poros en la base de las prolongaciones (flechas). Microscopía electrónica de barrido.

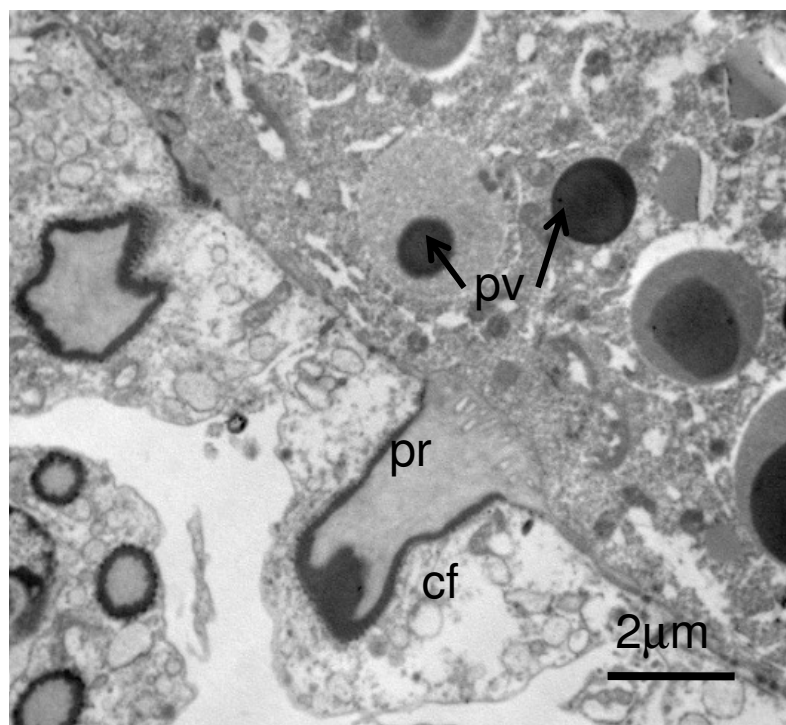


Figura 9. Ovocito vitelogénico inmaduro de *Chiton virgulatus*. Se observa la prolongación del casco del ovocito (pr), célula folicular (cf), plaquetas vitelinas (pv). Microscopía electrónica de transmisión.

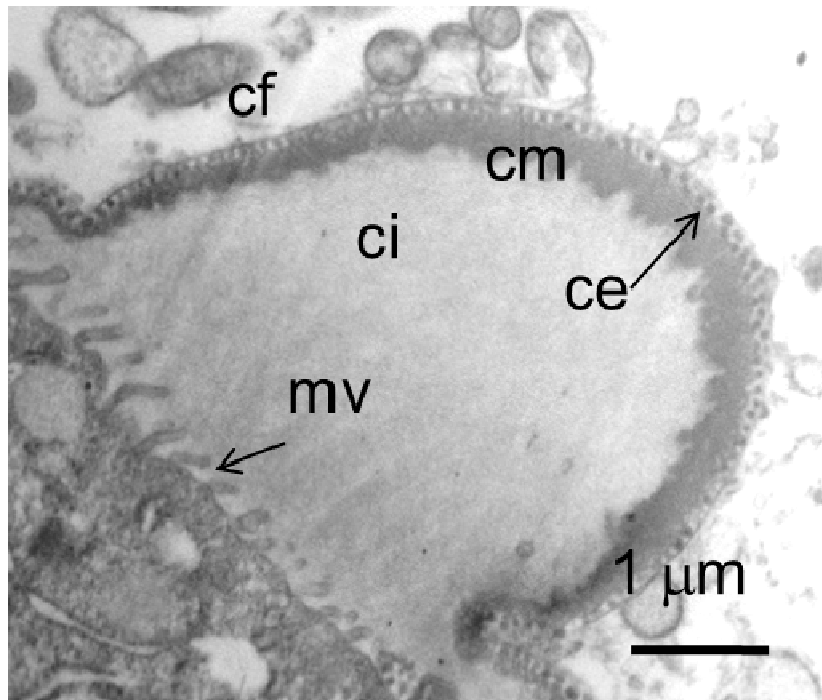


Figura 10. Prolongación del casco del ovocito. Célula folicular (cf), capa interna (ci), capa media (cm), capa externa (ce), microvellosidades (mv). Microscopía electrónica de transmisión.

Ovocitos vitelogénicos maduros: Alcanzan un diámetro de entre 100 y 301 μm , con un promedio de $146 \pm 24.8 \mu\text{m}$. Son sumamente acidófilos, el citoplasma está compuesto en su mayoría por plaquetas vitelinas que enmascaran los organelos, solo se observan algunas mitocondrias con un diámetro promedio de 0.5 μm , las prolongaciones citoplasmáticas del casco del ovocito crecen y su parte apical toma la forma de un tridente. Asimismo, las células foliculares, dado el crecimiento de la prolongación toman el aspecto de cuchara y llegan a medir hasta 20 μm de longitud (Figs. 11, 12 y 13).

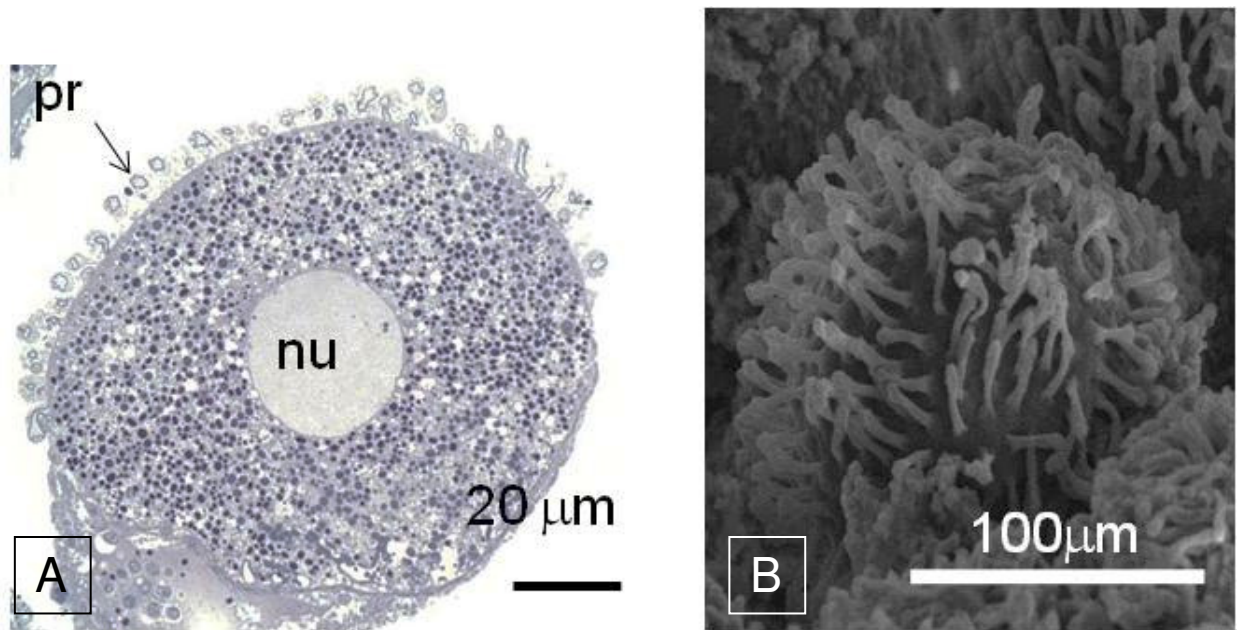


Figura 11. Ovocitos vitelogénicos maduros de *Chiton virgulatus*, En A) se observa un corte teñido con azul de toluidina, (nu) núcleo, (pr) prolongaciones del casco del ovocito. B). Morfología del ovocito. Microscopía electrónica de barrido.

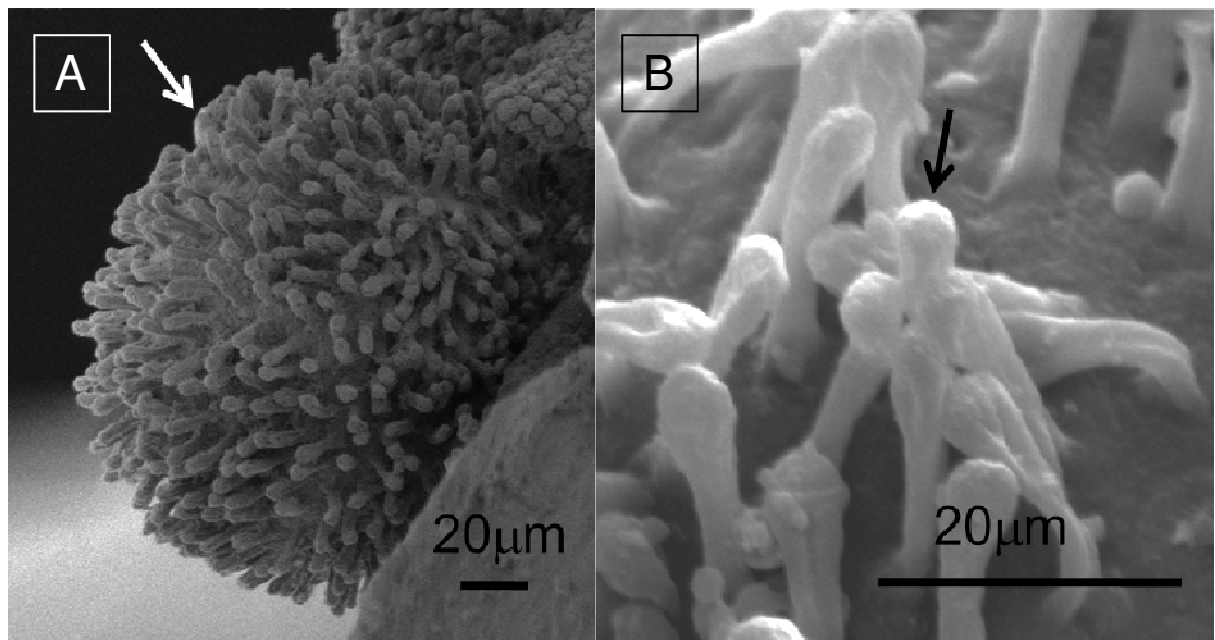


Figura 12. En A) se observa la morfología de un ovocito vitelogénico maduro de *Chiton virgulatus*. En B) se visualizan las prolongaciones del casco del ovocito (flecha). Microscopía electrónica de barrido.

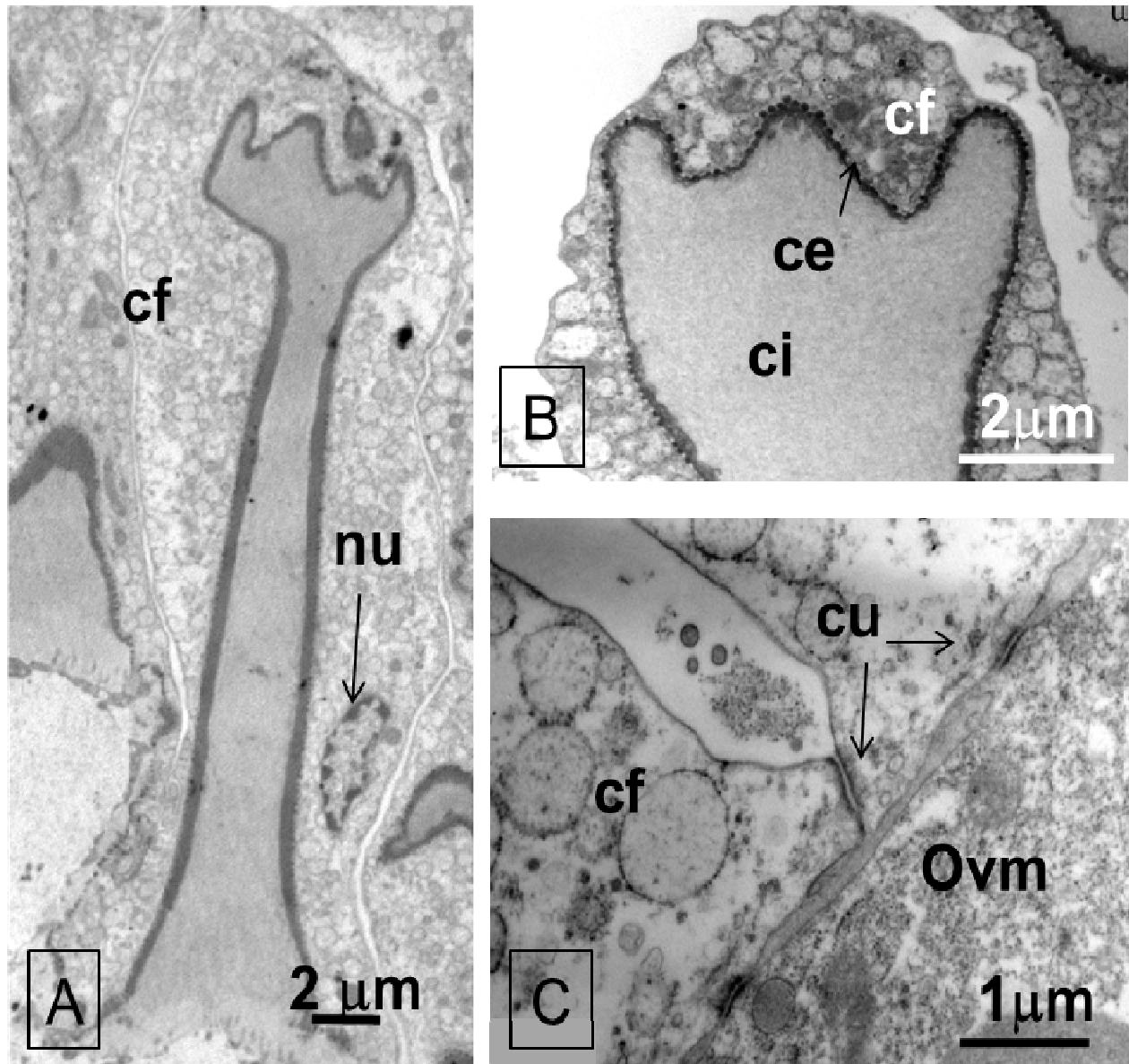


Figura 13. A) Prolongación del casco del ovocito vitelogénico maduro de *Chiton virgulatus* se observa el núcleo de la célula folicular (nu). B) parte apical de la prolongación del casco del ovocito se observa la capa interna (ci) y capa externa, C) Parte basal de la prolongación del casco del ovocito. Microscopía electrónica de transmisión.

Machos

Las células gametogénicas en los machos de *C. virgulatus* producen de forma continua a partir del tejido germinal adyacente a las invaginaciones del tejido conjuntivo proyectadas hacia el centro de la gónada, a partir de una célula diploide

(2n), llamada espermatogonia, se originan los espermatocitos primarios que experimentan la primera división meiótica que da origen a los espermatocitos secundarios, los que por medio de la segunda división meiótica originan espermatídas haploides (n), que aun no son capaces de funcionar como gametos masculinos. Tienen que pasar por un proceso de diferenciación para convertirse en espermatozoides. En este trabajo se describen cinco tipos celulares espermáticos (espermatogonias, espermatocitos primarios y secundarios, espermatídas y espermatozoides).

Espermatogonias: Tienen un área de $32.41 \pm 4.04 \mu\text{m}^2$ presentan un núcleo grande y esférico en posición central con la presencia de gránulos de heterocromatina dispersos en el nucleoplasma, las mitocondrias son abundantes y su tamaño es de aproximadamente $0.22 \pm 0.059 \mu\text{m}^2$ (Fig. 14).

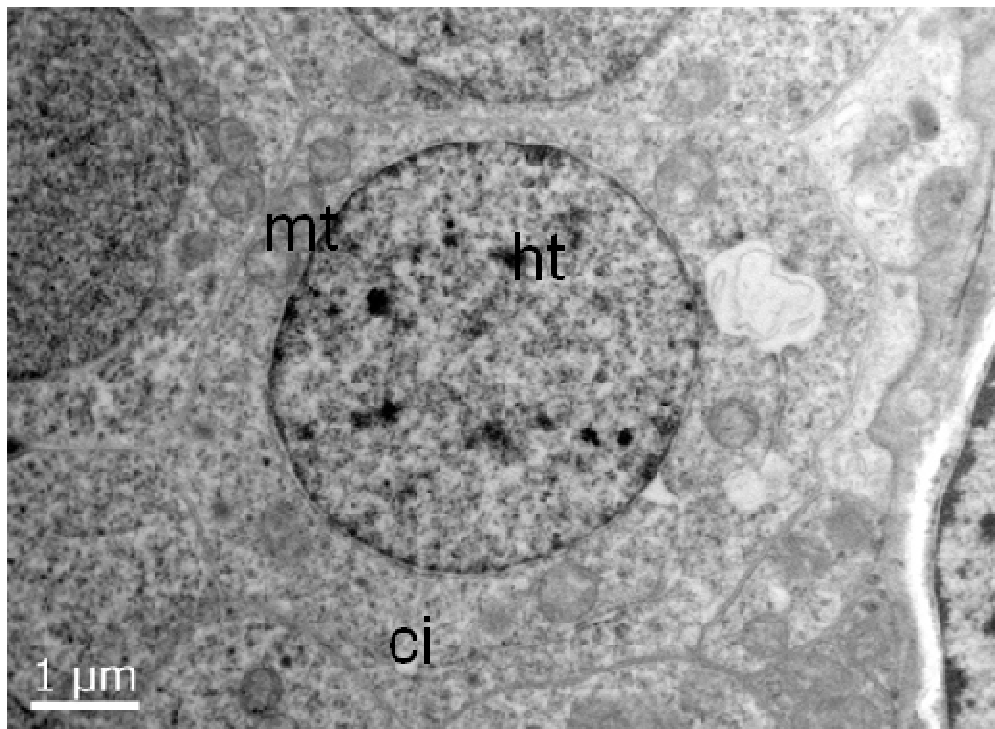


Figura 14. Espermatogonia de *Chiton virgulatus*, (mt) mitocondria, (ht) heterocromatina, (ci) citoplasma. Microscopía electrónica de transmisión.

Espermatocitos primarios: Presentan un área de $11.31 \pm 7.5 \mu\text{m}^2$, la heterocromatina se observa más condensada, las mitocondrias disminuyen en número pero aumentan en tamaño ($0.24 \pm 0.133 \mu\text{m}^2$), con respecto a las de las espermatogonias (Fig.15).

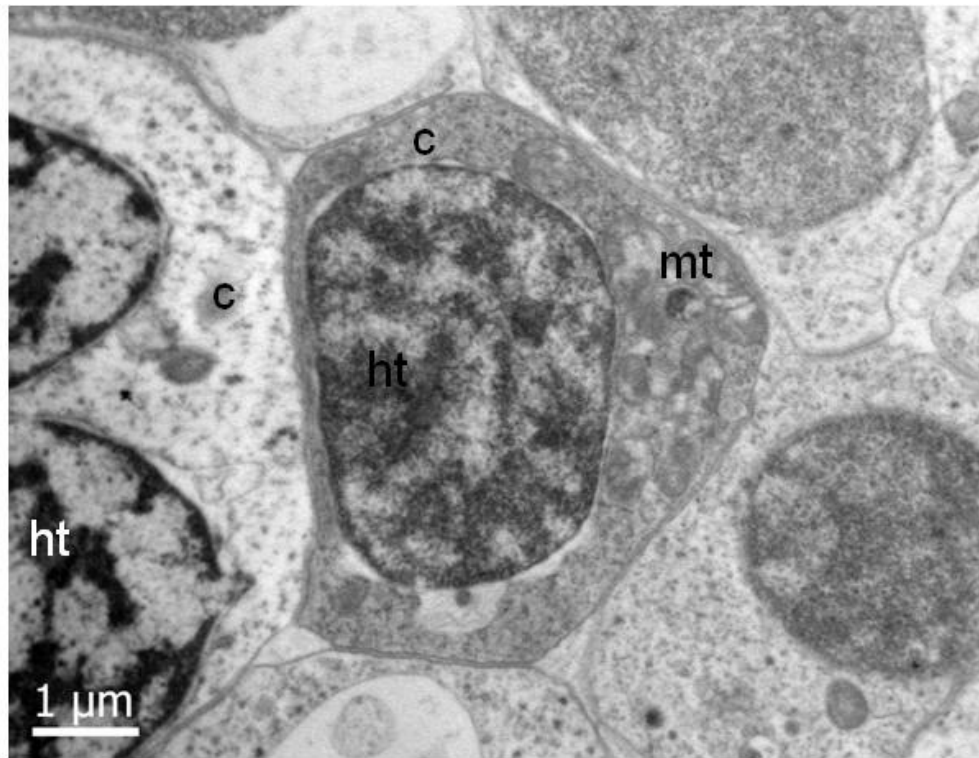


Figura 15. Espermatocito primario de *Chiton virgulatus*, (mt) mitocondria, (ht) heterocromatina, (c) citoplasma. Microscopía electrónica de transmisión.

Espermatocitos secundarios. Tienen un área de $4.14 \pm 1.6 \mu\text{m}^2$, presentan la heterocromatina aun más condensada desde la periferia nuclear hasta el centro del núcleo, la cantidad de citoplasma disminuye con respecto a los otros tipos celulares, las mitocondrias comienzan a migrar hacia el polo basal y presentan mayor tamaño ($0.33 \pm 0.13 \mu\text{m}^2$) (Fig.16).

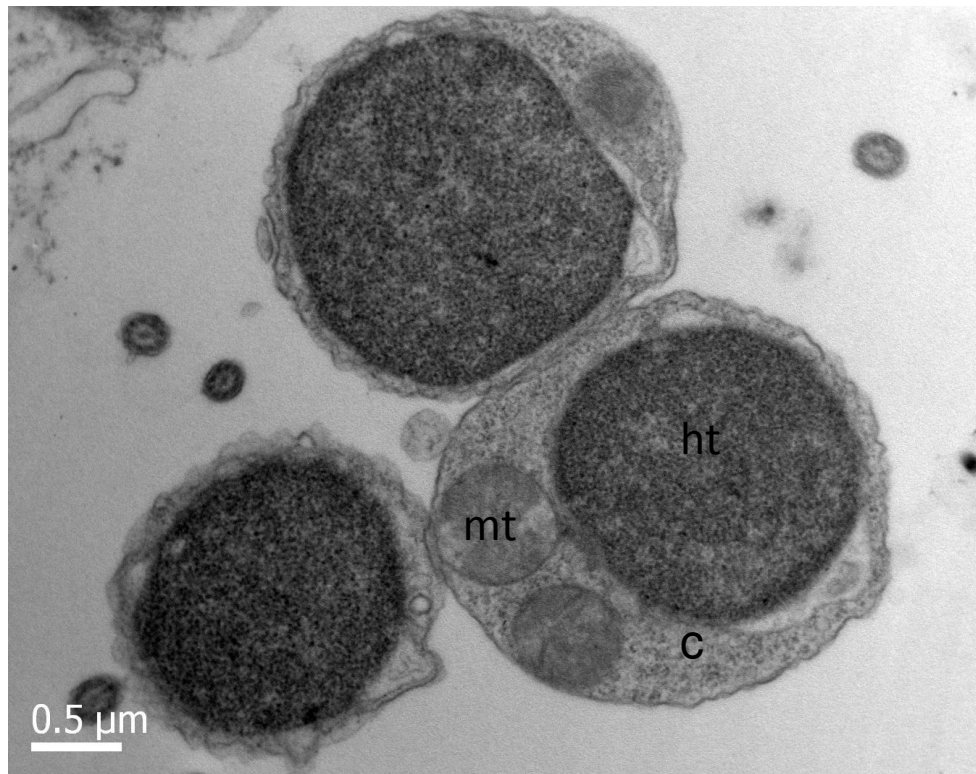


Figura 16. Espermatocitos secundarios de *Chiton virgulatus*, (ht) heterocromatina, (c) citoplasma, (mt) mitocondria. Microscopía electrónica de transmisión.

Espermátidas: El núcleo comienza a alargarse alcanza una longitud de $5.7 \pm 2.5 \mu\text{m}$ que cubre un área de $3.15 \pm 1.07 \mu\text{m}^2$, la cromatina está completamente condensada, las mitocondrias incrementan su tamaño ($0.45 \pm 0.04 \mu\text{m}^2$) y se encuentran dispuestas en el polo basal (Fig. 17).

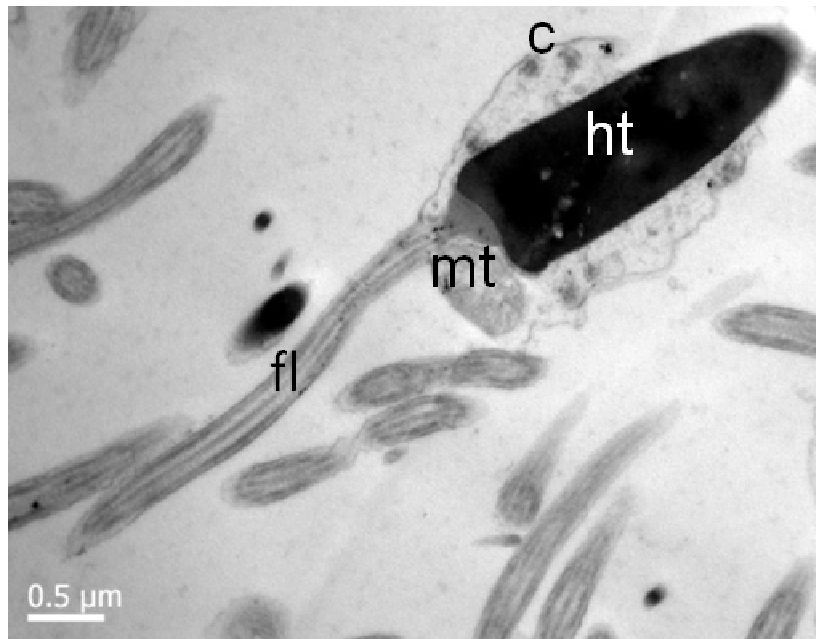


Figura 17. Espermatida de *Chiton virgulatus* (mt) mitocondria, (ht) heterocromatina, (c) citoplasma, (fl) flagelo. Microscopía electrónica de transmisión.

Espermatozoides: Presentan un núcleo ovoide que mide hasta 6 μm , y termina en un filamento anterior, el acrosoma se encuentra reducido en la parte final del filamento (Figs. 18, y 19). En la parte basal del espermatozoide se observa un centriolo, en el cuello, éste presenta tres mitocondrias de forma esférica de gran tamaño, y el flagelo con la disposición habitual (9+2) (Fig. 20).

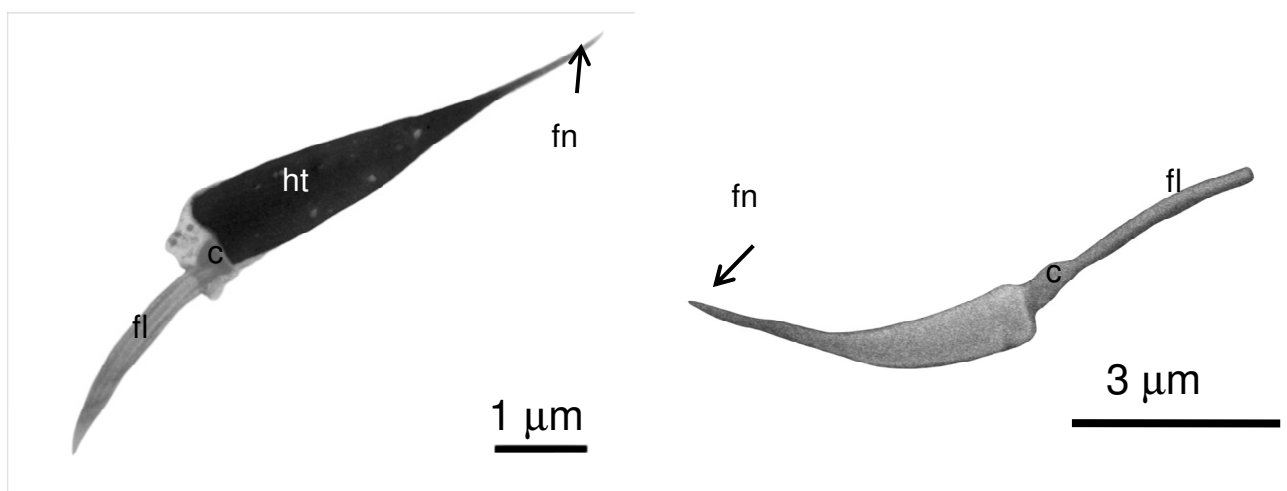


Figura 18. Espermatozoide de *Chiton virgulatus*, centriolo (c), flagelo (fl), heterocromatina (ht), filamento nuclear (fn). A) Microscopía electrónica de transmisión, B) Microscopía electrónica de barrido.



Figura 19. Filamento nuclear (fn) del espermatozoide de *Chiton virgulatus*, acrosoma (ac). Microscopía electrónica de transmisión.

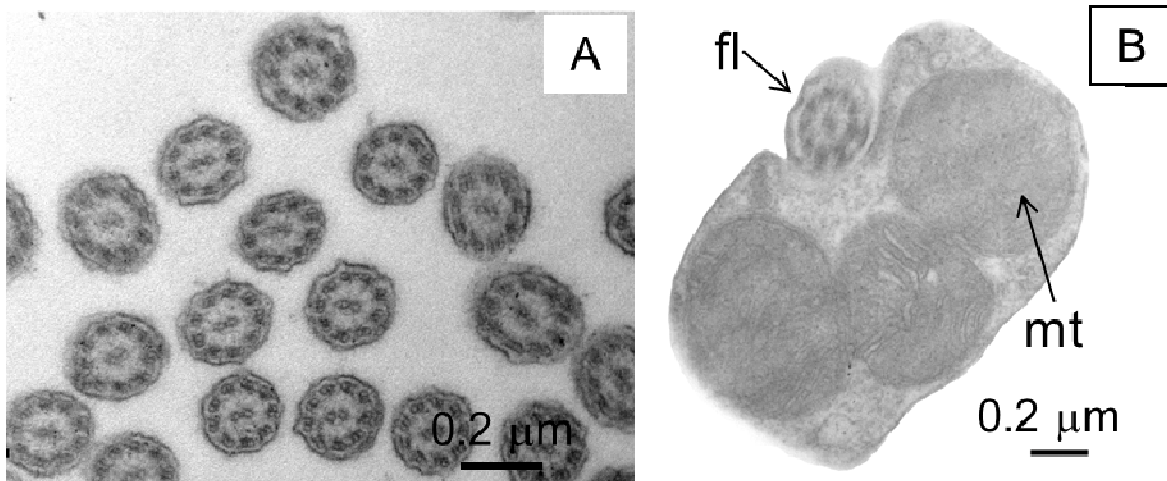


Figura 20. A) Corte transversal de flagelos de *Chiton virgulatus*. B) Mayor aumento del espermatozoide, mitocondrias (mt), flagelo (fl). Microscopía electrónica de transmisión.

Descripción de las fases del ciclo gonádico de acuerdo a la presencia y abundancia de las células gametogénicas. Se describen las siguientes fases del ciclo gonádico: Indiferenciación, desarrollo, madurez y desove (Tabla 2).

Tabla 2: Descripción de los estadios del ciclo gonádico de *Chiton virgulatus*.

Fases	Macho	Hembras
Indiferenciación	En esta etapa no se observan células sexuales, únicamente se observa tejido conjuntivo (Fig. 21).	
Desarrollo	Se caracteriza por presentar un gran número de espermatogónias, espermatocitos y espermatidas creciendo sobre cordones medulares hacia el lumen de la gónada, donde se encuentran algunos espermatozoides (Fig. 22A).	Predominan los ovocitos previtelogénicos y algunos ovocitos vitelogénicos inmaduros, entre estos, la gónada presenta espacios (Fig. 22B).
Madurez	La cantidad de espermatocitos y espermatogonias sobre los cordones medulares a disminuido, y se observa una gran cantidad de espermatozoides (Fig. 23A).	Se caracterizan por la dominancia de ovocitos vitelogénicos maduros, la disminución de ovocitos previtelogénicos y vitelogénicos inmaduros, desaparecen los espacios interovocitarios debido al crecimiento de los ovocitos (Fig. 23B).
Desove	Se observan espacios entre el tejido gonádico y algunos espermatozoides libres sobre el tejido gonádico (Fig. 24A).	En las hembras se observan grandes espacios vacíos entre los ovocitos vitelogénicos y se observan las trabéculas de tejido conjuntivo desordenadas (Fig. 24B).

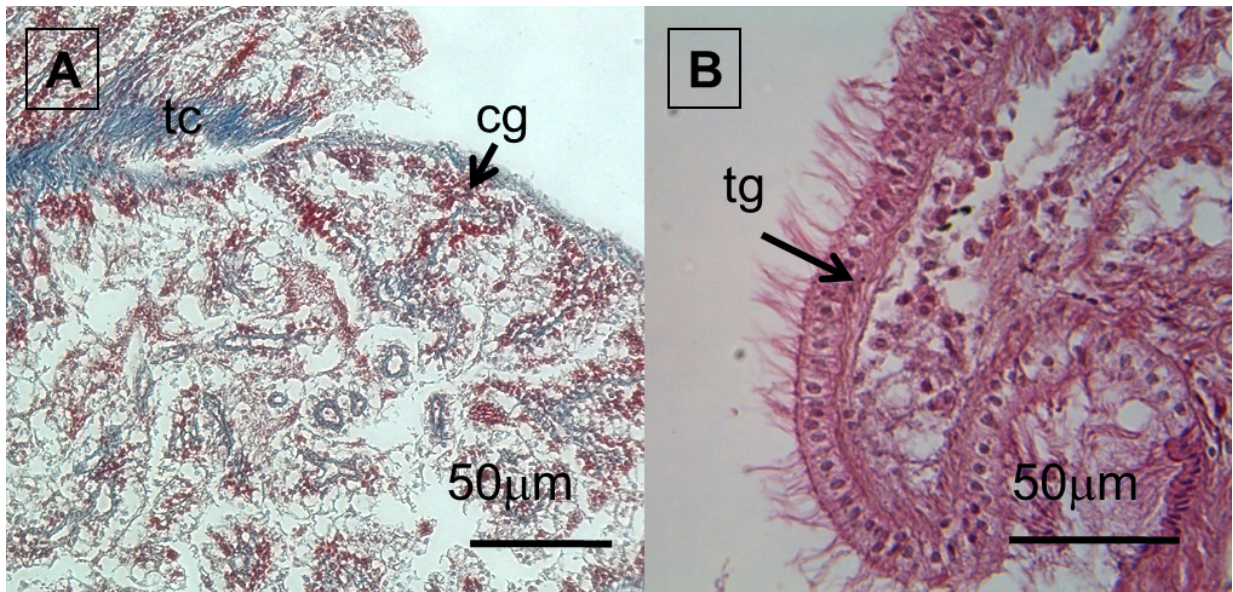


Figura 21. Gónada de *Chiton virgulatus* en etapa indiferenciada. Tejido conjuntivo (tc), células germinales (cg), epitelio germinal (tg).A) técnica Tricrómica de Masson, 20X. B) técnica Hematoxilina-eosina, 40X.

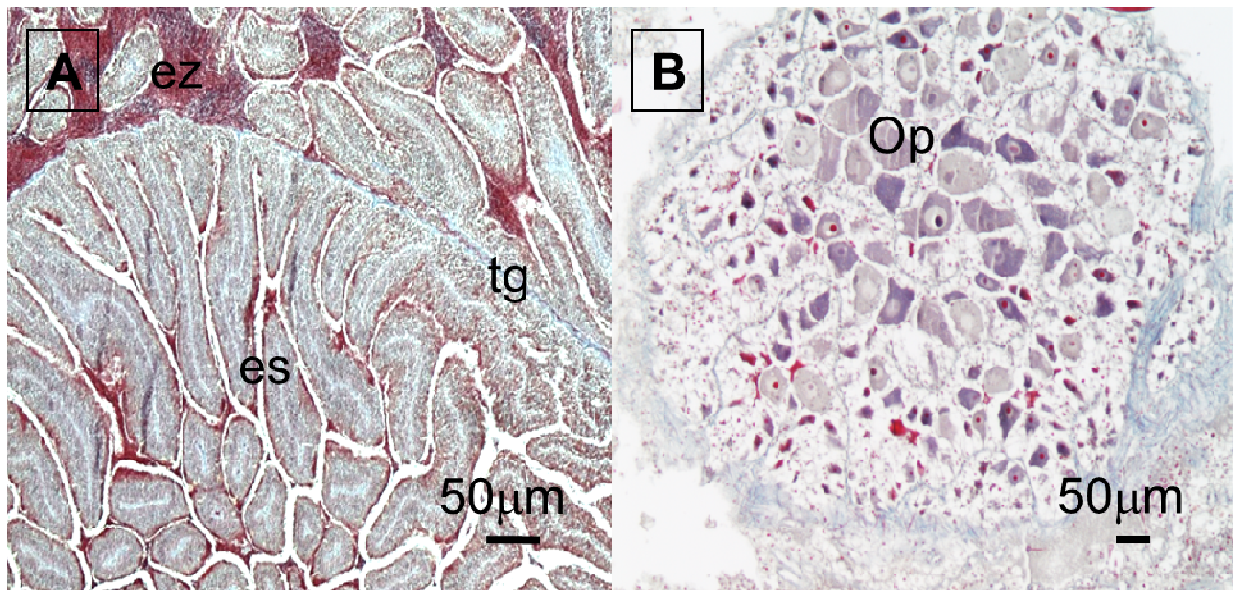


Figura 22. Gónada de *Chiton virgulatus* en etapa de desarrollo. A) macho teñido con la técnica Tricrómica de Masson. Espermatocitos (es), espermatozoides (ez), tejido germinal (tg), 20X. B) hembra teñida con la técnica Hematoxilina-eosina, ovocitos previtelogénicos (Op), 10X.

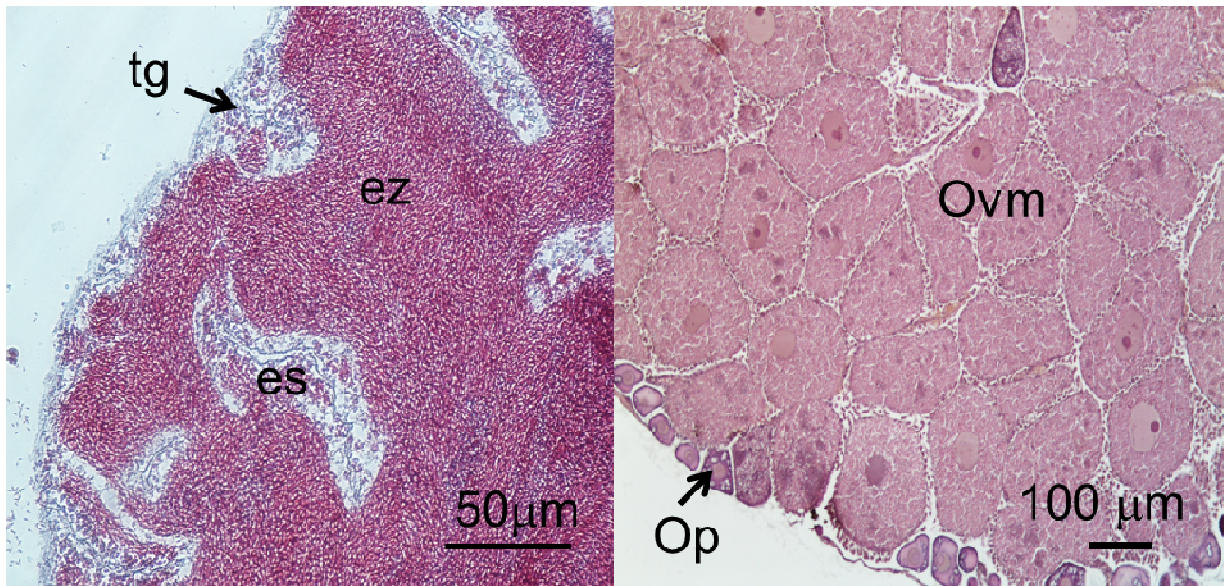


Figura 23. Gónada de *Chiton virgulatus* en etapa de madurez. A) macho teñido con la técnica Tricrómica de Masson. Tejido germinal (tg), espermatocitos (es), espermatozoides (ez), 20X. B) hembra teñida con la técnica Hematoxilina-eosina., Ovocitos vitelogénicos maduros (Ovm), ovocitos previtelogénicos (Opv), 10X.

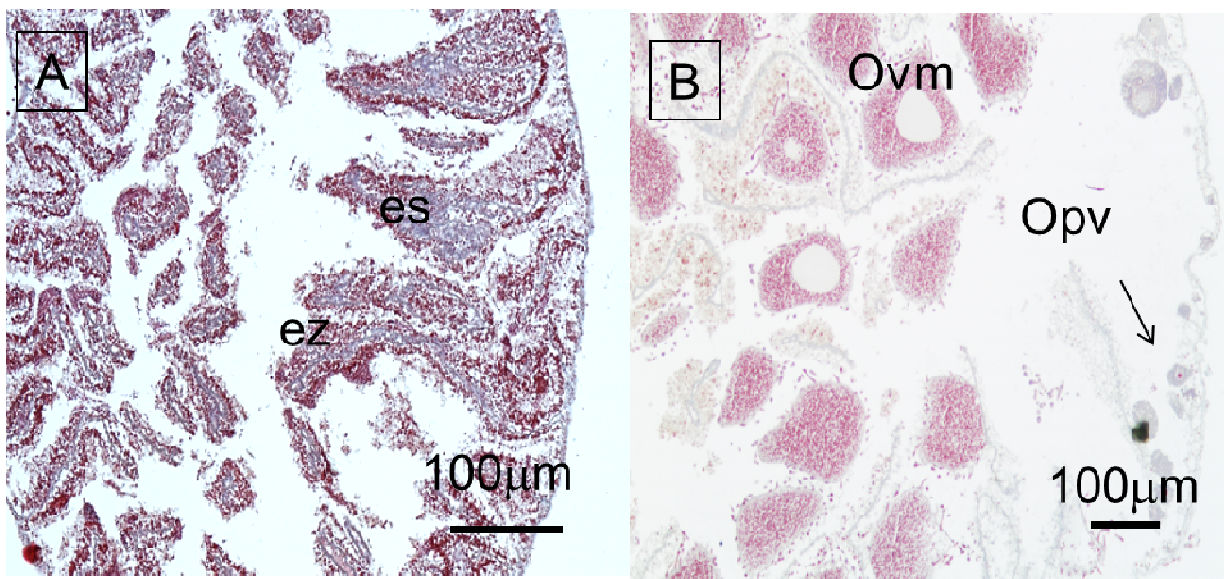


Figura 24 Gónada de *Chiton virgulatus* en etapa de desove, A) macho teñido con la técnica Tricrómica de Masson 10X, espermatocitos (es), espermatozoides (ez). B) hembra teñida con la técnica Tricrómica de Masson 10X, ovocitos vitelogénicos maduros (Ovm), ovocitos previtelogénicos (Opv), tejido conjuntivo (tc).

Ciclo reproductivo

En la figura 25, se muestra la frecuencia en que se presentaron las fases del ciclo reproductivo de *C. virgulatus* en el Calífin para cada uno de los meses, se encontraron una gran cantidad de organismos indiferenciados casi durante todo el año, con excepción de julio y septiembre de 2009. El mayor porcentaje se observó en enero y febrero (96%). La fase de desarrollo se presentó prácticamente durante todo el año, excepto en febrero de 2009, con un pico que ocurrió de abril (60%) a junio (87%), y el mayor porcentaje se presentó en mayo (96%). La fase de madurez se presentó principalmente en verano-otoño (septiembre y octubre de 2008 y de julio a septiembre de 2009), con mayor frecuencia (60%) en septiembre, octubre de 2008 y septiembre de 2009. La fase de desove también presentó un pico en verano-otoño (septiembre, 8% a diciembre, 20%) de 2008 y de julio (17%) a septiembre (8%) de 2009, el mayor porcentaje se presentó en diciembre (20%).

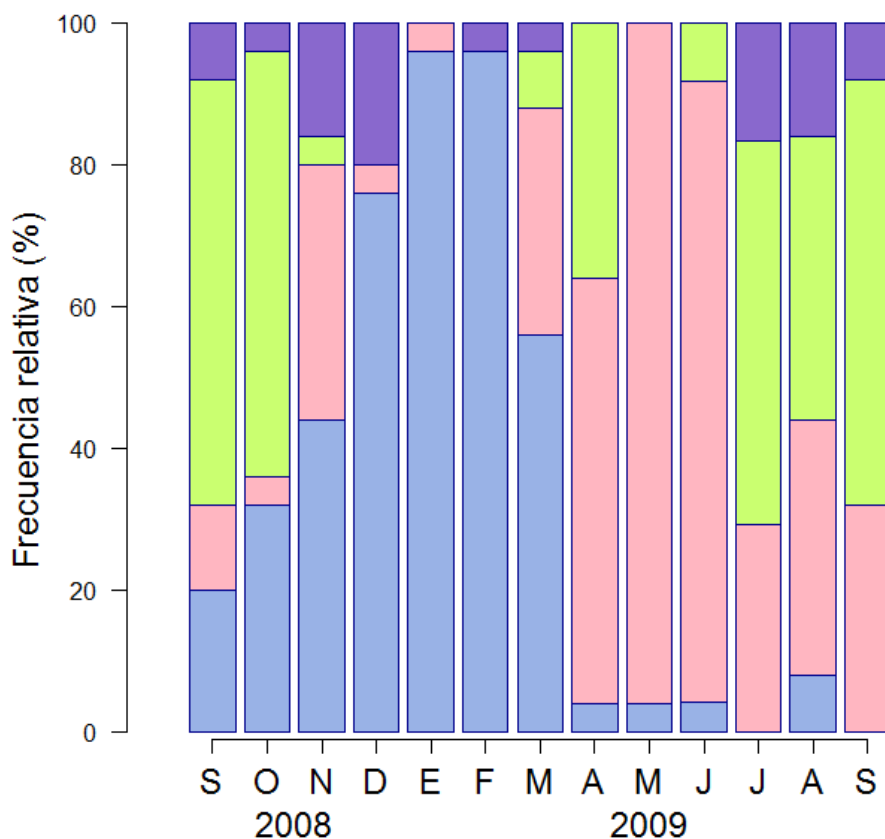


Figura 25. Frecuencia de las fases de desarrollo gonádico de *Chiton virgulatus* en El Calífin. Indiferenciado ■, desarrollo ■, madurez ■, desove ■.

En lo que respecta a Balandra la fase de indiferenciación se presentó principalmente de febrero a abril de 2010 y de diciembre de 2010 a febrero de 2011, con una mayor frecuencia en febrero de 2011(35%) (Fig. 26). La fase de desarrollo se presentó de febrero a junio y de octubre a diciembre de 2010 y en febrero de 2011, con un mayor porcentaje en febrero de 2010 (78%) (Fig. 26). La fase de madurez se presentó prácticamente durante todo el año excepto en octubre de 2010, enero y febrero de 2011, con el mayor porcentaje en junio (68%) (Fig. 26). La fase de desove se presentó durante todo el año con un pico de julio a octubre con frecuencias que van del 75% al 93% (Fig. 26).

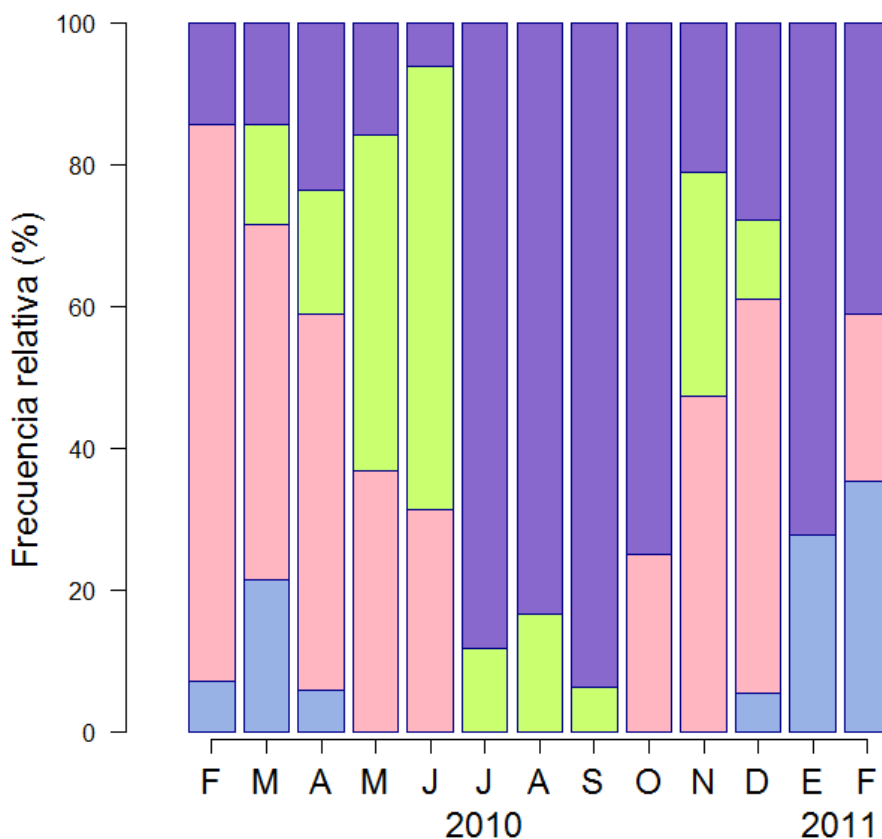


Figura 26. Frecuencia de las fases de desarrollo gonádico de *Chiton virgulatus*, en Balandra. Indiferenciado ■, desarrollo ■, madurez ■, desove ■.

Diámetro de los ovocitos

En ambas localidades el diámetro promedio mensual de los ovocitos reflejó la época reproductiva y presentó diferencias significativas entre los meses analizados (ANDEVA, $P < 0.05$).

En El Califín se encontró un diámetro significativamente más grande en septiembre (100 μm) y octubre (98 μm) de 2008 que disminuye progresivamente hasta diciembre de 2008, cuando se encontró el valor significativamente más bajo del ciclo (27 μm), a partir de este mes se mantuvo en valores bajos, pero aumenta gradualmente hasta marzo (51 μm), posteriormente ocurrió un aumento significativo en abril con un promedio de 81 μm y finalmente uno significativamente mayor en junio (107 μm), el valor más alto que presentaron fue en agosto (114 μm) y se mantuvo alto en septiembre (99 μm) (Fig. 27, Tabla 3).

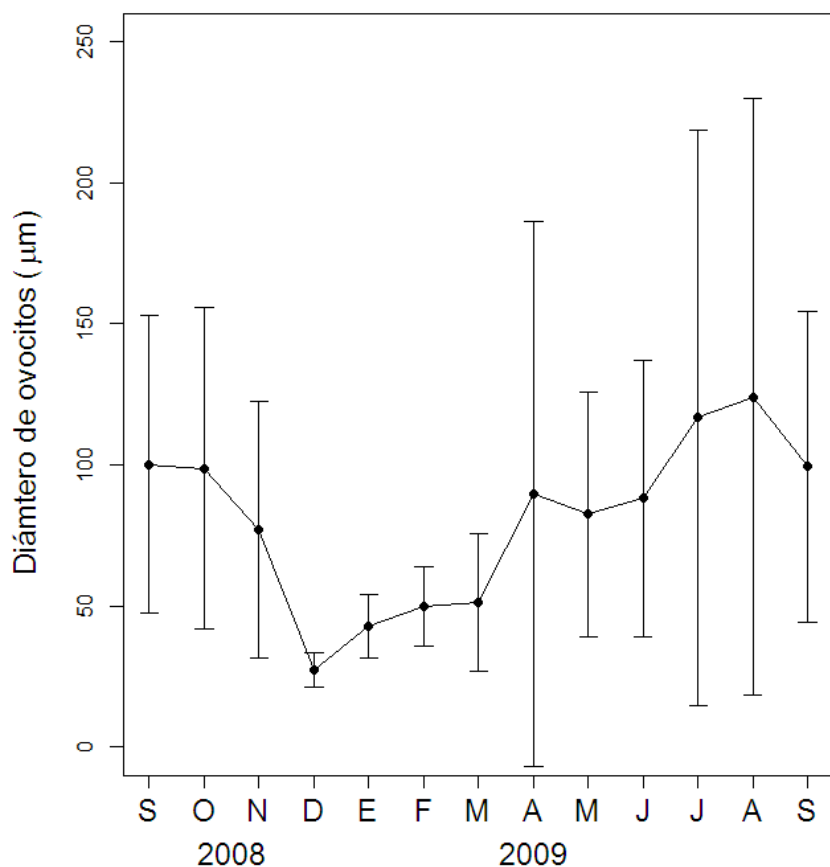


Figura 27. Variación del diámetro promedio mensual de los ovocitos de *Chiton virgulatus* en El Califín.

En Balandra, el diámetro promedio mensual de los ovocitos se mantuvo bajo desde febrero hasta mayo, de 58 μm a 80 μm , respectivamente, en junio ocurrió un aumento significativo (136 μm) y luego disminuyó significativamente en julio (108 μm) y permaneció hasta diciembre donde se observó una disminución significativa (77 μm), posteriormente aumentó de forma gradual hasta septiembre (90 μm) (Fig. 28C).

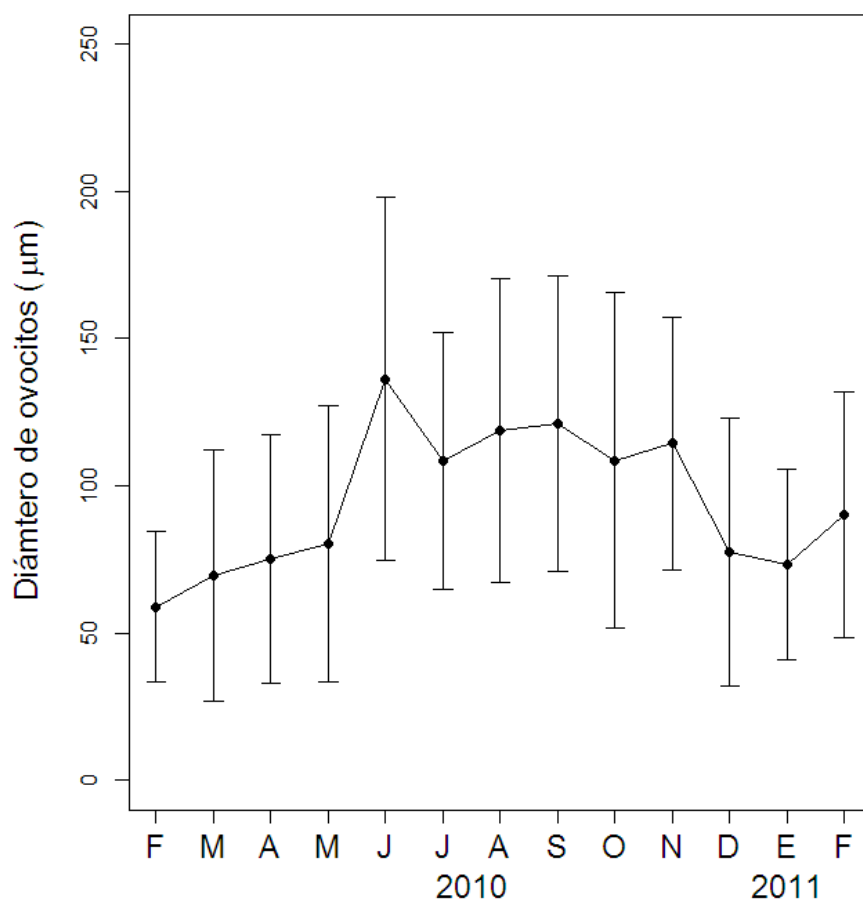


Figura 28. Variación del diámetro promedio mensual de los ovocitos de *Chiton virgulatus* en Balandra.

El análisis de varianza, demostró que no existe diferencia significativa en el tamaño promedio mensual de los ovocitos maduros entre localidades ($F = 3.583$, $P > 0.05$).

Tabla 3: Diámetro promedio mensual de los ovocitos (μm) y desviación estándar (DE) de *Chiton virgulatus*.

El Califín 2008-2009				Balandra 2010-2011			
	Mínimo	Máximo	media $\pm$ DE		Mínimo	Máximo	media $\pm$ DE
septiembre	20.61	200.22	100.18 $\pm$ 52	febrero	25.49	144.84	58.92 $\pm$ 25
octubre	19.07	211.73	98.71 $\pm$ 56	marzo	27.4	296.04	69.56 $\pm$ 42
noviembre	20	193.23	77.01 $\pm$ 45	abril	27.66	186.28	75.13 $\pm$ 42
diciembre	21.17	41.55	27.27 $\pm$ 6	mayo	23.87	306.12	80.12 $\pm$ 46
enero	29.87	66.21	42.67 $\pm$ 11	junio	41	226.95	136.26 $\pm$ 61
febrero	33.19	78.05	49.91 $\pm$ 14	julio	35.14	208.91	108.5 $\pm$ 43
marzo	24.65	162.63	51.2 $\pm$ 24	agosto	34.77	190.99	118.86 $\pm$ 51
abril	20.64	168.99	81.24 $\pm$ 41	septiembre	30.75	201.55	121.06 $\pm$ 50
mayo	20.64	192.41	82.45 $\pm$ 43	octubre	37.88	209.73	108.55 $\pm$ 56
junio	21.82	192.94	88.06 $\pm$ 49	noviembre	36.02	201.93	114.51 $\pm$ 42
julio	24.11	198.94	107.8 $\pm$ 51	diciembre	24.65	222.83	77.41 $\pm$ 45
agosto	23.1	194.35	114.41 $\pm$ 54	enero	32.52	194.36	73.42 $\pm$ 32
septiembre	19.67	200.81	99.38 $\pm$ 55	febrero	39.34	247.25	90.24 $\pm$ 41
promedio	22.96	161.69	78.48	promedio	32.03	224.41	97.80

Índice gonádico

Este índice solo se calculó para organismos de El Califín, se observaron diferencias significativas entre los meses analizados (ANDEVA, $P < 0.05$) (Fig. 29). En los meses de septiembre y octubre de 2008 se presentaron los valores más altos (30.52% y 30.75%, respectivamente), disminuyó significativamente en noviembre (14.4%) y permaneció con valores bajos hasta abril, donde tuvo un aumento significativo (19%). Posteriormente continuó aumentando progresivamente hasta llegar al valor más alto nuevamente en septiembre de 2009 (36.2%) (Fig. 29). El índice gonádico refleja la época reproductiva ya que los meses en que presentó los valores más altos (septiembre-octubre), también son los meses en los que se presentó el mayor número de desoves.

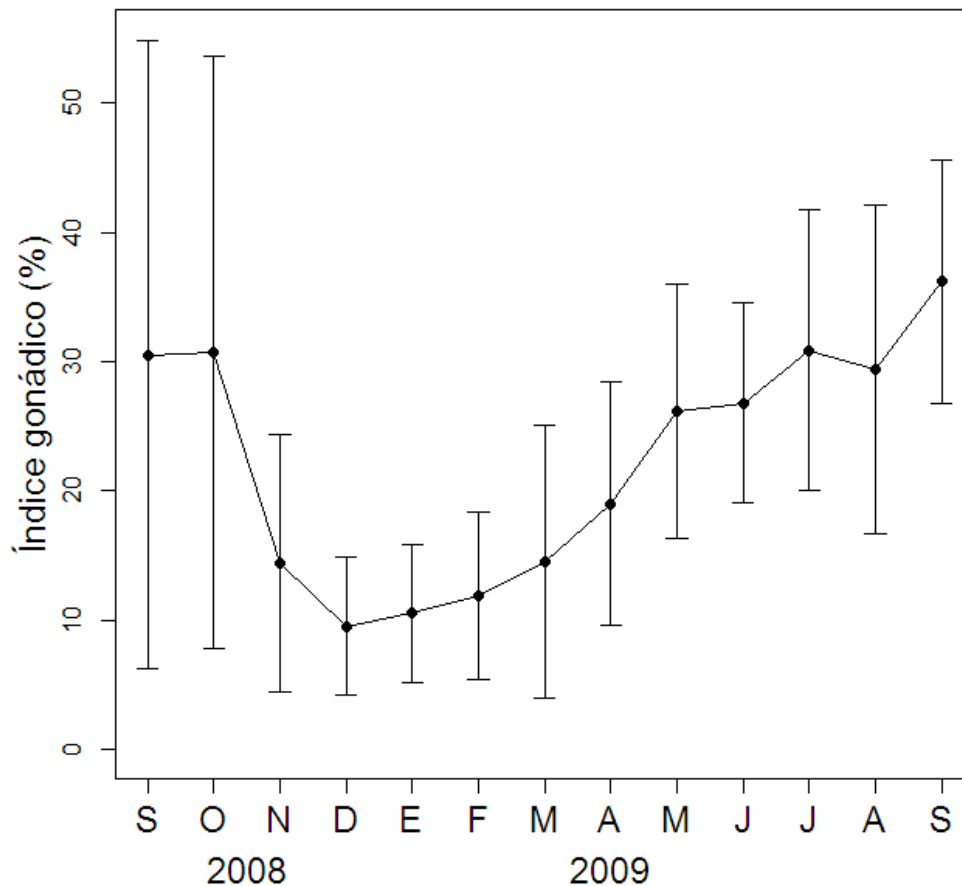


Figura 29. Variación del Índice gonádico de *Chiton virgulatus* en El Califín.

Variación de los factores ambientales y su relación con el ciclo reproductivo

En las figuras 30 y 31 se muestra la variación de la temperatura superficial del mar y del aire, el fotoperiodo, el ciclo de mareas y las frecuencias de cada una de las fases del ciclo reproductivo en El Califín y Balandra, respectivamente.

En El Califín la temperatura superficial del mar se presentó más cálida en septiembre de 2008 (30.6°C), a partir de este mes comenzó a disminuir paulatinamente hasta febrero de 2009, donde se presentó la temperatura más baja (18.1°C), en los meses en que la temperatura superficial del mar es más alta, la fase de madurez es más frecuente, con un coeficiente de correlación de ($R= 0.79$).

De manera similar la temperatura del aire se presentó elevada en septiembre de 2008 (29.9°C) y disminuye hasta enero de 2009 (19.9°C), donde nuevamente aumenta progresivamente con el valor más alto en agosto de 2009 (31.8°C), la fase de indiferenciación ($R = -0.75$) y la fase de madurez ($R = 0.8$) presentaron una relación significativa con la temperatura del aire, los meses en que la temperatura del aire es más elevada la fase de indiferenciación es menos frecuente y por el contrario la fase de madurez es más abundante. En cuanto al fotoperiodo, los meses con más iluminación durante el día fueron junio y julio de 2009 (816.13 y 807.58 minutos de luz en el día, respectivamente) y los días más cortos se presentaron en diciembre de 2008 y enero de 2009 (639.77 y 649.77 minutos de luz en el día, respectivamente), esto presentó una relación significativa con la fase de indiferenciación ($R = -0.83$) que es más frecuente cuando los días son más cortos, mientras que la fase de desarrollo ($R = 0.69$) que es más frecuente cuando los días son más largos.

El ciclo de mareas por su parte presentó los valores más altos en septiembre de 2008 y septiembre de 2009 (68.9 y 68.5 cm, respectivamente) a partir de septiembre de 2008 comienza a disminuir hasta abril de 2009 (43.23 cm) y posteriormente aumenta nuevamente hasta septiembre de 2009. Este comportamiento presenta una relación significativa con la fase de madurez y desove ($R = 0.64$ y 0.57 , respectivamente), los meses en que la marea es más alta la fase de madurez y desove es más frecuente.

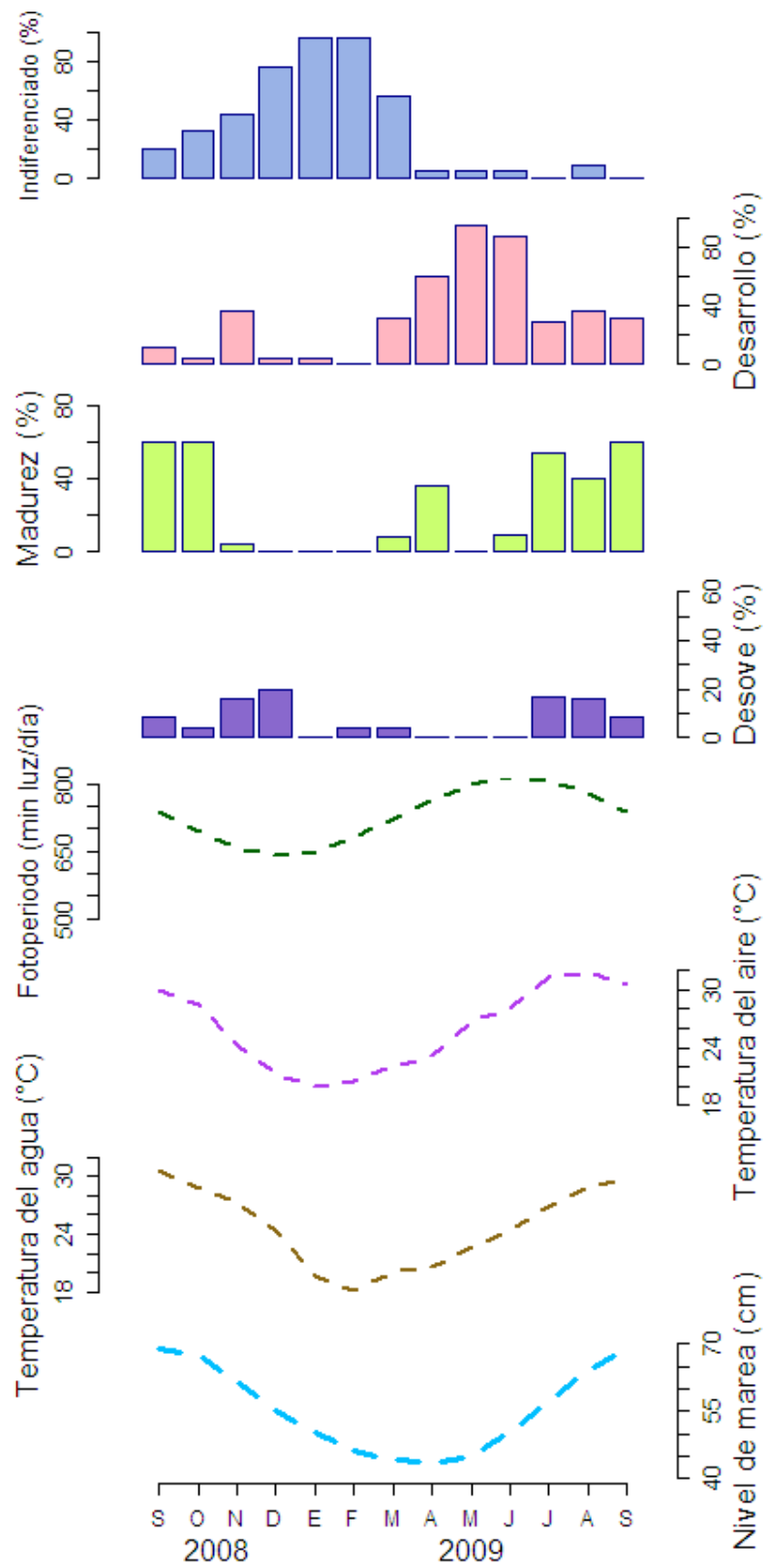


Figura 30. Frecuencia de las fases de desarrollo gonádico de *Chiton virgulatus* y variación de factores ambientales en El Califín.

En Balandra la temperatura superficial del mar presentó el valor más alto en agosto y septiembre de 2010 (29 °C), disminuyendo conforme pasan los meses, la temperatura más baja se presentó en enero y febrero de 2011, ésta presentó relación significativa con la fase de madurez y desove ($R = -0.55$ y -0.65 , respectivamente), los meses en que la temperatura fue baja la fase de madurez y desove fue más frecuente.

De la misma manera la temperatura del aire presentó los valores más elevados en agosto (31.8 °C) y así disminuyó hasta enero y febrero que fue en los meses en que la temperatura fue más baja (19.9 °C), también presentó una relación significativa con la fase de madurez y desove ($R = -0.7$ y -0.5 , respectivamente), los meses en que la temperatura fue baja las fases de madurez y desove fueron más frecuentes.

En cuanto al fotoperiodo no presentó gran diferencia con el año anterior, los días más largos se presentaron en junio y julio (816.13 y 807.74 minutos de luz en el día, respectivamente) y los más cortos en diciembre y enero 639.93 y 649.38 minutos de luz en el día, respectivamente). El fotoperiodo presentó una relación significativa con las fases de indiferenciación y madurez ($R = 0.84$ y -0.68 , respectivamente), los meses en que los días son más largos la fase de indiferenciación es más frecuente y lo contrario ocurre con la fase de madurez, que es menos frecuente cuando los días son más largos.

Por otro lado el ciclo de mareas tampoco presentó gran diferencia con respecto al año anterior, las mareas más altas se presentaron en agosto y septiembre (64.23 y 68.94 cm, respectivamente) y las más bajas en abril (43.63 cm), este presentó una relación significativa con la fase de desove ($R = -0.6$), en los meses que la fase de desove fue más frecuente concuerda con los meses con las mareas más bajas.

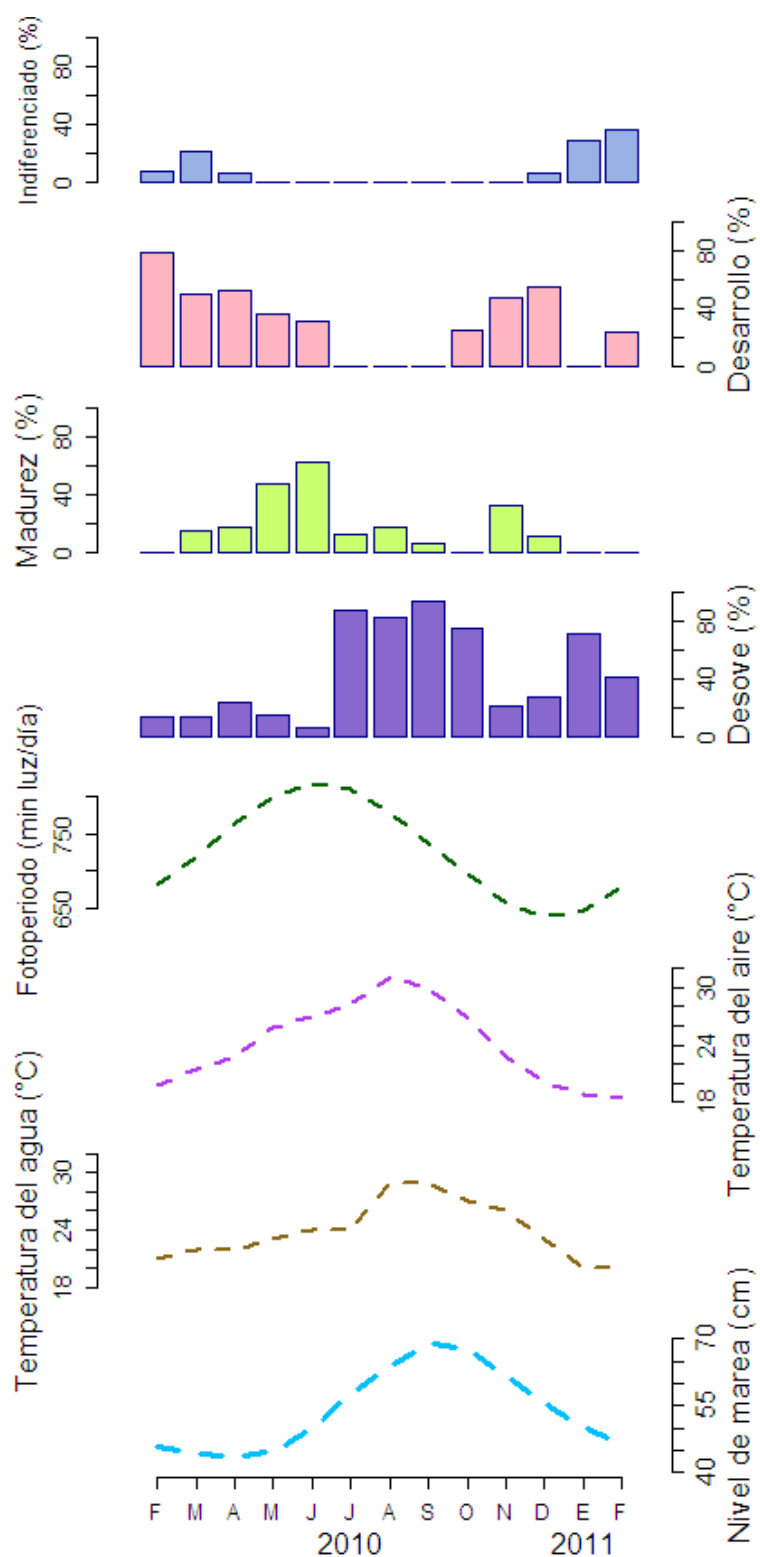


Figura 31. Frecuencia de las fases de desarrollo gonádico ciclo gonádico de *Chiton virgulatus* y variación de factores ambientales en Balandra.

Talla de reclutamiento a la reproducción

Se encontró que en El Califín la longitud de *C. virgulatus* varió de 24 a 46 mm (con una media de 32.18 mm y desviación estándar de 4 mm). Los datos de frecuencia relativa acumulada de individuos sexualmente maduros (madurez y desove) se ajustaron a un modelo logístico:

$$Y = \frac{1}{1 + e^{(a - b * x)^2}}$$

Con un coeficiente de determinación $R^2=0.99$ (Tabla 4, Fig. 32). Así la talla en que por lo menos el 50% de la población se encuentra madura se estableció a los 31.42 mm de longitud. Sin embargo, se observaron organismos con desarrollo gonádico desde los 24 mm. En Balandra la talla de reclutamiento a la reproducción fue de 37.45 mm de longitud, con organismos con desarrollo gonádico desde los 25 mm, en esta localidad la longitud más pequeña encontrada fue de 25 mm y la más grande de 55mm (Tabla 4, Fig.33).

Tabla 4: Longitud media (mm) y desviación estándar (DE), talla mínima (mm) y máxima (mm) por mes de *Chiton virgulatus*.

El Califín 2008-2009				Balandra 2010-2011			
	Talla media ± DE	Talla mínimo	Talla máximo		Talla media ± DE	Talla mínimo	Talla máximo
septiembre	31.32 ± 4.52	24	46	febrero	d/r	d/r	d/r
octubre	34 ± 4.78	26	44	marzo	d/r	d/r	d/r
noviembre	35.21 ± 4.66	28	46	abril	d/r	d/r	d/r
diciembre	31.04 ± 3.41	27	39	mayo	d/r	d/r	d/r
enero	34.32 ± 3.4	29	45	junio	d/r	d/r	d/r
febrero	28.72 ± 2.17	25	35	julio	37.64 ± 2.82	34	43
marzo	30.12 ± 3.1	25	38	agosto	37.64 ± 3.33	30	46
abril	35.36 ± 3.32	30	43	septiembre	37.62 ± 6.63	25	45
mayo	30.84 ± 2.86	26	38	octubre	38.25 ± 6.51	27	48
junio	32.04 ± 3.15	27	39	noviembre	42.73 ± 4.67	38	53
julio	33.5 ± 2.82	29	38	diciembre	43.33 ± 6.43	32	55
agosto	31.04 ± 4.63	26	42	enero	38.66 ± 4.58	31	50
septiembre	31.8 ± 2.56	27	40	febrero	35.76 ± 4.20	29	45
Total	32.18 ± 4			total	38.99 ± 5.6		

d/r datos no registrados

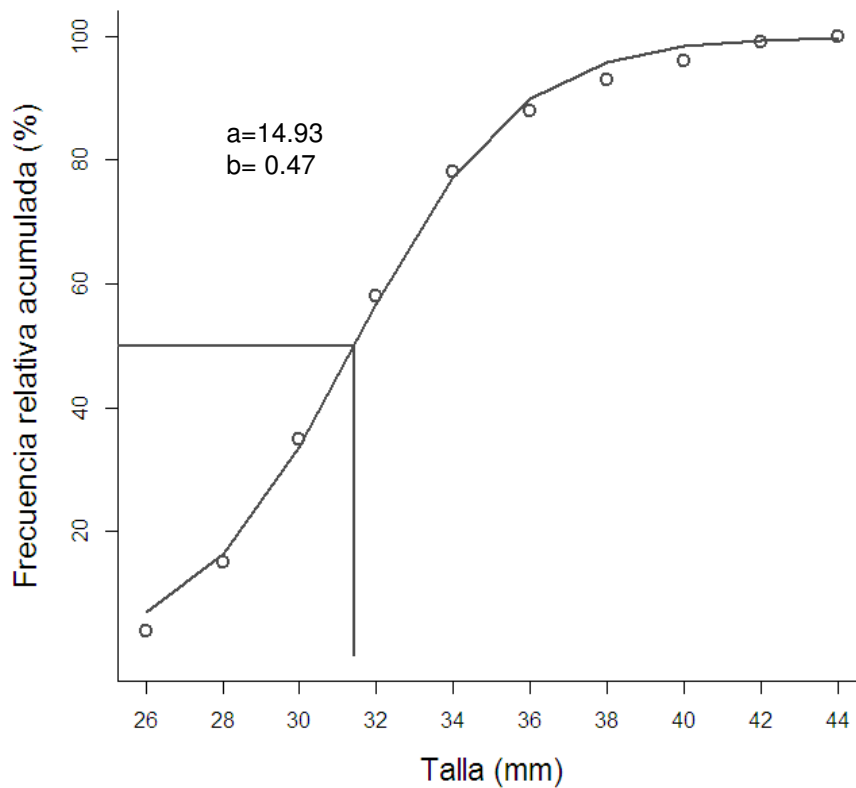


Figura 32. Talla de reclutamiento a la reproducción de *Chiton virgulatus* en El Califín B.C.S., México. Septiembre de 2008 – septiembre de 2009.

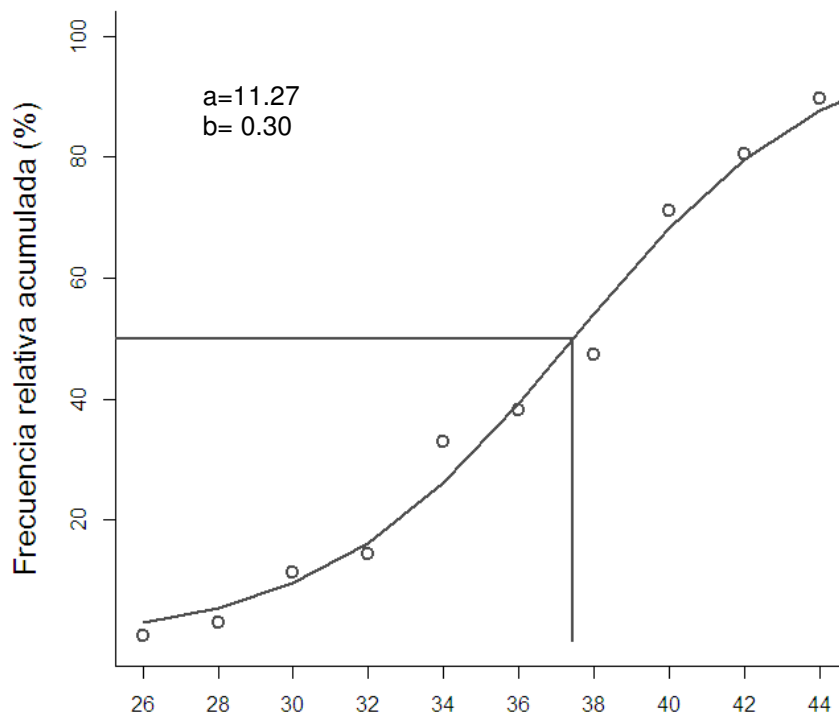


Figura 33. Talla de reclutamiento a la reproducción de *Chiton virgulatus* en Balandra B.C.S., México. Febrero de 2010 – febrero de 2011

DISCUSIÓN

En los poliplacóforos una característica que diferencia a los sexos es la variación en la coloración entre las gónadas maduras masculina y femenina que presentan tonalidades que van de verde oscuro a negro en las hembras y de rojo pardo, naranja o rosa salmón en los machos, y blanco en los machos inmaduros (Glynn, 1970; Pearse, 1979; Rojas-Herrera, 1988), de manera similar en *Chiton virgulatus* la gónada presentó una coloración café cuando son inmaduras y conforme maduran adquieren una coloración verde, en tanto que en los machos fue de color blanco cuando eran inmaduros y rosa en la gónada madura.

Tanto en la localidad de El Califín como en Balandra, *C. virgulatus* presentó una proporción de sexos de 1:1 en el total de la población, y solo en el caso de Balandra se encontraron más machos que hembras en agosto y junio de 2010. Esta mayor proporción de machos en una población se ha reportado para otros chitones como *Acanthopleura granulata* y *C. tuberculatus* (Glynn, 1970), *C. cumingsii* (Ishiyama, 1995; Sotil, 2004) y *A. gemmata* (Barbosa *et al.*, 2009). En este sentido, Sotil (2004), menciona que ante una disgregación de espermatozoides producto de la turbulencia del mar, es posible que el predominio proporcional de machos en la población garantice la fecundación de los ovocitos, al multiplicarse la cantidad de espermatozoides en el medio. En base a lo anterior, se puede explicar el aumento de machos observado en agosto y junio de 2010, meses en los que la frecuencia de desoves fue alta. Por otra parte, la relación de sexos 1:1 durante los demás meses probablemente se deba a que *C. virgulatus* desarrolló otras tácticas reproductivas para la dispersión de sus gametos, como el hecho de presentar desoves durante todo el ciclo reproductivo.

Al igual que en otros moluscos como el bivalvo *Meretrix luoria* (Chung, 2007) y otros poliplacóforos como *C. tuberculatum* (Cowden, 1961), *C. iatricus* (Deshpande & Nagabhushanam, 1983), *C. cumingsii* (Sotil, 2004) y *A. gemmata* (Barbosa *et al.*, 2009), *C. virgulatus* presentó las células típicas de la ovogénesis: ovogonia, ovocito previtelogénico, ovocito vitelogénico inmaduro y ovocito vitelogénico maduro. Estas células se desarrollan a partir de un epitelio germinal (Cowden, 1961), así conforme maduran las ovogonias aumentan su volumen por la acumulación de reservas

(Pazos *et al.*, 1996). De acuerdo a Sotil (2004) la basofilia y la presencia de un gran número de vacuolas en los ovocitos previtelogénicos, se debe a la presencia de mucopolisacáridos ácidos, junto con lípidos, contenidos en vesículas que aumentan en número y se dispersan, evidenciando una actividad de transporte intracelular y acumulación de sustancias, este tipo de vacuolas también las observaron Buckland-Nicks & Reunov (2009) en *Rhyssoplax tulipa*, quienes mencionaron que son liberadas por exocitosis para formar espacios intercelulares entre la célula folicular y el ovocito, donde posteriormente surgirán las proyecciones del casco del ovocito.

Asimismo, la presencia de plaquetas vitelinas y la disminución de vacuolas en los ovocitos vitelogénicos, son debido a que estos acumulan sus nutrientes en forma de gránulos de vitelo y vesículas de lípidos dispersos por todo el citoplasma, como ocurre en los invertebrados marinos (Pazos *et al.*, 1996). Sotil (2004) menciona que la vitelogénesis constituye un importante proceso de requerimiento energético, con formación de gránulos de vitelo principalmente compuestos por sustancias lipídicas y proteínicas.

En este estudio, se observó que el casco del ovocito de *C. virgulatus*, está formado por prolongaciones del citoplasma, algunos autores piensan que estas proyecciones son un tipo de corion, acompañado por las células foliculares que se mantienen en el extremo distal durante todo el desarrollo del ovocito (Sotil, 2004). Sin embargo, la morfología y ultraestructura del casco del ovocito de *C. virgulatus* presentó las proyecciones formadas por las células foliculares y el propio ovocito. Características similares han sido descritas para *Lepidochitona hartwegii*, *L. berryana*, *L. caverna*, *L. denties* (Eernisse & Reynolds, 1994) y para *R. tulipa* Buckland-Nicks & Reunov (2009). Estos autores mencionan que las células foliculares actúan como molde para ser el depósito de los mucopolisacáridos y proteínas que constituyen el casco del ovocito. De esta manera las proyecciones del casco del ovocito de *C. virgulatus* están constituidas de las tres capas descritas por Buckland-Nicks & Reunov (2009) en *R. tulipa*, que se originan de las secreciones microapocrinas de las células foliculares y el ovocito, a pesar de que las proyecciones en *C. virgulatus* aparentemente se forman de la misma manera que en *R. tulipa*. En el presente

trabajo y con las metodologías utilizadas no fue posible distinguir la naturaleza de las prolongaciones.

Los miembros de la familia Chitonidae presentan el casco del ovocito proyecciones conspicuas en forma de cúpulas, tazas, conos, aletas o espinas (Eernisse & Reynolds, 1994; Sotil, 2004; Buckland-Nicks & Brothers, 2008), la forma de estas prolongaciones mejora la flotación sobre la columna de agua formando cadenas con residuos flotantes, lo cual asegura la fertilización (Buckland-Nicks & Brothers, 2008). En cuanto a la morfología en forma de cuchara que adquiere la célula folicular y la parte apical de la prolongación a manera de tridente, es particular de *C. virgulatus*.

En la espermatogénesis, *C. virgulatus* presentó los cinco tipos celulares espermáticos (espermatogonias, espermaticitos primarios, secundarios, espermátidas y espermatozoides) que se han descrito para otros chitones de las familias Lepidochitonidae (*Leptochiton assimilis*, *Deschayesiella curvata*), Tonicellidae (*Tonicella undocaerulea*), Mopaliidae (*Mopalia retifera*), e Ischnochitonidae (*Ischnochiton hakodadensis*) (Pashchenko & Drozdov, 1998). Estas células presentan aproximadamente las mismas dimensiones en el diámetro del núcleo que el de otros chitones (Pashchenko & Drozdov, 1998). El espermatozoide de *C. virgulatus* es el típico de todos los Chitonidae, el cual está formado de tres distintas partes: 1) la cabeza es en forma de bala, está conformada principalmente del núcleo que es ovoide, que forma un filamento anterior que topa con un acrosoma reducido, 2) la parte intermedia presenta tres mitocondrias, características del suborden Chitonina (Buckland-Nicks, 2008), a diferencia de otros chitones como *L. assimilis*, *Deschayesiella curvata*, *T. undocaerulea*, *M. retifera*, *I. hakodadensis* (Pashchenko & Drozdov, 1998), que presentan entre cuatro y seis mitocondrias, y no pertenecen al suborden Chitonina y 3) el flagelo es largo con una disposición de los túbulos de 9+2, tal como se presentó en otros chitones (Sakker, 1984; Pashchenko & Drozdov, 1998). La presencia de un poro en la base de las prolongaciones y la morfología, tanto del ovocito como del espermatozoide, son factores que intervienen en la fertilización ya que son especie específico, como lo sostienen Buckland-Nicks & Brothers (2008), en su trabajo sobre fertilización de *Chaetopleura apiculata* y otras

especies de familia Chitonidae como *Rhysoplax tulipa*, *Radsia nigrovirescens* y *A. granulata*.

En cuanto al ciclo reproductivo, *Chiton virgulatus* se comportó como un desovador parcial, característica que es frecuente en la clase Polyplacophora, por ejemplo en *A. japonica* (Yoshioka, 1987a), *Ischnochitona australis* (Currier, 1989) y *C. cumingsii* (Ishiyama, 1995).

Aunque la frecuencia de estos desoves fue mayor en Balandra que en El Califín, en ambas localidades *C. virgulatus* presentó un pico reproductivo en verano-otoño (Figs. 23A y B), de manera similar a otros chitones como *M. hindsii* (Giese et al., 1959), *A. granulata*, *C. tuberculatus* (Glynn, 1970), *I. australis*, *Liolophura garmordii* (Currier, 1989) y *A. gemmata* (Fathyet al., 1996) y en invierno-primavera, una mayor frecuencia de organismos indiferenciados así como una disminución en la frecuencia de desoves. No obstante, en El Califín se presentó un mayor número de organismos en etapa de indiferenciación con respecto a los de Balandra, probablemente debido a que la línea de costa donde habitan los chitones recolectados en El Califín es una zona influenciada por oleaje de fondo que arrastra una gran cantidad de sedimento (Cruz-Chávez, 2008).

En la Bahía de Santa Mónica, EUA, se observó que *M. muscosa*, no podía alimentarse activamente debido a la acción del oleaje y la presencia de arena, lo que les provocó estrés y la consecuente reabsorción de las gónadas (Booolootian, 1965). Por otro lado, Balandra es una zona muy dinámica con respecto al intercambio de agua que es constante entre la zona somera en la parte interna de la laguna y la corriente tangencial del Canal de San Lorenzo (Gutiérrez-Sánchez, 1987), por lo que podría presentar mayor productividad que en El Califín, lo que les da a los chitones de esa área la oportunidad de alimentarse mejor y con esto producir gametos continuamente. Respecto a esto, se ha reportado que los organismos que viven en zonas de alta productividad producen gametos de manera continua durante todo el año y la etapa de indiferenciación muchas veces no ocurre o su frecuencia es muy baja, tal es el caso del bivalvo *Megapitaria squalida* (Villalejo-Fuerte et al., 2000).

A pesar de que los ciclos reproductivos de los invertebrados marinos están determinados por interacciones entre factores exógenos como el fotoperiodo, el nivel

de mareas y la temperatura que actúan como señales ambientales para la maduración gonadal (Rose *et al.*, 1990; López *et al.*, 2005) en este trabajo no fue posible determinar cual de ellos regula el ciclo reproductivo de *C. virgulatus*. En este sentido, Giese *et al.* (1959) detectaron que el ciclo reproductivo de *Katherina tunicata* y de *M. hindisi* en la Bahía de Santa Mónica, EUA, no está estrechamente vinculado a algún factor ambiental invariable de un año a otro, sino que está sujeto a la acción de varios factores locales. De la misma manera Himmelman (1979), encontró que la temperatura, el fotoperiodo, el ciclo lunar y el de mareas no presentaron relación con el ciclo reproductivo de *Tonicella lineata* y *T. insignis*, pero el afloramiento de fitoplancton que se encuentra relacionado con esos factores ambientales, si presentó relación con los desoves de estas especies, ya que la presencia de fitoplancton en la columna de agua ayuda a la larva de los quitones a mantenerse en la columna de agua y protegerse de los depredadores.

Probablemente la dificultad para poder establecer cual es el factor ambiental que determina el ciclo reproductivo es debido a que las zonas intermareales habitadas por los quitones son ambientes que continuamente experimentan variaciones (Sakker, 1986; Yoshioka, 1987a), sin descartar las diferencias en las características de las variables hidrológicas, la configuración de la línea de costa o los efectos de El Niño y La Niña que ocurrieron durante los distintos periodos de muestreo de este estudio. Esto podría ser la razón por la que el ciclo reproductivo de *C. virgulatus* presenta relación con factores ambientales de distinta manera, dependiendo de la localidad.

De esta manera, el ciclo reproductivo de *C. virgulatus* en El Califín fue influenciado por factores ambientales como el fotoperiodo que afectó directamente la etapa de desarrollo de la gónada. Por lo que, se encontró que conforme los días presentan menor cantidad de luz, la presencia de organismos indiferenciados es más frecuente y la frecuencia de organismos en fase de desarrollo fue menor. Sin embargo, en Balandra ocurrió lo contrario, cuando los días son más largos, la frecuencia de organismos indiferenciados en este sitio es mayor. Aunque esto no ha sido reportado para otros chitones, si se ha encontrado que en algunos invertebrados como la estrella de mar, *Pisaster ochraceus* (Pearse & Eernisse, 1982), e incluso en

algunos moluscos como *Octopus vulgaris*(Hideharu & Hiroko, 2009) y el bivalvo, *Solen marginatus*(López *et al.*, 2005), los días más largos son un detonador para el desarrollo gonádico. Respecto a esto López *et al.*(2005) encontraron una estrecha interrelación entre el proceso gametogénico, la acumulación de reservas y la disponibilidad de alimento en el medio, y lo adjudican a que la gran demanda de energía requerida para la reproducción se satisface a partir del alimento recién ingerido, o de las reservas acumuladas en época de abundancia de fitoplancton.

Por otra parte, en algunas especies como *A.japonica* (Yoshioka, 1987a), *K.tunicata*(Himmelman, 1978), *C. cumingsii* (Ishiyama, 1995), *A. gemmata* (Barbosa *et al.*, 2009) y muchos otros moluscos, el aumento de la temperatura estimula la maduración de los gametos. De manera similar en este estudio, en los meses con temperaturas más altas, tanto del aire como del mar, la etapa de madurez de *C. virgulatus* fue más frecuente en El Califín. Sin embargo, en los organismos de Balandra se encontró más frecuentemente la etapa de madurez gonádica cuando las temperaturas eran más bajas, lo que se ha observado también en *Enoplochiton niger* donde la producción de gametos se incrementa con temperaturas bajas aunque también con las temperaturas altas (Ishiyama *et al.*, 1994).

Por otra parte la etapa de desove de *C. virgulatus* está directamente influenciada por el ciclo de mareas, en particular en el caso de los organismos recolectados en el Califín los desoves coinciden con las mareas más altas, mientras que en Balandra coinciden con las mareas más bajas. En otras especies de chitones como *A.japonica* (Yoshioka, 1987a), *A. granulata* y *C. tuberculatus*(Glynn, 1970), los desoves ocurren cuando las mareas son más altas, sin embargo, no se han reportado chitones que desoven cuando las mareas son más bajas.

Lo anterior posiblemente se debe a que como *C. virgulatus* vive en la zona entre mareas, este es afectado tanto por la temperatura del mar, como por la temperatura del aire, y el ciclo de mareas, que además son sumamente variables, no solo durante un ciclo anual sino también durante un ciclo de 24 horas, por lo que es de esperarse que sea sumamente resistente a los cambios drásticos de temperatura y mareas, condición que se puede aplicar también a la reproducción, que entonces no serían un factor determinante en la maduración gonádica y desove de la especie.

También en este estudio se encontró una diferencia de tallas de *C. virgulatus* entre las dos localidades (en la talla de los organismos, en la talla de reclutamiento a la reproducción y en la talla en la que comienza el desarrollo gonádico). En El Califín se presentaron organismos de tallas más pequeñas (promedio de 32.18 ± 4 mm), que en Balandra (promedio de 38.99 ± 5.6 mm).

Lo anterior probablemente se deba a las diferencias hidrológicas entre localidades, ya que El Califín es una zona expuesta con moderada energía de oleaje lo que produce mayor pulido de las superficie de los cantos rodados, por lo que la cantidad de biofilmy algas que constituyen su alimento podría ser escaso en comparación al que se puede encontrar en Balandra, donde la baja energía de oleaje no provoca movimiento, ni pule la superficie del sustrato rocoso fijo, así como de los bloques caídos sueltos, lo que permite una mayor microrrugosidad del sustrato.

Al tener mayor cantidad de alimento disponible, los quitones pueden obtener la energía necesaria para tener mayores tallas y desoves más abundantes, a pesar de lo observado por Otaíza (1986) quien menciona que los chitones más grandes suelen presentarse en el hábitat más expuesto al oleaje. Esta suposición coincide con lo observado por Chung *et al.* (2005) quienes sugieren que las diferencias en la talla de primera madurez entre poblaciones de la misma especie, se deben a la distribución geográfica en la que se encuentran las poblaciones.

Sin embargo los factores ambientales estudiados en el presente trabajo no explican por sí solos el comportamiento del ciclo reproductivo de *C. virgulatus*, por lo que este podría ser afectado por el conjunto de los factores ambientales locales o por características no descritas en este trabajo, por ejemplo la disponibilidad de alimento y los factores endógenos (endocrino y neuronal).

CONCLUSIONES

- * Los ovocitos de *Chiton virgulatus* presentan el casco del ovocito característico de la clase Polyplacophora, que comienza a desarrollarse en los ovocitos vitelogénicos inmaduros.
- * En su máxima madurez, el ovocito vitelogénico maduro presenta las tres capas típicas que conforman las prolongaciones del casco del ovocito, que presentan forma de tridente rodeadas por las células foliculares que les dan apariencia de cuchara.
- * Los espermatozoides presentan una prolongación del núcleo en forma de filamento anterior que llega a medir aproximadamente 6 μm y presenta las tres mitocondrias típicas del suborden Chitonina.
- * *C. virgulatus* se comporta como un desovador parcial con la mayor frecuencia de desoves en verano-otoño.
- * Los factores ambientales estudiados en el presente trabajo no explican por sí solos el comportamiento del ciclo reproductivo de *C. virgulatus*, por lo que este podría ser afectado por el conjunto de los factores ambientales locales.
- * Existe una diferencia en la talla de reclutamiento a la reproducción entre El Califín (31.42 mm) y Balandra (37.45 mm), probablemente debido a las diferencias hidrológicas particulares de cada localidad.

REFERENCIAS

- Abbott, R. T. 1974. *American Seashells*, 2ª Ed. Van Nostrand Co., New York, 663 p.
- Amor, M. J., M. Ramón & M. Durfort. 2004. Ultrastructural studies of oogenesis in *Bolinus brandaris* (Gastropoda: Muricidae). *Sci. Mar.*, 68(3):343-353.
- Anónimo, 1985. *Tabla de predicción de Mareas*. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D. F., 398 p.
- Baqueiro, C. E., A. Avilés-Quevedo, J. A. Masso-Rojas, M. Muciño-Díaz, P. Rogers-Nieto & A. Vélez-Barajas. 1992. *Manual de métodos de muestreo y evaluación de poblaciones de moluscos y otros recursos bentónicos*. Secretaría de Pesca, México, D. F., 73 p.
- Barber, B. J. & N. J. Blake. 1991. Reproductive Physiology, 377-409. En: S.E. Shumway (Ed.) *Scallops: Biology, Ecology and Aquaculture*. Elsevier, Amsterdam, 1095 p.
- Barbosa, S. S., M. Byrne & B.P. Kelaher. 2009. Reproductive periodicity of the tropical intertidal chiton *Acanthopleura gemmata* at One Tree Island, Great Barrier Reef, near its southern latitudinal limit. *Mar. Biol.*, 89(2):405-411.
- Booolootian, R. A. 1965. On growth feeding and reproduction in the chiton *Mopalia muscosa* of Santa Monica Bay. *Helgoland Mar. Res.*, 11(3-4):186-99.
- Boyle, P. R. 1970. Aspects of the ecology of a littoral chiton, *Sypharochiton pelliserpentis* (Mollusca: Polyplacophora). *New Zeal. J. Mar. Fresh. Res.*, 4:364-384.
- Brusca, R.C. 1980. *Common intertidal invertebrates of the Gulf of California*, 2ª Ed. The Univ. of Arizona Press, Tucson, 513 p.
- Brusca, C. R. & G. J. Brusca. 2002. *Invertebrates*, 2ª Ed. Sinauer Associates, Massachusetts, 936 p.
- Buckland-Nicks, J. 2008. Fertilization biology and the evolution of chitons. *Amer. Malac. Bull.*, 25:97-111.
- Buckland-Nicks, J. F. S. Chia & R. Koss. 1990. Spermiogenesis in Polyplacophora, with special reference to acrosome formation (Mollusca). *Zoomorphology*, 109:179-188.

- Buckland-Nicks, J. & E. Brothers. 2008. On fertilization in *Chaetopleura apiculata* and selected Chitonida. *Biol. Bull.*, 214:184-193.
- Buckland-Nicks, J. & A. Reunov. 2009. Ultrastructura of hull formation during oogenesis in *Rhyssoplax tulipa* (= *Chiton tulipa*) (Chitonidae:Chitoninae). *Invertebr. Reprod. Dev.*, 53(3):165-174.
- Chung, E. Y. 2007. Oogenesis and sexual maturation in *Meretrix lusoria* (Röding 1798) (Bivalvia: Veneridae) in western Korea. *J. Shellfish Res.*, 26(1):71-80.
- Chung, E. Y., Y. B. Hur, M. S. Shin & Y. M. Kim. 2005. Reproductive biology of the female manila clam, *Ruditapes philippinarum* (Bivalvia:Veneridae) on the west coast of Korea. *Korean J. Malacology*, 21:1-11.
- Coma, R., M. Ribes, M. Zabala & J. M. Gili. 1995. Reproduction and cycle of gonadal development in the Mediterranean gorgonian *Paramuricea clavata*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 117:173-183.
- Cowden, R. 1961. A cytochemical investigation of oogenesis and development to the swimming larval stage in the chiton, *Chiton tuberculatus* L. *Biol. Bull.*, 120:313-325.
- Cruz-Chávez, F. D. 2008. *Estudio geológico marino del abanico delta El Califín, Baja California Sur, México*. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de Baja California Sur, La Paz, México, 76 p.
- Currie, R. D. 1989. Reproductive periodicity of three species of chitons at a site in New South Wales, Australia (Mollusca: Polyplacophora). *Invertebr. Reprod. Dev.*, 17(1):25-32.
- Deshpande, U.D. & R. Nagabhushanam. 1983. Oogenesis in the Amphinuran Chiton, *Chiton iatricus*. *Proc. Indian Natn. Sci. Acad.*, B49(6):613-619.
- Eernisse, D. J. 1988. Reproductive patterns in six species of *Lepidochitona* (Mollusca: Polyplacophora) from the Pacific Coast of North America. *Biol. Bull.*, 174: 287-302.
- Eernisse, D. J. 2007. Chitons, 127-133. En: Denny M. W. & S. D. Gaines (Eds.) *Encyclopedia of Tidepools and Rocky Shores*. University of California Press, Berkeley, 735 p.

- Eernisse, D. J. & P. D. Reynolds. 1994. Polyplacophora, 55-110. En: Harrison, F. W. & A. J. Kohn (Eds.) *Microscopic Anatomy of Invertebrates*, Vol. 5, Mollusca 1. Wiley-Liss, Nueva York, 390 p.
- Fathy, E. S, M. A. Hussein, A. H. Elmaraghi & T. N. Yousif. 1996. Reproductive ecology of the common rock chiton *Acanthopleura gemmata* (Mollusca; Polyplacophora) in the Northwestern Coast of the red sea. *Qatar Univ. Sci. J.*, 16(1):95-102.
- Flores-Campaña, L. M., M. A. González-Montoya, M. A. Ortiz-Arellano & J. F. Arzola-González. 2007. Estructura poblacional de *Chiton articulatus* Sowerby, 1832 en las islas Pájaros y Venados de la bahía de Mazatlán, Sinaloa, México. *An. Inst. Biol. Univ. Nal. Autón. Méx., Ser. Zool.*, 76(1):1-15.
- Gracia, C.A., J.M.Díaz & N. E. Ardila. 2005. Quitones (Mollusca: Polyplacophora) del mar Caribe colombiano. *Biota Colombiana*, 6(001):117-125.
- Grant, A. & P. A. Tyler. 1993. The analysis of data in studies of invertebrate reproduction. II. The analysis of oocytes size frequency data, and comparison of different types of data. *Int. J. Invert. Rep.*, 6:259-269.
- García, R. C. & M. Alvarez. 2007. Comunidades de quitones (Mollusca: Polyplacophora) de la Bahía de La Paz, Baja California Sur, México. *Rev. Biol. Trop.*, 55(1):177-182.
- Giese, A. C., J. S. Tucker & R. A. Boolootian. 1959. Annual reproductive cycles of the chitons, *Katharina tunicata* and *Mopalia hindsii*. *Biol. Bull.*, 117:81-88.
- Glynn, P.W. 1970. On the Ecology of the Caribbean chitons *Acanthopleura granulata* Gmelin and *Chiton tuberculatus* Linné: Density, Mortality, Feeding, Reproduction, and Growth. *Smithsonian C. Zoology*, 66:1-28.
- González, N. E. 1993. Moluscos endémicos del Pacífico de México, 223-252. En: Salazar-Vallejo, S. I. & N. E. González (Eds.) *Biodiversidad marina y costera de México*. Com. Nal. Biodiversidad y CIQRO, México, D. F., 865 p.
- Gutiérrez-Sánchez, S. 1987. *Geomorfología, agua y sedimentos de la Caleta-Laguna de Balandra B.C.S.* Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de Baja California Sur. La Paz, México, 66 p.

- Hernández-Olalde, L., F. García-Domínguez, M. Arellano-Martínez & B. P. Ceballos-Vázquez. 2007. Reproductive cycle of the pearl oyster *Pteria sterna* (Pteriidae) in the Ojo de Liebre lagoon, B.C.S., Mexico. *J. Shellfish Res.*, 26(2):543-548.
- Hideharu, N. & U. Hiroko. 2009. Photoperiodism in Mollusks, 173-189. En: Nelson, R. J., D. L. Denlinger & D. E. Somers. (Eds.) *Photoperiodism*. Oxford Scholarship Online Monographs, Oxford, 596 p.
- Himmelman, J.H. 1978. The Reproductive cycle of *Katherina tunicata* Wood and its controlling factors. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 31:27-41.
- Himmelman, J.H. 1979. Factors Regulating the Reproductive cycle of two northeast Pacific chitons. *Tonicella lineata* and *T. insignis*. *Mar. Biol.*, 50:215-222.
- Holguin-Quiñones, O. E. 2006. Moluscos bentónicos de interés económico y potencial de las costas de Michoacán, Colima y Jalisco, México, 121-146. En: Jiménez-Quiroz, M. C. & E. Espino-Barr. (Eds.) *Los recursos pesqueros y acuícolas de Jalisco, Colima y Michoacán. Marco Ambiental. Biología de Moluscos*. SAGARPA, México, D. F., 622 p.
- Holguin-Quiñones, O. & E. Michel-Morfín. 2002. Distribution, density and length-weight relationship of *Chiton articulatus* Sowerby, 1832 (Mollusca-Polyplacophora) on Isla Socorro, Revillagigedo Archipelago, México. *J. Shellfish Res.*, 21(1):239-241.
- Humason, L. G. 1979. *Animal Tissue Techniques*, 4ª Ed. W. F. Freeman & Co. San Francisco, 661 p.
- Iliffe, T. M. & J.S. Pearse. 1982. Annual and lunar reproductive rhythms of the sea urchin *Diadema antillarum* (Philippi) at Bermuda. *Int. J. Invertebr. Rep.*, 5:139-148.
- Ishiyama, V. C., B. Shiga & P. Huamán. 1994. Reproducción *Enoplochiton niger* (Mollusca, Polyplacophora) de la playa de San Bartolo, Lima, Perú. *Bol. de Lima*, XVI(91-96):69-74.
- Ishiyama, V.C. 1995. Reproducción del *Chiton cumingsii* (Polyplacophora, Chitonidae) de la Bahía de Ancón, Lima. *Bol. de Lima*, 100:203-210.

- Jaramillo, R. & J. Navarro. 1995. Reproductive cycle of the chilean ribbed mussel *Aulacomya ater* (Molina, 1782). *J. Shellfish Res.*, 14(1):165-171.
- Jenner, C.E. 1951. The significance of the period of darkness in animal photoperiodic responses. *Anat. Rec.*, 111:512.
- Jespersen, A. & J. Lützen. 2000. Sex, seminal receptacle, and sperm ultrastructure in the commensal bivalve *Montacuta phascolionis* (Veneroida; Galeommatacea). *Acta Zool. (Stockholm)*, 81:69-75.
- Keen, M. 1971. *Sea Shells of Tropical West America*, 2^aEd. Stanford Univ. Press., Stanford, 1064 p.
- López, J., C. Rodríguez & J.F. Carrasco. 2005. Comparación del ciclo reproductor de *Solen marginatus* (Pulteney, 1799) (Mollusca: Bivalvia) en la rías del Eo y Villaviciosa (Asturias, noroeste de España): relación con las variables ambientales. *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.*, 21(1-4):317-327.
- Mackie, G.L. 1984. Bivalves, 351-418. En: Tompa, A.S., N.H. Verdonk & J. Van Der Biggelaar (Eds.) *The Mollusca: Reproduction*, Vol. 7. Academic Press, New York, 486 p.
- Najmudeen, T.M. 2008. Ultrastructural studies of oogenesis in the variable abalone *Haliotis varia* (Vetigastropoda: Haliotidae). *Aquatic Biology*, 2:143-151.
- Neshyba, S. 1987. *Oceanography Perspectives on a fluid earth*. Wiley, New York, 506p.
- Neuman, G. & W. J. Pearson. 1966. *Principles of physical Oceanography*. Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey, 545 p.
- Nishida, A. K., N. Nordi & R. R. N. Alves. 2006. Molluscs production associated to lunar-tide cycle: a case study in Paraíba State under ethnoecology viewpoint. *J. Ethnobiol. Ethnomed.*, 2(28):1-6.
- Obeso-Nieblas, M., A. R. Jiménez-Illescas & S. Troyo-Díez. 1993. Modelación de la marea en la Bahía de La Paz, B.C.S. *Inv. Mar. CICIMAR*, 8:13-22.
- Ortiz-Ordoñez, E., E. Uría G., A. Silva-Olivares, V. Tsutsumi & M. Shibayama. 2006. Ultraestructura of spermatogenesis in the White clam *Chione californiensis* (Broderip, 1835) (Mollusca: Pelecypoda). *J. Shellfish Res.*, 25(2):399-401.

- Otaíza, R.D. 1986. Patrones de distribución vertical de chitones y efecto de pastoreo de *Chiton granosus* en roqueríos intermareales de Chile central, 173 -190. En: Santelices, B. (Ed.) *Simposio Internacional. Usos y funciones ecológicas de las algas marinas bentónicas. Monografías Biológicas 4*, Santiago, 308 p.
- Pashchenko, V. S., & A. L. Drozdov. 1998. Morphology of gametes in five species of fareastern chitons. *Invertebr. Reprod. Dev.*, 33(1):47-56.
- Pazos, A. J., G. Román, C. P. Acosta, M. Abad & J. L. Sánchez. 1996. Influence of the gametogenic cycle on the biochemical composition of the ovary of the great scallop. *Aquaculture International*, 4:201-213.
- Pearse, J. S. & J. Eernisse. 1982. Photoperiodic regulation of gametogenesis and gonadal growth in the sea star *Pisaster ochraceus*. *Mar. Biol.*, 67:121-125.
- Pearse, J. 1979. Polyplacophora, 27-93. En: Giese A. C. & J. S. Pearse (Eds.) *Reproduction of marine invertebrates*, Vol. V. Molluscs: Pelecypods and Lesser Classes. Academic Press, New York, 369 p.
- Peter, A., M. J. Bahret, J. Chaves, G. Courts & N. S. D'Alessio. 1992. *Biología*. Prentice Hall, New Jersey, 717 p.
- Pliego-Cárdenas, R., F. A. García-Domínguez, B. P. Ceballos-Vázquez, M. Villalejo-Fuerte & M. Arellano-Martínez. 2011. Reproductive aspects of *Octopus hubbsorum* (Cephalopoda: Octopodidae) en la Isla Espíritu Santo, sur del Golfo de California, México. *Ciencias Marinas*, 37(1):23-32.
- R Development Core Team. 2011. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.
- Reyes-Gómez, A. 1999. *Sistemática de los quitones (Mollusca: Polyplacophora) de la Colección Nacional de Moluscos del Instituto de Biología, UNAM*. Tesis de licenciatura. Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D. F., 186 p.
- Reyes-Gómez, A. 2004. Chitons in Mexican waters. *Bollettino Malacologico*, 5(suppl):69-82.
- Reyes-Gómez, A. & M. A. Salcedo-Vargas. 2002. The recent Mexican chiton (Mollusca: Polyplacophora) Species. *The Festivus*, 34:17-27.

- Ríos-Jara, E., M. Pérez-Peña, E. López-Uriarte, I. Enciso-Padilla & E. Juárez-Carrillo. 2006. Biodiversidad de moluscos marinos de la costa de Jalisco y Colima, con anotaciones sobre su aprovechamiento en la región, 103-120. En: Jiménez-Quiroz, M. C. & E. Espino-Barr. (Eds.) *Los recursos pesqueros y acuícolas de Jalisco, Colima y Michoacán. Marco Ambiental. Biología de Moluscos*. SAGARPA, México, D. F., 622 p.
- Rojas-Herrera, A. 1988. Análisis biológico-pesquero de la cucaracha de mar (*Chiton articulatus* Sowerby, 1832) de Acapulco, Gro. México, 151-157. En: *Mem. IX Congreso Nacional de Zoología. Villahermosa, Tabasco, México, 1987*. Tomo I. Univ. Juárez Autónoma de Tabasco y Soc. Mex. Zool. A. C., 245 p.
- Rose, R., R. Dybdal & S. Harders. 1990. Reproductive cycle of the Western Australian Silverlip Pearl oyster *Pinctada maxima* (Jameson) (Mollusca: Pteriidae). *J. Shellfish Res.*, 9(2): 261-272.
- Ruppert, E. E. & R. D. Barnes. 1996. *Zoología de los Invertebrados*, 6ª Ed. McGraw-Hill-Interamericana, México, D. F., 1114 p.
- Sakker, E. R. 1984. Sperm morphology, spermatogenesis and spermiogenesis of three species of chitons (Mollusca, Polyplacophora). *Zoomorphology*, 104:111-121.
- Sakker, E. R. 1986. Seasonal reproduction cycles of three Australian species of chitons (Mollusca: Polyplacophora). *Invertebr. Reprod. Dev.*, 10:1-16.
- Sastry, A. 1979. Pelecypoda (Excluding Ostreidae), 113- 292. En: Giese, A.C. y J.S. Pearse (Eds.) *Reproduction of marine invertebrates*, Vol. V. Academic Press, New York, 369 p.
- Scarano, A. & C. Ituarte. 2009. First report of a case of occasional hermaphroditism in Polyplacophora. *J. Mollus. Stud.*, 75:91-92.
- Sirenko, B. 1998. Relict settlement of the chiton *Lepidochitona cinerea* (Mollusca, Polyplacophora) in northern Norway. *Arch. Fish. Mar. Res.*, 46(2):139-149.
- Sokal, R. & F. Rohlf. 1979. *Biometría. Principios y métodos estadísticos en la investigación biológica*. Blume Ediciones, Madrid, 832 p.

- Sotil, C. G. E. 2004. *Variación estacional de la madurez gonadal y oogénesis de Chiton cumingsii Frembly, 1827 de Bahía Ancón, Lima-Perú*. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú, 63 p.
- Szmant-Froelich, A., M. Reutter & L. Riggs. 1985. Sexual reproduction of *Favia fragum* (Esper): Lunar patterns of, embryogenesis and planulation in Puerto Rico. *Bull. Mar. Sci.*, 37(3):880-892.
- Uría, G.E & M. del C. Mora. 1996. *Apuntes para el curso de Histología Animal*. Instituto Politécnico Nacional, México, D. F., 277 p.
- Vélez-Arellano, N., S. Guzmán del Proó & E. Ortiz-Ordoñez. 2009. Gonadal cycle of *Tegula eiseni* (Jordan, 1936) (Mollusca: Gastropoda) in Bahía Asunción, Baja California Sur, México. *J. Shellfish Res.*, 28(3):577-580.
- Villalejo-Fuerte, M. & B. P. Ceballos-Vázquez. 1996. Variación de los índices de condición general, gonádico y de rendimiento muscular en *Argopecten circularis* (Bivalvia: Pectinidae). *Rev. Biol. Trop.*, 44:591-594.
- Villalejo-Fuerte, M., M. Arellano-Martínez, B.P. Ceballos-Vázquez & F. García-Domínguez. 2000. Ciclo reproductivo de la almeja chocolate *Megapitaria squalida* (Sowerby, 1835) (Bivalvia: Veneridae) en Bahía Juncalito, Golfo de California, México. *Hidrobiológica*, 10:165-168.
- Wayne, N. L. & G. D. Block. 1992. Effects of photoperiodic temperature on Egg-Laying Behavior in a Marine Mollusk *Aplysia californica*. *Biol. Bull.*, 182:8-14.
- Willis, S. & J. Cortés. 2001. Mollusks of Manuel Antonio National Park, Pacific Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.*, 49(Supl. 2):25-36.
- WoRMS. 2011. Mollusca. Acceso a través de: World Register of Marine Species en <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=51> (Consultada 05-09-2011).
- Yoshioka, E. 1987a. Annual reproductive cycle of chiton *Acanthopleura japonica*. *Mar. Biol.*, 96(3):371-374.
- Yoshioka, E. 1987b. Environmental cue to initiate gametogenesis in the chiton *Acanthopleura japonica*. *Venus. Jpn. J. Malacol.*, 46:173-177.
- Zar, H. J. 2010. *Biostatistical analysis*. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, 620 p.