



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS



ORGANIZACIÓN DE LA GÓNADA,  
GAMETOGÉNESIS, SEXUALIDAD Y  
VARIACIONES ESTACIONALES Y  
GEOGRÁFICAS DE LAS TÁCTICAS  
REPRODUCTIVAS DEL HACHA CHINA  
*Atrina maura* (SOWERBY, 1835)  
(BIVALVIA: PINNIDAE)

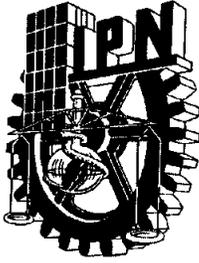
TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTORADO EN CIENCIAS MARINAS

PRESENTA

MARIAN ALEJANDRA CAMACHO MONDRAGÓN

LA PAZ, B.C.S., JUNIO DE 2014.



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

**CARTA CESIÓN DE DERECHOS**

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., el día 03 del mes junio del año 2014  
el (la) que suscribe MC. MARIAN ALEJANDRA CAMACHO MONDRAGÓN alumno(a) del  
Programa de DOCTORADO EN CIENCIAS MARINAS  
con número de registro B101413 adscrito al CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS  
manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de tesis, bajo la dirección de:  
DR. MARCIAL ARELLANO MARTÍNEZ Y DRA. BERTHA PATRICIA CEBALLOS VÁZQUEZ  
y cede los derechos del trabajo titulado:

"ORGANIZACIÓN DE LA GÓNADA, GAMETOGENESIS, SEXUALIDAD Y VARIACIONES ESTACIONALES Y GEOGRÁFICAS  
DE LAS TÁCTICAS REPRODUCTIVAS DEL HACHA CHINA *Atrina maura* (SOWERBY, 1835) (BIVALVIA: PINNIDAE)"

al Instituto Politécnico Nacional, para su difusión con fines académicos y de investigación.

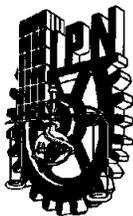
Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Éste, puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: hyma06@hotmail.com - marellam@ipn.mx - bceballo@ipn.mx

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

*Marian Camacho*

MC. MARIAN ALEJANDRA CAMACHO MONDRAGÓN

*nombre y firma*



# 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 8 del mes de Mayo del 2014 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:

**"ORGANIZACIÓN DE LA GÓNADA, GAMETOGÉNESIS, SEXUALIDAD Y VARIACIONES ESTACIONALES Y GEOGRÁFICAS DE LAS TÁCTICAS REPRODUCTIVAS DEL HACHA CHINA *Atrina maura* (SOWERBY, 1835) (BIVALVIA: PINNIDAE)"**

Presentada por el alumno:

**CAMACHO**

Apellido paterno

**MONDRAGÓN**

materno

**MARIAN ALEJANDRA**

nombre(s)

Con registro: 

B	1	0	1	4	1	3
---	---	---	---	---	---	---

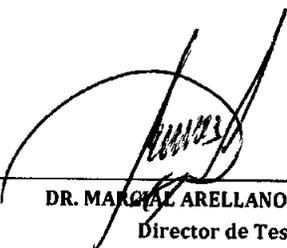
Aspirante de:

**DOCTORADO EN CIENCIAS MARINAS**

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 COMISIÓN REVISORA

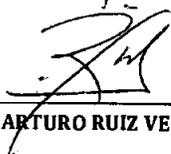
Directores de Tesis

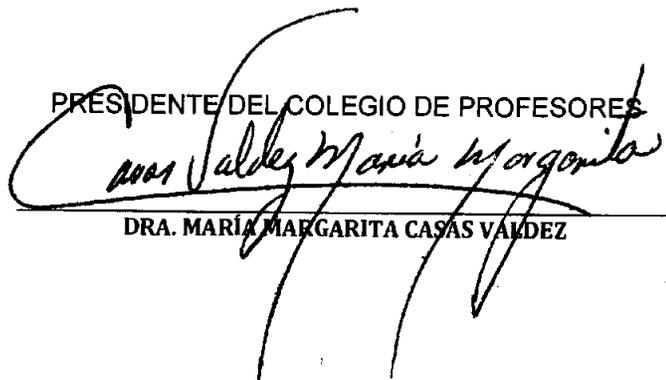
  
\_\_\_\_\_  
**DR. MARGAL ARELLANO MARTÍNEZ**  
Director de Tesis

  
\_\_\_\_\_  
**DRA. BERTHA PATRICIA CEBALLOS VÁZQUEZ**  
2ª. Directora de Tesis

  
\_\_\_\_\_  
**DR. RAFAEL CERVANTES DUARTE**

  
\_\_\_\_\_  
**DR. JOSÉ LUIS ORTIZ GAMINDO**

  
\_\_\_\_\_  
**DR. CÉSAR ARTURO RUIZ VERDUGO**

\_\_\_\_\_  
**PRÉSIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES**  
  
**DRA. MARÍA MARGARITA CASAS VALDEZ**



**IPN  
CICIMAR  
DIRECCION**

*A mi querida familia*

*A todos aquellos que siempre preguntan...*

## AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Politécnico Nacional que a través del Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas (CICIMAR) hizo posible mis estudios de Doctorado.

Un agradecimiento muy especial al Dr. Marcial Arellano Martínez y a la Dra. Bertha Patricia Ceballos Vázquez por haber dirigido este trabajo, por haberme enseñado a trabajar en la investigación científica, por ser excelentes guías en mi formación profesional y personal, además de dedicarme tanto de su valioso tiempo y energía. ¡Gracias por siempre!

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), al Programa Institucional de Formación de Investigadores del Instituto Politécnico Nacional (PIFI-IPN) y a la Comisión de Operación y Fomento de Actividades Académicas del Instituto Politécnico Nacional (COFFA-IPN), por los estímulos económicos.

A los miembros del Comité Revisor: Dr. Rafael Cervantes Duarte, Dr. José Luis Ortiz Galindo y al Dr. Dr. César Arturo Ruiz Verdugo por sus comentarios y atinadas correcciones a este trabajo.

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

Al Dr. Eduardo González Rodríguez por su colaboración con información del marco ambiental. Al Dr. Edgar Óliver López Villegas y a la Maestra Esther Uría Galicia, por su participación en los estudios de ultraestructura. A la Biol. Mar. Alma Rosa Rivera Camacho por su buena disposición e interés en cualquiera aspecto que surgiera durante el desarrollo de esta investigación aún más allá de su responsabilidad.

A Josué Alonso Yee Duarte por su amistad incondicional y apoyo constante en aspectos académicos y personales...Gracias por estar conmigo siempre! A Francisco Domínguez Contreras (Borrs) por ser un ejemplo de perseverancia, por tener un oído dispuesto y las palabras justas.

A mis queridos padres: Silvia y Miguel, a mi hermana Andrea y a mis pequeños Emmanuel, Alexander y Helena por formar la base de mi persona y mis recuerdos. Gracias Madre por tus ánimos y fortaleza; gracias Papá por estar ahí siempre que te necesito; Hermana te quiero y admiro mucho.

A mi amiga (hermana) Prissila, porque dicen que los amigos son un tesoro y yo lo he comprobado en más de la mitad de mi vida.....gracias Bfr. A Tonatiuh Chávez Sánchez por llegar a esta película justo en el momento correcto.

A Jorge por permitirme aprender más allá de lo evidente.

## PRODUCTOS DERIVADOS DE LA TESIS

### Publicaciones científicas:

- Camacho-Mondragón, M. A., M. Arellano-Martínez & B. P. Ceballos-Vázquez. 2012. **PARTICULAR FEATURES OF GONADAL MATURATION AND SIZE AT FIRST MATURITY IN *Atrina maura* (BIVALVIA: PINNIDAE).** *Scientia Marina* 76(3): 539-548.
- Camacho-Mondragón, M. A., B. P. Ceballos-Vázquez, E. Uría-Galicia, E. O. López-Villegas & M. Arellano-Martínez. 2014. **ULTRASTRUCTURE OF THE SPERMATOGENIC PROCESS IN THE PENSHELL *Atrina maura* (BIVALVIA: PINNIDAE).** *Malacologia* 57(2).
- Camacho-Mondragón, M. A., B. P. Ceballos-Vázquez, A. Rivera-Camacho & M. Arellano-Martínez. 2014. **UNPERCEIVED SEX CHANGE IN *Atrina maura* (BIVALVIA: PINNIDAE): HISTOLOGICAL AND SIZE STRUCTURE EVIDENCE.** *American Malacological Bulletin*. Aceptado.
- Camacho-Mondragón, M. A., B. P. Ceballos-Vázquez, E. Uría-Galicia, E. O. López-Villegas & M. Arellano-Martínez. 2014. **ULTRASTRUCTURE OF OOGENESIS AND OOCYTE DEGENERATION IN THE PENSHELL *Atrina maura* (BIVALVIA: PINNIDAE).** *Malacologia*. Enviado
- Camacho-Mondragón, M. A., B. P. Ceballos-Vázquez, E. González-Rodríguez & M. Arellano-Martínez. 2014. **SEASONAL AND GEOGRAPHICAL VARIATIONS IN REPRODUCTIVE PARAMETERS OF THE PENSHELL *Atrina maura* (BIVALVIA: PINNIDAE), FROM THREE LOCALITIES IN NORTHWESTERN MEXICAN PACIFIC COASTS.** *En preparación*.

### Ponencias:

- Camacho-Mondragón, Marian Alejandra; Arellano-Martínez, Marcial; Ceballos-Vázquez, Bertha Patricia. 2011. **ECOLOGÍA REPRODUCTIVA DEL HACHA CHINA *Atrina maura* (SOWERBY, 1835) (BIVALVIA: PINNIDAE) EN EL NOROESTE DEL PACÍFICO MEXICANO.** 11a Semana del Posgrado en Baja California Sur. La Paz, B.C.S. del 4 al 8 de abril de 2011.
- Camacho-Mondragón, Marian Alejandra; Arellano-Martínez, Marcial; Ceballos-Vázquez, Bertha Patricia. 2012. **ASPECTOS PARTICULARES DE LA MADURACIÓN GONÁDICA Y TALLA DE PRIMERA MADUREZ DEL HACHA CHINA *Atrina maura* (BIVALVIA: PINNIDAE).** 12a Semana del Posgrado en Baja California Sur. La Paz, B.C.S. del 12 al 16 de marzo de 2012.

- Camacho-Mondragón, Marian Alejandra; Arellano-Martínez, Marcial; Ceballos-Vázquez, Bertha Patricia. 2012. **PARTICULAR FEATURES OF GONADAL MATURATION AND SIZE AT FIRST MATURITY IN *Atrina maura* (SOWERBY, 1835) (BIVALVIA: PINNIDAE)**. 45th Annual Meeting of the Western Society of Malacologists. Santa Cruz, California, Estados Unidos del 24 al 27 de junio de 2012.
- Camacho-Mondragón, Marian Alejandra; Arellano-Martínez, Marcial; Ceballos-Vázquez, Bertha Patricia. 2012. **ESTRATEGIA REPRODUCTIVA DEL HACHA CHINA *Atrina maura* (BIVALVIA: PINNIDAE) EN EL NOROESTE DE MÉXICO**. IX Congreso de Ciencias del Mar- MarCuba 2012. La Habana, Cuba del 29 de octubre al 2 de noviembre de 2012.
- Camacho-Mondragón, Marian Alejandra; Arellano-Martínez, Marcial; Ceballos-Vázquez, Bertha Patricia. 2012. **HERMAFRODITISMO CON POSIBLE CAMBIO DE SEXO EN EL HACHA *Atrina maura* (BIVALVIA: PINNIDAE) EN BAJA CALIFORNIA SUR, MÉXICO**. XXXV Congreso Nacional de Histología. Ciudad de México del 5 al 7 de noviembre de 2012.
- Camacho-Mondragón, Marian Alejandra; Arellano-Martínez, Marcial; Ceballos-Vázquez, Bertha Patricia. 2013. **¿EL HACHA CHINA (*Atrina maura*) ES UNA ALMEJA QUE CAMBIA DE SEXO?**. XIII Semana de Posgrado en Baja California Sur. La Paz, B.C.S. del 15 al 19 de abril de 2013.
- Camacho-Mondragón, Marian Alejandra; Uría-Galicia, Esther; López-Villegas Edgar Oliver; Arellano-Martínez, Marcial; Ceballos-Vázquez, Bertha Patricia. 2013. **ULTRAESTRUCTURA DE LA ESPERMATOGÉNESIS DEL HACHA CHINA *Atrina maura* (BIVALVIA: PINNIDAE)**. XIII Congreso del Mar de Cortés y VII Simposio del Mar de Cortés. Ensenada, Baja California del 8 al 12 de abril de 2013.
- Camacho-Mondragón, Marian Alejandra; López-Rocha, Jorge Alberto; Ceballos-Vázquez, Bertha Patricia; Arellano-Martínez, Marcial. 2013. **LA PESQUERÍA DE HACHAS (MOLLUSCA: BIVALVIA: PINNIDAE) EN BAJA CALIFORNIA SUR, MÉXICO**. XX Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología del Mar. Cabo San Lucas, B.C.S. del 1 al 4 de octubre de 2013.
- Camacho-Mondragón, Marian Alejandra; Ceballos-Vázquez, Bertha Patricia; Uría-Galicia, Esther; López-Villegas, Edgar Óliver; Arellano-Martínez, Marcial. 2013. **ULTRAESTRUCTURA DEL PROCESO ESPERMATOGÉNICO EN EL HACHA CHINA *Atrina maura* (BIVALVIA: PINNIDAE)**. XXXVI Congreso Nacional de Histología. Cuernavaca, Morelos del 14 al 15 de octubre de 2013.
- Camacho-Mondragón, Marian Alejandra; Arellano-Martínez, Marcial; Ceballos-Vázquez, Bertha Patricia. 2014. **ECOLOGÍA REPRODUCTIVA DEL HACHA CHINA *Atrina maura* (SOWERBY, 1835) (BIVALVIA: PINNIDAE) EN BAJA CALIFORNIA SUR**. XIV Semana de Posgrado en Baja California Sur. La Paz, B.C.S. del 22 al 16 de abril de 2014.

Camacho-Mondragón, Marian Alejandra; Arellano-Martínez, Marcial; Ceballos-Vázquez, Bertha Patricia; González-Rodríguez Eduardo. 2014. **VARIACIONES ESTACIONALES Y GEOGRÁFICAS DE PARÁMETROS REPRODUCTIVOS DEL HACHA CHINA *Atrina maura* (BIVALVIA: PINNIDAE) DE TRES LOCALIDADES EN EL NOROESTE DEL PACÍFICO MEXICANO.** XVIII Congreso Nacional de Oceanografía. La Paz, B.C.S. del 4 al 6 de junio de 2014.

Camacho-Mondragón, Marian Alejandra; Arellano-Martínez, Marcial; Ceballos-Vázquez, Bertha Patricia; Uría-Galicia, Esther; López-Villegas, Edgar Óliver; Yee-Duarte, Josué Alonso. 2014. **ULTRASTRUCTURE OF OOGENESIS AND OOCYTE DEGENERATION IN THE PENSHELL *Atrina maura* (BIVALVIA: PINNIDAE).** Mollusca 2014. Ciudad de México del 22 al 27 de junio de 2014.

Ver anexo

## ÍNDICE

	Página
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>i</b>
<b>LISTA DE TABLAS.....</b>	<b>v</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>vi</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>viii</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. ANTECEDENTES.....</b>	<b>3</b>
2.1 BIOLOGÍA Y HÁBITAT.....	3
2.2 PESQUERÍA Y CULTIVO.....	6
2.3 REPRODUCCIÓN.....	7
2.3.1 ORGANIZACIÓN DE LA GÓNADA Y GAMETOGENESIS.....	7
2.3.2 SEXUALIDAD.....	9
2.3.3 TÁCTICAS REPRODUCTIVAS.....	12
2.3.4 REGULACIÓN DE LAS TÁCTICAS REPRODUCTIVAS.....	13
<b>3. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>18</b>
<b>4. OBJETIVOS.....</b>	<b>19</b>
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>21</b>
CAPÍTULO 1. ORGANIZACIÓN DE LA GÓNADA DE ACUERDO CON EL GRADO DE DESARROLLO EN <i>Atrina maura</i> .....	21
1. ENFOQUE HISTOLÓGICO (Publicación 1).....	21
2. ENFOQUE DE ULTRAESTRUCTURA.....	42
2.1 Espermatogénesis (Publicación 2).....	42
2.2 Ovogénesis (Publicación 3).....	61
CAPÍTULO 2. HERMAFRODITISMO PROTÁNDRICO EN <i>Atrina maura</i> (Publicación 4).....	77
CAPÍTULO 3. VARIACIONES ESTACIONALES Y GEOGRÁFICAS DE LAS TÁCTICAS REPRODUCTIVAS DE <i>Atrina maura</i> EN TRES LOCALIDADES DEL NOROESTE DEL PACÍFICO MEXICANO (Publicación 5).....	91

<b>6. DISCUSIÓN INTEGRATIVA.....</b>	<b>110</b>
<b>7. CONCLUSIONES.....</b>	<b>116</b>
<b>8. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>117</b>
<b>9. LITERATURA CITADA.....</b>	<b>119</b>
<b>ANEXO (productos de la tesis).....</b>	<b>140</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Ejemplar de <i>Atrina maura</i> (Sowerby, 1835).....	3
2	Anatomía general de <i>Atrina maura</i> .....	5
3	Modelo de la ventaja del tamaño corporal para el cambio de sexo.....	11

Resultados

Capítulo 1  
ORGANIZACIÓN DE LA GÓNADA DE ACUERDO CON EL  
GRADO DE DESARROLLO EN *Atrina maura*

1. ENFOQUE HISTOLÓGICO

1	Talla de primera madurez para machos y hembras de <i>Atrina maura</i> en la Ensenada de La Paz, México.....	28
2	Microfotografía de un ovario en desove con nuevo desarrollo en <i>Atrina maura</i> .....	29
3	Microfotografía de un testículo en eyaculación de <i>Atrina maura</i> sin evidencia de desarrollo espermático.....	30
4	Microfotografía de células adipogranulares (CAG) durante el desarrollo testicular en <i>Atrina maura</i> .....	30
5	Microfotografía de lisis masiva (reabsorción) en las gónadas de <i>Atrina maura</i> .....	31
6	Variación de la temperatura del agua en la Ensenada de La Paz y ciclo reproductivo de hembras y machos de <i>Atrina maura</i> .....	34
7	Ilustración esquemática del ciclo ovárico de <i>Atrina maura</i> en la Ensenada de La Paz, México.....	35
8	Variaciones mensuales en el índice de condición e índice de rendimiento muscular para machos y hembras combinados de <i>Atrina maura</i> .....	36

2. ENFOQUE DE ULTRAESTRUCTURA  
2.1 ESPERMATOGÉNESIS

1	Micrografía de transmisión electrónica de espermatogonias de <i>Atrina maura</i> en bandas separadas por proyecciones tipo pseudopodios de las células de Sertoli.....	47
2	Micrografía de transmisión electrónica de espermatogonia de <i>Atrina maura</i> rodeada por célula de Sertoli.....	47
3	Micrografía de transmisión electrónica de espermatocito primario de <i>Atrina maura</i> mostrando el inicio de condensación de la cromatina .....	48
4	Micrografía de transmisión electrónica de espermatocito secundario de <i>Atrina maura</i> mostrando condensación de la heterocromatina (zona oscura) en el núcleo hacia la periferia....	48
5	Micrografía de transmisión electrónica de espermátidas de <i>Atrina maura</i> en estadio de desarrollo inicial.....	49
6	Micrografía de transmisión electrónica de espermátidas de <i>Atrina maura</i> en estadio de desarrollo avanzado.....	49
7	Micrografía de transmisión electrónica de espermátidas maduras de <i>Atrina maura</i> .....	50
8	Micrografía de transmisión electrónica de espermátidas maduras de <i>Atrina maura</i> .....	50
9	Micrografía de transmisión electrónica de espermátidas maduras de <i>Atrina maura</i> .....	51
10	Micrografía de transmisión electrónica de espermatozoide maduro de <i>Atrina maura</i> .....	52
11	Micrografía de transmisión electrónica de espermatozoide maduro de <i>Atrina maura</i> .....	52
12	Micrografía de transmisión electrónica de espermatozoide maduro de <i>Atrina maura</i> .....	53
13	Micrografía de transmisión electrónica de espermatozoide maduro de <i>Atrina maura</i> .....	53
14	Micrografía de transmisión electrónica de espermatozoide maduro de <i>Atrina maura</i> .....	54
15	Micrografía de transmisión electrónica de espermatozoide maduro de <i>Atrina maura</i> .....	54

16	Micrografía de transmisión electrónica de una célula de Sertoli junto a la primera hilera de espermatogonias de <i>Atrina maura</i> ...	55
17	Micrografía de transmisión electrónica una célula de Sertoli en contacto con tres espermatogonias de <i>Atrina maura</i> .....	55

## 2.2 OVOGÉNESIS

1	Representación esquemática de la ovogénesis en <i>Atrina maura</i> basada en observaciones con microscopía de luz y microscopía electrónica de transmisión.....	66
2	Imágenes con microscopía de luz y microscopía electrónica de transmisión de las primeras etapas de la ovogénesis de <i>Atrina maura</i> .....	67
3	Imágenes con microscopía electrónica de transmisión de ovogonias de <i>Atrina maura</i> .....	68
4	Imágenes con microscopía de luz y microscopía electrónica de transmisión de ovocitos previtelogénicos de <i>Atrina maura</i> .....	69
5	Imágenes con microscopía de luz y microscopía electrónica de transmisión de ovocitos vitelogénicos de <i>Atrina maura</i> .....	70
6	Imágenes con microscopía de luz y microscopía electrónica de transmisión de ovocitos post-vitelogénicos de <i>Atrina maura</i> .....	71
7	Imágenes con microscopía electrónica de transmisión y microscopía de luz de ovocitos atrésicos de <i>Atrina maura</i> .....	72

## Capítulo 2

### HERMAFRODITISMO PROTÁNDRICO EN *Atrina maura*

1	Distribución de tallas de machos, hembras y hermafroditas de <i>Atrina maura</i> .....	83
2	Microfotografías de gónadas de <i>Atrina maura</i> en transición sexual de macho a hembra.....	85
3	Porcentaje de área ocupada por gametos de hembras y machos en relación a la fase de cambio de sexo en gónadas hermafroditas de <i>Atrina maura</i> .....	86
4	Talla de primera madurez en machos y hembras de <i>Atrina maura</i> .....	87

Capítulo 3  
VARIACIONES ESTACIONALES Y GEOGRÁFICAS DE LAS  
TÁCTICAS REPRODUCTIVAS DE *Atrina maura* EN TRES  
LOCALIDADES DEL NOROESTE DEL PACÍFICO MEXICANO

1	Localización geográfica de las áreas de estudio.....	95
2	Promedios mensuales históricos de temperatura superficial del mar y concentración de clorofila <i>a</i> para las tres zonas de estudio.....	98
3	Ciclos reproductivos de hembras (parte superior) y machos (parte inferior) de <i>Atrina maura</i> en las tres zonas de estudio.....	101
4	Temperatura, clorofila <i>a</i> , frecuencias de desove y reabsorción y diámetros de ovocitos de <i>Atrina maura</i> para las tres áreas de estudio.....	102
5	Variación del índice de condición y del índice de rendimiento muscular de <i>Atrina maura</i> en las tres áreas de estudio.....	104

## LISTA DE TABLAS

### Capítulo 1 ORGANIZACIÓN DE LA GÓNADA DE ACUERDO CON EL GRADO DE DESARROLLO EN *Atrina maura*

#### 1. ENFOQUE HISTOLÓGICO

Tabla		Página
1	Talla y peso de la muestra total estudiada de hembras y machos de <i>Atrina maura</i> .....	28
2	Descripción de las fases de desarrollo gonádico en <i>Atrina maura</i> .....	32
3	Porcentaje de ocurrencia de los diferentes tipos de ovocitos por fase de desarrollo ovárico en 18 hembras de <i>Atrina maura</i> .	33

### Capítulo 2 HERMAFRODITISMO PROTÁNDRICO EN *Atrina maura*

1	Porcentaje de ocurrencia de los diferentes tipos de ovocitos en relación a las fases de transición sexual en <i>Atrina maura</i> .....	86
---	--	----

### Capítulo 3 VARIACIONES ESTACIONALES Y GEOGRÁFICAS DE LAS TÁCTICAS REPRODUCTIVAS DE *Atrina maura* EN TRES LOCALIDADES DEL NOROESTE DEL PACÍFICO MEXICANO

1	Comparación de datos morfológicos de <i>Atrina maura</i> en la muestra total y por sexo entre las zonas de estudio.....	99
2	Comparación de datos morfológicos de <i>Atrina maura</i> entre sexos en las zonas de estudio.....	100
3	Comparación del diámetro de ovocitos post-vitelogénicos de <i>Atrina maura</i> en la muestra total entre las zonas de estudio.....	102
4	Comparación del diámetro de ovocitos post-vitelogénicos, índice de condición e índice de rendimiento muscular de <i>Atrina maura</i> por época entre las zonas de estudio.....	103

## RESUMEN

El hacha china *Atrina maura* (Sowerby, 1835) es un bivalvo con gran importancia comercial en las costas del Pacífico mexicano; sin embargo, en la actualidad el conocimiento sobre aspectos de su biología básica, particularmente la reproducción, es escaso. Debido a su alta demanda en el mercado nacional, las poblaciones naturales de *A. maura* en Baja California Sur han sido explotadas prácticamente sin regulación oficial desde hace varias décadas, generando una disminución importante del recurso en muchas de las zonas de captura. Esta situación ha derivado en una necesidad por parte de las autoridades gubernamentales de generar información que permita un manejo adecuado de este recurso pesquero; además de un interés creciente en diversos centros de investigación y empresas privadas que han intentado, sin éxito, desarrollar técnicas de acuicultura para lograr una producción continua de “semilla” de *A. maura*. El presente trabajo constituye la primera investigación integral de la biología reproductiva de *A. maura*, ya que analiza la reproducción de la especie desde un enfoque microscópico de la gónada hasta sus tácticas reproductivas con relación a las condiciones ambientales en el noroeste del Pacífico mexicano. Los resultados, presentados en forma de tres capítulos independientes, abordan diversos aspectos reproductivos que generan un nuevo panorama de la reproducción de *A. maura*, además que aportan información útil tanto para el manejo pesquero como para fines de cultivo. El capítulo 1 aborda aspectos de la organización de la gónada y la gametogénesis desde un enfoque histológico y de ultraestructura. Los análisis histológicos permitieron establecer una nueva escala de fases de desarrollo gonádico basada en criterios cualitativos y cuantitativos, además de evidenciar características particulares que no habían sido descritas previamente para la especie como la ausencia de una fase de indiferenciación, reabsorción masiva de gametos, tanto en hembras como en machos, cuando la temperatura del agua alcanza los 25°C; en los machos se presenta eyaculación continua durante todo el año, al mismo tiempo que se presentan otras fases de desarrollo gonádico, células adipogranulares arregladas alrededor de las paredes de los acinos, las cuales disminuyen conforme avanza la maduración, sugiriendo un papel energético. Los análisis de ultraestructura, por medio de microscopía electrónica de transmisión, mostraron por primera vez detalles de la gametogénesis de *A. maura* que no podrían haber sido observados con microscopía de luz. En los machos se describen cuatro estadios gaméticos de maduración. Asimismo, se encontraron características particulares del proceso de espermatogénesis de *A. maura* que lo diferencian de otras especies como la aparición de la vesícula proacrosomal y el flagelo hasta el inicio de la espermiogénesis, contrastando con la formación precoz de ambas estructuras durante las fases de espermatogonias y espermatocitos en otros bivalvos. También, el material en la vesícula acrosómica de los espermatozoides maduros muestra un patrón particular de las densidades electrónicas, el cual parece ser una característica taxonómica exclusiva de la familia Pinnidae. Sin embargo, *A. maura* presentó solo cuatro mitocondrias en la pieza intermedia, contrastando con las cinco en el resto de las especies en esta familia. En las hembras, al analizar el proceso de la formación de los ovocitos, se observó que el ovario contiene ovocitos en varias etapas de desarrollo. Los ovocitos se desarrollan a partir de protogonias que derivan en ovogonias y después atraviesan tres fases: previtelogénesis, vitelogénesis y postvitelogénesis. Las células auxiliares que se adhieren en las primeras fases de desarrollo de los ovocitos parecen jugar un

papel integral en la vitelogénesis. Adicionalmente, este enfoque de ultraestructura en la ovogénesis permitió corroborar y detallar las descripciones del efecto que ejerce la temperatura sobre los ovocitos postvitelogénicos previamente observado con microscopía de luz en la primera sección del capítulo. Por último, este capítulo aporta, por primera vez, la estimación de la talla de primera madurez de *A. maura* y se analiza desde un enfoque pesquero. El capítulo 2 aborda la sexualidad de *A. maura*, proponiéndose una reconsideración de su estatus como especie gonocórica. Esta propuesta se basa en una sólida evidencia histológica de transición sexual de *A. maura* de macho a hembra, en análisis de estructura de tallas de tres poblaciones geográficamente separadas en el noroeste de México, en el que se evidencia que los machos se presentan en las clases de tallas más pequeñas, las hembras en las clases más grandes y los hermafroditas en clases intermedias, así como en la comparación de la talla de primera madurez entre sexos, la cual mostró que los machos se reproducen a tallas menores. Todo lo anterior junto con consideraciones teóricas sugieren fuertemente que *A. maura* es una especie hermafrodita protándrica, condición que ha pasado desapercibida debido a la rapidez con la que ocurre. En el capítulo 3 se examinaron las diferentes tácticas reproductivas de tres poblaciones de *A. maura* en el noroeste del Pacífico mexicano; Laguna Ojo de Liebre, Bahía Magdalena y Ensenada de La Paz, en relación a los regímenes contrastantes de temperatura y disponibilidad de alimento. Aunque en todas las poblaciones *A. maura* presenta un ciclo reproductivo continuo y una talla de primera madurez similar, se encontraron diferencias geográficas y estacionales en la frecuencia de desove, diámetro de ovocitos postvitelogénicos e incidencia de gónadas en reabsorción para todas las zonas. Estas diferencias están relacionadas a las condiciones locales de temperatura y disponibilidad de alimento, las cuales interactúan en los procesos de gametogénesis y desove. Se concluye que la duración e intensidad de las fases del ciclo reproductivo dependen principalmente de la variabilidad estacional de la temperatura; mientras que el desove depende de no rebasar un umbral de temperatura (25 °C) y en menor medida, de la variación estacional de la concentración de alimento disponible. Finalmente, a partir del marco teórico y de la información obtenida en los tres capítulos, en la discusión general de esta tesis se analiza de forma integral la estrategia reproductiva que utiliza *A. maura* y se sugieren aplicaciones para el manejo pesquero y acuacultural de esta especie.

## ABSTRACT

The penshell *Atrina maura* (Sowerby, 1835) is a bivalve with great commercial importance in the coasts of the Mexican Pacific; nevertheless, at the present time the knowledge on aspects of its basic biology, particularly the reproduction, is scarce. Due to its high demand in the national market, the natural populations of *A. maura* in Baja California Sur have been exploited practically without official regulation for several decades generating an important decrease of this resource in many of the fishing areas. This situation has derived in a need of the governmental authorities to generate information that allows a suitable management of this fishing resource; in addition to an increasing interest in many research centers and private companies that have tried, without success, to develop aquaculture techniques to obtain a continuous production of "seed" of *A. maura*. The present work constitutes the first integral investigation of the reproductive biology of *A. maura*, since it analyzes to the reproduction of the species from a microscopic approach of the gonad to its reproductive tactics in relation to the environmental conditions in the northwest of the Mexican Pacific. The results, displayed in form of three independent chapters, deal with diverse reproductive aspects that generate a new scheme of the reproduction of *A. maura*, in addition contributes with useful information for the fishing management and for aquaculture purposes. Chapter 1 deals with aspects of the gonad organization and gametogenesis from histological and ultrastructural approaches. The histological analyses allowed to establish a new scale of gonadic development phases based on qualitative and quantitative criteria, in addition demonstrate particular characteristics that had not been described previously for the species like absence of an indifferentiation phase, massive resorption of gametes in females and males when the temperature of the water reaches 25°C; the males presents continuous spawning throughout the year, at the same time other phases of gonadic development are present, adipogranular cells located around the walls of the acini, which diminish as advances the maturation, suggesting an energetic role. The ultrastructural analyses, by means of electronic microscopy of transmission, showed for the first time details of the gametogenesis of *A. maura* that could not be observed with light microscopy. In males, four gamete maturation stages are described. Also, particular characteristics that allow to differentiate the spermatogenesis process of *A. maura* of the one of other species were found as the appearance of the proacrosomal vesicle and flagellum until the first stages of spermiogenesis, contrasting with the early formation of both structures in the phases of spermatogonia and spermatocytes in other bivalves. As well, the material in the acrosomal vesicle of mature spermatozoa shows a characteristic electron density pattern, which seems to be an exclusive taxonomic feature of the family Pinnidae. However, *A. maura* displayed only four mitochondria in the midpiece, contrasting with five in all other species in this family. In females, when analyzing the process of the formation of the oocytes, was observed that the ovary contains oocytes in several stages of development. The oocytes are developed from protogonias that derive in oogonias and later they cross three phases: previtellogenesis, vitellogenesis and postvitellogenesis. The auxiliary cells that adhere in first stage of development of the oocytes seem to play an integral role in the vitellogenesis. Additionally, this approach of ultrastructure in the oogenesis allowed to corroborate and to detail the descriptions of the effect that exerts the temperature on the postvitellogenic oocytes previously observed with light microscopy in the first section of the chapter. Finally, this chapter contributes, for

the first time, the estimation of the size at first maturity of *A. maura* and is analyzed from a fishing approach. Chapter 2 deals with the sexuality of *A. maura* proposing a reconsideración of its gonocoric status. This proposal is based on a solid histological evidence of male-to-female transition of *A. maura*, and analyses of the size structure of three geographically separated populations on the northwestern of Mexico, in that evidence that males occur primarily in the smaller classes, females in the larger classes and hermaphrodites in intermediate size classes; in addition, between-sex comparisons of size at first maturity showed that the males reproduce to smaller sizes. All the previous one together with theoretical considerations strongly suggest that *A. maura* is a protandrous hermaphrodite species, condition that has gone unnoticed due to the rapid occurrence of this process. In chapter 3 the different reproductive tactics of *A. maura* in the northwest of the Mexican Pacific; Ojo de Liebre Lagoon, Magdalena Bay and Ensenada de La Paz, in relation to the contrasting regimes of temperature and food availability. Although in all populations *A. maura* displays a continuous reproductive cycle and a similar size at first maturity, geographic and seasonal differences in spawning frequency, diameter of postvitellogenic oocytes and incidence of resorption gonads were found for all the zones. These differences are related to the local conditions of temperature and food availability, which interact in the processes of gametogenesis and spawning. In conclusion, the duration and intensity of the phases of the reproductive cycle depends mainly on the seasonal variability of the temperature; whereas the spawning depends on not exceeding a temperature threshold (25 °C) and to a lesser extent, of the seasonal variation of the food concentration available. Finally, from the theoretical frame and of the data obtained in the three chapters, in the general discussion of this thesis the reproductive strategy of *A. maura* is analyzed of comprehensive form and applications for the fisheries management and aquaculture of this species are suggested.

## 1. INTRODUCCIÓN

Los moluscos bivalvos de la familia Pinnidae, comúnmente conocidos como “hachas”, se encuentran representados en las costas del noroeste del Pacífico mexicano principalmente por tres especies: *Atrina maura* (hacha china), *A. tuberculosa* (hacha botijona) y *Pinna rugosa* (hacha larga) (Vélez-Barajas & Fajardo-León, 1996). Las hachas viven en bahías y lagunas costeras sobre fondos blandos constituidos de arena fina y limo-arcilla, a profundidades que van de 0.5 a 15 m (Soria, 1989). Son moluscos dominantes en la comunidad bentónica de los sitios que habitan, en donde forman densos bancos de tamaño y persistencia variable (Ahumada-Sempoal *et al.*, 2002).

Estos bivalvos cuentan con una larga tradición en la pesca ribereña del noroeste de México, en especial en Baja California Sur, donde incluso en ciertos cuerpos de agua (i.e. Ensenada de La Paz) son el único recurso de importancia comercial con el cual subsisten varias familias (obs. pers.). A nivel estatal, la explotación de *A. maura* se ha intensificado en los últimos años debido a la gran demanda que presenta y a los elevados precios regionales que alcanza el kilogramo de músculo aductor ó “callo” (\$200.00 MN). Sin embargo, a pesar de esta condición, no existen medidas de manejo oficiales para este recurso ya que las autoridades hacen referencia a que “la información biológica no identifica plenamente un periodo reproductivo”, lo cual ha ocasionado disminuciones alarmantes en su densidad en los cuerpos de agua de la región (Cardoza-Velasco & Maeda-Martínez, 1997; Ahumada-Sempoal *et al.*, 2002; Singh-Cabanillas & Michel-Guerrero, 2002; Enríquez-Díaz *et al.*, 2003, Anónimo, 2010).

Debido a lo anterior, en los últimos años varias instituciones han dedicado grandes esfuerzos de investigación con el fin de generar conocimientos biológicos de *A. maura*, y de buscar nuevas alternativas de explotación que ayuden al restablecimiento de los bancos naturales, a aumentar la producción a un nivel sostenible y a iniciar actividades de acuicultura, como una alternativa de producción y como estrategia para repoblar las zonas más explotadas, de las que dependen los pescadores de la región.

A la fecha, existen pocos estudios realizados con poblaciones naturales en diferentes localidades (Aguilar, 1964; Soria-Padilla, 1989; Ahumada-Sempoal *et al.*, 2002; Ángel-Pérez *et al.*, 2007; Ángel-Dapa *et al.*, 2010). A nivel laboratorio, se han realizado diversos esfuerzos encaminados a lograr la estandarización de

su técnica de cultivo y lograr la producción de juveniles de *A. maura* (Robles-Mungaray *et al.*, 1996; Robles-Mungaray, 2004, Goldchain-Godin, 2010; Escamilla-Montes, 2012). Sin embargo, los resultados aunque alentadores no son suficientemente consistentes para establecer estrategias de repoblamiento o cultivo masivo a corto plazo. Lo anterior, debido a lo errático de los desoves al desconocer la estacionalidad de recolecta de reproductores con la madurez gonádica óptima, aunado a la poca supervivencia de las larvas, lo cual en conjunto es ocasionado por lo insuficiente del conocimiento de su biología.

En el desarrollo del sector pesquero se destaca lo difícil que resulta plantear soluciones ante la falta de investigación, aunado al grave desaprovechamiento y falta de análisis de lo existente. Es por esto, que la presente investigación representa un esfuerzo destinado a cubrir esa ausencia de elementos de juicio que con frecuencia enfrentan autoridades, productores e inclusive investigadores acerca de la biología reproductiva de *A. maura*.

En los resultados de esta tesis se abordan, en forma de distintos capítulos, aspectos asociados a la reproducción de *A. maura*, que en conjunto constituyen el primer estudio integral para el noroeste del Pacífico mexicano y para el límite latitudinal superior de distribución de la especie. En el capítulo 1 se analiza la organización de la gónada de *A. maura* de acuerdo al grado de desarrollo utilizando técnicas de histología y microscopía electrónica. Este análisis constituye el primer aspecto fundamental en el conocimiento de la reproducción de cualquier especie y ayuda a la manipulación de reproductores en cultivo permitiendo un entendimiento de los tejidos que funcionan como reservorios de energía y de la gametogénesis (ovogénesis y espermatogénesis), lo cual es importante para visualizar la evolución de diversas categorías celulares y en su caso confirmar la presencia de ciertas células que pueden estar involucradas en la formación de los ovocitos y espermatozoides. El capítulo 2 corresponde al hallazgo de especímenes hermafroditas en transición sexual y plantea una reevaluación del estatus sexual de *A. maura*, lo cual repercute sustancialmente en el conocimiento de la biología básica de la especie y en la elección de reproductores de acuerdo a la talla. En el capítulo 3 se explora la relación de diversas tácticas reproductivas de *A. maura* con los factores ambientales contrastantes (temperatura y disponibilidad de alimento) en tres principales zonas de captura de esta especie en Baja California Sur. Este análisis del proceso

reproductivo de organismos silvestres desde un contexto biológico y ambiental permite entender su estrategia reproductiva (dinámica temporal de la gametogénesis, desarrollo gonádico, tiempo, intensidad y tipo de desove, así como la relación de la reproducción con factores ambientales). Finalmente, a partir del marco teórico y de la información obtenida en la presente investigación se analiza de forma integral la estrategia reproductiva que utiliza *A. maura* y se sugieren aplicaciones para el manejo pesquero y acuicultura de esta especie.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 BIOLOGÍA Y HÁBITAT

*Atrina maura* (Sowerby, 1835) es llamada comúnmente “hacha china”, “hacha de riñón” o “hacha de media luna”, este último nombre se debe a la forma de su músculo aductor o “callo”. Pertenece al Phylum Mollusca, Clase Bivalvia y a la familia Pinnidae (Brusca & Brusca, 2002). Presenta una concha alargada, bastante aplanada, semejante a un amplio abanico de borde posterior truncado-redondeado (Fig. 1). Su color en la superficie externa es ámbar-purpúreo a café oscuro; superficie interna brillante, coloreada tal como la externa, nacarada anteriormente. Alcanza una talla máxima reportada de 45 cm de altura de concha, aunque comúnmente los adultos se encuentran en tallas de 20-30 cm (Poutiers, 1995).

En *A. maura* los sexos están separados y al madurar, los gametos son expelidos al agua donde sobreviene la fecundación de los óvulos; posteriormente las larvas forman parte del plancton por un período breve de tiempo, al término del cual ocurre una metamorfosis que concluye con una fase definitiva que es bentónica (Ahumada-Sempoal, 1998).



**Figura 1.** Ejemplar de *Atrina maura* (Sowerby, 1835).

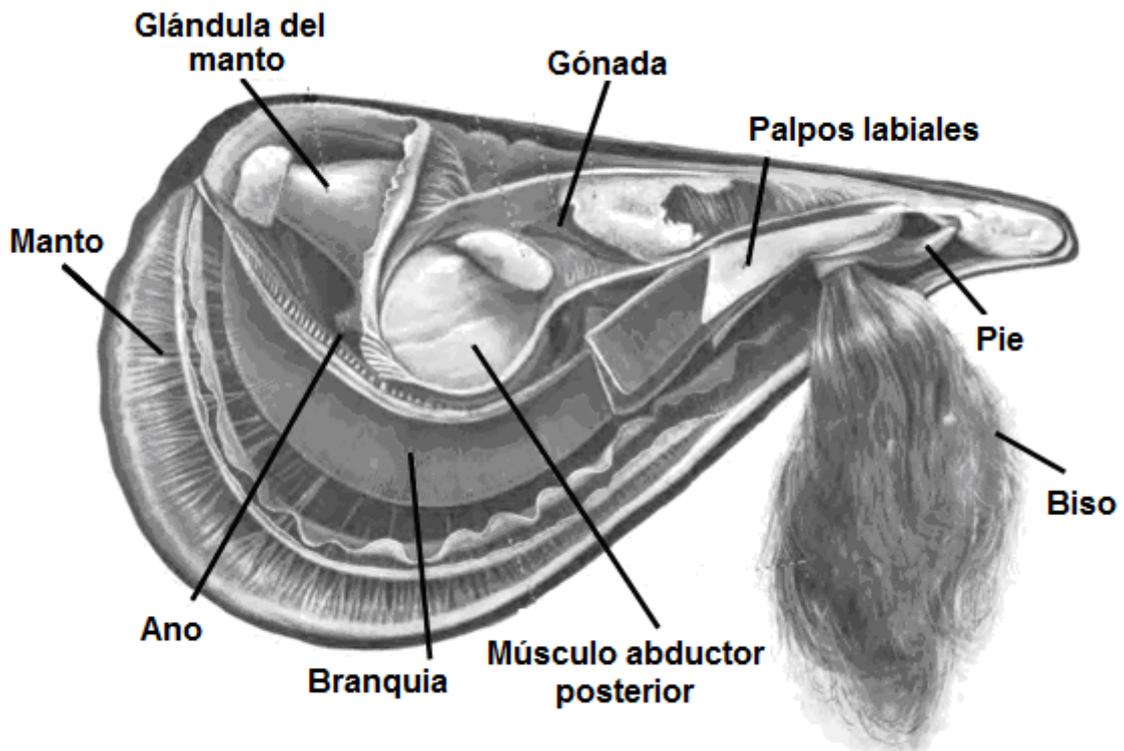
Santiago-Coronel (1981) describe la anatomía de los pinnidos, como a continuación se explica: presentan un músculo abductor posterior de gran tamaño localizado aproximadamente en la parte central de la concha, así como un músculo abductor anterior más pequeño ubicado en el vértice umbonal (Fig. 2). Hay otros dos pares de músculos que ayudan a los movimientos del pie del animal y son: los retractores pedales posteriores y los retractores pedales anteriores, estos junto con el pie son los que realizan la función de excavación y motilidad del organismo.

Muy relacionado al pie se encuentra el biso, que está muy desarrollado en los miembros de esta familia y está contenido en la cavidad bisógena que se localiza en la región basal posterior del pie y es de color café-dorado. La glándula bisógena se encuentra cerca del principio del pie. Las partes blandas están confinadas principalmente al área que queda entre ambos músculos abductores y al sobrepasar esta área se encuentran los lóbulos del manto y las branquias alargadas ó ctenidios, mismos que se extienden hacia la región posterior y sobrepasan el músculo abductor posterior. En esta especie no hay sifones verdaderos, aunque la cavidad del manto está dividida por un septo que forma la cámara excurrente y la cámara incurrente (Santiago-Coronel, 1981).

En estos organismos la boca es un orificio pequeño ubicado en la porción anterior de los palpos labiales que se encuentran localizados en la base del pie. De la boca se continúa al esófago el cual es un estrecho canal circular que desemboca al estómago, donde se inicia el intestino que se dirige posteriormente y que sale de la glándula digestiva y penetra en la gónada hasta su límite cerca del músculo aductor posterior. De aquí da una vuelta y forma el asa intestinal posterior que regresa hacia la región anterior y entra nuevamente a la glándula digestiva, donde da otra vuelta y forma el asa intestinal anterior. Después se dirige en dirección posterior, pasa por el corazón y forma una vuelta hacia la región ventral hasta concluir en el ano, localizado en el borde posterior del músculo aductor posterior (Santiago-Coronel, 1981).

El corazón está situado en la región dorsal a la altura del músculo aductor posterior. El estilete cristalino se inicia desde el estómago hasta el asa intestinal posterior, siempre sobre la parte dorsal del intestino y su función es secretar enzimas que ayudan en la digestión (Grave, 1909).

El órgano respiratorio de estos animales está formado por las branquias o ctenidios que se presentan en forma de hojas alargadas de color café claro, en número de cuatro y colocadas en pares a cada lado del organismo. Éstas se inician a partir de la porción posterior de los palpos labiales dirigiéndose hacia la región posterior del animal (Santiago-Coronel, 1981).



**Figura 2.** Anatomía general de *Atrina maura* (Tomada de Grave, 1909).

La distribución de *A. maura* va desde Baja California incluyendo el Golfo de California (Poutiers, 1995), hasta el sur de Perú (Keen, 1971). Presenta su hábitat en zonas de manglares y bancos de lodo, desde el nivel de marea baja hasta unos 15 m de profundidad (Soria, 1989). Esta especie vive semienterrada en diferentes tipos de sustratos entre los que se encuentran sustratos blandos que pueden contener raíces y rizomas de fanerógamas, pequeñas gravas, restos biodetríticos y también granos de arena a los que se fijan con el biso. En fondos fangosos seleccionan sobre todo partículas pequeñas de unos pocos milímetros, a las que fijan unos pocos filamentos, multiplicando de esta forma los puntos de anclaje al sustrato (García-March, 2005).

## 2.2 PESQUERÍA Y CULTIVO

*A. maura* es un bivalvo de importancia comercial en las costas de Baja California Sur. La parte del organismo que se comercializa es el músculo aductor posterior llamado “callo”, que tiene una amplia demanda y precios altos en el mercado debido a las características particulares de su textura y sabor, llegando a alcanzar entre 12 y 18 dólares al adquirirlo en la playa directamente con el pescador, aunque en el mercado sobrepasa los 25 dólares (Vélez-Barajas & Fajardo-León, 1996; González-Corona, 2003).

El producto se vende fresco o enhielado y se comercializa principalmente en los estados de Sinaloa, Sonora, Baja California, Baja California Sur y en las principales ciudades del país como la Ciudad de México, Guadalajara y Monterrey (Vélez-Barajas & Fajardo-León, 1996).

Junto con *P. rugosa*, durante 1990-2000 el promedio de la captura anual para B.C.S. fue de 45 toneladas de “callo” fresco. Esto ha llevado a una pesquería comercial intensiva y sin regulación que ha resultado en un descenso en la densidad de estas especies en varios cuerpos de agua de Baja California Sur (Cardoza-Velasco & Maeda-Martínez, 1997; Singh-Cabanillas & Michel-Guerrero, 2002; Enríquez-Díaz *et al.*, 2003).

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

Sobre *A. maura* se tienen pocos avances de investigación que permitan establecer con certeza su cultivo de manera sostenible. Se puede citar, por ejemplo, que se ha logrado la producción de semilla en el laboratorio para cultivo en el medio natural, sin embargo, dicha producción es limitada ya que aun no se conocen sus requerimientos químicos, físicos y nutricionales óptimos (Maeda-Martínez *et al.*, 1996; Miranda-Baeza, 1997). Por otro lado, no se ha intentado abordar el problema mediante alternativas de manipulación sobre el ciclo gametogénico. Esto es importante, pues los bancos naturales se encuentran sensiblemente disminuidos, lo que limita la extracción masiva de semillas del medio natural (Baqueiro, 1984; Cendejas *et al.*, 1985; Cardoza-Velasco & Maeda-

Martínez, 1997). A su vez, la recolecta de semilla por medio de colectas del medio natural resultaría incierto para una actividad acuícola sostenida.

La potencialidad de cultivo de *A. maura* se ha determinado por su alto valor comercial, sus temperaturas óptimas y letal superior, y su tasa de crecimiento (Leyva-Valencia *et al.*, 2001). A partir de un cultivo experimental de *A. maura*, en Bahía Magdalena, B.C.S. se encontró que se pueden obtener músculos de 14 g en 20 meses de cultivo, pero aunque el tiempo de cosecha es de 2 años (más largo que para otros bivalvos) su alto precio la hace una especie muy atractiva (Cardoza-Velasco & Maeda-Martínez, 1997, Escamilla-Montes, 2012).

## **2.3 REPRODUCCIÓN**

### **2.3.1 ORGANIZACIÓN DE LA GÓNADA Y GAMETOGÉNESIS**

El aparato reproductor de *A. maura* está constituido por la gónada que se encuentra situada en la región dorsal del animal, consta de dos protuberancias, una de cada lado, entre el músculo abductor y la glándula digestiva. Las gónadas son estructuras glandulares anastomosadas, que se ramifican invadiendo la glándula digestiva. A medida que progresa la maduración, la gónada ocupa un espacio mayor y se hace más notoria, hasta alcanzar la típica estructura del sistema folicular túbulo-acinoso que caracteriza a todos los bivalvos (Aguilar, 1964).

La gametogénesis en *A. maura* ha sido descrita principalmente bajo condiciones controladas de laboratorio y utilizando únicamente métodos histológicos (Rodríguez-Jaramillo *et al.*, 2001; Enríquez-Díaz *et al.*, 2003; Angel-Pérez *et al.*, 2007). La proliferación y crecimiento de los gametos se realiza en el interior de los acinos y son similares a lo reportado para *Pinna nobilis* (De Gaulejac *et al.*, 1995) y en general para todos los bivalvos con fecundación externa (Barber & Blake, 1991). En las hembras, se identificaron cinco fases de desarrollo gamético: protogonias, ovogonias, ovocitos previtelogénicos, vitelogénicos y postvitelogénicos; de igual forma, en los machos también ocurren cinco fases: espermatogonia, espermatocitos primarios, espermatocitos secundarios, espermátidas y espermatozoides.

Los detalles ultraestructurales de la gametogénesis en *A. maura* aún no han sido descritos y se asumen basados en las descripciones para otros bivalvos. En la ovogénesis, la meiosis de los ovocitos no culmina sino hasta el proceso de

fertilización en el medio marino. El desarrollo interno de los gametos tiene lugar hasta la primera profase de la meiosis, misma que se detiene concretamente en la etapa de diploteno y se reanuda hasta el momento que se lleva a cabo la unión con el espermatozoide (Giese y Pearse, 1974; Bayne, 1976). El proceso de ovogénesis se puede dividir en tres etapas: premeiótica, previtelogénica y vitelogénica (Dorange & Le Pennec, 1989).

*Etapas premeiótica:* las células germinales o protogonias, localizadas en las inmediaciones de las paredes foliculares, dan origen a las ovogonias primarias. El núcleo de estas células presenta cromatina condensada en pequeños cúmulos y con una distribución periférica. En su interior a veces es también visible un nucleolo y en el citoplasma se localizan algunas mitocondrias y cisternas del retículo endoplásmico. Estas ovogonias primarias proliferan, por mitosis, dando lugar a ovogonias secundarias. A esta etapa se le llama premeiótica debido a que en ellas suceden únicamente divisiones mitóticas.

*Etapas previtelogénica:* durante la previtelogénesis, las ovogonias comienzan a crecer y tanto el núcleo como el citoplasma se incrementan en volumen. Las ovogonias secundarias entran en la primera profase de la meiosis dando origen a los ovocitos previtelogénicos. Se observan ovocitos en estadio de leptoteno (desaparece el nucléolo y los cromosomas se hacen visibles), zigoteno, paquiteno (se aprecia la presencia de los complejos sinaptonémicos) y diploteno (reaparece el nucléolo y se ven extrusiones nucleares ricas en ribonucleoproteínas). Al alcanzarse estos estadios intermedios de la profase meiótica (paquiteno y diploteno) las células auxiliares, de carácter nutritivo, emigran desde la periferia de los folículos hasta unirse estrechamente a los ovocitos, los cuales se estiran y desarrollan prolongaciones a modo de pseudópodos. Su núcleo tiene una eucromatina muy densa y cúmulos de heterocromatina condensada en la periferia del núcleo. A veces presentan también uno o dos grandes nucléolos. El citoplasma de estas células puede contener inclusiones densas de tipo lisosomal.

*Etapas vitelogénica:* los ovocitos bloqueados en el estadio de diploteno de la primera profase meiótica entran en vitelogénesis. Durante este período los ovocitos crecen muy rápidamente, principalmente debido a la acumulación de vitelo, compuesto de carácter glicolipoprotéico debido a que está formado por sustancias nutritivas tales como glucógeno, lípidos y proteínas. Dichas sustancias

de reserva sirven tanto como combustible para auxiliar la ovogénesis, como para proporcionar al embrión todos los componentes nutritivos necesarios para su desarrollo. De dichos nutrientes, los lípidos y las proteínas forman las principales reservas vitelinas y están destinadas a cubrir los requerimientos energéticos de los estadios embrionarios y larvarios.

Por su parte, la espermatogénesis comienza con una célula germinal dividiéndose mitóticamente, y dando origen a espermatogonias primarias. Estas células crecen y se dividen, resultando en espermatogonias secundarias, que se diferencian nuevamente en espermatoцитos primarios. Subsecuentemente, dos divisiones meióticas producen primero espermatoцитos secundarios, y posteriormente espermátidas haploides (que aún son inmaduras, puesto que carecen de flagelo). Las espermátidas, de menor tamaño, entran entonces al proceso de espermiogénesis, el cual consiste en la formación del flagelo y la diferenciación en espermatozoides maduros. Los gametos en desarrollo, al igual que en el caso de la ovogénesis, se encuentran agrupados en acinos (Dorange & Le Penec, 1989).

### **2.3.2 SEXUALIDAD**

Los bivalvos exhiben una amplia variación en la expresión de su sexualidad, esta va desde especies estrictamente gonocóricas (sexos separados) hasta aquellas que son invariablemente hermafroditas simultáneos. El hermafroditismo ocurre en el 9% de las especies de bivalvos. Sin embargo, la sexualidad puede variar entre las especies que pertenecen al mismo género y también dentro de poblaciones de la misma especie, por lo que se han encontrado ocasionalmente individuos hermafroditas en especies consideradas estrictamente gonocóricas (Heller, 1993).

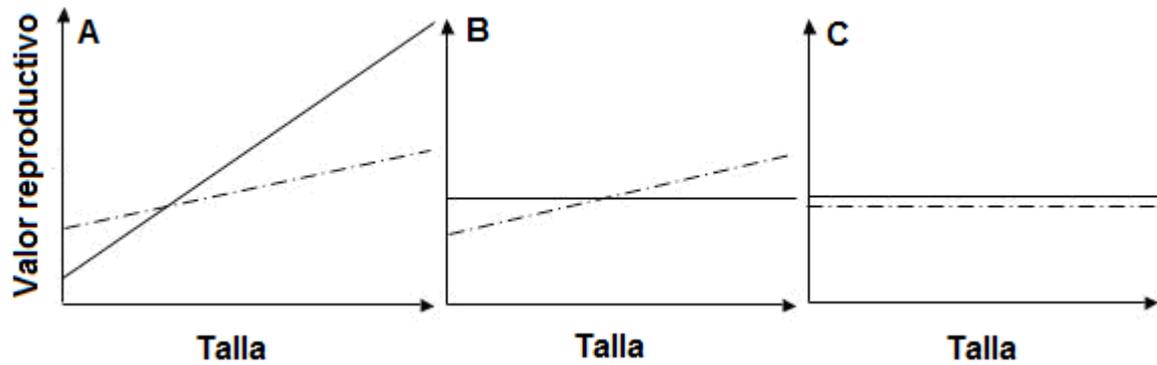
Hermafroditismo, en el sentido más amplio, es la producción de ovocitos y esperma por el mismo individuo. Hermafroditismo simultáneo es la maduración sincrónica de ovocitos y esperma por un organismo usando la misma gónada para producir ambos tipos de células sexuales. Hermafroditismo secuencial es un término general para la función (separada temporalmente) de un organismo primero como un sexo, luego como el otro. La mayoría de los autores restringen el término a protandria y protoginia (Giese & Pearse, 1974; Charnov, 1979) aunque los términos “cambio de sexo” y “reversión sexual” son usados como sinónimos

(Hoagland, 1984). Protandría es la función de un organismo primero como macho, luego como hembra, sin un cambio de sexo posterior. Las dos fases sexuales están separadas por una fase en la cual los caracteres sexuales masculinos desaparecen, y en la mayoría de las especies protándricas, la gónada se re-diferencia para convertirse en hembra. La protoginia es el proceso opuesto a la protandría, es decir, un organismo que primero funciona como hembra y después como macho (Hoagland, 1984).

Se han sugerido varias teorías para entender el significado funcional del hermafroditismo, sin embargo, esta condición aún no está comprendida del todo:

El *modelo de baja densidad* propone que cuando una especie tiene atributos que reducen las oportunidades de reproducirse, como la baja movilidad, tiene mayores probabilidades de presentar individuos hermafroditas. Sin embargo, este modelo no es suficiente para explicar los muchos ejemplos de hermafroditismo. Generalmente, no es factible para el hermafroditismo secuencial, ya sea protandría o protoginia (Ghiselin, 1969).

El *modelo de la ventaja del tamaño corporal* explica algunos de los ejemplos de hermafroditismo secuencial. Supone que un individuo se reproduce más eficientemente como miembro de un sexo cuando es de talla pequeña y cuando es de una talla más grande se reproduce mejor como miembro del otro sexo. Un animal, que al crecer, asume las ventajas del sexo de su tamaño actual incrementaría su potencial reproductivo (Ghiselin, 1969; Allsop, 2003) (Fig. 3). La teoría ecológica-evolutiva básica menciona que el cambio de sexo de macho a hembra es ventajoso cuando una especie puede aumentar su fertilidad con el incremento de talla como hembra, siendo el macho menos sensible a tal incremento (Hoagland, 1984). Además, otro hecho que apoya el modelo de la ventaja de tamaño, es que la producción de ovocitos y esperma tienen diferentes requerimientos metabólicos (Sastry, 1979). Como se necesita más energía para producir ovocitos que esperma, entonces un organismo protándrico canaliza sus ahorros de energía en el periodo como macho en sobrevivir o crecer, y luego toma ventaja de tales ahorros energéticos cambiando a hembra (Wright, 1988).



**Figura 3.** Modelo de la ventaja del tamaño corporal para el cambio de sexo. Las líneas sólidas representan el valor reproductivo masculino, las líneas punteadas el valor reproductivo femenino. A: Protoginia (hembra a macho); B: Protandria (macho a hembra); C: Gonocorismo (sexos separados) (Tomada de Allsop, 2003).

En particular, la familia Pinnidae presenta reproducción tanto gonocórica como hermafrodita. En el género *Pinna* los resultados de las investigaciones contrastan entre las especies, de tal forma que en *P. bicolor* únicamente se han examinado especímenes con sexos separados (Roberts, 1984; Butler, 1987), mientras que en *P. rugosa* y *P. nobilis* se presentan gónadas con gametos masculinos y femeninos en desarrollo asincrónico dentro del mismo acino sugiriendo un hermafroditismo secuencial protándrico (Noguera & Gómez-Aguirre, 1972; Santiago-Coronel, 1981; De Gaulejac *et al.*, 1995; Ceballos-Vázquez *et al.*, 2000). Por su parte, en el género *Atrina*, se han analizado un mayor número de especies: *A. rigida* (Grave, 1909), *A. pectinata* (Shimao *et al.*, 1987; Wang *et al.*, 1999; Chung *et al.*, 2006; Maeno *et al.*, 2009), *A. seminuda* (Freites *et al.*, 2010), *A. tuberculosa* (Niebla-Larreta, 2006) y *A. maura* (Aguilar, 1964; Rodríguez-Jaramillo *et al.*, 2001; Enríquez-Díaz *et al.*, 2003; González-Corona, 2003; Robles-Mungaray, 2004; Barrios-Ruiz, 2005; Ángel-Pérez *et al.*, 2007). Sin embargo, prácticamente todos los estudios consideran a estas especies como gonocóricas y la ocurrencia de uno o dos ejemplares hermafroditas ha sido reportada únicamente como incidental. Aunado a esto, no existen descripciones detalladas de las gónadas que permitan realizar consideraciones posteriores sobre su estatus sexual incluso aunque Aguilar (1964) señaló que en *A. maura* era necesario hacer un estudio detallado con organismos de distintas tallas, lo cual posiblemente permitiría contar con elementos concluyentes para afirmar la ocurrencia de protandria, o si los casos de

hermafroditismo han sido sólo alteraciones provocadas por condiciones ambientales o genéticas.

### 2.3.3 TÁCTICAS REPRODUCTIVAS

Las tácticas reproductivas son aspectos morfológicos, fisiológicos, bioquímicos, ecológicos y sociales cuya finalidad es la reproducción y que varían dentro de ciertos límites; la talla de primera madurez, la talla de los gametos, el almacenamiento de reservas energéticas destinadas para la maduración del ovario, la temporalidad y la duración de la época de reproducción (ciclo reproductivo), y la sincronización por señales ambientales, son sólo algunas tácticas reproductivas (Wootton, 1984).

En *A. maura* se han llevado a cabo investigaciones que evalúan algunas tácticas reproductivas y que han servido de base para los escasos trabajos posteriores que se han realizado con la especie. En primer lugar, la caracterización de las fases de desarrollo gonádico de *A. maura* se basó en lo reportado para *P. nobilis* (De Gaulejac *et al.*, 1995) y se aplicó en estudios que involucran organismos mantenidos en condiciones de laboratorio (Rodríguez-Jaramillo *et al.*, 2001; Enríquez-Díaz *et al.*, 2003) y en poblaciones silvestres de Oaxaca (Ángel-Pérez *et al.*, 2007) y Baja California Sur (Ángel-Dapa *et al.*, 2010).

El almacenamiento y transferencia de reservas energéticas a la gónada durante el ciclo reproductivo únicamente han sido inferidos de manera indirecta en *A. maura* por medio de los índices de condición general, de rendimiento muscular y del manto (Ángel-Pérez *et al.*, 2007; Camacho-Mondragón *et al.*, 2008) generando información básica que necesita corroborarse y detallarse con análisis bioquímicos. La distribución de las proporciones sexuales y la presencia de organismos hermafroditas de *A. maura* son tácticas reproductivas que han recibido muy poca atención y únicamente se han analizado de manera general para la población de Oaxaca (Ángel-Pérez *et al.*, 2007). Finalmente, existe sólo un trabajo que evalúa la calidad de los ovocitos a través de su contenido de lípidos (Ángel-Dapa *et al.*, 2010) y constituye uno de los primeros acercamientos a la fisiología reproductiva de la especie.

## **2.3.4 REGULACIÓN DE LAS TÁCTICAS REPRODUCTIVAS**

### ***Regulación endógena***

El sistema nervioso tiene el papel de coordinador principal de las funciones a nivel de todo el organismo, ya que controla el funcionamiento de órganos y tejidos por medio de un sistema de compuestos biológicamente activos. Estas moléculas biológicamente activas, diferentes en su origen químico, cumplen las funciones reguladoras como neurotransmisores. Un neurotransmisor es una sustancia liberada por tejido nervioso (neuronas) a través de una sinapsis y que tiene un efecto en una célula cercana específica. Así, los neurotransmisores son conocidos también como reguladores locales, ya que son liberados en el fluido intersticial y afectan a las células que se localizan muy cercanas al punto de secreción (Campbell *et al.*, 2000).

El sistema endocrino involucra mensajeros químicos, conocidos como hormonas, que son secretados para coordinar varios mecanismos y procesos fisiológicos de un organismo multicelular. Este sistema permite al organismo reaccionar apropiadamente a numerosas señales externas (ambientales) e internas (fisiológicas). Las hormonas son químicos reguladores que viajan a través del sistema circulatorio desde su sitio de producción y afectan otros sitios del cuerpo, frecuentemente alejados. Las hormonas son producidas y secretadas principalmente por órganos llamados glándulas endocrinas.

De manera similar, existen células nerviosas especializadas llamadas neurosecretoras que además de conducir señales nerviosas también producen y secretan hormonas (neurohormonas) que son liberados al sistema circulatorio. Por lo tanto, es evidente que existe una participación conjunta del sistema nervioso y endocrino en los procesos de coordinación fisiológica. Así, por ejemplo, en bivalvos, los ganglios cerebrales tienen un papel de neurosecreción muy importante, ya que dentro de estos se han identificado varios tipos diferentes de células neurosecretoras (Illanes-Bucher, 1979). Estas células (neuronas) producen péptidos que son liberados en el sistema circulatorio y participan en la regulación del crecimiento, gametogénesis y en el metabolismo del glucógeno (Zwaan & Mathieu, 1992).

Los mensajeros peptídicos son por mucho las hormonas más comunes en los moluscos. Son secretados por células neurosecretoras u órganos y pueden actuar en los receptores de membrana para disparar una cascada de eventos

intracelulares que eventualmente resultan en transcripción genética. Ejemplos de neurohormonas de moluscos involucradas en procesos reproductivos incluyen la hormona del desove (ELH). Aunque el sistema neuroendocrino ha sido estudiado especialmente en especies de gasterópodos como *Lymnaea*, hay duda si los péptidos juegan un papel en el sistema endocrino de otros moluscos tales como los bivalvos. Por ejemplo, algunos péptidos han sido encontrados en la gónada del ostión *Crassostrea gigas*, los cuales parecen ser sólo expresados durante el desarrollo gonádico ya que ningún efecto se ha registrado durante el periodo sexual de reposo (Pazos & Mathieu, 1999). Otras neurohormonas son producidas por los ganglios nerviosos (cerebral, visceral o pedal). Incluyen neuropéptidos y neurosecreciones aminérgicas (dopamina, noradrenalina, serotonina). El efecto estimulante de las neurohormonas en la maduración sexual fue demostrado en moluscos tales como *Mytilus edulis* (Mathieu *et al.*, 1991) y *C. gigas* (Pazos & Mathieu, 1999). Las neurohormonas activan la multiplicación de gametos y la vitelogénesis, y controlan los mecanismos de almacenamiento de energía y los procesos de desove (Mathieu, 1994).

Los moluscos son particulares entre los protostomados, ya que son considerados como el único Phylum que es capaz de sintetizar hormonas esteroides tipo vertebrado, las cuales a su vez tienen papeles fisiológicos específicos. Muchos reportes han resaltado los efectos de los esteroides en la diferenciación sexual, crecimiento gonádico, gametogénesis, producción de huevos y fertilidad en moluscos sugiriendo con esto diferentes papeles en la reproducción (Pazos & Mathieu, 1999; Wang & Croll, 2006). Perceptiblemente, algunos efectos pueden parecer contradictorios. Se ha reportado que una inyección de estradiol induce la reversión sexual de machos a hembras en *C. gigas* (Mori, 1969) mientras que incrementa la proporción de machos/hembras en *Placopecten magellanicus* (Wang & Croll, 2004).

En los moluscos, el sistema endocrino y especialmente el eje reproductivo incluyen generalmente sólo células neurosecretoras y otras glándulas endocrinas tales como gónadas. Illanes & Lubet (1980) demostraron que un número significativo de células liberan sus productos antes del desove y que existe una correlación significativa entre el ciclo reproductivo y el número de células neurosecretoras activas, las cuales se incrementan al reanudarse la actividad en la gónada, a través de la gametogénesis y hasta la maduración y disminuyen en

el desove para incrementarse de nuevo al reanudarse la actividad en la gónada al inicio de un nuevo ciclo sexual. Estas variaciones pueden ser vistas sólo a nivel de los ganglios cerebrales.

Las secreciones neuroendocrinas de los ganglios cerebrales y, en menor grado, los ganglios viscerales, una vez liberadas, son esenciales para el desarrollo de la mitosis gonádica, meiosis (espermatoцитos) y vitelogénesis (Lubet & Mathieu, 1978; Mathieu, 1987). Estas secreciones no parecen ser específicas de cada sexo ya que ganglios cerebrales tomados de hembras mantienen el desarrollo de la línea masculina y viceversa, ni tampoco exclusiva de cada especie porque la continuación del desarrollo de la gónada de diferentes especies (ostras y almejas) ha sido mantenida *in vitro* asociada con tejidos de los ganglios cerebrales de mejillones. El cultivo de la gónada femenina de varias especies de bivalvos (mejillones, ostras, almejas) ha mostrado la existencia de un factor de origen cerebral que mantiene el desarrollo de las ovogonias (Lubet & Mathieu, 1978). También hay al menos un factor de origen cerebral, distinto del anterior, el cual es esencial para la vitelogénesis. En su ausencia, los ovocitos se lisan. Este factor incrementa significativamente la síntesis de ARN y fosfolípidos (Lubet *et al.* 1987). Sin embargo, el factor no es responsable del reinicio de la meiosis, maduración de ovocitos o del desove.

Sato *et al.* (1985) demostraron la existencia de un factor en la gónada de *Spisula* (= *Mactra*) que inicia el proceso de maduración final de los ovocitos (ruptura de la vesícula germinal, reinicio de la meiosis). A través de la inyección de serotonina en la gónada de *Spisula* o la adición de esta sustancia a la suspensión de ovocitos, Hirai *et al.* (1988) obtuvieron los mismos efectos en la maduración. Stefano & Catapane (1979) han mostrado que la concentración máxima de serotonina se encuentra en el momento de la madurez gonadal. Además de la serotonina, otras aminas pueden estar involucradas también en los procesos fisiológicos asociados con el desove. Osada *et al.* (1987) mostraron que existe un incremento significativo en el nivel de dopamina en varias especies de bivalvos (*Mytilus edulis*, *Patinopecten yessoensis* y *Crassostrea gigas*).

### **Regulación exógena**

Aunque el efecto de los factores ambientales se distingue del que ocasionan los factores internos, esta distinción es artificial dado que obviamente

ambos se complementan para llevar a cabo las funciones reproductivas necesarias en todos los organismos.

La reproducción en invertebrados marinos debe estar altamente sincronizada para asegurar su éxito. En última instancia, esta sincronización es a nivel de desarrollo de gametos y desove entre los individuos en una población; además de estar moderada por medio de señales externas que para muchas especies la temperatura y el fotoperiodo son las variables principales a las cuales se vincula la biología de los organismos. Estas pueden actuar directa o indirectamente para reiniciar o mantener los mecanismos de reloj internos. Sin embargo, la evidencia creciente muestra que la traducción de las señales ambientales hacia los gametos es vía el sistema endocrino (Olive *et al.*, 1990; Bentley & Pacey, 1992; Lawrence, 1996).

Varios autores (Sastry, 1975; Blake, 1972 y Blake & Sastry, 1979) propusieron un modelo general de la compleja interacción entre los factores neuroendocrinos y ambientales en el ciclo reproductivo de los bivalvos, tomando como ejemplo las investigaciones realizadas en el pectínido *Argopecten irradians*. En este modelo, se identificaron cinco etapas de neurosecreción. En la etapa I, los organismos secretan una sustancia neuroendocrina que permite la acumulación de nutrientes. Las etapas II y III actúan como mecanismos de 'encendido-apagado' controlando la transferencia de nutrientes a la gónada. La etapa IV coincide con el crecimiento de ovocitos hasta la madurez, y la etapa V corresponde al inicio del desove. Inicialmente, durante la fase de reposo, esta especie es indiferente a los estímulos ambientales para el inicio del crecimiento gonádico. Sin embargo, al desarrollarse las ovogonias y los primeros ovocitos, los individuos responden a los estímulos ambientales. El cambio de etapa II a etapa III en el ciclo neurosecretor parece actuar como un mecanismo de 'encendido-apagado', y el crecimiento de los ovocitos es iniciado o retrasado dependiendo de la temperatura y la disponibilidad de alimento. Con el inicio del crecimiento de los ovocitos, las reservas son transferidas de la glándula digestiva a la gónada. Después de que ciertas reservas mínimas son acumuladas dentro de la gónada, el desarrollo de los ovocitos hasta la maduración es independiente del suministro de alimento. Sin embargo, la exposición a temperaturas menores al umbral revierte el ciclo neurosecretor a la etapa II y el crecimiento de los ovocitos es retrasado. Cuando las temperaturas se presentan por arriba del mínimo requerido

por el ciclo neurosecretor se avanza hacia las etapas III y IV donde los ovocitos experimentan crecimiento citoplásmico y vitelogénesis, respectivamente. Exposición prolongada a temperaturas por debajo o por arriba del umbral durante la vitelogénesis ocasiona degeneración neuronal lo cual a su vez causa la desintegración y reabsorción de ovocitos (Barber & Blake, 1991).

Los factores exógenos, junto con las características genóticas propias de la especie, determinan el ciclo reproductivo del organismo, lo que da como resultado un patrón particular de reproducción, en el que se regulan la duración, intensidad y frecuencia del mismo, de modo que los individuos presentan un patrón característico del ciclo reproductivo. La temperatura y la disponibilidad de alimento han sido señaladas como los principales factores ambientales que regulan el ciclo reproductivo de los bivalvos marinos (Seed, 1976; Bayne & Newell, 1983; MacDonald & Thompson, 1988; Arsenault & Himmelman, 1998). En este sentido, Rodríguez-Jaramillo *et al.* (2001) encontraron que la temperatura tiene un efecto directo sobre la maduración de *Atrina maura* pues aumenta la velocidad del proceso de vitelogénesis. Sin embargo, presenta una disminución en la calidad de los ovocitos al manifestarse un fenómeno común en los moluscos que es la reabsorción de los ovocitos, llamada atresia, y la cual se observó al final de la vitelogénesis.

Por otra parte, en los ciclos reproductivos de muchos bivalvos marinos se han observado diferencias que pueden deberse a las condiciones ambientales propias de cada localidad; es decir, el ciclo reproductivo de una especie que habita en zonas con diferencias climáticas puede variar en relación con el medio ambiente local, puesto que la reproducción de una especie es una respuesta al medio ambiente genéticamente controlada (Sastry, 1970). Baqueiro & Aldana (2000) analizaron el ciclo reproductivo de varias especies de bivalvos de la costa occidental de México y encontraron que los patrones de desove están asociados a las condiciones microambientales de su hábitat.

Un ejemplo de lo anterior lo constituye *P. rugosa*. Esta especie fue estudiada en La Paz, B.C.S. durante un año y se encontró que el momento de máxima maduración, así como la expulsión de los productos sexuales suceden en un período bastante prolongado, desde mediados de primavera hasta finalizar el verano (Noguera & Gómez-Aguirre, 1972). Una situación similar fue reportada por Ceballos-Vázquez *et al.* (2000) para Bahía Concepción, B.C.S., una localidad más

al norte que la Bahía de La Paz, en donde las mayores frecuencias de madurez y desove de *P. rugosa* se registraron desde primavera hasta finales del otoño y se encontró un periodo de tres meses de inactividad reproductiva. Por su parte, Cendejas *et al.* (1985) encontraron en la Bahía Bacoichibampo, en Guaymas, Sonora, que la mayor actividad reproductiva para dicha especie ocurre durante verano.

### **3. JUSTIFICACIÓN**

Los moluscos como muchos otros de los recursos marinos, representan un patrimonio con un inmenso potencial económico, alimenticio y de interés científico. Asimismo, son el segundo grupo más numeroso y diverso de los invertebrados en su morfología, hábitat y biología (Brusca & Brusca, 2002). Sin embargo, debido a la accesibilidad y al nulo o poco desplazamiento que presentan las especies bentónicas que conforman este recurso, lo hacen muy vulnerable, lo que se refleja en una sobreexplotación y destrucción de sus bancos (Baqueiro *et al.*, 1992). En este sentido, los estudios de reproducción son necesarios debido a que proporcionan datos importantes relacionados con la distribución y estructura de la población, permiten efectuar predicciones sobre el reclutamiento y proporcionan la información necesaria para la obtención de semilla, el establecimiento de épocas de veda y la determinación de tallas mínimas de captura (Seed, 1976; Arsenault & Himmelman, 1998). Debido a lo anterior, el conocimiento de la reproducción de una especie es esencial para el manejo de todas las pesquerías comerciales de bivalvos y para la acuicultura (Barber & Blake, 1991).

La reproducción en bivalvos generalmente está altamente sincronizada entre los individuos de una población para asegurar su éxito, especialmente tratándose de especies sésiles (Lawrence & Soame, 2004). En último término, esta sincronización se da a nivel del desarrollo de gametos y al momento del desove y se debe a una combinación de factores endógenos (genéticos y hormonales) y factores exógenos, siendo la temperatura y la disponibilidad de alimento las principales variables ambientales que influyen en el metabolismo de un organismo y más específicamente sobre su reproducción (Sastri, 1979; Bayne & Newell, 1983; Barber & Blake, 1991; Rodríguez-Jaramillo *et al.*, 2001). Estas

variables pueden actuar directa o indirectamente para reiniciar o mantener los mecanismos de reloj internos (Lawrence & Soame, 2004).

Es por ello que, las especies con una amplia distribución geográfica pueden presentar diferencias en sus tácticas reproductivas (maduración gonádica, ciclo reproductivo, almacenamiento y transferencia de reservas, fecundidad, tamaño de los gametos, proporción sexual, talla de primera madurez, entre otras), como una respuesta específica a las condiciones ambientales de cada localidad (Heffernan *et al.*, 1989). Lo cual tendría implicaciones profundas en el manejo del recurso y en las técnicas de acuicultura (elección de zonas y temporadas de extracción de reproductores).

La península de Baja California está circundada al oriente por el Golfo de California y al occidente por el Océano Pacífico, dos cuerpos de agua con características oceanográficas muy particulares que proveen de zonas con diferencias ambientales contrastantes, las cuales son propicias para una investigación comparativa de la biología reproductiva de *A. maura*.

## **4. OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Comprender la estrategia reproductiva del hacha *Atrina maura* en Baja California Sur, analizando la organización de la gónada, gametogénesis, su sexualidad y diferentes tácticas reproductivas en tres zonas de captura comercial en el noroeste de México.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

#### **Capítulo 1. Organización de la gónada de acuerdo con el grado de desarrollo en *Atrina maura*.**

- Describir las características histológicas de la maduración gonádica de *A. maura* e investigar la relación entre la maduración gonádica y la temperatura del agua.
- Describir las características ultraestructurales de la espermatogénesis en *A. maura* y enfatizar las características morfológicas del espermatozoide que son consideradas taxonómicamente y filogenéticamente relevantes,

para permitir comparaciones interespecíficas y aportar información sobre el modelo general del espermatozoide en la familia Pinnidae.

- Describir las fases ultraestructurales de la formación de gametos femeninos de *A. maura*, en forma particular el proceso de la degeneración de ovocitos; y analizar las células auxiliares que intervienen en ambos procesos.

## **Capítulo 2. Hermafroditismo protándrico en *Atrina maura*.**

- Examinar la sexualidad del hacha *A. maura* en tres poblaciones geográficamente separadas usando diferentes enfoques: análisis histológicos, proporciones sexuales en relación con la estructura de tallas, y comparaciones entre sexos de la talla de primera madurez.

## **Capítulo 3. Variaciones estacionales y geográficas de los parámetros reproductivos de *Atrina maura* en tres localidades del noroeste del Pacífico mexicano.**

- Describir cómo las variaciones locales en la temperatura y disponibilidad de alimento pueden influenciar la gametogénesis y las características reproductivas en una población.
- Establecer si los parámetros reproductivos muestran tendencias latitudinales identificables y determinar cuáles deben ser vistos como plásticos o variables a escala local y entender el posible valor adaptativo de las tácticas observadas.

## 5. RESULTADOS

### CAPÍTULO 1

---

#### ORGANIZACIÓN DE LA GÓNADA DE ACUERDO CON EL GRADO DE DESARROLLO EN *Atrina maura*

##### 1. ENFOQUE HISTOLÓGICO

Este trabajo fue publicado bajo la siguiente referencia:

Camacho-Mondragón, M. A., M. Arellano-Martínez & B. P. Ceballos-Vázquez.  
2012. PARTICULAR FEATURES OF GONADAL MATURATION AND SIZE AT  
FIRST MATURITY IN *Atrina maura* (BIVALVIA: PINNIDAE). *Scientia Marina* 76(3):  
539-548.

## RESUMEN

El proceso de maduración gonádica de *Atrina maura* se analizó histológicamente y usando criterios cuantitativos. Se reportan características particulares que no han sido descritas previamente para la especie: ausencia de la fase de indiferenciación y reabsorción masiva de gametos, tanto en hembras como en machos, cuando la temperatura del agua alcanza los 25°C; en los machos presencia de eyaculación continua simultánea con otras fases de desarrollo gonádico y células adipogranulares arregladas alrededor de las paredes de los acinos que disminuyen conforme avanza la maduración, sugiriendo un papel energético. La atresia presentó dos fases: estructuras citoplasmáticas con degeneración ovocitaria y digestión por hemocitos. El diámetro de los ovocitos fue mayor que los reportados para organismos de cultivo. La talla de primera madurez para las hembras se estableció en 23.3 cm de altura de la concha (AC) (12.2 cm de longitud de la concha, LC) y para los machos en 22.8 cm de AC (12.0 cm de LC).

## INTRODUCCIÓN

Los bivalvos de la familia Pinnidae, comúnmente llamados hachas (en inglés fan mussels o pen shells), son altamente apreciados en muchos países (incluyendo México y particularmente en Asia). *Atrina maura* se encuentra en hábitats litorales arenosos y lodosos formando densas agregaciones y está ampliamente distribuida a lo largo de las costas templadas y tropicales del Pacífico oriental, desde Baja California Sur, México (incluyendo el Golfo de California) hasta Perú.

Algunas especies de pinnidos han disminuido sus abundancias a lo largo de las costas del mundo o se encuentran seriamente amenazados, lo cual justifica incluirlos en el listado de especies completamente protegidas (Cabanellas-Reboredo *et al.*, 2009). A pesar de esto, aún no es el caso de *A. maura* en México, ya que las capturas de esta especie se encuentran en aumento y no existe una regulación de manejo pesquero.

Como resultado de la creciente demanda comercial de las especies de la familia Pinnidae, la mayoría de los estudios en estos bivalvos se han enfocado en evaluaciones pesqueras y desarrollo de técnicas para su cultivo (Kennedy *et al.*, 2001; Lora-Vilchis *et al.*, 2004; Safi *et al.*, 2007). Relativamente pocos estudios se ha dirigido hacia aspectos taxonómicos, ecológicos y fisiológicos de las especies en esta familia (Butler *et al.*, 1993; De Gaulejac *et al.*, 1995; Urban, 2001; Beer & Southgate, 2006; Idris *et al.*, 2008). La información disponible en *Atrina maura* está enfocada principalmente en la estandarización de técnicas de cultivo (Cardoza-Velasco & Maeda-Martínez, 1997) y aspectos reproductivos se han llevado a cabo con organismos que proceden de cultivos o en condiciones controladas de laboratorio (Rodríguez-Jaramillo *et al.*, 2001; Enríquez-Díaz *et al.*, 2003). En contraste, pocas investigaciones se han realizado con poblaciones naturales (Soria, 1989; Ahumada-Sempoal *et al.*, 2002; Angel-Pérez *et al.*, 2007; Angel-Dapa *et al.*, 2010).

Las observaciones en el campo son las evidencias más confiables que se pueden obtener sobre el inicio de la reproducción y la época de desove. Sin embargo, es muy difícil de observar un bivalvo justo al momento del desove. Por otra parte, las observaciones sobre el desove en condiciones de laboratorio o experimentales tienen poco significado, y pueden causar conclusiones dudosas sobre la temporalidad de la reproducción en condiciones naturales. Por lo tanto, la

información obtenida a partir del análisis microscópico de las gónadas en organismos silvestres es la más confiable (Seed, 1976).

Para el estudio de la reproducción de los bivalvos, el análisis histológico del tejido gonádico de individuos recolectados en intervalos regulares, es el método más confiable para determinar los cambios gonádicos estacionales. Además, permite determinar la temporalidad del desove y el porcentaje de organismos desovantes en una población natural, lo cual es útil en la predicción de la fijación de semillas para su uso en acuacultura y como parte de las recomendaciones para el manejo de su pesquería (Brousseau, 1987; Jaramillo & Navarro, 1995; Alfaro *et al.*, 2001). Asimismo, las investigaciones que llevan a cabo muestreos directamente en las poblaciones silvestres pueden revelar cambios a nivel histológico, bioquímico o metabólico que conducirán a un mayor conocimiento de la reproducción y por lo tanto a un mejor control y optimización de la producción de bivalvos.

Caracterizar el desarrollo gonádico, calcular la talla de primera madurez y analizar los índices morfofisiológicos no sólo es una aportación al conocimiento, sino que sirven como herramientas de monitoreo. La talla de primera madurez es utilizada para establecer la talla mínima de captura, un parámetro importante para regular el esfuerzo pesquero en muchas especies. La talla mínima de captura debe ser mayor que la talla de primera madurez para garantizar que los individuos puedan reproducirse al menos una vez, asegurando así un stock parental lo suficientemente grande para mantener la población. Igualmente, la determinación de la época reproductiva, los patrones de desarrollo gonádico y el tipo de desove son aspectos claves para ampliar el conocimiento biológico de una especie, además, resultan indispensables para realizar estudios posteriores sobre fecundidad y viabilidad de los huevos. Finalmente, la información acerca de la estacionalidad del proceso reproductivo y los factores que la regulan (particularmente temperatura del agua y disponibilidad de alimento) provee de elementos básicos para el manejo pesquero así como para el diseño de ambientes artificiales para el control de la reproducción.

En este estudio se describen algunas características histológicas de la maduración gonádica de *A. maura* y se investiga la relación entre la maduración gonádica y la temperatura del agua en la Ensenada de La Paz, B.C.S., México.

Adicionalmente, se documenta por primera vez la talla de primera madurez para esta especie.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### ***Área de estudio y toma de muestras***

La Ensenada de La Paz (24°06'N-24°11'N y 110°19'W-110°26'W) es una laguna costera somera (<10 m de profundidad) situada al sur de la Bahía de La Paz en el Golfo de California, México. Esta es el área principal área de pesca de *A. maura* dentro de la bahía y una de las cinco regiones de pesca en el estado de Baja California Sur. Durante 2008, se recolectaron mensualmente entre 20 y 30 especímenes adultos de *A. maura* a profundidades entre 3 y 8 m por medio de buceo semi-autónomo entre las 8:00 y el medio día. Se registró la temperatura del agua al momento del muestreo con un termómetro digital BK Precision 710 con una incertidumbre de  $\pm 0.01$  °C. En el laboratorio, los ejemplares se limpiaron de toda la fauna epibionte y se registraron la altura (AC, distancia en línea recta desde el umbo al margen ventral de la concha) y la longitud de la concha (LC, distancia en línea recta desde el margen anterior al margen posterior de la concha) ( $\pm 1$  mm), así como el peso total (PT) y el peso sin concha (PSC) ( $\pm 0.1$  g). La masa visceral y el músculo aductor se diseccionaron y se registraron sus pesos individuales (PV y PM, respectivamente) ( $\pm 0.1$  g).

### ***Proporción sexual y talla de primera madurez***

Debido a que *A. maura* carece de dimorfismo sexual, los especímenes fueron sexados a través del análisis microscópico de las gónadas y se calculó la proporción sexual mensual. Además, se estimó la talla de primera madurez para cada sexo utilizando el método de Somerton (1980). Se calcularon las frecuencias relativas y las frecuencias relativas acumuladas por intervalo de talla de 1 cm, y éstas últimas se ajustaron a un modelo logístico a partir del cual se estimó la talla en la que el 50% de los individuos están sexualmente maduros. El cálculo se realizó con todos los organismos muestreados debido a que todos presentaron evidencia de desarrollo gametogénico. Se consideró tanto la AC como la LC ya que la AC posee un significado biológico y la LC es relevante para el manejo pesquero.

### **Análisis histológico e índices de condición**

Dado que *A. maura* presenta una gónada difusa (la gónada infiltra la glándula digestiva formando la masa visceral), una porción de la masa visceral que incluyera tejido gonádico fue extraída de cada espécimen y fijada en formol al 10%. Se utilizó la técnica histológica convencional (Humason, 1979) que consiste en deshidratación a través de una serie de alcoholes de concentraciones crecientes, seguido de aclarado por medio de Hemo-De® e inclusión en Paraplast-Xtra®. Se realizaron cortes de 5 µm de grosor, tinción con hematoxilina-eosina y revisión bajo un microscopio de luz.

La caracterización inicial de las fases de desarrollo gonadal se basó en la propuesta por Rodríguez-Jaramillo *et al.* (2001) para la misma especie: actividad temprana, desarrollo, actividad tardía, madurez, desove y posdesove. Estas fases fueron modificadas considerando el tamaño, forma y grado de desarrollo de los acinos; presencia y grado de desarrollo de los gametos; localización de los gametos en los acinos; tamaño de los ovocitos y cantidad de tejido conectivo. En los machos, se registró la presencia de células adipogranulares (CAG); estas células fueron identificadas utilizando la tinción de Sudan Negro. Para fortalecer las fases de desarrollo asignadas con criterios cuantitativos, los cortes histológicos de 18 hembras y 18 machos (seis por cada fase de desarrollo establecidas en este estudio) fueron digitalizadas y analizadas utilizando el programa SIGMA SCAN PRO (Versión 5.0, Systat Software, Inc.). En los ovarios de cada hembra estudiada, se midieron los diámetros de todos los ovocitos encontrados dentro de 20 acinos. Después, se calculó la proporción de cada tipo de ovocito por fase de desarrollo ovárico. Los ovocitos se clasificaron de acuerdo a las cuatro categorías descritas por Rodríguez-Jaramillo *et al.* (2001) y Enriquez-Díaz *et al.* (2003) basados en su grado de desarrollo: ovogonias, ovocitos previtelogénicos, ovocitos vitelogénicos y ovocitos post-vitelogénicos. En los machos, se midió el área ocupada por las CAG en cada fase de desarrollo testicular. En ambos sexos, las gónadas con presencia de reabsorción de gametos no se consideraron cuantitativamente debido a que este proceso afecta la integridad del tejido gonádico. El ciclo ovárico en *A. maura* fue determinado considerando las diferentes fases de desarrollo identificadas a través de los análisis histológicos y su secuencia en la madurez del ovario.

Además, se examinaron las variaciones mensuales en el Índice de Condición ( $IC=PSC/PT \times 100$ ) e Índice de Rendimiento Muscular ( $IRM=PM/PSC \times 100$ ).

### ***Ciclo reproductivo***

Con la finalidad de describir el ciclo reproductivo, se calcularon y graficaron las frecuencias relativas mensuales de cada fase de desarrollo gonádico. Para evaluar el efecto de la temperatura del agua en la reproducción de *A. maura*, se examinó la relación entre la temperatura y el ciclo reproductivo.

### ***Análisis estadísticos***

Se utilizó un análisis de varianza (ANDEVA) de una vía para examinar la relación entre las fases de desarrollo gonádico y la frecuencia de los diferentes tipos de ovocitos o el porcentaje de área ocupada por las CAG. También se aplicó un ANDEVA de una vía para examinar las variaciones mensuales en el IC e IRM. Cuando los ANDEVAs detectaron un efecto estadísticamente significativo, se llevó a cabo una prueba *a posteriori* de comparación de medias (Tukey). Las variables expresadas como frecuencias (%) fueron transformadas con arcoseno (Zar, 1996) para reducir la dependencia de la variancia de las muestras sobre las medias y para normalizar la distribución de los datos. Sin embargo, los datos están expresados como medias sin transformar y errores estándar. Todos los análisis estadísticos fueron llevados a cabo utilizando el programa STATISTICA para Windows (Versión 6.0, Statsoft). Las diferencias en las proporciones sexuales fueron probadas usando una prueba de  $\chi^2$  con la corrección de continuidad de Yates (Zar, 1996). En todos las pruebas se estableció un nivel de significancia de  $\alpha=0.05$ .

## **RESULTADOS**

### ***Análisis biométricos, proporción de sexos y talla de primera madurez***

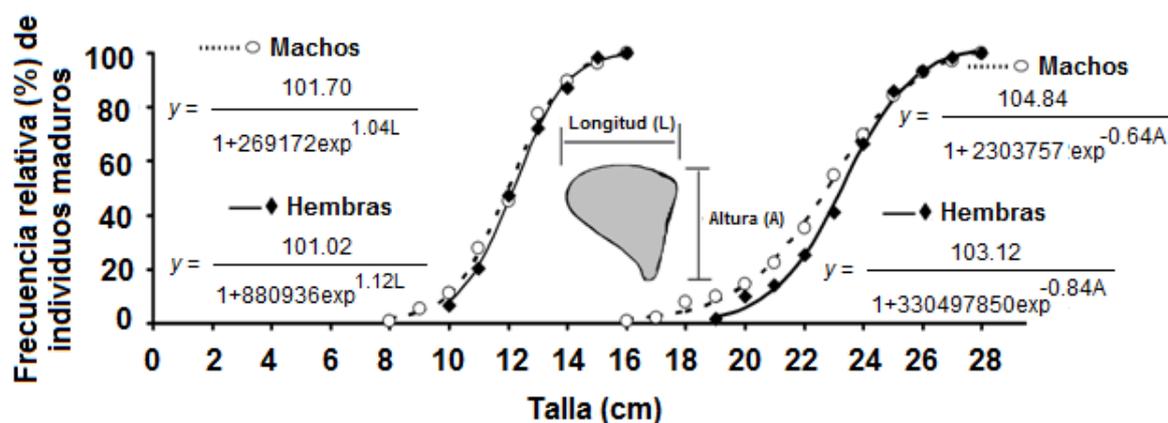
Se examinaron un total de 226 individuos, 52% fueron hembras y 48% fueron machos. La proporción de sexos total fue 1.06H:1.00M. La proporción sexual fue significativamente diferente ( $\chi^2$ ,  $P<0.05$ ) de la proporción esperada

(1:1) sólo en febrero (3.00H:1.00M). La talla y peso de los especímenes no mostraron diferencias significativas entre sexos (ANDEVA,  $P > 0.05$ ) (Tabla 1).

**Tabla 1.** Talla y peso (media  $\pm$  EE, intervalo) de la muestra total estudiada de hembras y machos de *Atrina maura*.

	Hembras	Machos	ANDEVA
Altura de concha (cm)	24 $\pm$ 0.17 (19 – 28.1)	23.5 $\pm$ 0.25 (16 – 28.2)	P = 0.09
Longitud de concha (cm)	13.1 $\pm$ 0.13 (10 – 16.2)	12.9 $\pm$ 0.15 (8.9 – 16.2)	P = 0.35
Peso Total (g)	282.9 $\pm$ 8.34 (113.2 – 521.6)	290.9 $\pm$ 11.45 (75.8 – 576.8)	P = 0.57

La talla de primera madurez para las hembras se estableció en 23.3 cm de AC y en 12.2 cm de LC ( $r^2=0.99$ ) y para los machos en 22.8 cm de AC y en 12.0 cm de LC ( $r^2=0.99$ ) (Fig. 1). Sin embargo, se encontraron hembras maduras desde los 19 cm de AC (10 cm de LC) y machos maduros a partir de los 16 cm de AC (8.9 cm de LC).

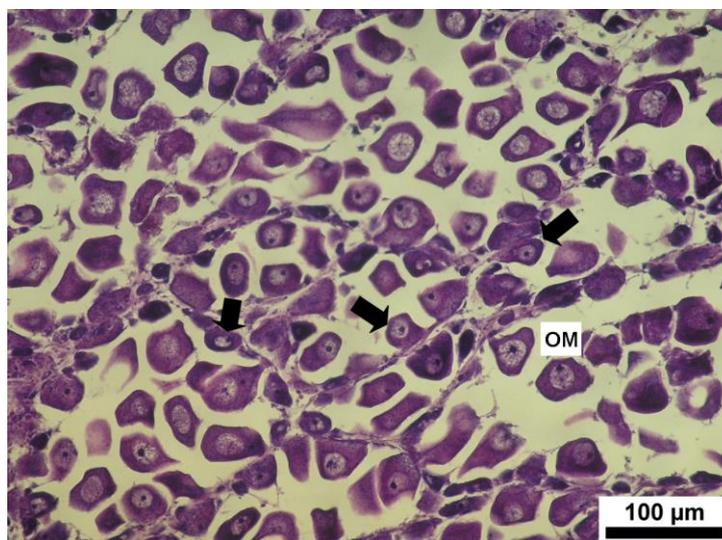


**Figura 1.** Talla de primera madurez para machos y hembras de *Atrina maura* en la Ensenada de La Paz, México. Se incluyen los modelos ajustados.

### **Desarrollo gonádico**

La observación microscópica de las gónadas reveló la presencia de gametos en diferentes fases de desarrollo dentro de un mismo individuo e incluso dentro del mismo acino. Fue posible determinar que la producción de gametos es continua, particularmente en los machos, mientras que el desove es parcial. El diámetro de los 6,618 ovocitos medidos cambió de acuerdo al grado de desarrollo. Las ovogonias midieron entre 7.0 y 20.8  $\mu\text{m}$  ( $12.5 \pm 0.19$  EE) y los ovocitos previtelogénicos midieron entre 12.7 y 46.2  $\mu\text{m}$  ( $27.9 \pm 0.33$ ). Los ovocitos vitelogénicos oscilaron entre 23.7 y 56.5  $\mu\text{m}$  ( $40.7 \pm 0.29$ ), y los ovocitos post-vitelogénicos oscilaron entre 29.4 y 56.0  $\mu\text{m}$  ( $41.6 \pm 0.29$ ).

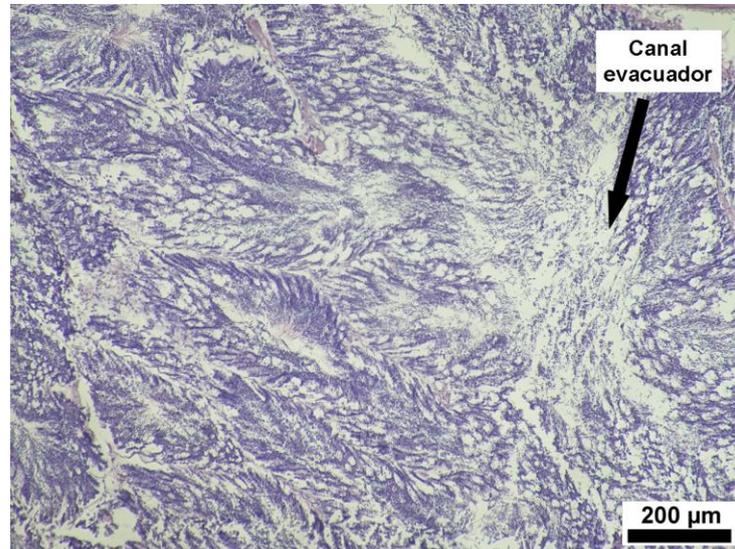
Algunas características observadas en el desarrollo gonádico de *A. maura* no habían sido descritas previamente para esta especie. En las hembras, se observaron ovarios que han iniciado la liberación de ovocitos y al mismo tiempo contienen gametos en desarrollo (ovocitos previtelogénicos) adheridos a las paredes de los acinos, indicando por lo tanto la producción y liberación continua de gametos (Fig. 2).



**Figura 2.** Microfotografía de un ovario en desove con nuevo desarrollo en *Atrina maura*. Las flechas indican algunos ovocitos adheridos a la pared del acino. OM, ovocitos maduros.

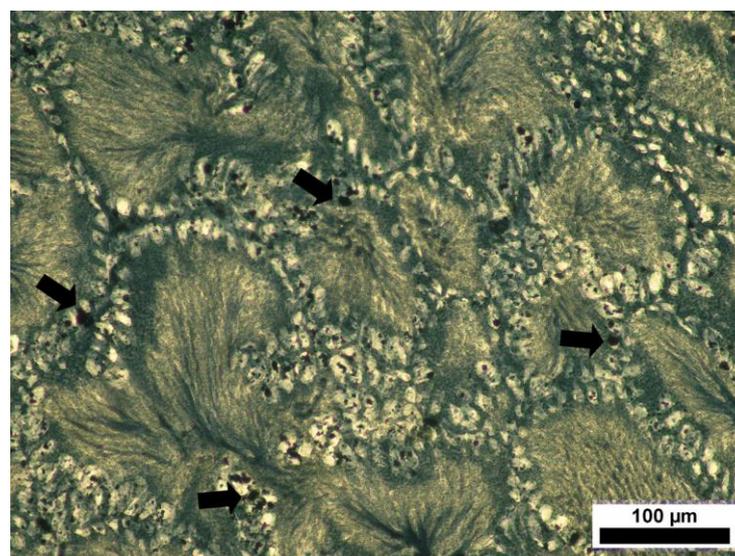
En los machos, la mayoría de los testículos con actividad espermatogénica (producción de gametos) presentaron zonas con evidencia clara de liberación de gametos (unión de acinos con abundantes espermatozoides y canales evacuadores parcialmente vacíos). La producción y liberación continua de

gametos (desove con actividad espermática al mismo tiempo) fue más persistente en machos, sólo se observaron ocho testículos (de individuos que midieron entre 22.0 y 26.2 cm AC) sin desarrollo espermático pero que contenían abundantes espermatozoides, aparentemente siendo liberados (Fig. 3).



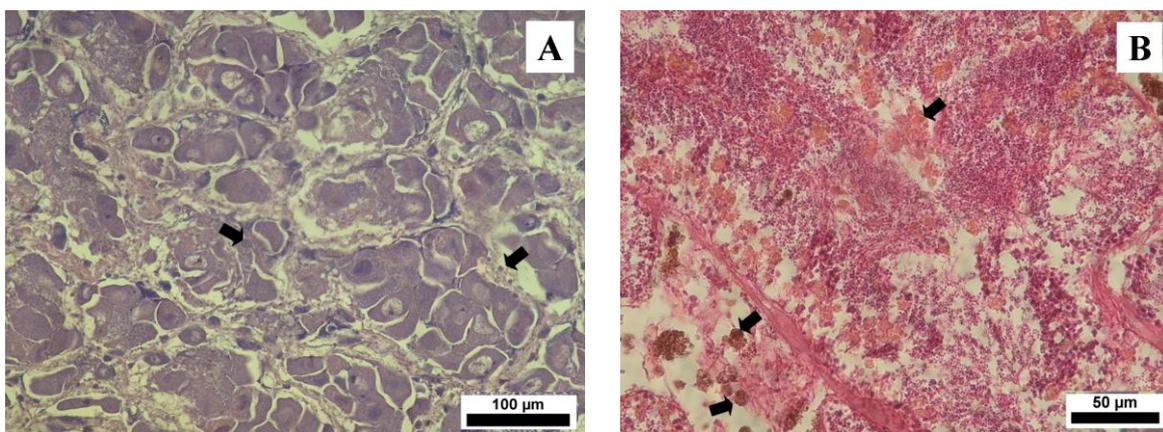
**Figura 3.** Microfotografía de un testículo en eyaculación de *Atrina maura* sin evidencia de desarrollo espermático.

Una característica interesante que persistió durante el desarrollo testicular fue la presencia de una gran cantidad de estructuras en forma de células adipogranulares rodeando las células vesiculares en cada acino (Fig. 4).



**Figura 4.** Microfotografía de células adipogranulares (CAG) durante el desarrollo testicular en *Atrina maura*. Las CAG (células blancas) están evidenciadas por la acumulación de lípidos (puntos negros, tinción Sudán B), algunos de ellos están indicados por flechas.

Tanto en los ovarios como en los testículos se observó una lisis masiva con deterioro y pérdida de la integridad de los acinos (Fig. 5). Este proceso fue observado en 44 hembras ( $24.2 \pm 2.0$  cm AC) y en diez machos ( $26.6 \pm 1.4$  cm AC) y su frecuencia se describe más adelante como reabsorción. Estas gónadas presentaron una gran cantidad de gametos maduros atrésicos (ovocitos post-vitelogénicos o espermatozoides). Se observaron numerosos fagocitos (hemocitos macrófagos) dentro y entre de los acinos, que contribuyen a la lisis de los gametos. También se observó tejido conectivo invadiendo la gónada.



**Figura 5.** Microfotografía de lisis masiva (reabsorción) en las gónadas de *Atrina maura*: A) Ovario y B) Testículo. Las flechas indican la presencia de fagocitos.

Considerando tanto las observaciones de este estudio (descritas anteriormente), y las observaciones del desarrollo gametogénico reportadas para esta especie por otros autores, se identificaron tres fases de desarrollo (Tabla 2) y no se encontraron organismos indiferenciados. En hembras, estas etapas fueron: desarrollo, madurez y desove. En machos, debido a que todos los especímenes mostraron evidencia de desove pero al mismo tiempo tenían gametos en diferentes fases de desarrollo, la definición de las fases también consideró estas características: desove tipo 1, desove tipo 2 y desove tipo 3. Además, en ambos sexos el proceso de reabsorción también fue considerado como parte del ciclo reproductivo, dado que en algunos meses todos los especímenes estuvieron en reabsorción gonádica. Debido a que la producción de gametos en *A. maura* fue continua, fue difícil entre gónadas con desarrollo avanzado y gónadas maduras. Entonces, un ovario se consideró en fase de desarrollo cuando no se observaron ovocitos post-vitelogénicos, mientras que un testículo fue clasificado en desove

tipo 1 cuando el área ocupada por las CAG fuera mayor al 15% y con evidente actividad espermatogénica.

**Tabla 2.** Descripción de las fases de desarrollo gonádico en *Atrina maura*.

Hembras	Machos
<p><b>Desarrollo.</b> Numerosas ovogonias y ovocitos previtelogénicos adheridos a las paredes de los acinos. Presencia de algunos ovocitos entrando a la fase vitelogénica, evidenciados por el aumento en el área citoplasmática. En ovarios más desarrollados, aparecen ovocitos vitelogénicos libres en el lumen pero nunca se observan ovocitos post-vitelogénicos. Los acinos se encuentran rodeados por tejido conectivo con poco espacio entre ellos.</p>	<p><b>Desove tipo 1.</b> Son visibles zonas que evidencian una liberación de gametos en curso: grupos de acinos y acumulación de espermatozoides, así como canales evacuadores. Estratificación evidente de gametos con diferentes grados de desarrollo. Al inicio de esta fase, existen capas gruesas de espermatogonias y espermatocitos en las paredes de los acinos. Al avanzar el desarrollo, las espermatogonias se vuelven menos abundantes y la cantidad de espermatocitos, espermátidas y espermatozoides se incrementa. Presencia de una gran cantidad (&gt;15% del área de la gónada) de células adipogranulares (ACG) entre los acinos.</p>
<p><b>Madurez.</b> Acinos prácticamente llenos de ovocitos post-vitelogénicos libres en el lumen. Debido a su abundancia, estos ovocitos adquieren una forma poliédrica. Algunos ovocitos previtelogénicos adheridos a las paredes de los acinos. Reducción del tejido conectivo sin espacio entre los acinos.</p>	<p><b>Desove tipo 2.</b> Se presentan zonas que evidencian una evacuación de gametos en curso. Acinos llenos de espermatozoides, con sus flagelos apuntando hacia el lumen. Las capas de espermatogonias y espermatocitos se han adelgazado y la actividad espermatogénica continúa. Presencia de células adipogranulares (ACG) entre los acinos (&lt;15% del área de la gónada). Tejido conectivo poco evidente.</p>
<p><b>Desove.</b> Acinos parcialmente vacíos, con cantidades variables de ovocitos post-vitelogénicos dependiendo del progreso del desove. En algunos ovarios, se presentan ovocitos previtelogénicos adheridos a las paredes de los acinos, indicando el inicio de un nuevo desarrollo o remaduración. El tejido conectivo es evidente, con mucho espacio entre los acinos.</p>	<p><b>Desove tipo 3.</b> Disminución en el número de espermatozoides en el centro de los acinos. Presencia de canales evacuadores. Algunos acinos parecen prácticamente vacíos, mientras otros están aun llenos de espermatozoides. Sin actividad espermatogénica. Presencia de células adipogranulares (ACG) entre los acinos (&lt;15% del área de la gónada). Tejido conectivo poco evidente.</p>
<p><b>Reabsorción.</b> Las gónadas muestran las mismas características micro- y macroscópicas de la fase de madurez, pero contienen grandes cantidades de gametos maduros en proceso de lisis. La degeneración celular es evidente debido a la pérdida de las características estructurales básicas: deterioro del núcleo y rompimiento de las membranas plasmática y vitelina. Se pueden observar numerosos fagocitos dentro y entre los folículos.</p>	

El análisis de la frecuencia de ocurrencia por tipos de ovocitos y de porcentaje de área ocupada por CAG confirmaron también las fases de desarrollo gonádico identificadas en ambos sexos con base en las observaciones histológicas. En hembras, la frecuencia de los diferentes tipos de ovocitos cambió significativamente de acuerdo al grado de desarrollo ovárico (ANDEVA,  $P < 0.05$ ) (Tabla 3). La cantidad de ovogonias fue significativamente mayor en la fase de desarrollo comparada con la fase de madurez; sin embargo, la fase de desove no difirió significativamente de las otras fases en términos de la frecuencia de ovogonias. Sin embargo, los ovocitos previtelogénicos fueron significativamente más abundantes durante las fases de desarrollo y desove que en la fase de madurez. La frecuencia de los ovocitos vitelogénicos durante la fase de desarrollo fue significativamente mayor que en las fases de madurez y desove. Finalmente, los ovocitos post-vitelogénicos fueron más abundantes en la fase de madurez que en la fase de desove pero la diferencia no fue significativa.

**Tabla 3.** Porcentaje de ocurrencia (media  $\pm$  EE) de los diferentes tipos de ovocitos por fase de desarrollo ovárico en 18 hembras de *Atrina maura*. En las filas, los valores con letras diferentes son significativamente diferentes.

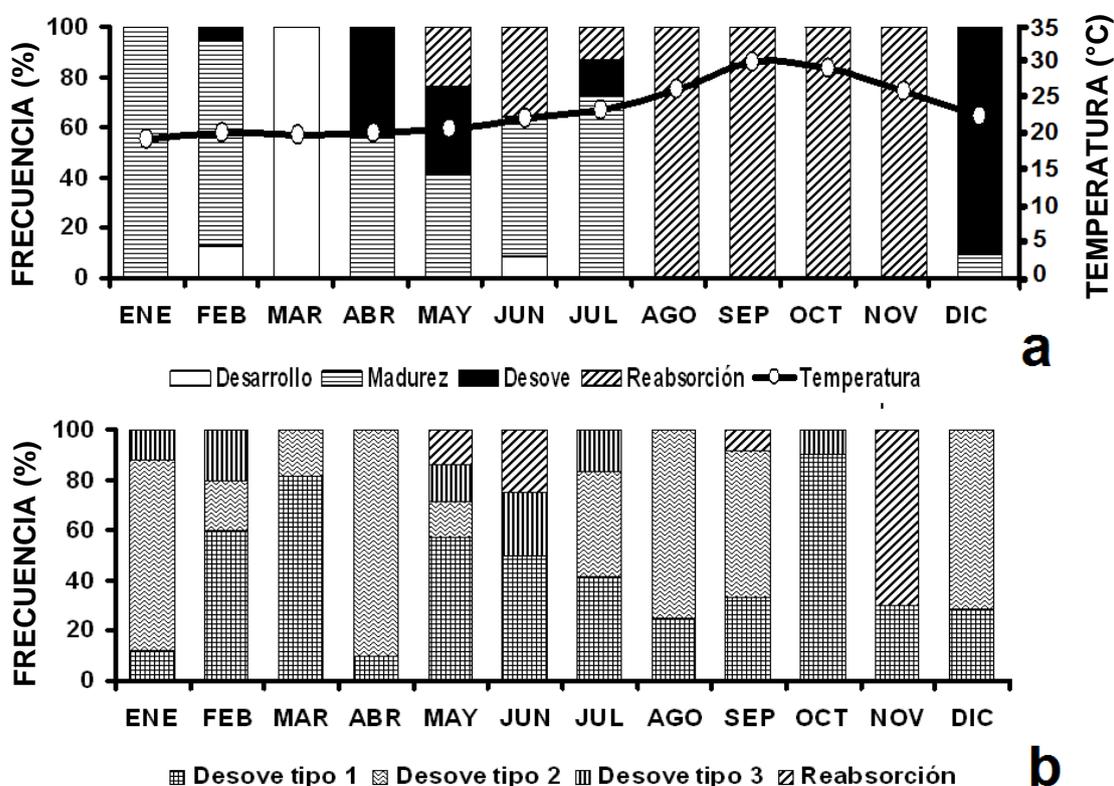
Tipo de ovocito	Fase de desarrollo ovárico			ANDEVA
	Desarrollo	Madurez	Desove	
Ovogonia	16.3 $\pm$ 2.8 <sup>b</sup>	3.0 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>	10.0 $\pm$ 3.2 <sup>ab</sup>	P = 0.022
Previtelogénico	43.3 $\pm$ 10.3 <sup>b</sup>	11.1 $\pm$ 3.2 <sup>a</sup>	27.4 $\pm$ 4.1 <sup>b</sup>	P = 0.006
Vitelogénico	40.4 $\pm$ 7.5 <sup>b</sup>	6.4 $\pm$ 2.2 <sup>a</sup>	9.2 $\pm$ 2.3 <sup>a</sup>	P = 0.004
Post-vitelogénico	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	79.5 $\pm$ 6.5 <sup>b</sup>	53.5 $\pm$ 5.2 <sup>b</sup>	P < 0.001

En machos, el área ocupada por las CAG varió de acuerdo a la fase de desarrollo. Estas estructuras fueron significativamente más abundantes (ANDEVA,  $P < 0.05$ ) al inicio del desarrollo (fase desove tipo 1: 21.10  $\pm$  3.76), y aunque disminuyeron al avanzar la madurez, las CAG permanecen a lo largo del ciclo gonádico (fase desove tipo 2: 4.62  $\pm$  1.52; fase desove tipo 3: 8.31  $\pm$  4.03).

### Ciclo reproductivo

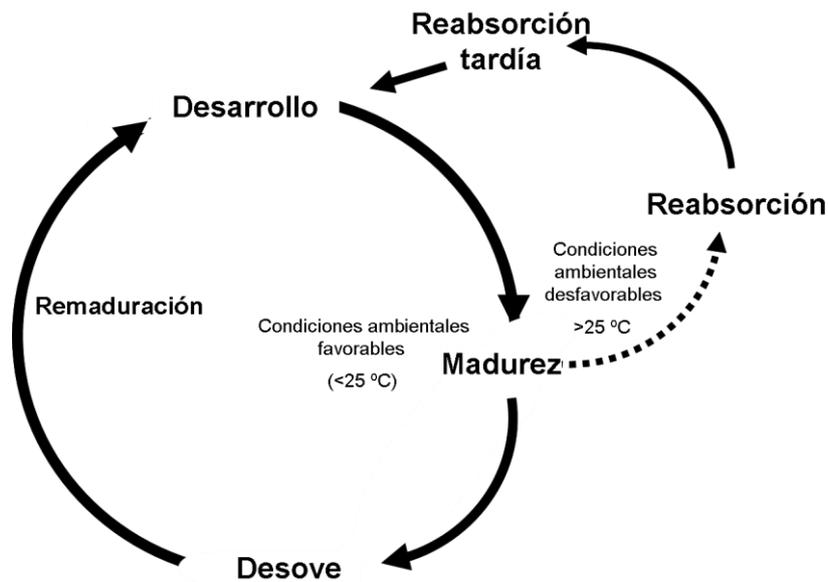
El ciclo reproductivo de *A. maura* y la variación de la temperatura del agua en la Ensenada de La Paz se muestran en la Figura 6. La temperatura del agua presentó una variación estacional con los valores más bajos de diciembre a junio (21.6-23.7 °C) y los valores más altos de julio a noviembre (25.5-30.4 °C) (Fig. 6a). No se pudo identificar un periodo de inactividad reproductiva (fase de reposo) evidenciado por la presencia de individuos indiferenciados. Las hembras maduras fueron encontradas de diciembre a julio con valores altos en enero y febrero (>80%). El desove ocurrió de febrero a julio con un valor alto en diciembre (90%) (Fig. 6a). En machos, el desove con diferentes grados de remaduración fue observado a través de todo el periodo de estudio (Fig. 6b).

En hembras, la reabsorción de gametos ocurrió en bajos porcentajes (entre 14 % y 36 %) de mayo a julio; sin embargo, esta condición apareció en todos los especímenes observados de agosto a noviembre, coincidiendo con las temperaturas del agua más altas (>25 °C). Los machos también presentaron gónadas en proceso de reabsorción de gametos en los mismos periodos, i.e. mayo, junio y septiembre (<25 %), con un valor alto en noviembre (70 %).



**Figura 6.** Variación de la temperatura del agua en la Ensenada de La Paz y ciclo reproductivo de hembras (a) y machos (b) de *Atrina maura*.

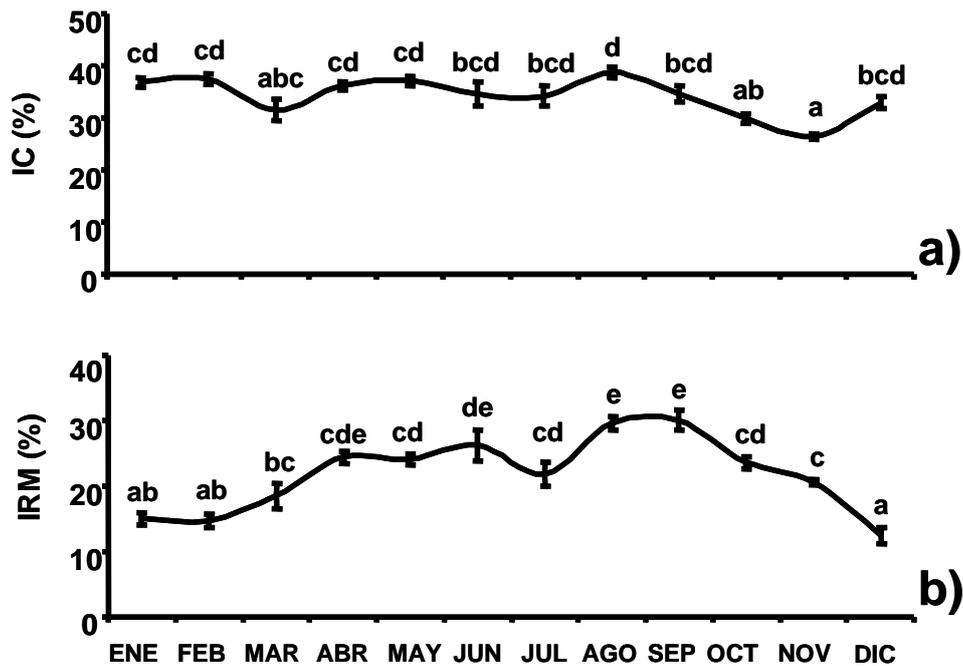
El ciclo gonádico (ocurrencia secuencial de las fases de desarrollo) de *A. maura* está esquemáticamente ilustrado en la Figura 7. En la Ensenada de La Paz, el ciclo ovárico de *A. maura* incluye tres fases de desarrollo y un proceso de reabsorción de gametos, que se relacionan cíclicamente y llevan a dos vías dependientes de las condiciones ambientales, aparentemente dirigidas por la temperatura del agua.



**Figura 7.** Ilustración esquemática del ciclo ovárico de *Atrina maura* en la Ensenada de La Paz, México.

### ***Índices de condición y de rendimiento muscular***

Se detectaron diferencias mensuales significativas (ANDEVA,  $P < 0.05$ ) en los valores del IC e IRM, aunque no pudo reconocerse una estacionalidad definida (Fig. 8). Sin embargo, se observó una disminución significativa en ambos índices de agosto a noviembre en el IC y hasta diciembre en el IRM. Tales disminuciones se relacionaron con la alta frecuencia de gónadas en reabsorción de gametos y, en el caso del IRM, también con los desoves ocurridos en diciembre.



**Figura 8.** Variaciones mensuales (media  $\pm$  EE) en: a) Índice de Condición y b) Índice de Rendimiento Muscular para machos y hembras combinados de *Atrina maura*. Las muestras mensuales con diferentes letras son significativamente diferentes.

## DISCUSIÓN

En la Ensenada de La Paz, *A. maura* presentó una producción continua de gametos (sólo interrumpido por el proceso de reabsorción dependiente de la temperatura) sin un patrón ambiental evidente en el proceso de desove. Sin embargo, la liberación de gametos sólo ocurrió cuando la temperatura disminuyó debajo de los 25 °C.

El tamaño del ovocito es un rasgo importante desde los puntos de vista ecológico y evolutivo, ya que refleja la inversión energética materna y tiene influencia en la adecuación (fitness) maternal y en la de la descendencia. El tamaño del ovocito puede estar influenciado por la talla y origen de la hembra (laboratorio vs. condiciones naturales). En este sentido, se han encontrado resultados contrastantes en diferentes organismos acuáticos, incluyendo correlaciones positivas entre la talla o condición de la hembra y la talla del huevo o de la descendencia (estrella marina: George, 1994; gasterópodos: Ito, 1997; pez: Marteinsdottir & Steinarsson, 1998), correlaciones negativas (pez: Iguchi & Yamaguchi, 1994), y sin correlación (pez: Marsh, 1984; equinoideos: Lessios, 1987; anfípodos: Glazier, 2000). Adicionalmente, ha sido demostrado que

mejillones adultos estresados producen huevos y larvas más pequeños y de menor calidad (Bayne, 1972). En el presente estudio, los diámetros de los diferentes tipos de ovocitos de *A. maura* fueron mayores que los reportados en otros estudios llevados a cabo bajo condiciones controladas (Rodríguez-Jaramillo *et al.*, 2001; Enríquez-Díaz *et al.*, 2003). En este sentido, Rodríguez-Jaramillo *et al.* (2001) estudiaron especímenes criados en laboratorio que fueron más pequeños ( $9.8 \pm 0.1$  cm AC) que las examinados en este estudio (19 a 28.2 cm AC). Los criterios cualitativos son necesarios para describir los procesos reproductivos relacionados con el desarrollo gonádico. Sin embargo, la información cuantitativa detallada reduce la subjetividad y elimina los problemas semánticos inherentes a las descripciones cualitativas, por lo tanto mejora la habilidad para obtener información ecológicamente significativa (Barber & Blake, 1991). Con base en lo anterior, el esquema de tres fases de desarrollo gonádico propuesto para los machos (desove tipo 1, desove tipo 2 y desove tipo 3) y para las hembras (desarrollo, madurez y desove) son el resultado combinado de análisis cualitativos (observaciones microscópicas y criterios morfológicos) y criterios cuantitativos (porcentajes de área ocupada por las CAG y frecuencias de ocurrencia de cada tipo de ovocito). Esto permitió establecer que, aunque los machos de *A. maura* liberan gametos continuamente en la Ensenada de La Paz, las etapas de desarrollo pueden ser diferenciadas basado en la abundancia de las CAG. De manera similar, en las hembras la frecuencia de ocurrencia de los diferentes tipos de ovocitos indicó la fase de desarrollo (desarrollo, madurez y desove). Estos criterios por lo tanto parecen más adecuados para describir el proceso de maduración gonádica de especímenes silvestres de *A. maura* del área de estudio. En este caso, la actividad gametogénica continua de *A. maura* (evidenciada por la presencia de ovocitos en diferentes fases de desarrollo junto con ovocitos en crecimiento en la periferia de los acinos en organismos en desove) impidió una clasificación más fina de los especímenes en fases reproductivas intermedios (actividad temprana, desarrollo y actividad tardía). Este fenómeno ya ha sido reportado que ocurre en esta especie, tanto en individuos silvestres (Angel-Pérez *et al.*, 2007) como en especímenes criados o acondicionados en laboratorio (Rodríguez-Jaramillo *et al.*, 2001).

Contrario a los reportes para la costa de Oaxaca (Angel-Pérez *et al.*, 2007), no se observaron especímenes indiferenciados en la Ensenada de La Paz. La

ausencia de un periodo de inactividad reproductiva (fase de reposo) en esta población puede ser una respuesta a las condiciones ambientales locales, particularmente a la disponibilidad de alimento (Baqueiro & Aldana, 2000; Villalejo-Fuerte *et al.*, 2000). La Ensenada de La Paz es un área favorable para la reproducción continua de *A. maura* ya que suministra una fuente constante e inmediata de alimento para organismos filtradores. Esta zona presenta una productividad primaria alta (abundancia y diversidad de fitoplancton); además, su porción interna es una zona de baja energía en términos de fuerza de la corriente, así que funciona como una trampa natural de materia orgánica particulada (detritus) que puede ser re-suspendida incluso por corrientes débiles (Aguirre-Bahena, 2002) y luego consumida por consumidores filtradores bentónicos.

Muchas proteínas son sintetizadas durante la espermatogénesis, lo cual involucra un gasto energético alto (Lehninger, 1975). El transporte de las reservas de nutrientes puede ocurrir directamente o a través de algunas células localizadas en las paredes de los acinos (e.g. células de Sertoli) (Pipe, 1987b). En este sentido, la presencia de CAG rodeando las paredes de los acinos en los machos y su disminución con la madurez sugieren que las CAG juegan un papel mediático en el desarrollo y maduración de las células de la línea germinal. Se ha reportado que la proporción relativa de tejido de almacenamiento para las células germinales varía de acuerdo a la condición gametogénica (Herlin-Houtteville & Lubet, 1975; Lowe *et al.*, 1982; Pipe & Moore, 1985; Delgado & Pérez-Camacho, 2007). La disminución significativa en las CAG durante el curso del desarrollo testicular apoya la hipótesis que su papel de suministro energético puede estar restringido a las primeras fases de la espermatogénesis.

Este es el primer reporte de una atresia tan intensa en las gónadas de *A. maura* de ambos sexos. En ovocitos, la atresia aparentemente muestra dos fases claramente diferenciadas. Inicialmente, ocurre lisis de la membrana del ovocito y de las estructuras citoplasmáticas, lo cual resulta en grandes masas de material citoplasmático disperso con núcleos sin nucleolos que parecen más translúcidos comparados con núcleos de ovocitos normales. Esto es seguido por la digestión de los materiales lisados por los hemocitos. En espermatozoides, la lisis no es tan evidente debido a que carecen prácticamente de citoplasma. Sin embargo, también se observaron grandes masas de hemocitos que ocurren típicamente durante el proceso de lisis y pérdida de la integridad del tejido. Este hallazgo

sugiere que existe degradación de espermatozoides (Bayne *et al.*, 1978) no descrita previamente para *A. maura*.

Motavkine & Varaksine (1983) sugirieron tres razones posibles para la ocurrencia de la atresia: 1) un mecanismo de control del número de células en el acino (el cual tiene una capacidad finita) podría explicar la reabsorción fisiológica (apoptosis); 2) un proceso de “autolimpieza”, el cual prepara la gónada para un nuevo ciclo gametogénico; 3) condiciones ambientales desfavorables (e.g. contaminación ambiental, déficit nutricional, temperaturas anómalamente bajas o altas) que pueden detener el ciclo gonádico y afectar el desove. En este estudio, se observaron altos porcentajes de gónadas masculinas y femeninas mostrando reabsorción de gametos de agosto a noviembre, cuando se registraron las temperaturas más altas (>25 °C). Esto es apoyado además por otro estudio que muestra que la reabsorción de gametos ocurrió a los 25 °C en hembras de *A. maura* bajo condiciones de laboratorio (Rodríguez-Jaramillo *et al.*, 2001).

La atresia de los ovocitos ha sido reportada en otras especies de bivalvos tales como *Corbicula japonica* (Baba *et al.*, 1999), *Pecten maximus* (Paulet *et al.*, 1988, Beninger & Le Pennec, 1991), *Pinna nobilis* (De Gaulejac *et al.*, 1995) y *Nodipecten subnodosus* (Arellano-Martínez *et al.*, 2004), sugiriendo que los productos derivados de la lisis pueden ser reabsorbidos por las células auxiliares, hemocitos y células epiteliales en los gonoductos para ser reutilizados (Dorange & Le Pennec, 1989; Le Pennec *et al.*, 1991; De Gaulejac *et al.*, 1995). En bivalvos, el índice de condición (IC) es considerado como un indicador cuantitativo de la calidad del tejido blando (i.e., estatus nutricional) (Crosby & Gale, 1990; Abbe & Albright, 2003). Además, el IC es también una herramienta útil para evaluar la condición reproductiva en bivalvos con gónada difusa (como es el caso de *A. maura*), en los que no es posible evaluar el índice gonadosomático. Sin embargo, se debe tener precaución cuando se interpretan los valores del IC porque estos pueden estar influenciados por otros factores aparte del tamaño de la gónada (e.g. tamaño del músculo aductor, cantidad de alimento sin digerir en la glándula digestiva, etc.). En *A. maura*, el músculo aductor representa aproximadamente el 20% del peso sin concha; por lo tanto, la disminución significativa en los valores del IC observados a final del año puede ser explicada por una disminución en el IRM en lugar de por una variación de la madurez gonádica. Adicionalmente, en este estudio no se observó una relación directa entre los valores del IRM o del IC

y la actividad reproductiva. Esto, aunado a la alta disponibilidad de alimento en la Ensenada de La Paz, apoya la conclusión que la fuente de energía principal para la reproducción de *A. maura* que habita en esta zona proviene del alimento recién ingerido (táctica oportunista).

Determinar la talla de primera madurez es particularmente relevante para las poblaciones de *A. maura* en México dado que la Carta Nacional Pesquera (Anónimo, 2010) indica que estas se encuentran sobre-explotadas y en deterioro en todas las localidades a lo largo de su área de distribución. En este estudio, se utilizaron tanto la AC como la LC para determinar la talla de primera madurez. La altura se utilizó para propósitos comparativos, ya que este es el parámetro más frecuentemente mencionado en bivalvos que pueden ser medidos en el punto de captura, y que pueden ser regresados al medioambiente sin daño aparente si no cumplen con la talla mínima de captura. Sin embargo, la AC de las especies que pertenecen a la familia Pinnidae no puede ser medida sin provocar daño considerable a los individuos, ya que estos organismos viven casi totalmente enterrados, con excepción del extremo posterior que sobresale unos centímetros sobre el sedimento. Por lo tanto, la LC es la mejor alternativa para medidas de manejo pesquero, ya que permite a los pescadores medir a los organismos sin causarles daño.

La talla de primera madurez de *A. maura* en la Ensenada de La Paz fue de 12 cm LC. Esta difiere de la única talla de primera madurez (16 cm LC) reportada para esta especie en una localidad en el Pacífico mexicano (desembocadura del Río Balsas, Michoacán) (Soria, 1989). Las normas vigentes estipulan una talla mínima de captura de 14 cm LC para *A. maura* (Anónimo, 2010), lo cual es consistente con los resultados presentes. Sin embargo, la talla de primera madurez disminuye como una consecuencia de la sobre-explotación, así que debe ser monitoreada periódicamente para actualizar la regulación si es necesario.

Los hallazgos reportados aquí apoyan la conclusión que *A. maura* despliega una estrategia reproductiva oportunista favorecida por la gran cantidad de alimento disponible en la Ensenada de La Paz. Su reproducción combina varios elementos, incluyendo maduración continua (sin fase de reposo) y desove parciales, para asegurar el éxito reproductivo. Sin embargo, a temperaturas arriba

de 25 °C, ocurre una reabsorción masiva de gametos (principalmente en hembras).

## **2. ENFOQUE DE ULTRAESTRUCTURA**

### **2.1 ESPERMATOGÉNESIS**

Este trabajo fue publicado bajo la siguiente referencia:

Camacho-Mondragón, M. A., B. P. Ceballos-Vázquez, E. Uría-Galicia, E. O. López-Villegas & M. Arellano-Martínez. 2014. ULTRASTRUCTURE OF THE SPERMATOGENIC PROCESS IN THE PENSHELL *Atrina maura* (BIVALVIA: PINNIDAE). *Malacologia* 57(2).

## RESUMEN

Se analizaron las características ultraestructurales del desarrollo espermatogénico y la morfología de los espermatozoides maduros de *Atrina maura* por medio de microscopía electrónica de transmisión. El testículo presenta una estructura difusa tubular en la cual se desarrollan los gametos en disposición concéntrica de acuerdo al grado de desarrollo. Dentro de los túbulos también aparecen células de Sertoli, las cuales contienen una gran cantidad de gotas de lípidos y gránulos de glucógeno en el citoplasma, sugiriendo una función nutritiva durante la primera etapa de la espermatogénesis (espermatogonias). Se presentaron cuatro estadios gaméticos de maduración en el mismo individuo: espermatogonias (4-8  $\mu\text{m}$ ), espermatocitos (3-4  $\mu\text{m}$ ) (incluyendo primarios y secundarios), espermatidas (4-8  $\mu\text{m}$ ) y espermatozoides (~2  $\mu\text{m}$  de longitud de la cabeza). La vesícula proacrosomal y el flagelo se presentan sólo hasta las primeras fases de la espermiogénesis, contrastando con la formación precoz de ambas estructuras en espermatogonias y espermatocitos en otros bivalvos. En *A. maura*, el material en la vesícula acrosómica de los espermatozoides maduros muestra un patrón particular de las densidades electrónicas, el cual parece ser una característica taxonómica exclusiva de la familia Pinnidae. Sin embargo, *A. maura* presentó solo cuatro mitocondrias en la pieza intermedia, contrastando con las cinco en el resto de las especies en esta familia.

## INTRODUCCIÓN

*Atrina maura* (Sowerby, 1835) es una de las especies comestibles de bivalvos con mayor importancia económica en México. Se distribuye desde Baja California Sur, México (incluyendo el Golfo de California) hasta Perú (Keen 1971). Ha sido reconocida como un recurso natural abundante a lo largo de las costas templadas y tropicales del Pacífico mexicano por varias décadas (Vélez-Barajas & Fajardo-León, 1996; Ahumada-Sempoal *et al.*, 2002). Pero recientemente, los pescadores de Baja California Sur han atestiguado un notable descenso en la abundancia de esta especie en varias de las zonas de captura, aunque las autoridades gubernamentales no han reportado este descenso. Derivado de esta situación, varias instituciones de investigación han realizado repetidos intentos para producir semilla de *A. maura* en el laboratorio. Sin embargo, aún existen varias preguntas sin resolver acerca de la biología reproductiva de la especie y hasta la fecha no existe una metodología estandarizada de cultivo (Reynoso-Granados *et al.*, 1996; Cardoza-Velasco & Maeda-Martínez, 1997; Lora-Vilchis *et al.*, 2004).

Previamente se han llevado a cabo varios estudios acerca de aspectos reproductivos de *A. maura*, incluyendo desarrollo gonádico, maduración y ciclo reproductivo (Rodríguez-Jaramillo *et al.*, 2001; Enríquez-Díaz *et al.*, 2003; Angel-Pérez *et al.*, 2007; Angel-Dapa *et al.*, 2010; Camacho-Mondragón *et al.*, 2012). Sin embargo, estas investigaciones se han enfocado en histología utilizando microscopía de luz y cortes incluidos con parafina, conduciendo a una interpretación limitada de las características citológicas debido a la baja resolución intrínseca de esta técnica. Los estudios de la ultraestructura espermática han demostrado ser una fuente útil de información acerca de características adicionales para análisis taxonómicos y filogenéticos en bivalvos (Franzen, 1983; Hodgson *et al.*, 1990; Healy, 1996; Kafanov & Drozdov, 1998; Healy *et al.*, 2000). De igual forma, estos estudios constituyen la línea base para llevar a cabo trabajos más especializados, e.g. análisis moleculares, que permiten caracterizar a los gametos a nivel celular, tal como se ha logrado en especies de vertebrados (Com *et al.*, 2003). Además, las descripciones ultraestructurales sirven como un modelo inicial del cual pueden derivarse estudios en los que se comparan las anomalías producidas por contaminantes o enfermedades (Yurchenko & Vaschenko, 2010).

A la fecha, no existen estudios publicados sobre la ultraestructura de la espermatogénesis para complementar las descripciones morfológicas de los gametos de *A. maura*, lo cual avanzaría el conocimiento básico de la biología reproductiva de esta especie. Además, existe poca información sobre la ultraestructura espermática para la familia Pinnidae (subclase Pteriomorphia), la cual comprende sólo dos géneros: *Pinna* y *Atrina* (De Gaulejac *et al.*, 1995; Healy *et al.*, 2000; Kang *et al.*, 2012). Los únicos trabajos publicados sobre esta familia se refieren a *Pinna nobilis* (De Gaulejac *et al.*, 1995) y describen todas las etapas de la espermatogénesis; sin embargo, la caracterización de los organelos más importantes, i.e. el complejo acrosomal, requieren mayor investigación. Por su parte, en el género *Atrina*, se investigado a detalle la ultraestructura del espermatozoide para *Atrina vexillum* (Healy *et al.*, 2000) y *Atrina pectinata* (Kang *et al.*, 2012); en esta última especie, también se ha analizado la diferenciación celular durante la espermatogénesis. El presente estudio describe las características ultraestructurales de la espermatogénesis en *A. maura* y enfatiza las características morfológicas del espermatozoide que son consideradas taxonomicamente y filogenéticamente relevantes, permitiendo comparaciones interespecíficas al mismo tiempo que aporta información sobre el modelo general del espermatozoide en la familia Pinnidae.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

Se recolectaron machos de *Atrina maura* (> 12 cm de longitud de la concha) en la Ensenada de La Paz, Baja California Sur, México, los cuales se consideran adultos basados a la talla de primera madurez de esta especie en particular en la misma área (Camacho-Mondragón *et al.*, 2012). Las gónadas de estos especímenes fueron diseccionadas, se obtuvieron muestras de 5 mm y se fijaron en glutaraldehído al 2.5% (Electron Microscopy Sciences) por seis horas; después, se realizaron cinco lavados de diez minutos utilizando solución amortiguadora de Sorensen. La post-fijación se realizó con tetraóxido de osmio al 1 % por una hora seguido de lavados con solución amortiguadora como se describió anteriormente. Después las muestras fueron deshidratadas con una serie de alcoholes de concentración ascendente (desde 70 a 100 grados). Las muestras de tejidos fueron infiltradas en una solución de óxido de propileno y resina epóxica por tres horas y luego, incluidas en resina EPON 812. Se

obtuvieron cortes ultra finos de 70 nm utilizando un ultramicrotomo, los cuales fueron teñidos con acetato de uranilo y citrato de plomo. Finalmente, los cortes fueron examinados en un microscopio electrónico de transmisión Jeol-100SX (60000 V) y se obtuvieron micrografías de distintas porciones de la gónada.

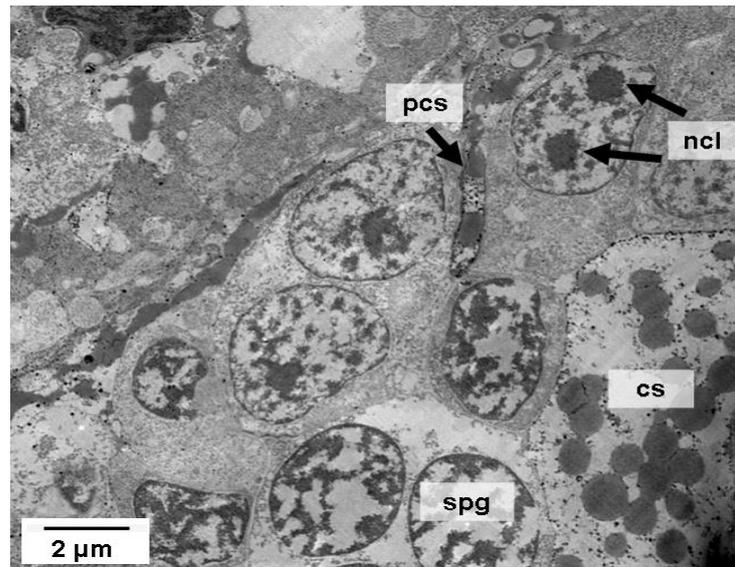
Para caracterizar la espermatogénesis, se seleccionaron gametos en diferentes estadios de desarrollo y se midieron varios parámetros morfológicos utilizados comúnmente para propósitos comparativos. En espermatogonias, espermatocitos (primarios y secundarios) y espermátidas, se midieron los diámetros totales y del núcleo. En espermatozoides maduros, se midieron la longitud del acrosoma (distancia lineal desde el borde posterior del acrosoma al borde posterior de la invaginación nuclear), la longitud del núcleo (distancia lineal del borde posterior de la invaginación al borde anterior de la pieza media) y la anchura del núcleo (en su punto más ancho).

## **RESULTADOS**

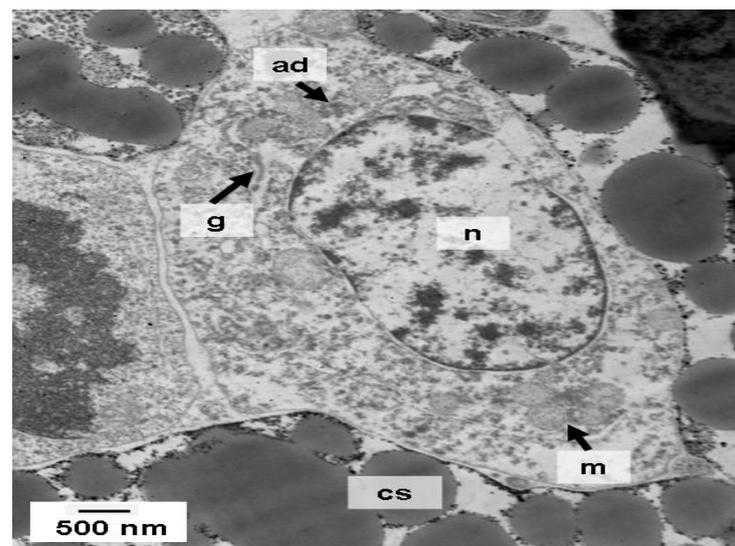
La gónada masculina de *A. maura* está formada por túbulos ciegos donde se alinean los gametos a lo largo de la pared interna. La espermatogénesis sigue un patrón de arreglo concéntrico; de la pared interna hacia el lumen, todas los estadios de desarrollo de los gametos están presentes simultáneamente en un mismo individuo, incluyendo, espermatogonias, espermatocitos primarios y secundarios, espermátidas y espermatozoides. Las células en el mismo estadio están arregladas en grupos, y los espermatozoides están aglomerados hacia el centro del túbulo con los flagelos dirigidos hacia el lumen.

### ***Espermatogonias***

Las espermatogonias se localizan a lo largo de la pared interna de los túbulos, arregladas en filas de dos o tres células. En la primera capa, las espermatogonias ocasionalmente están en contacto, o separadas por proyecciones del citoplasma de las células de Sertoli. Las espermatogonias miden de 4 a 8  $\mu\text{m}$  y tienen bordes irregulares. El núcleo mide de 2 a 5  $\mu\text{m}$ , con un arreglo heterogéneo de la cromatina, y contiene uno o dos nucleolos (Fig. 1). El citoplasma incluye numerosas mitocondrias, aparato de Golgi y en ocasiones agregados densos (Fig. 2).



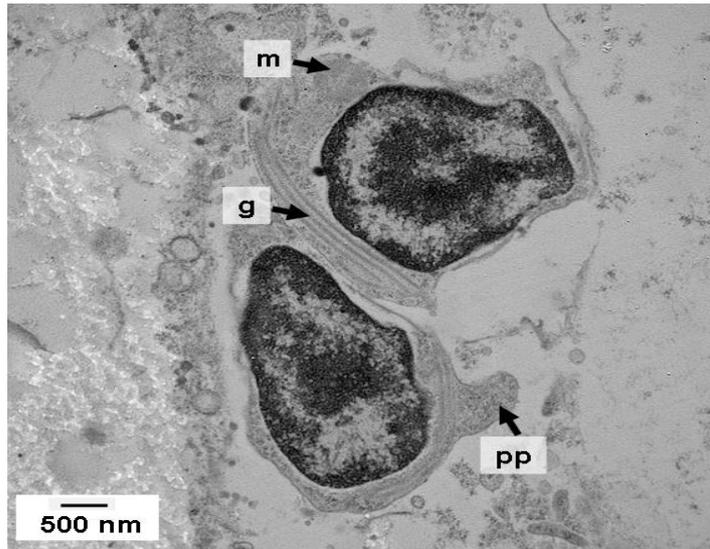
**Figura 1.** Micrografía de transmisión electrónica de espermatogonias de *Atrina maura* (spg) en bandas separadas por proyecciones tipo pseudopodios (pcs) de las células de Sertoli (cs); el núcleo puede presentar uno o dos nucleolos (ncl).



**Figura 2.** Micrografía de transmisión electrónica de espermatogonia de *Atrina maura* rodeada por célula de Sertoli (cs), el núcleo (n) es voluminoso; g: aparato de Golgi, m: mitocondria, ad: agregados densos.

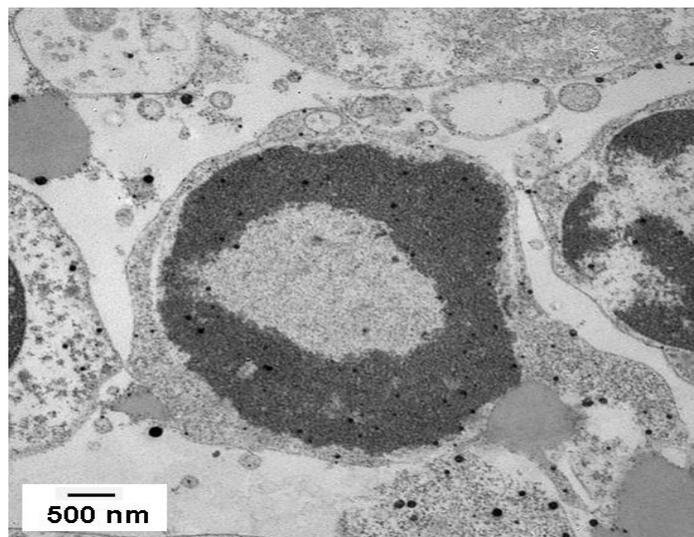
### **Espermatocitos**

Los espermatocitos primarios miden 3-4 μm; el núcleo es similar en forma al de las espermatogonias, pero muestra las primeras señales de condensación de la cromatina. El citoplasma es reducido, así la proporción núcleo: citoplasma se incrementa. El citoplasma contiene los mismos organelos que las espermatogonias. Los espermatocitos desarrollan proyecciones citoplásmicas sin organelos. Los bordes celulares son irregulares (Fig. 3).



**Figura 3.** Micrografía de transmisión electrónica de espermatozoida primario de *Atrina maura* mostrando el inicio de condensación de la cromatina; g: aparato de Golgi, m: mitocondria, pp: proyecciones del citoplasma tipo pseudopodios.

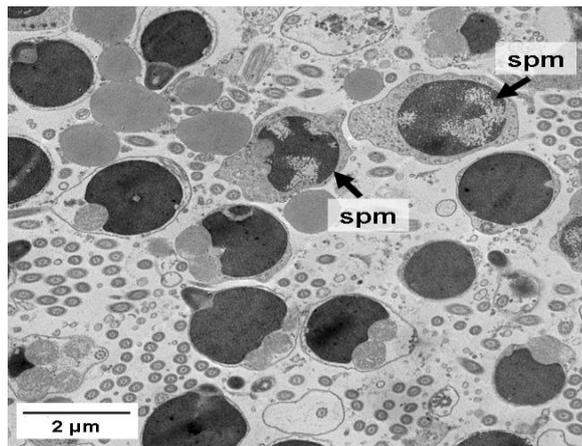
Los espermatozoida secundarios son raramente observados, probablemente debido a la rapidez con la que ocurre la segunda división meiótica (Fig. 4). Estas células son de forma irregular y tienen dimensiones similares a los espermatozoida primarios. El núcleo es esférico y la heterocromatina se condensa hacia la periferia. El citoplasma es reducido y las mitocondrias son los organelos más abundantes y visibles.



**Figura 4.** Micrografía de transmisión electrónica de espermatozoida secundario de *Atrina maura* mostrando condensación de la heterocromatina (zona oscura) en el núcleo hacia la periferia.

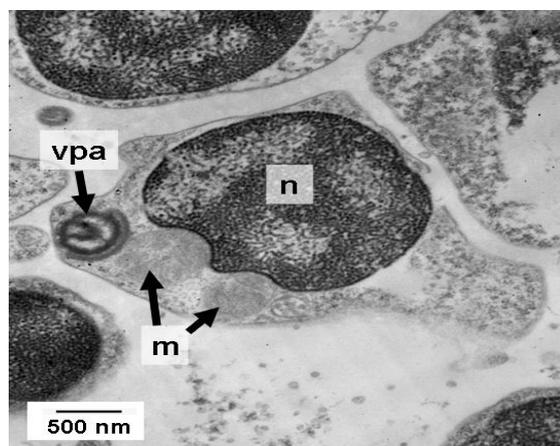
## **Espermátidas**

La espermiogénesis (diferenciación de las espermátidas) inicia con células esféricas que miden 2.5  $\mu\text{m}$  de diámetro y que presentan un núcleo redondo con la heterocromatina marginal dispersa (Fig. 5). La cantidad de citoplasma disminuye y se observan varios grupos de mitocondrias. Al avanzar el desarrollo, ocurre una reducción progresiva del núcleo y la cromatina se esparce en acúmulos irregulares.



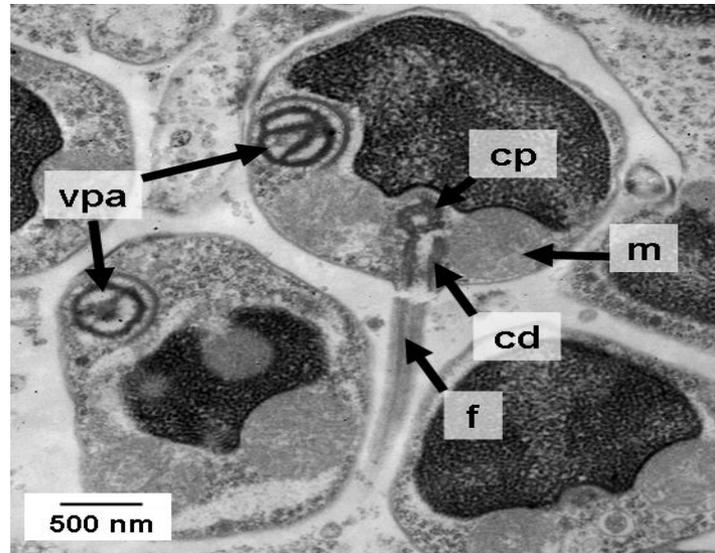
**Figura 5.** Micrografía de transmisión electrónica de espermátidas (spm) de *Atrina maura* en estadio de desarrollo inicial.

En esta etapa, las espermátidas presentan cuatro mitocondrias voluminosas que se agregan en el lado posterior del núcleo. Aparece una vesícula proacrosomal en la misma zona, la cual muestra en el centro una disposición particular en forma de "V" de material electron-denso (Fig. 6).



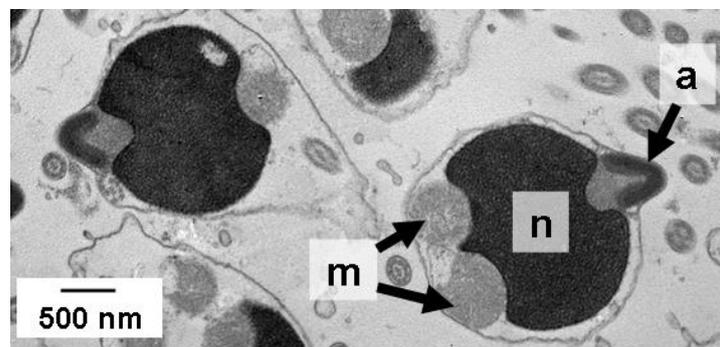
**Figura 6.** Micrografía de transmisión electrónica de espermátidas de *Atrina maura* en estadio de desarrollo avanzado; núcleo (n), mitocondria (m), vesícula proacrosomal (vpa).

El citoplasma presenta dos centriolos en posición ortogonal que exhiben los clásicos nueve tripletes de microtúbulos. El flagelo es producido por el centriolo distal, el más cercano a la membrana plasmática (Fig. 7).



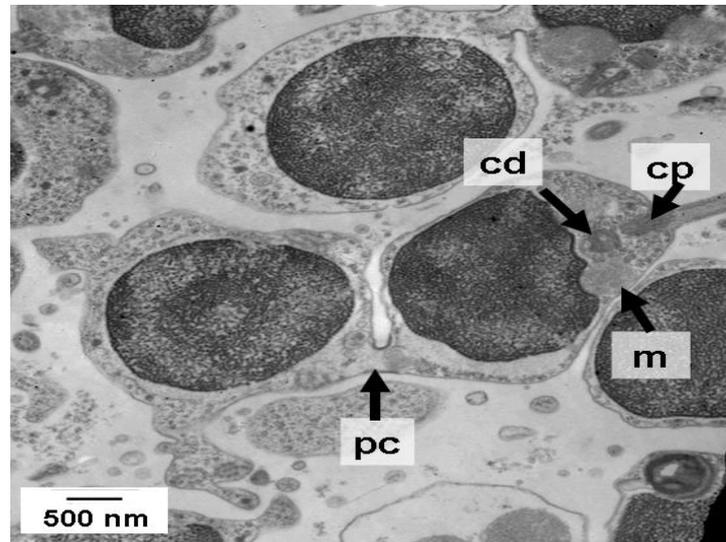
**Figura 7.** Micrografía de transmisión electrónica de espermatidas maduras de *Atrina maura*. Se observa la vesícula proacrosomal (vpa) en diferentes posiciones en su migración al ápice de la célula; centriolo distal (cd), vesícula proacrosomal (vpa), flagelo (f), centriolo proximal (cp), mitocondria (m).

Las espermatidas maduras se caracterizan por la condensación del material nuclear que comienza en la periferia. La vesícula proacrosomal migra de la parte basal al ápice de la célula (Fig. 7) y adquiere una forma cónica, invaginada y menos electron-densa en la periferia (Fig. 8).



**Figura 8.** Micrografía de transmisión electrónica de espermatidas maduras de *Atrina maura*; acrosoma (a), mitocondria (m), núcleo (n).

Las mitocondrias esféricas están localizadas en la base del núcleo y rodean los centriolos. El aparato de Golgi no se observa comúnmente. Las espermatidas pueden estar conectadas por puentes intracelulares que unen la parte basal de una célula con el ápice de otra (Fig. 9).

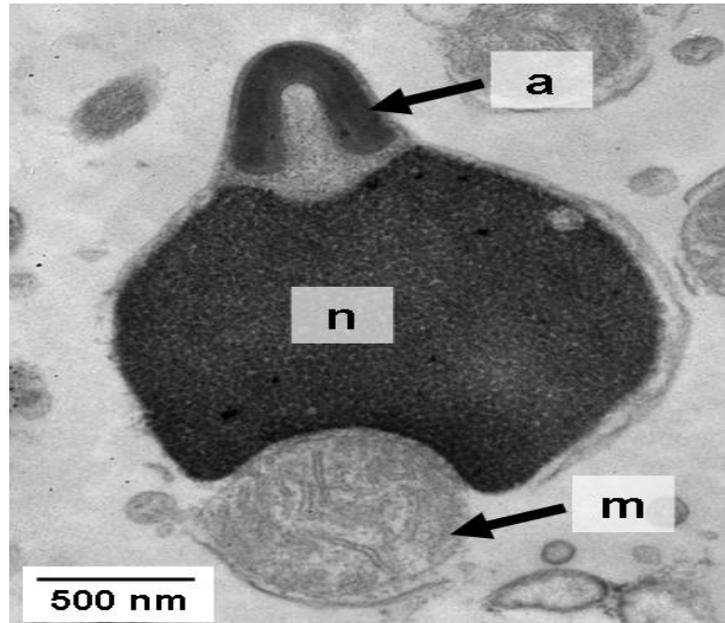


**Figura 9.** Micrografía de transmisión electrónica de espermatidas maduras de *Atrina maura*. Se observa un puente celular (pc); centriolo distal (cd), centriolo proximal (cp), mitocondria (m).

En resumen, la espermiogénesis involucra la condensación progresiva de la cromatina desde la periferia al centro junto con la reducción de tamaño del núcleo; la formación de una vesícula proacrosomal en la base de las células y su migración al ápice, donde se convierte en el acrosoma; la fusión de pequeñas mitocondrias en cuatro esferas mitocondriales dispuestas alrededor de los centriolos; la producción del flagelo por el centriolo distal; la reducción del citoplasma en una capa muy delgada y la pérdida del aparato de Golgi.

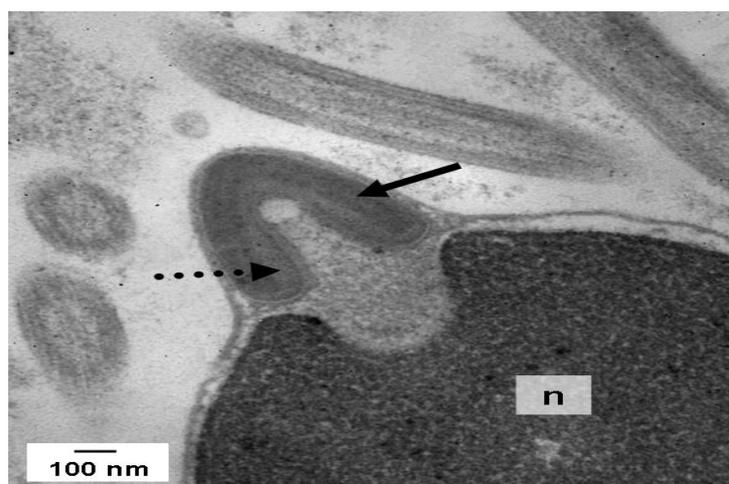
### ***Espermatozoides***

Los espermatozoides maduros tienen una cabeza cónica que mide  $\sim 2 \mu\text{m}$  desde la punta del acrosoma hasta la parte posterior de la pieza media. El núcleo casi esférico está completamente condensado y mide  $\sim 1.4 \mu\text{m}$  de longitud y  $\sim 1.6 \mu\text{m}$  de ancho (Fig. 10).



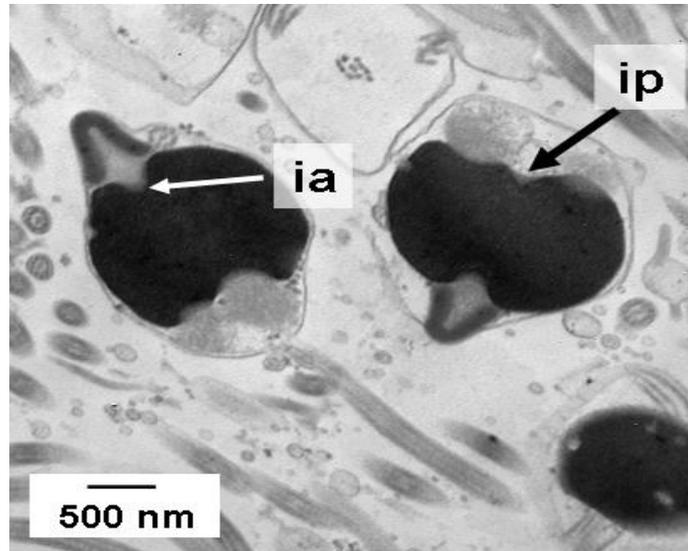
**Figura 10.** Micrografía de transmisión electrónica de espermatozoide maduro de *Atrina maura*. Se observa el núcleo condensado; acrosoma (a), núcleo (n), mitocondria (m).

Un pequeño acrosoma cónico ( $\sim 0.7 \mu\text{m}$ , incluyendo el material subacrosomal), sin barra axial, se localiza en la parte anterior. El acrosoma está invaginado en el extremo posterior. Parece estar compuesto de dos materiales diferentes, una región externa electron-densa en forma de una delgada línea elíptica y otra región interna electron-translúcida. El espacio subacrosomal contiene material granulado (Fig. 11).



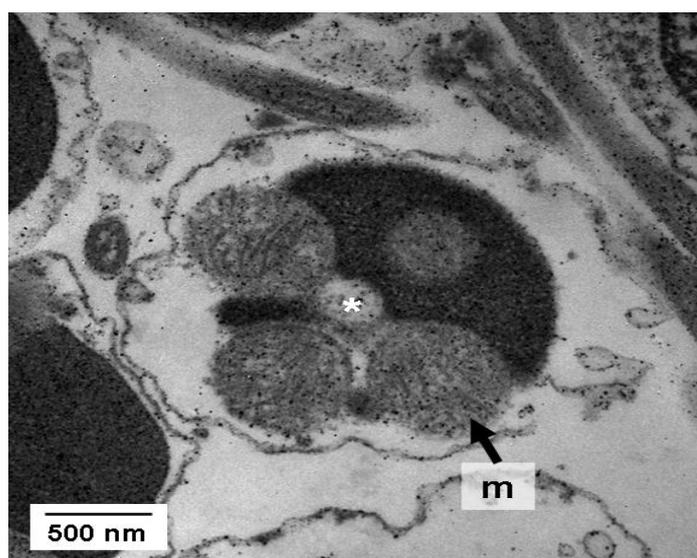
**Figura 11.** Micrografía de transmisión electrónica de espermatozoide maduro de *Atrina maura*. Detalle del acrosoma que muestra una región electron-densa (flecha continua) y una región electron-translúcida (flecha segmentada); núcleo (n).

El núcleo muestra dos invaginaciones: la primera en posición anterior, junto al acrosoma, conteniendo material granulado moderadamente denso, y la segunda en posición posterior, donde se localiza el centriolo proximal (Fig. 12).



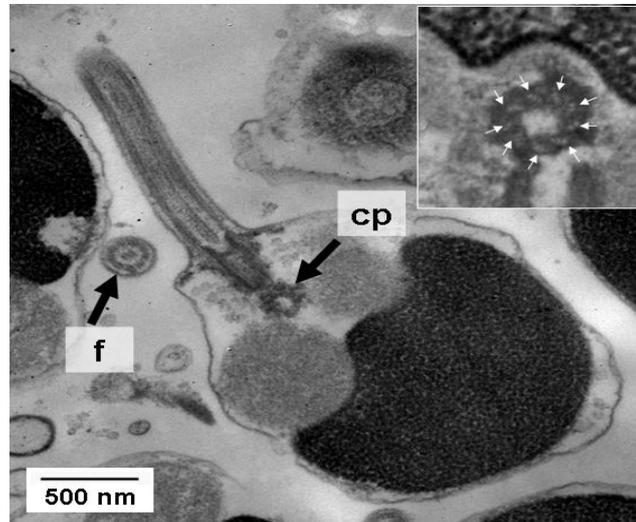
**Figura 12.** Micrografía de transmisión electrónica de espermatozoide maduro de *Atrina maura*. El núcleo muestra dos invaginaciones: invaginación anterior (ia) e invaginación posterior (ip).

En la base del núcleo, las mitocondrias se localizan cerca de la membrana nuclear. Se observaron hasta cuatro mitocondrias esféricas de 0.5  $\mu\text{m}$  de diámetro rodeando el diplosoma, lo cual constituye la pieza media (Fig. 13).



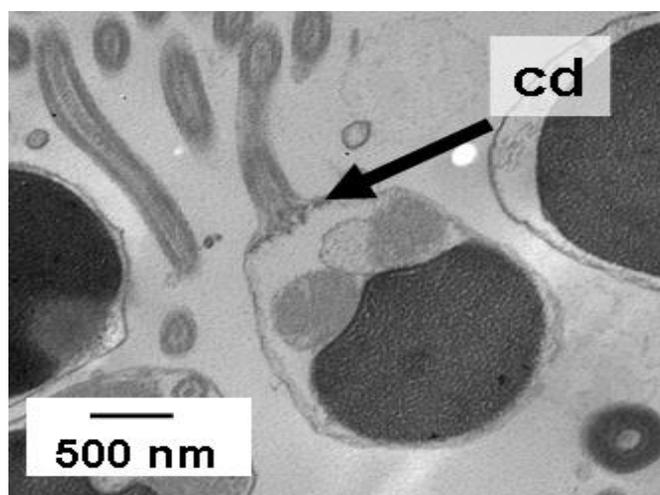
**Figura 13.** Micrografía de transmisión electrónica de espermatozoide maduro de *Atrina maura*. Vista posterior de la pieza media con cuatro mitocondrias (m) alrededor del centriolo distal (\*).

El centriolo proximal se localiza en la invaginación posterior del núcleo perpendicular al axonema y muestra una configuración de nueve tripletes de microtúbulos (Fig. 14).



**Figura 14.** Micrografía de transmisión electrónica de espermatozoide maduro de *Atrina maura*. El recuadro muestra los nueve tripletes de microtúbulos en el centriolo proximal (cp). Corte transversal del flagelo (f) mostrando la estructura interna microtubular de 9+2.

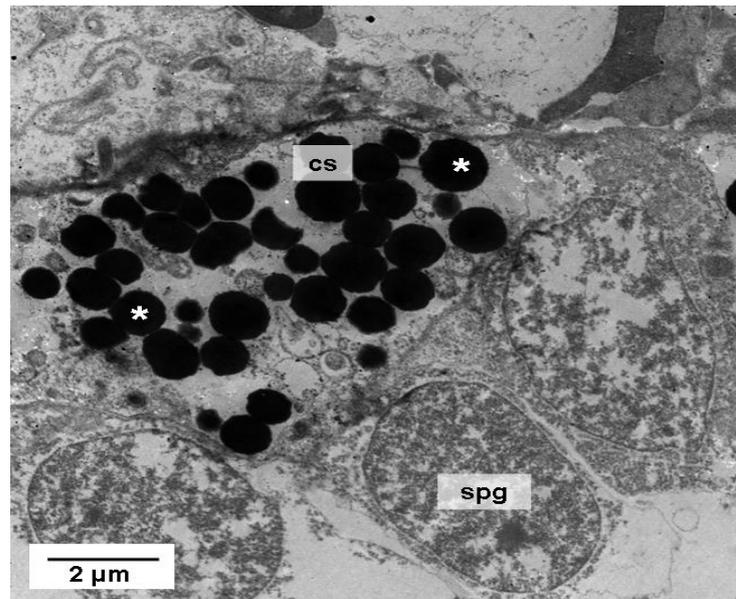
El centriolo distal constituye el cuerpo basal del flagelo (Fig. 15), el cual presenta la estructura interna microtubular típica de 9 + 2 (nueve microtúbulos periféricos rodeando a un par central) (Fig. 14). El citoplasma en los espermatozoides está altamente reducido, por lo que la proporción núcleo: citoplasma es alta en estas células.



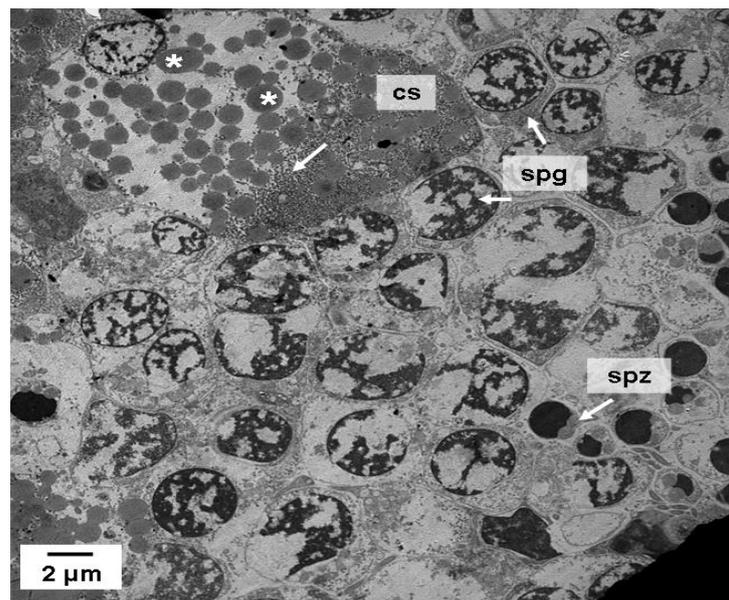
**Figura 15.** Micrografía de transmisión electrónica de espermatozoide maduro de *Atrina maura*. El centriolo distal (cd) constituye la base del flagelo.

### *Células de Sertoli*

Dentro de los túbulos se pueden encontrar células somáticas grandes de formas irregulares conocidas como células de Sertoli. El citoplasma de estas células contiene una gran cantidad de gotas de lípidos y pequeñas partículas de glucógeno dispersas ( $\sim 0.5\mu\text{m}$ ) (Figs. 16 y 17). No se observaron organelos rodeados por membranas en el citoplasma de estas células.



**Figura 16.** Micrografía de transmisión electrónica de una célula de Sertoli (cs) junto a la primera hilera de espermatogonias (spg) de *Atrina maura*. La célula de Sertoli contiene gotas de lípidos (\*) y pequeños gránulos de glucógeno (flecha).



**Figura 17.** Micrografía de transmisión electrónica una célula de Sertoli en contacto con tres espermatogonias de *Atrina maura*.

## DISCUSIÓN

El proceso general de espermatogénesis en *A. maura* es similar al de otros bivalvos (Thielley *et al.*, 1993; De Gaulejac *et al.*, 1995; Chung *et al.* 2007b). En un mismo individuo, se presentaron gametos en todas los estadios de desarrollo con la distribución concéntrica que caracteriza la gónada masculina de esta especie (Camacho-Mondragón *et al.*, 2012). Sin embargo, los diferentes tipos celulares no se observaron con la misma frecuencia. Específicamente, los espermátocitos secundarios fueron raramente observados; esta condición ha sido reportada previamente para otros bivalvos y es atribuida a la rápida tasa de división celular, la cual es difícil de distinguir histológicamente con microscopía de luz (Sastry 1979).

Los cambios mayores en la morfología celular durante la espermatogénesis de *A. maura* ocurren en el estadio de espermátida, incluyendo la condensación de la cromatina nuclear, la fusión mitocondrial y la formación del acrosoma. Al igual que en *P. nobilis* y *A. pectinata*, ambos miembros de la familia Pinnidae (De Gaulejac *et al.*, 1995; Kang *et al.*, 2012), en *A. maura* la vesícula proacrosomal y el flagelo aparecen hasta las primeras etapas de la espermiogénesis, en contraste con otras especies de bivalvos como *Barbatia obliquata*, *B. foliata* (Arcidae), *Brachidontes semistriatus* (Mytilidae), *Arcuatula capensis* (Mytilidae), *Bathymodiolus childressi* (Mytilidae) y *Tivela polita* (Veneridae), en las cuales se presenta una formación precoz de ambas estructuras en espermatogonias y espermátocitos (Reunov & Hodgson 1994; Eckelbarger & Young 1999). En *A. maura*, el acrosoma es formado en el extremo posterior de la espermátida y luego migra al extremo anterior, como sucede en otros bivalvos (Erkan & Sousa 2002; Chung *et al.* 2007b). Cuando completa su migración, el acrosoma muestra una región apical externa que es más electron-densa y homogénea en comparación con la región interna electron-translúcida. Esta diferencia en las densidades electrónicas del acrosoma ha sido observada en *Perna perna* (Bernard & Hodgson, 1985), *Pinctada margaritifera* (Thielley *et al.*, 1993), *Chama macerophylla* y *Spisula solidissima* (Hylander & Summers, 1977); esto puede deberse a las varias funciones del acrosoma durante la fertilización (Popham, 1974). Existe evidencia de que la región electron-densa participa en la unión del espermatozoide con las microvellosidades de la superficie del ovocito, liberando lisinas durante la reacción acrosomal (Hylander & Summers, 1977), talvez

arilsulfatasa y fosfatasa ácida como reportan Pipe & Da Silveira (1989) para *Mytilus edulis*. Por su parte, la región electron-translúcida pudiera resultar del alineamiento cristalino de enzimas involucradas en la fertilización (Friend & Fawcett, 1974). Numerosos estudios han mostrado que todos los bivalvos tienen espermatozoides “primitivos” (Franzen, 1956) o acuaespermas (Rouse & Jamieson, 1987), típicos de animales que liberan sus gametos al medio acuático circundante. Rouse & Jamieson (1987) reconocen dos categorías de acuaespermas: (1) 'ect-acuaesperma': espermatozoides que, al menos potencialmente, fertilizan ovocitos en el agua circundante, (2) 'ent-acuaesperma': espermatozoides liberados en el agua pero que subsecuentemente son atraídos por una corriente inhalante de la cavidad del manto donde se lleva a cabo la fertilización. En el caso de *A. maura*, los espermatozoides presentan el plan estructural básico, presuntamente adaptado para la natación (ect-acuaesperma), con un complejo acrosomal, un núcleo esférico condensado, una pieza media que consiste de cuatro mitocondrias rodeando los dos centriolos y un flagelo con una configuración microtubular de 9 + 2.

La morfología de la pieza media en *A. maura* es similar a la reportada para varios bivalvos (Popham, 1979): se observan cuatro mitocondrias, similar a los espermatozoides de otros miembros del orden Pterioidea (Healy, 1989). Estas mitocondrias gigantes probablemente resultan de la fusión de las pequeñas mitocondrias preexistentes, como se ha reportado para otros bivalvos (Longo & Dornfeld, 1967; Bernard & Hodgson, 1985; Hodgson & Bernard, 1986). Su posición alrededor del flagelo sugiere que pueden estar implicadas en el suministro de energía para la movilidad y metabolismo de los espermatozoides.

La forma del núcleo, el cual es básicamente la cabeza de los espermatozoides maduros, varía entre las especies de moluscos. En el caso de los espermatozoides “primitivos” de los bivalvos, la forma del núcleo puede ser ovoide, cónica ó esférica (Popham, 1979). Los espermatozoides de *A. maura* tienen un núcleo esférico que exhibe un patrón granular en la condensación de la cromatina durante la espermiogénesis, similar a otros bivalvos con espermatozoides con núcleos casi esféricos (Maxwell, 1983).

A diferencia de los espermatozoides de otros moluscos (e.g. gasterópodos), los espermatozoides de los bivalvos poseen un número limitado de características disponibles para propósitos taxonómicos o filogenéticos. Los

caracteres que aportan información relevante incluyen la forma y estructura interna de la vesícula acrosómica, y la relación espacial entre esta vesícula y el ápice nuclear (Healy *et al.*, 2000). El núcleo de los espermatozoides en *A. maura* tiene una invaginación anterior bajo la vesícula acrosómica que contiene una sustancia de naturaleza desconocida, la cual no está organizada en una barra axial (o perforatorium); lo mismo es observado en *A. vexillum* y aparentemente representa la condición bivalva primitiva (Popham, 1979). Además, la ausencia de una barra axial y la presencia de una vesícula acrosómica pequeña ( $\sim 0.7 \mu\text{m}$ ) en *A. maura* pueden estar asociadas con aspectos funcionales y estar relacionadas con el grosor de la membrana vitelina. En la familia Mytilidae, por ejemplo, existe una barra axial bien definida y una vesícula acrosómica larga ( $2 \mu\text{m}$ ), y ambas características son atribuidas al hecho que en esta familia las ovocitos tienen una membrana más gruesa (Healy *et al.*, 2000).

Los detalles ultraestructurales del espermatozoide de *A. maura* observados en este estudio concuerdan en esencia con los reportados para otros miembros de la familia Pinnidae, como *P. nobilis* (De Gaulejac *et al.*, 1995), *A. vexillum* (Healy *et al.*, 2000) y *A. pectinata* (Kang *et al.*, 2012), pero también contribuyen con información adicional en el perfil y subestructura de la vesícula acrosómica. Esto permite la identificación de diferencias y similitudes morfológicas significativas entre especies en la familia. Cuatro características importantes fueron detectadas en *A. maura*: (1) la vesícula acrosómica es cónica y más grande (longitud de  $\sim 0.7 \mu\text{m}$ ) que la reportada para *A. vexillum* ( $\sim 0.4 \mu\text{m}$ ) y *A. pectinata* ( $\sim 0.5 \mu\text{m}$ ), profundamente invaginada en la base y contiene material diferenciado en una capa anterior altamente electron-densa formando una línea elíptica delgada (que pudiera corresponder a las placas radiadas en *A. vexillum*) y una capa posterior menos electron-densa. Esta disposición particular del material electron-denso (en una línea elíptica delgada) en la vesícula acrosómica también fue detectada en *A. vexillum* (Healy *et al.*, 2000) y *A. pectinata* (Kang *et al.*, 2012) pero no en otras especies de las familias Pteriidae, Ostreidae, Mytilidae y Arcidae (Healy *et al.*, 2000), así esta característica pudiera ser utilizada en análisis taxonómicos a nivel de familia; (2) el material subacrosomal es altamente granulado y, aunque llena la depresión nuclear, no se esparce hasta el límite superior de la invaginación de la vesícula como en *A. vexillum*; (3) el núcleo es pequeño ( $\sim 1.4 \mu\text{m}$ ), comparado con los núcleos grandes ( $2-10 \mu\text{m}$ ) reportados

para *A. vexillum* y especies de otras familias como Arcidae y Glycymeridae (Healy *et al.*, 2000). También presenta una textura granulada y una notable invaginación anterior; (4) las mitocondrias son esféricas y están asociadas con el par de centriolos en las tres especies; sin embargo, *A. maura* presenta cuatro en contraste con las cinco comúnmente observadas en *P. nobilis*, *A. vexillum* y *A. pectinata*. Healy (1995) reportó que el número de mitocondrias en la pieza intermedia del espermatozoide es una característica que es ampliamente utilizada en análisis taxonómicos, ya que tiende a ser estable a nivel familia o superfamilia. Recientemente, ha sido reportado que las familias Arcidae, Mytilidae, Pteriidae y Pinnidae de la subclase Pteriomorphia tienen espermatozoides con cinco mitocondrias (Healy *et al.*, 2000; Kang *et al.*, 2012). Sin embargo, es aceptado el número de mitocondrias en la pieza intermedia puede variar en algún grado entre especies en la misma familia (Healy *et al.*, 2000). Algunas veces, este factor puede presentar ligeras variaciones incluso dentro de una especie (Healy, 1995), aunque en *A. maura* siempre se observaron cuatro mitocondrias.

Por otra parte, el uso de técnicas de microscopía electrónica ha permitido revelar los detalles acerca de la evolución de varias categorías celulares y la presencia de células somáticas específicas que acompañan el desarrollo de los gametos de los bivalvos (Avendaño & Le Pennec, 1998). En *A. maura*, la presencia y abundancia relativa (de acuerdo a la maduración gonádica) de células adipogranulares en la gónada masculina fue reportada por Camacho-Mondragón *et al.* (2012) utilizando únicamente la técnica histológica con parafina junto con una tinción de Sudán negro para evidenciar el contenido de lípidos. La presente investigación no pudo confirmar la existencia de estas células, pero en su lugar reveló la presencia de células de Sertoli dentro de los túbulos.

La disposición de las células de Sertoli en la gónada masculina de *A. maura* no pudo ser descrita a detalle anteriormente debido a las limitaciones intrínsecas de la microscopía de luz. La mayor resolución del presente estudio reveló que las células de Sertoli sólo rodean las espermatogonias, i.e. no se observó una interacción de las células de Sertoli con ningún otro tipo de gameto en un estadio de desarrollo más avanzado. Este hallazgo refuerza la hipótesis del papel activo de las células de Sertoli en la nutrición durante los primeros estadios del desarrollo espermático, como se ha observado en otras especies de bivalvos (Pipe, 1987b; Mathieu & Lubet, 1993; Eckelbarger & Young, 1999). El citoplasma

de las células de Sertoli incluye un número de biomoléculas, como gránulos de proteínas, glucógeno y lípidos, que son transmitidas a los gametos a través de pinocitosis para soportar las reacciones metabólicas necesarias en esa etapa (Herlin-Houtteville & Lubet 1975; Pipe, 1987b).

## 2.2 OVOGÉNESIS

Este trabajo será publicado bajo la siguiente referencia:

Camacho-Mondragón, M. A., B. P. Ceballos-Vázquez, E. Uría-Galicia, E. O. López-Villegas & M. Arellano-Martínez. ULTRASTRUCTURE OF OOGENESIS AND OOCYTE DEGENERATION IN THE PENSHELL *Atrina maura* (BIVALVIA: PINNIDAE). *En preparación.*

## RESUMEN

Se describe el modo solitario de ovogénesis en el bivalvo marino *Atrina maura*, una especie de importancia económica, en especímenes recolectados en dos épocas del año (fría y cálida) en la Ensenada de La Paz, Baja California Sur, México. Para realizar las descripciones de las estructuras de los ovocitos y las células auxiliares se utilizaron técnicas de microscopía electrónica de transmisión e histología. Al analizar el proceso de la formación de los ovocitos, se observó que el ovario contiene ovocitos en varias etapas de desarrollo. Los ovocitos se desarrollan a partir de protogonias que derivan en ovogonias y después atraviesan tres fases: previtelogénesis, vitelogénesis y postvitelogénesis. Las células auxiliares que se adhieren en las primeras fases de desarrollo de los ovocitos parecen jugar un papel integral en la vitelogénesis en este estudio. Los ovocitos vitelogénicos contienen numerosas espirales de retículo endoplásmico rugoso y aparatos de Golgi en el citoplasma, sugiriendo que puede ocurrir una vitelogénesis autosintética en esta especie. Adicionalmente, se describe la degeneración de ovocitos, la cual parece ser más común en ovocitos postvitelogénicos durante la época cálida.

## INTRODUCCIÓN

Las investigaciones de biología reproductiva de bivalvos necesariamente comienzan con la organización de la gónada y la gametogénesis (Eckelbarger & Davis, 1996; Erkan, 2009). Para llevar a cabo dichos estudios comúnmente se emplean dos herramientas de observación de los gametos, la microscopía de luz (ML), la cual permite observar la estructura general de la gónada por medio de preparaciones histológicas, sin embargo, posee limitaciones cuando es necesario observar detalladamente a nivel de organelos celulares. Por otro lado, la microscopía electrónica de transmisión (MET) o de barrido, aporta información acerca de la ultraestructura de las células y junto con la ML complementa de forma integral el conocimiento acerca de la configuración de la gónada.

El estudio de los gametos genera conocimientos en dos áreas fundamentales de la gametogénesis, incluyendo la morfología de éstos. Con el estudio de la espermatogénesis es posible aclarar relaciones filogenéticas con otros taxa (Healy *et al.*, 2000) y con el de ovogénesis es posible deducir la estrategia nutricional de las primeras etapas del desarrollo (larvas), lo cual se relaciona directamente con la cantidad de vitelo y tamaño de los ovocitos maduros (Beninger & Le Penec, 1997).

Los estudios de ultraestructura de la ovogénesis han sido llevados a cabo en varias especies de bivalvos, principalmente en aquellos con importancia económica, tales como: *M. edulis* (Pipe, 1987a), *Pecten maximus* (Dorange & Le Penec, 1989), *Cyclina sinensis* (Chung *et al.*, 2007a), *Ruditapes philippinarum* (Lee & Chung, 2008) y *Chamelea gallina* (Erkan, 2009), estos estudios abordan básicamente las variaciones que ocurren en cada especie durante la vitelogénesis, en particular la función de las células auxiliares durante este proceso. Además, estos trabajos describen la degeneración ovocitaria (atresia) que se presenta dentro de alguna de las fases del ciclo gonádico “normal” de estos organismos. Para la familia Pinnidae, el proceso completo de ovogénesis ha sido descrito únicamente en *Pinna nobilis* (De Gaulejac *et al.*, 1995). Para *Atrina maura* (Enríquez Díaz *et al.*, 2003) y *A. pectinata* (Fang & Qi, 1988) sólo se han realizado descripciones ultraestructurales de algunas fases del desarrollo gametogénico con organismos mantenidos en condiciones controladas de laboratorio, por lo que aún existe carencia de información acerca de la morfología de los organelos citoplásmicos a través de la ovogénesis en condiciones

naturales, así como de los diferentes compuestos que se acumulan durante el proceso de vitelogénesis y los cambios que ocurren en los ovocitos atrésicos.

*A. maura* es una especie de importancia comercial y ha sido un recurso natural abundante a lo largo de las costas templadas y tropicales del Pacífico mexicano por varias décadas (Vélez-Barajas & Fajardo-León, 1996; Ahumada-Sempoal *et al.*, 2002). Sin embargo, recientemente los pescadores de Baja California Sur, México, han reportado un marcado descenso en la abundancia de esta especie en varias áreas de captura. Derivado de esta situación, varias instituciones de investigación han hecho numerosos intentos para producir semillas de *A. maura* en laboratorio para cubrir la demanda comercial e iniciar actividades de repoblamiento (NOS, com. pers.). Sin embargo, los resultados no han sido satisfactorios debido a lo errático de los desoves y de la casi nula sobrevivencia de las larvas que se generan cuando se logran algunos desoves, por lo que aun existen varias preguntas sin resolver acerca de la biología reproductiva de esta especie (Reynoso-Granados *et al.*, 1996; Cardoza-Velasco & Maeda-Martínez, 1997; Lora-Vilchis *et al.*, 2004; Robles-Mungaray, Acuacultura Robles, com. pers.).

El objetivo de este estudio es describir a detalle las fases ultraestructurales de la formación de gametos femeninos de *A. maura* y en forma particular el proceso de la degeneración de ovocitos. Las células auxiliares que intervienen en ambos procesos también son examinadas.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

En la Ensenada de La Paz, Baja California Sur, México se recolectaron hembras adultas de *Atrina maura* mayores a 12 cm de longitud de la concha) (Camacho-Mondragón *et al.*, 2012). Debido a que *A. maura* sufre un proceso de degeneración de los ovocitos cuando la temperatura del agua sobrepasa los 25 °C (Camacho-Mondragón *et al.*, 2012), los muestreos se realizaron durante la época fría (enero) y cálida (septiembre) con el fin de describir la ultraestructura de ovocitos sanos y en degeneración.

Las gónadas de los organismos fueron diseccionadas y preparadas para MET y ML. En el caso de la MET, se obtuvieron porciones de aproximadamente 5 mm, las cuales se fijaron durante seis horas con glutaraldehído (Electron Microscopy Sciences) al 2.5%; transcurrido este tiempo se realizaron cinco

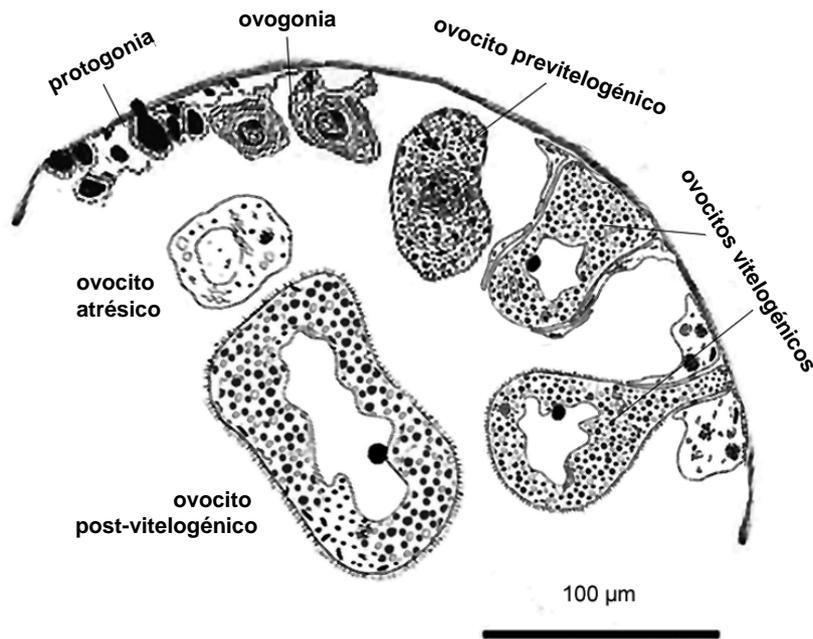
lavados de diez minutos cada uno con solución amortiguadora de Sorensen. La post-fijación se realizó con tetraóxido de osmio al 1% durante una hora y las muestras se lavaron de la misma forma con la solución amortiguadora. La deshidratación se realizó con una serie de alcoholes de concentración ascendente (desde 70 a 100 grados). La infiltración de los tejidos se llevó a cabo con una solución de óxido de propileno y resina epóxica durante tres horas, para posteriormente incluirse con resina EPON 812. Se obtuvieron cortes ultra finos de 70 nm con ayuda de un ultramicrotomo, los cuales fueron contrastados con acetato de uranilo y citrato de plomo. Finalmente, los cortes fueron examinados en un microscopio electrónico de transmisión Jeol-100SX (60000 V) y se obtuvieron micrográficas de distintas porciones de la gónada. Para ML se utilizó la técnica histológica convencional (Humason, 1979), que consiste en una deshidratación a través de una serie de alcoholes de concentración creciente, seguida de un aclarado con Hemo-De® y la inclusión en Paraplast-Xtra®. Se obtuvieron cortes de 5 µm de grosor, las cuales se tiñeron con hematoxilina-eosina y examinadas bajo un microscopio de luz.

La información obtenida a partir de ML y MET fue utilizada para describir las fases de la ovogénesis desde diferentes niveles. La ML aporta un panorama general de la estructura ovárica ya que permite observar el arreglo de los gametos en sus distintas fases de desarrollo dentro de los acinos y a su vez complementa las descripciones detalladas generadas a partir de la MET, las cuales en ocasiones puede omitir características importantes al enfocarse en áreas muy específicas debido a las características inherentes de esta última técnica. Finalmente, se obtuvieron medidas de los diámetros totales y del nucléolo en gametos en todas las etapas de desarrollo.

## **RESULTADOS**

### ***Morfología general del tejido gonádico y de los ovocitos***

El ovario de *Atrina maura* consiste de una serie de cúmulos de acinos globulares altamente ramificados, rodeados de una delgada pared acinar, y contiene ovocitos en diferentes fases de desarrollo durante la ovogénesis. Todos los ovocitos maduros fueron observados en el lumen de los acinos y los ovocitos en desarrollo estuvieron en contacto cercano con la pared del acino (Fig. 1).



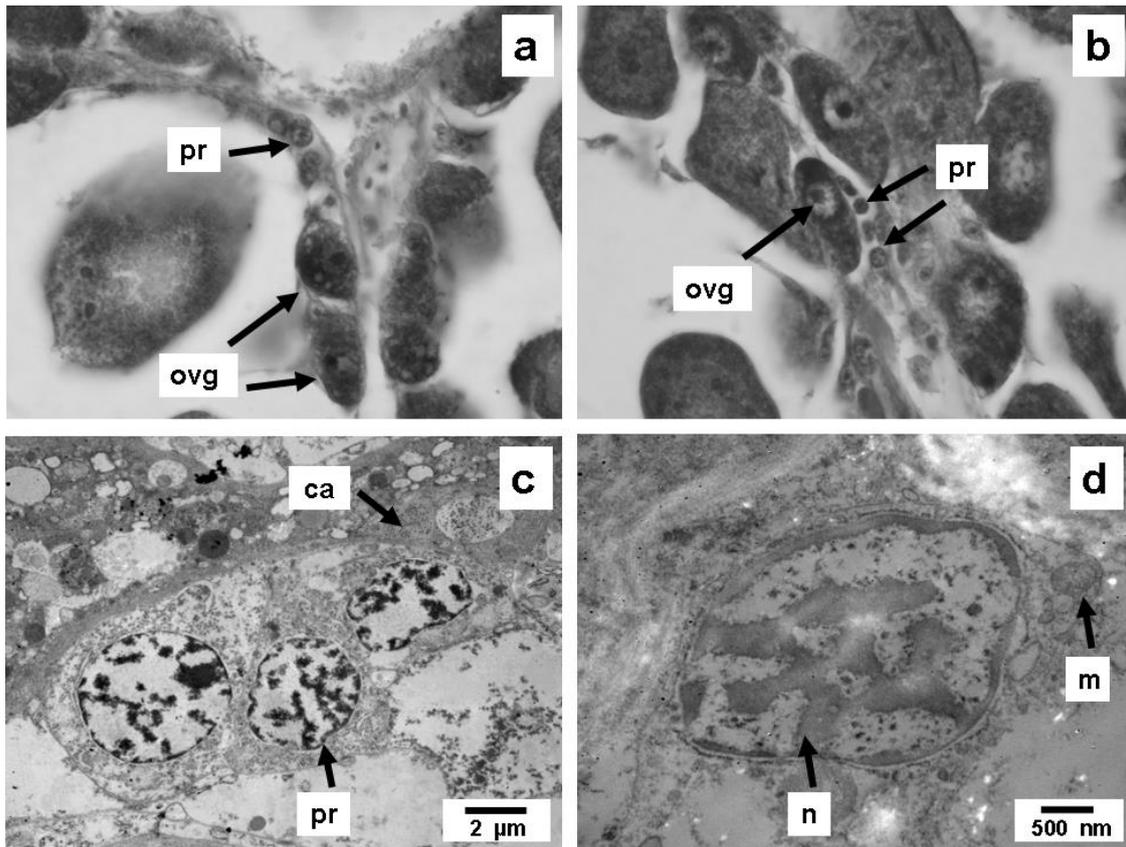
**Figura 1.** Representación esquemática de la ovogénesis en *Atrina maura* basada en observaciones con microscopía de luz y microscopía electrónica de transmisión. Las etapas de la ovogénesis son protogonias, ovogonias, ovocitos previtelogénicos, vitelogénicos y postvitelogénicos. Adicionalmente, se integra la condición de atresia ovocitaria.

La ML y MET permitieron la categorización de cinco etapas de desarrollo de los ovocitos: protogonia, ovogonia, previtelogénesis, vitelogénesis y postvitelogénesis. En las dos épocas, cálida y fría, se presentaron todas las etapas de desarrollo, sin embargo, durante la época cálida se presentó una mayor incidencia de atresia en ovocitos maduros.

En *A. maura*, la asociación de las células foliculares con los ovocitos en desarrollo sólo fue observada durante las primeras etapas de la ovogénesis, donde las células auxiliares fueron observadas muy cerca de las protogonias y ovogonias (Fig. 2c). Los ovocitos maduros se caracterizaron por un diámetro dramáticamente mayor y forma esférica. Al incrementarse el diámetro de los ovocitos, estos se agregan en el centro del lumen. En ovarios maduros, el lumen está lleno de ovocitos grandes, y ninguna célula folicular se asocia con ovocitos que atraviesan las etapas intermedias o avanzadas de la ovogénesis.

### **Protogonias**

En *A. maura*, las protogonias (células germinales) están localizadas a lo largo de las paredes internas de los acinos (Fig. 2). Son de forma irregular y miden entre 3 y 6  $\mu\text{m}$ . Se caracterizan por una alta proporción núcleo-citoplasma. El núcleo es redondo y grande. El citoplasma contiene numerosas mitocondrias esféricas, al aparato de Golgi y gotas lipídicas (Fig. 2d).

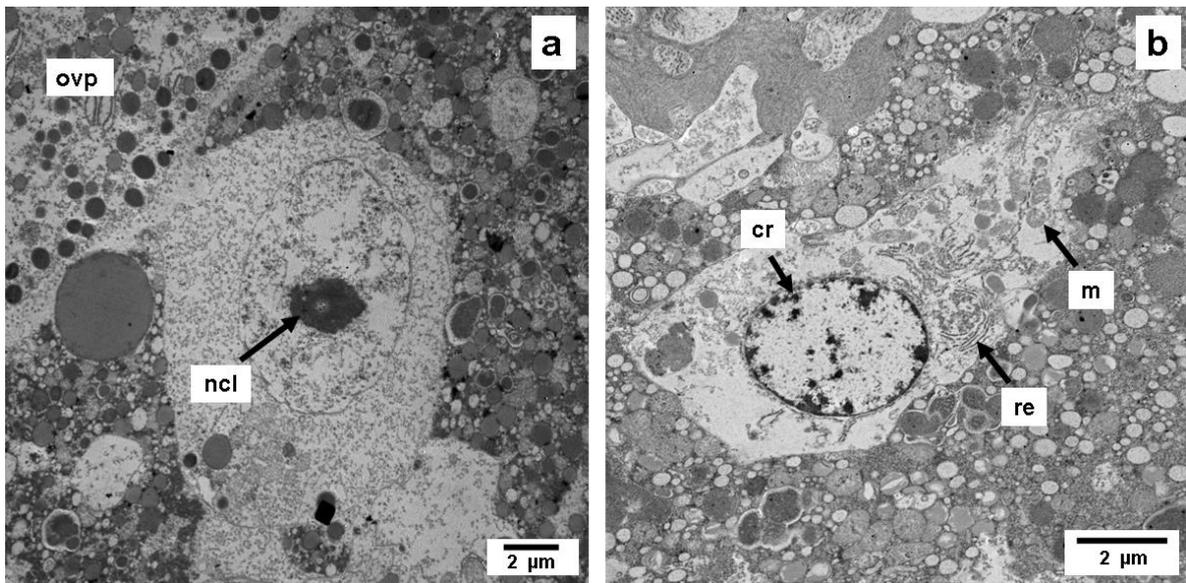


**Figura 2.** Imágenes con microscopía de luz (a y b) y microscopía electrónica de transmisión (c y d) de las primeras etapas de la ovogénesis de *Atrina maura*; a) protogonia (pr) localizada en la pared del acino; b) protogonias cercanas a una ovogonia (ovg) que presenta un núcleo distintivo; c) protogonia en contacto con célula auxiliar (ca); d) acercamiento de una protogonia mostrando el núcleo (n) y mitocondria (m).

### **Ovogonias**

Las ovogonias están presentes en capas de una o dos células de grosor a lo largo de los bordes de los acinos en contacto o separadas del borde por proyecciones tipo pseudópodos de las células auxiliares. Las ovogonias, las cuales miden de 6 a 10  $\mu\text{m}$ , son redondas o alargadas y tienen un núcleo más

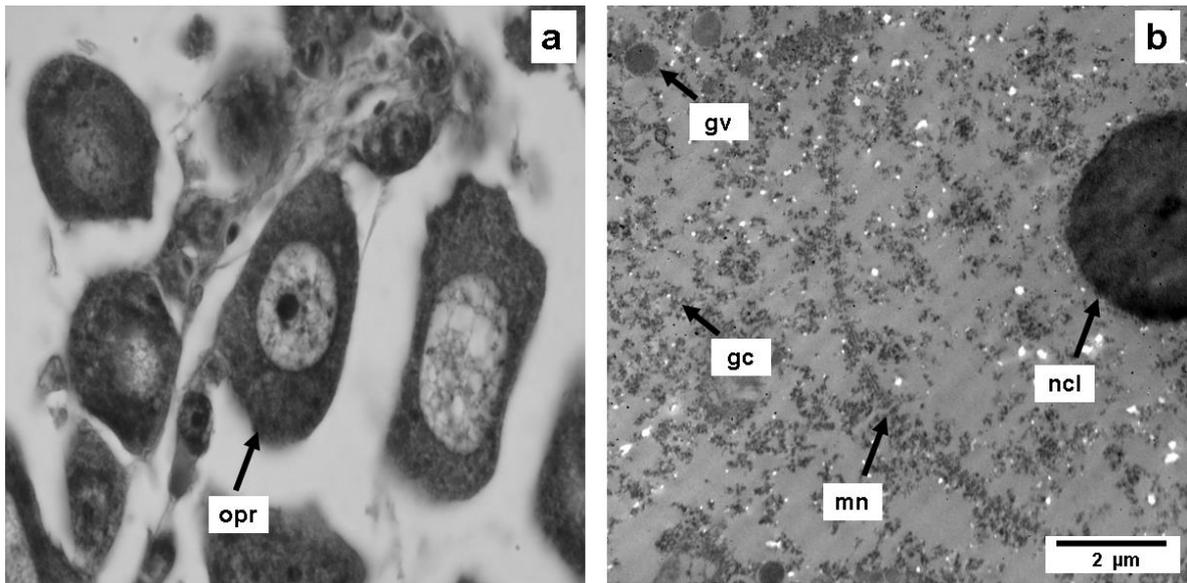
basófilico que su citoplasma (Fig. 2a y b). Al llevar a cabo MET se observó que frecuentemente poseen un gran núcleo en el cual la cromatina es reticular y marginal y un único nucléolo (Fig. 3a). Se presentan numerosos ribosomas, aparatos de Golgi, mitocondrias dispersas, algunas cisternas del retículo endoplásmico, gotas de lípido y agregados densos en el citoplasma (Fig. 3b).



**Figura 3.** Imágenes con microscopía electrónica de transmisión de ovogonias de *Atrina maura*; a) ovogonia mostrando el nucléolo (ncl) junto a un ovocito post-vitelogénico (ovp); b) ovogonia con la cromatina (cr) en la periferia del núcleo y una gran cantidad de organelos en el citoplasma, mitocondria (m), retículo endoplásmico (re).

### ***Ovocitos previtelogénicos***

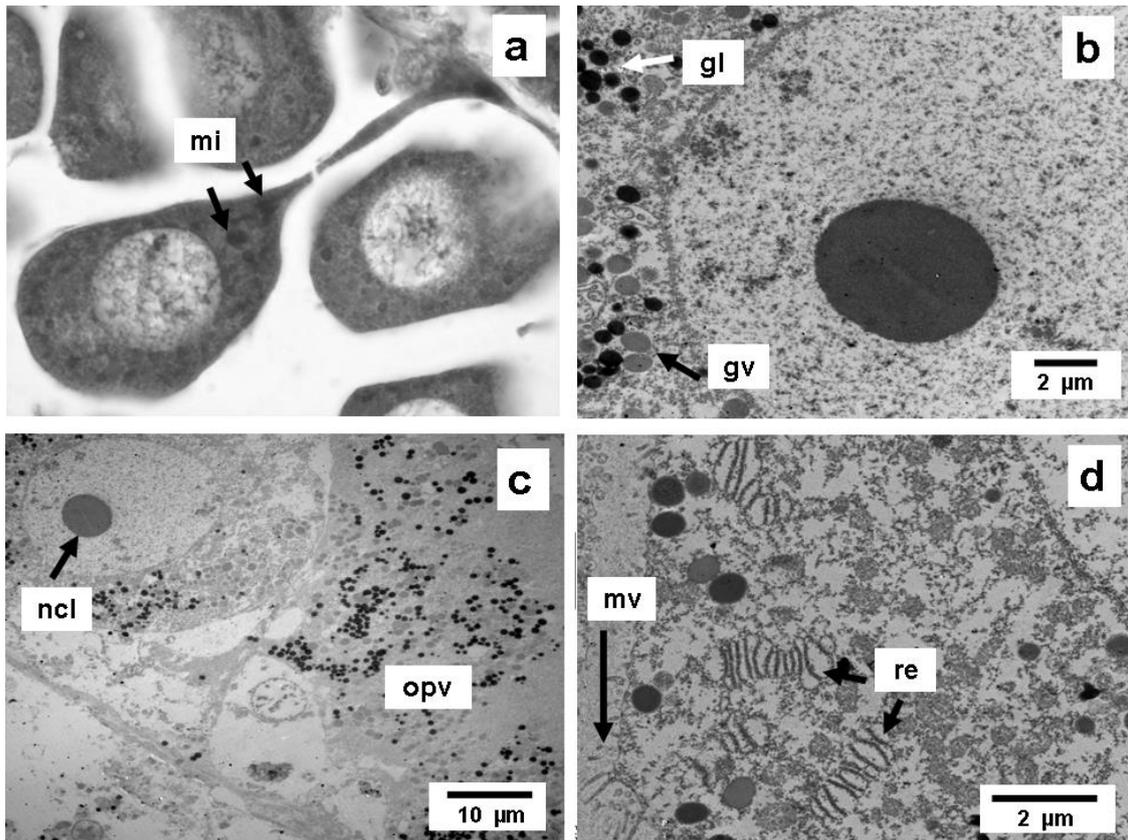
Los bordes de los ovocitos previtelogénicos son irregulares y pueden alcanzar las 30 µm con un nucleolo de 5 µm de diámetro (Fig. 4). La ML mostró que los ovocitos previtelogénicos tienen un núcleo basófilico y un citoplasma ligeramente eosinofílico (Fig. 4a). Por medio de la MET, se observó que la membrana nuclear está bien definida y aunque el volumen del citoplasma se ha incrementando contiene pocos organelos. Los ovocitos previtelogénicos se encuentran aun cercanos unos a otros pero no se registraron desmosomas. Numerosos gránulos corticales agregados en el citoplasma, asimismo, aparecen los primeros gránulos de vitelo. En esta etapa no se presentaron microvellosidades ni capa vitelina (Fig. 4b).



**Figura 4.** Imágenes con microscopía de luz (a) y microscopía electrónica de transmisión (b) de ovocitos previtelogénicos de *Atrina maura*; a) ovocito previtelogénico en la pared del acino; b) acercamiento de un ovocito previtelogénico con la membrana nuclear (mn) bien definida, se observan numerosos gránulos corticales (gc) y algunos gránulos de vitelo (gv) en el citoplasma.

### ***Ovocitos vitelogénicos***

Los ovocitos que entran en la etapa de vitelogénesis continúan creciendo hacia el lumen del acino, al acumular gránulos de vitelo en su citoplasma y alcanzan diámetros de ~40 µm. El punto de unión con la pared acinar, conocido como pedúnculo, presentó numerosas mitocondrias agrupadas y fue visible únicamente por medio de ML (Fig. 5a). La MET muestra gránulos de vitelo de color gris claro y de la misma densidad que la capa vitelina, mientras que los gránulos de lípidos son de consistencia más electrodensa y por lo tanto aparecen negros en las imágenes (Fig. 5b). El núcleo es redondo y frecuentemente se observan varias acumulaciones densas cerca de la membrana nuclear; se presenta un solo nucléolo (Fig. 5c). En la etapa final aparecen por primera vez las microvellosidades, los organelos del citoplasma proliferan y se observan numerosas espirales de retículo endoplásmico rugoso (RER) a través de todo el citoplasma (Fig. 5d).

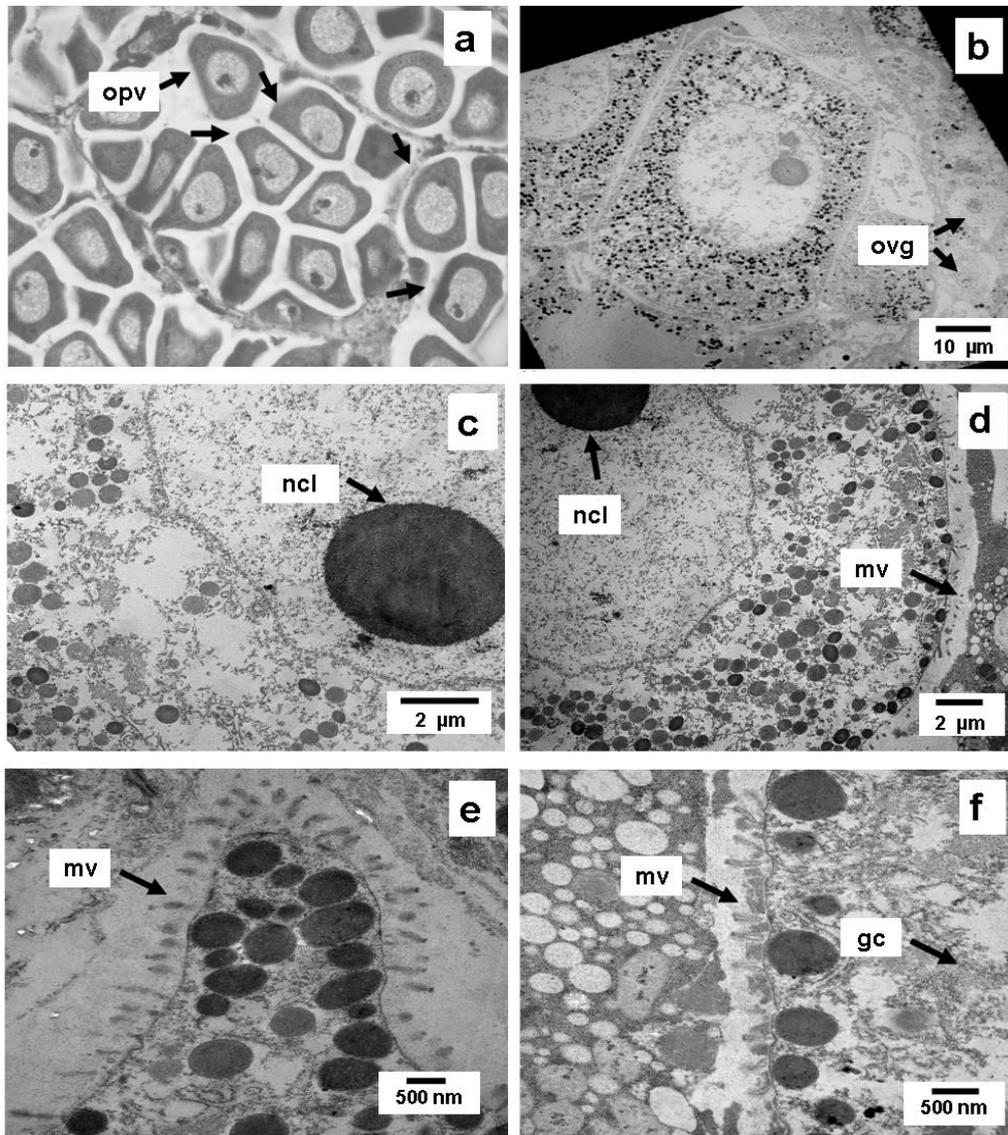


**Figura 5.** Imágenes con microscopía de luz (a) y microscopía electrónica de transmisión (b-d) de ovocitos vitelogénicos de *Atrina maura*; a) ovocito vitelogénico desprendiéndose de la pared del acino, se observan numerosas mitocondrias (mi) agrupadas en el pedúnculo; b) detalle del citoplasma que contiene gránulos de vitelo (gris) (gv) y gránulos de lípidos (negro) (gl); c) ovocito vitelogénico mostrando el nucléolo (ncl) junto a un ovocito post-vitelogénico (opv); d) acercamiento de un ovocito en la fase final de la vitelogénesis, se observan las microvellosidades en la periferia (mv) y numerosas espirales de retículo endoplásmico (re).

### ***Ovocitos post-vitelogénicos***

Los ovocitos post-vitelogénicos alcanzan 80  $\mu\text{m}$  de longitud. Tienen una apariencia poliédrica en el lumen del acino y están deformados por la compresión en la gónada madura (Fig. 6a). Los resultados de MET mostraron que los ovocitos post-vitelogénicos contienen numerosos gránulos de vitelo y lípidos (Fig. 6b). En esta etapa, no se observan uniones entre ovocitos y células auxiliares. El núcleo es homogéneo y el nucléolo, generalmente en posición marginal aunque puede presentarse en el centro del nucleoplasma, es de apariencia densa (Fig. 6c). El RER, cuyo extremo tubular se expande, tiene numerosas capas que están cercanas unas a otras y paralelas a la envoltura nuclear; esto constituye las lamelas anuladas. Las mitocondrias aparecen a través del ooplasma y los

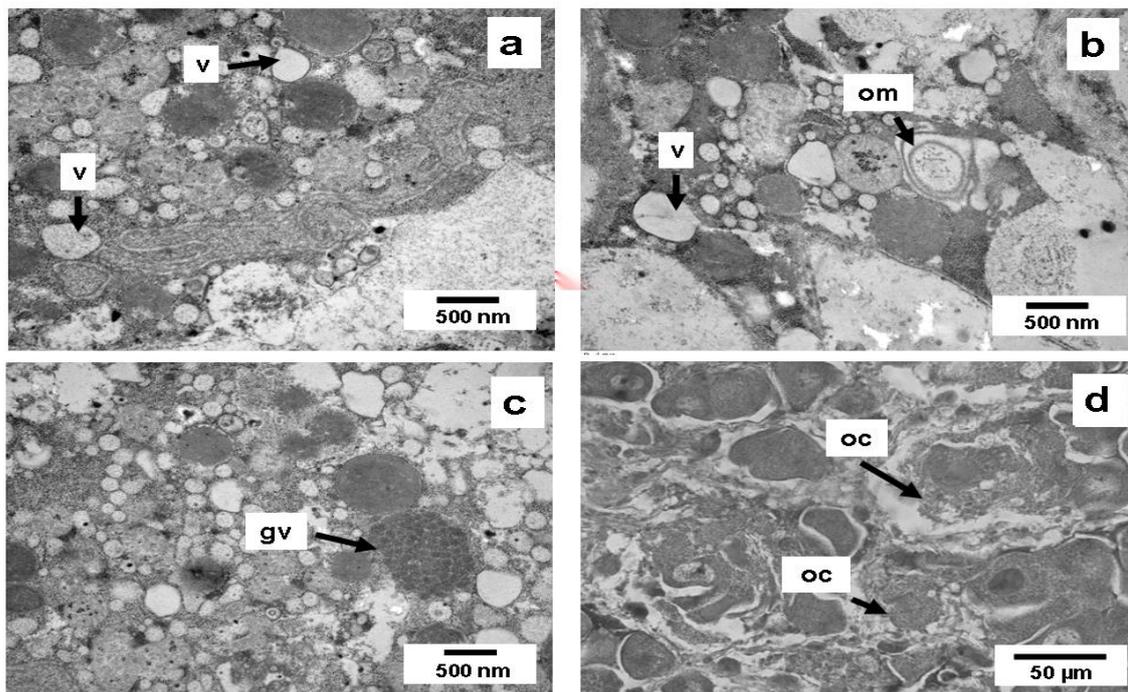
gránulos corticales son muy numerosos en la periferia de estos ovocitos. Las agregaciones densas son más grandes que las de los ovocitos vitelogénicos y se presenta el aparato de Golgi. En esta etapa, las microvellosidades son muy evidentes y rodean por completo a los ovocitos (Fig. 6d-f).



**Figura 6.** Imágenes con microscopía de luz (a) y microscopía electrónica de transmisión (b-f) de ovocitos post-vitelogénicos de *Atrina maura*; a) ovocitos post-vitelogénicos (opv) poliédricos en el lumen del acino; b) ovocito post-vitelogénico con numerosos gránulos en el citoplasma, se observan tres ovogonia (ovg) en la periferia del acino; c) detalle del núcleo que muestra la ubicación marginal del nucléolo (ncl) y su apariencia densa; d) las microvellosidades (mi) rodean completamente a los ovocitos postvitelogénicos; e) acercamiento de las microvellosidades (mi) en una deformación de la membrana plasmática de un ovocito post-vitelogénico; f) detalle del gran número de microvellosidades (mi) presentes en los ovocitos post-vitelogénicos, también se observan los gránulos corticales (gc).

### **Degeneración de ovocitos**

Los ovocitos vitelogénicos y postvitelogénicos presentaron características evidentes del proceso de atresia. El retículo endoplásmico se expande, conduciendo a la vacuolación del ooplasma (Fig. 7a). Las mitocondrias se degeneran y organelos tipo mielínicos están presentes (Fig. 7b). En ovocitos atrésicos no se observa aparato de Golgi. El núcleo se deteriora; el espacio nuclear de intermembrana se incrementa y la membrana nuclear se rompe. Al mismo tiempo, el nucléolo también se deteriora y las acumulaciones electro-densas están presentes en el nucleoplasma. La membrana citoplásmica se desintegra, pero los gránulos de vitelo y las inclusiones de lípidos se acumulan y forman una masa globulosa densa en el lumen del acino (Fig. 7c), la cual estará presente en el contenido citoplásmico de las células auxiliares. Un incremento en el espacio perivitelino causa un desprendimiento de las microvellosidades de la superficie del ovocito. La membrana citoplásmica se colapsa, así como la capa vitelina; por lo que el material lítico es liberado en el lumen del acino (Fig. 7d).



**Figura 7.** Imágenes con microscopía electrónica de transmisión (a-c) y microscopía de luz (d) de ovocitos atrésicos de *Atrina maura*; a) gran cantidad de vacuolas (v) en el citoplasma; b) ooplasma con organelo tipo mielínico; c) masas densas formadas por gránulos de vitelo (gv) en el citoplasma; d) ovocitos con membranas citoplásmicas colapsadas (oc) que vierten su contenido en el lumen de los acinos.

## DISCUSIÓN

Las características generales de la gónada de *Atrina maura* y el proceso de ovogénesis son similares a los descritos para otros bivalvos como *Mytilus edulis* (Pipe, 1987a), *Pecten maximus* (Dorange & Le Pennec, 1989), *Crassostrea virginica* (Eckelbarger & Davis, 1996), *Cyclina sinensis* (Chung *et al.*, 2007a), y al de sus parientes más cercanos: *A. pectinata* (Fang & Qi, 1988) y *Pinna nobilis* (De Gaulejac *et al.*, 1995).

La ovogénesis en bivalvos ha sido clasificada como folicular, la menos común; donde las células auxiliares rodean completamente a los ovocitos en todas las etapas de desarrollo, o solitaria donde los ovocitos en desarrollo no son rodeados completamente por las células auxiliares y sólo se presentan durante algunas fases de desarrollo (Glavinic *et al.*, 2012), la cual ha sido reportada en varias familias de bivalvos: Ostreidae (Eckelbarger & Davis, 1996), Mytilidae (Pipe, 1987a), Pectinidae (Dorange & Le Pennec, 1989).

En este estudio, las observaciones revelaron que *A. maura* presenta una ovogénesis de tipo solitario, que inicia con protogonias, y que se desarrollan en ovogonias, ovocitos previtelogénicos, ovocitos vitelogénicos y finalmente en ovocitos post-vitelogénicos. En la figura 1 se describen y esquematizan cinco etapas de la ovogénesis y el proceso de atresia en *A. maura*. Las protogonias, raramente descritas para especies de bivalvos, son células que no están sexualmente diferenciadas pero contienen los mismos organelos que las ovogonias, y a partir de las cuales inicia el proceso de ovogénesis.

La etapa previtelogénica de la ovogénesis en *A. maura* se caracteriza por la presencia de un núcleo definido, gránulos corticales y un gran número de mitocondrias, numerosos ribosomas y retículo endoplásmico. En *P. nobilis*, esto ha sido interpretado como el inicio de una actividad sintética intensa (De Gaulejac *et al.*, 1995). La envoltura nuclear está bien formada y posee numerosos poros permitiendo la transferencia de nutrientes a los ovocitos en crecimiento. Durante la etapa vitelogénica, el crecimiento del citoplasma se debe principalmente a la acumulación de organelos y sus productos, principalmente vitelo. Para Hill & Bowen (1976) la mayoría de los organelos citoplásmicos están involucrados y aunque la incorporación de sustancias macromoleculares exógenas ha sido descrita para numerosas especies (Bottke *et al.*, 1982), parece que la formación endógena de vitelo predomina durante la etapa vitelogénica de los moluscos

(Jong-Brink *et al.*, 1983). Se han propuesto varios constituyentes citoplásmicos involucrados en la formación de gránulos de vitelo. En *M. edulis* (Pipe, 1987a) y *C. gigas* (Suzuki *et al.*, 1992) se ha reportado que pudiera existir una formación auto-sintética de proteína del vitelo debido a la presencia de numerosas espirales de retículo endoplásmico y complejos de Golgi en el citoplasma de ovocitos en vitelogénesis. Observaciones similares se han realizado en *A. maura*, lo que también sugiere que puede ocurrir una vitelogénesis auto-sintética en esta especie. En *A. maura*, al igual que en *P. nobilis* (De Gaulejac *et al.*, 1995) y *A. pectinata* (Fang & Qi, 1988), los gránulos de vitelo lípido-proteicos están formados por la fusión de glóbulos de lípidos, cisternas expandidas de retículo endoplásmico y vesículas derivadas de los complejos de Golgi. Se ha reportado que las espirales de retículo endoplásmico son estructuras características comunes en ovocitos en desarrollo (Pipe, 1987a) y que posiblemente las sustancias que son usadas para la construcción de gránulos de vitelo se filtran gradualmente a través de los diferentes órdenes de los anillos lamelares del retículo endoplásmico y después se concentran en el área central (Reverberi, 1966); a partir de las imágenes en *A. maura*, donde se observa que las lamelas anulares aparecen durante la vitelogénesis, esta proposición es bastante probable.

También existe evidencia de la transformación de mitocondrias en gránulos de vitelo en varias especies de bivalvos como *Planorbis corneus* (Albanese & Bolognari, 1964), *A. pectinata* (Fang & Qi, 1988) y *Patella caerulea* (Benmeradi, 1992). Sin embargo, en *A. maura*, no fue observada esta participación de las mitocondrias en la formación del vitelo. En esta especie, las mitocondrias son observadas por primera vez en las protogonias, y luego se multiplican durante la etapa previtelogénica. Estos organelos fueron observados en grupos en el pedúnculo de los ovocitos vitelogénicos, lo cual sugiere que apoyan a los microtúbulos en su función de estructuras de soporte y posiblemente delimitan los canales para la transferencia de materiales de una porción del ovocito a otra (De Gaulejac *et al.*, 1995). En las etapas posteriores de la ovogénesis en *A. maura*, las mitocondrias aún están presentes en el citoplasma, pero no son tan numerosas como en las primeras etapas, sugiriendo que la actividad mitocondrial está reducida.

Al inicio de la etapa vitelogénica de *A. maura* aparecen gotas grandes de lípidos, sin embargo, no existe evidencia morfológica clara acerca de los procesos involucrados en la formación de gránulos de lípidos. En unas pocas especies, las gotas de lípidos parecen surgir en cuerpos de Balbiani por la transformación de mitocondrias y otros organelos (Dohmen, 1983; Chung *et al.*, 2005) pero en *A. maura* no se observan las lamelas concéntricas del retículo endoplásmico rugoso que rodean las gotas de lípidos o ninguna asociación específica entre las gotas de lípidos y organelos citoplásmicos. Los lípidos pueden ser producidos fuera del ovocito, por las células auxiliares por ejemplo, y subsecuentemente incorporados por fagocitosis (Dohmen, 1983) o puede existir una conversión de glucógeno en lípidos como se ha visto en *Mytilus edulis* (Pipe, 1987a).

En *A. maura*, los gránulos corticales se encuentran sólo a partir de ovocitos previtelogénicos. Al principio, están aleatoriamente distribuidos, y luego al avanzar la vitelogenénesis, se localizan en la periferia del ovocito, lo cual se ha sugerido como una estrategia para prevenir la poliespermia liberando su contenido durante la fertilización (Pipe, 1987a). Se sabe que la composición de los gránulos es glicoproteica, sin embargo su origen está pobremente entendido. En *Mytilus edulis*, los gránulos corticales frecuentemente aparecen en grupos durante el desarrollo del ovocito, aparentemente con conexiones de membrana y pueden incrementar en número por división (Pipe, 1987a).

Las modificaciones de los organelos en *A. maura* en el proceso de degeneración de ovocitos son similares a aquellas observadas para otros bivalvos (Dorange & Le Pennec, 1989; Chung *et al.*, 2008) pero la evolución de las reservas del ovocito es diferente en este caso. Los gránulos de vitelo y lípidos no desaparecen sino que se acumulan y forman una masa globulosa densa en el lumen del acino y en el citoplasma de los ovocitos atrésicos. Las grandes vacuolas autofágicas y organelos tipo mielínicos sugieren una gran actividad de degradación y así una parte en reabsorción. La degeneración y reabsorción de los ovocitos permite el reciclaje de los nutrientes para alcanzar los requerimientos energéticos del metabolismo basal (Herlin Houtteville & Lubet, 1975). De Gaulejac *et al.* (1995) propusieron tres tipos de recuperación del contenido de los ovocitos en los acinos de *P. nobilis*, los cuales pudieran aplicarse también a *A. maura*: una recuperación directa por pinocitosis por los ovocitos previtelogénicos; una reabsorción por los hemocitos macrófagos y una reabsorción de las reservas

lipídicas y liberación de gránulos de vitelo en el lumen del acino, por las células auxiliares. Por lo tanto, la pérdida de energía debido a la degeneración de ovocitos es reducida por la reabsorción del contenido de los mismos ovocitos. La fagocitosis y la digestión intracelular de los productos que se originan de la degeneración de los ovocitos pueden permitir una transferencia de los precursores necesarios para la vitelogénesis y la síntesis y almacén de reservas (glucógeno y lípidos) que pueden ser empleados por los ovocitos vitelogénicos. Morvan & Ansell (1988) establecen que la reabsorción de gametos puede ser vista como una adaptación a las condiciones ambientales locales, en especial la temperatura. Derivado de esto, recientemente se ha reportado que cuando las temperaturas en verano, en la Ensenada de La Paz, rebasan los 25 °C las gónadas femeninas de *A. maura* atraviesan por un proceso de reabsorción masiva como una estrategia para adaptarse a condiciones desfavorables para el desove (Camacho-Mondragón *et al.*, 2012). Con los resultados obtenidos a partir de la MET fue posible corroborar esta situación a nivel ultraestructural y permitieron hacer una caracterización detalladas de los daños que presentan los gametos atrésicos.

En conclusión, este estudio que ha seguido a detalle las diferentes etapas de la ovogénesis y la degeneración de los ovocitos y en conjunto con la descripción ultraestructural de la espermatogénesis (Camacho-Mondragón *et al.*, 2014) permiten conocer la gametogénesis de *A. maura*. Además, trabajo previo ha mostrado que esta especie es un hermafrodita protándrico (Camacho-Mondragón *et al.*, en prensa), aunque aún no se cuenta con los estudios ultraestructurales de la gónada de especímenes en cambio de sexo, lo cual complementaría el conocimiento acerca del desarrollo gonádico en todas las condiciones sexuales descritas para este especie.

## CAPÍTULO 2

---

### HERMAFRODITISMO PROTÁNDRICO EN *Atrina maura*

Este trabajo será publicado bajo la siguiente referencia:

Camacho-Mondragón, M. A., B. P. Ceballos-Vázquez, A. Rivera-Camacho & M. Arellano-Martínez. 2014. UNPERCEIVED SEX CHANGE IN *Atrina maura* (BIVALVIA: PINNIDAE): HISTOLOGICAL AND SIZE STRUCTURE EVIDENCE. *Aceptada con revisiones en American Malacological Bulletin.*

## RESUMEN

En este estudio, la evidencia histológica y el análisis de estructura de tallas de tres poblaciones geográficamente separadas en la costa noroeste de México junto con consideraciones teóricas sugieren fuertemente que *Atrina maura* es una especie protándrica. Se recolectaron las gónadas de 931 especímenes de *A. maura* en los tres sitios de estudio analizados: Laguna Ojo de Liebre (27°55'N, 114°20'W de marzo de 2002 a febrero de 2003), Ensenada de La Paz (24°11'N, 110°26'W, de mayo de 2004 a junio de 2005 y durante 2007), y Bahía Magdalena (24°30'N, 111°48'W, de marzo a octubre de 2008). El análisis microscópico de las gónadas de especímenes hermafroditas permitió establecer la reconstrucción de una detallada secuencia histológica durante la transición sexual de macho a hembra. El análisis de la proporción de sexos por clases de talla reveló que los machos se presentan en las clases más pequeñas, las hembras en las clases más grandes y los hermafroditas en clases intermedias. Además, las comparaciones de la talla de primera madurez entre sexos sustentan la hipótesis que esta especie no es gonocórica. El cambio de sexo (protandría o protoginia) ha pasado desapercibido en muchos bivalvos debido a la rapidez con la que ocurre.

## INTRODUCCIÓN

La sexualidad de los bivalvos ha sido por mucho tiempo un tema controversial en la biología reproductiva de estos moluscos. Inicialmente, esto se ve reflejado en la gran discrepancia en los términos utilizados para describir el estatus sexual de las especies estudiadas. Algunas revisiones han intentado aclarar esta situación proponiendo un uso generalizado de conceptos dentro de las investigaciones malacológicas (Hoagland, 1984); sin embargo, está claro en la literatura que aun no se ha alcanzado un consenso. No obstante, existen algunos acuerdos en ciertas definiciones generales. El hermafroditismo, en el sentido más amplio, implica la producción de células sexuales masculinas y femeninas por el mismo individuo. El hermafroditismo simultáneo involucra la liberación de ovocitos y espermatozoides por un individuo al mismo tiempo, mientras que el hermafroditismo secuencial es un término general para la función de un organismo que primero se desarrolla como un sexo y luego cambia al otro. La mayoría de los autores restringen este término a protandría o protoginia (Giese & Pearse, 1974; Charnov, 1979), aunque los términos cambio de sexo y reversión sexual son usados como sinónimos (Hoagland, 1984).

Otro aspecto controversial acerca de la sexualidad en bivalvos son los criterios para establecer el estatus sexual de una especie. Los trabajos clásicos publicados hace más de 40 años (Coe, 1943; Fretter & Graham, 1962; Morton, 1963; Ghiselin, 1969), establecen que aproximadamente el 96% de los bivalvos tienen sexos separados. Pero, existe un número creciente de reportes de la presencia de hermafroditas en especies previamente consideradas de sexos separados.

El cambio de sexo en los bivalvos ha sido objeto de interés científico desde el siglo XVII (Coe, 1943). Sin embargo, la mayoría de los trabajos que abordan el hermafroditismo secuencial en bivalvos únicamente mencionan y describen brevemente los hallazgos “accidentales” de especímenes con gónadas en transición y, en algunos casos, se observan sólo unos pocos gametos del sexo hacia el que hipotéticamente se está dando la transición (Angel-Pérez *et al.*, 2007). Otros reportes incluso asignan a ciertas especies como protándricas basados principalmente en las proporciones sexuales específicas de edades o tallas (Tranter, 1958; Asif, 1979).

*Atrina maura*, es reconocida como una especie gonocórica (Rodríguez-Jaramillo *et al.*, 2001; Ahumada-Sempoal *et al.*, 2002; Enríquez-Díaz *et al.*, 2003; Angel-Pérez *et al.*, 2007) y sólo un hermafrodita de *A. maura* ha sido reportado (Angel-Pérez *et al.*, 2007). Dado este escenario, este estudio pretende examinar la sexualidad del hacha *A. maura* en tres poblaciones geográficamente separadas usando diferentes enfoques: análisis histológicos, proporciones sexuales en relación con la estructura de tallas, y comparaciones entre sexos de la talla de primera madurez.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

Como parte de una extensa investigación sobre la reproducción de organismos silvestres de *Atrina maura* en el noroeste de México, se recolectaron mensualmente especímenes de esta especie, por medio de buceo semiautónomo, en tres sitios de la costa de la Península de Baja California, México: Laguna Ojo de Liebre (LOL, 27°55'N, 114°20'O) entre marzo de 2002 y febrero de 2003; Ensenada de La Paz (ELP, 24°11'N, 110°26'O) entre mayo de 2004 y junio de 2005 y durante 2007; y Bahía Magdalena (BM, 24°30'N, 111°48'O) entre marzo y octubre de 2008. Los especímenes recolectados fueron transportados vivos al Laboratorio de Invertebrados Marinos del Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas (CICIMAR-IPN) donde se registró la altura de la concha (AC, distancia en línea recta desde el umbo al margen ventral de la concha) ( $\pm 1$  mm). Dado que *A. maura* tiene una gónada difusa (la gónada infiltra la glándula digestiva formando la masa visceral), una porción de la masa visceral que contuviera principalmente tejido gonádico fue diseccionada de cada espécimen y fijada en formol al 10%. Posteriormente, cada porción de tejido se deshidrató a través de una secuencia de alcoholes de concentración creciente, seguida de un aclarado con Hemo-De® y se incluyó en Paraplast-Xtra®. Se obtuvieron cortes de 5  $\mu$ m de grosor y se tiñeron con hematoxilina y eosina (Humason, 1979). La estructura de la gónada fue examinada bajo el microscopio de luz para determinar el sexo y el grado de desarrollo gonádico de cada espécimen. Durante ese proceso, se identificaron especímenes hermafroditas en las tres zonas de estudio.

Para documentar y describir el proceso de cambio de sexo en *A. maura*, se digitalizaron al azar cinco campos de cada gónada con presencia simultánea de gametos masculinos y femeninos. El proceso de cambio de sexo se clasificó en

tres etapas: inicial, intermedia y avanzada, con base en la abundancia y arreglo de los gametos en los acinos. Para categorizar objetivamente la transición sexual para cada etapa, se midieron las áreas ocupadas por cada tipo de gameto en 30 acinos (en cada uno de los cinco campos digitalizados de cada gónada) utilizando el programa SIGMA SCAN PRO (v. 5.0, Systat Software, Inc.). Después, se calculó el área relativa (%) ocupada por gametos masculinos y femeninos en relación al área total de tejido en cada campo. Adicionalmente, se calculó la frecuencia de los diferentes tipos de ovocitos reconocidos previamente para esta especie, ovocitos previtelogénicos, vitelogénicos y post-vitelogénicos (Rodríguez-Jaramillo *et al.*, 2001; Enriquez-Díaz *et al.*, 2003; Camacho-Mondragón *et al.* 2012), como un indicador cuantitativo “con mayor resolución” del proceso de cambio de sexo.

También, para reunir más evidencia que apoye la condición protándrica de *A. maura*, se calcularon las proporciones sexuales en cada una de las tres zonas de estudio y en total (considerando los datos agrupados de las tres zonas). Dado que las proporciones sexuales fueron similares en todos los casos, se usaron los datos agrupados de las tres zonas para calcular la proporción sexual por intervalo de talla de 1 cm de AC.

La talla de primera madurez ( $L_{50}$ ) para cada sexo se calculó para cada una de las zonas de estudio y en el total (usando los datos agrupados de las tres zonas) utilizando el método de Somerton (1980). Las estimaciones fueron hechas usando todos los especímenes, ya que todos eran adultos con evidencia de desarrollo de gametos.

### ***Análisis estadísticos***

Para evaluar las diferencias en la frecuencia de los diferentes tipos de ovocitos y el área ocupada por los gametos femeninos o masculinos entre las etapas de transición sexual (inicial, intermedia y avanzada), se utilizaron ANDEVA's de una vía, seguidos por pruebas *a posteriori* de comparación de medias de Tukey. Además, se utilizaron pruebas pareadas de *t* de Student para comparar el área ocupada por gametos femeninos y masculinos en cada etapa de transición. En todos los casos, los valores de porcentaje fueron transformados con arcoseno (Zar, 1996) antes del análisis para reducir la dependencia de la media en la varianza de la muestra y para normalizar la distribución de los datos. Sin

embargo, los resultados son presentados como medias sin transformar y errores estándar.

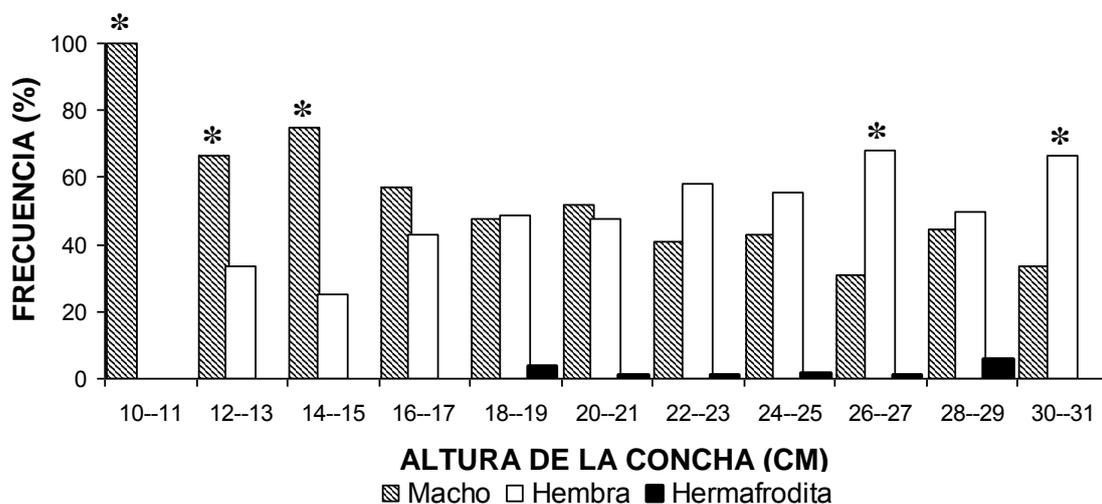
Las diferencias en las proporciones sexuales, en total y por intervalo de talla, fueron evaluadas utilizando pruebas de  $\chi^2$  con la corrección de continuidad de Yates (Zar, 1996). Para poder probar la significancia de las diferencias entre sexos en la talla de primera madurez en cada una de las zonas de estudio, se utilizó un análisis de suma de cuadrados residuales (ARSS de Ratkowsky) (Chen *et al.*, 1992) comparando las pendientes de los modelos logísticos ajustados a los valores de altura de la concha. Todos los análisis estadísticos fueron llevados a cabo utilizando el programa STATISTICA para Windows (Versión 6.0, Statsoft); el nivel de significancia ( $\alpha$ ) fue establecido en 0.05 para todas las pruebas.

## RESULTADOS

Se analizaron las gónadas de un total de 931 especímenes de *Atrina maura* recolectados en las tres áreas de estudio; 498 (53.5%) especímenes fueron hembras, 419 (45%) machos, y 14 (1.5%) hermafroditas. Las proporciones sexuales (hembra:macho) en las tres zonas (LOL 1:1, ELP 1.4:1 y BM 1:1) y en la muestra total (1.19:1) no fueron significativamente diferentes de una proporción 1:1 (LOL:  $X^2 = 0.02$ ,  $P = 0.89$ ; ELP:  $X^2 = 1.29$ ,  $P = 0.26$ ; BM:  $X^2 = 0.02$ ,  $P = 0.89$ ; muestra total:  $X^2 = 0.75$ ,  $P = 0.39$ ).

En la muestra total (utilizando los datos agrupados de las tres zonas), la tallas de los especímenes varió de 10.5 cm a 31.5 cm de AC ( $22.4 \pm 0.99$  cm) ( $\pm$ EE,  $n = 931$ ). Se encontraron significativamente más machos en las tallas más pequeñas, particularmente en los intervalos de 10-11 cm de AC ( $X^2 = 100.01$ ,  $P < 0.001$ ), 12-13 cm de AC ( $X^2 = 11.12$ ,  $P = 0.001$ ) y 14-15 cm de AC ( $X^2 = 25.01$ ,  $P < 0.001$ ). En contraste, se encontraron significativamente más hembras en las clases de talla más grandes, específicamente en los 26-27 cm de AC ( $X^2 = 13.96$ ,  $P < 0.001$ ) y 30-31 cm de AC ( $X^2 = 11.12$ ,  $P = 0.001$ ). En las clases de tallas intermedias, la proporción de hembra:macho no fue significativamente diferente de 1:1 ( $X^2 < 3.84$ ,  $P > 0.05$ ), pero los hermafroditas sólo se presentaron a partir de las tallas intermedias a las clases de talla más grandes (18-29 cm de AC) (Fig. 1). La incidencia de hermafroditismo fue similar en las tres zonas y, aunque ocurrió

sólo con poca frecuencia (LOL 1.59%, ELP 1.78% y BM 0.9%), se pudo reconocer claramente la transición sexual.



**Figura 1.** Distribución de tallas de machos, hembras y hermafroditas de *Atrina maura*. (\*) indican diferencias significativas.

### **Secuencia histológica de cambio de sexo**

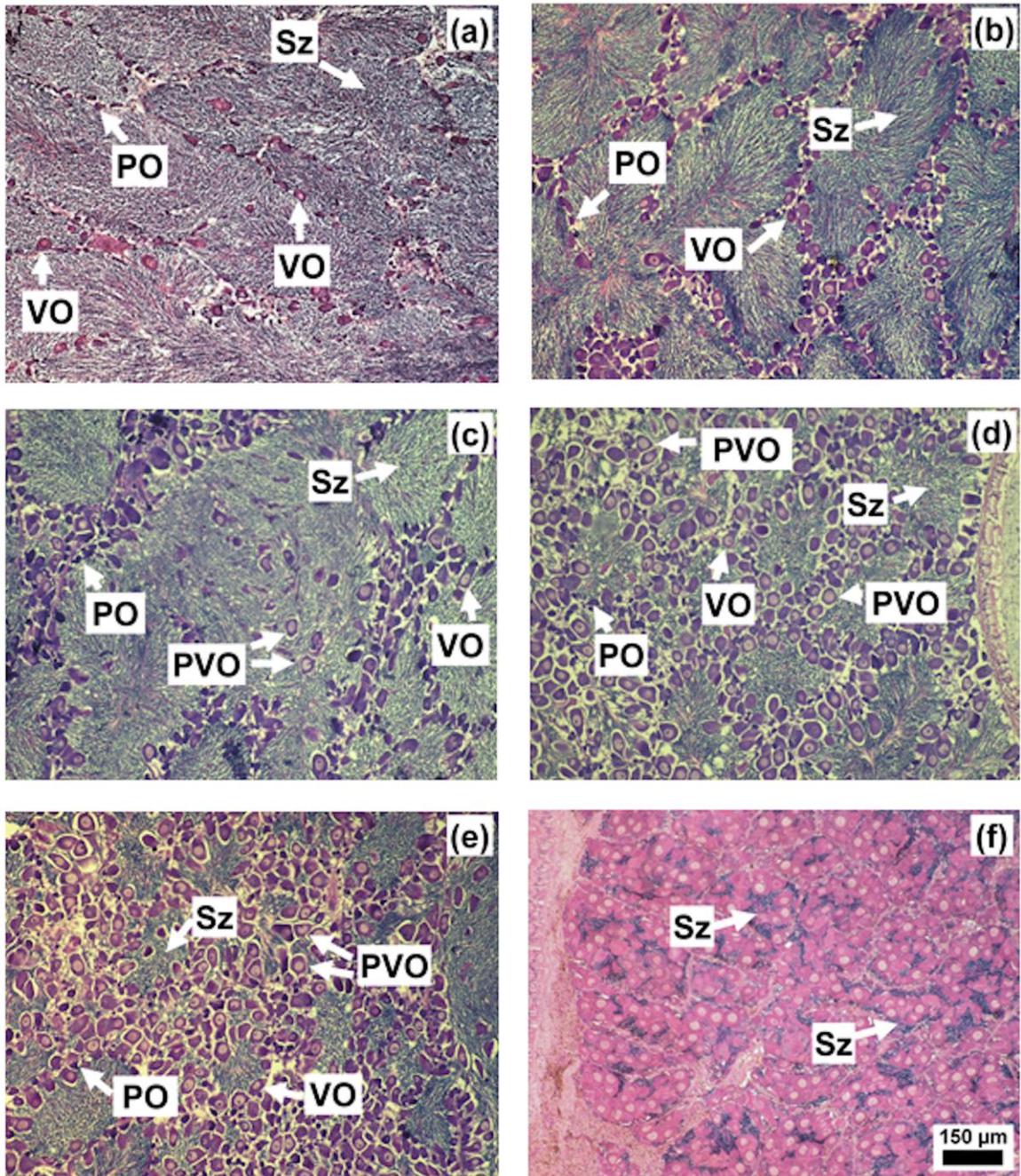
Las observaciones histológicas revelaron que, en los hermafroditas de *A. maura*, los gametos femeninos y masculinos están organizados dentro del mismo acino, una condición conocida como acinos mixtos (Coe, 1945; Reddiah, 1962; Darrigran *et al.*, 1998; Gaspar-Soria *et al.*, 2002). Desde el punto de vista histológico, el proceso de cambio de sexo en *A. maura* puede ser dividido en tres etapas: inicial (Fig. 2a, b), intermedia (Fig. 2c, d) y avanzada (Fig. 2e, f), las cuales pueden ser reconocidas por diferencias significativas en las áreas ocupadas por gametos femeninos ( $F_{(2, 74)} = 171.35$ ,  $P < 0.001$ ; se incrementan al avanzar el cambio) y gametos masculinos ( $F_{(2, 74)} = 171.35$ ,  $P < 0.001$ ; disminuye al avanzar el desarrollo) (Fig. 3), y en la frecuencia de los tipos de ovocitos (Tabla 1). La transición sexual inicia a partir de machos maduros (gónadas llenas de espermatozoides que dirigen sus flagelos hacia el lumen) caracterizados por presentar una ligera actividad espermatogénica en la periferia de los acinos, al mismo tiempo, se observan algunas zonas de liberación de gametos (Camacho-Mondragón *et al.*, 2012).

*Etapa inicial.* El área ocupada por gametos masculinos (82%) fue significativamente ( $t_{34} = 55.86$ ,  $P < 0.001$ ) mayor que el área ocupada por

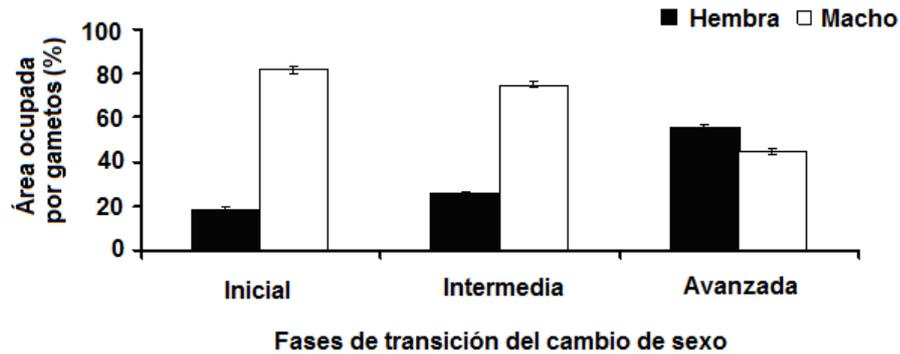
gametos femeninos (18%). Las espermátidas y espermatozoides predominan en el centro de los acinos, mientras que los ovocitos se encuentran adheridos a las paredes de éstos (Fig. 2a, b). El análisis de frecuencias de tipos de ovocitos (Tabla 1) mostró que los ovocitos previtelogénicos y vitelogénicos son más frecuentes en esta etapa, mientras que los ovocitos post-vitelogénicos son escasos (< 2%).

*Etapa intermedia.* Al avanzar el cambio de sexo, el área ocupada por gametos masculinos (75%) disminuyó al ser liberados (Fig. 2c, d), mientras que la frecuencia de ovocitos post-vitelogénicos se incrementó significativamente (>30%) ( $F_{(2, 11)} = 154.67$ ,  $P < 0.001$ ), y algunos de ellos se localizaron en el centro de los acinos, llenando el espacio dejado por los espermatozoides liberados.

*Etapa avanzada.* El área ocupada por gametos masculinos (30%) disminuyó significativamente ( $t_{18} = 57.09$ ,  $P < 0.001$ ) por lo que la gónada adquirió una estructura de apariencia prácticamente femenina, con una alta frecuencia (70%) de ovocitos post-vitelogénicos (Tabla 1, Fig. 2e, f).



**Figura 2.** Microfotografías de gónadas de *Atrina maura* en transición sexual de macho a hembra (10x). a) y b) Fase inicial, c) y d) Fase intermedia, e) y f) Fase avanzada; PO ovocito previtelogénico, VO ovocito vitelogénico, PVO ovocito postvitelogénico, Sz espermatozoides.



**Figura 3.** Porcentaje de área ocupada por gametos de hembras y machos en relación a la fase de cambio de sexo en gónadas hermafroditas de *Atrina maura*. Las barras indican el error estándar.

**Tabla 1.** Porcentaje de ocurrencia de los diferentes tipos de ovocitos en relación a las fases de transición sexual en *Atrina maura*. En las filas, los valores con letras diferentes son significativamente diferentes.

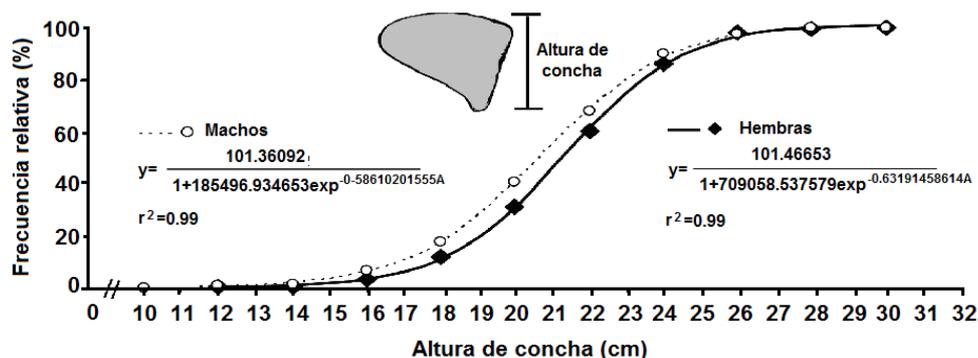
Tipo de ovocito	Fase de transición sexual			ANDEVA
	Inicial	Intermedia	Avanzada	
Previtelogénicos	50.3 ± 3.1 <sup>c</sup>	33.1 ± 3.7 <sup>b</sup>	7.8 ± 2.5 <sup>a</sup>	$F_{(2,11)} = 45.28, P < 0.001$
Vitelogénicos	47.8 ± 2.8 <sup>b</sup>	34.3 ± 3.4 <sup>ab</sup>	22.0 ± 4.1 <sup>a</sup>	$F_{(2,11)} = 12.91, P = 0.001$
Posvitelogénicos	1.9 ± 0.5 <sup>a</sup>	32.6 ± 2.1 <sup>b</sup>	70.3 ± 5.4 <sup>c</sup>	$F_{(2,11)} = 157.06, P < 0.001$

Se muestran la media ± EE (n = 5 para inicial e intermedia, n = 4 para avanzada). En las filas, los valores con letras diferentes son significativamente diferentes.

### **Talla de primera madurez**

Cuando se compararon la talla de primera madurez de machos y hembras, el análisis de suma de cuadrados residuales (ARSS) reveló diferencias significativas (LOL:  $F_{(2, 188)} = 21.85, P = 0.04$ ; BM:  $F_{(2, 221)} = 29.22, P = 0.03$ ; EP:  $F_{(2, 732)} = 131.05, P = 0.01$ ) entre sexos en cada una de las tres zonas de estudio. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas (ARSS, Hembras:  $F_{(3, 614)} = 18.71, P = 0.05$ ; Machos:  $F_{(3, 526)} = 16.21, P = 0.06$ ) cuando se compararon las tallas de primera madurez independientemente de hembras o machos entre las tres zonas. Basados en este resultado, los datos de las tres zonas se agruparon para calcular la talla de primera madurez general para machos y para hembras. La talla de primera madurez fue de 21.28 cm AC ( $r^2 = 0.99$ ) para las hembras y 20.66 cm AC ( $r^2 = 0.99$ ) para los machos (Fig. 4). Sin embargo, se

observaron machos maduros desde los 10.5 cm AC y hembras maduras desde los 12.2 cm AC. Se encontró una diferencia significativa (ARSS,  $F_{(2, 1140)} = 207.38$ ,  $P = 0.005$ ) en la talla de primera madurez general entre machos y hembras; esto significa que los machos de *A. maura* alcanzan la madurez sexual a tallas menores que las hembras.



**Figura 4.** Talla de primera madurez en machos y hembras de *Atrina maura*. Se incluyen los modelos ajustados.

## DISCUSIÓN

Hasta ahora, *Atrina maura* ha sido reconocida como una especie gonocórica con sexos claramente definidos aunque sin dimorfismo sexual (Rodríguez-Jaramillo *et al.*, 2001; Ahumada-Sempoal *et al.*, 2002; Enríquez-Díaz *et al.*, 2003; Angel-Pérez *et al.*, 2007). Únicamente un trabajo ha reportado la presencia de un sólo individuo hermafrodita en *A. maura* (Angel-Pérez *et al.*, 2007), pero la información mencionada es escasa y no permite hacer ninguna conjetura al respecto.

En la presente investigación, especímenes hermafroditas de *A. maura* presentaron algunas características que permitieron una identificación clara de una secuencia histológica de etapas de transición de macho a hembra. Aparentemente, la transición sexual inicia en machos con gónadas maduras que muestran evidencia de inicio de desove. Como regla general, las células masculinas maduran antes que las células femeninas (debido a los costos metabólicos) y, así, la fase inicial es funcionalmente masculina (Coe, 1943). Ejemplos de este mismo fenómeno incluyen reportes para *Arca noae* (Peharda *et al.*, 2006), *Crassostrea corteziensis* (Chávez-Villalba *et al.*, 2008), *Pinctada radiata* (Derbali *et al.*, 2009) y *P. margaritifera* (Chávez-Villalba *et al.*, 2011), en los cuales

los machos predominan en las clases de talla más pequeñas mientras que las hembras se vuelven predominantes al incrementarse la talla. Estas diferencias en las proporciones sexuales han sido catalogadas como un resultado directo del cambio de sexo; otras especies de bivalvos han mostrado que las proporciones sexuales están sesgadas hacia el sexo que madura primero en las clases de talla pequeñas y posteriormente cambia hacia el sexo que madura después (Guo *et al.*, 1998; Yusa, 2007). Similarmente, este estudio apoya estos hallazgos mostrando que además de las proporciones sexuales sesgadas, en *A. maura*, la talla de primera madurez de machos fue significativamente menor que la de las hembras en las tres zonas estudiadas.

La secuencia de cambio de sexo descrita aquí para *A. maura* muestra, en términos generales y a través de sus tres etapas (inicial, intermedia y avanzada), que ocurre una liberación sucesiva de espermatozoides al mismo tiempo que inicia el crecimiento de ovocitos. Estos organismos no parecen producir una nueva capa de espermatogonias; en cambio, el proceso de maduración de las células espermáticas existentes continúa. Para el momento en que los espermatozoides han sido liberados casi completamente, los ovocitos alcanzan su nivel máximo de crecimiento (ovocitos post-vitelogénicos), la cual es la última etapa que pudo ser reconocida en los cortes histológicos examinados en este estudio. Dado que no hay evidencia disponible en sentido contrario, *i.e.*, hembras en desove que cambien a machos en inicio de desarrollo, se asume que éstas continúan su subsecuente proceso de madurez gonádica exclusivamente como hembras. Apoyando esta visión, el análisis de proporciones sexuales por clases de talla en este estudio muestra una proporción mayor de machos en las clases de talla más pequeñas, un incremento de hermafroditas al aumentar la talla (alrededor de los 18 cm AC) y un porcentaje mayor de hembras que machos en clases de tallas más grandes. Este mismo patrón en la distribución de las proporciones sexuales por clase de talla ha sido considerado, por sí solo, como evidencia de protandría en otras especies de bivalvos (Tranter, 1958; Asif, 1979; Thielley, 1993).

Esta investigación encontró evidencia sólida y consistente de las tres zonas de estudio, y aparentemente sin diferencias interanuales, sugiriendo un hermafroditismo protándrico en *A. maura*. En las poblaciones de *A. maura* de la Península de Baja California estudiadas, se observaron hermafroditas sólo en

baja frecuencia (0.9-1.78%), como también ha sido reportado para otros miembros de la familia Pinnidae, e.g. *Atrina seminuda* (Gaspar-Soria *et al.*, 2002) y *Pinna rugosa* (Ceballos-Vázquez *et al.*, 2000), para los cuales se ha sugerido hermafroditismo casual. Por otra parte, los porcentajes bajos de individuos en transición sexual reportados para otras especies de bivalvos consideradas como gonocóricas o hermafroditas secuenciales (Tabla 2) no han impedido reconsiderar o reafirmar su estatus sexual basado en varios argumentos. Se ha sugerido principalmente que los hermafroditas atraviesan las etapas de transición sexual tan rápidamente que éstas difícilmente pueden ser detectadas por medio de técnicas clásicas (histología) (Thielley, 1993). Un ejemplo de esto es *P. margaritifera*, la cual es reconocida como un hermafrodita secuencial protándrico, a pesar de los porcentajes bajos de individuos en transición sexual que han sido observados en estudios dirigidos hacia la sexualidad de esta especie (Tranter, 1958; Thielley, 1993; Pouvreau *et al.*, 2000; Chavez-Villalba *et al.*, 2011). En otro contexto, una observación poco frecuente es que la fase inicial en una población joven esté constituida por hembras, individuos protogínicos (Coe, 1943), como es el caso en el mejillón *Mytella charruana*, en el cual las hembras son más abundantes que los machos en todas las clases de talla (Stenyakina *et al.*, 2010).

El cambio de sexo ocurre en una variedad de animales marinos, incluyendo peces, equinodermos, crustáceos, moluscos y gusanos poliquetos (Allsop & West, 2004). Los mecanismos evolutivos para el hermafroditismo secuencial pueden incluir la liberación de hormonas (Coe, 1943; Croll & Wang, 2007), metabolismo alimenticio (Tranter, 1958), aislamiento genético (Ghiselin, 1969), o prevención de autofecundación en organismos que desovan al medio ambiente (Geise & Pearse, 1974). Las hachas viven enterradas, lo cual puede favorecer la posibilidad de desarrollar individuos hermafroditas, de acuerdo al modelo de baja densidad (Ghiselin, 1969). Si la densidad disminuye, se reducen las oportunidades de reproducirse, especialmente si individuos cercanos son del mismo sexo. En este sentido, la posibilidad del cambio de sexo aumenta la probabilidad de una fertilización exitosa.

Por otra parte, se considera que el momento del cambio de sexo en moluscos está programado genéticamente y, por lo tanto, la proporción sexual está determinada por la estructura de edad o talla y por la composición genética de una población, en lugar de la interacción de grupo (Hoagland, 1978), como

parece ser el caso en *A. maura*. A pesar de lo anterior, el mecanismo genético para la determinación sexual ha probado ser impreciso por sí mismo, pero es crucial para el entendimiento de la importancia relativa de los genes y el ambiente en los procesos del cambio de sexo (Hoagland, 1978).

Por lo tanto, para *A. maura* la ventaja de protandria se explica mejor por el modelo de la ventaja del tamaño (Ghiselin, 1969). De acuerdo a este modelo, un individuo es más exitoso reproductivamente al pertenecer a un sexo (macho, en este caso) cuando es de talla pequeña pero alcanza una reproducción más exitosa cambiando al sexo opuesto cuando crece. Como se necesita más energía para producir ovocitos (Sastry, 1979) que para producir espermatozoides, un organismo protándrico puede invertir sus reservas de energía para crecer o sobrevivir durante su fase masculina (Wright, 1988), y luego tomar ventaja de su talla mayor como hembra para incrementar su potencial reproductivo (Ghiselin, 1969).

En conclusión, la sólida evidencia histológica de transición sexual, las proporciones sexuales para las diferentes clases de talla en las tres zonas de estudio y la talla de madurez sexual menor para los machos, todo apoya la hipótesis de protandria en *A. maura*. Por lo tanto, se considera que esta situación no es incidental sino una condición inherente a la sexualidad de esta especie, que no había sido evidenciada previamente debido a la rapidez del proceso de transición sexual y por los tamaños de muestra pequeños analizados anteriormente. Sin embargo, es probable que muestras recolectadas más frecuentemente (en intervalos menores a un mes) permitirían observar el proceso de transición sexual en un número mayor de casos. Similarmente, estudios que examinen específicamente la sexualidad de estos bivalvos, ya sea con organismos silvestres o monitoreando especímenes individuales bajo condiciones de laboratorio, puedan clarificar la tendencia evolutiva del hermafroditismo en estas poblaciones.

### CAPÍTULO 3

---

#### VARIACIONES ESTACIONALES Y GEOGRÁFICAS DE LAS TÁCTICAS REPRODUCTIVAS DE *Atrina maura* EN TRES LOCALIDADES DEL NOROESTE DEL PACÍFICO MEXICANO

Este trabajo será publicado bajo la siguiente referencia:

Camacho-Mondragón, M. A., B. P. Ceballos-Vázquez, E. González-Rodríguez & M. Arellano-Martínez. SEASONAL AND GEOGRAPHICAL VARIATIONS IN REPRODUCTIVE TACTICS OF THE PENSHELL *Atrina maura* (BIVALVIA: PINNIDAE), FROM THREE LOCALITIES IN NORTHWESTERN MEXICAN PACIFIC COASTS. *En preparación.*

## RESUMEN

Se examinaron las diferentes tácticas reproductivas de tres poblaciones latitudinalmente separadas de *Atrina maura* en el noroeste del Pacífico mexicano, Laguna Ojo de Liebre, Bahía Magdalena y Ensenada de La Paz, en relación a los regímenes contrastantes de temperatura y disponibilidad de alimento entre las zonas. La condición reproductiva fue analizada en dos temporadas, cálida y fría, con base en el grado de desarrollo de los gametos, diámetros de los ovocitos e índices morfofisiológicos. Todas las poblaciones presentaron ciclos reproductivos y gonádicos continuos. Aunque los desoves ocurrieron durante prácticamente todo el año en las tres poblaciones analizadas, se encontró una variación estacional con las mayores frecuencias principalmente durante la temporada fría. Asimismo, se observaron reabsorciones de las gónadas femeninas durante los meses de la temporada cálida cuando las temperaturas del agua fueron mayores a 25 °C. La variación geográfica se evidenció en el diámetro promedio de los ovocitos postvitelogénicos el cual es significativamente diferente entre poblaciones y entre temporadas cálidas y frías. Estas diferencias son evaluadas en términos de los efectos de los regímenes locales de temperatura y disponibilidad de alimento que interactúan en los procesos de gametogénesis y desove. Se concluyó que la variabilidad estacional en la temperatura juega el papel principal en la determinación de la duración e intensidad de las fases del ciclo reproductivo; mientras que el desove depende de no rebasar un intervalo de temperatura limitado y, en menor medida, de la variación estacional de la concentración de alimento disponible.

## INTRODUCCIÓN

Muchas especies de organismos marinos se distribuyen en un rango latitudinal amplio y frecuentemente despliegan variaciones intraespecíficas en las características fisiológicas y estrategias en su historia de vida (Levinton, 1983). Tales especies son candidatos ideales para determinar cuáles factores ambientales, como la temperatura del agua, que varían con la latitud de manera predecible pueden influenciar su reproducción (Brown, 1984; Williams & Babcock, 2004). Las relaciones causales entre la temperatura y la reproducción han sido difíciles de establecer claramente, debido a las variaciones locales en las condiciones ambientales, como la disponibilidad de alimento y la temperatura (Newell *et al.*, 1982; MacDonald & Thompson, 1985a). Por lo tanto, existe la necesidad de estudios en los cuales se examine la variación intraespecífica de características reproductivas en poblaciones latitudinalmente separadas.

Existe una gran cantidad de literatura acerca de ciclos reproductivos y épocas de desove en muchas especies de bivalvos (Giese & Pearse, 1974; Sastry, 1979; Newell *et al.*, 1982). Desafortunadamente, hay poca información sobre la variación intraespecífica en aspectos reproductivos en poblaciones latitudinalmente separadas (Bricelj *et al.*, 1987), a pesar de que estas características son de los rasgos fisiológicos más sensibles a los cambios ambientales.

El hacha *Atrina maura* es un bivalvo de gran importancia comercial que se distribuye desde la península de Baja California, México, incluyendo el Golfo de California (Poutiers, 1995) hasta el sur de Perú (Keen, 1971). En una publicación previa, se ha descrito cómo las variaciones locales en la temperatura y disponibilidad de alimento pueden influenciar la gametogénesis y las características reproductivas en una población de esta especie en la Ensenada de La Paz, Baja California Sur, México (Camacho-Mondragón *et al.*, 2012). Ahora, en esta nueva investigación, se integra dicha información con datos obtenidos en otros años para esa misma zona de estudio, se analiza y compara dos nuevas poblaciones (Laguna Ojo de Liebre y Bahía Magdalena) y además se utilizan referencias bibliográficas del comportamiento reproductivo en otras poblaciones de México, para incrementar el conocimiento de la variación intraespecífica en *A. maura*. Los objetivos son establecer si los parámetros reproductivos muestran tendencias latitudinales identificables, para determinar cuáles deben ser vistos

como plásticos o variables a escala local y entender el posible valor adaptativo de las tácticas observadas.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### ***Áreas de estudio***

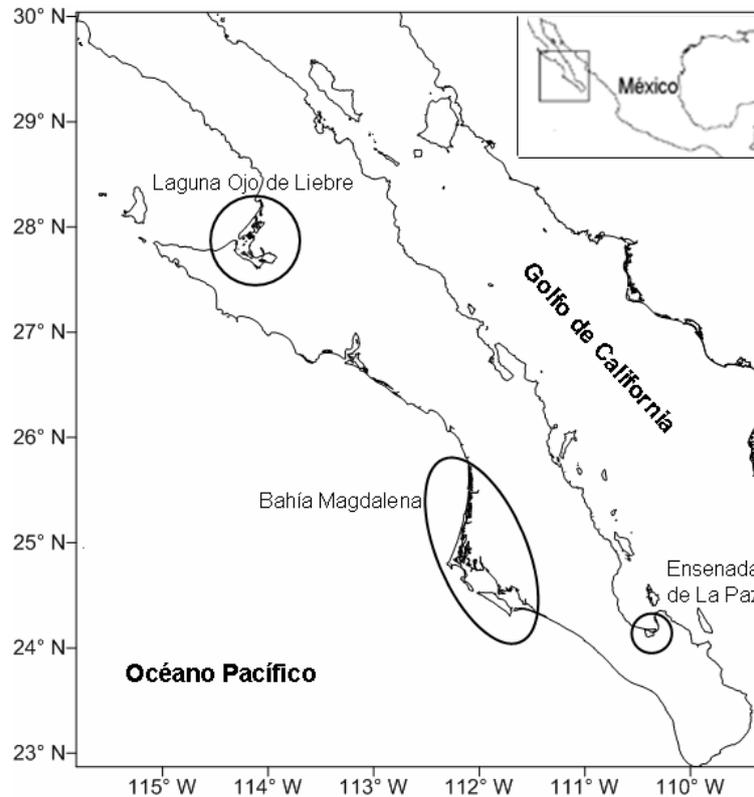
Este estudio se llevó a cabo en tres localidades en las costas de la península de Baja California, México: Ensenada de La Paz, Bahía Magdalena y Laguna Ojo de Liebre (Fig. 1).

La Ensenada de La Paz (EP) (24°06'N, 110°19'O), ubicada dentro del Golfo de California, es un cuerpo de agua somero (menos de 10 m de profundidad) (Gilmartin & Revelante, 1978). Está separada de la bahía de La Paz por una barrera arenosa (de aproximadamente 11 km de longitud) y se comunica con la misma por medio de una boca abierta permanentemente. La temperatura del agua oscila entre los 21 °C en invierno y los 28 °C en verano con un promedio anual de 24.7 °C (Cervantes-Duarte *et al.*, 1991). Los valores promedio más altos de concentración de clorofila a (16 mg/m<sup>3</sup>) se presentan en primavera, en contraste con los valores mínimos (2-5 mg/m<sup>3</sup>) en verano y otoño (Reyes-Salinas *et al.*, 2003).

El complejo lagunar Bahía Magdalena (BM) (24°20'N, 111°27'O) se localiza en la costa occidental de la península de Baja California (Bizzarro, 2008). La parte central de la bahía tiene una profundidad entre 15 y 20 m que disminuye hacia el oriente con una pendiente suave hacia la costa, quedando expuestos frecuentemente extensos bancos de arena durante periodos de bajamar hacia el este y noroeste de la bahía (Álvarez-Borrego *et al.*, 1975; Bizzarro, 2008). Las temperaturas mínimas mensuales fluctúan entre 19 y 20°C de enero a marzo y los valores máximos se presentan durante agosto y septiembre (26-28°C) (Lluch-Belda *et al.*, 2000). La concentración de clorofila a muestra variaciones a lo largo del año, con valores mínimos de noviembre a marzo (<1.5 mg/m<sup>3</sup>) y valores mayores de abril a junio (9.0 mg/m<sup>3</sup>) (Palomares-García *et al.*, 2003; Rodríguez-Mata, 2006).

La Laguna Ojo de Liebre (LOL) (27°55'N, 114°20'O) se ubica en la costa pacífica de la Península de Baja California, es un cuerpo de agua somero aunque presenta canales de más de 20 m de profundidad cerca de la boca. La temperatura promedio máxima en verano es de 25.5 °C y la mínima en invierno es

de 18 °C (Aguila-Ramírez *et al.*, 2000). La concentración de clorofila *a* oscila entre 0.4 y 2.4 mg/m<sup>3</sup> (Millán-Núñez *et al.*, 1987).



**Figura 1.** Localización geográfica de las áreas de estudio.

### ***Factores ambientales***

Con la finalidad de establecer un perfil general del ambiente en cada una de las áreas de estudio, a partir de imágenes satelitales diarias del sensor MODIS Aqua con resolución de 1km, se obtuvieron series históricas (10 años) de datos de temperatura superficial del mar y de concentración de clorofila *a* (mgCL/m<sup>3</sup>) como indicador de la cantidad de alimento disponible para los organismos filtradores. Adicionalmente, se calcularon valores promedio mensuales de ambos factores ambientales para los periodos específicos de muestreo en cada zona.

### ***Muestreo de organismos***

Los organismos fueron recolectados por medio de buceo semiautónomo. Las recolectas mensuales de aproximadamente 30 organismos se realizaron

entre marzo de 2002 y febrero de 2003 en LOL; marzo a octubre de 2008 en BM; mayo de 2004 a junio de 2005 y de enero a diciembre de 2007 en ELP.

Los especímenes fueron transportados al Laboratorio de Invertebrados Marinos del Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas (CICIMAR-IPN) donde fueron limpiados de organismos epibiontes y se les registró la altura de la concha (AC, distancia en línea recta desde el umbo al margen ventral de la concha) ( $\pm 1$  mm), la longitud de la concha (LC, distancia en línea recta desde el margen anterior al margen posterior de la concha) ( $\pm 1$  mm), así como el peso total (PT) y peso sin concha (PSC) ( $\pm 0.1$  g). El músculo abductor fue diseccionado y se registró su peso individual (PM) ( $\pm 0.1$  g).

### ***Análisis histológicos e índices morfofisiológicos***

Dado que *A. maura* tiene una gónada difusa (la gónada junto con la glándula digestiva forman la masa visceral), una porción de la masa visceral que contuviera tejido gonádico fue extraída de cada espécimen y fijada en formol al 10%. Se utilizó la técnica histológica convencional (Humason, 1979), que consiste de una deshidratación a través de una secuencia de soluciones alcohólicas de concentraciones crecientes, seguida de un aclarado con Hemo-De® e inclusión en Paraplast-Xtra®. Se realizaron cortes de 5  $\mu$ m de grosor, teñidos con hematoxilina-eosina y se examinaron bajo el microscopio de luz.

La caracterización de las fases de desarrollo gonádico está basada en los criterios propuestos por Camacho-Mondragón *et al.* (2012) para esta especie: desarrollo, madurez y desove, en el caso de las hembras; desove tipo 1, desove tipo 2 y desove tipo 3, en el caso de los machos; reabsorción (atresia) para ambos sexos. Para poder describir el ciclo reproductivo en cada una de las zonas de estudio, las frecuencias relativas mensuales de cada fase de desarrollo gonádico fueron calculadas y graficadas.

Para evidenciar diferencias en el tamaño de los ovocitos entre localidades, las preparaciones histológicas de hembras maduras fueron digitalizadas y analizadas utilizando el programa SIGMA SCAN PRO (V. 5.0, Systat Software, Inc.). En los ovarios de cada hembra estudiada, se midieron los diámetros de 20 ovocitos postvitelogénicos. Se utilizó únicamente este tipo de ovocito, ya que representa el máximo crecimiento alcanzado por los gametos femeninos potenciales a ser desovados.

Además, se examinaron las variaciones mensuales en el Índice de Condición ( $IC=PSC/PT \times 100$ ) e Índice de Rendimiento Muscular ( $IRM=PM/PSC \times 100$ ) en cada zona de estudio.

### **Análisis estadísticos**

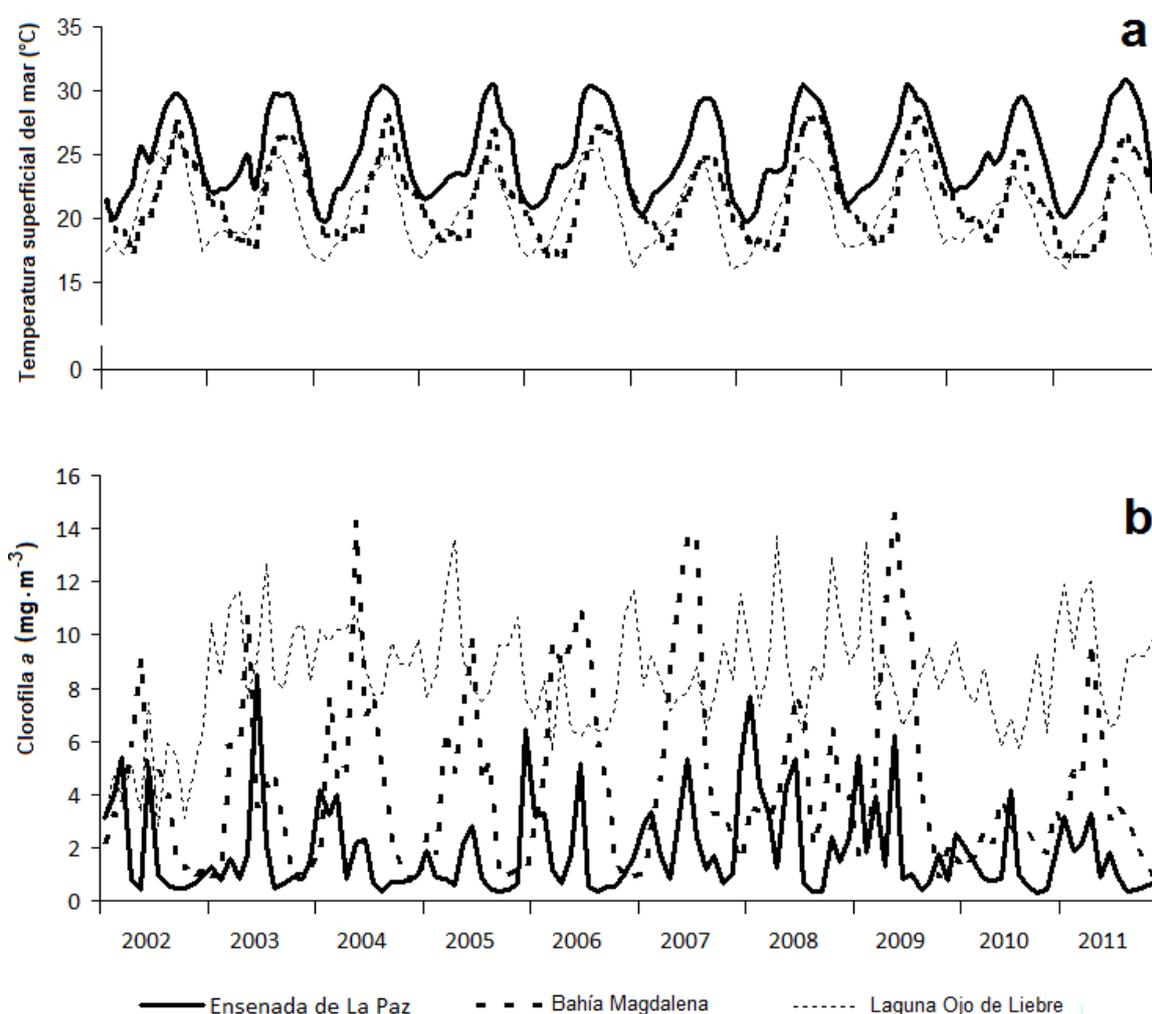
Se utilizaron ANDEVAs de una vía seguidas de pruebas *a posteriori* para comparación de medias (Tukey) para detectar posibles diferencias en las variables biométricas (AC, LC, PT, PSC, diámetro de los ovocitos) entre las tres localidades. Además, se utilizaron pruebas de *t* (Student) para detectar diferencias en las variables biométricas entre sexos en las tres localidades. Adicionalmente, en cada una de las zonas, se llevaron a cabo ANCOVAs con las mediciones mensuales de los diámetros de los ovocitos, utilizando como covariable la talla de las hembras para eliminar su efecto sobre la talla de los gametos. Para analizar las variaciones mensuales en el IC y el IRM en cada localidad se aplicaron ANDEVAs de una vía. Cuando los análisis de varianza detectaron un efecto estadísticamente significativo, se llevaron a cabo pruebas *a posteriori* para comparación de medias (Tukey). Para evaluar el efecto de la temperatura del mar y de la disponibilidad de alimento (concentración de clorofila *a*) sobre la reproducción de *A. maura*, se examinó la relación entre estas variables ambientales y las frecuencias de desove y reabsorción en cada localidad mediante análisis de correlación de Spearman. Adicionalmente, se aplicaron análisis de correlación de Spearman para investigar la relación entre el IC, IRM e IM y los factores ambientales (temperatura y concentración de clorofila *a*).

Las variables expresadas como frecuencia (%) fueron transformadas con arcoseno (Zar, 1996) para reducir la dependencia de la variancia de las muestras sobre las medias y para normalizar la distribución de los datos. Sin embargo, los datos son reportados como medias sin transformar y errores estándar. Todos los análisis estadísticos fueron llevados a cabo utilizando el programa STATISTICA para Windows (Versión 6.0, Statsoft). En todos los casos se estableció un nivel de significancia de  $\alpha=0.05$ .

## RESULTADOS

### *Factores ambientales*

Los registros históricos de temperatura superficial del agua y de concentración de clorofila *a* mostraron diferencias entre las áreas de estudio (Fig. 2). La zona más cálida (19.7-30.8 °C) y con las menores concentraciones de clorofila *a* (0.3-8.5 mg/m<sup>3</sup> media = 1.9 mg/m<sup>3</sup>) es la ELP, la zona más fría (16-25.6 °C) y con las mayores concentraciones de clorofila *a* (2.8-13.7 mg/m<sup>3</sup>; media = 8.4 mg/m<sup>3</sup>) es LOL, mientras que BM presentó temperaturas (17-27.8 °C) y concentraciones de clorofila *a* (0.81-14.5 mg/m<sup>3</sup>; media = 4.4 mg/m<sup>3</sup>) intermedias.



**Figura 2.** Promedios mensuales históricos de a) temperatura superficial del mar y b) concentración de clorofila *a* para las tres zonas de estudio.

### Análisis biométricos

Todas las variables biométricas mostraron diferencias significativas (ANDEVA,  $P < 0.05$ ) (Tabla I) entre las tres localidades. Los análisis de la altura y longitud de la concha indican que los organismos que pertenecen a la población de la ELP son significativamente más pequeños que los de las poblaciones de la LOL y BM. Sin embargo, al examinar los pesos totales y pesos sin concha se observó que los individuos de LOL son significativamente más livianos en comparación con los de las otras dos zonas.

**Tabla 1.** Comparación de datos morfológicos de *Atrina maura* en la muestra total y por sexo entre las zonas de estudio.

		Laguna Ojo de Liebre	Bahía Magdalena	Ensenada de La Paz	ANDEVA
Altura de concha (cm)	Muestra total	23.10 ± 0.23 <sup>b</sup> (11.7-31.5) N = 177	23.08 ± 0.19 <sup>b</sup> (15.7-29.7) N = 249	22.07 ± 0.12 <sup>a</sup> (10.5-30.0) N = 506	P < 0.001
	Hembras	23.60 ± 0.31 <sup>b</sup> (12.6-31.5) N = 95	23.34 ± 0.26 <sup>b</sup> (16.4-29.7) N = 126	22.36 ± 0.15 <sup>a</sup> (13.0-29.1) N = 292	P < 0.001
	Machos	22.53 ± 0.33 <sup>ab</sup> (11.7-29.8) N = 82	22.82 ± 0.28 <sup>b</sup> (15.7-29.0) N = 123	21.67 ± 0.19 <sup>a</sup> (10.5-30.0) N = 214	P = 0.001
Longitud de concha (cm)	Muestra total	12.56 ± 0.12 <sup>b</sup> (8.9-17.1)	12.58 ± 0.12 <sup>b</sup> (7.9-16.5)	11.94 ± 0.08 <sup>a</sup> (5.0-19.0)	P < 0.001
	Hembras	12.82 ± 0.17 <sup>b</sup> (8.9-17.1)	12.73 ± 0.16 <sup>b</sup> (7.9-16.5)	12.17 ± 0.10 <sup>a</sup> (5.0-16.0)	P < 0.001
	Machos	12.25 ± 0.17 <sup>b</sup> (9.2-15.6)	12.42 ± 0.18 <sup>b</sup> (8.5-16.3)	11.64 ± 0.12 <sup>a</sup> (6.5-19.0)	P < 0.001
Peso total (g)	Muestra total	229.92 ± 6.37 <sup>a</sup> (94.3-596.9)	266.16 ± 7.24 <sup>b</sup> (86.5-635.6)	234.81 ± 4.18 <sup>a</sup> (23.1-513.7)	P < 0.001
	Hembras	240.02 ± 9.51 (102.3-596.9)	267.45 ± 9.80 (86.5-594.6)	244.69 ± 5.62 (23.1-510.4)	NS (P = 0.058)
	Machos	218.22 ± 8.11 <sup>a</sup> (94.3-432.6)	264.83 ± 10.73 <sup>b</sup> (89.7-635.6)	221.33 ± 6.12 <sup>a</sup> (39.8-513.7)	P < 0.001
Peso sin concha (g)	Muestra total	79.86 ± 2.12 <sup>a</sup> (32.8-191.5)	100.77 ± 2.74 <sup>b</sup> (36.5-269.3)	85.42 ± 1.50 <sup>a</sup> (8.2-193.9)	P < 0.001
	Hembras	82.21 ± 3.14 <sup>a</sup> (32.8-191.5)	99.78 ± 3.80 <sup>b</sup> (36.5-222.5)	88.57 ± 1.96 <sup>a</sup> (8.2-193.9)	P < 0.001
	Machos	77.14 ± 2.78 <sup>a</sup> (32.8-172.7)	101.78 ± 3.97 <sup>b</sup> (38.1-269.3)	81.11 ± 2.31 <sup>a</sup> (14.4-176.0)	P < 0.001

Datos expresados como medias ± E.E. (mínimo-máximo). Las medias que no comparten el mismo superíndice para las diferentes zonas son significativamente diferentes. N=932 para la muestra total, N=513 para hembras, N=419 para machos.

Además, todas las variables biométricas mostraron diferencias significativas ( $t$  (Student),  $P < 0.001$ ) (Tabla 2) entre sexos en las tres localidades, indicando que las hembras son más grandes y pesadas que los machos en todas las zonas.

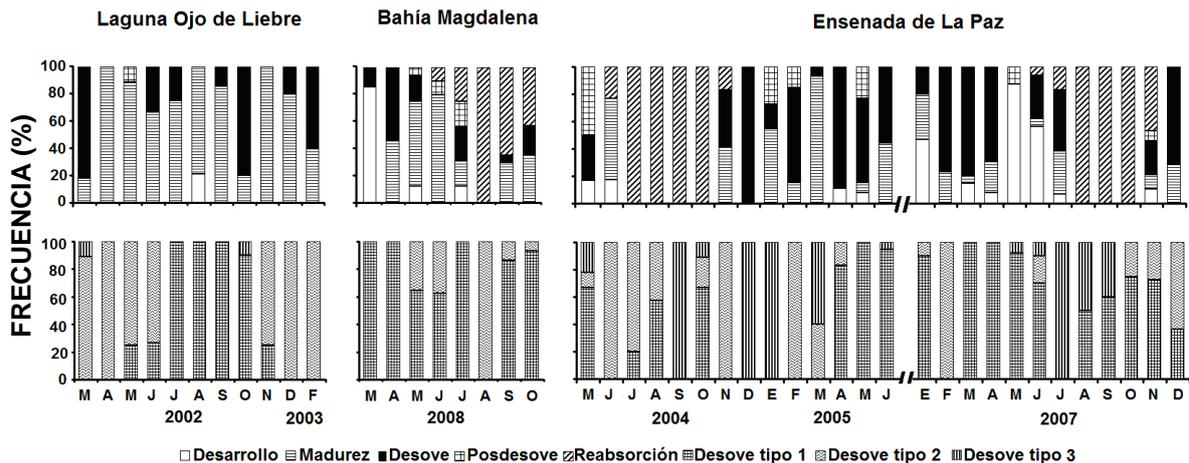
**Tabla 2.** Comparación de datos morfológicos de *Atrina maura* entre sexos en las zonas de estudio.

	Laguna Ojo de Liebre	Bahía Magdalena	Ensenada de La Paz
Altura de concha (cm)	$t_{95} = 77.02$	$t_{126} = 90.41$	$t_{292} = 148.63$
Longitud de concha (cm)	$t_{95} = 77.65$	$t_{126} = 79.14$	$t_{292} = 125.42$
Peso total (g)	$t_{95} = 25.23$	$t_{126} = 27.29$	$t_{292} = 43.54$
Peso sin concha (g)	$t_{95} = 26.16$	$t_{126} = 26.29$	$t_{292} = 45.25$

### ***Tácticas reproductivas y su relación con el ambiente***

#### ***Ciclos reproductivos***

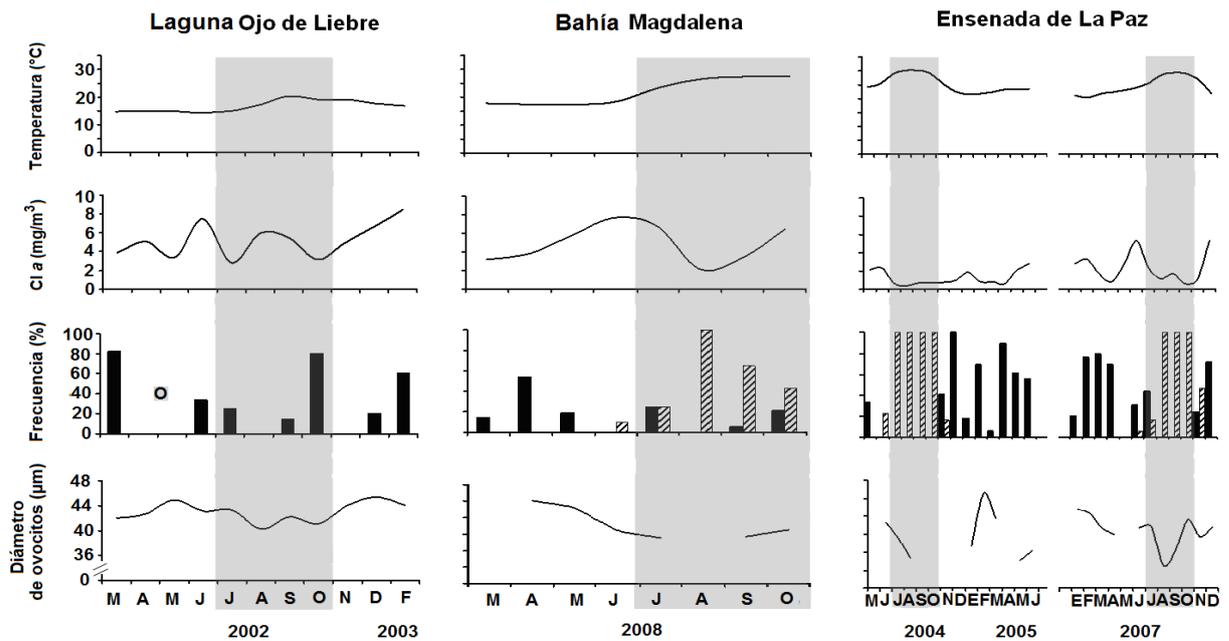
Los ciclos reproductivos de *A. maura* en las tres zonas de estudio son continuos, las fases de madurez y desove se presentaron prácticamente en todos los meses (Fig. 3), por lo que no se puede distinguir una época de inactividad reproductiva representada por organismos indiferenciados. Sin embargo, en BM y ELP se presentaron periodos de varios meses en los que la reproducción se vio interrumpida debido a reabsorciones masivas (Fig. 3). En el caso de los machos, estos se encuentran en desove con remaduración en distintos grados durante todo el periodo de estudio en cada una de las zonas, por lo que no fueron considerados para los análisis que relacionan las variables reproductivas con los factores ambientales.



**Figura 3.** Ciclos reproductivos de hembras (parte superior) y machos (parte inferior) de *Atrina maura* en las tres zonas de estudio.

La fase de desove se presentó durante prácticamente todos los meses en las tres zonas de estudio. En LOL las frecuencias más altas se observaron en marzo y octubre, 82 % y 78 %, respectivamente. En BM se registró un valor máximo de 54 % en abril. Por su parte, en EP las mayores proporciones (42 % a 88 %), se registraron principalmente de noviembre a junio, alcanzando un 100 % en diciembre (Fig. 4). Los eventos de desove presentaron una relación negativa significativa ( $P < 0.05$ ) con la temperatura únicamente en ELP ( $R = -0.66$ ). No existe relación del desove con la concentración de clorofila *a* en ninguna de las zonas de estudio.

La reabsorción (atresia masiva de ovocitos en gónadas maduras) sólo se registró en BM y ELP, en LOL no se registró en las gónadas de ningún individuo. En BM, la reabsorción se presentó en junio (10 %), agosto (100 %), septiembre (65 %) y octubre (43 %). En EP, se repitió el mismo patrón en ambos años; se registraron hembras en reabsorción de junio a noviembre con una frecuencia del 100% de agosto a octubre (Fig. 4). La incidencia de reabsorción en BM y ELP presentan una relación positiva significativa ( $P < 0.05$ ) con la temperatura ( $R = 0.90$  para ambas zonas) y coincide con la elevación estacional de la temperatura ( $>25$  °C) en la época cálida, mientras que en LOL donde no se presentaron reabsorciones la máxima temperatura en la época cálida es 20 °C (Fig. 4). Las frecuencias de reabsorción presentan una relación negativa significativa ( $P < 0.05$ ) con la concentración de clorofila *a* en ELP ( $R = -0.46$ ) en contraste con BM donde la relación no fue significativa.



**Figura 4.** Temperatura, clorofila *a*, frecuencias de desove y reabsorción y diámetros de ovocitos de *Atrina maura* para las tres áreas de estudio. Las sombras indican la época cálida y los meses restantes la época fría.

#### **Diámetro de ovocitos**

En total se analizaron 128 hembras y se midieron 3234 ovocitos postvitelogénicos, en las gónadas en reabsorción se midieron ovocitos no atrésicos. El diámetro promedio es significativamente diferente entre zonas (ANOVA,  $F_{(2, 3233)} = 14.7$ ,  $P < 0.001$ ) (Tabla 3). El diámetro promedio de los ovocitos de las hembras maduras en ELP es significativamente menor ( $42.3 \mu\text{m}$ ) que los diámetros registrados en LOL ( $43.0 \mu\text{m}$ ) y BM ( $43.2 \mu\text{m}$ ). Además, la talla de los ovocitos varió significativamente entre los meses en cada una de las tres localidades (ANCOVA,  $P < 0.001$ ). En las tres zonas se observó disminución significativa (ANDEVA,  $P < 0.001$ ) del tamaño de los ovocitos en los meses cálidos del año (julio a octubre) (Tabla 4). (Fig. 4).

**Tabla 3.** Comparación del diámetro de ovocitos post-vitelogénicos de *Atrina maura* en la muestra total entre las zonas de estudio.

	Laguna Ojo de Liebre	Bahía Magdalena	Ensenada de La Paz	ANDEVA
Diámetro de ovocitos post-vitelogénicos	$43.0 \pm 0.13^b$ (29.9-61.4)	$43.2 \pm 0.17^b$ (32.3-58.2)	$42.3 \pm 0.11^a$ (27.7-59.3)	$P < 0.001$

Datos expresados como medias  $\pm$  E.E. (mínimo-máximo). Las medias que no comparten el mismo superíndice para las diferentes zonas son significativamente diferentes.

**Tabla 4.** Comparación del diámetro de ovocitos post-vitelogénicos, índice de condición e índice de rendimiento muscular de *Atrina maura* por época entre las zonas de estudio.

	Laguna Ojo de Liebre		Bahía Magdalena		Ensenada de La Paz	
	Cálida	Fría	Cálida	Fría	Cálida	Fría
Diámetro de ovocitos post-vitelogénicos	41.7 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup> (29.9-61.4)	43.8 $\pm$ 0.16 <sup>b</sup> (31.9-56.6)	41.90 $\pm$ 0.23 <sup>a</sup> (32.3-58.2)	44.5 $\pm$ 0.24 <sup>b</sup> (33.0-54.9)	41.3 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup> (27.7-54.9)	42.7 $\pm$ 0.13 <sup>b</sup> (31.9-59.3)
Índice de condición	32.7 $\pm$ 0.61 <sup>a</sup> (23.5-41.7)	35.8 $\pm$ 0.89 <sup>b</sup> (16.4-46.9)	36.7 $\pm$ 0.59 <sup>a</sup> (25.8-47.3)	39.0 $\pm$ 0.63 <sup>b</sup> (27.3-48.8)	37.2 $\pm$ 1.01 (22.4-65.3)	36.8 $\pm$ 0.42 (22.6-64.8)
Índice de rendimiento muscular	24.5 $\pm$ 0.61 <sup>b</sup> (17.8-37.6)	19.1 $\pm$ 0.40 <sup>a</sup> (14.3-27.2)	25.3 $\pm$ 0.60 (13.9-38.5)	24.7 $\pm$ 0.76 (15.5-35.6)	21.2 $\pm$ 0.67 <sup>b</sup> (13.3-36.7)	15.8 $\pm$ 0.35 <sup>a</sup> (6.5-35.3)
Temperatura (°C)	17.9 (15.0-20.5)	16.1 (14.7-19.1)	26.3 (23.6-27.5)	17.7 (17.4-18.4)	28.9 (25.9-30.2)	23.1 (20.4-26.8)
Clorofila <i>a</i> (mg*m <sup>-3</sup> )	4.3 (2.8-5.5)	5.7 (3.3-8.4)	4.7 (2.1-6.7)	5.1 (3.1-7.7)	1.0 (0.4-2.4)	2.1 (0.6-5.3)

Datos expresados como medias  $\pm$  E.E. (mínimo-máximo). Las medias que no comparten el mismo superíndice para las diferentes zonas son significativamente diferentes (ANDEVA,  $P < 0.05$ ).

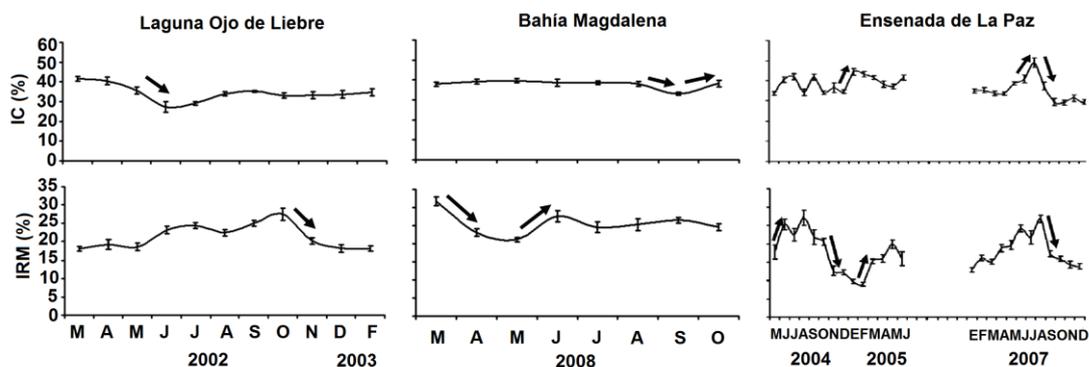
### **Índices morfofisiológicos**

La variación de los índices morfofisiológicos presentó tendencias diferentes en las tres zonas de estudio (Fig. 5). En Laguna Ojo de Liebre, el IC mostró diferencias significativas mensuales (ANDEVA,  $P < 0.01$ ) en el periodo de estudio. Durante marzo y abril se registraron los valores más altos del IC (42 % y 41 %, respectivamente). A partir de mayo se inició un descenso significativo de los valores del IC hasta alcanzar un valor mínimo de 29 % en julio. De agosto de 2002 hasta febrero de 2003 no se presentaron variaciones significativas en los valores del IC (entre 34 y 35%). Los valores del IRM se mantuvieron entre 18 % y 25 % de marzo a septiembre, y en octubre alcanzaron un máximo de 28 %. A partir de noviembre inició un descenso significativo (ANDEVA,  $P < 0.01$ ) hasta obtener un valor de 18 % en diciembre y febrero.

En Bahía Magdalena, el IC mostró un comportamiento estable de marzo a agosto con valores entre 38 % y 40 %, sin embargo, en septiembre se observó un descenso significativo (ANDEVA,  $P < 0.01$ ) hasta un valor mínimo de 33 % y una inmediata recuperación en octubre alcanzando nuevamente un valor de 38 %. Por su parte, el IRM mostró un valor máximo de 32 % en marzo, seguido de una

disminución significativa (ANDEVA,  $P < 0.01$ ) en abril que continuó hasta mayo en donde se registró el valor mínimo de 21 %. En junio se observó un incremento significativo hasta un valor de 28%, y a partir de ese mes y hasta octubre los valores oscilaron entre 25 % y 27 %.

En la Ensenada de La Paz, el índice de condición (IC) mostró diferencias significativas mensuales (ANDEVA,  $P < 0.01$ ) a lo largo de los años de estudio. Al inicio del primer año de estudio (2004-2005), el IC registró un valor mínimo de 34% y a partir de junio y hasta diciembre osciló entre 34 % y 42 %. En enero se registró un incremento significativo de los valores del IC (44 %) y en febrero comenzó un descenso hasta alcanzar un valor de 37 % en mayo. Durante los primeros meses del 2007 (enero-mayo), los valores del IC se mantuvieron entre 33 % y 39 %, a partir de junio (41 %) se observó un incremento significativo (ANDEVA,  $P < 0.01$ ) hasta alcanzar un valor máximo de 49 % en julio; a continuación, en agosto se inició un descenso hasta un valor de 29 % en octubre. Los valores del índice de rendimiento muscular (IRM) también presentaron diferencias significativas (ANDEVA,  $P < 0.01$ ) entre los meses analizados. Al inicio del primer año de estudio (2004-2005), se observó un incremento de los valores del IRM de mayo a junio, con valores de 18 a 25 %. A partir de octubre y hasta febrero hubo un descenso de los valores del IRM desde 21 % a un mínimo de 9 %. Al inicio de 2005, se registró un incremento del IRM de marzo a mayo (15 % a 19 %). En los tres primeros meses del 2007, el IRM mostró valores entre 13 % y 16 %. De abril a julio los valores del IRM oscilaron entre de 19 % y 24 % hasta alcanzar un valor de 27 % en agosto. A partir de septiembre y hasta diciembre, se observó un descenso significativo de los valores del IRM de 17 a 14 %.



**Figura 5.** Variación del índice de condición (IC) y del índice de rendimiento muscular (IRM) de *Atrina maura* en las tres áreas de estudio. Las flechas indican aumentos y descensos significativos (ANDEVA,  $P < 0.05$ ).

Adicionalmente, los análisis de correlación entre los índices morfofisiológicos y los factores ambientales (temperatura y concentración de clorofila *a*) mostraron que el IC presenta una correlación negativa significativa con respecto a la temperatura en BM ( $R = -0.71$ ;  $P < 0.05$ ) a diferencia de LOL y ELP en donde la relación no fue significativa ( $P > 0.05$ ). El IRM presentó una correlación positiva significativa ( $P < 0.05$ ) con la temperatura únicamente en LOL ( $R = 0.94$ ) y EP ( $R = 0.60$ ). Con respecto a la clorofila *a*, no se observó una relación con el IC ni con el IRM en ninguna de las tres zonas.

## DISCUSIÓN

Es evidente a partir de la escasa literatura acerca de *Atrina maura*, y de las tres poblaciones analizadas en el presente estudio, que las tácticas reproductivas varían considerablemente en el intervalo geográfico de distribución de la especie. Han existido muchos intentos para determinar cuáles son los factores ambientales que sincronizan los eventos reproductivos entre los individuos de diversas poblaciones de bivalvos marinos con las condiciones ambientales (Brown, 1984), sin embargo, a la fecha no hay una única respuesta.

En primer lugar, se ha reportado que la disponibilidad de alimento puede ser de mayor importancia en la maduración de la gónada que la temperatura, por lo cual, las especies de bivalvos utilizan dos tácticas, conservativa y oportunista, para lograr un aprovechamiento óptimo de los nutrientes disponibles en cada zona donde habitan (Bayne, 1976; Griffiths, 1977). En la táctica conservativa se acumulan reservas de energía, en diferentes tejidos (músculo, glándula digestiva, entre otros), las cuales se transfieren a la gónada cuando el metabolismo de la gametogénesis así lo requiere. Por su parte, en la táctica oportunista, la gametogénesis está más relacionada con el suministro de alimento disponible, lo cual permite capitalizarlo en condiciones ambientales particularmente favorables, e.g., alta producción de fitoplancton.

En el presente estudio, no se encontró relación significativa entre los índices morfofisiológicos y la disponibilidad de alimento en ninguna de las tres zonas, lo cual puede indicar que esta especie no almacena (por lo menos en el músculo abductor) ni transfiere energía a la gónada y que obtiene la energía necesaria para su metabolismo reproductivo directamente del alimento disponible en el medio (táctica oportunista). Sin embargo, es necesario que esta información

se corrobore con análisis bioquímicos y se incluyan otros tejidos en próximos trabajos.

Aún con lo anterior y a pesar de no existir una relación significativa entre las frecuencias de desove y la concentración de clorofila *a* en ninguna de las zonas, fue posible observar una tendencia particular en el comportamiento reproductivo de *A. maura* con respecto a la disponibilidad de alimento en dos de las zonas analizadas. En Bahía Magdalena y Ensenada de La Paz, las frecuencias más altas de organismos en desove se presentaron justo antes o durante el periodo de máxima disponibilidad de alimento. Esta sincronización permite que tanto las larvas como los adultos tengan acceso a suministros abundantes de alimento; esto maximiza la probabilidad de un reclutamiento exitoso y la tasa de adquisición de energía por los adultos para la siguiente estación reproductiva (Bayne, 1976; Sastry, 1979), como fue comprobado para la población de la Ensenada de La Paz en un estudio independiente (Aguillón-Negreros, 2011). En contraste, en Laguna Ojo de Liebre, el alimento es abundante durante todo el año, por lo que *A. maura* presenta frecuencias de desove en todas las estaciones. Este comportamiento refleja el alto grado de sincronía en la condición y ciclicidad gametogénica de *A. maura* con respecto a la variación temporal en la disponibilidad local de alimento en cada una de las zonas.

Por otro lado, la temperatura del agua, la cual varía estacional y latitudinalmente de manera moderadamente uniforme, frecuentemente ha sido considerada como un factor dominante de sincronización (Sastry, 1979). Y aunque se ha documentado una correlación entre las diferencias latitudinales en la temperatura del agua y el ciclo reproductivo para un número de especies (Macdonald & Thompson, 1988; Cardoso *et al.*, 2007; Enríquez-Díaz *et al.*, 2003), para algunos autores es difícil demostrar una influencia causal simple de la temperatura en la reproducción (Brown, 1984). Existe evidencia que apoya la idea que existe un umbral de temperatura, o posiblemente una tasa de cambio en la temperatura (Bayne, 1975; Sastry, 1979), que puede influenciar la gametogénesis y actuar como un disparador para el desove. En el caso particular de *A. maura*, en Bahía Magdalena y Ensenada de La Paz, se presentan evidencias claras de que la temperatura es el factor principal que regula el ciclo reproductivo de esta especie y que un aumento más allá de 25 °C en la época cálida, provoca que la

gónadas entren a un proceso de reabsorción (lisis masiva), y que el desove, que de manera regular es continuo, se vea detenido hasta que las condiciones térmicas sean favorables de nuevo. Sin embargo, esta situación en dos poblaciones al norte de la distribución de la especie, contrastan con lo encontrado para la población de Oaxaca, al sur del Pacífico mexicano. En esta última localidad, las temperaturas oscilaron entre 28-30 °C durante todo el año y el ciclo reproductivo presentó una etapa de reposo (indiferenciación) y no se evidenciaron gónadas en reabsorción masiva (Angel-Pérez *et al.*, 2007). Esta diferencia tan radical puede estar explicada por las adaptaciones fisiológicas que son potencialmente ajustables para maximizar la fecundidad de los animales y por lo tanto su habilidad competitiva en un ambiente particular (Brown, 1984). Probablemente, la táctica de utilizar un periodo de reposo compense el gasto energético que se supone pueden cubrir los nutrientes reutilizados a partir de las reabsorciones en las poblaciones del norte donde los ciclos son continuos y requieren un suministro mayor de energía (Dorange & Le Pennec, 1989; De Gaulejac *et al.*, 1995).

Además, cuando se comparan ciclos reproductivos entre diferentes localidades, es importante no sólo tener en cuenta el nivel absoluto de los valores de temperatura a lo largo del año, sino principalmente los intervalos de temperatura (variabilidad). Chipperfield (1953) sugirió que la tasa de cambio de la temperatura puede influenciar la velocidad de la gametogénesis en *Mytilus edulis* y probablemente este mismo comportamiento se observe en las poblaciones de *A. maura*. En el norte, donde las variaciones de temperatura son de aproximadamente 10 °C, los ciclos reproductivos no tienen una fase de reposo, mientras que en el sur, donde la variación es de alrededor de 3 °C, los organismos detienen el proceso gametogénico por un cierto periodo.

Es interesante especular sobre el significado adaptativo de las especies de moluscos planctotróficos que tienen periodos de desove bien establecidos en alguna época en particular del año, comparadas con especies que presentan periodos extensivos de desove. En el primer caso, existe una alta probabilidad de fertilización de los ovocitos (Sastry, 1979). También, las larvas pueden ser producidas en el momento más oportuno en lo que respecta a la disponibilidad de alimento (Sastry, 1975) y aún tener tiempo suficiente para superar la depredación rápidamente (Seed & Brown, 1978) y acumular una reserva de nutrientes antes

que comience la siguiente estación. En el segundo caso, existe un desove continuo, que prolonga el reclutamiento, lo cual significa que bajo condiciones ambientales desfavorables, que pudieran matar o evitar el asentamiento de las larvas vulnerables, sólo una porción de los reclutas potenciales sería eliminada. Así, estas diferencias en los periodos de desove, pueden ser una respuesta adaptativa a las diferencias geográficas en el periodo de máxima producción de alimento y temperatura (Sastry, 1970).

Es evidente, por lo tanto, que la influencia de la temperatura y la disponibilidad de alimento en los procesos de gametogénesis y desove en las poblaciones de bivalvos es de naturaleza compleja. Sastry & Blake (1971) y Bayne (1975) han mostrado que la tasa de gametogénesis está regulada por las influencias combinadas de temperatura y nutrición; ya que estos probablemente sincronizan factores endógenos tales como el ciclo neurosecretor y la utilización de reservas de glucógeno (Lubet, 1957). El mecanismo preciso del desove aún permanece sin ser explicado. Bayne (1975) encontró que aunque el inicio del desove estaba relacionado con la temperatura, su duración no lo estaba. Otros autores han enfatizado la importancia de los cambios a corto plazo en los factores ambientales (salinidad, temperatura y turbidez) y la presencia de gametos en el agua como los disparadores del proceso de desove (Brown, 1984).

El tamaño del ovocito es un rasgo importante desde los puntos de vista ecológico y evolutivo, ya que refleja la inversión energética materna y tiene influencia en la adecuación (fitness) maternal y en la de la descendencia (Lango-Reynoso *et al.*, 2000). Los ovocitos post-vitelogénicos de *A. maura* de la Ensenada de La Paz fueron significativamente más pequeños en comparación con los ovocitos de Laguna Ojo de Liebre y Bahía Magdalena. También se observó que los individuos de la Ensenada de La Paz presentaron tallas significativamente menores que los individuos de las otras dos poblaciones analizadas en este estudio. Bayne & Newell (1983) encontraron que en mejillones, los individuos pequeños tienen mayores tasas metabólicas y de requerimientos energéticos de mantenimiento en contraste con los individuos grandes. Aunque los mejillones más pequeños tienen una mayor eficiencia de mantenimiento que los individuos más grandes, esto no compensa completamente las diferencias en los requerimientos de mantenimiento y por lo tanto los mejillones más pequeños pierden peso más rápidamente durante los periodos de inanición que los

mejillones más grandes. Si lo mismo es verdad para *A. maura*, entonces los individuos de la Ensenada de La Paz, pudieran estar asignando una mayor cantidad de energía en los gastos metabólicos que implica mantenerse en una zona con menor cantidad de alimento (en comparación con las otras dos zonas) en lugar de asignar una parte de dicha energía en procesos reproductivos.

Otra posible explicación para las diferencias en el tamaño de los ovocitos de *A. maura* entre las zonas de estudio se refiere a la densidad poblacional, ya que se ha reportado que este parámetro en las poblaciones de bivalvos es un factor que afecta la disponibilidad de esperma y por lo tanto influencia el tamaño de los ovocitos, e.g. poblaciones con densidades bajas presentan concentraciones limitadas de esperma y ovocitos con tallas mayores, en comparación con poblaciones con densidades altas en los que la concentraciones de esperma son mayores y los ovocitos más pequeños. Esta situación pudiera explicarse por la mayor probabilidad de encuentro, y por lo tanto de fecundación, que tienen los ovocitos más grandes con los pocos espermatozoides disponibles en el medio (Luttikhuisen *et al.*, 2010). Sin embargo, esta hipótesis no puede ser comprobada a partir de la información recolectada en este estudio, por lo que es necesario realizar muestreos que incluyan análisis de densidad poblacional para cada una de las zonas.

## 7. DISCUSIÓN INTEGRATIVA

La presente investigación constituye el primer análisis integral de las tácticas reproductivas que utiliza *Atrina maura* en el noroeste del Pacífico mexicano y, aunque está integrado por capítulos independientes, permite obtener una perspectiva general del comportamiento reproductivo de esta importante especie comercial, al mismo tiempo que aporta detalles específicos sobre algunos aspectos que no habían sido evaluados previamente.

Como punto de partida, fue necesario conocer cómo es la organización interna de la gónada de *A. maura* y considerar qué métodos son los más convenientes para evaluar dicha disposición. En la literatura se describen varios medios para evaluar el desarrollo gametogénico en bivalvos y entre los más comunes se mencionan: 1) observación macroscópica del tamaño relativo, forma y color de las gónadas (Mason, 1958; Camacho-Mondragón *et al.*, 2008); 2) índice gonádico, el peso relativo de la gónada con respecto al peso del cuerpo (húmedo o seco) (Hughes-Games, 1977; Grant & Tyler, 1983); 3) diámetro promedio de ovocitos (Kennedy & Battle, 1964; Muranaka & Lannan, 1984); y 4) fases de desarrollo basadas en características citológicas (histología) (Enríquez-Díaz *et al.*, 2003; Angel-Pérez *et al.*, 2007).

Sin embargo, todos los métodos utilizados para evaluar la gametogénesis en bivalvos tienen ventajas y desventajas. Barber & Blake (1991) mencionan que el enfoque más completo consistiría en aplicar al menos dos métodos, ya sea cuantitativos o cualitativos; también subrayan que la histología siempre es requerida para verificar eventos reproductivos que conciernen al desarrollo gametogénico. No obstante, en la actualidad no es común encontrar una escala reproductiva o clasificación que se base en el uso de ambos tipos de métodos, ya que la mayoría de las escalas que describen la gametogénesis sólo están basadas en características cualitativas. Aunado a esto, varias investigaciones han correlacionado las fases de desarrollo con ciertas características citológicas reconocidas generalmente en todos los bivalvos. Desafortunadamente, la determinación de estas fases frecuentemente es subjetiva y existe poco acuerdo sobre los criterios para establecer el número de fases que deben ser incluidas en la escala de clasificación (Barber & Blake, 1991).

En el Capítulo 1 se describe el desarrollo gametogénico de *A. maura* a partir de criterios cuantitativos y cualitativos utilizando análisis histológicos y de

ultraestructura. La histología permitió elaborar la propuesta de una nueva escala reproductiva basada en varios métodos y que puede ser aplicada para cualquier población de esta especie (Camacho-Mondragón *et al.*, 2012). Esta aportación es importante ya que queda cubierta la necesidad de una escala de fases de desarrollo gametogénico para una especie que presenta particularidades en su ciclo gonádico. Por ejemplo, la reabsorción masiva de gametos femeninos y masculinos en condiciones ambientales desfavorables, la eyaculación permanente en los machos al mismo tiempo que se presentan otras fases de desarrollo y la variación significativa del número de células de Sertoli en las gónadas masculinas al avanzar la madurez.

Por su parte, los análisis de ultraestructura de *A. maura* permitieron conocer detalladamente la morfología de los gametos en las distintas fases de desarrollo. En el caso de la espermatogénesis, al utilizar por primera vez la microscopía electrónica de transmisión para la especie, se identificó el arreglo mitocondrial y la forma del acrosoma lo cual permite sentar las bases para futuras comparaciones con otros miembros de la familia Pinnidae. Igualmente, estas descripciones aportan información acerca del tipo de vida que presentan los organismos, ya que se ha logrado determinar que la morfología de los espermatozoides se encuentra relacionada con el modo en que realizan la fertilización ya sea de manera interna o externa en cada especie (Franzén, 1955). Adicionalmente, se corroboró la disposición de las células de Sertoli en la gónada masculina, las cuales no fueron descritas a detalle anteriormente debido a las limitaciones intrínsecas de la microscopía de luz, reforzando con esto la hipótesis del papel activo de estas células en la nutrición durante los primeros estadios del desarrollo espermático, como se ha observado en otras especies de bivalvos (Pipe, 1987b; Mathieu & Lubet, 1993; Eckelbarger & Young, 1999). En lo que respecta a la ovogénesis, se obtuvo la descripción de diversos organelos celulares como mitocondrias, retículo endoplasmático y aparato de Golgi, así como la caracterización de su grado de participación en las diferentes fases de desarrollo gamético y en procesos como la vitelogénesis y la reabsorción ovocitaria. Esta última, resulta de principal importancia ya que condiciona la estacionalidad del desove y es clave para describir el ciclo reproductivo de *A. maura*, tal como se analiza en el Capítulo 3.

Con todo lo anterior, es evidente que los estudios de la organización de la gónada no sólo contribuyen al conocimiento básico de la biología reproductiva de *A. maura* en condiciones naturales, sino que también pueden ayudar en la manipulación de reproductores en cultivo, ya que el entendimiento de la ultraestructura de los tejidos que funcionan como reservorios de energía y de la gametogénesis es importante para visualizar la evolución de diversas categorías celulares y en su caso confirmar la presencia de ciertas células que pueden estar involucradas en la formación de los gametos.

Paralelamente al estudio citológico de las gónadas de machos y hembras de *A. maura*, durante la presente investigación, se realizó el hallazgo de un número de organismos hermafroditas. Afortunadamente, estos especímenes permitieron elaborar una secuencia de transición sexual que evidencia la condición de protandría para la especie y elaborar una propuesta para reevaluar su estatus sexual (Capítulo 2). Esta propuesta está basada además en las proporciones sexuales para las diferentes clases de talla en las tres zonas de estudio y la talla de madurez sexual menor para los machos. Así mismo, considera que esta situación no es incidental sino una condición inherente a la sexualidad de esta especie, que no había sido evidenciada previamente debido a la rapidez del proceso de transición sexual y por los tamaños de muestra pequeños analizados anteriormente. Sin embargo, es probable que muestras recolectadas más frecuentemente (en intervalos menores a un mes) permitieran observar el proceso de transición sexual en un número mayor de casos. Similarmente, estudios que examinen específicamente la sexualidad de estos bivalvos, ya sea con organismos silvestres o monitoreando especímenes individuales bajo condiciones de laboratorio, puedan clarificar la tendencia evolutiva del hermafroditismo en estas poblaciones.

Ahora bien, después de establecer una escala integral (cuantitativa y cualitativa) de las fases de desarrollo gonádico de *A. maura*, fue posible calcular las frecuencias de aparición de estas fases a través del tiempo y a partir de esto caracterizar el ciclo reproductivo de cada una de las poblaciones analizadas (Capítulo 3).

Se sabe que los factores exógenos (ambiente) y el genotipo determinan el ciclo reproductivo de los organismos, lo que da como resultado un patrón particular de reproducción, en el que se regulan la duración, intensidad y

frecuencia del mismo. Así, la temperatura y la disponibilidad de alimento han sido señalados como los principales factores ambientales que regulan el ciclo reproductivo de los bivalvos marinos (Seed, 1976; Bayne & Newell, 1983; MacDonald & Thompson, 1985; Malachowski, 1988; Arsenault & Himmelman, 1998). Teniendo en cuenta lo anterior, al analizar las tres poblaciones de *A. maura* se observó que existen características ambientales contrastantes (temperatura y disponibilidad de alimento), lo cual originó que aunque se presentaron similitudes en el patrón reproductivo, e.g. desoves continuos y ausencia de indiferenciación, también se presentaron diferencias, e.g. reabsorciones sólo en Bahía Magdalena y Ensenada de La Paz. Diferencias como estas se han observado en muchos bivalvos marinos, concluyendo que el ciclo reproductivo de una especie que habita en distintas zonas climáticas puede variar en relación con el medio ambiente local, puesto que la reproducción de una especie es una respuesta al medio ambiente genéticamente controlada (Sastri, 1970; Baqueiro & Aldana, 2000).

Igualmente, las diferencias en los ciclos reproductivos pueden ser adaptaciones fisiológicas, conocidas como razas fisiológicas que pueden estar afectadas debido a la variación geográfica (Loosanoff & Nomejko, 1951). Baqueiro & Aldana (2000) analizaron los patrones reproductivos de varias especies de bivalvos en México y encontraron diferencias en el ciclo de una misma especie, pero en diferentes localidades, asociadas a la inestabilidad ambiental o a la variación de parámetros críticos. En este caso la tendencia fue hacia la optimización de la reproducción por medio de alguna de las siguientes alternativas: 1) Una gametogénesis muy rápida con acumulación de gametos maduros, 2) Gametogénesis lenta pero constante con una limitada o sin ninguna acumulación de gametos, 3) Un desove constante asincrónico y 4) Un desove sincrónico de duración por cortos o por largos periodos. En el caso de la presente investigación, se encontraron diferencias entre las poblaciones analizadas, pero también con la población de Oaxaca. En esta última localidad, el intervalo anual de variación de temperatura es de 2-3 °C, en comparación con los 8-10 °C en las poblaciones de Baja California Sur. Estas diferencias en la temperatura muy probablemente originaron dos adaptaciones fisiológicas en cada una de las regiones, por su parte en Baja California Sur se observa un periodo de reabsorción masiva de la gónada durante los meses en los que la temperatura

rebasa los 25°C y no se observaron organismos indiferenciados; en contraste en Oaxaca se presenta un periodo de indiferenciación en algunos miembros de la población durante el ciclo reproductivo y no se presentan reabsorciones masivas de la gónada aún cuando la temperatura oscila entre 28 y 31 °C.

Al analizar en conjunto la información obtenida en este trabajo, se pone de manifiesto que el conocimiento de la biología reproductiva de una especie de importancia comercial, como *A. maura*, tiene implicaciones potenciales en la conservación y manejo de dicho recurso. Esto, ya que la reproducción de los organismos juega un papel central en la respuesta de una población a la explotación y cambios en el ambiente; por lo tanto, las medidas de parámetros reproductivos pueden proveer de los indicadores básicos necesarios para monitorear de manera efectiva la sustentabilidad de una pesquería.

Por ejemplo, un requerimiento clave para la evaluación de poblaciones explotadas, y la consecuente toma de decisiones respecto a su manejo por parte de los biólogos pesqueros, es el entendimiento de la predicción de las épocas de desove y si estas exhiben una regularidad relacionada en cierta medida con los eventos cíclicos del medio ambiente. En el caso de este manuscrito, se ha reiterado el particular interés del efecto de la temperatura sobre la reproducción de *A. maura*, el cual se manifiesta principalmente durante el verano cuando las temperaturas registradas sobrepasan los 25°C y se ha observan reabsorciones masivas de gametos en las gónadas de los organismos maduros, es decir, no se lleva a cabo el desove debido a que las condiciones no son las óptimas para que esto suceda. De tal forma, que esto ha permitido hacer una recomendación a los encargados de tomar las decisiones en cuanto al manejo de esta importante pesquería estatal. La recomendación va dirigida hacia la temporada de veda; tomando en cuenta que durante el verano no habrá liberación de gametos debido a las altas temperaturas en comparación con los meses fríos de invierno y primavera, proponemos que sea precisamente en estos meses cuando no se capture a los organismos y la temporada de máxima de pesca se lleve a cabo en verano. Igualmente, las tallas mínimas de captura pueden ser establecidas a partir de las tallas de primera madurez obtenidas en este estudio, funcionando como un importante regulador del esfuerzo pesquero para las zonas analizadas.

Finalmente, los resultados de los estudios de biología reproductiva que pueden ser utilizados para desarrollar metodologías para la evaluación de

recursos de importancia comercial y elaboración de planes de manejo, también pueden ser útiles para incrementar la conciencia pública, promover la conservación en situaciones en las que se registra una disminución en las capturas y desarrollar e implementar estrategias de restauración, tales como producción de semilla o establecimiento de áreas de no pesca. Un ejemplo en tiempo real de la veracidad de estos argumentos es el proyecto “Mangle cenizo”, dirigido por la organización no gubernamental “Noroeste Sustentable” (NOS). Esta iniciativa brinda a las familias de pescadores de la Ensenada de La Paz una visión alternativa del manejo de los recursos naturales de los que depende su economía. El proyecto está basado en una red de colaboración con instituciones académicas y de investigación que al involucrar directamente a los usuarios de los recursos de la Ensenada promueve que el conocimiento de la biología reproductiva de una especie, en este caso del hacha *A. maura*, forme parte de su entendimiento del medio y al mismo tiempo ocasione que estas personas adquieran un sentido de conservación y restauración de esa localidad. Hasta el momento, el proyecto “Mangle cenizo” se ha incorporado en el monitoreo del estado reproductivo de la población silvestre, en experimentos de obtención de semilla en laboratorio y del medio natural y próximamente en el seguimiento y mantenimiento de parcelas submarinas para la siembra de juveniles.

## 8. CONCLUSIONES

- La caracterización histológica de la maduración gonádica de *Atrina maura* permitió elaborar una nueva escala específica con base en caracteres cualitativos y cuantitativos. En las hembras, se observaron cuatro fases de maduración: desarrollo, madurez, desove y posdesove; mientras que en los machos, se presentó una liberación continua de gametos simultánea a otras fases de maduración (desarrollo y madurez), por lo cual se designaron tres fases: desove tipo 1, desove tipo 2 y desove tipo 3. La condición de reabsorción gonádica se presentó tanto en hembras como en machos únicamente cuando la temperatura del agua sobrepasó los 25 °C.
- Las características ultraestructurales del proceso espermatogénico de *A. maura* son comunes a la mayoría de los bivalvos marinos, sin embargo, en esta especie, la vesícula proacrosomal y el flagelo se presentan sólo hasta las primeras fases de la espermiogénesis, contrastando con la formación precoz de ambas estructuras en espermatogonias y espermatocitos en otros bivalvos. En *A. maura*, el material en la vesícula acrosómica de los espermatozoides maduros muestra un patrón particular de las densidades electrónicas, el cual parece ser una característica taxonómica exclusiva de la familia Pinnidae. Sin embargo, *A. maura* presentó solo cuatro mitocondrias en la pieza intermedia, contrastando con las cinco en el resto de las especies en esta familia.
- El ovario contiene ovocitos en varias etapas de desarrollo: protogonias, ovogonias, ovocitos previtelogénicos, ovocitos vitelogénicos y ovocitos postvitelogénicos. Las células auxiliares que se adhieren en las primeras fases de desarrollo de los ovocitos parecen jugar un papel integral en la vitelogénesis. La degeneración de ovocitos (atresia) parece ser más común en ovocitos postvitelogénicos cuando la temperatura sobrepasa los 25 °C.
- *A. maura* es una especie protándrica que presenta una reversión sexual a partir de los 18 cm de altura de concha. El proceso de cambio de sexo en *A. maura* inicia a partir de machos maduros y puede ser dividido en tres etapas: inicial, intermedia y avanzada. Dichas etapas pueden ser reconocidas por

diferencias significativas en las áreas ocupadas por gametos femeninos (se incrementan al avanzar el cambio) y gametos masculinos (disminuyen al avanzar el desarrollo), y en la frecuencia de los tipos de ovocitos.

- *A. maura* presenta ciclos reproductivos y gonádicos continuos, i.e. sin periodos de indiferenciación gonádica, en Laguna Ojo de Liebre, Bahía Magdalena y Ensenada de La Paz. Aunque los desoves ocurrieron durante prácticamente todo el año en las tres poblaciones analizadas, se encontró una variación estacional en cada una de las localidades, con las mayores frecuencias principalmente durante la temporada fría. Asimismo, en Bahía Magdalena y en la Ensenada de La Paz se observó un cese del desove durante los meses de la temporada cálida, cuando las temperaturas del agua fueron mayores a 25 °C, mientras que en la Laguna Ojo de Liebre no hubo esta interrupción debido a que la temperatura del agua no sobrepasa los 25 °C . Por lo tanto, se asume que esta especie es capaz de reproducirse todo el año si las condiciones ambientales fueran favorables.
- La variabilidad estacional en la temperatura juega el papel principal en la determinación de la duración e intensidad de las fases del ciclo reproductivo de *A. maura*; mientras que el desove depende de no rebasar un intervalo de temperatura limitado y, en menor medida, de la variación estacional de la concentración de alimento disponible.

## **9. RECOMENDACIONES PARA FUTURAS INVESTIGACIONES**

A pesar de la importante contribución al conocimiento sobre la biología reproductiva del hacha china *Atrina maura* que se generó en la presente tesis, es necesario reconocer que se requiere diseñar experimentos que analicen a mayor detalle algunos aspectos de la reproducción de esta especie. Se sugiere la realización de las siguientes investigaciones:

- Realizar análisis bioquímicos (proteínas, carbohidratos y lípidos) del músculo abductor, glándula digestiva y manto para evidenciar la acumulación y

transferencia de reservas energéticas hacia la gónada durante el ciclo reproductivo.

- Caracterizar las variaciones en la composición bioquímica de las células auxiliares del tejido gonadal a lo largo de un ciclo gonádico para corroborar su papel nutritivo en la formación de los gametos.
- Para obtener una mayor evidencia de individuos hermafroditas se debe ampliar el esfuerzo de muestreo en especímenes mayores a 18 cm de altura de concha y cuando se detecte esta condición se recomienda realizar análisis ultraestructurales de la gónada para caracterizar detalladamente el proceso de cambio de sexo.
- Analizar nuevas poblaciones de *A. maura* que presenten características ambientales contrastantes, con respecto a las reportadas previamente, para corroborar las variaciones en las tácticas reproductivas a lo largo de su intervalo de distribución geográfica.
- Llevar a cabo estimaciones de la densidad de individuos en las zonas donde se recolectan los organismos con la finalidad de comprobar hipótesis acerca de la relación del tamaño de los ovocitos y este parámetro poblacional.
- Debido a que la técnica de cultivo de *A. maura* aún no se encuentra estandarizada, es necesario analizar variables que pudieran afectar el comportamiento reproductivo de esta especie en condiciones controladas. Así, se sugiere evaluar el desempeño reproductivo de *A. maura* utilizando reproductores silvestres que provengan de diferentes profundidades para conocer los efectos de esta variable sobre los desoves y el desarrollo larvario de esta especie.

## 10. LITERATURA CITADA

- Abbe, G.R. & B.W. Albright. 2003. An improvement to the determination of meat condition index for *Crassostrea virginica*. *J. Shellfish Res.*, 22:747-752.
- Aguila-Ramírez, R.N., M. Casas-Valdez, M.B. Cruz-Ayala & R.A. Núñez-López. Variación estacional de la ficoflora en la Laguna Ojo de Liebre, Baja California Sur, México. *Hidrobiológica*, 10(2):147-160.
- Aguilar, F. 1964. *Contribución al estudio histológico de las gónadas de Atrina maura Sowerby 1835 (Mollusca, Fam. Pinnidae)*. Tesis de licenciatura. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. IPN., México, 27 p.
- Aguillón-Negreros, A. 2011. *Variación espacio-temporal del reclutamiento en Mollusca y Echinodermata en la Bahía de La Paz, Baja California Sur, México*. Tesis de maestría. CICIMAR-IPN, México, 75 p.
- Aguirre-Bahena. 2002. *Dinámica de los componentes de la materia particulada suspendida y otras variables hidrológicas en la Ensenada-Bahía de La Paz, Baja California Sur, México*. Tesis de maestría. CICIMAR-IPN, México, 146 p.
- Ahumada-Sempoal, M.A. 1998. Una nota sobre la familia Pinnidae (callo de hacha) de Oaxaca, México. *Ciencia y Mar. Revista de la Universidad del Mar*. 2: 42-44.
- Ahumada-Sempoal, M.A., S.J. Serrano-Guzmán & N. Ruiz-García. 2002. Abundancia, estructura poblacional y crecimiento de *Atrina maura* (Bivalvia:Pinnidae) en una laguna costera tropical del Pacífico mexicano. *Rev. Biol. Trop.*, 50:1091-1100.
- Albanese, M.P. & A. Bolognari. 1964. Mitochondri, zone del Golgi et globuli vitellini negli ovociti in accrescimento di *Planorbis comeus* L. (Moll. Gast. Polm.). *Experientia*, 20: 19-30.
- Alfaro, A.C., A.G. Jeffs & S.H. Hooker. 2001. Reproductive behavior of the greenlipped mussel, *Perna canaliculus*, in northern New Zealand. *Bull. Mar. Sci.*, 69:1095-1108.
- Allsop, D.J. 2003. The evolutionary ecology of sex change. Tesis de Doctorado. University of Edinburgh. 120 p.
- Allsop, D.J. & S.A. West. 2004. Sex-ratio evolution in sex changing animals. *Evolution*, 58: 1019-1027.

- Álvarez-Borrego, S., L. Galindo-Bect, & A. Chee-Barragán. 1975. Características hidroquímicas de Bahía Magdalena, B. C. S. *Cienc. Mar.*, 2(2): 94-109.
- Angel-Dapa, M.A., C. Rodríguez-Jaramillo, C.J. Cáceres-Martínez & P.E. Saucedo. 2010. Changes in lipid content of oocytes of the penshell *Atrina maura* as a criterion of gamete development and quality: a study of histochemistry and digital image analysis. *J. Shellfish Res.*, 29:407-413.
- Angel-Pérez, C., S.J. Serrano-Guzmán & M.A. Ahumada-Sempoal. 2007. Ciclo reproductivo del molusco *Atrina maura* (Pterioidea: Pinnidae) en un sistema lagunar costero, al sur del Pacífico tropical mexicano. *Rev. Biol. Trop.*, 55:839-852.
- Anónimo. 2010. Diario Oficial de la Federación: Carta Nacional Pesquera ([http://conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/cona\\_carta\\_nacional\\_pesquera](http://conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/cona_carta_nacional_pesquera) \_)
- Arellano-Martínez, M., I. Racotta, B.P. Ceballos-Vázquez & J. Elorduy-Garay. 2004. Biochemical composition, reproductive activity, and food availability of the lion's paw scallop *Nodipecten subnodosus* in the Laguna Ojo de Liebre, B.C.S., México. *J. Shellfish Res.*, 23:15-23.
- Arsenault, D.J. & J.H. Himmelman. 1998. Spawning of the Iceland Scallop (*Chlamys islandica* Müller, 1776) in the northern Gulf of St. Lawrence and its relationship to temperature and phytoplankton abundance. *Veliger*, 41:180-185.
- Asif, M. 1979. Hermaphroditism and sex reversal in the four common oviparous species of oysters from the coast of Karachi. *Hydrobiologia*, 66:49-55.
- Avendaño, M. & M. Le Pennec. 1998. Presencia de células auxiliares en la gametogénesis del ostión del norte, *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819), (Mollusca, Bivalvia, Pectinidae). *Estud. Oceanol.*, 17:13-16.
- Baba, K., M. Tada, T. Kawajiri & Y. Kuwahara. 1999. Effects of temperature and salinity on spawning of the brackish water bivalve *Corbicula japonica* in Lake Abashiri, Hokkaido, Japan. *Mar. Ecol. Progr. Ser.*, 180: 213-221.
- Baqueiro, E. 1984. Status of molluscan aquaculture on the Pacific coast of Mexico. *Aquaculture*, 39:83-93.
- Baqueiro, E. & D. A. Aldana. 2000. A review of reproductive patterns of bivalve mollusks from Mexico. *Bull. Mar. Sci.*, 66:13-27.

- Baqueiro, E., A. Avilés-Quevedo, J. Massó-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*. Instituto Nacional de la Pesca. México, 73p.
- Barber, J.B. & N.J. Blake. 1991. Reproductive physiology, 377-409. *En: Shumway, S.E. (Ed.) Scallops: Biology, Ecology and Aquaculture*. Elsevier, Amsterdam, 1095 p.
- Barrios-Ruíz, D.P. 2005. *Estudio del esfuerzo reproductivo de Atrina maura (Bivalvia: Pinnidae) en la Laguna de San Ignacio B.C.S.* Tesis de Maestría, Universidad Autónoma de Baja California Sur, Baja California Sur, México. 69 p.
- Bayne, B.L. 1972. Some effects of stress in the adult on the larval development of *Mytilus edulis*. *Nature*, 237:459.
- Bayne, B.L. 1975. Reproduction in bivalve molluscs under environmental stress, 259-277. *En: F.J. Vernberg (Ed.) Physiological ecology of estuarine organisms*. University of South Carolina Press, Columbia.
- Bayne, B.L. 1976. Aspects of reproduction in bivalve molluscs, 432-448. *En: Wiley, M. (Ed.) Estuarine Processes: USA, Stresses and Adaptation to the Estuary*. Academic Press, New York, 928 p.
- Bayne, B.L. & R.C. Newell. 1983. Physiological energetics of marine molluscs. *En: Wilbur, K.M. (Ed.), The Mollusca, Vol 1*. Academic Press, New York.
- Bayne, B.L., D.L. Holland, M.N. Moore, D.M. Lowe & J. Windows. 1978. Further studies on the effect of stress in the adult on the eggs of *Mytilus edulis*. *J. Mar. Biol. Assoc. UK.*, 58:825-841.
- Beer, A.C. & P.C. Southgate. 2006. Spat collection, growth and meat yield of *Pinna bicolor* (Gmelin) in suspended culture in northern Australia. *Aquaculture*, 258: 424-429.
- Beninger, P.G. & I.V. Le Pennec. 1991. Functional anatomy of scallops, 133-223. *En: Shumway, S.E. (Ed.) Scallops: Biology, Ecology and Aquaculture*. Elsevier, Amsterdam, 1095 p.
- Beninger, P.G. & M. Le Pennec. 1997. Reproductive characteristics of a primitive bivalve from a deep-sea reducing environment: giant gametes and their significance in *Acharax alinae* (Cryptodonta: Solemyidae). *Mar. Ecol. Progr. Ser.*, 157:195-206.

- Benmeradi, N. 1992. La vitellogenese chez *Patella caerulea* Lmk (Mollusca, Gasteropoda). Approche ultrastructurale. Aspects recents de la biologie des Mollusques. *Actes Colloques Ifremer*, 13: 39-46.
- Bentley, M.G. & A.A. Pacey. 1992. Physiological and environmental control of reproduction in polychaetes. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.*, 30:433–481.
- Bernard, R.T.F. & A.N. Hodgson. 1985. The fine structure of the sperm and spermatid differentiation in the brown mussel *Perna perna*. *South Africa J. Zool.*, 20:5-9.
- Bizarro, J. 2008. A review of the physical and biological characteristics of the Bahia Magdalena lagoon complex (Baja California Sur, Mexico). *Bull. South. Calif. Acad. of Sci.* 107(1):1-24.
- Blake, N.J. 1972. *Environmental regulation of neurosecretion and reproductive activity in the bay scallop, Aequipecten irradians (Lamarck)*. Tesis de Doctorado. University of Rhode Island, Kingston, EUA.
- Blake, N.J. & A.N. Sastry. 1979. Neurosecretory regulation of oogenesis in the bay scallop, *Aequipecten irradians irradians* (Lamarck), 181–190. En: Naylor E. & R.G. Hartnoll (Eds.) *Cyclic phenomena in marine plants and animals*. Pergamon Press, New York.
- Bottke, W., I. Sinha, & I. Keil. 1982. Coated vesicle-mediated transport and deposition of vitellogenic ferritin in the rapid growth phase of snail oocytes. *J Cell Scien.*, 53:173-191.
- Bricelj, V.M., J. Epp & R.E. Malouf. 1987. Intraspecific variation in reproductive and somatic growth cycles of bay scallops *Argopecten irradians*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 36: 123-137.
- Brousseau, D.J. 1987. A comparative study of the reproductive cycle of the softshell clam, *Mya arenaria* in Long Island Sound. *J. Shellfish Res.*, 6:7-15.
- Brown, R.A. 1984. Geographical variations in the reproduction of the horse mussel *Modiolus modiolus* (Mollusca: Bivalvia). *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, 64:751-770.
- Brusca, R.C. & G.J. Brusca. 2002. *Invertebrates*. 2da Edición. Sinauer Associates, Inc., E.U.A. 936p.
- Butler, A.J. 1987. Ecology of *Pinna bicolor* Gmelin (Mollusca: Bivalvia) in Gulf St. Vincent, south Australia: density, reproductive cycle, recruitment, growth and mortality at three sites. *Aust. J. Mar. Freshw. Res.*, 38:743-769.

- Butler, A., N. Vicente & B. De Gaulejac. 1993. Ecology of the Pteroid bivalves *Pinna bicolor* Gmelin and *Pinna nobilis* L. *Life*, 3:37-45.
- Cabanellas-Reboredo, M., S. Deudero, J. Alós, J.M. Valencia, D. March, I.E. Hendriks & E. Álvarez. 2009. Recruitment of *Pinna nobilis* (Mollusca: Bivalvia) on artificial structures. *Mar. Biod. Rec.*, e126.
- Camacho-Mondragón, M.A., M. Arellano-Martínez & B.P. Ceballos-Vázquez. 2008. Variation of the condition, muscle yield and mantle indices in *Atrina maura* (Sowerby, 1835) (Bivalvia: Pinnidae) in the Ensenada de La Paz, B.C.S., Mexico. *Oceanides*, 23:11-18.
- Camacho-Mondragón, M.A., M. Arellano-Martínez & B.P. Ceballos-Vázquez. 2012. Particular features of gonadal maturation and size at first maturity in *Atrina maura* (Bivalvia: Pinnidae). *Sci. Mar.*, 76:539-548.
- Camacho-Mondragón, M.A., B.P. Ceballos-Vázquez, E. Uría-Galicia, E.O. López-Villegas & M. Arellano-Martínez. 2014. Ultrastructure of the spermatogenic process in the penshell *Atrina maura* (Bivalvia: Pinnidae). *Malacologia*, 57(2).
- Campbell N.A, L.G. Mitchell & J.B. Reece. 2000. *Biology, concepts and concctions*. Addison Wesley Longman, 3era edición. San Francisco, CA, EUA. 809 pp.
- Cardoso, J.F.M.F., D. Langlet, J.F. Loff, A.R. Martins, J.I.J. Witte, P.T. Santos & H.W. van der Veer. 2007. Spatial variability in growth and reproduction of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) along the west European coast. *J. Sea Res.*, 57:303-315.
- Cardoza-Velasco, F. & A. Maeda-Martínez. 1997. An approach to aquacultural production of the penshell *Atrina maura* Sowerby, 1835 (Bivalvia:Pinnidae) in northwest Mexico. *J. Shellfish Res.*, 16:311.
- Ceballos-Vázquez, B.P., M. Arellano-Martínez, M. Villalejo-Fuerte & F. García-Domínguez. 2000. Reproductive cycle of the rugose pen shell, *Pinna rugosa* Sowerby, 1835 (Mollusca: Bivalvia) from Bahía Concepción, Gulf of California and its relation to temperature and photoperiod. *J. Shellfish Res.*, 19:95-99.
- Cendejas, J.M., M.G. Carballo & L.M. Juárez. 1985. Experimental spat collection and early growth of the penshell, *Pinna rugosa* (Pelecypoda: Pinnidae), from the Gulf of California. *Aquaculture*, 48: 331-336.

- Cervantes-Duarte, R., S. Aguiñiga-García & R. Guerrero. 1991. Variación estacional de temperatura, salinidad y nutrientes en la Ensenada de La Paz, B.C.S. *Rev. Invest. Cient. Univ. Auton. Baja Calif. Sur*, 2(2):53-64.
- Charnov, E.L. 1979. The genetical evolution of patterns of sexuality: Darwinian fitness. *Am. Nat.*, 113:465-480.
- Chávez-Villalba, J., A. Hernández-Ibarra, M.R. López-Tapia & J.M. Mazón-Suástegui. 2008. Prospective culture of the Cortez oyster *Crassostrea corteziensis* from northwestern Mexico: growth, gametogenic activity, and condition index. *J. Shellfish Res.*, 27:711-720.
- Chávez-Villalba, J., C. Soyez, A. Huvet, Y. Gueguen, C. Lo & G. Le Moullac. 2011. Determination of gender in the pearl oyster *Pinctada margaritifera*. *J. Shellfish Res.*, 30:231-240.
- Chen, Y., D.A. Jackson & H.H. Harvey. 1992. A comparison of von Bertalanffy and polynomial functions in modelling fish growth data. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 49:1228-1235.
- Chipperfield, P.N.J. 1953. Observations on the breeding and settlement of *Mytilus edulis* (L.) in British waters. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, 32:449-476.
- Chung, E.Y., Y.J. Park, J.Y. Lee & D.K. Ryu. 2005. Germ cell differentiation and sexual maturation of the hanging cultured female scallop *Patinopecten yessoensis* on the east coast of Korea. *J. Shellfish Res.*, 24:913-921.
- Chung, E.Y., S.H. Seong & D.K. Ryu. 2006. Reproductive biology of the pen shell, *Atrina (Servatrina) pectinata* on the Boryeong coastal waters of Korea. *Kor. J. Mal.*, 22:143-150.
- Chung, E.Y., C.H. Koh & G.M. Park. 2007a. Oogenesis, oocyte degeneration and sexual maturation in female *Cyclina sinensis* (Gmelin, 1971) (Bivalvia: Veneridae) in Korea. *Integrative Biosciences*, 11:191-198.
- Chung, E.Y., E. Kim & G.M. Park. 2007b. Spermatogenesis and sexual maturation in male *Mactra chinensis* (Bivalvia: Mactridae) of Korea. *Integrative Biosciences*, 11:227-234.
- Chung, E.Y., C.H. Ko, H.W. Kang, K.H. Choi & J.C. Jun. 2008. Ultrastructure of oocytes during oogenesis and oocyte degeneration associated with follicle cells in female *Sinonovacula constricta* (Bivalvia: Pharidae) in western Korea. *Animal Cells and Systems*, 12: 313-319.

- Coe, W.R. 1943. Sexual differentiation in mollusks. I. Pelecypods. *Q. Rev. Biol.*, 18:154-164.
- Coe, W.R. 1945. Development of reproductive system and variations in sexuality in *Pecten* and other pelecypod mollusks. *Trans. Conn. Acad. Arts Sci.*, 36:673-700.
- Com, E., B. Evrard, P. Roepstorff, F. Aubry & C. Pineau. 2003. New insights into the rat spermatogonial proteome. *Mol. Cell Proteomics*, 2:248–261.
- Croll, R.P. & C. Wang. 2007. Possible roles of sex steroids in the control of reproduction in bivalve molluscs. *Aquaculture*, 272:76-86.
- Crosby, M.P. & L.D. Gale. 1990. A review and evaluation of bivalve condition index methodologies with a suggested standard method. *J. Shellfish Res.*, 9:233-237.
- Darrigran, G.A., M.C. Damborenea & P.E. Penchaszadeh. 1998. A case of hermaphroditism in the freshwater invading bivalve *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (Mytilidae) from Río de la Plata, Argentina. *Iberus*, 16:99-104.
- De Gaulejac, B., M. Henry & N. Vicente. 1995. An ultrastructural study of gametogenesis of the marine bivalve *Pinna nobilis* (Linnaeus, 1758). I. Oogenesis. *J. Moll. Stud.*, 61:375-392.
- Delgado, M. & A. Pérez-Camacho. 2007. Comparative study of gonadal development of *Ruditapes philippinarum* (Adams and Reeve) and *Ruditapes decussatus* (L.) (Mollusca: Bivalvia): Influence of temperature. *Sci. Mar.*, 71:471-484.
- Derbali, A., O. Jarboui, M. Ghorbel & K. Dhieb. 2009. Reproductive biology of the pearl oyster, *Pinctada radiata* (Mollusca: Pteriidae), in northern Kerkennah Island (Gulf of Gabes). *Cah. Biol. Mar.*, 50:215–222.
- Dohmen, M.R. 1983. Gametogenesis, 1-48. En: Verdonk, N.H., J.A.M. van den Biggelaar & A.S. Tompa (Eds.). *The Mollusca, 3: Development*. Academic Press, Londres.
- Dorange, G. & M. Le Pennec. 1989. Ultrastructural study of oogenesis and oocytic degeneration in *Pecten maximus* from the Bay of St. Brieuc. *Mar. Biol.*, 103:339-348.

- Eckelbarger, K.J. & C.V. Davis. 1996. Ultrastructure of gonad and gametogenesis in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. I. Ovary and oogenesis. *Mar. Biol.*, 127:79-87.
- Eckelbarger, K.J. & C.M. Young. 1999. Ultrastructure of gametogenesis in a chemosynthetic mytilid bivalve (*Bathymodiolus childressi*) from a bathyal, methane seep environment (northern Gulf of Mexico). *Mar. Biol.*, 135:635-646.
- Enríquez-Díaz, M., C. Cáceres-Martínez, J. Chávez-Villalba, G. Le Pennec & M. Le Pennec. 2003. Gametogenesis of *Atrina maura* (Bivalvia: Pinnidae) under artificial conditions. *Invert. Repro. Dev.*, 43:151-161.
- Erkan, M. 2009. Ultrastructure of ovary and oogenesis in *Chamelea gallina* (Linné, 1758) (Bivalvia, Veneridae). *Invert. Repro. Dev.*, 53:201-209.
- Erkan, M. & M. Sousa. 2002. Fine structural study of the spermatogenic cycle in *Pitar rudis* and *Chamelea gallina* (Mollusca, Bivalvia, Veneridae). *Tissue Cell*, 34:262–272.
- Fang, Y. & X. Qi. 1988. Studies on ultrastructure of oocyte in process of maturing in pen shell. *Acta Oceanologica Sinica*, 7:459-472.
- Franzen, A. 1955. Comparative morphological investigation into the spermatogenesis among Mollusca. *Zoo. Bidr. Upp.*, 30:339-456.
- Franzen, A. 1956. On spermiogenesis, morphology of the spermatozoon, and biology of fertilization among invertebrates. *Zool. Bidr. Uppsala*, 31:355-82.
- Franzen, A. 1983. Ultrastructural studies of spermatozoa in three bivalve species with notes on evolution of elongated sperm nucleus in primitive spermatozoa. *Gamete Res.*, 7:199-214.
- Freites, L., C. Cordova, D. Arrieché, L. Montero, N. García & J.H. Himmelman. 2010. Reproductive cycle of the penshell *Atrina seminuda* (Mollusca: Bivalvia) in northern waters of Venezuela. *Bull. Mar. Sci.*, 86:785-801.
- Fretter, V. & A. Graham. 1962. Reproduction, 127-164. En: Wilbur, K.M. & C.M. Yonge (Eds.). *Physiology of Mollusca*. Academic Press, New York.
- Friend, D.S. & D.W. Fawcett. 1974. Membrane differentiation in freeze-fractured mammalian sperm. *J. Cell Biol.*, 63:641-664.
- García-March, J.R. 2005. *Aportaciones al conocimiento de la biología de Pinna nobilis Linneo, 1758 (Mollusca: Bivalvia) en el litoral mediterráneo ibérico*. Tesis de doctorado. Universidad de Valencia, España, 335 p.

- Gaspar-Soria, R., M.S. Pascual & V.H. Fernández-Cartes. 2002. Reproductive cycle of the cholga paleta, *Atrina seminuda* Lamark, 1819 (Bivalvia: Pinnidae) from northern Patagonia, Argentina. *J. Shellfish Res.*, 21:479-488.
- George, S.B. 1994. Population differences in maternal size and offspring quality for *Leptasterias epichlora* (Brandt) (Echinodermata: Asteroidea). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 175:121–131.
- Ghiselin, M.T. 1969. The evolution of hermaphroditism among animals. *Q. Rev. Biol.*, 44:189-208.
- Giese, A.C. & J.S. Pearse. 1974. *Reproduction of Marine Invertebrates. Introduction: General principles*. Academic Press, New York. 1-49 pp.
- Gilmartin, M. & N. Revelante. 1978. The phytoplankton characteristics of the barrier Island lagoons of the Gulf of California. *Estuar. Coast. Mar. Sci.*, 7(1):29-47.
- Glavinic, A., K. Benkendorff & G.W. Rouse. 2012. Oogenesis and ultrastructure of the ovary in *Neotrigonia margaritacea* (Lamarck 1804) (Bivalvia, Mollusca). *Invert. Repro. Dev.*, 56:111-123.
- Glazier, D.S. 2000. Is fatter fitter? Body storage and reproduction in ten populations of the freshwater amphipod *Gammarus minus*. *Oecologia*, 122:335–345.
- González-Corona, M.E. 2003. *Estudio de la fisiología reproductiva y gametogénesis del callo de hacha Atrina maura, (Sowerby, 1835)*. Tesis de maestría. Universidad de Sonora, México, 74p.
- Grave, B.H. 1909. Anatomy and physiology of the Wing-shell *Atrina rigida*. *Bull. Bur. Fish.*, 29:409.
- Grant, A., & P.A. Tyler. 1983. The analysis of data in studies of invertebrate reproduction: I. Introduction and statistical analysis of gonad indices and maturity indices. *Int. J. Invertebr. Reprod.*, 6:259-269.
- Griffiths, R.J. 1977. Reproductive cycles in littoral populations of *Choromytilus meridionalis* (Kr) and *Aulacomya ater* (Molina) with quantitative assessment of gamete production in the former. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 30:53-71.
- Goldchain-Godin. 2010. *Estudio comparativo de crecimiento y supervivencia de las larvas flotadoras y nadadoras del hacha china Atrina maura (Sowerby,*

- 1835) *bajo condiciones de cultivo intensivo*. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de Baja California Sur, México, 52p.
- Guo, X., D. Hedgecock, W.K. Hershberger, K. Cooper, & S.K. Allen. 1998. Genetic determinants of protandric sex in *Crassostrea oyster*. *Evolution*, 52:394-402.
- Healy, J.M. 1989. Spermiogenesis and spermatozoa in the relict bivalve genus *Neotrigonia*: relevance to trigonioid relationships, particularly Unionoidea. *Mar. Biol.*, 103:75-85.
- Healy, J.M. 1995. Sperm ultrastructure in in the marine bivalve families Carditidae and Crassatellidae and its bearing on unification of the Crassatelloidea with the Carditoidea. *Zool. Sci.*, 24:21-28.
- Healy, J.M. 1996. Molluscan sperm ultrastructure: correlation with taxonomic units within the Gastropoda, Cephalopoda, and Bivalvia, 99-113. *En*: Taylor, J. (Ed.) *Origin and evolutionary radiation of the Mollusca*. Oxford University Press, Londres, UK., 392 p.
- Healy, J.M., J.L. Keys & L.Y.M. Daddow. 2000. Comparative sperm ultrastructure in pteriomorphian bivalves with special reference to phylogenetic and taxonomic implications. *En*: Harper, E.M., J.D. Taylor & J.A. Crame (Eds.) *The evolutionary biology of the Bivalvia*. Special Publications Geological Society, Londres, UK., 494 p.
- Heffernan, P., L. Walker & J. Carr. 1989. Gametogenic cycles of three bivalves in Wasaw Sound Georgia: I. *Mercenaria mercenaria* (Linnaeus, 1758). *J. Shellfish Res.*, 8:51-60.
- Heller, J. 1993. Hermaphroditism in molluscs. *Biol. J. Linn. Soc.* 48:19-42.
- Herlin-Houtteville, P. & P.E. Lubet. 1975. The sexuality of pelecypod molluscs, 179-187. *En*: Reinboth, R. (Ed.) *Intersexuality in the animal kingdom*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 449 p.
- Hill, R.S. & J.P. Bowen. 1976. Studies on the ovotestis of the slug *Agriolimax reticulatus* (Mailer). I. The oocyte. *Cell and Tissue Res.*, 173:465-482.
- Hirai S., T. Kishimoto, A.L. Kadam, H. Kanatani & S.S. Koide. 1988. Induction of spawning and oocyte maturation by 5-hydroxytryptamine in the surf clam. *J. Exp. Zool.*, 245(3):18-321.
- Hoagland, K.E. 1978. Protandry and the evolution of environmentally-mediated sex change: a study of the Mollusca. *Malacologia*, 17:365-391.

- Hoagland, K.E. 1984. Use of the terms protandry, protogyny and hermaphroditism in malacology. *Amer. Malacol. Bull.*, 3:85-88.
- Hodgson, A.N. & R.T.F. Bernard. 1986. Ultrastructure of the sperm and spermatogenesis of three species of Mytilidae (Mollusca, Bivalvia). *Gamete Res.*, 15:123-135.
- Hodgson, A.N., R.T.F. Bernard & G. Van Der Horst. 1990. Comparative spermatology of three species of *Donax* (Bivalvia) from South Africa. *J. Mollus. Stud.*, 56:257-265.
- Hughes-Games, W.L., 1977. Growing the Japanese oyster (*Crassostrea gigas*) in subtropical sea water fish ponds: I. Growth rate, survival and quality index. *Aquaculture*, 11:217-229.
- Humason, G.L. 1979. *Animal tissue techniques*,. 4ta ed. W. H. Freeman and Company, San Francisco, 111-129 p.
- Hylander, B.L. & R.G. Summers. 1977. An ultrastructural analysis of the gametes and early fertilization in two bivalves molluscs, *Chama macerophylla* and *Spisula solidissima* with special reference to gamete binding. *Cell Tissue Res.*, 182:469-489.
- Idris, M.H., A. Arshad, J.S. Bujang, S.K. Daud & M. Abdul Ghaffar, 2008. New distribution record of two pen shells (Bivalvia: Pinnidae) from the Seagrass Beds of Sungai Pulai, Johore, Malaysia. *J. Boil. Sci.*, 8: 882-888.
- Iguchi, K., & M. Yamaguchi. 1994. Adaptive significance of inter- and intrapopulational egg size variation in Ayu *Plecoglossus altivelis* (Osmeridae). *Copeia*, 1994:184–190.
- Illanes-Bucher, J. 1979. Recherches cytologiques et expérimentales sur la neurosécrétion de la moule, *Mytilus edulis* L. *Tesis de Doctorado*. 134 pp.
- Illanes, J. & P. Lubet. 1980. Etude de l'activité neurosécrétoire au cours du cycle sexuel annuel de la moule *Mytilus edulis* L. *Bull. Soc. Zool., France*, 105(1):141–145.
- Ito, K. 1997. Egg-size and -number variations related to maternal size and age, and the relationship between egg size and larval characteristics in an annual marine gastropod, *Haloa japonica* (Opisthobranchia; Cephalaspidea). *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 152:187–195.
- Ituarte, C. 2009. Unusual modes of oogenesis and brooding in bivalves: the case of *Gaimardia trapesina* (Mollusca: Gaimardiidae). *Invert. Biol.*, 128:243-251.

- Jaramillo, R. & J. Navarro. 1995. Reproductive cycle of the Chilean ribbed mussel *Aulacomya ater* (Molina, 1982). *J. Shellfish Res.*, 14:165-171.
- Jong-Brink, M., H.H. Boer, & J. Joosse. 1983. Mollusca, 297–355. *En: Adiyodi, K.G. & R.G. Adiyodi (Eds.) Reproductive Biology of Invertebrates, Vol. 1. Oogenesis, Oviposition, and Absorption.* Wiley & Sons, New York, EUA, 653 p.
- Kafanov, A.I. & A.L. Drozdov. 1998. Comparative sperm morphology and phylogenetic classification of recent Mytiloidea (Bivalvia). *Malacologia*, 39:129-139.
- Kang, H.W., E.Y. Chung, J.H. Kim, J.S. Chung & K.Y. Lee. 2012. Germ cell differentiations during spermatogenesis and taxonomic values of mature sperm morphology of *Atrina* (Servatrina) *pectinata* (Bivalvia, Pteriomorphia, Pinnidae). *Dev. Reprod.*, 16:19-29.
- Keen, M. 1971. *Sea shells of Tropical West America. Marine mollusks from Baja California to Peru.* Stanford University Press. 1064 p.
- Kennedy, A.V., & H.I. Battle. 1964. Cyclic changes in the gonad of the American oysters, *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Can. J. Zool.*, 42:305-321.
- Kennedy, H., C.A. Richardson, C.M. Duarte & D.P. Kennedy. 2001. Diet and association of *Pontonia pinnophylax* occurring in *Pinna nobilis*: insights from stable isotope analysis. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.*, 81:177-178.
- Lango-Reynoso, F., J. Chávez-Villalba, J.C. Cochard, M. Le Pennec. 2000. Oocyte size, a means to evaluate the gametogenic development of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture*, 190:183-199.
- Lawrence A.J. 1996. Environmental and endocrine control of reproduction in two species of polychaete. Potential bio-indicators for global climate change. *J. Mar. Biol. Assoc. UK*, 76:247–250.
- Lawrence, A.J. & J.M. Soame. 2004. The effects of climate change on the reproduction of coastal invertebrates. *Ibis*, 146(1):S29–S39.
- Le Pennec, M., P.G. Beninger, G. Dorange & Y.M. Paulet. 1991. Trophic sources and pathways to the developing gametes of *Pecten maximus* (Bivalvia: Pectinidae). *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.*, 71:451-463.
- Lee, K.Y. & E.E. Chung. 2008. Ultrastructural studies of oogenesis and oocyte degeneration in female *Ruditapes philippinarum* (Bivalvia: Veneridae) from Gomso Bay, Korea. *Dev. Reprod.*, 12:41-49.

- Lehninger, A. 1975. *Biochemistry*. Worth Publishers, Nueva York, 1104 p.
- Lessios, H.A. 1987. Temporal and spatial variation in egg size of thirteen Panamian echinoids. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 114:217–239.
- Levinton, J.S. 1983. The latitudinal compensation hypothesis: growth data and a model of latitudinal growth differentiation based upon energy budgets. I. Interspecific comparison of *Ophryotrocha* (Polychaeta: Dorvilleidae). *Biol. Bull.* 165:686-698.
- Leyva-Valencia, L., A.N. Maeda-Martinez, M.T. Sicard, I. Roldan & M. Robles-Mungaray. 2001. Halotolerance, upper thermotolerance, and optimum temperature for growth of the pen shell *Atrina maura* (Sowerby, 1835) (Bivalvia: Pinnidae). *J. Shellfish Res.* 20:49–54.
- Lluch-Belda, D., M.E. Hernández-Rivas, R. Saldierna-Martínez, & R. Guerrero-Caballero. 2000. Variabilidad de la temperatura superficial del mar en Bahía Magdalena, BCS. *Oceánides*, 15(1):1-23.
- Longo, F.G. & E.J. Dornfeld. 1967. The fine structure of spermatid differentiation in the mussel, *Mytilus edulis*. *J. Infrastruct. Res.*, 20:462-480.
- Loosanoff, V.L. & C.A. Nomejko. 1951. Existence of physiologically-different races of oysters, *Crassostrea virginica*. *Biol. Bull.*, 101:151-156.
- Lora-Vilchis, M.C., E. Ruiz-Velasco-Cruz & T. Reynoso-Granados. 2004. Evaluation of five microalgae diets for juvenile pen shells *Atrina maura*. *J. World Aquacult. Soc.*, 35:232-236.
- Lowe, D.M., Moore, M.N. & Bayne, B.L. 1982. Aspects of gametogenesis in the marine mussel *Mytilus edulis* L. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 62:133-145.
- Lubet, P. 1957. Cycle sexual de *Mytilus edulis* L. et de *Mytilus galloprovincialis* Lmk dans le Bassin d'Arcachon (Gironde). *Année Biologique*, 33 :19-29.
- Lubet P. & M. Mathieu. 1978. Experimental studies on the control of annual reproductive cycle in pelecypod mollusks (*Mytilus edulis* and *Crassostrea gigas*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 34(1):109-118.
- Lubet, P., J.Y. Besnard, R. Faveris & I. Robbins. 1987. Physiologie de la reproduction de la coquille St-Jacques (*Pecten maximus* L.). *Oceanis*, 13:265-290.
- Luttikhuisen, P.C., P.J.C. Honkoop & J. Drent. 2010. Intraspecific egg size variation and sperm limitation in the broadcast spawning bivalve *Macoma balthica*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 396(2):156-161.

- MacDonald, B.A. & R.J. Thompson. 1985a. Influence of temperature and food availability on the ecological energetics of the giant scallop *Placopecten magellanicus*. I. Growth rates of shell and somatic tissue. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 25: 279-294.
- Macdonald, B.A. & R.J.Thompson. 1988. Intraspecific variation in growth and reproduction in latitudinally differentiated populations of the giant scallop *Placopecten magellanicus* (Gmelin). *Biol. Bull.*, 175:361-371.
- Maeda-Martínez, A., P. Monsalvo-Spencer & T. Reynoso-Granados. 1996. Acondicionamiento, inducción al desove y obtención de embriones de callo de hacha *Atrina maura* (Mollusca: Pinnidae). Lab. De Ecofisiología y Cultivos Marinos. Div. de Biología Marina. *Informe Interno CIBNOR*, La Paz, B. C. S., México, 167-175 p.
- Maeno, Y., K. Suzuki, T. Yurimoto, R. Fuseya, S. Kiyomoto, S. Ohashi & H. Oniki. 2009. Maturation process of broodstock of the pen shell *Atrina pectinata* (Linnaeus, 1767) in suspension culture. *J. Shell. Res.*, 28:561-568.
- Malachowski, M. (1988). The reproductive cycle of the rock scallop *Hinnites giganteus* (Grey) in Humboldt Bay, California. *J. Shell. Res.*, 7:241-248.
- Marsh, E. 1984. Egg size variation in central Texas populations of *Etheostoma spectabile* (Pisces: Percidae). *Copeia*, 1984:291–301.
- Marteinsdottir, G., & A. Steinarsson. 1998. Maternal influence on the size and viability of Iceland cod *Gadus morhua* eggs and larvae. *J. Fish Biol.*, 52:1241-1258.
- Mason, J., 1958. The breeding of the scallop, *Pecten maximus* (L.), in Manx waters. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.*, 37:653–671.
- Mathieu, M. 1987. Utilization of ATCase activity in the study of neuroendocrine control of gametogenesis in *Mytilus edulis* (Moll. Bivalvia). *J. Exp. Zool.*, 241- 247.
- Mathieu, M. 1994. Endocrine control of carbohydrate metabolism in molluscs. *Persp. Comp. Endocr.*, 471–474.
- Mathieu, M. & P. Lubet. 1993. Storage tissue metabolism and reproduction in marine bivalves - a brief review. *Invertebr. Reprod. Dev.*, 23:123-129.
- Mathieu, M., I. Robbins, & P. Lubet. 1991. The neuroendocrinology of *Mytilus edulis*. *Aquaculture*, 94(2-3):213–233.

- Maxwell, W.L. 1983. Mollusca, 275-239. *En: Adiyodi, K.G. & R.G. Adiyodi (Eds.) Reproductive biology of the invertebrates, Vol. 2: Spermatogenesis and sperm function.* John Wiley and Sons Ltd., Chichester.
- Millán-Núñez, R., E. Ripa-Soleno & L.A. Aguirre-Buenfil. 1987. Estudio preliminar en la composición y abundancia del fitoplancton y clorofilas en la Laguna Ojo de Liebre, BCS. *Cien. Mar.* 13(1):30-38.
- Miranda-Baeza, A. 1997. En investigación regional: hablemos de callo de hacha. *Pesca y Conservación. Un órgano de difusión para la pesca sustentable,* 1:6-7.
- Mori K. 1969. Effect of steroid on oyster-IV. Acceleration of sexual maturation in female *Crassostrea gigas* by estradiol-17 $\beta$ . *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.,* 35:1077–1079.
- Morton, J.E. 1963. *Molluscs.* Hutchinson University Library, Londres, 232 p.
- Morvan, C. & A.D. Ansell. 1988. Stereological methods applied to the reproductive cycle of *Tapes rhomboids*. *Mar. Biol.,* 97:355–364.
- Motavkine, P.A. & A.A. Varaksine. 1983. *Histophysiologie du systeme nerveux et regulation de la reproduction chez les mollusques bivalves.* Sciences. Moscú, 208 p.
- Muranaka, M.S., & J.E. Lannan. 1984. Broodstock management of *Crassostrea gigas*: Environmental influences on broodstock conditioning. *Aquaculture,* 39:217-228.
- Newell, R.I.E., T.J. Hilbish, R.K. Koehn & C.J. Newell. 1982. Temporal variation in the reproductive cycle of *Mytilus edulis* (L.) (Bivalvia: Mytilidae) from localities on the east coast of the United States. *Biol. Bull.* 162: 299-310.
- Niebla-Larreta, J.L. 2006. *Maduración, desove y desarrollo larvario del callo de hacha Atrina tuberculosa (Sowerby, 1835) bajo condiciones de laboratorio.* Tesis de Maestría. Universidad de Sonora, Sonora, México, 64 p.
- Noguera, O.M. & S. Gómez-Aguirre. 1972. Ciclo sexual de *Pinna rugosa* Sowerby, 1835 (Lamellibranchia: Pinnidae) de La Paz, B.C.S., México, 273-283. *En: Carranza J. (Ed.) Memorias IV Congreso Nacional de Oceanografía.* México.
- Olive P.J.W., S. Clark & A. Lawrence. 1990. Global warming and seasonal reproduction: perception and transduction of environmental information. *Adv. Invert. Reprod.,* 5:265–270.

- Ortíz, E., E. Uría-Galicia, A. Silva-Olivares, V. Tsutsumi & M. Shybayama. 2003. Estudio de la ultraestructura de la espermatogénesis de *Anadara tuberculosa* (Sowerby, 1833) (Mollusca: Pelecipoda: Arcidae). *Hidrobiológica*, 13:145-150.
- Ortíz-Ordoñez, E., E. Uría-Galicia, A. Silva-Olivares, V. Tsutsumi & M. Shybayama. 2006. Ultrastructure of spermatogenesis in the white clam *Chione californiensis* (Broderip, 1835) (Mollusca: Pelecipoda). *J. Shellfish Res.*, 25:399-401.
- Osada M., T. Matsutani & T. Nomura. 1987. Implication of catecholamines during spawning in bivalve molluscs. *Int. J. Invert. Reprod. Dev.*, 12:241–252.
- Palomares-García, R.J., A. Martínez-López, R. De Silva-Dávila, R. Funes-Rodríguez, M.A. Carballido-Carranza, R. Avendaño-Ibarra, A. Hinojosa-Medina & G.A. López-Ibarra. 2003. Biological effect of El Niño 1997-1998 on a shallow subtropical cosystem: Bahía Magdalena, Mexico. *Geofísica Internacional*, 42(3):455-466.
- Paulet, Y.M., A. Lucas & A. Gerard. 1988. Reproduction and larval development in two *Pecten maximus* (L.) populations from Brittany. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 119:145-156.
- Pazos A.J. & M. Mathieu. 1999. Effects of five natural gonadotropin-releasing hormones on cell suspensions of marine bivalve gonad: stimulation of gonial DNA synthesis. *Gen. Comp. Endocr.*, 113(1):112–120.
- Peharda, M., I. Mladineo, J. Bolotin, L. Kekez & B. Skaramuca. 2006. The reproductive cycle and potential protandric development of the Noah's Ark shell, *Arca noae* L.: implications for aquaculture. *Aquaculture*, 252:317-327.
- Pipe, R. K. 1987a. Oogenesis in the marine mussel *Mytilus edulis*: an ultrastructural study. *Mar Biol.*, 95:405-414.
- Pipe, R. K. 1987b. Ultrastructural and cytochemical study on interactions between nutrient storage cells and gametogenesis in the mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.*, 96:519-528.
- Pipe, R.K. & M.N. Moore. 1985. The ultrastructural localization of lysosomal acid hydrolases in developing oocytes of the common marine mussel *Mytilus edulis*. *Histochem. J.*, 17: 939-949.

- Pipe, R.K. & H.M.C. Da Silveira. 1989. Arylsulphatase and acid phosphatase activity associated with developing and ripe spermatozoa of the mussel *Mytilus edulis*. *Histochem. J.*, 21:23-32.
- Popham, J.D. 1974. The acrosome reaction in the sperm of the shipworm *Bankia australis* Caiman (Bivalvia, Mollusca). *Cell Tissue Res.*, 151:93-101.
- Popham, J.D. 1979. Comparative spermatozoon morphology and bivalve phylogeny. *Malacol. Rev.*, 12:1-20.
- Poutiers, J.M. 1995. Bivalvos, 100-222. En: Fischer, W., F. Krupp, W. Schneider, C. Sommer, K.E. Carpenter & V.H. Niem (Eds.). *Guía FAO para la identificación de especies para los fines de la pesca. Pacífico centro-oriental*. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Roma, 598 p.
- Pouvreau, S., A. Gangnery, J. Tiapari, F. Lagarde, M. Garnier & A. Bodoy. 2000. Gametogenic cycle and reproductive effort of the tropical blacklip pearl oyster, *Pinctada margaritifera* (Bivalvia: Pteriidae), cultivated in Takapoto atoll (French Polynesia). *Aquat. Living Resour.*, 13:37-48.
- Reddiah K 1962. The sexuality and spawning of Manx pectinids. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 42: 683–703.
- Reunov, A.A. & A.N. Hodgson. 1994. Ultrastructure of the spermatozoa of five species of South African bivalves (Mollusca), and an examination of early spermatogenesis. *J. Morphol.*, 219:275-283.
- Reverberi, G. 1966. Electron microscopy of some cytoplasmic structures of the oocytes of *Mytilus*. *Exp. Cell Res.*, 42:392-394.
- Reyes-Salinas, A., R. Cervantes-Duarte, R.A. Morales-Pérez & J.E. Valdez-Holguín. 2003. Variabilidad estacional de la productividad primaria y su relación con la estratificación vertical en la Bahía de la Paz, B. C. S. *Hidrobiológica*, 13(2):103-110.
- Reynoso-Granados, T., A.N. Maeda-Martínez, F. Cardoza-Velasco & P. Monslavo-Spencer. 1996. Cultivo de Hacha, 545-550. En: Casas-Valdez, M. & G. Ponce-Díaz (Eds.) *Estudio del potencial pesquero y acuícola de Baja California Sur*, Vol. 2. SEMARNAT, México.
- Roberts, D. 1984. A comparative study of *Lasaea australis*, *Vulsella spongiarum*, *Pinna bicolor* and *Donacilla cuneata* (Mollusca; Bivalvia) from Princess Royal Harbour, western Australia. *J. Molluscan Stud.*, 50:129-136.

- Robles-Mungaray, M. 2004. *Desarrollo de la biotecnología para la producción de semilla en laboratorio, diploide y triploide, de callo de hacha Atrina maura (Sowerby, 1835)*. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Baja California Sur, Baja California Sur, México, 66 p.
- Robles-Mungaray, M., S.J. Serrano-Guzmán & F. Hoyos-Chaires. 1996. Cultivo de larvas y semillas de callo de hacha *Atrina maura* (Sowerby, 1835) en el CREMES de Bahía Kino, Son. Méx. *Resúmenes del XI Simposium Internacional de Biología Marina*. La Paz, B.C.S. 25 al 30 de Nov.
- Rodríguez-Jaramillo, C., A.N. Maeda-Martínez, M.E. Valdez, T. Reynoso, P. Monsalvo-Spencer, D. Prado-Ancona, F. Cardoza-Velasco, M. Robles-Mungray & M. T. Sicard. 2001. The effect of temperature on the reproductive maturity of the penshell *Atrina maura* (Sowerby, 1835) (Bivalvia: Pinnidae). *J. Shellfish Res.*, 20:39-47.
- Rodríguez-Mata, L.M. 2006. *Estudio a microescala de los nutrientes y variables hidrológicas en Bahía Magdalena, BCS., México*. Tesis de Maestría, Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, Instituto Politécnico Nacional, La Paz, Baja California Sur, México. 89 p.
- Rouse, G.W. & B.G.M. Jamieson. 1987. An ultrastructural study of the spermatozoa of the polychaetes *Eurythoe complanata* (Amphinomidae), *Clymenella* sp. and *Micromaldane* sp. (Maldanidae), with definition of sperm types in relation to reproductive biology. *J. Submicr. Cytol.*, 19:573-584.
- Safi, K., J.E. Hewitt & S.G. Talman. 2007. The effect of high inorganic seston loads on prey selection by the suspension-feeding bivalve, *Atrina zelandica*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 344:136-148.
- Santiago-Coronel, J. 1981. *Estudio gonadal de Pinna rugosa (Sowerby, 1835) Pinnidae, Mollusca, en el período comprendido entre agosto de 1979 y diciembre de 1980 en la Bahía de La Paz*. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de Baja California Sur, México, 36 p.
- Sastry, A.N. 1970. Reproductive physiological variation in latitudinally separated populations of the bay scallop, *Aequipecten irradians* Lamarck. *Biol. Bull.*, 138:56-65.
- Sastry, A.N. 1975. Physiology and ecology of reproduction in marine invertebrates, 279-299. *En: Vernberg, F.J. (Ed.) Physiological ecology of estuarine organisms*, University of South Carolina Press, Columbia.

- Sastry, A.N. 1979. Pelecypoda (excluding Ostreidae), 113-292. En: Giese, A.C. & J.S. Pearse (Eds.) *Reproduction of marine invertebrates, Vol. 5. Molluscs: pelecypods and lesser classes*. Academic Press, New York.
- Sastry, A.N. & N.J. Blake. 1971. Regulation of gonad development in the bay scallop, *Aequipecten irradians* Lamarck. *Biol. Bull.*, 140:274-283.
- Sato E., D. Wood, M. Sahni & S. Koide. 1985. Meiotic arrest in oocytes regulated by a *Spisula factor*. *Biol. Bull.*, 169:334-341.
- Seed, R. 1976. Ecology, 13-65 En: Bayne, B.L. (Ed.) *Marine mussels: their ecology and physiology*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Seed, R. & R.A. Brown. 1978. Growth as a strategy for survival in two marine bivalves, *Cerastoderma edule* and *Modiolus modiolus*. *J. Anim. Ecol.* 47:283-292.
- Shimao, G., C. Chengcono, H. Lixuan & W. Qinohoe. 1987. A preliminary study on the artificial rearing of larval pen shell *Pinna pectinata* Linné. *Mar. Sci.*, 1:35-39.
- Singh-Cabanillas, J. & E. Michel-Guerrero. 2002. *Aspectos biológicos del callo de hacha, Pinna rugosa Sowerby, 1835, en Bahía Concepción, B.C.S. Mem. I Foro Científico de Pesca Ribereña*. INP-CRIP. Guaymas, Son.
- Somerton, D. A. 1980. A computer technique for estimating the size of sexual maturity in crabs. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 47:1488-1494.
- Soria-Padilla, E. 1989. *Aspectos poblacionales y datos preliminares para la evaluación del callo de hacha Atrina maura (Sowerby, 1835) en la desembocadura del Río Balsas de Lázaro Cárdenas, Michoacán, México*. Tesis de licenciatura. Univ. Mich. San Nicolás Hidalgo, 27 p.
- Sousa, M., & E. Oliveira. 1994. An ultrastructural study of *Crassostrea angulata* (Mollusca, Bivalvia) spermatogenesis. *Mar. Bio.*, 120:545-551.
- Stefano G.B., & E.J. Catapane. 1979. Enkephalins increase dopamine levels in the central nervous system of marine molluscs. *Life Science*, 24:1617-1622.
- Stenyakina, A., L.J. Walters, E.A. Hoffman & C. Calestani. 2010. Food availability and sex reversal in *Mytella charruana*, an introduced bivalve in the southeastern United States. *Mol. Reprod. Dev.*, 77:222-230.
- Suzuki, T., A. Hara, K. Yamaguchi & K. Mori. 1992. Purification and immunolocalization of a vitellin like protein from the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Mar. Biol.*, 113:239-245.

- Thielley, M. 1993. *Etude cytologique de la gamétogenèse, de la sex-ratio et du cycle de reproduction chez l'huître perlière Pinctada margaritifera (L) var. cummingi (Jameson), (Mollusques, Bivalves): comparaison avec le cycle de Pinctada maculata (Gould)*. Tesis de Doctorado, Université Française du Pacifique.
- Thielley, M., M. Weppe & C. Herbaut. 1993. Ultrastructural study of gametogenesis in the French Polynesian black pearl oyster *Pinctada margaritifera* (Mollusca, Bivalvia), I-spermatogenesis. *J. Shellfish Res.*, 12:41-47.
- Tranter, D.J. 1958. Reproduction in Australian pearl oysters (Lamellibranchia). IV. *Pinctada margaritifera* (Linnaeus). *Aust. J. Mar. Freshw. Res.*, 9:511-525.
- Urban, H. J. 2001. Reproductive strategies in tropical bivalves (*Pteria colymbus*, *Pinctada imbricata* and *Pinna carnea*): Temporal coupling of gonad production and spat abundance related to environmental variability. *J Shellfish Res.*, 20:1127-1134.
- Vélez-Barajas, J. & M. Fajardo-León. 1996. Pesquería de hacha, 101-111. *En: Casas-Valdez, M. & G. Ponce-Díaz (Eds.) Estudio del potencial pesquero y acuícola de Baja California Sur*, Vol. 1. SEMARNAT, México.
- Villalejo-Fuerte, M., M. Arellano-Martínez, B.P. Ceballos-Vázquez & F. García-Domínguez. 2000. Ciclo reproductivo de la almeja chocolata *Megapitaria squalida* (Sowerby, 1835) (Bivalvia: Veneridae) en Bahía Juncalito, Golfo de California, México. *Hidrobiología*, 10:165-168.
- Wang C. & P.R. Croll. 2004. Effects of sex steroids on gonadal development and gender determination in the sea scallop, *Placopecten magellanicus*. *Aquaculture*, 238:483–498.
- Wang, C. & P.R. Croll. 2006. Effects of sex steroids on spawning in the sea scallop, *Placopecten magellanicus*. *Aquaculture*, 256:423–432.
- Wang, M.F., X.Y. Yu & J.Y. Wang. 1999. The androgynous phenomena and sex reversal of two *Pinna (Atrina) pectinata* (J). *J. Zhanjiang Ocean University*, 19:6-10.
- Williams, J.R. & R.C. Babcock. 2004. Comparison of multiple techniques to evaluate reproductive variability in a marine bivalve: application to the scallop *Pecten novaezelandiae*. *Mar. Fresh. Res.* 55:457-468.

- Wootton, R.J. 1984. Introduction: strategies and tactics in fish reproduction, 1-12.  
*En: Potts, G.W. & R.J. Wootton (Eds.) Fish reproduction: strategies and tactics.* Academic Press, New York. 410 p.
- Wright, W.G. 1988. Sex change in the Mollusca. *Tree*, 3:137-140.
- Yung, E.C. 2007. Oogenesis and sexual maturation in *Meretrix lusoria* (Roding, 1798) (Bivalvia: Veneridae) in western Korea. *J. Shellfish Res.*, 26:71-80.
- Yurchenko, O. & M.A. Vaschenko. 2010. Morphology of spermatogenic and accessory cells in the mussel *Modiolus kurilensis* under environmental pollution. *Mar. Environ. Res.*, 70:171-180.
- Yusa, Y. 2007. Causes of variation in sex ratio and modes of sex determination in the Mollusca—an overview. *Amer. Malacol. Bull.*, 23:89-98.
- Zar, J.H. 1996. *Biostatistical análisis*. 3rd edition. Prentice Hall, Inc. New Jersey. EUA, 365 p.
- Zwaan A. & M. Mathieu. 1992. Cellular biochemistry and endocrinology, 223-307.  
*En: Gosling E. (Ed.) The mussel Mytilus edulis: ecology, physiology, genetics and culture:* Elsevier, Amsterdam.

## Particular features of gonadal maturation and size at first maturity in *Atrina maura* (Bivalvia: Pinnidae)

MARIAN A. CAMACHO-MONDRAGÓN, MARCIAL ARELLANO-MARTÍNEZ  
and BERTHA P. CEBALLOS-VÁZQUEZ

Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas-IPN, Av. Instituto Politécnico Nacional, S/N, Col. Playa Palo de Santa Rita, La Paz, Baja California Sur, 23096 México. E-mail: bceballo@ipn.mx

**SUMMARY:** The gonadal maturation of *Atrina maura* was examined by means of histological analysis and quantitative criteria. Particular features not previously described for this species are reported in this study: in both males and females the undifferentiated stage is absent and there is massive gamete resorption when the seawater temperature reaches 25°C; in males, there is continuous spawning concurrent with other gonadal development stages and the adipogranular cells surrounding the acini walls decrease with testis ripeness, which suggests they play an energetic role. Atresia displayed two stages: cytoplasmic structures with oocyte degeneration and digestion by hemocytes. The oocyte diameter was larger than that reported for cultured specimens. Size at first maturity was reached at 23.3 cm in shell height (SH) (12.2 cm in shell length, SL) in females and 22.8 cm SH (12.0 cm SL) in males.

**Keywords:** reproduction, resorption, adipogranular cells, size at first maturity.

**RESUMEN:** ASPECTOS PARTICULARES DE LA MADURACIÓN GONÁDICA Y TALLA DE PRIMERA MADUREZ DE *ATRINA MAURA* (BIVALVIA: PINNIDAE). – Se analizó histológicamente y usando criterios cuantitativos el proceso de maduración gonádica de *Atrina maura*. Se reportan características particulares que no han sido descritas previamente para la especie: ausencia de la fase de indiferenciación y reabsorción masiva de gametos, tanto en hembras como en machos, cuando la temperatura del agua alcanza los 25°C; en los machos presencia de eyaculación continua simultánea con otras fases de desarrollo gonádico y células adipogranulares arregladas alrededor de las paredes de los acinos que disminuyen conforme avanza la maduración, sugiriendo un papel energético. La atresia presentó dos fases: estructuras citoplasmáticas con degeneración ovocitaria y digestión por hemocitos. El diámetro de los ovocitos fue mayor que los reportados para organismos de cultivo. La talla de primera madurez para las hembras se estableció en 23.3 cm de altura de la concha (AC) (12.2 cm de longitud de la concha, LC) y para los machos en 22.8 cm de AC (12.0 cm de LC).

**Palabras clave:** reproducción, reabsorción, células adipogranulares, talla de primera madurez.

### INTRODUCTION

Pinnids, commonly called fan mussels or pen shells, are considered a delicacy in many countries (including Mexico and particularly in Asia). *Atrina maura* is found in littoral sand and mud habitats forming dense aggregations and is widely distributed along the temperate and tropical coasts of the east Pacific from Baja California Sur, México (including Gulf of California) to Peru.

Some species of the Pinnidae family have declined worldwide or are seriously threatened, which justifies

including them in the listing of fully protected species (Cabanellas-Reboredo *et al.* 2009). Despite this, it is not yet the case for *A. maura* in Mexico, the catches of this species are increasing and there is no fishery management regulation.

As a result of the growing commercial demand for species of the Pinnidae family, most studies on these bivalves have focused on fishery assessment and development of mass culturing techniques (Kennedy *et al.* 2001, Lora-Vilchis *et al.* 2004, Safi *et al.* 2007). Relatively few studies have addressed taxonomic,

ecological, and physiological aspects of the species in this family (Butler *et al.* 1993, De Gaulejac *et al.* 1995, Urban 2001, Beer and Southgate 2006, Idris *et al.* 2008). The available information on *Atrina maura* mainly deals with the standardization of culturing techniques (Cardoza-Velasco and Maeda-Martínez 1997) and reproductive aspects in cultured organisms or under laboratory conditions (Rodríguez-Jaramillo *et al.* 2001, Enríquez-Díaz *et al.* 2003). In contrast, few investigations have been carried out on natural populations (Soria 1989, Ahumada-Sempoal *et al.* 2002, Ángel-Pérez *et al.* 2007, Ángel-Dapa *et al.* 2010).

Field observations usually provide the most reliable information about the onset of reproduction and the timing of spawning. However, observing spawning bivalves in nature is extremely difficult. On the other hand, observations of spawning under laboratory or experimental conditions have little meaning and might lead to dubious conclusions about the timeline of reproduction under field conditions. Therefore, microscopic analysis of gonads of wild specimens results in far more reliable information (Seed 1976).

In bivalves, histological analyses of gonadal tissue of individuals collected at regular intervals provide the most reliable method for determining seasonal gonadal changes. The timing of spawning and the percentage of spawning individuals in a natural population can also be determined with this method, which is useful for predicting the occurrence of seed settlement for use in aquaculture and for establishing fishery management measures (Brousseau 1987, Jaramillo and Navarro 1995, Alfaro *et al.* 2001). Moreover, studies that include direct sampling of wild populations may reveal histological, biochemical or metabolic changes that will lead to a deeper understanding of reproduction, and thus better management and optimization of bivalve production.

Determining gonadal development, size at first maturity and morpho-physiological indices not only improves the knowledge on these organisms but also provides monitoring tools. The size at first maturity is used to establish the minimum landing size, an important parameter for regulating fishing effort in many species. The minimum landing size should be larger than the size at first maturity to guarantee that the individuals can reproduce at least once, thus ensuring a parental stock that is large enough to maintain the population. Likewise, determining the reproductive season, the patterns of gonadal development and the type of spawning are also keys for broadening the knowledge on the species biology, and are also essential for further studies on fecundity and egg viability. Finally, information on the seasonality of the reproductive process and the factors affecting it (particularly seawater temperature and food availability) provides basic elements for fisheries management as well as for designing artificial environments for managing reproduction.

This study describes some histological features of the gonadal maturation of *A. maura* and investigates the

relationship between gonadal maturation and seawater temperature in Ensenada de La Paz, B.C.S., Mexico. In addition, the size at first maturity is assessed for this species.

## MATERIALS AND METHODS

### Study area and sampling

Ensenada de La Paz (24°06'N-24°11'N and 110°19'W-110°26'W) is a shallow coastal lagoon (<10 m deep) located in the southern area of La Paz Bay in the Gulf of California, Mexico. This is the main *A. maura* fishing area inside the bay and one of the five fishing regions in the state of Baja California Sur. During 2008, 20-30 adult specimens of *A. maura* were collected monthly at depths from 3 to 8 m by semi-autonomous diving between 8:00 and noon. Seawater temperature at the time of sampling was recorded to the nearest 0.01°C with a BK Precision 710 digital temperature meter. In the laboratory, the epibionts were cleaned off the specimens and the shell height (SH, in line straight distance from umbo to ventral margin of the shell) and shell length (SL, in line straight distance from anterior margin to posterior margin of the shell) were measured ( $\pm 1$  mm), as well as the total weight (TW) and flesh weight (FW) ( $\pm 0.1$  g). The visceral mass and adductor muscle were removed and their individual weights (VW and MW respectively) were also recorded ( $\pm 0.1$  g).

### Sex ratio and size at first maturity

Since *A. maura* lacks sexual dimorphism, specimens were sexed through microscopic analysis of the gonads and the sex ratio was calculated monthly. In addition, the size at first maturity for each sex was estimated using Somerton's method (1980). Relative frequencies and cumulative relative frequencies for 1 cm size intervals were computed, and the latter was fitted to a logistic model from which the size at which 50% of the individuals are sexually mature was estimated. The estimate was based on the entire set of specimens sampled, since all showed evidence of gamete development. Both the SH and SL were considered as SH is biologically significant and SL is relevant for fisheries management.

### Histological analysis and condition indices

Since *A. maura* has a diffuse gonad (the gonad infiltrates the digestive gland forming the visceral mass), a portion of the visceral mass containing gonadal tissue was extracted from each specimen and fixed in 10% formalin. A conventional histological technique was used (Humason 1979), consisting in dehydration through a sequence of alcohol solutions of increasing concentrations, followed by clearing with Hemo-De® and embedding in Paraplast-Xtra®. Sections 5  $\mu$ m thick

were cut, stained with haematoxylin-eosin and examined under a light microscope.

The initial characterization of the gonadal development stages followed the proposal by Rodríguez-Jaramillo *et al.* (2001) for this species: early activity, development, late activity, maturity, spawning and post-spawning. These stages were modified based on acinus size, shape and extent of development; gamete occurrence and extent of development; gamete location in acini; oocyte size, and amount of connective tissue. In males, the presence of adipogranular cells (AGC) was also registered; these cells were identified by staining with Black Sudan. To support the assigned development stages with quantitative criteria, histological sections from 18 females and 18 males (six for each development stage detected in this study) were digitized and analysed using the software SIGMA SCAN PRO (V. 5.0, Systat Software, Inc.). In the ovaries of each studied female, the diameters of all oocytes found within 20 acini were measured. Afterwards, the proportion of each oocyte type per ovarian development stage was calculated. Oocytes were classified according to the four categories described by Rodríguez-Jaramillo *et al.* (2001) and Enriquez-Díaz *et al.* (2003) based on their extent of development: oogonia, previtellogenic oocytes, vitellogenic oocytes and post-vitellogenic oocytes. In males, the surface area occupied by AGC was measured in each testicular development stage. In both sexes, gonads undergoing gamete resorption were not considered quantitatively because this process affects the integrity of the gonadal tissue. The ovarian cycle in *A. maura* was determined considering the different development stages identified through histological analysis and their sequence in the ovarian ripeness.

In addition, monthly variations in the Condition Index (CI=FW/TW×100) and Muscle Yield Index (MYI=MW/FW×100) were examined.

### Reproductive cycle

In order to describe the reproductive cycle, monthly relative frequencies of each gonadal development stage were calculated and plotted. To assess the effect of seawater temperature on the reproduction of *A. maura*, the relationship between temperature and the reproductive cycle was examined.

### Statistical analyses

One-way ANOVA was used to examine the relationship between gonadal development stages and the frequency of different oocyte types or the percent area occupied by AGC. One-way ANOVA was also employed to examine monthly variations in CI and MYI. When the analyses of variance detected a statistically significant effect, *a posteriori* multiple comparison tests (Tukey) were conducted. Variables expressed as a frequency (%) were arcsine transformed (Zar 1996) to reduce the dependence of sample variances on the

TABLE 1. – Size and weight (mean ± SE, range) of the whole female and male *Atrina maura* sample studied.

	Females	Males	ANOVA
Shell height (cm)	24.0±0.17 (19-28.1)	23.5±0.25 (16-28.2)	P=0.09
Shell length (cm)	13.1±0.13 (10-16.2)	12.9±0.15 (8.9-16.2)	P=0.35
Total weight (g)	282.9±8.34 (113.2-521.6)	290.9±11.45 (75.8-576.8)	P=0.57

means and to normalize the data distribution. However, results are expressed as untransformed means and standard errors. All statistical analyses were performed using the software STATISTICA for Windows (Versión 6.0, Statsoft). Differences in sex ratios were tested using an  $\chi^2$  test with Yates' continuity correction (Zar 1996). A significance level of  $\alpha=0.05$  was set in all tests.

## RESULTS

### Biometric analyses, sex ratio and size at first maturity

A total of 226 individuals, 52% females and 48% males, were examined. The overall sex ratio was 1.06F:1.00M. The sex ratio was significantly different ( $\chi^2$ ,  $P<0.05$ ) from parity (1:1) only in February (3.00F:1.00M). The size and weight of specimens did not display significant differences between sexes (ANOVA,  $P>0.05$ ) (Table 1).

Size at first maturity was reached at 23.3 cm SH and 12.2 cm SL ( $r^2=0.99$ ) in females, and 22.8 cm SH and 12.0 cm SL ( $r^2=0.99$ ) in males (Fig. 1). Nevertheless, mature females with a 19 cm SH (10 cm SL) and mature males as small as 16 cm SH (8.9 cm SL) were observed.

### Gonadal development

Microscopic examination of gonads revealed the presence of gametes in different developmental stages in the same individual and even within individual acini. It was possible to determine that gamete production is continuous, particularly in males, while spawning is partial. The diameter of the 6618 oocytes measured changed with the extent of development. Oogonies measured between 7.0 and 20.8  $\mu\text{m}$  ( $12.5\pm 0.19$  SE) and previtellogenic oocytes measured between 12.7 and 46.2  $\mu\text{m}$  ( $27.9\pm 0.33$ ). Vitellogenic oocytes ranged between 23.7 and 56.5  $\mu\text{m}$  ( $40.7\pm 0.29$ ), and postvitellogenic oocytes ranged between 29.4 and 56.0  $\mu\text{m}$  ( $41.6\pm 0.29$ ).

Some features observed in the gonadal development of *A. maura* had not been previously described for this species. In females, ovaries that had started releasing oocytes and at the same time contained developing gametes (previtellogenic oocytes) adhered to the acinus walls were observed, thus indicating continuous gam-

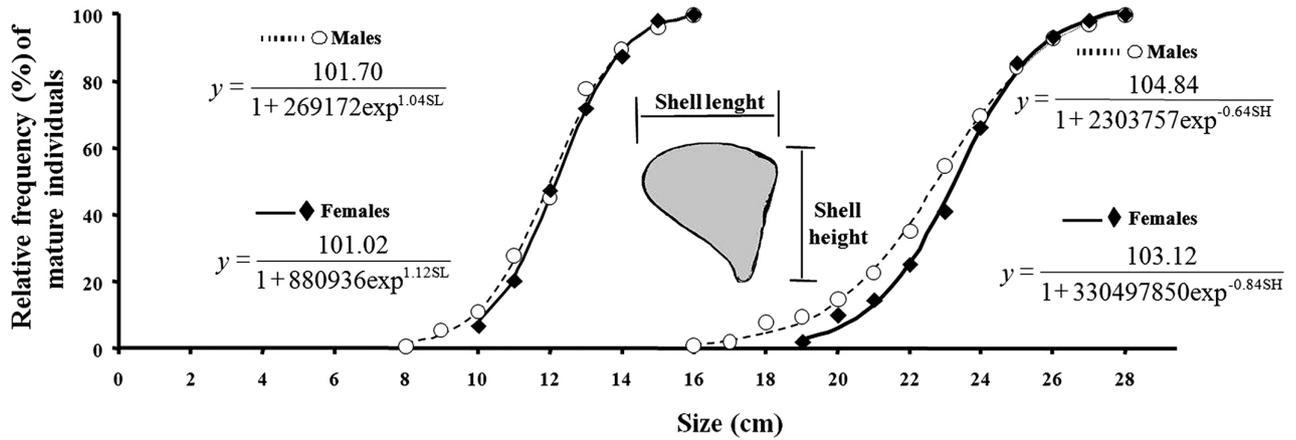


FIG. 1. – Size at first maturity for males and females of *Atrina maura* in Ensenada de La Paz, Mexico. Fitted models are included.

ete production and releases (Fig. 2). In males, most testes with spermatogenic activity (gamete production) showed areas with clear evidence of gamete release (joint acini with abundant spermatozooids and partly emptied evacuating ducts). Continuous gamete production and releases (spawning with spermatogenic activity at the same time) was more persistent in males, only eight testes (of individuals measuring between 22.0 and 26.2 cm SH) showed no sperm development but contained abundant spermatozooids, apparently being released (Fig. 3). An interesting feature that persisted throughout the testicular development was the presence of a large amount of adipogranular cell-shaped structures surrounding the vesicular cells in each acinus (Fig. 4).

Massive lysis with deterioration and loss of acinus integrity was noted in both ovaries and testes (Fig. 5). This process was observed in 44 females (24.2±2.0 cm SH) and ten males (26.6±1.4 cm SH) and its frequency is described below as gamete resorption. These gonads displayed a large amount of mature atresic gametes (post-vitellogenic oocytes or spermatozooids). Numerous phagocytes (macrophage hemocytes) contributing

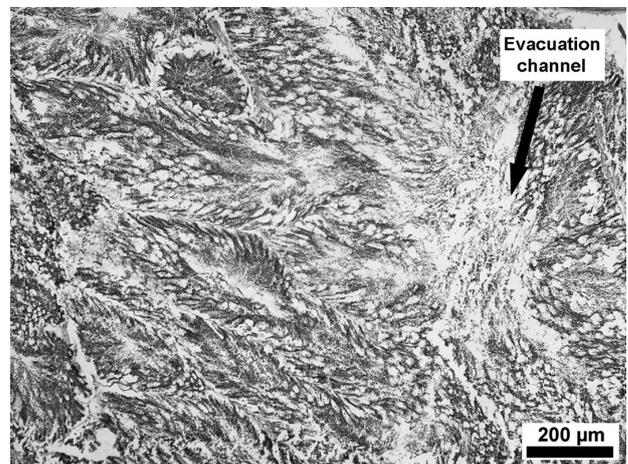


FIG. 3. – Photomicrograph of a spawning testis of *Atrina maura* with no evidence of sperm development.

to gamete lysis were observed both inside and between acini. Connective tissue invading the gonad was also observed.

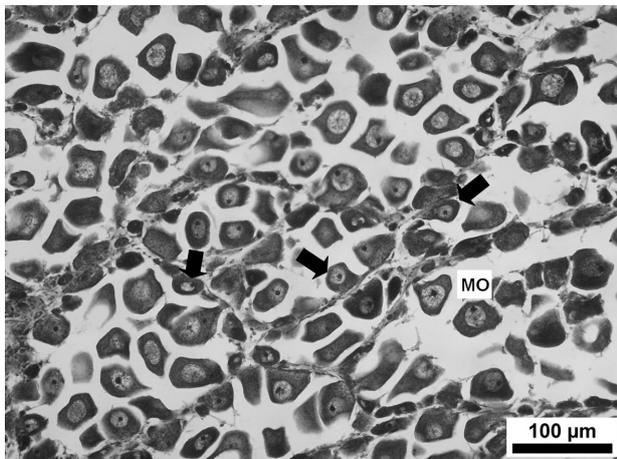


FIG. 2. – Photomicrograph of a spawning ovary with new development in *Atrina maura*. Arrows indicate some developing oocytes attached to acini wall. MO, mature oocytes.

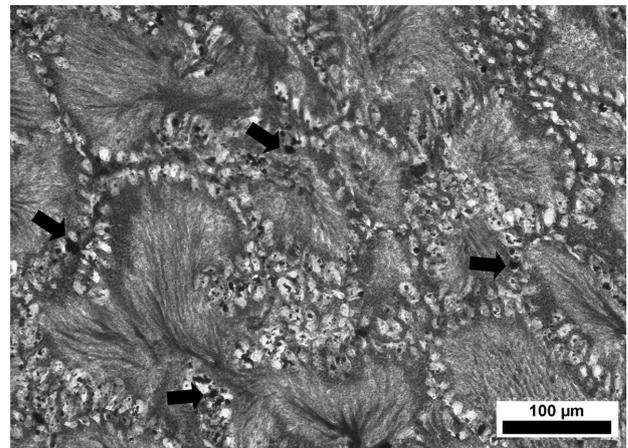


FIG. 4. – Photomicrograph of adipogranular cells (AGC) during testis development in *Atrina maura*. AGC (white cells) are evidenced by the lipid accumulations (black points, Sudan B stain), some of them are indicated by arrows.

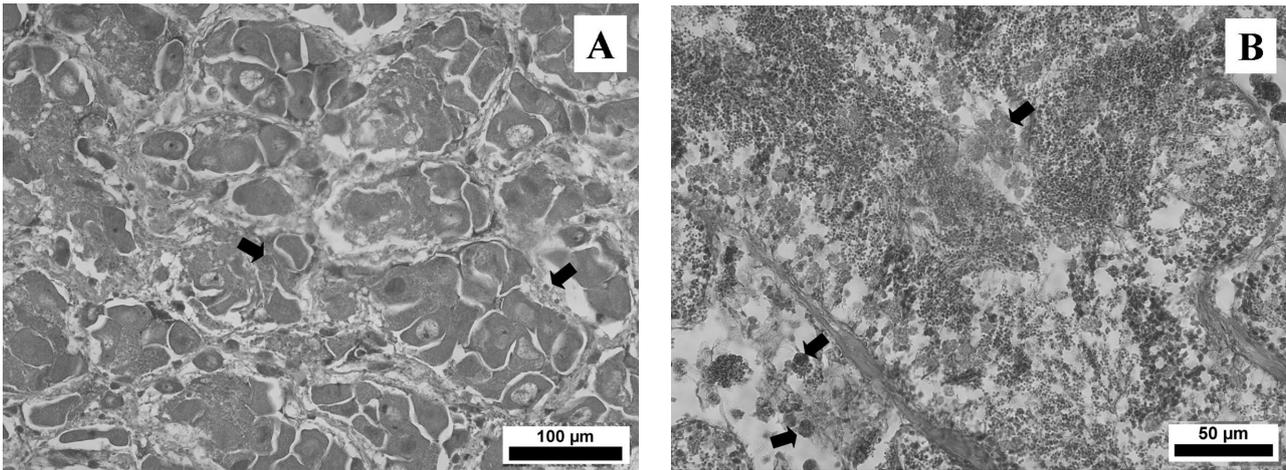


FIG. 5. – Photomicrograph of massive lysis (resorption) in gonads of *Atrina maura*: A) Ovary and B) Testis. Arrows indicate the presence of phagocytes.

Considering both our observations (described above), and the observations of gametogenic development reported for this species by other authors, three development stages were identified (Table 2) and no undifferentiated individuals were found. In females, these stages were: development, ripe and spawning. In males, since all specimens showed evidence of spawning but at the same time had gametes in different development stages, the definition of stages also considered these features: type-1, type-2 and type-3 spawning stages. In addition, in both sexes the resorption process was also considered as part of the reproductive cycle, since in some months all specimens were in gonadal resorption. Given that gamete production in *A. maura* was continuous, it was difficult to differentiate between

gonads with advanced development and ripe gonads. Then, a given ovary was considered to be in the development stage when no post-vitellogenic oocytes were observed, whereas a testis was classified as type-1 spawning when the area occupied by AGC was higher than 15% and with evident spermatogenic activity.

The analysis of the frequency of occurrence by oocyte type and of percentage area occupied by AGC further confirmed the gonadal development stages identified in both sexes from histological observations. In females, the frequency of the different oocyte types changed significantly with the extent of ovarian development (ANOVA,  $P < 0.05$ ) (Table 3). The amount of oogonia was significantly higher in the development compared to the ripe stage; however, the spawning

TABLE 2. – Description of gonadal development stages in *Atrina maura*.

Females	Males
<p><b>Development.</b> Numerous oogonia and previtellogenic oocytes attached to acini walls. Presence of some oocytes entering the vitellogenic phase, evidenced by the increase in cytoplasmic surface area. In more developed ovaries, vitellogenic oocytes appear free in the lumen but postvitellogenic oocytes are never observed. Acini are found surrounded by connective tissue with little space between them.</p>	<p><b>Type 1 Spawning.</b> Zones evidencing ongoing gamete release are visible: groups of acini and accumulation of spermatozooids, as well as emptying ducts. Evident stratification of gametes with different degrees of development. At the onset of this phase, thick layers of spermatogonia and spermatocytes occur in acini walls. As development progresses, spermatogonia become less abundant and the amount of spermatocytes, spermatids and spermatozooids increase. Presence of a large amount (&gt;15% of gonad area) of adipogranular cells (AGC) between acini.</p>
<p><b>Ripe.</b> Acini practically filled with free post-vitellogenic oocytes in the lumen. Because of their abundance, those oocytes acquire a polyhedral shape. Some previtellogenic oocytes attached to acini walls. Reduction of connective tissue without space between acini.</p>	<p><b>Type 2 Spawning.</b> Zones evidencing ongoing gamete emptying are present. Acini filled with spermatozooids, with their flagella pointing towards the lumen. Layers of spermatogonia and spermatocytes have thinned and spermatogenic activity continues. Presence of adipogranular cells (AGC) between acini (&lt;15% of gonad area). Connective tissue barely evident.</p>
<p><b>Spawning.</b> Partially empty acini, with variable amounts of post-vitellogenic oocytes depending on the progress of spawning. In some ovaries previtellogenic oocytes are present attached to the acinus walls, indicating the onset of a new development or rematuration. Connective tissue is evident, with a large space between acini.</p>	<p><b>Type 3 Spawning.</b> Decrease in the number of spermatozooids in the centre of acini. Presence of emptying ducts. Some acini appear virtually empty, while others are still filled with spermatozooids. No spermatogenic activity. Presence of adipogranular cells (AGC) between acini (&lt;15% of gonad area). Connective tissue barely evident.</p>
<p><b>Resorption.</b> Gonads show the same micro- and macroscopic characteristics than in the ripe stage, but contain large amounts of mature gametes undergoing lysis. Cellular degeneration is evident due to the loss of basic structural characteristics: deterioration of nuclei and breakage of plasma and vitelline membranes. Numerous phagocytes can be observed inside and between follicles.</p>	

TABLE 3. Percentage occurrence (mean ± SE) of different oocyte types by phase of ovarian development in 18 females of *Atrina maura*. In rows, values with different letters are significantly different.

Oocyte type	Ovarian development phase			ANOVA
	Development	Ripe	Spawning	
Oogonia	16.3±2.8 <sup>b</sup>	3.0±1.5 <sup>a</sup>	10.0±3.2 <sup>ab</sup>	P=0.022
Previtellogenic	43.3±10.3 <sup>b</sup>	11.1±3.2 <sup>a</sup>	27.4±4.1 <sup>b</sup>	P=0.006
Vitellogenic	40.4±7.5 <sup>b</sup>	6.4±2.2 <sup>a</sup>	9.2±2.3 <sup>a</sup>	P=0.004
Post-vitellogenic	0±0 <sup>a</sup>	79.5±6.5 <sup>b</sup>	53.5±5.2 <sup>b</sup>	P<0.001

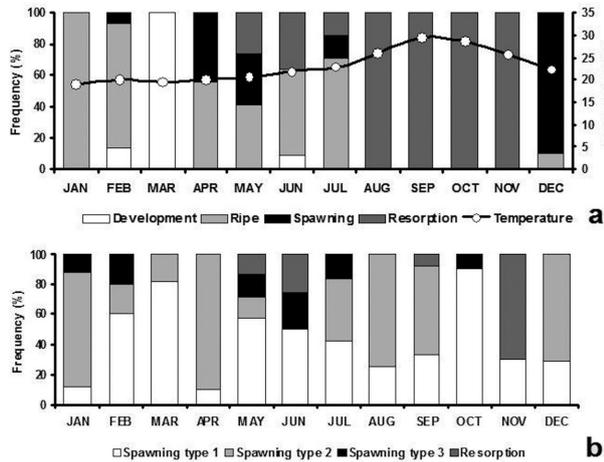


Fig. 6. – Seawater temperature variation in Ensenada de La Paz and reproductive cycle of *Atrina maura* females (a) and males (b).

stage did not significantly differ from the other stages in terms of oogonia frequency. However, previtellogenic oocytes were significantly more abundant during the development and spawning stages than in the ripe stage. The frequency of vitellogenic oocytes during the development stage was significantly higher than in the ripe and spawning stages. Finally, post-vitellogenic oocytes were more abundant in the ripe stage than in the spawning stage but the difference was not significant.

In males, the area occupied by AGC changed with the development stage. These structures were significantly more abundant (ANOVA, P<0.05) at the beginning of development (type-1 spawning stage: 21.10±3.76) and, although they decreased as ripening progressed, AGC remained throughout the entire gonadal cycle (type-2 spawning stage: 4.62±1.52; type-3 spawning stage: 8.31±4.03).

**Reproductive cycle**

The reproductive cycle of *A. maura* and the variation in seawater temperature in Ensenada de La Paz are shown in Figure 6. The seawater temperature had a seasonal variation with the lowest values from December to June (21.6-23.7°C) and the highest values from July to November (25.5-30.4°C) (Fig. 6a). A reproductively inactive period (resting phase) evidenced by the presence of undifferentiated individuals could not be identified. Ripe females were found from December to July with peak abundance in January and February

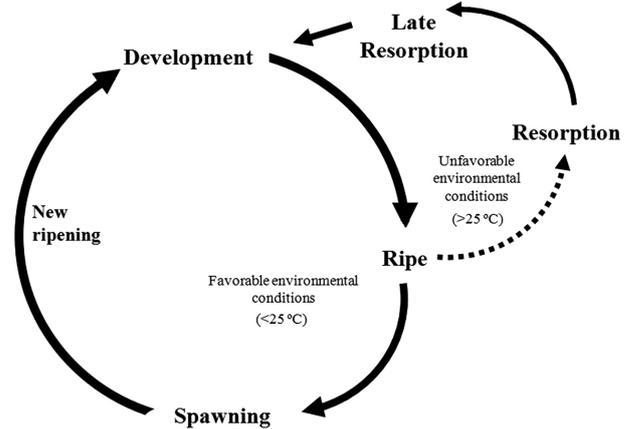


Fig. 7. – Schematic illustration of the ovarian cycle of *Atrina maura* in Ensenada de La Paz, Mexico.

(>80%). Spawning occurred from February to July and peaked in December (90%) (Fig. 6a). In males, spawning with different degrees of new ripening was observed throughout the study period (Fig. 6b).

In females, gamete resorption occurred in low percentages (between 14% and 36%) from May and throughout July; however, this condition appeared in all specimens observed from August to November, coinciding with the highest seawater temperatures (>25°C). Males also had gonads undergoing gamete

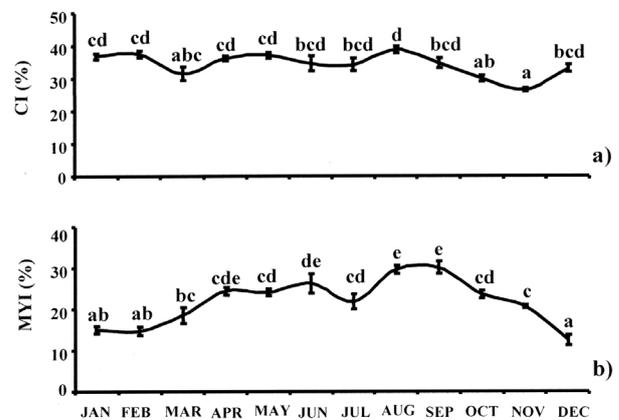


Fig. 8. – Monthly variations (means ± SE) in: a) Condition Index and b) Muscle Yield Index for combined male and female individuals of *Atrina maura*. Monthly samples with different letters are significantly different. Bars indicate the standard error.

resorption in the same periods, i.e. May, June and September (<25%), with a peak in November (70%).

The ovarian cycle (sequential occurrence of developmental stages) of *A. maura* is schematically illustrated in Figure 7. In Ensenada de La Paz the ovarian cycle of *A. maura* includes three development stages and a gamete resorption process, which are cyclically related and lead to two environment-dependent paths, apparently driven by seawater temperature.

### Condition and muscle yield indices

Significant monthly differences (ANOVA,  $P < 0.05$ ) were detected in CI and MYI values, although a well-defined seasonality could not be recognized (Fig. 8). However, a significant decrease in both indices was observed from August to November in the case of CI, and to December in the case of MYI. Such reductions were related to the high frequency of gonads undergoing gamete resorption and, in the case of the MYI, also to spawning during December.

### DISCUSSION

In Ensenada de La Paz, *A. maura* displayed continuous gamete production (only interrupted by the temperature dependent resorption process) with no evident seasonal pattern in the spawning process. However, gamete release only occurred when the temperature fell below 25°C.

Oocyte size is an important feature from both ecological and evolutionary viewpoints, as it reflects the maternal energy investment and influences the fitness of both the females and offspring. Oocyte size can be influenced by female size and origin (laboratory vs. natural conditions). In this sense, contrasting results have been found in different aquatic organisms, including positive correlations between female size or condition and egg or offspring size (sea star: George 1994, gastropods: Ito 1997, fish: Marteinsdottir and Steinarsson 1998), negative correlations (fish: Iguchi and Yamaguchi 1994), and no correlation (fish: Marsh 1984, echinoids: Lessios 1987, amphipods: Glazier 2000). Moreover, it has been demonstrated that stressed adult mussels produce smaller, lower-quality eggs and larvae (Bayne 1972). In the present study, the diameters of the different oocyte types of *A. maura* were larger than those reported in other studies performed under controlled conditions (Rodríguez-Jaramillo *et al.* 2001, Enríquez-Díaz *et al.* 2003). In this sense, Rodríguez-Jaramillo *et al.* (2001) studied laboratory-reared specimens that were smaller ( $9.8 \pm 0.1$  cm SH) than those examined in this study (19 to 28.1 cm SH). Qualitative criteria are required to describe the reproductive processes related to gonadal development. However, detailed quantitative information reduces subjectivity and eliminates semantic problems inherent to qualitative descriptions, thus improving the ability to obtain ecologically meaningful information (Barber

and Blake 1991). Accordingly, the three-stage gonadal development scheme proposed for males (type-1, type-2, and type-3 spawning stages) and females (development, maturity and spawning) are the combined result of qualitative analyses (microscopic observations and morphological criteria) and quantitative criteria (percentage area occupied by AGC and frequency occurrence of each oocyte type). This led us to establish that, even though *A. maura* males release gametes continuously in Ensenada de La Paz, development stages can be differentiated based on AGC abundance. Similarly, in females the frequency of occurrence of different oocyte types indicated the development stage (development, maturity and spawning). These criteria therefore seem more suitable for describing the gonadal maturation process in wild specimens of *A. maura* from the study area. In this case, the continuous gametogenic activity observed in *A. maura* females (evidenced by the presence of oocytes in different developmental stages together with growing oocytes at the periphery of acini in spawning individuals) precluded a finer classification of specimens into intermediate reproductive stages (early activity, development and late activity). This phenomenon had already been reported to occur in this species, both in wild individuals (Ángel-Pérez *et al.* 2007) and in specimens reared or conditioned in the laboratory (Rodríguez-Jaramillo *et al.* 2001).

Contrary to reports for the Oaxaca coast (Ángel-Pérez *et al.* 2007), no undifferentiated specimens were observed in Ensenada de La Paz. The lack of a reproductively inactive period (resting phase) in this population might be a response to local environmental conditions, particularly food availability (Baqueiro and Aldana 2000, Villalejo-Fuerte *et al.* 2000). Ensenada de La Paz is a favourable area for continuous breeding of *A. maura* as there is a constant and immediate food supply for filter feeders. This zone displays high primary productivity (phytoplankton abundance and diversity); furthermore, its inner portion is a low-energy zone in terms of current strength, thus working as a natural trap for particulate organic matter (detritus) that can be re-suspended even by weak currents (Aguirre-Bahena 2002) and then consumed by benthic filter feeders.

Many proteins are synthesized during spermatogenesis, which involves a high energy expenditure (Lehninger 1975). The transport of nutrient reserves could occur either directly or through some cells located in acinus walls (e.g. Sertoli's cells) (Pipe 1987). In this sense, the presence of AGC surrounding acinus walls in males and their decrease with ripening suggest that AGC play a mediating role in the development and maturation of germ line cells. The relative proportion of storage tissue for germ cells has been reported to change depending on the gametogenic condition (Herlin-Houtteville and Lubet 1975, Lowe *et al.* 1982, Pipe and Moore 1985, Delgado and Pérez-Camacho 2007). The significant reduction in AGC over the course of testicular development supports the assumption that

their energy-supply role might be restricted to the earliest stages of spermatogenesis.

This is the first report of such an intense atresia in gonads of *A. maura* of both sexes. In oocytes, atresia apparently shows two clearly distinctive phases. Initially, lysis of the oocyte membrane and cytoplasmic structures takes place, which results in large masses of scattered cytoplasmic material with nuclei lacking nucleolus that appear more translucent compared to nuclei of normal oocytes. This is followed by the digestion of lysed materials by hemocytes. In spermatozooids, lysis is not as evident due to their almost total lack of cytoplasm. However, large masses of hemocytes that typically occur during the lysis process and loss of tissue integrity were also observed. This finding suggests there is spermatozoid degradation (Bayne *et al.* 1978), not previously described for *A. maura*.

Motavkine and Varaksine (1983) suggested three likely reasons for the occurrence of atresia: 1) a control mechanism of the number of cells in the acinus (which has a finite capacity) could explain physiological resorption (apoptosis); 2) a “self-cleaning” process, which prepares the gonad for a new gametogenic cycle; 3) unfavourable environmental conditions (e.g. pollution, nutritional deficit, anomalously low or high temperatures) which can restrain the ovarian cycle and impair spawning. In this study, high percentages of male and female gonads showing gamete resorption were observed from August to November, when the highest temperatures (>25°C) were recorded. This is further supported by another study showing that gamete resorption occurred at 25°C in *A. maura* females under laboratory conditions (Rodríguez-Jaramillo *et al.* 2001).

Oocyte atresia has been reported in other bivalve species such as *Corbicula japonica* (Baba *et al.* 1999), *Pecten maximus* (Paulet *et al.* 1988, Beninger and Le Pennec 1991), *Pinna nobilis* (De Gaulejac *et al.* 1995) and *Nodipecten subnodosus* (Arellano-Martínez *et al.* 2004), suggesting that lysis byproducts might be reabsorbed by ancillary cells, hemocytes and epithelial cells in gonoducts to be reused (Dorange and Le Pennec 1989, Le Pennec *et al.* 1991, De Gaulejac *et al.* 1995). In bivalves, the condition index (CI) is regarded as a quantitative indicator of soft tissue quality (i.e. nutritional status) (Crosby and Gale 1990, Abbe and Albright 2003). Moreover, CI is also a useful tool for assessing the reproductive condition in bivalves with diffuse gonads (as is the case of *A. maura*), in which assessing the gonadosomatic index is not possible. However, caution should be taken when the CI values are interpreted because these can be influenced by factors other than gonad size (e.g. adductor muscle size, amount of undigested food in the digestive gland, etc.). In *A. maura*, the adductor muscle represents approximately 20% of the flesh weight; therefore, the significant decrease in CI values observed late in the year can be accounted for a simultaneous re-

duction in MYI rather than by variation in gonadal maturity. In addition, a direct relationship between MYI or CI values and reproductive activity was not observed in this study. This, together with the high food availability in Ensenada de La Paz, supports the conclusion that the primary energy source for the reproduction of *A. maura* inhabiting this zone comes from recently ingested food (opportunistic tactic).

Determining the size at first maturity is particularly relevant for *A. maura* populations in Mexico since the National Fisheries Chart (Anonymous 2010) indicates that these are overexploited and deteriorating in all localities across its distributional range. In this study, both SH and SL were used to determine size at first maturity. Shell height was used for comparative purposes, as this is the parameter most frequently mentioned in bivalves that can be measured at the point of capture, and that can be returned to the environment without evident damage if they are below the minimum landing size. However, the SH of species belonging to the Pinidae cannot be measured without causing considerable damage to the individuals, since these live almost completely buried, except for their rear end that protrudes a few centimetres above the sediment. Therefore, SL is the best alternative for fishery management measures, as this allows fishermen to measure the individuals without causing damage.

Size at first maturity in *A. maura* living in Ensenada de La Paz was reached at 12 cm SL. This differs from the only size at first maturity (16 cm SL) reported for this species at a locality in the Mexican Pacific (outlet of the Balsas River, Michoacán) (Soria 1989). Current regulations stipulate a minimum landing size of 14 cm SL for *A. maura* (Anonymous 2010), which is consistent with the present results. However, the size at first maturity decreases as a consequence of overexploitation, thus it should be monitored periodically to update the regulation if necessary.

The findings reported herein support the conclusion that *A. maura* displays an opportunistic reproductive strategy favoured by the large amount of food available in Ensenada de La Paz. Its reproduction combines several elements, including continuous maturation (no resting stage) and partial spawning, to ensure reproductive success. However, at temperatures above 25°C, massive gamete resorption occurs (mostly in females).

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This research was funded through projects SIP 20080824, SIP 20082220 and CONACyT-909000. M.A. Camacho-Mondragón is a fellow student of PIFI (IPN) and CONACyT, the results presented here are part of her PhD thesis. B.P. Ceballos-Vázquez and M. Arellano-Martínez received grants from SIBE (COFAA), EDI (IPN), and SNI-CONACYT. Thanks are due to María Elena Sánchez-Salazar (M.Sc.) and Salvador Sánchez-Colón (M.Sc.) for their revision of the English manuscript.

## REFERENCES

- Abbe G.R., Albright B.W. 2003. An improvement to the determination of meat condition index for *Crassostrea virginica*. *J. Shellfish Res.* 22: 747-752.
- Aguirre-Bahena F. 2002. *Dinámica de los componentes de la materia particulada suspendida y otras variables hidrológicas en la Ensenada-Bahía de La Paz, Baja California Sur, México*. M.Sc. thesis, CICIMAR-IPN, 146 pp. (<http://www.biblioteca.cicimar.ipn.mx/oasis/tesisdesplegar detalles.php?id=430>)
- Ahumada-Sempoal M.A., Serrano-Guzmán S.J., Ruiz-García N. 2002. Abundancia, estructura poblacional y crecimiento de *Atrina maura* (Bivalvia: Pinnidae) en una laguna costera tropical del Pacífico mexicano. *Rev. Biol. Trop.* 50: 1091-1100.
- Alfaro A.C., Jeffs A.G., Hooker S.H. 2001. Reproductive behavior of the greenlipped mussel, *Perna canaliculus*, in northern New Zealand. *Bull. Mar. Sci.* 69: 1095-1108.
- Ángel-Dapa M.A., Rodríguez-Jaramillo C., Cáceres-Martínez C.J., Saucedo P.E. 2010. Changes in lipid content of oocytes of the penshell *Atrina maura* as a criterion of gamete development and quality: a study of histochemistry and digital image analysis. *J. Shellfish Res.* 29 (2): 407-413.
- Ángel-Pérez C., Serrano-Guzmán S.J., Ahumada-Sempoal M.A. 2007. Ciclo reproductivo del molusco *Atrina maura* (Pterioidea: Pinnidae) en un sistema lagunar costero, al sur del Pacífico tropical mexicano. *Rev. Biol. Trop.* 55: 839-852.
- Anonymous. 2010. Diario Oficial de la Federación: Carta Nacional Pesquera ([http://conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/conacona\\_carta\\_nacional\\_pesquera](http://conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/conacona_carta_nacional_pesquera))
- Arellano-Martínez M., Racotta L., Ceballos-Vázquez B.P., Elorduy-Garay J. 2004. Biochemical composition, reproductive activity, and food availability of the lion's paw scallop *Nodipecten subnodosus* in the Laguna Ojo de Liebre, B.C.S., Mexico. *J. Shellfish Res.* 23: 15-23.
- Baba K., Tada M., Kawajiri T., Kuwahara Y. 1999. Effects of temperature and salinity on spawning of the brackish water bivalve *Corbicula japonica* in Lake Abashiri, Hokkaido, Japan. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 180: 213-221.
- Baqueiro E., Aldana D.A. 2000. A review of reproductive patterns of bivalve mollusks from Mexico. *Bull. Mar. Sci.* 66: 13-27.
- Barber J.B., Blake N.J. 1991. Reproductive physiology. In: Shumway S.E. (ed.), *Scallops: Biology, Ecology and Aquaculture*. Elsevier, Amsterdam, pp. 377-409.
- Bayne B.L. 1972. Some effects of stress in the adult on the larval development of *Mytilus edulis*. *Nature* 237: 459.
- Bayne B.L., Holland D.L., Moore M.N., Lowe D.M., Windows J. 1978. Further studies on the effect of stress in the adult on the eggs of *Mytilus edulis*. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 58: 825-841.
- Beer A.C., Southgate P.C. 2006. Spat collection, growth and meat yield of *Pinna bicolor* (Gmelin) in suspended culture in northern Australia. *Aquaculture* 258: 424-429.
- Beninger P.G., Le Pennec I.V. 1991. Functional anatomy of scallops. In: Shumway S.E. (ed.), *Scallops: Biology, Ecology and Aquaculture*. Elsevier, Amsterdam, pp. 133-223.
- Brousseau D.J. 1987. A comparative study of the reproductive cycle of the softshell clam, *Mya arenaria* in Long Island Sound. *J. Shellfish Res.* 6: 7-15.
- Butler A., Vicente N., De Gaulejac B. 1993. Ecology of the Pterioid bivalves *Pinna bicolor* Gmelin and *Pinna nobilis* L. *Life* 3(1-2): 37-45.
- Cabanellas-Reboredo M., Deudero S., Alós J., Valencia J.M., March D., Hendriks I.E., Álvarez E. 2009. Recruitment of *Pinna nobilis* (Mollusca: Bivalvia) on artificial structures. *Mar. Biodivers Rec.* 2: 1-5.
- Cardoza-Velasco F., Maeda-Martínez A. 1997. An approach to aquacultural production of the penshell *Atrina maura* Sowerby, 1835 (Bivalvia:Pinnidae) in northwest Mexico. *J. Shellfish Res.* 16 (1): 311.
- Crosby M.P., Gale L.D. 1990. A review and evaluation of bivalve condition index methodologies with a suggested standard method. *J. Shellfish Res.* 9: 233-237.
- De Gaulejac B., Henry M., Vicente N. 1995. An ultrastructural study of gametogenesis of the marine bivalve *Pinna nobilis* (Linnaeus, 1758). I. Oogenesis. *J. Molluscan Stud.* 61: 375-392.
- Delgado M., Pérez-Camacho A. 2007. Comparative study of gonadal development of *Ruditapes philippinarum* (Adams and Reeve) and *Ruditapes decussatus* (L.) (Mollusca: Bivalvia): Influence of temperature. *Sci. Mar.* 71(3): 471-484.
- Dorange G., Le Pennec M. 1989. Ultrastructural study of oogenesis and oocytic degeneration in *Pecten maximus* from the Bay of St. Briec. *Mar. Biol.* 103: 339-348.
- Enriquez-Díaz M., Cáceres-Martínez C., Chávez-Villalba J., Le Pennec G., Le Pennec M. 2003. Gametogenesis of *Atrina maura* (Bivalvia: Pinnidae) under artificial conditions. *Invertebr. Reprod. Dev.* 43(2): 151-161.
- George S.B. 1994. Population differences in maternal size and offspring quality for *Leptasterias epichlora* (Brandt) (Echinodermata: Asteroidea). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 175: 121-131.
- Glazier D.S. 2000. Is fatter fitter? Body storage and reproduction in ten populations of the freshwater amphipod *Gammarus minus*. *Oecologia* 122: 335-345.
- Herlin-Houtteville P., Lubet P.E. 1975. The sexuality of pelecypod molluscs. In: Reinbeth R. (ed.), *Intersexuality in the animal kingdom*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 179-187.
- Humason G.L. 1979. *Animal tissue techniques*. 4th Edition, W.H. Freeman and Company, San Francisco, 661 pp.
- Idris M.H., Arshad A., Bujang J.S., Daud S.K., Abdul-Ghaffar M. 2008. New distribution record of two pen shells (Bivalvia: Pinnidae) from the Seagrass Beds of Sungai Pulau, Johore, Malaysia. *J. Biol. Sci.* 8: 882-888.
- Iguchi K., Yamaguchi M. 1994. Adaptive significance of inter- and intrapopulation egg size variation in Ayu *Plecoglossus altivelis* (Osmeridae). *Copeia* 1994: 184-190.
- Ito K. 1997. Egg-size and -number variations related to maternal size and age, and the relationship between egg size and larval characteristics in an annual marine gastropod, *Haloa japonica* (Opisthobranchia: Cephalaspidea). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 152: 187-195.
- Jaramillo R., Navarro J. 1995. Reproductive cycle of the Chilean ribbed mussel *Aulacomya ater* (Molina, 1982). *J. Shellfish Res.* 14: 165-171.
- Kennedy H., Richardson C.A., Duarte C.M., Kennedy D.P. 2001. Diet and association of *Pontonia pinnophylax* occurring in *Pinna nobilis*: insights from stable isotope analysis. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 81 (1): 177-178.
- Le Pennec M., Beninger P.G., Dorange G., Paulet Y.M. 1991. Trophic sources and pathways to the developing gametes of *Pecten Maximus* (Bivalvia: Pectinidae). *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 71: 451-463.
- Lehninger A. 1975. *Biochemistry*. Worth Publishers, Nueva York, 1104 pp.
- Lessios H.A. 1987. Temporal and spatial variation in egg size of thirteen Panamanian echinoids. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 114: 217-239.
- Lora-Vilchis M.C., Ruiz-Velasco-Cruz E., Reynoso-Granados T. 2004. Evaluation of five microalgae diets for juvenile pen shells *Atrina maura*. *J. World Aquac. Soc.* 35(2): 232-236.
- Lowe D.M., Moore M.N., Bayne B.L. 1982. Aspects of gametogenesis in the marine mussel *Mytilus edulis* L. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 62: 133-145.
- Marsh E. 1984. Egg size variation in central Texas populations of *Etheostoma spectabile* (Pisces: Percidae). *Copeia* 1984: 291-301.
- Marteinsdottir G., Steinarsson A. 1998. Maternal influence on the size and viability of Iceland cod *Gadus morhua* eggs and larvae. *J. Fish Biol.* 52: 1241-1258.
- Motavkine P.A., Varaksine A.A. 1983. *Histophysiologie du système nerveux et régulation de la reproduction chez les mollusques bivalves*. Sciences, Moscu, 208 pp.
- Paulet Y.M., Lucas A., Gerard A. 1988. Reproduction and larval development in two *Pecten maximus* (L.) populations from Brittany. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 119: 145-156.
- Pipe R.K. 1987. Oogenesis in the marine mussel *Mytilus edulis*: an ultrastructural study. *Mar. Biol.* 95: 405-414.
- Pipe R.K., Moore M.N. 1985. The ultrastructural localization of lysosomal acid hydrolases in developing oocytes of the common marine mussel *Mytilus edulis*. *Histochem. J.* 17: 939-949.
- Rodríguez-Jaramillo C., Maeda-Martínez A.N., Valdez M.E., Reynoso T., Monsalvo-Spencer P., Prado-Ancona D., Cardoza-Velasco F., Robles-Mungaray M., Sicard M.T. 2001. The effect of temperature on the reproductive maturity of the penshell *Atrina maura* (Sowerby, 1835) (Bivalvia: Pinnidae). *J. Shellfish*

- Res.* 20(1): 39-47.
- Safi K., Hewitt J.E., Talman S.G. 2007. The effect of high inorganic seston loads on prey selection by the suspension-feeding bivalve, *Atrina zelandica*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 344: 136-148.
- Seed R. 1976. Ecology. In: Bayne B.L. (ed.), *Marine mussels: their ecology and physiology*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 13-65.
- Somerton D.A. 1980. A computer technique for estimating the size of sexual maturity in crabs. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 47: 1488-1494.
- Soria E. 1989. *Aspectos poblacionales y datos preliminares para la evaluación del callo de hacha Atrina maura (Sowerby, 1835) en la desembocadura del Río Balsas de Lázaro Cárdenas, Michoacán, México*. B.Sc. thesis, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, 27 pp.
- Urban H.J. 2001. Reproductive strategies in tropical bivalves (*Pteridaria colymbus*, *Pinctada imbricata* and *Pinna carnea*): Temporal coupling of gonad production and spat abundance related to environmental variability. *J. Shellfish Res.* 20: 1127-1134.
- Villalejo-Fuerte M., Arellano-Martínez M., Ceballos-Vázquez B.P., García-Domínguez F. 2000. Ciclo reproductivo de la almeja chocolate *Megapitaria squalida* (Sowerby, 1835) (Bivalvia: Veneridae) en Bahía Juncalito, Golfo de California, México. *Hidrobiologica* 10: 165-168.
- Zar J.H. 1996. *Biostatistical analysis*. 3<sup>rd</sup> edition. Prentice Hall, Inc. New Jersey, 662 pp.
- Scient. ed.: M. Gaspar.  
Received October 14, 2011. Accepted February 10, 2012.  
Published online July 9, 2012.

SEMANA DEL POSGRADO  
2011

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR)  
Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas (CICIMAR)  
Universidad Autónoma de Baja California Sur (UABCS)

Otorgan el presente

# Reconocimiento

a:

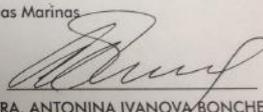
**MARIAN ALEJANDRA CAMACHO MONDRAGÓN**

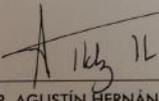
Por su participación en la XI Semana del Posgrado

Trabajo: Ecología reproductiva del hacha china *Atrina maura* Sowerby 1835  
Bivalvia Pinnidae en el noroeste del Pacífico mexicano

Modalidad: Entrevista  
Institución: Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas

  
DRA. ELISA SERVIERE ZARAGOZA  
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO Y  
FORMACIÓN DE RECURSOS HUMANOS  
CIBNOR

  
DRA. ANTONINA IVANOVA BONCHEVA  
DIRECTORA DE INVESTIGACIÓN INTERDISCIPLINARIA  
Y POSGRADO UABCS

  
DR. AGUSTÍN HERNÁNDEZ HERRERA  
SUBDIRECTOR ACADÉMICO Y DE  
INVESTIGACIÓN CICIMAR - IPN

LA PAZ, BCS, MÉXICO  
ABRIL 4 AL 8, 2011

XII SEMANA DE POSGRADO EN B.C.S.

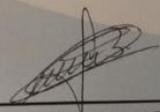
Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas (CICIMAR-IPN)  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR)  
Universidad Autónoma de Baja California Sur (UABCS)

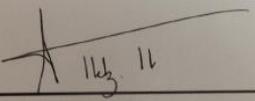
Otorgan el presente

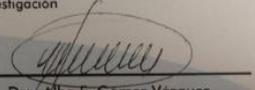
# RECONOCIMIENTO

A: *Marian Alejandra Camacho Mondragón*

Por su participación en la XII Semana de Posgrado en B.C.S.

  
Dra. Elisa Serviere Zaragoza  
Directora de Estudios de Posgrado  
y Formación de Recursos Humanos  
CIBNOR

  
Dr. Agustín Hernández Herrera  
Subdirector Académico y de Investigación  
CICIMAR-IPN

  
Dra. Alba E. Gómez Vázquez  
Directora de Investigación Interdisciplinaria  
y Posgrado UABCS

LA PAZ, B.C.S. MÉXICO  
MARZO 12-16, 2012







La Asociación de Investigadores del Mar de Cortés y el  
Instituto de Investigaciones Oceanológicas



Otorga la presente

## Constancia

a:

Camacho Mondragón, Marian Alejandra, Esther Uría Galicia, Edgar Oliver López  
Villegas, Marcial Arellano Martínez y Bertha Patricia Ceballos Vázquez

Por su valiosa participación como expositor en el XIII Congreso del Mar de Cortés  
Y VII Simposio del mar de Cortés con la ponencia:

**"ULTRAESTRUCTURA DE LA ESPERMATOGÉNESIS DEL HACHA CHINA *Atrina maura* (BIVALVIA: PINNIDAE)"**

Realizado en la ciudad y puerto de Ensenada B.C. México, del 8 al 12 de abril del 2013

  
**Dr. E. Alberto Aragón N.**  
Presidente AIMAC

  
**Dr. Isai Pacheco Ruíz**  
Director IO - UABC

  
**MC Luis F. Navarro O.**  
Coordinador general