

TESIS DEFENDIDA POR
Ana María Basto Cuevas
Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ

Dr. Miguel Ángel del Río Portilla
Codirector del Comité

Dr. Jorge Abelardo Cáceres Martínez
Codirector del Comité

Dra. Carmen Guadalupe Paniagua
Chávez
Miembro del Comité

Dr. Oscar Sosa Nishizaki
Miembro del Comité

Dra. Rebeca Vásquez Yeomans
Miembro del Comité

Meritxell Riquelme Pérez
*Coordinador del programa de posgrado
en Ciencias con orientación en
Acuicultura*

Dr. David Hilario Covarrubias Rosales
Director de Estudios de Posgrado

28 de agosto de 2009

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN
SUPERIOR DE ENSENADA**



**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS
CON ORIENTACION EN ACUICULTURA**

**IDENTIFICACIÓN DEL SEXO Y DEL DESARROLLO GONADAL EN
ABULÓN ROJO *Haliotis rufescens*, EN CAUTIVERIO**

TESIS

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado
de
MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

ANA MARIA BASTO CUEVAS

Ensenada, Baja California, México, 28 de agosto del 2009.

RESUMEN de la tesis de **Ana María Basto Cuevas**, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de MAESTRO EN CIENCIAS con orientación en **Acuicultura**. Ensenada, Baja California. Agosto 2009.

**IDENTIFICACIÓN DEL SEXO Y DEL DESARROLLO GONADAL EN
ABULÓN ROJO *Haliotis rufescens* Swainson, EN CAUTIVERIO**

Resumen aprobado por:

Dr. Miguel Ángel del Río Portilla
Codirector de tesis

Dr. Jorge Abelardo Cáceres Martínez
Codirector de tesis

El abulón rojo (*Haliotis. rufescens*) es un molusco gasterópodo con alto valor comercial a nivel internacional. En México, la península de Baja California es la única entidad productora. Actualmente la producción de abulón rojo es sólo por cultivo y la producción en el año 2007 tuvo un valor de \$ 4, 677, 499 pesos. Considerando que el éxito en el cultivo depende en gran medida de la crianza selectiva y el conocimiento de los aspectos reproductivos en estos sistemas, se realizó este estudio donde se compararon diferentes métodos como herramientas para la identificación del sexo, así como un análisis del desarrollo gonadal de abulones pertenecientes a un sistema de cultivo.

Los abulones se obtuvieron de la granja de Abulones Cultivados S.A. de C.V en Eréndira, Baja California. Los abulones estudiados estuvieron en el intervalo de tallas de 21.98 mm y 77.32 mm. Se utilizaron tres métodos para la identificación del sexo y análisis del desarrollo gonadal de los abulones: método visual, método histológico y método bioquímico. El método visual se basó en la observación del aspecto de la gónada. El método histológico se basó en la inspección microscópica de la gónada y sirvió de control para evaluar los resultados obtenidos en los otros métodos. El método bioquímico consistió en la aplicación de ácido tiobarbitúrico y ácido tricloroacético a biopsias de tejido de abulón en condiciones de alta temperatura. Posteriormente la alícuota obtenida se analizó en un espectrofotómetro con un barrido de 400-600 nm de longitud de onda. Finalmente con los valores de

absorbancia se obtuvieron unos índices que permitieron identificar el sexo de forma cuantitativa.

Con la inspección visual e histológica se encontró que por debajo de la talla de 50 mm los abulones estuvieron en la fase de desarrollo gonadal preproliferativo, caracterizada por la ausencia de gónada y epitelio germinal. Por arriba de la talla de 65 mm fue posible identificar el sexo de forma visual con una precisión de 90.2%. En este mismo grupo, con el método histológico la hembra de menor talla encontrada fue de 66.28 mm y el macho de menor talla fue 65.78 mm. En las hembras, el 17% de este grupo estuvo en fase de maduración y el 83% estuvo en la fase de desove nulo. En los machos, el 71% estuvo en fase de maduración y el 29 % restante estuvo en la fase madura.

Con el método bioquímico sí fue posible identificar el sexo del abulón rojo. Utilizando tejido gonádico, en las hembras se produce un cromóforo rosa asociado a un pico de mayor absorbancia a los 555 nm mientras que en los machos se produce un cromóforo amarillo asociado a dos picos de mayor absorbancia, el primero a los 458 nm y el segundo a los 502 nm. Analizando los valores de absorbancia se crearon cuatro índices utilizando la absorbancia a los 458 nm, 502 nm y 555 nm. Además, se estimaron los valores límites para poder identificar cada sexo. El índice b (Abs_{555}/Abs_{502}) tuvo la precisión total mayor de 86.27 % respecto a la histología considerada del 100%. Si el valor del índice es mayor de 1.0 el abulón es hembra, de 0.6 a 1.0 es indiferenciado y menor a 0.6 es macho. No se observó una correlación entre el grado de madurez sexual y los valores de absorbancia, por lo que el método bioquímico no permite cuantificar el grado de madurez sexual pero es una herramienta útil para identificar el sexo cuando no es posible hacerlo de forma visual y para detectar el momento en que empieza el proceso de maduración sexual.

Palabras Clave: Identificación del sexo, desarrollo gonadal, abulón rojo cultivado.

ABSTRACT of the thesis presented by **Ana María Basto Cuevas** as a partial requirement to obtain the **MASTER OF SCIENCES** degree in **Aquaculture**. Ensenada, Baja California, México. Agosto 2009.

**SEX IDENTIFICATION AND GONAD GROWTH IN THE RED ABALONE
HALIOTIS RUFESCENS CULTURED**

Key Words: Sex identification, gonad growth, red abalone cultured.

The red abalone (*Haliotis rufescens*) is a gastropod mollusk with a high commercial value in international market. Baja California, Mexico, is the only state that produces cultured red abalone, In 2007, the abalone production had a value of \$4, 677,499. Considering that farm success depends of the selective culture and knowledge of reproductive process, this study aim to compared different methods for sex identification and gonad assessment.

Abalones were obtained from the Abalones Cultivados S.A de C.V, a farm situated in Ejido Erendira, Baja California. The abalones were between 21.98 mm and 77.32 mm of length of shell. Three methods were used for sex identification and gonad assessment; visual macroscopic, hystology and biochemistry method. The visual method was based in the macroscopic observation of the gonad color. The histology was based in the microscopic observation of the gonad. With the visual and histological inspection was found that abalones with minor size of 50 mm were without gonad nor germinal epithelium. For abalone above 65 mm it was possible to visually identified the sex with a 90.2% precision. In this group, for the female abalone smaller than 66.28 mm, 17% were in maturation phase and the 83% were in null spawning. For males smaller than 65.78 mm in size, 71% were in maturation phase and the 29% in mature phase. (se repite maturation phase dos veces corrije cual es!)

For the biochemical method, each tissue sample was treated with thiobarbituric (TBA) and trichloroacetic (TCA) acids. Then, the absorbance (A) spectrum was obtained in a spectrophotometer from 400 to 600 nm. Finally, with absorbance values, four absorbance ratios were estimated a quantitative way for identified the sex.

With the biochemical method female gonad produced a pink coloration with the highest absorbance at 555 nm, while male gonads produced a yellow coloration with two peaks with the highest absorbance at 458 nm and 502 nm. The absorbance ratios also helped to differentiate between sexes. The $A_{555}:A_{502}$ (*b* ratio) has the highest precision at 86.27% in contrast with histology that considered 100% precision. The

comparison of $A_{555\text{nm}}:A_{502\text{ nm}}$ ratio with histological results showed that when the ratio was > 1.0 the abalone were female, between 0.6 and 1.0 were undifferentiated and < 0.6 were male, respectively. The specific lipids content in could be the cause of the observed differences between sexes. There were not correlation between absorbance values and the maturity phase of the gonad. This method is useful for abalone sex identification when with the visual methods is not possible and to know precisely the moment when sexual maturation process begins.

Dedicatoria

*A mis padres Ana y Rafael
y mis hermanos Ismael, Rafael,
Ursula y Julio, ¡mis grandes apoyos!*

Hálito mortal

*Yo ya he muerto mil veces,
y volveré a morir otras mil,
he muerto entre flores y cipreses,
en mayo y diciembre, y en el mes de abril;
bajo un árbol, en la húmeda arena,
bajo el rayo del sol, y sin gloria ni pena...*

*Pero habré de volver entre flores,
entre las praderas multicolores...
volveré como un ave, quizás como un pez,
como rana, o ciervo, quizás un ciempiés...*

*Y aunque así retorne, tan adolorido
a un mundo de penas nunca redimido,
templaré mi flecha, clamaré al cielo
y haré que se renueve mi anhelo
de matar la maldad y el encono,
de olvidar la malicia, el odio y el celo
y alabar a Dios en su gloria y trono...*

Herman Hesse

Agradecimientos

A mi comité de tesis por su disposición y las aportaciones a esta tesis.

Dr. Miguel Ángel del Río Portilla

Dr. Jorge Abelardo Cáceres Martínez

Dra. Carmen Guadalupe Paniagua Chávez

Dr. Oscar Sosa Nishizaki

Dra. Rebeca Vásquez Yeomans

A la M. en C. Yanet Guerrero Rentería, Técnico titular del Laboratorio de Histopatología por la capacitación en histología, así como por sus valiosos comentarios, disposición y apoyo.

Al M. en C José Ángel Olivas Valdez por sus recomendaciones técnicas en histología.

A la Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra, por apoyo proporcionado en el Laboratorio de Microalgas del CICESE.

Al Instituto de Sanidad Acuícola (ISA) por el apoyo en equipo.

Al M. en C. Jesús Ortiz por la ayuda técnica brindada en la toma y análisis de imágenes.

Norberto Flores Acevedo, Técnico titular del Laboratorio de Microalgas por el apoyo brindado.

M. en C. Omar Mendoza Porras, Técnico titular del Laboratorio de Genética por el apoyo brindado.

Dr. Manuel Alberto Segovia Quintero por el gran apoyo moral brindado.

A todo el personal del Departamento de Acuicultura.

A CONACYT por la beca proporcionada para este estudio.

A todos mis compañeros. Gracias

CONTENIDO		Página
Resumen español		i
Resumen inglés		iii
Dedicatorias		iv
Agradecimientos		v
Contenido		vi
Lista de Figuras		x
Lista de Tablas		xii
CAPITULO I. Introducción		1
I.1. Generalidades del abulón		1
I.2. Biología reproductiva		2
I.2.1. Sistema reproductivo		2
I.2.2. Ciclo reproductivo		4
I.2.3. Talla o edad de madurez sexual		5
I.3. Identificación del sexo		7
I.3.1. Factores que determinan el sexo		7
I.4. Métodos para determinar el sexo y el grado de madurez sexual		7
I.4.1. Método visual macroscópico		7
I.4.2. Índices gonádicos		8

CONTENIDO (Continuación)		Página
I.4.3. Método histológico		9
I.4.4. Método bioquímico		10
I.5. Importancia del cultivo de abulón en México		11
CAPITULO II. Objetivos		13
II.1. Objetivo general		13
II.2. Objetivos particulares		13
CAPITULO III. Materiales y métodos		14
III.1. Obtención y biometría de los abulones		14
III.2. Identificación del sexo		14
III.2.1. Método visual macroscópico		14
III.2.2. Método histológico		15
III.2.3. Método bioquímico		15
III.3. Determinación de la madurez sexual		17
III.1.1. Método visual		17
III.1.2. Método histológico		17
III.1.3. Método bioquímico		17
CAPITULO IV. Resultados		19
IV.1. Biometría de los abulones		19
IV.2. Identificación del sexo		19

CONTENIDO (continuación)	Página
IV.2.1. Método visual macroscópico	29
IV.2.2. Método histológico	20
IV.2.3. Método bioquímico	23
IV.3. Determinación de la madurez sexual	29
IV.3.1. Método visual macroscópico	29
IV.3.2. Método histológico	30
IV.3.3. Método bioquímico	34
CAPITULO V. Discusión	35
V.1. Talla del abulón y madurez sexual	35
V.2. Identificación del sexo	37
V.2.1. Método visual	37
V.2.2. Método histológico	37
V.2.3. Método bioquímico	38
CAPITULO VI. Conclusiones	40
CAPITULO VII. Literatura citada	41
Apéndices	48

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Distribución del abulón rojo.	2
2	Ubicación de la gónada en el abulón.	3
3	Apéndice cónico mostrando la glándula digestiva (GD) y la gónada (G) del abulón.	9
4	Dirección de los cortes para histología realizados en el apéndice cónico que contiene la glándula digestiva (GD) y la gónada (G) del abulón.	15
5	Vistas macroscópicas de las gónada de abulón rojo.	22
6	Identificación histológica del sexo del abulón rojo.	22
7	Espectros de absorbancia de la reacción TBA y TCA con diferentes tejidos de abulón rojo.	24
8	Espectros de absorbancia de la reacción TBA y TCA con gónada de abulón rojo.	25
9	Espectros de absorbancia de la reacción TBA y TCA con glándula digestiva de abulón rojo indiferenciado.	25
10	Relación de absorbancia a diferentes longitudes de onda de tejido gonádico.	27
11	Relación de absorbancia a diferentes longitudes de onda de glándula digestiva.	28
12	Diferencias macroscópicas en tamaño y grosor de las gónadas de abulón rojo.	31
13	Fases de maduración gonádica en hembras de abulón rojo.	32
14	Fase de maduración gonádica en machos de abulón rojo.	33

LISTA DE FIGURAS (Continuación)

Figura		Página
15	Fase de madurez gonádica en machos de abulón rojo.	33
16	Correlación del grado de madurez sexual y la absorbancia obtenida con el método bioquímico en abulón rojo.	34

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Criterio para determinar el desarrollo gonádico del abulón rojo.	18
II	Biometría de los abulones por clase de talla (mm).	19
III	Precisión de los métodos para identificar el sexo en el abulón rojo.	20
IV	Valores de los índices para la identificación del sexo.	26
V	Identificación del sexo con los índices bioquímicos en abulones de talla menor a 50 mm.	29

Capítulo I

INTRODUCCION

I.1. Generalidades del abulón

Los abulones son moluscos gasterópodos marinos de los más primitivos en forma y estructura pertenecientes a la Familia Haliotidae. Recientes revisiones de la familia Haliotidae la colocan en una nueva relación sistemática, en la nueva sub-clase Orthogastropoda dentro del nuevo orden Vetigastropoda y dentro de la Clase Gastropoda (Harasewych y McArthur, 2003). La principales característica de la familia Haliotidae es la concha en forma de oreja, ovalada y convexa que puede ser altamente arqueada o extremadamente aplanada la cual cuenta con una hilera de perforaciones o poros sobre la cavidad respiratoria. Las estructuras sensoriales están generalmente bien desarrolladas, el cuerpo es aplanado y las masa visceral está contigua a la última espiral de la concha (Cox, 1962).

Existen cerca de 83 especies que habitan en mares templados y tropicales del mundo, la mayor diversidad de especies se encuentra en Australia, Japón, África del Sur, y a lo largo de las costas del Pacífico Noreste. (Geiger y Poppe, 2000). Batimétricamente se localizan desde la zona intermareal hasta profundidades mayores de 400 m (Lindberg, 1992) aunque la mayoría se localiza entre el nivel medio del mar y los 30 m de profundidad (Geiger y Poppe, 2000).

Las principales especies de abulón en México por su abundancia son: *Haliotis rufescens* Swainson, 1822 (abulón rojo), *Haliotis fulgens* Philippi, 1845 (abulón azul) y *Haliotis corrugata* Word, 1828 (abulón amarillo) (Hahn, 1989). De ellas, la especie que se cultiva con mayor éxito en México, es el abulón rojo cuya

distribución va desde la Bahía Sunset, Oregon hasta Bahía Tortugas, Baja California (Fig. 1) y habita en costas rocosas, entre la zona supramareal hasta los 165 m de profundidad. Sus mayores densidades ocurre entre los 6 y 15 m. Usualmente no se encuentran en bahías protegidas, prefieren localidades donde hay una considerable acción de las olas y recambios de agua (Cox, 1962).

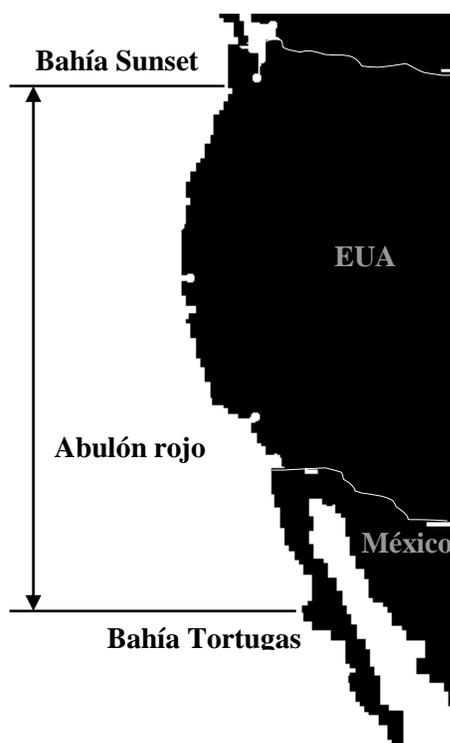


Figura 1. Distribución del abulón rojo, Tomado de Cook 2003.

I.2. Biología reproductiva del abulón

I.2.1. Sistema reproductivo

Se considera que los abulones son organismos dioicos (sexos separados), sin dimorfismo sexual externo. Presentan una sola gónada que ocupa la misma posición en ambos sexos. La gónada forma una capa de tejido cubriendo la glándula digestiva y conformando el apéndice cónico (Tutschulte y Connell, 1981) (Fig. 2). En la

mayoría de los casos, el color de la gónada permite diferenciar los sexos cuando los abulones están maduros, verde en hembras y amarilla en machos (Booolotian *et al.*, 1962).

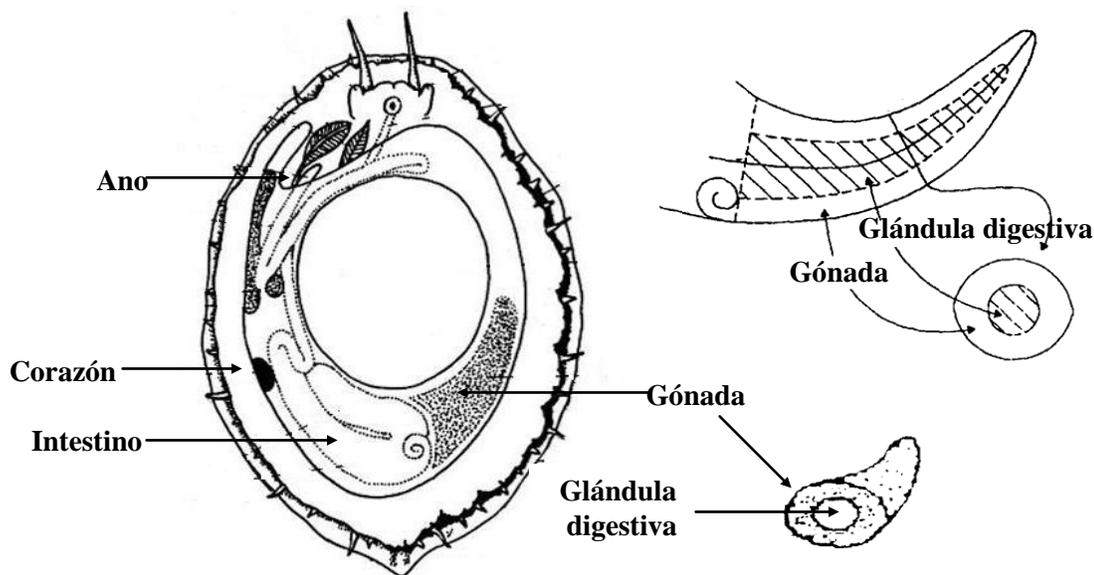


Figura 2. Ubicación de la gónada en el abulón una vez removida la concha (Modificada de Rogers-Bennett *et al.*, 2004)

La pared externa de la gónada es similar en ambos sexos. La pared consiste de una epidermis glandular cubierta por la parte externa por una cutícula delgada y por la parte interna de una pared muscular con tejido conectivo. En hembras maduras, el ovario está compuesto de trabéculas organizadas en forma poligonal compuestas de tejido conectivo y algunas fibras musculares que se proyectan desde la pared externa de la gónada hacia la glándula digestiva. Las trabéculas adjuntas a la pared externa de la gónada sirven de soporte a la gónada. En la parte distal de las trabéculas y en la pared externa del ovario se localizan senos sanguíneos que contiene amebocitos. En la parte interna del ovario se delinea el epitelio germinal donde se desarrollan las ovogonias, con forma cúbica que darán lugar a los ovocitos (Hahn, 1989). En machos maduros, el testículo consiste de tubos de tejido conectivo que se ramifican

desde la pared externa del testículo hacia la pared interior. Los tubos lo cuales están rodeados por el epitelio germinal que dará origen a las espermatogonias y a los espermatozoides (Young y DeMartini, 1970).

Antes y durante el desove la gónada cubre gran parte de la glándula digestiva, el estómago, los órganos renales y el corazón. Durante el desove los gametos son descargados dentro de la cavidad renal derecha y se liberan a través de la abertura renal externa, dentro de la cámara respiratoria y de ahí hacia la columna de agua (Cox, 1962). En el abulón rojo la proporción de sexos se mantiene 1:1 como en la mayoría de las especies y poblaciones de abulón (Young y DeMartini, 1970). Sin embargo, en algunos casos esta proporción puede variar en función de la tasa de crecimiento o mortalidad entre hembras y machos (Tutschulte y Connell, 1981).

I.2.2. Ciclo reproductivo en la gónada

Se denomina ciclo reproductivo a las fases de desarrollo que ocurren en la gónada de un organismo que ya ha alcanzado la madurez sexual. Las fases van desde el reposo hasta la producción de gametos maduros (Ault, 1985). El ciclo reproductivo de un abulón está caracterizado por cinco o seis fases: (1) activación (iniciación de gametogénesis), (2) gametogénesis, (3) incremento en el tamaño de la gónada debido al incremento en número y tamaño de los gametos, (4) desove, (5) reabsorción de gametos no desovados y (6) reposo, sin embargo las fases utilizadas para estudiar el ciclo reproductivo pueden variar dependiendo de la especie y del investigador (Hahn, 1989; Refstie y Gjedrem, 2005). Se considera que la interacción de los factores exógenos (bióticos: densidad de población, presencia del sexo opuesto, presión depredatoria; abióticos: alimento, temperatura, luz, ciclo lunar, corrientes) y endógenos (genéticos y hormonales) determinan el tiempo y duración de cada fase del ciclo reproductivo para una particular especie y zona geográfica (Barber y Blake, 1991).

La maduración de la gónada es un proceso demandante de energía, debido a la movilización de nutrientes hacia ella durante el desarrollo de los gametos. Se considera al alimento y la temperatura del agua como los principales factores exógenos que regulan los ciclos reproductivos en invertebrados marinos (Barber y Blake, 1991). En ausencia de alimento o por debajo de la temperatura de cero biológico, los gametos no se desarrollan (Sastry y Blake, 1971). En abulón rojo la maduración de la gónada está directamente controlada por el nivel alimenticio (Hahn, 1989). Por ejemplo, durante el verano la abundancia de algas cerca de Mendocino, California (fuente de alimento del abulón) está correlacionada con una alta producción de gametos (Giorgi y DeMartini, 1977; Hahn, 1989). En el desove interviene la activación de la prostaglandina endoperóxido sintetasa (Morse *et al.*, 1977) y puede ser inducido por el fotoperiodo y la temperatura del agua (Hahn, 1989).

Sobhon *et al.* (1999) al estudiar el ciclo reproductivo del abulón *Haliotis asinina* encontraron que los machos estaban maduros después de siete u ocho meses de haber desovado mientras que las hembras estaban maduras después de diez u once meses. Por lo que concluyeron que los machos tienden a recuperar la madurez de la gónada más rápido que las hembras.

I.2.3. Talla o edad de madurez sexual

Se considera que el abulón rojo ha alcanzado la madurez sexual cuando ha producido una generación de gametos maduros y tiene la capacidad de desovar (Rogers-Bennett *et al.*, 2004). La determinación de la talla o edad de primera madurez se ha utilizado para conocer el momento en que los organismos de una población se reclutan al grupo reproductor e implementar estrategias de manejo. En acuicultura permite planear la integración de nuevos reproductores a la granja y la obtención de semillas.

Giorgi y DeMartini (1977) estudiaron dos poblaciones de abulón rojo en Mendocino, California. Ellos determinaron la talla mínima de madurez sexual, midieron la fecundidad y monitorearon histológicamente el ciclo reproductivo encontrando que las hembras maduran a menor talla que los machos. El macho maduro más pequeño encontrado fue de 84.5 mm y la hembra madura más pequeña fue de 39.5 mm. Tutschulte y Conell (1981) estudiaron el ciclo reproductivo de tres especies de abulón en California, asumiendo que los abulones hembras con ovocitos en crecimiento y los abulones machos con espermatocitos alcanzarán la madurez sexual en un año. Encontraron que el abulón amarillo (*H. corrugata*) alcanzaba la madurez en 3 años, el abulón azul (*H. fulgens*) a los 5 años y el abulón blanco (*H. sorenseni*) a los 4 años de edad. Ault (1985) estudió algunos aspectos de la reproducción y el crecimiento del abulón rojo recolectado en Mendocino, California y encontraron que los abulones mantenidos en condiciones de laboratorio maduraron a menor talla con relación al estudio de Giorgi y DeMartini (1977) de abulones silvestres. Shepherd *et al.* (1991) estudiaron el crecimiento, la talla de madurez sexual y la fecundidad del abulón azul en Baja California. La talla de primera madurez que encontraron estuvo en el intervalo de 70 a 140 mm y sugirieron que la madurez sexual depende más de la edad que de la talla porque las tasas de crecimiento pueden variar entre sitios. Rogers-Bennett *et al.* (2004) estudiaron la talla de madurez sexual en abulones silvestres del norte de California, y encontraron que las hembras maduraron a mayor talla que los machos. Todos los machos a partir de los 91 mm tuvieron esperma y es hasta que las hembras alcanzan 130 mm (longitud de la concha) que el 100% de los ovocitos están maduros.

I.3. Identificación del sexo

I.3.1. Factores de determinación del sexo

Los moluscos tienen sistemas reproductivos y modos de determinación del sexo diversos, desde organismos dioicos hasta hermafroditas funcionales, incluso en especies del mismo género pueden existir diferencias respecto a la sexualidad (Coe, 1943). El abulón es dioico y de acuerdo con los análisis del cariotipo en *Haliotis cracherodii* (Minkler, 1977), *H. discus hannai* y *H. discus* (Arai *et al.*, 1982), en *H. rufescens* (Gallardo-Escárate *et al.*, 2004) y en *H. fulgens* y *H. corrugata* (Gallardo-Escárate, *et al.*, 2005) no existe evidencia de cromosomas sexuales heteromórficos. Minkler (1977) sugiere que la determinación sexual debe estar determinada a nivel intracromosomal.

Hay factores ambientales que pueden afectar la anatomía sexual en moluscos, Castagna y Kraeuter (1994) encontraron que al mantener a machos de caracol *Busycon* durante varios años en condiciones de laboratorio se podría ver reducida la talla del pene. Además en el caracol *Neptunea antiqua* (Mollusca: Prosobranchia), una especie dioica se observó que los químicos como la tributiltina de las pinturas “anti-fouling” provocaron el fenómeno de “*imposex*”, el consiste en que las hembras desarrollan vasos deferentes y pene (Power y Keegan, 2001). Jenner (1979) denominó como pseudohermafroditismo cuando se presentan cambios en el fenotipo que son provocados por el ambiente.

I.4. Métodos para identificar el sexo y el grado de madurez sexual

I.4.1. Método visual

Cuando los abulones presentan gónada se puede diferenciar el sexo observando su color. La gónada de los abulones hembras es color verde oscuro y la de los machos es color amarillo pálido. La presencia del color café indica la carencia de

gónada, observándose sólo la glándula digestiva (Booolootian *et al.*, 1962). Al inicio de la diferenciación sexual las coloraciones antes mencionadas no son intensas, y la gónada solo es una ligera capa de tejido traslúcido. La gónada madura representa del 15 al 20% del peso corporal del abulón (Hahn, 1989).

I.4.2. Índices gonádicos

El ciclo reproductivo también puede ser evaluado individualmente utilizando algún índice gonádico que considere el desarrollo gonadal a partir de evaluar el peso o porcentaje de la gónada respecto al peso o talla del animal (Hahn, 1989).

El índice gonádico (IG) es el más simple y su cálculo se basa en el peso húmedo o seco de la gónada en relación al peso húmedo o seco del abulón. Este índice asume que una gónada inmadura o desovada es pequeña y una gónada madura es grande. Esto no es válido en todas las especies de abulón como el caso del abulón rojo.

$$IG = \frac{\text{Pesode la gónada}}{\text{Pesodel cuerpo}} \quad (1)$$

El índice gonádico volumétrico (IGV) calcula el porcentaje de la gónada en el apéndice cónico y se considera mejor que el IG ya que considera la variación en tamaño de la glándula digestiva.

$$IGV = \left(\frac{\text{Área de la gónada}}{\text{Área del apéndice cónico}} \right) \times 100 \quad (2)$$

El índice gonádico volumétrico de Tutschulte y Connell (IGV_{TC}) calcula un estimado del volumen de la gónada (EVG) asumiendo que toda la gónada está contenida en un apéndice cónico (Fig. 3).

$$EVG = \frac{\pi h}{96} \times \left[8(x+y)^2 - \frac{(x+y+a+b)^3}{x+y} \right] \quad (3)$$

$$IGV_{TC} = \frac{EGV}{\text{Pesocorporal}} \quad (4)$$

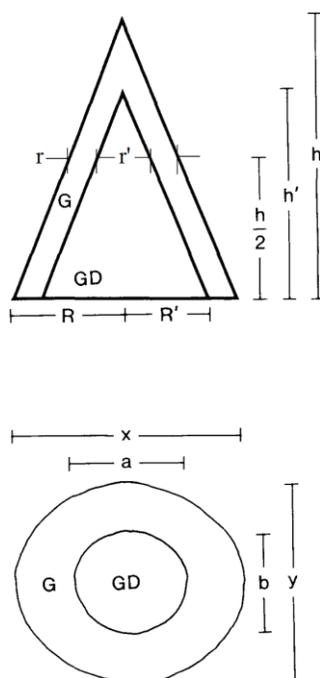


Figura 3. Apéndice cónico mostrando la glándula digestiva (GD) y la gónada (G) del abulón; h =altura del apéndice cónico; h' =altura de la glándula digestiva; $h/2$ = punto medio del apéndice cónico; R =radio del apéndice cónico; R' =radio de la glándula digestiva. a =ancho de la glándula digestiva; b =alto de la glándula digestiva; x =ancho del apéndice cónico; y =alto del apéndice cónico.

I.4.3. Método histológico

La histología es un procedimiento práctico para evidenciar la estructura de los elementos anatómicos de los organismos. Este procedimiento está compuesto de 6 pasos: (1) Toma de la muestra, (2) Fijación, (3) Inclusión, (4) Microtomía, (5) Tinción y (6) Montaje y observación al microscopio. Una vez tomada la muestra la

fijación provoca la muerte de las células de tal manera que los tejidos conservan lo mejor posible las características morfológicas y químicas que tuvieron en estado vivo. La inclusión conserva los tejidos en el interior de alguna sustancia, como la parafina que penetra hasta lo más interno de la estructura celulares, para que los tejidos adquieran tal consistencia que se pueden cortar en láminas delgadas. La microtomía permite cortar el tejido ya incluido en parafina y adherirlo a un portaobjetos para llevar a cabo la tinción. La tinción colorea los diferentes componentes celulares y tisulares para facilitar la observación (Estrada *et al.*, 1982; Gaviño, *et al.*, 1985).

Mediante la histología se determina el sexo observando la presencia de las células germinales específicas de cada sexo. Para el estudio del ciclo reproductivo se han utilizado diferentes criterios. Ault (1985) describió el proceso de maduración gonádica para hembras de abulón rojo con las siguientes fases: (1) Preproliferativo, (2) Proliferativo, (3) Nuevo tallo, (4) Viejo tallo y (5) Liberación. Capinpin *et al.* (1998) utilizaron un criterio similar para describir el desarrollo gonadal del abulón *Haliotis asinina* e incluyeron la descripción para los machos, las fases que ellos utilizaron fueron: (1) Preproliferativo, (2) Proliferativo, (3) Madurando, (4) Maduro, (5) Parcialmente desovado y (6) Desovado.

Los criterios de clasificación en las diferentes fases se basan en la ausencia o presencia de células germinales, en la forma, tamaño y cantidad de éstas, así como en la estructura que presentan dentro de la gónada. Por lo tanto, la examinación histológica de las secciones de la gónada del abulón provee información más detallada sobre el estado de madurez de los abulones que la examinación visual o los índices gonádicos por sí solos (Hahn, 1989).

I.4.4. Método bioquímico

En algunos moluscos bivalvos y equinodermos marinos se ha demostrado la existencia de ciclos de almacenamiento y utilización de energía denominados ciclos

bioquímicos. En algunas especies se da una variación estacional en la composición bioquímica de los órganos (Litaay y De Silva, 2003). En varios estudios se ha comprobado que durante el ciclo reproductivo en diferentes especies de moluscos se producen cambios en la composición bioquímica como resultado del almacenaje y transformación de energía, indicando que las reservas lipídicas son usadas principalmente durante la gametogénesis (Zandee, *et al.*, 1980; Gabbott, 1983; Jabbar y Davies, 1987; Littaay y De Silva, 2003; De la Parra *et al.*, 2005). Las fluctuaciones en el contenido lipídico en el órgano digestivo y en las gónadas coinciden con el ciclo reproductivo en las especies *Ensis arcuatus* (Darriba *et al.*, 2005), *Pecten sulciocostatus* (Arendse *et al.*, 2008), *Fulvica mutica* (Liu *et al.*, 2008), *Paracentrotus lividus* (Montero-Torreiro, 2000), *Haliotis rubra* (Litaay y De Silva, 2003).

El ácido tiobarbitúrico (TBA, por sus siglas en inglés) se ha usado para medir la peroxidación lipídica y poder evaluar los cambios en la composición bioquímica de los tejidos (Montero-Torreiro, 2000). Por lo tanto, con el método bioquímico se puede identificar el sexo detectando el diferencial en las reservas lipídicas del apéndice cónico (glándula digestiva-gónada) existente entre los abulones indiferenciados, las hembras y los machos. El método tiene como base la degradación de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAS, por sus siglas en inglés) en malonildialdehído (MDA), el cual al reaccionar con un agente cromógeno en condiciones ácidas y calientes produce un cromóforo (complejo coloreado) y un patrón absorbancia específico (medido en un espectrofotómetro de luz visible) para cada sexo (Jabbar y Davies, 1987; Montero-Torreiro, 2000).

I.5. Importancia del cultivo de abulón

Las poblaciones naturales de abulón ha disminuido a nivel mundial debido, entre otras causas, a la sobreexplotación (Karpov *et al.*, 2000). Tales declines en la producción y sus altos precios en el mercado, han provocado el interés en el cultivo

de abulón en varios países (Elliott, 2000). En México, el abulón es uno de los moluscos con mayor importancia comercial y es Baja California la única entidad productora. Como se mencionó anteriormente el abulón azul, el abulón amarillo y el abulón rojo, son los de mayor importancia. Éste último es la especie que sostiene el cultivo y se estimó una producción de 22.458 toneladas con un valor de \$ 4, 677,499 pesos para el año 2007 (SAGARPA, 2008).

Elliot (2000) menciona que explotando el potencial biológico del abulón mediante programas de mejoramiento genético, se puede obtener una tasa de crecimiento mayor, incrementar la fecundidad, así como modificar la talla de madurez sexual según se requiera en el cultivo. Por lo tanto, considerando que el éxito en el cultivo depende en gran medida de la crianza selectiva y el conocimiento de los aspectos reproductivos en estos sistemas, se realizó este estudio donde se comparan diferentes métodos como herramientas de selección para la identificación del sexo así como un análisis del desarrollo gonadal de abulón rojo *H. rufescens* perteneciente a un sistema de cultivo comercial. La comparación de estos métodos permitirá definir criterios para su mejor utilización práctica en el cultivo de abulón.

Capítulo II

OBJETIVOS

II.1. Objetivo general

Identificar el sexo y comparar el desarrollo gonadal del abulón rojo *Haliotis rufescens* en cautiverio utilizando diversos métodos.

II.2. Objetivos particulares

II.2.1. Identificar el sexo del abulón mediante los métodos visual, histológico, y bioquímico.

II.2.2. Determinar si existe alguna correlación en la identificación del sexo obtenido por los diversos métodos.

II.2.3. Cuantificar el grado de madurez sexual.

II.2.4. Determinar si existe alguna correlación entre el grado de madurez obtenido por los diversos métodos.

Capítulo III

MATERIALES Y MÉTODOS

III.1. Obtención y biometría de los abulones

Se obtuvieron abulones rojos *H. rufescens* de la granja “Abulones Cultivados S.A. de C.V” del Ejido de Eréndira, Baja California (31°24'N; 16°24'O), a 85 km al Sur de la ciudad de Ensenada. Los abulones se transportaron a las instalaciones del Departamento de Acuicultura del CICESE en Ensenada, Baja California. Se analizaron 151 abulones rojos entre 20 y 77 mm (longitud de la concha). Los abulones se clasificaron dentro de cuatro clases de talla: (A) 20-30 mm, (B) 30-40 mm, (C) 40-50 mm y (D) 60-80 mm. Todos los abulones se marcaron y se les midió el largo de la concha y su peso total.

III.2. Identificación del sexo

III.2.1. Método visual macroscópico

Se identificó el sexo observando la coloración de la gónada del abulón. Primero, se levantó el pie del lado opuesto a los poros respiratorios para exponer la gónada, posteriormente si la gónada era verde se registró el sexo del abulón como hembra, si la gónada era amarilla como macho y si era café como indiferenciado. Se analizaron 90 abulones con talla de 20 mm a 50 mm y 60 abulones con talla de 60 mm a 80 mm y se obtuvo la proporción de sexos. Para la estimar la precisión del método sólo se utilizaron 52 abulones con talla mayor a 60 mm, de los cuales se tenía resultados en todos lo métodos.

III.2.2. Método histológico

A todos los abulones se les realizó la disección del apéndice cónico, que contiene la glándula digestiva y la gónada (Fig. 4) y se fijaron en solución Davidson. Posteriormente, los apéndices de las clases de talla A, B y C, se cortaron en secciones longitudinales y la clase D en secciones transversales. Las muestras fueron deshidratadas con alcohol, embebidas en parafina, seccionadas a 5 μm , montadas y teñidas con hematoxilina y eosina (Apéndice 1). El sexo se determinó observando la presencia de gametos femeninos o masculinos.

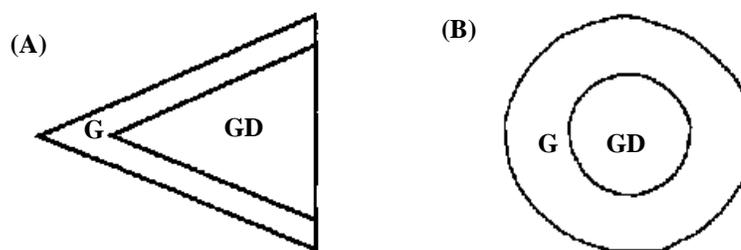


Figura 4. Dirección de los cortes para histología realizados en el apéndice cónico que contiene la glándula digestiva (GD) y la gónada (G) del abulón. A. Corte longitudinal. B. Corte transversal (Hahn, 1989).

La proporción de sexos en la clase D se obtuvo analizando un total de 60 abulones, sin embargo, como se mencionó anteriormente, solamente se usaron a 52 abulones para estimar la precisión de los otros métodos y la precisión de este método se consideró del 100% (Tabla IV).

III.2.3. Método bioquímico

Para conocer si era posible determinar el sexo con el método se procesaron abulones de las clases A, B, C y D, a cada abulón se le tomó una biopsia entre 20 y 50 mg de manto, branquia, músculo, glándula digestiva y gónada. Cada muestra se

colocó individualmente en tubos de plástico para microcentrífuga de 2 ml. A cada tubo se le agregaron 1.5 ml de ácido tricloroacético al 20% (TCA, PM=163.4) y 0.375 ml de ácido tiobarbitúrico al 0.75% (TBA, PM=144.1). Se agitaron los tubos con un vórtex y se colocaron en un bloque de calentamiento a 90 °C de 20 a 30 minutos hasta que la alícuota desarrolló coloración (Modificado de Jabbar y Davies, 1987). Para la valoración semicuantitativa de la diferenciación sexual, las muestras se enfriaron y se les realizó una centrifugación a 2.3 g (5000 rpm) durante 3 minutos.

El sobrenadante se colocó en una celda y se escaneó sobre un intervalo de longitud de onda de 400 a 600 nm cada 1 nm, en un espectrofotómetro HACH DR/4000 modelo 48000U. Se registró el espectro de absorbancia para cada muestra y se comparó el patrón de absorbancia observado entre tejidos y entre sexos.

Los valores de absorbancia fueron usados para calcular cuatro índices para encontrar el tejido y los valores que permitieran identificar el sexo en abulones indiferenciados. Se utilizaron las longitudes de onda donde se observaron los picos de mayor absorbancia en hembras y en machos. En los abulones indiferenciados de las clases A, B y C se usaron los valores de absorbancia de la reacción de TBA y TCA con glándula digestiva.

$$a = \frac{\text{Abs } 458 \text{ nm}}{\text{Abs } 502 \text{ nm}} \quad (5)$$

$$b = \frac{\text{Abs } 555 \text{ nm}}{\text{Abs } 502 \text{ nm}} \quad (6)$$

$$c = \frac{\text{Abs } 458 \text{ nm}}{\text{Abs } 555 \text{ nm}} \quad (7)$$

$$d = \frac{\text{Abs } 555\text{nm}}{\text{Abs } 458\text{nm}} \quad (8)$$

Con fines de comparación se procesaron muestras de hembras y machos de abulón azul y amarillo utilizando el método bioquímico.

III.3. Determinación de la madurez sexual

III.3.1. Método visual macroscópico

Para la madurez se clasificaron los abulones de acuerdo al área de la glándula digestiva cubierta por gónada. Se utilizaron cuatro niveles: 25%, 50%, 75% y 100% del área cubierta, los cuales están asociados a diferentes grados de madurez sexual en la descripción histológica y se compararon con los resultados obtenidos con el método histológico (Ver tabla I).

III.3.2. Método histológico

Se evaluó el desarrollo gonádico presente en cada muestra para estimar la madurez sexual en cada abulón. El criterio utilizado para describir el desarrollo gonádico fue el criterio empleado por Capinpin *et al.* (1998), que consiste de seis fases: (1) Preproliferativo, (2) Proliferativo, (3) Madurando, (4) Maduro, (5) Parcialmente desovado y (6) Desovado (Tabla I).

III.3.3. Método bioquímico

Para determinar si existe alguna asociación entre la absorbancia y el grado de madurez sexual se correlacionó la absorbancia a los 555 nm en hembras, y a los 458 nm y a los 502 nm en machos respecto a la madurez sexual.

Tabla I. Criterio para determinar el desarrollo gonádico del abulón rojo (Capinpin *et al.*, 1998)

Fase	Gónada en hembras	Gónada en machos
Preproliferativo	La gónada es inmadura caracterizada por poco o ningún epitelio germinal entre la epidermis y la glándula digestiva.	
Proliferativo	Epitelio germinal escamoso. Las células germinales crecen desde la trabécula. Ovogonias de forma cuadrada miden de 5 y 8 μm y alcanzan hasta las 25 μm . Las ovogonias forman grupos sobre las paredes de la trabécula. Tejido ovárico cubriendo un cuarto de la GD.	Epitelio germinal escamoso. Las células germinales crecen desde los túbulos del tejido conectivo. Las espermatogonias de forma cuadrada y miden $\sim 5 \mu\text{m}$. Tejido testicular cubre un cuarto de la GD.
Madurando	Al inicio ovocitos primarios, miden $\sim 25 \mu\text{m}$. La vitelogénesis se inicia en esta fase. Al final, ovocitos mayores de 50 μm se extienden desde la trabécula hacia la glándula digestiva, cada uno adjunto en forma entallada y de gota. Tejido ovárico cubre la mitad de la GD.	Estado de gametogénesis temprana alrededor de los túbulos. Una delgada membrana de espermatidas o espermatozoides puede estar presente. Tejido testicular cubre la mitad de la GD.
Maduro	Ovocitos $> 125 \mu\text{m}$. Los ovocitos libres de la trabécula tienen diámetro medio de 150 μm . Es común una ligera proliferación de ovocitos $< 25 \mu\text{m}$ cerca de la pared de la gónada. Tejido ovárico cubre más de la mitad de la GD.	La gónada está densamente ocupada con espermatozoides. Pueden estar presentes pocos estados gametogénicos tempranos alrededor de los túbulos. Tejido testicular cubre toda la GD.
Parcialmente desovado	Se reduce la cantidad de ovocitos maduros, el lumen está parcialmente colapsado, las trabéculas dobladas. Ovocitos necróticos en el área contigua a la glándula digestiva. El primer signo de necrosis ocurre en el núcleo, la cromatina se vuelve eosinofílica, menos granular y distribuida uniformemente y la membrana nuclear se rompe desaparece el núcleo. Se forman vacuolas y masas eosinofílicas.	Espacios alrededor de los túbulos y otras áreas siguen densamente ocupadas por espermatozoides. No hay evidencia de necrosis en los espermatozoides residuales.
Desovado	La gónada carece de gametos maduros y tiene ligera actividad gametogénica. El lumen se colapsa con los túbulos o las trabéculas dobladas. Un ovario puede tener pocos ovocitos residuales.	

GD=glándula digestiva

Capítulo IV

RESULTADOS

IV.1. Biometría de los abulones

La distribución de las tallas (longitud de la concha) estuvo en el intervalo de 21.98 mm a 77.32 mm, y la distribución del peso total en el intervalo de 1.54 g a 58.55 g. La talla promedio en la clase A fue de 27.45 mm, en B de 34.28 mm, en C de 46.92 mm y en D de 69.87 mm (Tabla II).

Tabla II. Biometría de los abulones por clase de talla (mm).

	Media	Mínimo	Máximo	DE
A (n=28)	27.45	21.98	29.88	1.92
B (n=31)	34.19	30.40	40.00	1.90
C (n=32)	46.82	43.50	50.00	1.88
D (n=60)	69.87	65.78	77.32	2.77

DE=desviación estándar

IV.2. Identificación del sexo

IV.2.1. Método visual

De los 91 abulones pertenecientes a las clases de talla A, B y C ningún abulón presentó tejido gonádico, todos fueron visualmente indiferenciados. En la clase D, se identificaron 31 hembras y 27 machos con una proporción de 1:87. De las 30 hembras, los 21 machos y un indiferenciado utilizados para estimar la precisión se identificaron correctamente a 28 hembras y 20 machos (Fig. 5) con una precisión de 94.12% respecto al método histológico (Tabla. III).

IV.2.2. Método histológico

Se identificó el sexo observando la ausencia o presencia de gametos. Las diferencias entre los gametos de hembras y machos se apreciaron fácilmente mediante histología (Fig. 6). De los 64 abulones examinados mediante histología, pertenecientes a las clases de talla A, B y C, sólo siete abulones mostraron tejido gonadal diferenciado siendo todas hembras, la hembra de menor talla fue de 26.90 mm. Para la clase D, se encontró un indiferenciado, 33 hembras y 26 machos. La hembra de menor talla fue de 66.28 mm y el macho de menor talla fue de 65.78 mm. Sólo se utilizaron 30 hembras y 21 machos para estandarizar la comparación entre los métodos, que fueron a los abulones donde se tenían resultados de todos los métodos.

Tabla III. Precisión de los métodos para identificar el sexo en el abulón rojo.

Método	H +	M +	I +	H -	M -	I -	Precisión H	Precisión M	Precisión total
Histología	30	21	1	0	0	0	100.00	100.00	100.00
Visual	28	20	0	1	2	1	93.33	95.24	94.12
Bioquímico									
Cromóforo	26	16	0	2	2	6	86.67	76.19	82.35
Espectro	18	12	0	3	2	17	60.00	57.14	58.82
Índice a	16	12	1	0	0	23	53.33	57.14	54.90
Índice b	27	17	0	1	0	7	90.00	80.95	86.27
Índice c	21	18	1	0	0	12	70.00	85.71	76.47
Índice d	26	17	1	0	0	8	86.67	80.95	84.31

H=hembras; M=machos; I=indiferenciados; + correctos, - incorrectos

**A****B****C**

Figura 5. Vistas macroscópicas de las gónadas de abulón rojo. A. Gónada de una hembra de 70.28 mm. B. Gónada de un macho de 69.14 mm. C. Gónada de un abulón indiferenciado de 69.00 mm.

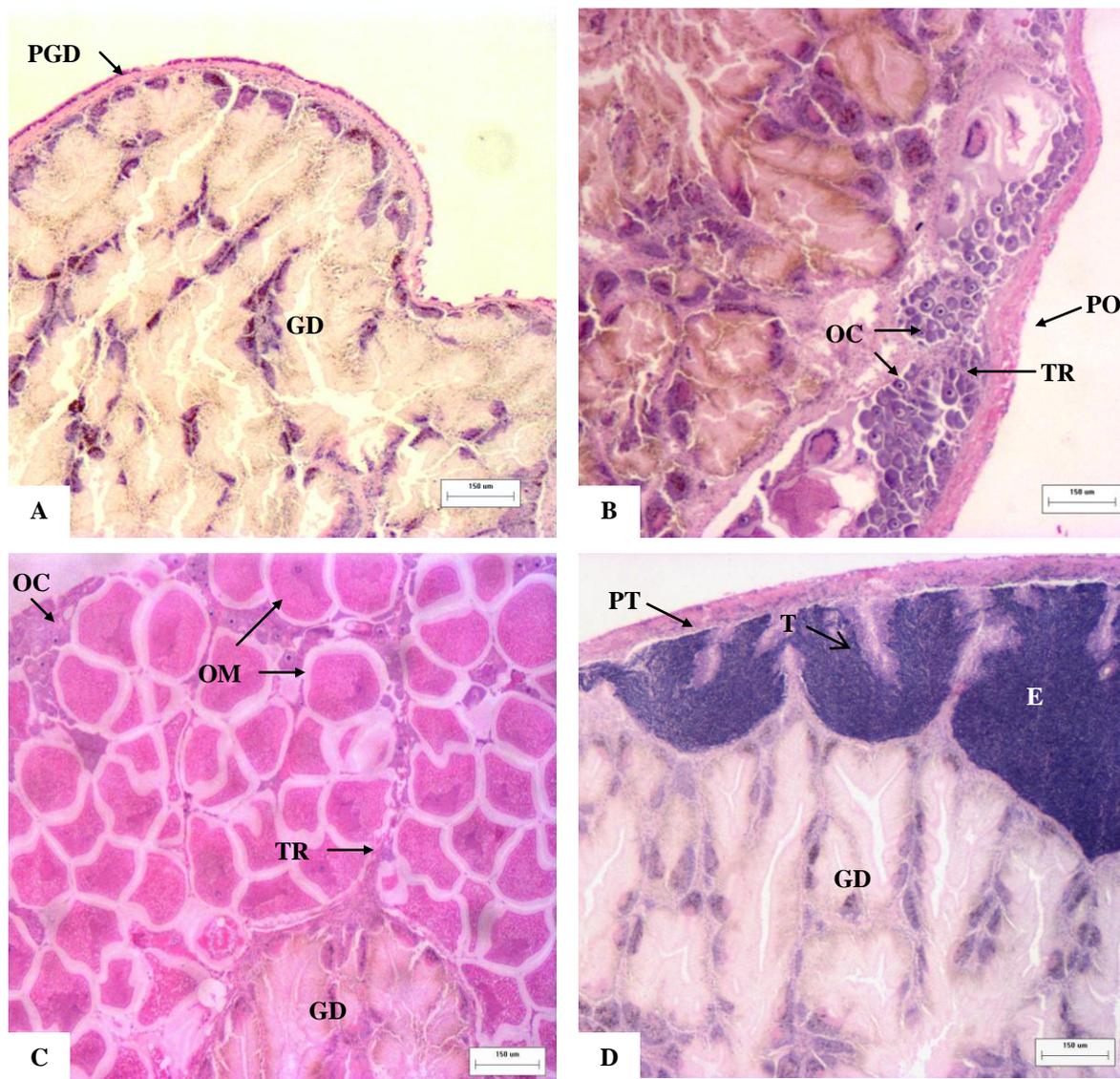


Figura 6. Identificación histológica del sexo del abulón rojo. A. Corte longitudinal de un abulón indiferenciado (talla de 32.80 mm). B. Corte transversal de un abulón hembra (talla de 68.56 mm) con ovocitos en crecimiento. C. Corte Transversal de un abulón hembra (talla 71.66 mm) con ovocitos maduros. D. Corte Transversal de una gónada madura de un abulón macho (Talla 70.88 mm). PGD: pared de la glándula digestiva; GD: glándula digestiva; PO: pared del ovario; OC: Ovocito en crecimiento; TR: trabécula; OM: ovocito maduro; PT: pared del testículo; T: túbulo; E: espermias. Esc=150 µm

IV.2.3. Método bioquímico

En los tejidos del manto, el músculo, la branquia y la glándula digestiva el cromóforo desarrollado fue de color anaranjado y el espectro de absorbancia presentó el mismo patrón sin haber diferencias entre sexos, todos tuvieron un pico de mayor absorbancia a los 530 nm (Fig. 7). En la reacción con tejido gonádico si hubo diferencias, se produjeron dos cromóforos, las alícuotas se colorearon amarillas o rosas, sin colores intermedios en abulones sexualmente diferenciados. El cromóforo rosa que se desarrolló en abulones hembras se asoció con un pico de mayor absorbancia a los 555 nm (Apéndice 2, Fig. A2.1), mientras que el cromóforo amarillo que se desarrolló en abulones machos se asoció con dos picos de mayor absorbancia el primero a los 458 nm y el segundo a los 502 nm (Apéndice 2, Fig. A2.2) (Fig. 8). Con tejido gonádico, ovocitos y espermias liberados sí se pudo identificar el sexo (Apéndice 2, Fig. A2.3 y Fig. A2.4).

En hembras de abulón azul el pico de mayor absorbancia fue a los 555 nm (Apéndice 2, Fig. A2.5), mientras que las hembras de abulón amarillo el pico fue a los 560 nm (Apéndice 2, Fig. A2.6). En los machos de abulón azul y de abulón amarillo, los picos de mayor absorbancia también se observaron en las mismas longitudes de onda, a los 458 nm y 502 nm (Apéndice 2, Fig. 2.7 y Fig. 2.8).

En algunas reacciones con glándula digestiva de los abulones sexualmente indiferenciados de las clases A, B y C se presentó la coloración rosa y/o el espectro de absorbancia característico de los abulones hembras, con el pico de mayor absorbancia a los 550 nm (Fig. 9) a diferencia del resto que presentó el cromóforo anaranjado con el pico de mayor absorbancia a los 530 nm.

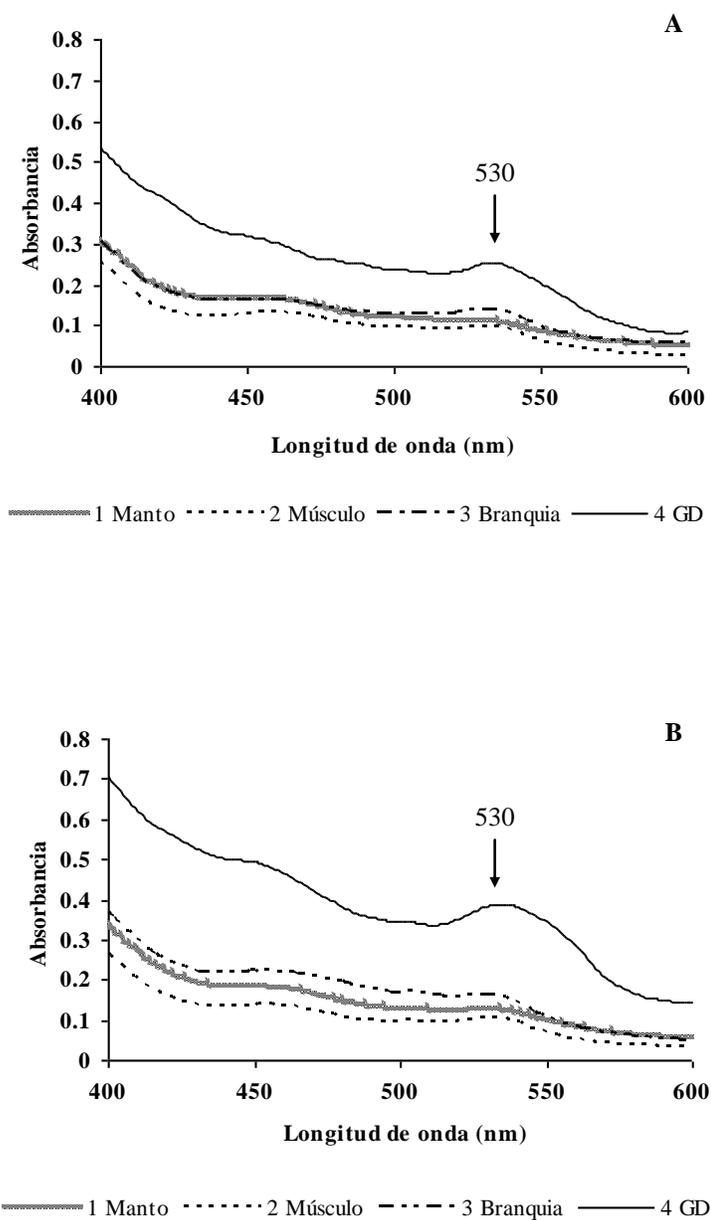


Figura 7. Espectros de absorbancia de la reacción TBA y TCA con diferentes tejidos de abulón rojo. A. hembras B. machos.

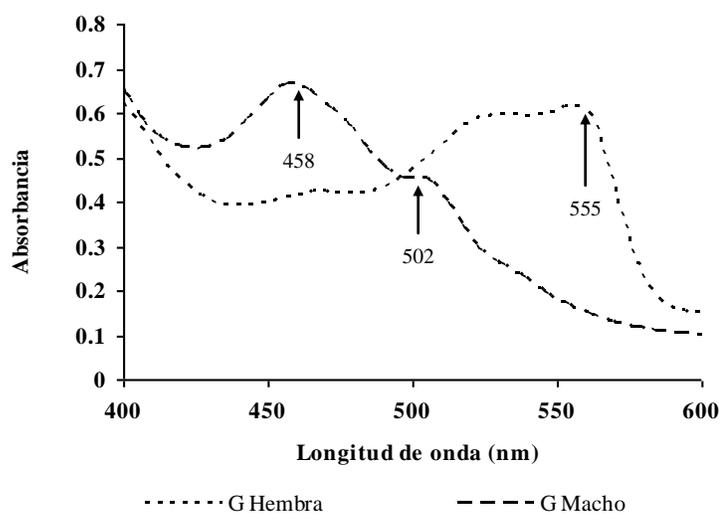


Figura 8. Espectros de absorbancia de la reacción TBA y TCA con gónada de hembras y machos de abulón rojo.

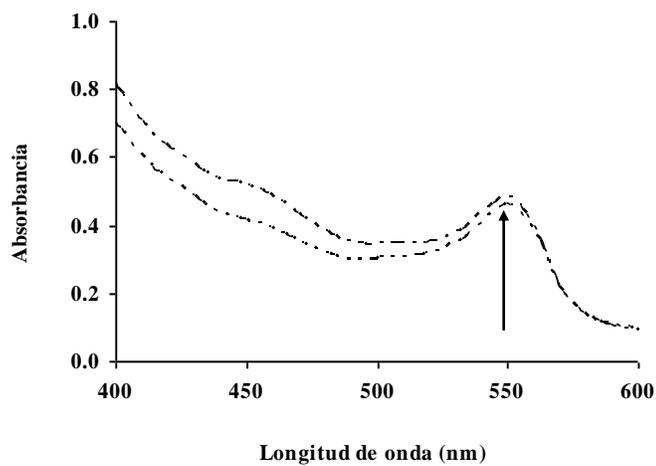


Figura 9. Espectros de absorbancia de la reacción TBA y TCA con glándula digestiva de abulones rojos indiferenciados que presentaron el cromóforo rosa. El pico de mayor absorbancia presenta un desplazamiento hacia los 550 nm.

El resultado de graficar la relación de las absorbancias en las longitudes de onda usadas en cada índice bioquímico con las muestras de glándula digestiva y gónada, confirmó que sólo la gónada es útil para la identificación del sexo con éste método. Al utilizar la gónada se observa que los valores se agrupan de acuerdo con el sexo de los abulones (Fig. 10), contrario a cuando se emplea glándula digestiva (Fig. 11). Los valores máximos y mínimos de los índices de la reacción con glándula digestiva se usaron como los valores límites al trazarlos utilizando como origen el cero al momento de graficar. Cuando los valores de los índice se analizaron con respecto al sexo se corroboró que si hubo diferencia altamente significativa ($F=40.07$, $p<0.001$) entre sexos en todos los índices. Posteriormente se elaboró una tabla para la identificación del sexo (Tabla IV).

Tabla IV. Valores de los índices para la identificación de sexo.

Índices	Sexo		
	H	I	M
<i>a</i> (Abs_{458}/Abs_{502})	<1.0	1.0-1.6	>1.6
<i>b</i> (Abs_{555}/Abs_{502})	>1.0	0.6-1.0	<0.6
<i>c</i> (Abs_{458}/Abs_{555})	<1.0	1.0-2.0	>2.0
<i>d</i> (Abs_{555}/Abs_{458})	>0.9	0.4-0.9	<0.4

H=hembra; I=indiferenciado; M=macho

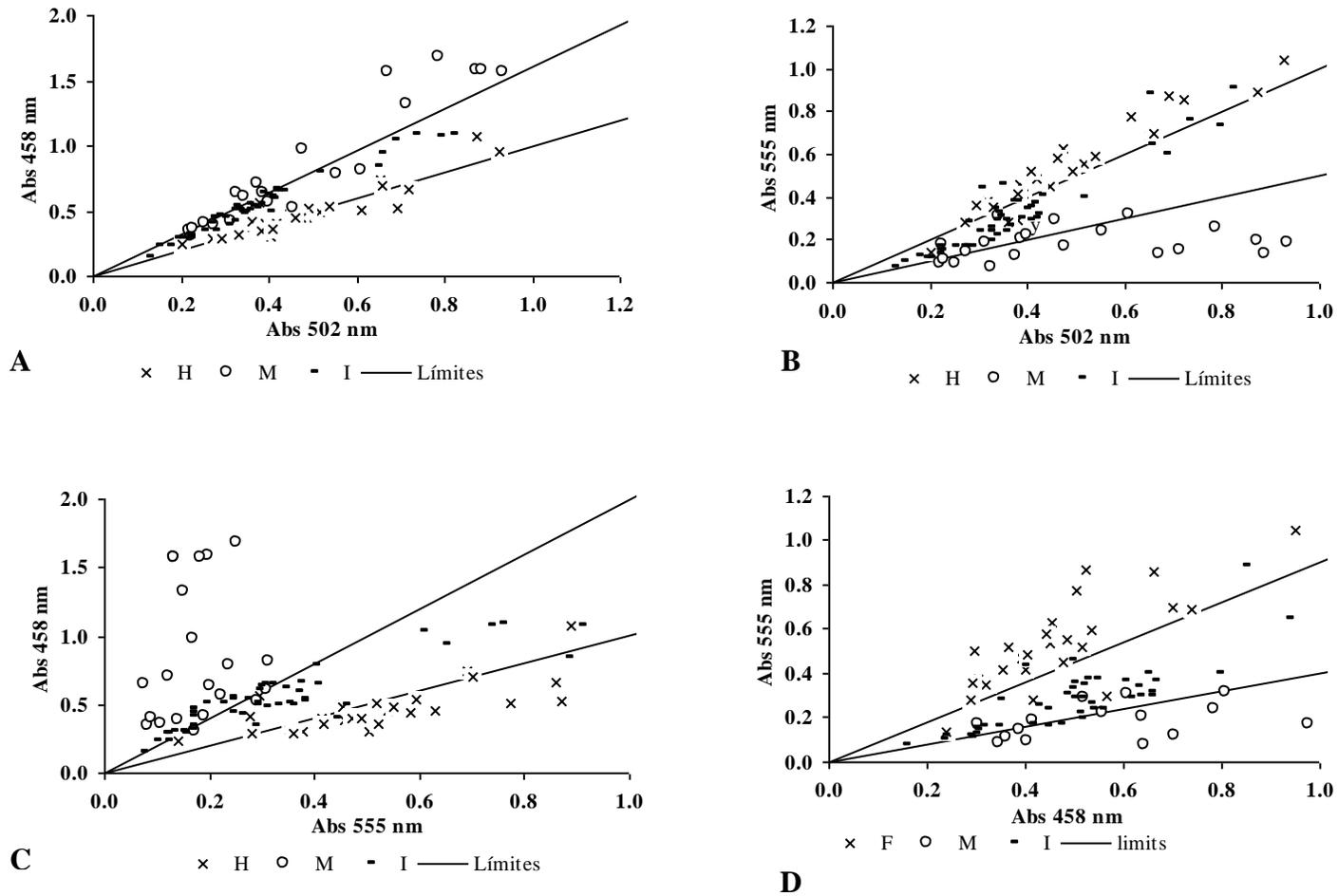


Figura 10. Relación de absorbancia a diferentes longitudes de onda de tejido gonádico. A. Abs_{458}/Abs_{502} (Índice a). B. Abs_{555}/Abs_{502} (Índice b). C. Abs_{458}/Abs_{555} (Índice c). D. Abs_{555}/Abs_{458} (Índice d).

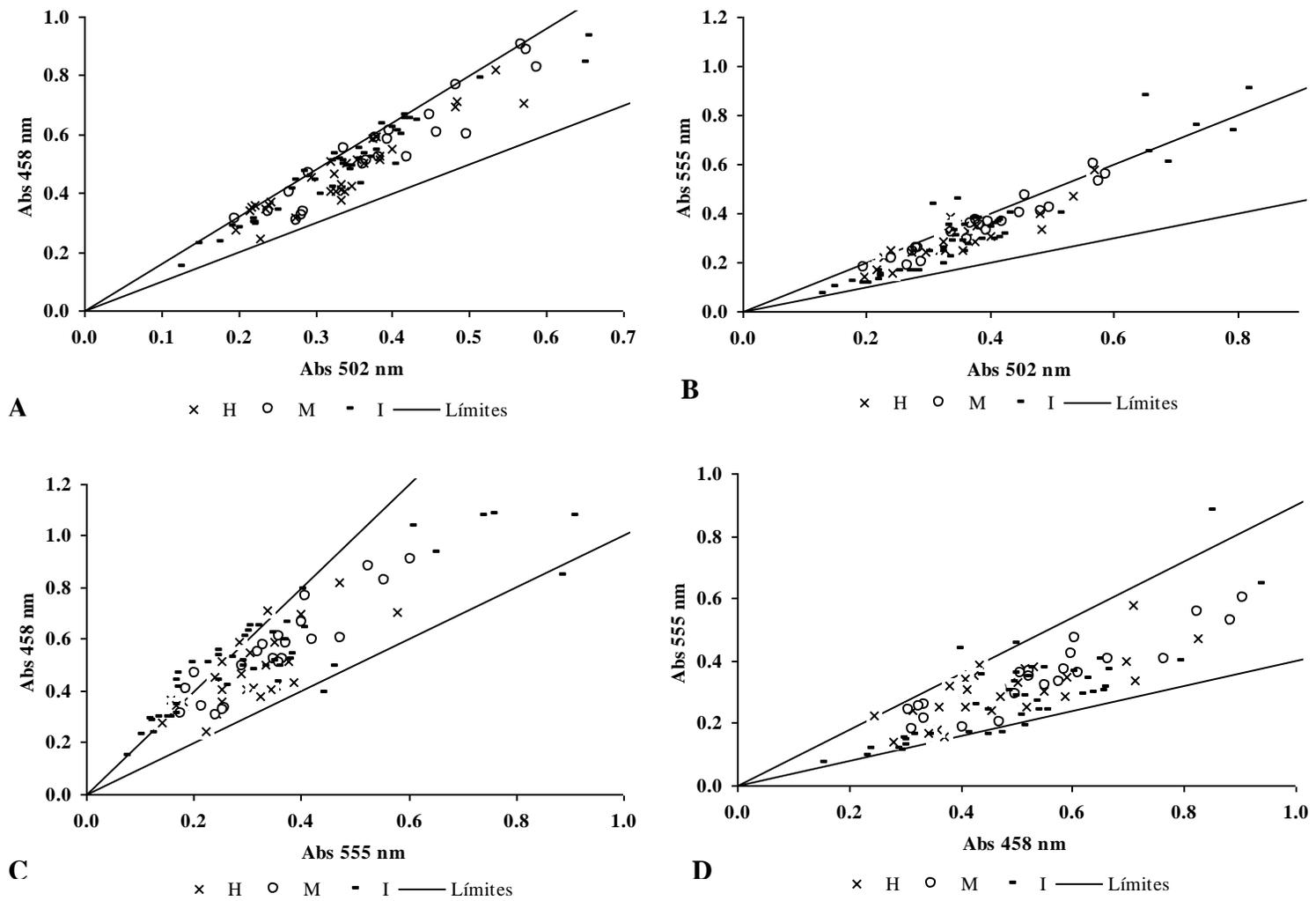


Figura 11. Relación de absorbancia a diferentes longitudes de onda de glándula digestiva. A. Abs_{458}/Abs_{502} (Índice a). B. Abs_{555}/Abs_{502} (Índice b). C. Abs_{458}/Abs_{555} (Índice c). D. Abs_{555}/Abs_{458} (Índice d).

De las 30 abulones hembras y 21 abulones machos de la clase D, con el índice *a*, se pudieron identificar correctamente a 16 hembras y 12 machos; con el índice *b*, a 27 hembras y 17 machos; con el índice *c* a 21 hembras y 18 machos; con el índice *d* a 26 hembras y 17 machos. La precisión total para identificar el sexo de los índices *a*, *b*, *c* y *d* fue de 54.90%, 86.27%, 76.47% y 84.31 % respectivamente (Tabla III).

De los abulones utilizados en el método bioquímico, los de la clase A y B todos fueron visual e histológicamente indiferenciados, y en la clase C solo se detectaron 3 hembras mediante histología, sin embargo al utilizar los índices se asignó el sexo de a un mayor número de abulones (Tabla V).

Tabla V. Identificación del sexo con los índices bioquímicos en abulones de talla menor a 50 mm.

	Clases de talla			Total
	A	B	C	
H	0	5	7	12
M	9	4	5	18
I	6	6	3	15

H=hembras; M=machos; I=indiferenciados

IV.3. Determinación de la madurez sexual

IV.3.1. Método visual

En las clases de talla A, B y C todos los abulones carecían de tejido gonádico por los que se consideraron abulones inmaduros. En el grupo D, se observó el área de la glándula digestiva cubierta por gónada. El 67% de la hembras tuvo entre tres cuartos y la totalidad de la glándula digestiva cubierta por gónada, el 8% tuvo dos cuartos cubiertos y el 25% restante sólo un cuarto cubierto. El 46% de los machos tuvo la totalidad de la glándula digestiva cubierta por gónada, el 29% entres dos y tres cuartos cubiertos y el 25% un cuarto cubierto (Fig. 12). Sin embargo al asignarle la fase de madurez que indica la tabla I tomando en cuenta sólo el área de la glándula

digestiva cubierta por gónada y compararlo con la fase de madurez determinada por el método histológico, las fases de maduración no son las mismas.

IV.3.2. Método histológico

Para las clases de talla A y B los abulones estuvieron en el estado preproliferativo de madurez sexual, donde la gónada estuvo inmadura y no hubo formación de epitelio germinal entre la epidermis y la glándula digestiva (Fig. 13A). En el grupo C hubo 7 hembras en estado proliferativo, presentaron epitelio germinal con crecimiento de las ovogonias con forma cúbica midiendo alrededor de 25 μm (Fig. 13B) y el resto estuvo en el estado preproliferativo. En el análisis histológico de los abulones hembras de la clase D, hubo cinco hembras (17%) en fase de maduración, con ovocitos midiendo entre 25 μm y 50 μm (Fig. 13C) y el resto de las hembras (83%) presentaron proliferación de nuevos ovocitos y ovocitos maduros (Fig. 13D-10E), así como ovocitos en estado necrótico en su fase temprana y tardía (Fig. 13F), sin tener la trabécula y el lumen colapsados, lo cual indica una liberación de los ovocitos maduros, características del estado de desove nulo. El diámetro promedio de los ovocitos en maduración fue de 33.30 μm (DE \pm 6.44 μm), el diámetro de los ovocitos maduros fue de 164.29 μm (DE \pm 29.76 μm). Los ovocitos necróticos tempranos tuvieron un diámetro promedio de 145.68 μm (DE \pm 19.09 μm).

En el análisis histológico de los abulones machos de la clase D, el 71% de los machos estuvieron en la fase de maduración, que se caracteriza por la presencia de estados tempranos de gametogénesis alrededor de los túbulos con una ligera proliferación de espermátidas (Fig. 14) y el 29% restante estuvieron maduros con abundantes espermátidas y espermatozoides y con pocos estados gametogénicos tempranos sólo alrededor de los túbulos (Fig. 15).

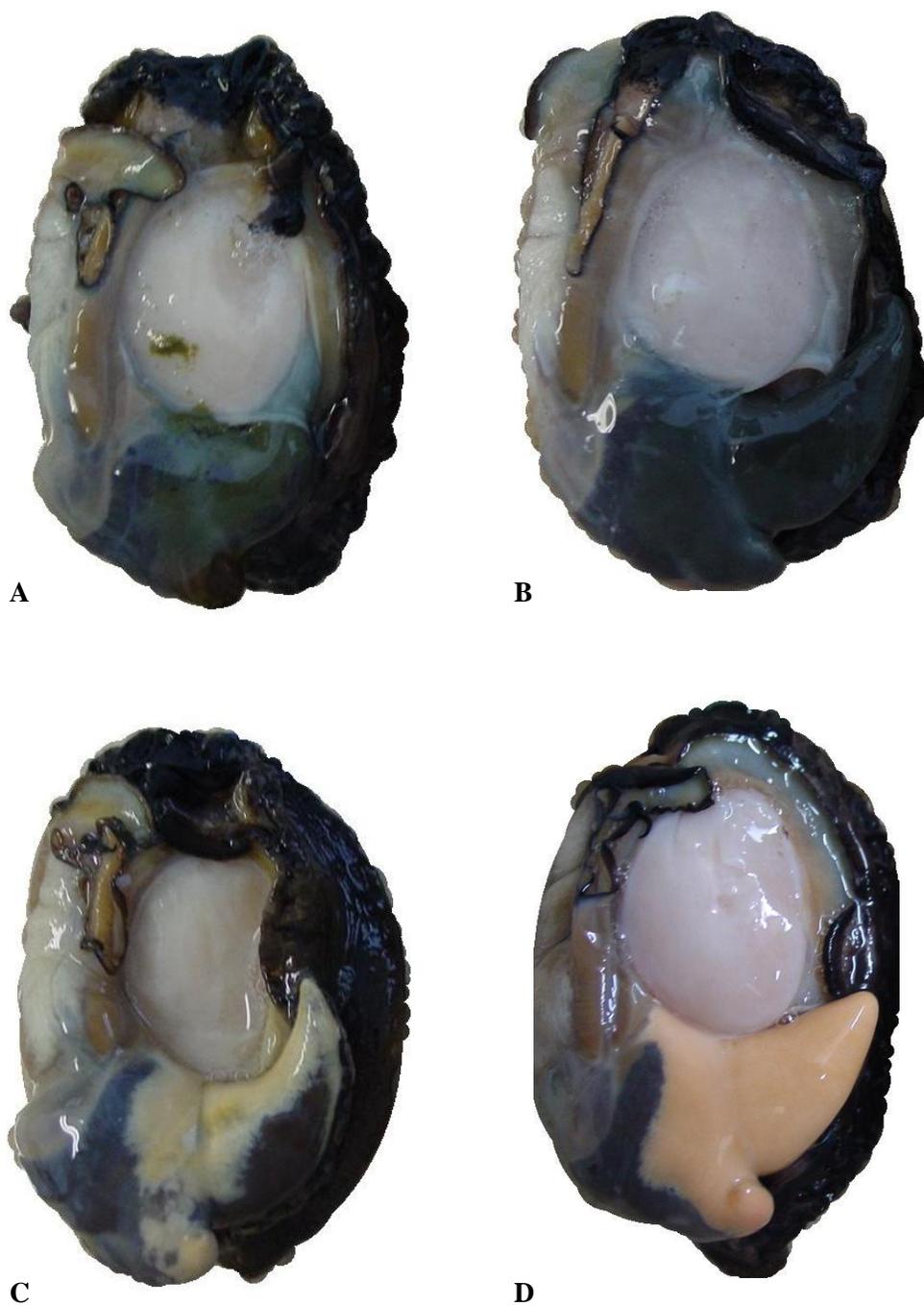


Figura 12. Diferencias macroscópicas en tamaño y grosor en las gónadas de abulón rojo. A: hembra con 25% de glándula digestiva (GD) cubierta por gónada (G) (Talla: 67.36 mm); B: hembra con 100% de GD cubierta por G (Talla: 68.46 mm); C: macho con 25% de GD cubierta por G (Talla; 68.78 mm); D. macho con 100% de GD cubierta por G (Talla: 70.70 mm).

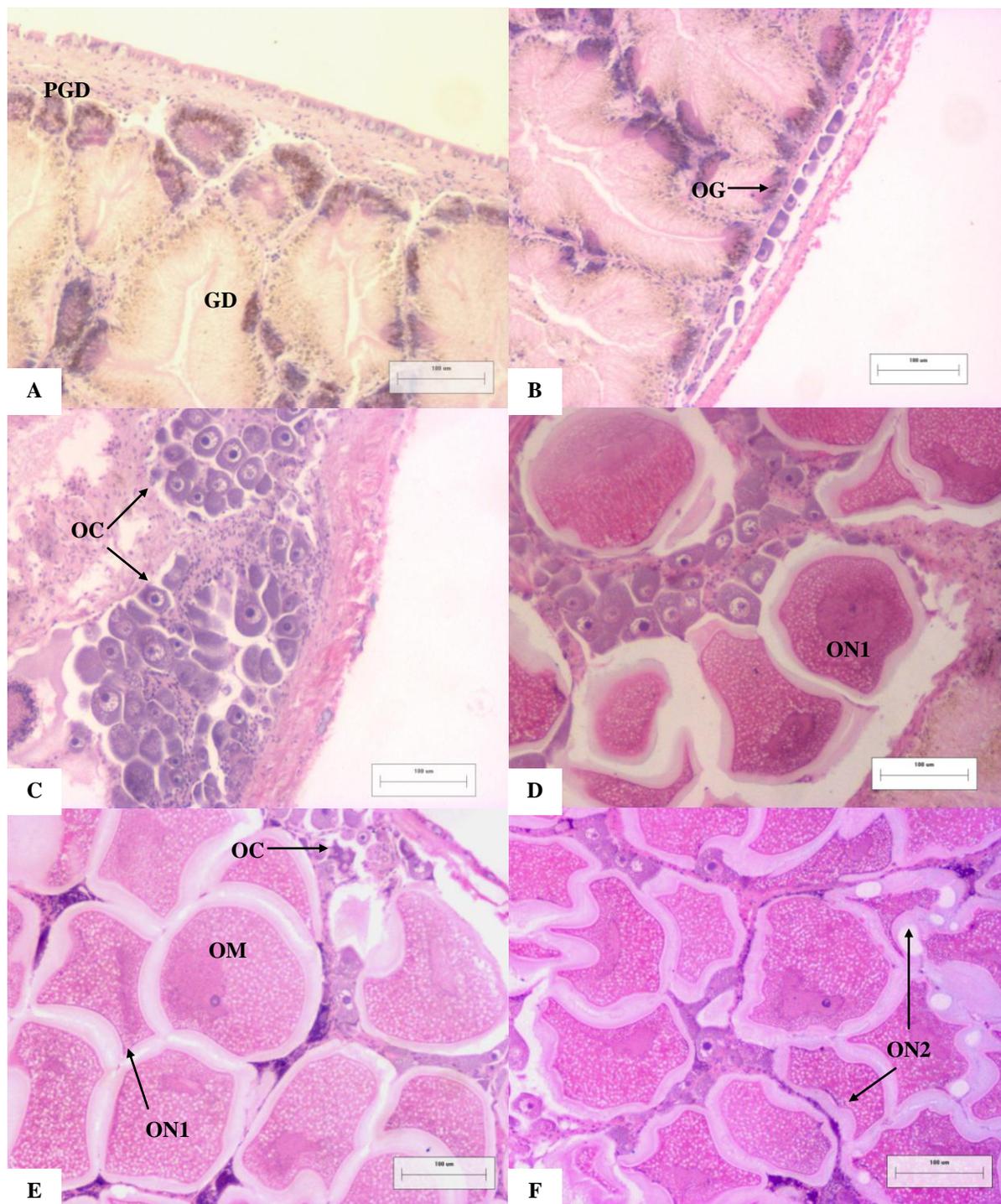


Figura 13. Fases de maduración gonádica en hembras de abulón rojo. A. Estado preproliferativo (talla de 35.70 mm). B-C. Estado proliferativo (talla 47 mm y 68.60 mm). D-E. Estado parcialmente desovado (talla de 76.60 mm y 68.94 mm). F. Estado Necrótico (talla 76.60 mm) PGD: pared de la glándula digestiva; GD: glándula digestiva; OG: Ovogonia; OC: Ovocito creciendo; OM: ovocito maduro; ON1: ovocito necrótico en fase temprana; ON2: ovocito necrótico en fase tardía. Esc: 100µm

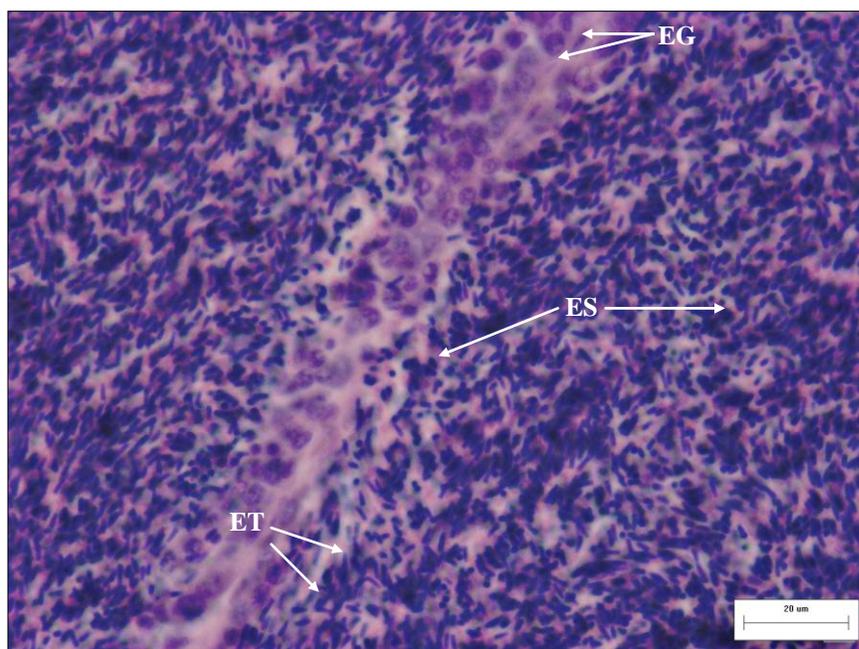


Figura 14. Fase de maduración gonádica en machos de abulón rojo. Corte transversal de un macho (talla 70.88 mm). EG: espermatogonia (redondas de 10-12 μm); ES: espermatocito secundario (redondas de 7 μm); ET: espermatidas (ovales de 3-6 μm). Esc:20 μm

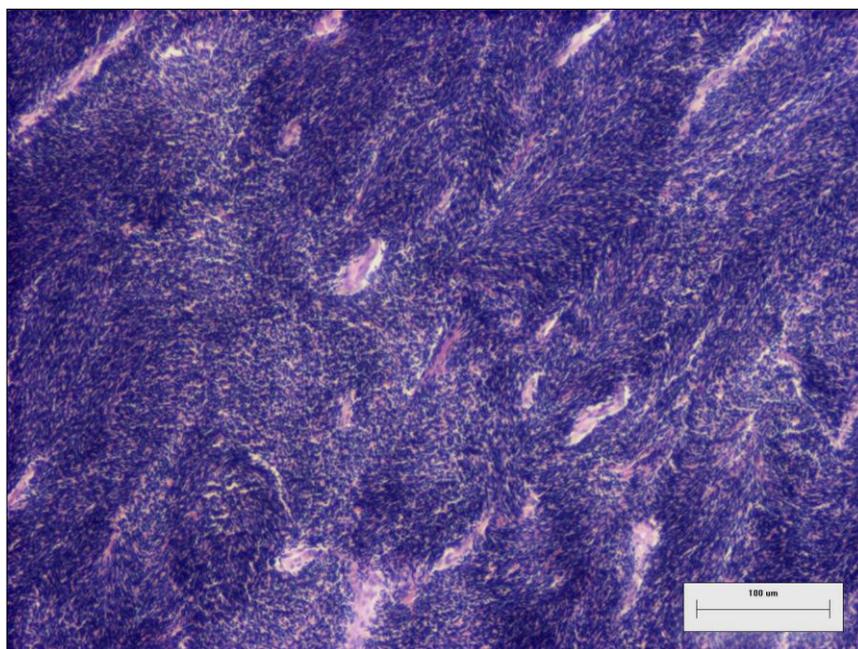


Figura 15. Fase madurez gonádica en machos de abulón rojo. Corte transversal de un macho (talla 67.36 mm).

IV.3.3. Método bioquímico

Al graficar el grado de madurez sexual contra la absorbancia a los 458, 502 y 555 nm no se observó correlación entre las dos variables (Fig. 16). Se esperaría que a mayor madurez mayor absorbancia, sin embargo, en las gráficas no se observó este fenómeno. Por lo que el método bioquímico no permite cuantificar el grado de madurez sexual.

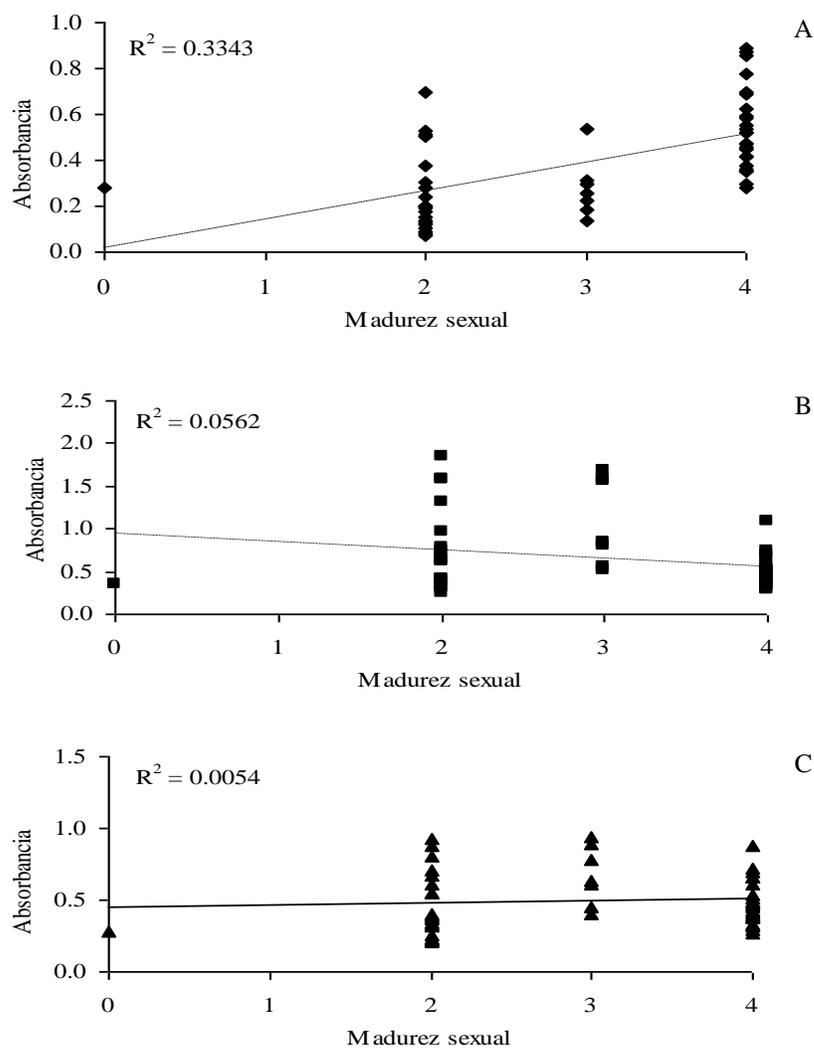


Figura 16. Correlación del grado de madurez sexual y la absorbancia obtenida en el método bioquímico en abulón rojo. A. Absorbancia a los 458 nm. B. Absorbancia a los 502 nm. C. Absorbancia a los 555 nm. 0=preproliferativo, 1=proliferativo, 2=-madurando, 3=maduro, 4=desove nulo.

Capítulo V

DISCUSION

V.1. Talla del abulón y madurez sexual

La examinación histológica de la gónada mostró que entre las tallas de 20-50 mm el abulón rojo cultivado estuvo sexualmente indiferenciado y el 98 % de los abulones con talla mayor a 60 mm estuvo diferenciado. Rogers-Bennett *et al.* (2004) encontraron en el abulón rojo silvestre del norte de California que a partir de la talla de 50 mm se dieron los primeros signos de diferenciación sexual (cuando se pudieron observar ovocitos o espermatoцитos en el tejido gonádico) y a partir de la talla de 75 mm el grosor de la gónada aumentó drásticamente junto con un incremento exponencial del número de ovocitos. En abulones rojos de Mendocino, California, las hembras con tallas entre 51-70 mm ya presentaban ovocitos primarios (Giorgio y DeMartini, 1977).

Las hembras en fase de maduración y en fase de desove nulo estuvieron en el mismo intervalo de tallas, 66.90-73.06 mm y 66.28-76.60 mm respectivamente. Sin embargo, la fase de maduración estuvo comprendida por cinco hembras, por lo tanto, las hembras en este intervalo de tallas estuvo en general en desove nulo, caracterizado principalmente por presentar escasos ovocitos maduros debido al incremento de ovocitos necróticos, así como ligera proliferación de nuevos ovocitos alrededor de la pared externa de la gónada. El desove nulo fue descrito por Giorgio y DeMartini (1977) y mencionaron que la causa posible de esta fase es porque no se presentan las condiciones que estimulan el desove, por lo que la necrosis es la autólisis de los ovocitos residuales dado que la gametogénesis estará inhibida hasta

que los ovocitos residuales sean liberados o reabsorbidos. Rogers-Bennett *et al.* (2004) observaron que los ovocitos necróticos representaron el 30% del total de ovocitos en abulones mayores de 81 mm y que el mayor de los abulones (260 mm) tuvo más del 80% de ovocitos necróticos.

En este estudio los machos en fase de maduración estuvieron entre las tallas de 65.82–74.92 mm, y los machos maduros estuvieron entre las tallas de 65.78-71.68 mm. Rogers-Bennett *et al.* (2004) reportaron que el macho de menor talla con espermatozoides y estructura testicular fue de 64 mm y que los machos entre 75-91 mm ya presentaban esperma. No hubo evidencia de necrosis en los espermatozoides, tal como lo mencionaron Giorgio y DeMartini (1977). No se encontró diferencias en la relación de las tallas y fases de maduración entre los abulones en cautiverio de este estudio y los abulones silvestres estudiados por Giorgio y De Martini.

Ault (1985) mantuvo abulones rojos del norte California en cautiverio y encontró que bajo condiciones de laboratorio maduraban a menor talla que los especímenes silvestres reportados por Giorgio y DeMartini (1977). Además, expresaron que dicha diferencia pudo haberse debido a la abundancia de macroalga *Macrocystis pyrifera*. Jarayabhand y Paphavasit (1996) consideraron que los factores más importantes para tener abulones maduros todo el año son las condiciones óptimas de cultivo y adecuada cantidad de macroalga.

La talla mínima de madurez sexual en el abulón rojo de Mendocino, California estuvo entre los 100-125 mm (Giorgio y DeMartini, 1997) entre los 105-130 mm en hembras y entre 75-95 mm en machos (Rogers-Bennett *et al.*, 2004). La talla mínima de madurez sexual del abulón azul *H. fulgens* de Bahía Tortugas, Baja California está entre las tallas de 70-140 mm, aproximadamente a los tres años de edad (Shepherd *et al.*, 1991), y de Santa Catalina, California está entre las tallas de 61-128 mm alrededor de los cinco años de edad (Tutschulte y Connell, 1988). Shepherd *et al.* (1991) sugiere que las diferencias encontradas es debida a que la tasa de crecimiento es menor en Santa Catalina, California, y consideraron que la talla de

primera madurez sexual es más dependiente de la edad que de la talla. Cabe mencionar que no se utilizó el mismo criterio para definir a un organismo maduro.

V.2. Identificación del sexo y del desarrollo gonadal

V.2.1. Método visual macroscópico

En abulón no existe dimorfismo sexual externo. En las granjas de abulón la forma práctica de identificar el sexo es observando la coloración de la gónada. Sin embargo, es efectiva hasta que los organismos tienen una considerable cantidad de gónada. En este estudio aunque la precisión del método visual para el grupo D, fue del 90.20 % se debe considerar que las gónadas examinadas ya estaban bien desarrolladas, por lo que es de esperarse que a menor desarrollo gonadal menor la precisión. Considerando que con los otros métodos se pudo identificar el sexo de abulones visualmente indiferenciados es necesario implementar otras técnicas confirmatorias que sean rápidas y simples que permitan identificar el sexo cuando los abulones empiezan a madurar.

Aunque durante el ciclo reproductivo de la gónada se produce un crecimiento en la gónada como resultado del aumento del tamaño y número de los gametos, el área de la glándula digestiva cubierta por gónada no es un criterio funcional para establecer la fase de desarrollo por lo que se hace necesario el uso de la histología para lograr este propósito.

V.2.2. Método histológico

La histología es una herramienta empleada comúnmente para la examinación microscópica del apéndice cónico donde crece la gónada. Tiene la ventaja de que permite identificar el sexo a edad más temprana y más precisa que de forma visual, así como también permite apreciar la fase de desarrollo. Sin embargo es un método

laborioso y tardado. En este estudio se utilizó como método control para comparar los resultados de los otros métodos.

V.2.3. Método bioquímico

Jabbar y Davies (1987) identificaron el sexo en el mejillón *Mytilus edulis*, utilizando la reacción con TBA y TCA con tejido del manto, glándula digestiva, ovocitos y espermias. Mikhailov, *et al.* (1995) lo hicieron en el mejillón *Mytilus galloprovincialis* con tejido el manto. En este trabajo se utilizó la misma técnica en abulón rojo y no fue posible identificar el sexo con el manto, el músculo, la branquia y en abulones visualmente diferenciados tampoco con glándula digestiva. Estos resultados podrían deberse a la diferencia entre los sistemas reproductivos, ya que en el mejillón los folículos donde se encuentra el epitelio germinal se localizan en el manto y se conectan por ductos hacia el exterior (Jabbar y Davies, 1987) y en abulones las células germinales crecen alrededor de la glándula digestiva, lo que explica porque con algunas muestras fue posible identificar el sexo en abulones visualmente indiferenciados utilizando este tejido.

Tanto en el mejillón como en el abulón rojo se desarrollaron dos cromóforos: el rosa en hembras y el amarillo en machos. En el espectro de absorbancia del mejillón las hembras presentaron un pico de mayor absorbancia a los 532 nm y los machos dos picos de mayor absorbancia el primero y mayor a los 453 nm y el segundo a los 490 nm, mientras que en el abulón rojo en las hembras el pico de mayor absorbancia fue a los 555 nm y en los machos el pico de mayor absorbancia a los 458 nm y el segundo a los 502 nm. En hembras de abulón azul el pico de mayor absorbancia fue igual que abulón rojo, no así en las hembras de abulón amarillo. En los machos de abulón rojo, de abulón azul y de abulón amarillo, los picos de mayor absorbancia se observaron en las mismas longitudes de onda, a los 458 nm y a los 502 nm. Las diferencias observadas en la longitud de onda donde se presentan los picos de mayor absorbancia entre las diferentes especies sugieren que los espectros de absorbancia y

por tanto los lípidos degradados en la reacción con TBA son específicos para cada especie.

En el mejillón, Jabbar y Davies (1987) encontraron que el cromóforo de los 450 nm estuvo presente desde la gametogénesis hasta el desove, por lo que estimaron un índice dividiendo la absorbancia a los 450 nm (pico de mayor absorbancia en machos) entre la absorbancia a los 530 nm (pico de mayor absorbancia en hembras) y observaron la variación sobre un periodo de 15 meses. Ellos pudieron determinar el sexo todo el tiempo excepto de mediados de julio a mediados de octubre cuando los mejillones se encontraron en fase de reposo y el valor del índice no mostró diferencias entre ambos sexos. En este trabajo los índices bioquímicos permitieron identificar el sexo y aunque no hubo resultados contradictorios que señalaran falsas hembras o falsos machos, sí se presentaron diferencias en las precisiones. En abulones visualmente diferenciados, el índice *b* tuvo mayor precisión total que los otros. No obstante, aún cuando en hembras la precisión sigue siendo mayor con *b*, la precisión en machos fue mayor con el índice *c* por lo que se recomienda el uso de ambos índices para obtener un resultado confirmatorio.

En abulones con talla menor a 50 mm que fueron visualmente indiferenciados, se pudo asignar el sexo utilizando los índices. Llama la atención que en la clase de talla A, que son abulones con talla menor a 30 mm se le asignó el sexo a 9 machos que representan el 60% de los abulones del grupo con una proporción de sexos (Hembras:Machos) de 0:1. Considerando que la proporción de sexos en la clase de talla B (30-40 mm) fue de 1:0.8 y en la clase de talla C (40-50 mm) fue de 1:0.7 y que la literatura señala una proporción de 1:1 para esta especie, así como también expresa que a los 30 mm los abulones aún no han entrado en el proceso de maduración sexual, no se recomienda el empleo del método bioquímico en tallas menores a 30 mm.

Jabbar y Davies (1987) consideraron que las diferencias observadas entre sexos es reflejo de la abundancia relativa de ADN y lípidos oxidables que son sustancias específicas de cada sexo.

V.3. Comparación entre métodos

Los tres métodos probados pudieron identificar el sexo del abulón rojo. Sin embargo, el método visual se recomienda usar en abulones de mayor talla respecto a las tallas en las que se pueden usar los métodos histológico y bioquímico. Dicha divergencia se puede atribuir a la naturaleza de cada método, ya que visualmente se está observando la capa de tejido gonádico formada por la agrupación de las células germinales, así como por histología se observa la célula germinal independientemente de si existe una agrupación o no y, en el caso del método bioquímico se detectan los lípidos específicos de cada sexo que están presentes en las células germinales.

Aún cuando no se observó correlación entre la absorbancia y las fases de madurez gonádica, el método bioquímico podría servir como herramienta para indagar el momento en que empieza el proceso de maduración sexual. Como se observa en los diferentes estudios, el abulón rojo madura alrededor de los 50 mm, antes de la talla mínima de comercialización que es a los 80 mm. Tomando en cuenta que la madurez sexual es un proceso demandante de energía es de suma importancia conocer el inicio de la madurez sexual a fin de proveer de mayor alimento a los abulones y así evitar que el crecimiento somático se vea reducido.

Capítulo VI

CONCLUSIONES

Los métodos visual, histológico y bioquímicos permitieron identificar el sexo del abulón rojo.

Los abulones con talla menor de 50 mm son indiferenciados y en esencia carecen de gónada, a partir de esta talla empiezan a madurar sexualmente.

En las talla de 60-80 mm las hembras estuvieron en desove nulo y los machos en fase de maduración.

El método visual macroscópico es práctico y preciso para identificar el sexo en abulones con talla mayor a 60 mm.

El método bioquímico permitió identificar el sexo en abulones con talla mayor a 30 mm aunque no se encontró correlación con este método y la madurez sexual.

Capítulo VII

LITERATURA CITADA

- Arai, K., Tsubaki, H. y Fujino, K. 1982. Chromosomes of *Haliotis discos hannai* INO y *H. discus* REEVE. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish. 48(12): 1689-1691.
- Arendse, D. C. Z., Anderesen, S., Blake, N. J. y Pitcher G. C. 2008. The reproductive cycle of the scallop *Pecten sulcicostatus* from the Southern Benguela upwelling system. J. Shellfish Res. 27(2): 281-287.
- Ault, J. S. 1985. Some quantitative aspects of reproduction and growth of the red abalone, *Haliotis rufescens* Swainson. J. World Maricul. Soc. 16: 398-425.
- Barber, B. J. 1984. Reproductive energy metabolism in the bay scallop, *Argopecten irradians concentricus* (Gay). Ph. D. thesis. University of South Florida, Tampa.
- Barber, B. J., and Blake, N. L. 1991. Reproductive physiology. En: Scallops: biology, ecology and aquaculture. Development in aquaculture and fisheries science. Ed. Shumway. New York. 21: 377-421 p.
- Booolootian, R. A., Farmanfarmaian, A. y Giese, A. C. 1962. On the reproductive cycle and breeding habits of two western species of *Haliotis*. Biol. Bull. 122(2): 183-193.
- Capinpin, E. C. Jr., Encena II V. C. y Bayona N. C. 1998. Studies on the reproductive biology of the Donkey's ear abalone, *Haliotis asinina* Linné. Aquaculture. 166 :141-150.

- Castagna, M. y Kraeuter, J. N. 1994. Age, growth rate, sexual dimorphism and fecundity of knobbed whelk *Busycon carica* (Gmelin, 1791) in a western Mid-Atlantic lagoon system, Virginia. *J. Shellfish Res.* 13:581-585.
- Coe, W. R. 1943. Sexual differentiation in mollusks. *Q. Rev. Biol.* 18(2):154-164.
- Cox, K. W. 1960. Review of the abalone in California. California Department of Fish and Game. 46(4):381-406.
- Cox, K. W. 1962. California abalones, family Haliotidae. California Department of Fish and Game. Fish Bulletin. (118):1-133.
- De la Parra, A. M., García, O. y San Juan, F. 2005. Seasonal variations on the biochemical composition and lipid classes of the gonad and storage tissues of *Crassostrea gigas* in relation to the gametogenic cycle. *J. Shellfisheries Res.* 24(2): 457-467.
- Elliott, N. G. 2000. Genetic improvement programmes in abalone: what is the future? *Aquaculture Res.* 31: 51-59.
- Estrada, F. E., Peralta, Z. L. y Rivas, M. P. 1982. Manual de Técnicas Histológicas. Ed. AGT. 140 pp.
- Gallardo-Escárate, C., Álvarez-Borrego, J., Del Río-Portillo, M. A. y Kober, V. 2004. Karyotype of Pacific red abalone *Haliotis rufescens* (Archalogastrópoda: Haliotidae) using image analysis. *J. Shellfish Res.* 23(1):205-209.
- Gallardo-Escárate, C., Álvarez-Borrego, J., Del Río-Portillo, M. A., Brand-Skopnik, E. V., Cross, I., Merlo, A. y Rebordinos, L. 2005. Karyotype analysis and chromosomal localization by fish of ribosomal DNA, telomeric (TTAGGG)_N

- y (GATA)_N repeats in *Haliotis fulgens* y *H. corrugate* (Archeogastropoda: Haliotidae). J. Shellfish Res. 24(4):1153-1159.
- Gaviño de la Torre G., Juárez, J. C. y Figueroa, H. H. 1985. Técnicas biológicas selectas de laboratorio y campo. Ed. Limusa. México. 251 pp.
- Geiger D. L y Poppe G. T. 2000. A Conchological Iconography. The Family Haliotidae. Ed. ConchBooks. Alemania. 1-135 pp.
- Giorgi, A. E. y DeMartini, J. D. 1977. A study of the reproductive biology of the red abalone, *Haliotis rufescens* Swainson, near Mendocino, California. Calif. Fish and Game. 63(2): 80-94.
- Hancock, A. T., 2004. The biology and fishery of Roe's abalone *Haliotis roei* Gray in south-western Australia, with emphasis on the Perth fishery. Thesis of Doctor of Philosophy. University of Western Australia. 200 pp.
- Hahn, K. O., 1989. Handbook of culture of abalone and other marine gasteropods. CRC Press. Florida, 348 pp.
- Harasewych, M. G. y McArthur, A. G. 2000. A molecular phylogeny of the Patellogastropoda (Mollusca Gastropoda). Marine Biology. 137:183-194.
- Jabbar, A. y Davies, I., 1987. A simple and convenient biochemical method for sex identification in the marine mussel, *Mytilus edulis* L. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 107: 39-44.
- Jarayabhand, P. y Paphavasit, N. 1996. A review of the culture of tropical abalone with special reference to Thailand. Aquaculture. 140: 159-168.
- Jenner, M. G. 1979. Pseudohermaphroditism in *Ilyanassa obsoleta* (Mollusca: Neogastropoda). Science 205: 1407-1409.

- Karpov, K. A., Hakeer, P. L., Taniguchi, I. K. y Rogers-Bennett, L. 2000. Serial depletion and the collapse of the California abalone (*Haliotis spp.*) fishery. En: Workshop an rebuilding abalone stocks in British Columbia. Ed. Alan Campbell. National Research of Council of Canada. 158 pp.
- Lindberg, D. R., 1992. Evolution, distribution and systematics in Haliotidae. En: Abalone of the World: biology, fisheries and culture. Ed. A. Shepherd, M. J. Tegner and S.A Guzmán del Proo. Blackwell Scientific, Oxford. 3-18.
- Litaay, M. y De Silva, S. S., 2003. Spawning season and fecundity and proximate composition of the gonads of wild-caught blacklip abalone (*Haliotis rubra*) from Port Fairy waters, south eastern Australia. Aquat. Living Resour. 16: 353-361.
- Liu, W., Li, Q., Yuan, Y. y Zhang, S. 2008. Seasonal variations in reproductive activity and biochemical compositions of the cockle *Fulvia mutica* (Reeve) from the Eastern coast of China. J. Shellfish Res. 27(2): 405-411.
- Mikhailov, A. T., Torrado, M. y Méndez, J. Sexual differentiation of reproductive tissue in bivalve molluscs: identification of male associated polypeptide in the mantle of *Mytilus galloprovincialis* Lmk. Int. J. Dev. Biol. 39:545-548.
- Minkler, J., 1977. Chromosomes of the black abalone (*Haliotis cracherodii*). CMLS. 33(9):1143
- Montero-Torreiro, M. F., 2000. Análisis de la composición bioquímica y de posibles biomarcadores de contaminación del erizo de mar, *Paracentrotus lividus*, Lmk. Tesis doctoral. Departamento de bioquímica y biología molecular de la Universidad de Santiago de Compostela. 185 pp.
- Morse, D. E., Dunca, H., Hooker, N. y Morse, A. 1977. Hydrogen peroxide induces spawning in mollusks with activation of prostaglandin endoperoxide synthetase. Science. 196(4287): 298-300.

- Power, A. J. y Keegan, B. F. 2001. The significance of imposex levels and TBT contamination in the red whelk, *Neptunea antiqua* (L.) from the offshore Irish Sea. *Mar. Pollut. Bull.* 42(9):761-772.
- Refstie, T. y Gjedrem, T. 2005. Reproductive traits in aquatic animals. En: Selection and breeding programs in aquaculture. Ed. Gjedrem, T. Springer Netherlands. 113-120 pp.
- Rogers-Bennett, L., Dondanville, R. F. y Kashiwada J. 2004. Size specific fecundity of red abalone (*Haliotis rufescens*): evidence for reproductive senescence? *J. Shellfish Res.* 23(2): 553-560.
- SAGARPA. 2008. Valor de la producción acuícola en el Estado de Baja California en el 2007.
<http://www.sagarpa.gob.mx/dlg/bajacalifornia/pesca/informacion/Produccion%20acuicola%20total%202007.pdf>
- Sastry, A. N. y Blake, N. J. 1971. Regulation of gonad development in the bay scallop, *Aequipecten irradians* Lamarck. *Biol. Bull.* 140:274-283.
- Shepherd, S. A., Guzmán del Proó S. A., Turrubiates, J., Belmar, J., Baker J. L. y Sluczanowski P. R. 1991. Growth, size at sexual maturity, and egg-per-recruit analysis of the abalone *Haliotis fulgens* in Baja California. *The Veliger.* 34(4):324-330.
- Sobhon, P., Apisawetakan, S., Chanpoo, M., Wanichanon, Ch., Linthong, V., Thongkukiatkul, A., Jarayabhand, P., Kruatrachue, M., Upatham, S. E. and Poomthong, T. 1999. Classification of germ cells, reproductive cycle and maturation of gonadas in *Haliotis asinina* Linnaeus. *ScienceAsia.* 25: 3-21.
- StatSoft, Inc. (2002). STATISTICA (data analysis software system), version 6. www.statsoft.com.
- Tuschulte, T. y Connell, J. 1981. Reproductive biology of three species de abalones (*Haliotis*) in Southern California. *The Veliger.* 23(3):195-206.

Young, J. S. y DeMartini, J. D. 1970. The reproductive cycle, gonadal histology, and gametogenesis of the red abalone, *Haliotis rufescens* (Swainson). Calif. Fish and Game. 56(4): 208-309.

Zandee, D. I., Kluytmans, J. H. y Zurburg, W. 1980. Seasonal variations in biochemical composition of *Mytilus edulis* with reference to energy metabolism and gametogenesis. Neth. J. Sea Res. 14(1):1-29.

APENDICE 1

Técnica histológica: Tinción Hematoxilina-Eosina (HE)

Fijación

La fijación del tejido del abulón se realiza para provocar la muerte de las células de tal manera que conserven lo mejor posible las características morfológicas y químicas que tuvieron en estado vivo.

La fijación se realizó con líquido Davidson's y la relación entre el volumen de muestra y líquido es de 1:5 y después se pasó a la solución conservante.

Davidson's fijador:

Se mezcla nueve partes de solución Davidson's conservante y una parte de ácido acético.

Davidson's conservante:

Glicerina	400 ml
Formol	800 ml
Alcohol (95 %)	1200 ml
Agua de mar filtrada	1200 ml
Agitar bien	

Inclusión en parafina

La inclusión conserva los tejidos a estudiar en el interior de alguna sustancia plástica (que penetra hasta lo más interno de las estructura celulares) que da tal consistencia que permite cortar los tejidos en láminas delgadas. Los tejidos contienen gran cantidad de agua, tanto intracelular como extracelular que debe ser eliminada y reemplazada con parafina.

Para impregnar los tejidos con parafina, las muestras se deshidrataron y se completó la impregnación con un disolvente de la parafina que substituyó el alcohol (benceno). Para la inclusión se utilizó un histoquinete LEICA TP 1400 con los siguientes tiempos:

Solución	Tiempo (h)	Producto	Tiempo Hrs.
1. Alcohol 70%	1	7. Benceno	2
2. Alcohol 96%	2	8. Benceno	2
3. Alcohol 96%	2	9. Benceno-parafina	3
4. Alcohol 100%	2	10. Parafina	2
5. Alcohol 100%	2	11. Parafina	2
6. Etanol-benceno	3	<i>Tiempo total</i>	23

Después del último baño en parafina, el tejido se orientó de la manera deseada dentro de moldes metálicos con parafina fundida. Una vez solidificados los bloques se colocaron en una la solución ablandadora de 24 a 48 horas previas a la microtomía.

Solución ablandadora:

Glicerina	5 ml
Agua destilada	25 ml
Alcohol 95%	70 ml

Microtomía

La microtomía permite cortar el tejido ya incluido en parafina. Se utilizó un microtomo modelo Spencer 820 y se realizaron cortes de 5 micras de grosor. Los cortes se colocaron en un portaobjetos y se vertieron unas gotas de alcohol al 30% entre el tejido y el portaobjeto para extender parcialmente el corte. Después se colocó el tejido en un baño de agua a 46 °C para extender completamente el corte.

Finalmente se recogió el corte con un portaobjeto nuevo, esmerilado y se dejó escurrir y secar.

Tinción

Desparafinado:

Antes de teñir es necesario eliminar la parafina para que puedan penetrar los colorantes. El desparafinado se realizó mediante baños de Xileno a 30-35 °C, y posteriormente se rehidrató el tejido con alcoholes de diferente graduación y agua, ambos a temperatura ambiente. Los tiempos para el desparafinado fueron los siguientes:

Solución	Tiempo (min.)	Solución	Tiempo (min.)
1. Xileno	5	5. Alcohol 100%	1
2. Xileno	5	6. Alcohol 96%	1
3. Xileno	5	7. Alcohol 50%	1
4. Alcohol 100%	1	8. Agua destilada	Reposo

Nota: antes de desparafinar es necesario colocar las láminas en la estufa de preferencia 24 horas para que el tejido quedé adherido al portaobjetos.

Tinción: método de hematoxilina eosina:

La hematoxilina es un colorante básico que se utiliza en histología para teñir los componentes aniónicos (ácidos) de los tejidos, a los que da una coloración violeta. Tiñe intensamente los núcleos de las células, dado que estos contienen ácidos nucleicos ricos en radicales ácidos.

La eosina distingue detalles del citoplasma, al tener su base incolora y su parte ácida coloreada, es un colorante citoplasmático. La mayor parte de la célula es teñida por la eosina (rosado o rojo) y la intensidad en la cual se vea la tinción

depende del pH de la solución colorante. El procedimiento de tinción fue el que sigue:

Solución	Tiempo	Solución	Tiempo
1. Agua destilada	Reposo	8. Eosina-Floxina	2 min.
2. Hematoxilina	8 min.	9. Alcohol II 96%	1 min.
3. Agua corriente	Enjuagar	10. Alcohol III 96%	1 min.
4. Alcohol ácido	10 s	11. Alcohol I 100%	1 min.
4. Agua corriente	Enjuagar	12. Alcohol II 100%	1 min.
5. Carbonato de litio SAT.*	2 min.	13. Alcohol III 100%	1 min.
6. Agua corriente	Enjuagar	14. Xileno I	3 min.
7. Alcohol I 96%	1 min.	15. Xileno II	3 min.

*SAT=concentración saturada

Montaje

El montaje se realiza para lograr la observación microscópica de los tejidos durante periodos prolongados. Al material por observar se le agregó el medio de montaje (Resina) y se colocó el cubreobjetos. La resina utilizada fue Cytoseal 60.

APÉNDICE 2

Espectros de absorción

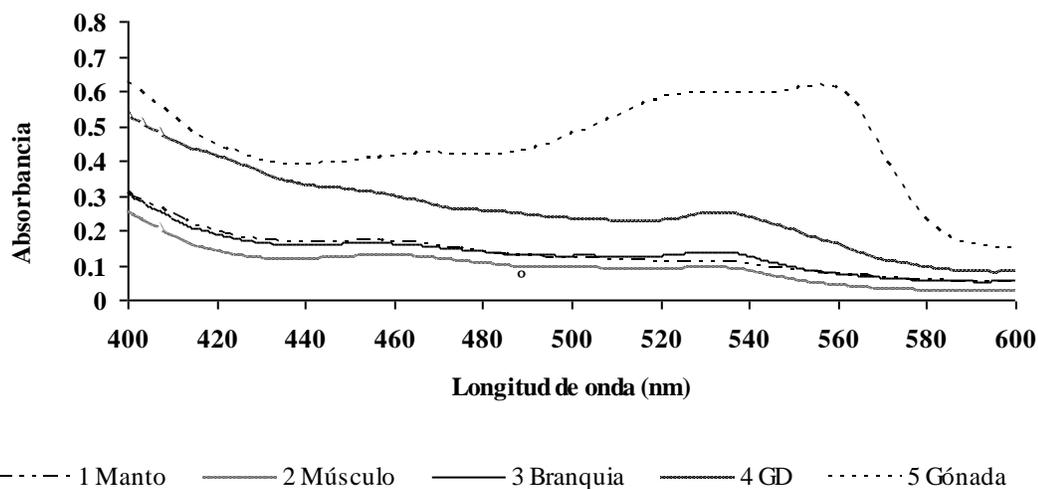


Figura A2.1. Espectros de absorción de la reacción TBA y TCA para diferentes tejidos de hembras de abulón rojo. De los tejidos 1 al 4 se observa el pico de mayor absorbancia a los 530 nm, mientras que en el tejido 5 se forma un pico de mayor absorbancia a los 555 nm.

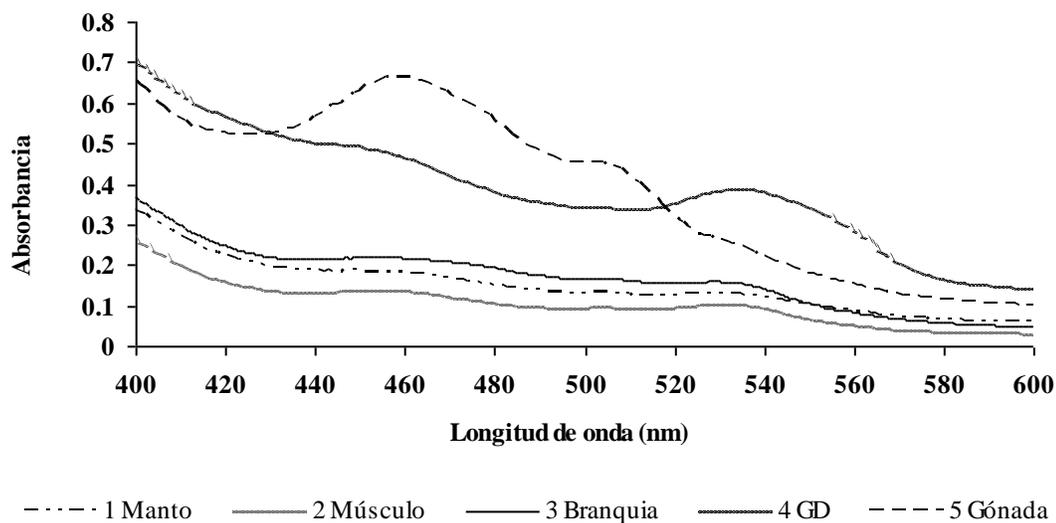


Figura A2.2 Espectros de absorción de la reacción TBA y TCA para diferentes tejidos de machos de abulón rojo. De los tejidos 1 al 4 se observa el pico de mayor absorbancia a los 530 nm, mientras que en el tejido 5 se forman dos picos de mayor absorbancia a los 458 y las 502 nm.

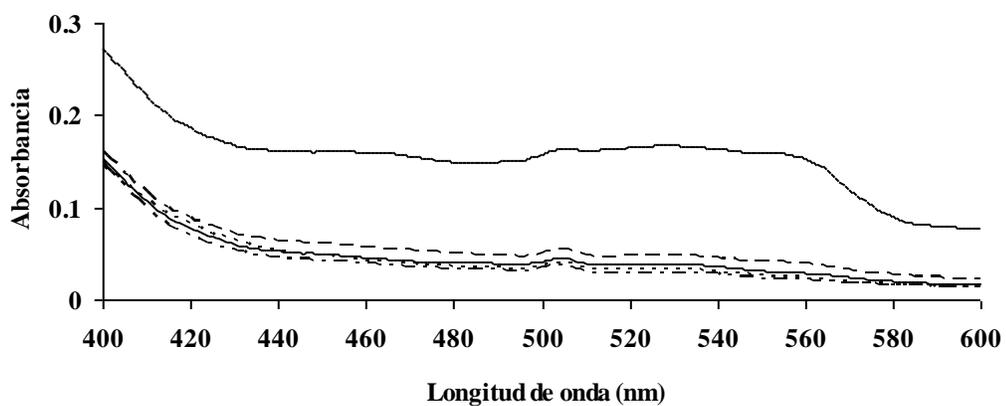


Figura A2.3. Espectros de absorción de la reacción TBA y TCA para diferentes concentraciones de ovocitos de abulón rojo.

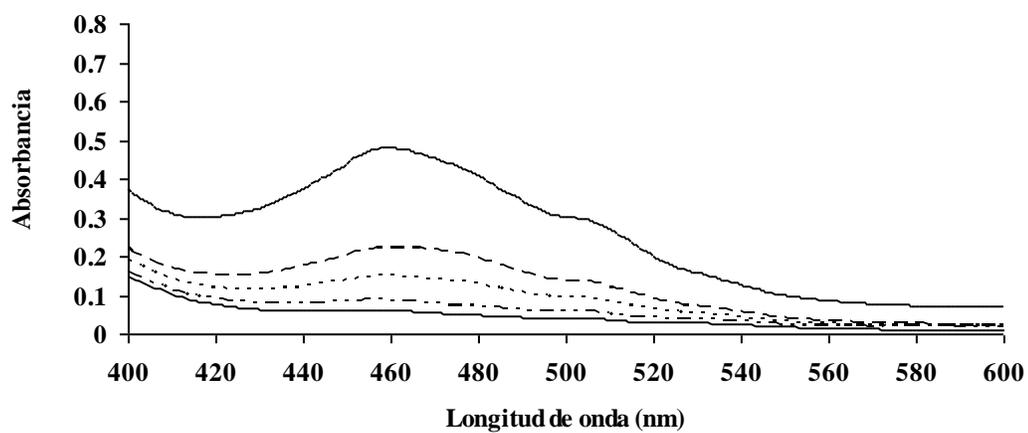


Figura A2.4. Espectros de absorción de la reacción TBA y TCA para diferentes concentraciones de esperma de abulón rojo.

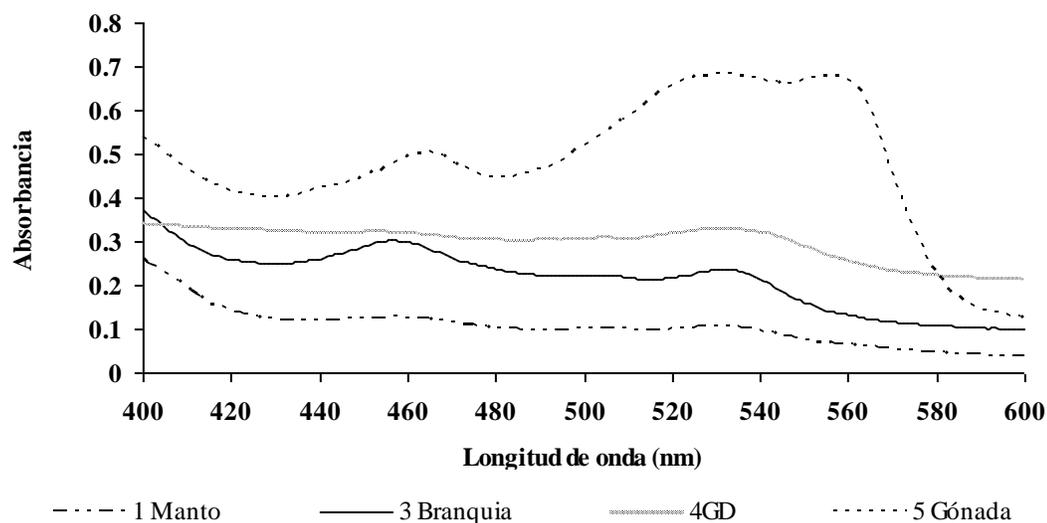


Figura A2.5. Espectros de absorción de la reacción TBA y TCA con diferentes tejidos de hembra abulón azul. El espectro presenta la máxima absorción alrededor de los 555 nm.

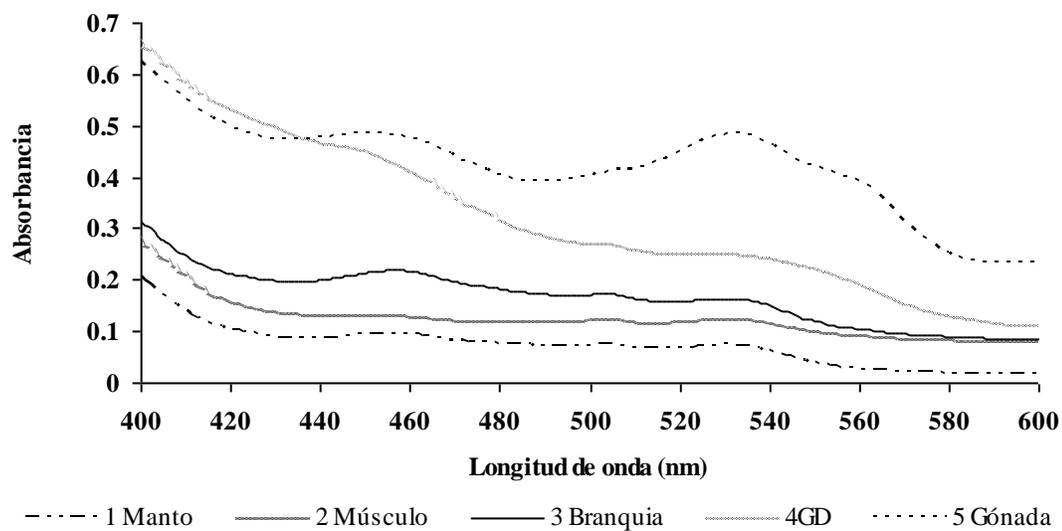


Figura A2.6. Espectros de absorción de la reacción TBA y TCA con diferentes tejidos de hembra de abulón amarillo. El espectro presenta la máxima absorción a los 560 nm.

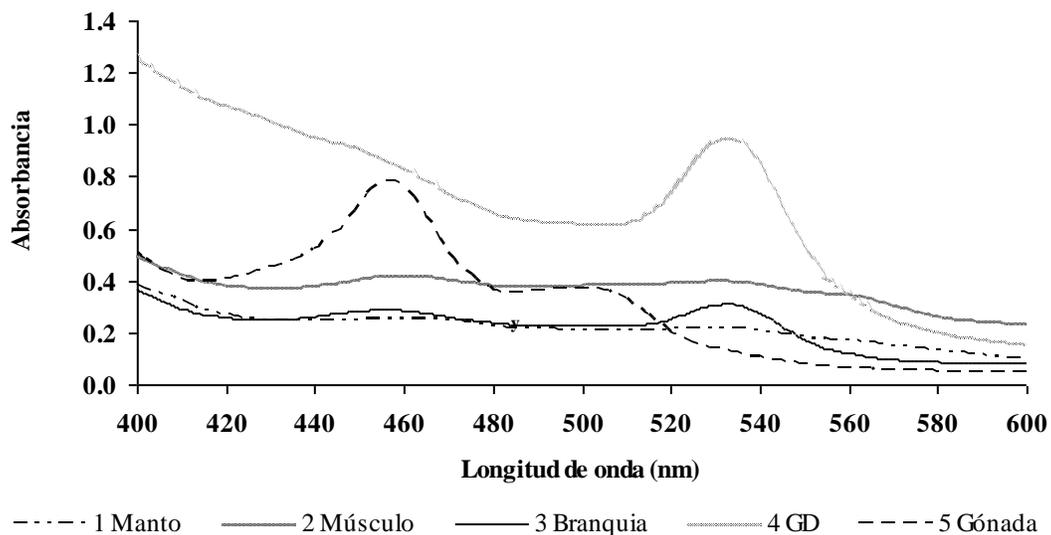


Figura A2.7. Espectros de absorción de la reacción TBA y TCA con diferentes tejidos de machos de abulón azul. El espectro presenta la máxima absorción a los 458 nm y a los 502 nm.

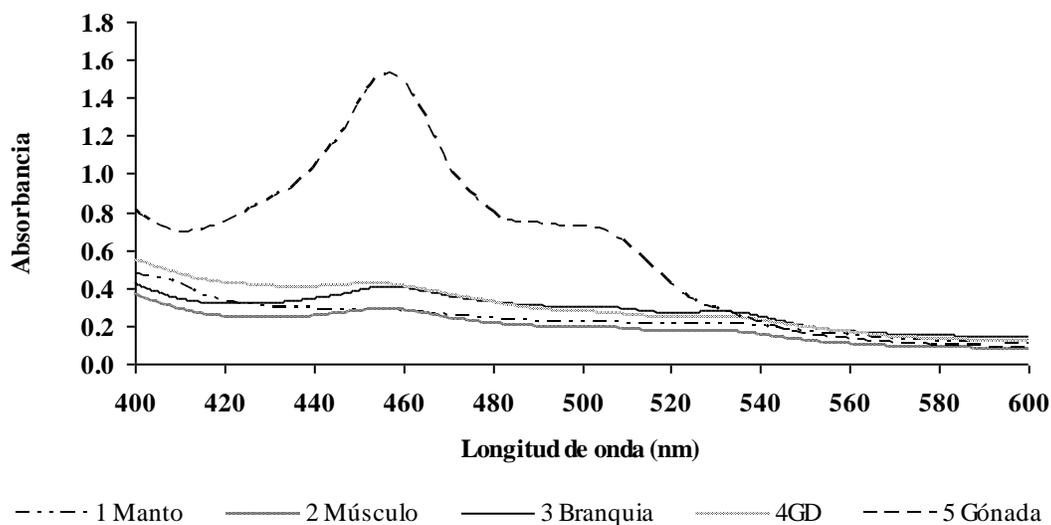


Figura A2.8. Espectros de absorción de la reacción TBA y TCA con diferentes tejidos de machos de abulón amarillo. El espectro presenta la máxima absorción a los 458 nm y a los 502 nm.

