

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Maestría en Ciencias
en Acuicultura**

**Estandarización de protocolos para la obtención de híbridos de
abulón rojo (*Haliotis rufescens*) con abulón amarillo (*Haliotis
corrugata*) y abulón azul (*Haliotis fulgens guadalupensis*)**

Tesis
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

Erik Fernando González Aragón

Ensenada, Baja California, México
2017

Tesis defendida por
Erik Fernando González Aragón

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Fabiola Lafarga De la Cruz
Director de tesis

Dra. María Clara Arteaga Uribe

Dr. Miguel Ángel Del Río Portilla



Dr. Benjamín Barón Sevilla
Coordinador del Posgrado en Acuicultura

Dra. Rufina Hernández Martínez
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Erik Fernando González Aragón** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Acuicultura.

Estandarización de protocolos para la obtención de híbridos de abulón rojo (*Haliotis rufescens*) con abulón amarillo (*Haliotis corrugata*) y abulón azul (*Haliotis fulgens guadalupensis*)

Resumen aprobado por:

Dra. Fabiola Lafarga De la Cruz
Director de tesis

En este trabajo se abordaron diversos aspectos de biología reproductiva en haliótidos que permiten generar híbridos de abulón rojo con abulón amarillo y azul, las tres especies de mayor producción acuícola y pesquera en México. El propósito del trabajo fue generar información para establecer estrategias de manejo de reproductores silvestres y facilitar la obtención de progenies híbridas interespecíficas. En el caso de abulón rojo, dado que la especie ha sido cultivada por más de 30 años, los protocolos de maduración gonadal y obtención de gametos viables esta bien documentada. Sin embargo, en abulón amarillo y azul el manejo en cautiverio no ha sido documentado. Para cuantificar la Temperatura Efectiva Acumulada (TEA; °C·día) necesaria para alcanzar la maduración sexual, se acondicionaron diez abulones amarillos silvestres gradualmente de 16 hasta 18 °C, y posteriormente fueron mantenidos a 18 °C por un periodo de 5 meses en un sistema de recirculación. Con base en el Índice Visual Gonadal (IVG) y el análisis histológico del tejido gonadal, se lograron registrar diferentes estadios de madurez gonadal y se determinó que la TEA de 2400 °C·día permite obtener organismos maduros. Una vez obtenidos organismos grávidos, diferentes métodos de inducción al desove fueron probados (TRIS-H₂O₂ y UV) sin obtener una respuesta al estímulo de los abulones amarillo y azul silvestres. Por lo cual, utilizando como modelo al abulón rojo, se evaluó la viabilidad de los gametos cuando estos son obtenidos a través del método de biopsia del tejido gonadal tomando como referencia el éxito en la fecundación, eclosión y supervivencia larval. El esperma se evaluó incrementando la concentración y aumentando el tiempo de contacto entre esperma y ovocitos, los resultados mostraron una alta capacidad para fecundar ovocitos alcanzando valores de 33 hasta 85 %, sin afectar la eclosión ni la supervivencia las cuales registraron valores de 63-96 % y del 12-38 %, respectivamente. Por otro lado, la viabilidad de los ovocitos se evaluó a través de dos hembras sometidas a biopsia con y sin previa exposición a una solución inductora al desove de TRIS-H₂O₂. Los resultados mostraron que los ovocitos de la hembra previamente expuesta a la solución inductora son altamente viables registrando un 96 % de fecundación y un porcentaje de eclosión mayor al 82%. Mientras que, en el caso de la hembra que no fue expuesta a una solución inductora el porcentaje de fecundación fue de hasta 25 % y no se presentó eclosión. Por lo cual, se demostró que la biopsia gonadal, tanto de machos como hembras de abulón, es un método alternativo para obtener gametos viables; y en el caso de las hembras, que éstas requieren una previa inducción con solución TRIS-H₂O₂. Posteriormente, con la finalidad de estandarizar los protocolos de fecundación *in vitro* para obtener progenies híbridas entre hembras de abulón rojo cultivado y machos de abulón amarillo silvestre (cruza *RxA_m*, híbrido *RA_m*) y azul silvestre (cruza *RxAz-G*, híbrido *RAz-G*) se realizaron cinco eventos de desove. En todos los desoves, la cruce entre hembras y machos de abulón rojo cultivado (cruza *RxR*, progenie pura *RR*) fue usada como control. Los factores evaluados fueron la concentración de esperma y la edad de los ovocitos al ser fecundados (tiempo post-desove). En las cruces *RxA_m*, las tasas de fecundación variaron de 0 a 53 %, mostrando un aumento en la fecundación cuando la edad de los ovocitos se reduce y cuando aumenta la

concentración de esperma. La eclosión de esta cruce se registró en un intervalo de 0 a 45 % y la supervivencia máxima registrada fue del 20 %. Por otro lado, para la cruce *RxAz-G* las tasas de fecundación variaron de 0 a 73 %, mostrando una relación negativa significativa con el aumento en la edad de los ovocitos, mientras que con la concentración de esperma no se observó una relación. La eclosión de esta cruce registró un valor máximo de 86 % y la supervivencia larval varió de 0 a 48 %. Con respecto al desempeño en cultivo, la progenie híbrida *RAm* presentó heterosis en crecimiento larval al ser comparada con la progenie pura control *RR*. Mientras que, en la progenie híbrida *RAz-G* el crecimiento larval, postlarval y juvenil fue menor respecto a la progenie *RR*. Sin embargo, en términos de supervivencia, la progenie *RAz-G* presentó valores significativamente mayores que su contraparte *RR*, y los obtenidos con los híbridos *RAm*.

Palabras clave: Maduración gonadal, desarrollo larval, hibridación, supervivencia, crecimiento, *Haliotis rufescens*, *Haliotis corrugata*, *Haliotis fulgens guadalupensis*.

Abstract of the thesis presented by **Erik Fernando González Aragón** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Aquaculture.

Standardization of protocols to obtain hybrids of red abalone (*Haliotis rufescens*) with pink abalone (*Haliotis corrugata*) and green abalone (*Haliotis fulgens guadalupensis*)

Abstract approved by:

Dra. Fabiola Lafarga De la Cruz
Thesis Director

In this work, we address several aspects of reproductive biology in haliotids that allow the production of hybrids from red, pink and green abalones, the three main species cultured and fished in Mexico. The purpose of this work was to generate information to establish wild breeding stock management strategies and to facilitate the interspecific hybrid offspring attainment. In the case of red abalone, since the species has been cultivated for more than 30 years, gonad maturation protocols and obtaining viable gametes are well documented. However, in pink and green abalone the management in captivity has not been documented. In order to assess the account the Effective Accumulated Temperature (EAT; °C-day) needed to reach sexual maturation, were conditioned ten wild pink abalone gradually from 16 to 18°C of temperature and subsequently were maintained at 18 °C for five months in a recirculation aquaculture system. Based on the Visual Gonad Index (IVG) and the histological analysis of the gonad tissue, it was possible to record different stages of gonadal maturity and it was determined that the TEA of 2400 °C-day allows to obtain mature organisms. Once gravid organisms were obtained, different methods of spawning induction were tested (TRIS-H₂O₂ and UV) without obtaining a response to the stimulus of wild pink and green abalone. Therefore, using the red abalone as a model, the viability of the gametes was assessed when they were obtained through gonadal tissue biopsy method, taking as reference the success in the rate of fertilization, hatching and larval survival. The sperm was evaluated by increasing the concentration and increasing the contact time between sperm and oocytes, the results showed a high capacity to fertilize oocytes reaching values of 33 to 85 %, without affecting hatching or survival, which registered values of 63-96 % and 12-38 %, respectively. On the other hand, the viability of the oocytes was evaluated through two females submitted to biopsy with and without previous exposure to a solution inducing the spawning of TRIS-H₂O₂. The results showed that the oocytes of the female previously exposed to the induction solution are highly viable with a 96 % fertilization rate and a hatching percentage greater than 82 %. Whereas, in the case of the female that was not exposed to an induction solution, the percentage of fertilization was less than 25 % and no hatching occurred. Therefore, it was demonstrated that the gonadal biopsy of both males and females of abalone, is an alternative method to obtain viable gametes; in the case of females, they require a previous induction with TRIS-H₂O₂ solution. Afterwards, in order to standardize the *in vitro* fertilization protocols to obtain hybrid progenies between red abalone and cultivated red abalone (*RxAm*, *RAm* hybrid) and wild green abalone (*RxAz-G*, *RAz-G* hybrid), five spawning events were performed. In all spawning, the cross between females and males of cultivated red abalone (cross *RxR*, pure progeny *RR*) was used as control. The factors evaluated were the sperm concentration and the age of the oocytes when fertilized (post-spawning time). In the *RxAm* crosses, fertilization rates varied from 0 to 53 %, showing an increase in fertilization when the age of the oocytes is reduced and when the sperm concentration increases. The hatching of this cross was recorded in a range of 0 to 45 % and the maximum survival recorded was 20 %. On the other hand, for the *RAz-G* cross the fertilization

rates varied from 0 to 73 %, showing a significant negative relation with the age of the oocytes, whereas with the sperm concentration no relation was observed. The hatching of this cross recorded a maximum value of 86% and larval survival ranged from 0 to 48 %. Regarding performance in hatchery, the hybrid *RAm* progeny presented heterosis larval growing when compared to the pure control *RR* progeny. Whereas, in the hybrid progeny *RAz-G*, larval, postlarval and juvenile growth was lower than the *RR* progeny. However, in terms of survival, the *RAz-G* progeny presented values significantly higher than their *RR* counterpart, and those obtained with the *RAm* hybrids.

Keywords: Gonadal development, larval development, histology, hybridization, survival, growth, *Haliotis rufescens*, *Haliotis corrugata*, *Haliotis fulgens guadalupensis*

Dedicatoria

*A mi hija, a mi esposa
y a mi madre*

*“Izamos velas antes del amanecer
para emprender la aventura del nuevo día
ya lo he decidido y no me arrepentiré”,*

*“no importará si hay obstáculos que afrontar
nada podrá detener nuestros corazones
hay un sitio al que aspiramos llegar
Vuela hacia la Luz”*

*“Los lazos que forjamos? en las batallas
no dejaré que nadie los pueda deshacer
si abro mis puños se que podré encontrar
la energía dentro de mi cuerpo para empezar
un nuevo mundo nos esta esperando”*

*“Mira hacia el futuro
incluso si hay mares muy difíciles de cruzar”*

*“Siempre voy a estar ahí para ti
No tengas miedo de dar el siguiente paso
Nunca lo olvides
luchamos juntos”*

Agradecimientos

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada por permitirme estudiar un posgrado y en especial al Departamento de Acuicultura por todo el apoyo brindado para poder terminar esta tesis.

A mi comité de tesis Dra. Fabiola Lafarga De la Cruz, Dr. Miguel Ángel del Río Portilla, Dra. María Clara Arteaga Uribe por su disposición, apoyo y las aportaciones en este trabajo.

A la M. en C. Carmen Elvira Vargas Peralta, Técnico titular del Laboratorio de Genética por su valioso apoyo en el trabajo de campo, también por sus comentarios y disposición en todo momento.

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

Al Oceanólogo Jesús Mariscal por sus recomendaciones técnicas sobre los sistemas de reproductores, así como el apoyo brindado en la realización de las tareas de mantenimiento diarias.

Al Concejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca proporcionada para este estudio.

A la planta académica de Acuicultura por todas las experiencias vividas, así como por formarme el carácter necesario para poder enfrentar los retos que se presenten en el campo laboral. En especial gracias a la Dra. Beatriz Cordero, Dra. Claudia Farfán, Dr. Benjamín Barón y Dra. Carmen Paniagua, por siempre estar dispuestos a apoyarme con equipos, soluciones y sobre todo consejos sin los cuales esta tesis no hubiera podido ser.

A la granja comercial Productores Marinos Baja S. A. de C. V. por el apoyo proporcionado en etapas fundamentales en este trabajo, así como por facilitarnos sus instalaciones y las herramientas necesarias para generar las cruzas híbridas de *RAm*. Al equipo de trabajadores que laboran en ese lugar en especial a Enrique Vázquez, Leticia Badillo y Venecia por tener siempre la disposición de ayudarme en el cumplimiento de los objetivos de este trabajo.

A la granja comercial Abulones Cultivados S. A. de C. V. por el apoyo proporcionado, así como por facilitarnos sus instalaciones y las herramientas necesarias para generar las cruzas híbridas de *RxAz-G*. En especial al equipo de trabajadores que laboran en ese lugar en especial a Benito Altamira Rodríguez, Noé García, Claudia, Javier y Muñoz, por ser los mejores compañeros de trabajo, así como por ser excelentes amigos.

A Karla Chacón, Alexandra, Romina y en especial a Rigoberto Delgado por ser excelentes compañeros y amigos en todo momento.

A Roberto Cruz, por todo el apoyo y los consejos brindados sobre el diagnóstico y tratamiento de enfermedades de los lotes de reproductores.

Pero sobre todo quisiera agradecer a mi familia en especial a mi esposa Gesem y a mi hija Erika por el apoyo moral brindado en todo momento, por los consejos y por animarme a seguir a delante durante los momentos más difíciles de esta etapa.

Tabla de contenido

	página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iv
Dedicatorias.....	vi
Agradecimientos.....	vii
Lista de figuras.....	xi
Lista de tablas.....	xvi
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1. Antecedentes	4
1.1.1. Ciclo reproductivo	4
1.1.2. Factores importantes en el cultivo de abulón.....	5
1.1.2.1. Acondicionamiento de reproductores.....	6
1.1.2.2. Métodos para determinar el estado de madurez gonadal.....	6
1.1.2.3. Métodos de Inducción al desove en abulón.....	8
1.2.3. Programas de crianza selectiva y mejoramiento genético.....	9
1.2.4. Híbridos de abulón.....	11
1.2.5. Estado actual de la producción de abulón en México.....	12
1.2.6. Generalidades de abulones de interés comercial en México.....	14
1.2.6.1. Abulón rojo <i>Haliotis rufescens</i>	14
1.2.6.2. Abulón amarillo <i>Haliotis corrugata</i>	15
1.2.6.3. Abulón azul <i>Haliotis fulgens</i>	15
1.2. Justificación.....	17
1.3. Hipótesis.....	17
1.4. Objetivos generales.....	18
1.4.1. Objetivos específicos.....	18
Capítulo 2. Materiales y métodos.....	19
2.1 Obtención de reproductores e inducción a la maduración.....	19
2.2 Identificación del sexo y estimación del grado de madurez sexual en abulón amarillo.....	20
2.2.1 Determinación del Índice Visual Gonadal (IVG).....	20
2.2.2 Validación histológica del estado de madurez gonadal.....	21
2.2.2.1 Colecta de organismos.....	21
2.2.2.2 Preparación de muestras.....	22
2.2.2.3 Determinación del estado de madurez gonadal.....	23
2.3 Método de inducción al desove y de obtención de gametos	24
2.3.1 Método de inducción al desove con TRIS-H ₂ O ₂	24
2.3.2 Biopsia del tejido gonadal en machos de abulón rojo	25
2.3.2.1 Obtención del esperma.....	25
2.3.2.2 Fertilización y evaluación del método de biopsia en machos de abulón rojo	25
2.3.3 Biopsia gonadal en hembras de abulón rojo	27

2.3.3.1 Obtención de ovocito.....	27
2.3.3.2 Fertilización y evaluación del método de biopsia en hembras de abulón rojo.....	28
2.4 Protocolos de producción de híbridos de abulón	29
2.4.1 Protocolo de producción de híbridos entre hembras de abulón rojo de granja y machos de abulón amarillo silvestre de Punta Canoas (cruza <i>RxAm</i>)	30
2.4.1.1 <i>Primer desove</i> : viabilidad del método de biopsia gonadal en cruza interespecífica <i>RxAm</i>	30
2.4.1.2 <i>Segundo desove</i> : efecto de la edad del ovocito en cruza interespecífica <i>RxAm</i>	31
2.4.1.3 <i>Tercer desove</i> : efecto de la concentración espermática en cruza interespecífica <i>RxAm</i>	33
2.4.2 Protocolo de producción de híbridos entre hembras de abulón rojo de granja y machos de abulón azul silvestre de Isla Guadalupe (cruza <i>RxAz-G</i>)	33
2.4.2.1 <i>Cuarto desove</i> : efecto de la concentración espermática en cruza interespecífica <i>RxAz-G</i>	34
2.4.2.2 <i>Quinto desove</i> : efecto de la edad del ovocito en cruza interespecífica <i>RxAz-G</i>	35
2.5 Desarrollo embrionario y larval en abulones híbridos.....	36
2.6 Fijación de larvas competentes y cultivo de juveniles.....	37
2.7 Desempeño de abulones híbridos.....	38
2.8 Análisis estadísticos de las cruzas.....	38
Capítulo 3. Resultados	40
3.1 Temperatura de maduración de abulón amarillo.....	40
3.2 Identificación del sexo y estimación del grado de madurez sexual.....	41
3.3 Histología del complejo hepatogonadal congelado.....	42
3.4 Viabilidad espermática del método de biopsia gonadal en machos de abulón rojo	46
3.5 Viabilidad de ovocitos obtenidos con biopsia.....	48
3.5.1 Análisis histológico de CHG de hembras sometidas a biopsia.....	50
3.6 Producción de híbridos interespecíficos.....	51
3.6.1 Hibridación entre hembras de abulón rojo y machos de abulón amarillo.....	51
3.6.2 Viabilidad del método de biopsia gonadal en cruza híbrida <i>RxAm</i>	51
3.6.3 Efecto de la edad del ovocito en la cruza híbrida <i>RxAm</i>	52
3.6.4 Efecto de la edad de la concentración de esperma en la cruza híbrida <i>RxAm</i>	54
3.7. Hibridación entre hembras de abulón rojo y machos de abulón azul de Isla Guadalupe....	57
3.7.1 Efecto de la concentración de esperma en la cruza híbrida <i>RxAz-G</i>	57
3.7.2 Efecto de la edad del ovocito en la cruza híbrida <i>RxAz-G</i>	60
3.8 Desarrollo ontogénico.....	62
3.9 Desempeño de progenies híbridas.....	66
3.9.1 Crecimiento de progenies híbridas en cultivo larval.....	66
3.9.2 Crecimiento de progenies híbridas en etapa postlarval y juvenil	66
3.9.3 Supervivencia de progenies híbridas.....	68

Capítulo 4. Discusiones	71
4.1 Temperatura como el principal factor promotor de la maduración del abulón amarillo.....	71
4.2 Histología del complejo hepatogonadal congelado.....	73
4.3 Viabilidad de los gametos obtenidos por biopsia gonadal	75
4.4 Optimización de los protocolos de fecundación interespecífica en tres especies de abulón: efecto de la concentración de esperma.....	79
4.5 Optimización de los protocolos de fecundación interespecífica en tres especies de abulón: efecto de la edad del ovocito.....	82
4.6 Desempeño de las progenies híbridas durante desarrollo embrionario y el cultivo larval de las progenies híbridas.....	84
4.6 Desempeño de la progenie híbrida durante la etapa de postlarval y juvenil.....	86
Capítulo 5. Conclusiones	89
Capítulo 6. Recomendaciones	91
Literatura citada	92
Anexos	104

Lista de figuras

Figura	Página
Figura 1. Fluctuaciones de la producción mundial de abulón; cantidad producida por captura y por acuicultura de 1960 a 2014 (FAO, 2016 a y b)	2
Figura 2. Anatomía interna de <i>Haliotis kamtschatkana assimilis</i> hembra.....	5
Figura 3. Apariencia de la gónada, sexado y asignación del índice visual gonadal (IVG) de acuerdo con la gravidez del organismo en <i>Haliotis fulgens</i>	8
Figura 4. (A) Producción nacional total de abulón de 1990 a 2014 y (B) cantidad producida por pesca y acuicultura durante el año 2014 (FAO, 2016; SAGARPA, 2013; SEPESCA, 2015).....	14
Figura 5. Características externas e internas de la concha de abulón rojo <i>H. rufescens</i> (A-B); abulón amarillo <i>H. corrugata</i> (C-D) y abulón azul de Isla Guadalupe <i>H. fulgens guadalupensis</i> (E-F).....	15
Figura 6. A) Distribución latitudinal y B) batimétrica de las poblaciones de abulón rojo <i>Haliotis rufescens</i> , amarillo <i>Haliotis corrugata</i> y azul <i>Haliotis fulgens</i>	16
Figura 7. Sistema de recirculación para cuarentena, mantenimiento e inducción a la maduración de abulones.....	19
Figura 8. Diseño experimental para evaluar la viabilidad del esperma extraído por biopsia en abulón rojo; CC es el tratamiento control en donde se usaron gametos extraídos por el método de TRIS-H ₂ O ₂ ; T1, T2 y T3 son tratamientos con diferentes concentraciones espermáticas evaluadas con un tiempo de contacto esperma-ovocito de 30 min; T4, T5 y T6, son tratamientos con tiempo de contacto esperma-ovocito de 50 min; T1 con T4 presentan la misma concentración de esperma, al igual que T2 con T5 y T3 con T6.....	26
Figura 9. Diseño experimental para evaluar la viabilidad de ovocitos extraídos por biopsia en abulón rojo; CC es el tratamiento control en donde se usaron gametos de abulón rojo obtenidos por el método de TRIS-H ₂ O ₂ (H ₂ O ₂); T1 tratamiento usando ovocitos obtenidos de biopsias del CHG de hembras de abulón rojo con previa inducción con TRIS-H ₂ O ₂ (C/I) y T2, de hembras sin inducción con TRIS-H ₂ O ₂ (S/I).....	29
Figura 10. Diseño experimental para evaluar la viabilidad del esperma obtenido por biopsia en cruza interespecíficas <i>RxAm</i> ; CC es el tratamiento de cruce control <i>RxR</i> y T1 el tratamiento experimental de cruce interespecífica <i>RxAm</i>	31
Figura 11. Diseño experimental para evaluar el efecto de la edad de los ovocitos (12, 15, 25 y 40 min postdesove) en cruza interespecíficas <i>RxAm</i> ; C1-C4 representan los	

tratamientos de cruce control <i>RxR</i> ; y T1-T4 los tratamientos experimentales de cruce interespecífica <i>RxAm</i>	33
Figura 12. Diseño experimental para evaluar el efecto de la concentración espermática en cruces interespecíficas <i>RxAm</i> ; CC es el tratamiento de cruce control <i>RxR</i> y T1-T3 los tratamientos experimentales de cruce interespecífica <i>RxAm</i>	34
Figura 13. Diseño experimental para evaluar el efecto de la concentración espermática en cruces interespecíficas <i>RxAz-G</i> ; C1-C3 es el tratamiento de cruce control <i>RxR</i> y T1-T3 los tratamientos experimentales de cruce interespecífica <i>RxAz-G</i>	35
Figura 14. Diseño experimental para evaluar el efecto de la edad de los ovocitos (11, 15 y 24 min postdesove) en cruces interespecíficas <i>RxAz-G</i> ; C1-C3 es el tratamiento de cruce control <i>RxR</i> y T1-T3 los tratamientos experimentales de cruce interespecífica <i>RxAz-G</i>	36
Figura 15. Temperatura registrada durante el acondicionamiento; TEA corresponde al área sombreada.....	40
Figura 16. Incremento del Índice Visual Gonadal (IVG) y °C·día acumulados para alcanzar los diferentes estadios de madurez en abulón amarillo.....	41
Figura 17. Asignación del grado de madurez de acuerdo al incremento en el IVG. A) Se muestra un organismo sin desarrollo gonadal (IVG 0); B), C) y D) se muestran las fases del desarrollo gonadal de una hembra con IVG de 1, 2 y 3, respectivamente. En E), F) y G) se muestra el desarrollo gonadal de un macho con un IVG de 1, 2 y 3, respectivamente.....	42
Figura 18. Características histológicas de tejido gonadal fijado y congelado de machos de abulón. A), B) y C) muestran la parte basal, media y apical, respectivamente, de una gónada fresca de <i>H. f. guadalupensis</i> ; las imágenes D), E) y F) muestran la parte basal, media y apical, respectivamente, de una gónada congelada de <i>H. f. guadalupensis</i> y las imágenes G), H) e I) muestran las partes basal, media y apical, respectivamente, de una gónada congelada de <i>H. corrugata</i> . Las letras muestran los lugares en donde se pueden observar algunas estructuras como: H : hepatopáncreas, Ec : espermatocito, Es : espermatozoides, L : lumen, t : túbulos espermáticos.....	43
Figura 19. Características histológicas de tejido gonadal fresco y congelado de hembras de abulón. A), B) y C) muestran la parte basal, media y apical, respectivamente, de una gónada fresca de <i>H. fulgens guadalupensis</i> ; las imágenes D), E) y F) muestran la parte basal, media y apical, respectivamente de una gónada congelada de <i>H. fulgens guadalupensis</i> y las imágenes G), H) e I) muestran las partes basal, media y apical, respectivamente de una gónada congelada de <i>H. corrugata</i> . Las letras muestran los lugares en donde se pueden observar algunas estructuras como: H : hepatopáncreas, Tb : Trabécula, OG : ovogonias, Oa : Ovocito atrésico, Ov : Ovocito N : núcleo.....	44
Figura 20. Características morfológicas e histología de las glándulas cónicas del complejo hepatogonadal (CHG) de abulón amarillo en diferentes estados de	

desarrollo: a) y b) indiferenciado; c) y d) macho en desarrollo, e) y f) hembra madura; g) y h) macho completamente maduro; i) y j) hembra parcialmente desovada. Cortes histológicos del CHG de abulón amarillo: i, ii y iii, corresponden a la parte basal, media y apical del cono, respectivamente. Las letras muestran los lugares donde se observan algunas estructuras como: **H**: hepatopáncreas, **Tb**: Trabécula, **OG**: ovogonias, **TG**: tejido gonadal, **GH**: glándula hepatopáncreal, **MG**: membrana gonadal, **MGI**: membrana gonadal interna, **V**: vitelo, **Oa**: Ovocito atrésico, **Ov**: Ovocito, **Ec**: Espermatozoides, **Es**: Espermatozoides, **L**: Lumen y **t**: túbulos espermáticos.....

45

Figura 21. A) Relación esperma/ovocito (esp/ov), B) Tasa de fecundación (%), C) Tasa de eclosión (%), D) Tasa de deformidad (%), E) Tasa de supervivencia (%) de los tratamientos. TC=tiempo de contacto esp/ov. La relación esp/ov y tasa de supervivencia se analizaron con un ANOVA paramétrico de una vía. La gráfica muestra la media y las barras indican el error estándar. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos ($P<0.05$). Las tasas de fecundación, eclosión y deformidades se analizaron con un ANOVA no paramétrico de Kruskal-Wallis. La gráfica muestra la mediana como una línea roja, las cajas indican los cuartiles y las barras indican los rangos registrados y las letras indican diferencias significativas ($P<0.05$).....

47

Figura 22. A) Relación esperma/ovocito (esp/ov), B) Tasa de fecundación (%) y C) Tasa de eclosión (%) de los tratamientos con ovocitos obtenidos por biopsia con (BCI) y sin (BSI) previa exposición al método de inducción con TRIS-H₂O₂. La relación esp/ov se analizó con un ANOVA paramétrico de una vía. La gráfica muestra la media y las barras indican el error estándar. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos ($P<0.05$). Las tasas de fecundación y eclosión se analizaron con un ANOVA no paramétrico de Kruskal-Wallis. La gráfica muestra la mediana como una línea roja y las barras indican los rangos registrados y las letras indican diferencias significativas ($P<0.05$).....

49

Figura 23. Características histológicas de las glándulas cónicas del CHG de hembras de abulón rojo *H. rufescens* sometidas a biopsias con previa exposición a TRIS-H₂O₂ (B C/I) y sin exposición (B S/I); corte transversal de la parte media y apical: **H**: hepatopáncreas, **Tb**: Trabécula, **N**: núcleo, **L**: lumen, **Og**: ovogonias, **Ov**: Ovocito y **Oa**: Ovocito atrésico.....

50

Figura 24. A) Tasa de fecundación (%) y B) Tasa de eclosión (%) de las cruza conespecíficas *RxR* e interespecíficas *RxAm*. Tasas de fecundación y eclosión se analizaron con un ANOVA no paramétrico de Kruskal-Wallis. La gráfica muestra la mediana como una línea roja, las barras indican los rangos registrados y las letras indican diferencias significativas ($P<0.05$).....

53

Figura 25. Tasas de supervivencia de las progenies *RR* y *RAm* durante la evaluación del efecto de la edad del ovocito.....

54

Figura 26. A) Relación esperma/ovocito (esp/ov), B) Tasa de fecundación (%), C) Tasa de eclosión (%) y D) Tasa de deformidad (%) de la craza conespecífica *RxR* (CC) e

- interespecíficas *RxA_m* (T1, T2 y T3). La relación esp/ov se analizó con un ANOVA paramétrico de una vía. La gráfica muestra la media y las barras indican el error estándar. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0.05$). Las tasas de fecundación, eclosión y deformidad se analizaron con un ANOVA no paramétrico de Kruskal-Wallis. La gráfica muestra la mediana como una línea roja y las barras indican los rangos registrados, y las letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$)..... 55
- Figura 27.** Tasas de supervivencia de las progenies *RR* y *RA_m* obtenidas en el tercer desove donde se evaluó el efecto de la concentración espermática. Las letras indican los tratamientos con diferencias significativas ($P < 0.05$)..... 56
- Figura 28.** Relación espermato/ovocito (esp/ov), B) Tasa de fecundación (%) C) Tasa de eclosión (%) y D) Tasa de deformidad (%) de las cruces conespecíficas *RxR* (C1, C2 y C3) e interespecíficas *RxAz-G* (T1, T2 y T3) con diferentes concentraciones de espermato. La relación de esp/ov se analizó con un ANOVA paramétrico de una vía. La gráfica muestra la media y las barras indican el error estándar. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0.05$). Las tasas de fecundación, eclosión y deformidad se analizaron con un ANOVA no paramétrico de Kruskal-Wallis. La gráfica muestra la mediana como una línea roja y las barras indican los rangos registrados, y las letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$)..... 58
- Figura 29.** Tasas de supervivencia de las progenies *RR* (C1, C2 y C3) y *RAz-G* (T1, T2 y T3) obtenidas en el cuarto desove donde se evaluó el efecto de la concentración espermática..... 59
- Figura 30.** A) Tasa de fecundación (%), B) Tasa de eclosión (%) y C) Tasa de deformidad (%) de las cruces conespecíficas *RxR* (C1-C3) e interespecíficas *RxAz-G* (T1-T3) a diferente edad de ovocito. Los datos se analizaron con un ANOVA no paramétrico de Kruskal-Wallis. La gráfica muestra la mediana como una línea roja, las barras indican los rangos registrados y las letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$)..... 61
- Figura 31.** Tasas de supervivencia de las progenies *RR* (C1-C3) e interespecíficas *RAz-G* (T1-T3) obtenidas en el quinto desove donde se evaluó el efecto de la edad del ovocito..... 62
- Figura 32.** Estadios de clivaje y desarrollo ontogénico de larvas híbridas *RA_m*. A) Fecundación B) expulsión del primer cuerpo polar, C) primera división, D) segunda división, E) 6 a 16 células, F) mórula G) blástula H) larva trocófora sin eclosionar, I) larva trocófora temprana (recién eclosionada), J) larva veliger con protoconcha formada, K) aparición de manchas oculares, L) formación de la espina en el metápodo y aparición del opérculo, M) aparición de tentáculo cefálico, N) aparición de cilios en la parte plana del pie, Ñ) tentáculo cefálico con la tercera ramificación y O) postlarva..... 63
- Figura 33.** Estadios de clivaje y desarrollo ontogénico de larvas híbridas *RAz-G*. A) fecundación B) primera división, C) segunda división, D) 6 a 16 células, E) mórula F) gástrula G) formación de la cintura prototroncal, H) larva trocófora I) larva veliger con protoconcha formada, J) torción de la masa cefalopodal, K) formación de la espina

en el metápodo y aparición del opérculo, L) aparición de tentáculo cefálico, M) aparición de cilios en la parte plana del pie, N) aparición de espina corta en el tentáculo cefálico, Ñ) tentáculo cefálico con la tercera ramificación y O) postlarva..	64
Figura 34. Crecimiento larval de las progenies <i>RR</i> y <i>RAm</i> (A) y <i>RR</i> y <i>RAz-G</i> (B) durante seis días de cultivo. Las barras indican el error estándar y las letras indican diferencias significativas ($P<0.05$) entre los tratamientos.....	67
Figura 35. Crecimiento de PL de las progenies <i>RR</i> y <i>RAm</i> (A) y <i>RR</i> y <i>RAz-G</i> (B) durante 180 y 60 días de cultivo, respectivamente. Las barras indican el error estándar. $n=10$ y 15 en las progenies <i>RR</i> y <i>RAm</i> , respectivamente; $n=17$ en la progenie <i>RR</i> y $n=47$ en la progenie <i>RAz-G</i> ; las letras indican diferencias significativas ($P<0.05$) entre los tratamientos.....	69
Figura 36. Supervivencia de PL de las progenies <i>RR</i> y <i>RAm</i> (A) y <i>RR</i> y <i>RAz-G</i> (B) durante 180 y 60 días de cultivo, respectivamente.....	70
Figura 37. Vista externa e interna de la concha del abulón y vista de un organismo con concha y desconchado. Se puede observar la ubicación de los principales órganos internos y externos de un abulón amarillo (<i>Haliotis corrugata</i>). En la imagen se señala la ubicación de las branquias (Br), tejido gonadal (G), hepatopáncreas (H), callo (Ca), manto (M), cabeza (C), tentáculo cefálico (TC), ojos (O), pie (P), epipódios (EP); de igual forma se muestra la vista externa e interna de la concha (CE y CI, respectivamente) así como los poros respiratorios (PR).....	107
Figura 38. Biopsia del complejo hepatogonadal para la extracción de esperma viable A) cono de abulón rojo macho. B) colecta de esperma C) concentración de esperma.....	108
Figura 39. Características histología de la zona apical del CHG de <i>H. fulgens guadalupensis</i> en diferentes estadios de desarrollo. a) hembra desovada, b) macho maduro, c) indeterminados. Las letras muestran los lugares en donde se pueden observar algunas estructuras como: H) hepatopáncreas, Tb)Trabécula, OG)ovogonias, MG)membrana gonadal, ee)epitelio externo, Oa) ovocito atrésico, Ov) ovocito, Ec) espermatozoides, Es) espermatozoides, L) lumen, T) túbulos espermáticos, TG) tejido gonadal.....	110

Lista de tablas

Tabla	Página
Tabla 1. Descripción de estadios de madurez gonadal en <i>Haliotis fulgens</i> y <i>Haliotis corrugata</i> , características obtenidas y modificadas de Vélez-Arellano <i>et al.</i> (2015).	21
Tabla 2. Descripción de estadios de madurez gonadal en <i>Haliotis fulgens</i> y <i>Haliotis corrugata</i> , tomada y modificada de Capinpin <i>et al.</i> (1998) y Vélez-Arellano <i>et al.</i> (2015).....	23
Tabla 3. Tiempos de desarrollo embrionario y larval en progenie híbridas de <i>H. rufescens</i> x <i>H. corrugata</i> (RAm) y <i>H. rufescens</i> x <i>H. fulgens guadalupensis</i> (RAz-G).....	65
Tabla 4. Resumen de parámetros de producción de progenies híbridas RAm/RAz-G y sus respectivos controles RR.....	68
Tabla 5. Porcentajes de fecundación, eclosión, deformidad y supervivencia larval registrados en la prueba experimental de viabilidad de esperma extraído a través de biopsia del tejido gonadal. Las letras indican diferencias significativas.....	110
Tabla 6. Porcentajes supervivencia larval y tasa de rendimiento por tratamiento registrados en la prueba experimental de viabilidad de esperma extraído a través de biopsia del tejido gonadal.....	110
Tabla 7. Porcentajes de fecundación y eclosión larval registrados en la prueba experimental de viabilidad de ovocitos extraído a través de biopsia del tejido gonadal en hembras de abulón. Los tratamientos con diferencias significativas se indican con una letra.....	110
Tabla 8. Resumen de parámetros en las cruzas RxR y RxAm realizadas durante la optimización de los protocolos de fecundación <i>in vitro</i>	111
Tabla 9. Porcentajes de fecundación y eclosión registrados en la cruce experimental RxAm (segundo desove).....	111
Tabla 10. Porcentajes de fecundación, eclosión, deformidad y supervivencia larval registrados durante la evaluación de concentración de esperma en cruzas RxAm (tercer desove).....	112
Tabla 11. Resumen de parámetros en las cruzas RxR y RxAz-G realizadas durante la evaluación de concentración de esperma para optimizar protocolos de fecundación <i>in vitro</i> (cuarto desove).....	112
Tabla 12. Porcentajes de de eclosión y deformidad larval registrados en la primera prueba experimental de cruzas RxAz-G (cuarto desove).....	112

Tabla 13. Resumen de las condiciones de las cruzas <i>RxR</i> y <i>RxAz-G</i> y los parámetros obtenidos de la prueba en donde se evaluó el efecto de la edad del ovocito para optimizar los protocolos de fecundación <i>in vitro</i> de la craza <i>RxAz-G</i>	113
Tabla 14. Tasa de crecimiento diario de la progenie híbrida RAm y su control RR.	113
Tabla 15. Tasa de crecimiento diario de la progenie híbrida RAz-G y su control RR.....	113

Capítulo 1. Introducción

Los abulones son moluscos marinos pertenecientes a la clase gasterópoda y al mono género *Haliotis* (Leighton, 2000). Se pueden localizar en casi todo tipo de nichos marinos, distribuidos tanto en aguas templadas como en aguas tropicales (Geiger y Owen, 2012).

Se caracterizan por presentar una concha en forma de oreja con colores, texturas y una serie de perforaciones en el costado izquierdo de ésta, el número varía dependiendo de la especie y edad de los organismos, permitiendo clasificar las especies que conforman este género (Owen, 1971; Geiger y Owen, 2012). La parte interna de la concha muestra iridiscencia en la mayoría de las especies, lo cual, sumado a las características externas, de epipodios y pie, permiten diferenciar entre las especies de abulón (Owen, 1971).

Existen alrededor de 56 especies en el mundo, la mayoría se encuentran en fondos someros en regiones templadas y tropicales (Geiger y Owen, 2012). Los abulones habitan sobre sustratos rocosos alimentándose de microflora bentónica en estadios tempranos principalmente postlarva y juvenil y de macroalgas cuando son adultos (Booolootian, *et al.*, 1962; Lindberg, 1992; Leighton, 2000). La mayoría de las especies de abulón se pueden localizar entre los primeros 60 metros de profundidad (Leighton, 2000; Geiger y Owen, 2012) aunque se han registrado organismos que pueden habitar cerca de los 100 m de profundidad (Freeman, 2001; Geiger y Owen, 2012). No obstante, se considera que menos de 20 especies en el mundo alcanzan tallas apropiadas para poder ser explotados por pesquerías comerciales y acuicultura (Leighton, 2000; Spencer, 2002).

Los abulones se consideran como uno de los productos más apreciados en el mercado internacional, llegando a alcanzar valores de hasta 30 USD/kg (Cook, 2014). En términos de producción contribuyen con un 8 % de la producción mundial de moluscos equivalentes a más de 128 mil toneladas (t; FAO, 2016a). En los años 70s, la producción mundial de abulón por captura se estimó en 19,720 t; por otro lado, la producción acuícola, que era una actividad que se comenzaba a desarrollar, solo reportaba un volumen de 50 t (FAO, 2016a). Actualmente la extracción mundial de abulón por pesquería ha decrecido hasta las 7,486 t anuales, mientras que la producción por acuicultura ha rebasado las 128 mil t (Fig. 1; FAO, 2016b).

Una de las causas por las que se incrementó el cultivo de abulón a nivel mundial, es debido a la disminución significativa en su producción pesquera y por consiguiente al efecto que este fenómeno tuvo sobre su demanda y en su valor comercial (Troell *et al.*, 2006).

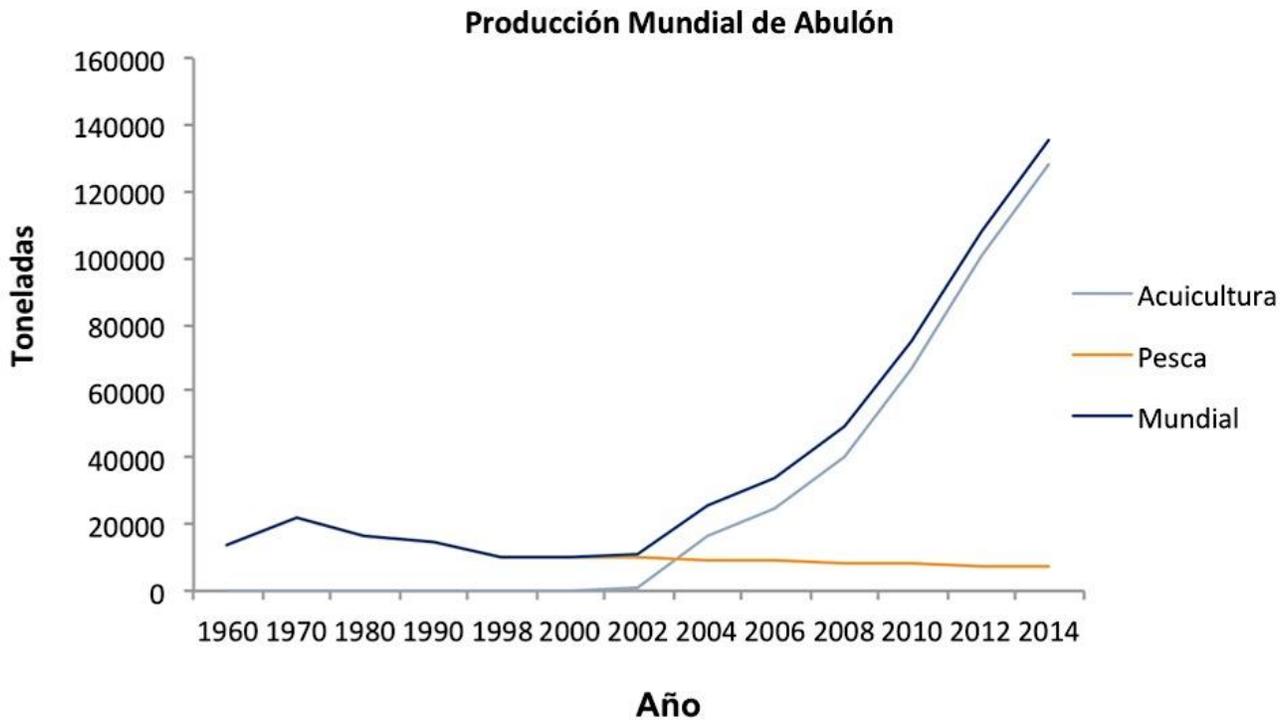


Figura 1. Fluctuaciones de la producción mundial de abulón; cantidad producida por captura y por acuicultura de 1960 a 2014 (FAO, 2016 a y b).

El primer paso para el cultivo del abulón es la producción de semilla de calidad, no obstante para poder generar semilla con características adecuadas para su cultivo es imprescindible abordar tres puntos clave: 1) la producción de lotes de reproductores, 2) el conocimiento sobre la biología reproductiva de los organismos y 3) implementar programas de crianza selectiva con base en líneas de reproductores seleccionados (mejoramiento genético) (McCormick, 2000; Freeman, 2001).

Es una práctica común coleccionar abulones silvestres y usarlos como pie de cría inicial, lo que tiene como consecuencia que las épocas de producción de semilla estén sujetas a las épocas de desove en el medio natural (McCormick, 2000). En las granjas con frecuencia los reproductores son seleccionados de los mismos lotes de engorda, generalmente progenie F1. No obstante por las condiciones en las cuales se cultivan las épocas de cría siguen estando asociadas a las épocas de desove natural (Freeman, 2001).

Otro punto importante en el cultivo del abulón es la manipulación de los factores que afectan los procesos de maduración, desove y fecundación de las diferentes especies. Los abulones pueden ser acondicionados y desovados predeciblemente en cultivo a través de la exposición a condiciones que les proporcione un ambiente favorable. Muchos estudios respaldan que la temperatura y el fotoperiodo son los factores con más influencia en la maduración, cuando existen las condiciones alimenticias adecuadas (Uki y Kikuchi, 1984; Ritar, 2004; Leighton, 2008).

Con respecto a las tasas de fecundación, los factores más determinantes son la edad de los gametos, el tiempo de contacto y la relación esperma:ovocito (Leighton y Lewis, 1982; Baker y Tyler, 2001). Por ejemplo, en algunas especies de abulón como *Haliotis rufescens* los espermias pueden permanecer viables hasta 6 horas post desove a temperatura ambiente sin afectar la tasa de fecundación (Ebert y Hamilton, 1983), y en el caso del abulón azul *H. fulgens* existe evidencia de que el espermia preservado a temperaturas de 5 °C puede mantenerse viable hasta por una semana, sin embargo la tasa de fecundación se ve afectada significativamente después de 24 horas (Leighton, 2000). En contraste, los gametos femeninos pierden viabilidad en tiempos más cortos, y en algunos casos como *H. rufescens* bajar la temperatura del agua a 12 °C afecta la fecundación y disminuye el tiempo de viabilidad de los ovocitos (Ebert y Hamilton, 1983). Otras especies como *H. asinina* han demostrado bajar las tasas de fecundación después de 2 horas (Encena *et al.*, 1998) *H. tuberculata* no presenta fecundación después de 2.5 h (Baker y Tyler, 2001) y *Haliotis gigantea* poseen intervalos mucho más cortos de longevidad de los ovocitos, en esta especie el éxito en las tasas de fecundación puede disminuir drásticamente después de 10 minutos de edad de los ovocitos (Ahmed *et al.*, 2008).

Otro paso importante para lograr una producción de semilla de alta calidad es implementar programas de crianza selectiva basados en líneas de reproductores seleccionados con la finalidad de llevar a cabo un programa de mejoramiento genético de la especie en cuestión (Gjedrem *et al.*, 2012; Gjedrem y Rye, 2016).

Actualmente existe mucha información sobre estudios genéticos en abulón involucrados en el mejoramiento de rasgos de interés acuícola, como el aumento en las tasas de crecimiento, supervivencia, resistencia a enfermedades y a variaciones climáticas, principalmente a la temperatura (Hayes *et al.*, 2007; Kube *et al.*, 2007; Hart *et al.*, 2013; Difford, *et al.*, 2017). Algunas de las técnicas empleadas para esto son el desarrollo de organismos triploides (Jee y Chang, 1995; Yan y Chen, 2001; Dunstan *et al.*, 2007); cría selectiva (Hayes *et al.*, 2007; Neira, 2010), criopreservación de espermia (Salinas-Flores *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2014) e hibridación (Elliot, 2000; Kijima y Park, 2002; Lafarga-De la Cruz y Gallardo-Escárte, 2011). El

objetivo de este trabajo es aportar información que pueda ayudar a optimizar protocolos de fecundación *in vitro* entre tres especies de abulón para producir descendencia híbrida viable, así como evaluar su desempeño, en términos de crecimiento y supervivencia, durante su desarrollo larval y postlarval.

1.1. Antecedentes

1.1.1. Ciclo reproductivo

El ciclo reproductivo de un organismo es caracterizado por las fases de desarrollo que presenta la gónada de individuos que han alcanzado la madurez sexual. Las fases van desde el reposo hasta la expulsión de gametos maduros, pasando antes por la producción y maduración de éstos (Ault, 1985). Las fases de maduración que se han descrito en abulón varían respecto de los autores, sin embargo, la mayoría incluyen las fases de: 1) gametogénesis, 2) incremento en el tamaño de la gónada y maduración de gametos, 3) desove, 4) reabsorción de gametos no desovados y 5) reposo (Hahn, 1989).

Los abulones son organismos dioicos, poseen sexos separados y diferenciados durante las épocas de reproducción. En organismos maduros la gónada envuelve la glándula digestiva y juntos forman un cono llamado apéndice cónico o complejo hepatogonadal (Leighton, 2008). Los abulones no presentan cromosomas sexuales heteromórficos, por lo que no es posible distinguir a los machos de las hembras por medio de un análisis cromosómico (Gallardo-Escárte *et al.*, 2005). La diferenciación de sexos se puede hacer únicamente en organismos maduros a través de una inspección visual del color del apéndice cónico, el cual se encuentra entre la concha y el pie, en la parte posterior del animal opuesta al lado en donde se encuentran los poros respiratorios (Booolootian *et al.*, 1962).

El color de la gónada depende de las especies, pero en general los machos tienden a presentar colores blancos o cremas, mientras que las hembras obtienen colores oscuros, como verde, verde grisáceo o café verdoso en algunos casos (Fig. 2; Booolootian *et al.*, 1962; Leighton, 2008).

En hembras maduras, el ovario está compuesto de tejido conectivo y fibras musculares (trabéculas) que se proyectan desde la pared externa de la gónada hacia la glándula digestiva. En la parte interna del ovario se delinea el epitelio germinal donde se desarrollan las ovogonias, que darán lugar a los ovocitos (Hahn, 1989). En machos, el testículo presenta tubos de tejido conectivo que se ramifican de la pared externa del testículo hacia la pared interna. Los tubos están rodeados por epitelio germinal donde se originan las espermatogonias (Young y DeMartini, 1970).

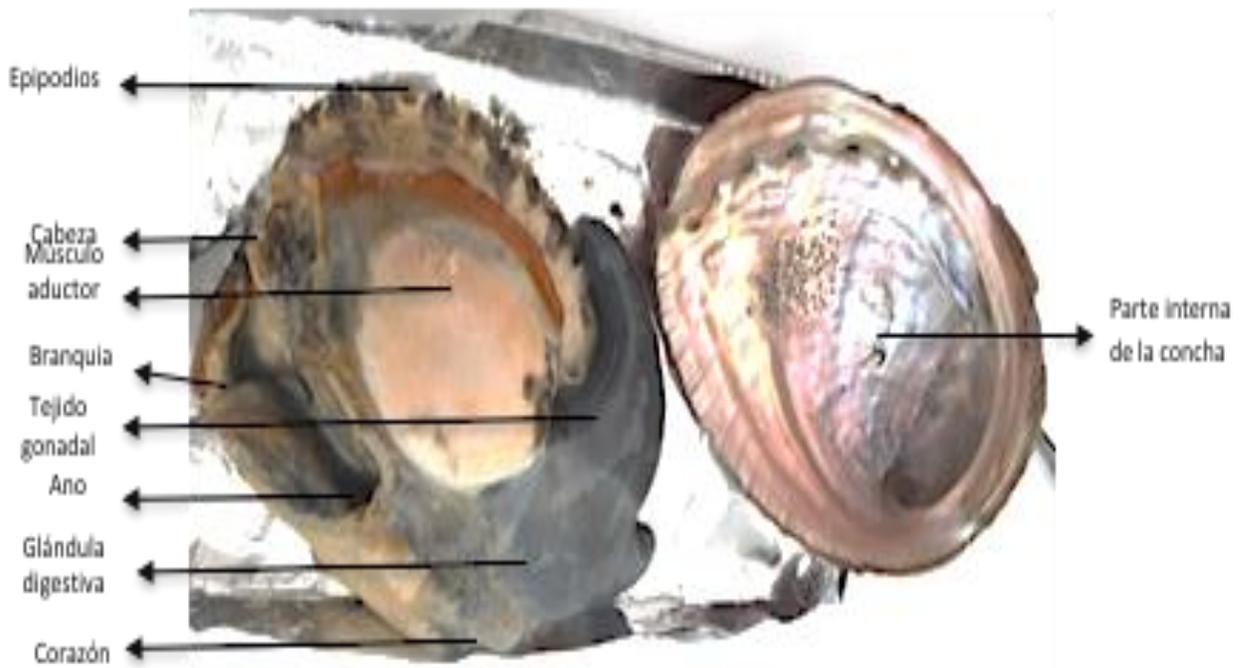


Figura 2. Anatomía interna de *Haliotis kamtschatkana assimilis* hembra.

La maduración de la gónada es un proceso que demanda energía, debido a la movilización de nutrientes hacia este tejido durante el desarrollo y la maduración de los gametos. Para manipular las estaciones de cría y hacer un óptimo manejo de reproductores dentro de los cultivos acuícolas es necesario conocer los factores que influyen en la maduración de los abulones (Uki y Kikuchi, 1984).

1.1.2. Factores importantes en el cultivo de abulón

Un punto clave en la acuicultura del abulón es la adquisición de reproductores maduros. Un cultivo exitoso depende del acceso a los reproductores (Freeman, 2001). Las tres fuentes de reproductores de abulón son: 1) abulones silvestres listos para desovar, lo cual hace que la producción de semilla dependa en gran medida de las épocas reproductivas naturales, 2) primera o generaciones posteriores de abulones cultivados, en granjas es una práctica común seleccionar organismos dentro de los lotes de engorda, no obstante, debido a las formas en que se cultivan los abulones las épocas de producción de semilla suelen estar sujetas a las estaciones de cría que se dan en el medio natural (McCormick, 2000); 3) abulones silvestres acondicionados; acondicionar los organismos y usarlos como reproductores es una práctica que se ha incrementado en el mundo (Freeman, 2001), esto permite manipular las épocas de cría y tener un mayor manejo y control sobre la producción de semilla.

1.1.2.1. Acondicionamiento de reproductores

Hasta hace poco el cultivo de abulones se ha basado en la captura e inducción al desove de reproductores silvestres, no obstante, este proceso puede verse afectado por variaciones espaciales y temporales de la gravidez de los reproductores y el estrés de captura y transporte (Ritar, 2004).

La manipulación de los factores que afectan los procesos de maduración, desove y fecundación de las diferentes especies de abulón son cruciales para su cultivo. La temperatura y el fotoperiodo son los factores con más influencia en el desarrollo de la gónada. No obstante, la temperatura es el principal factor que afecta la tasa de desarrollo gonadal (Ritar, 2004). Esta tiene un efecto acumulativo una vez que excede el punto del cero biológico (PCB o BZP, *Biological Zero Point*), el cual es el punto de partida para que los organismos desarrollen gónada (Maeda-Martínez, 1995; Leighton, 2008).

Otras formas de alcanzar la gravidez es exponer a los organismos a un fotoperiodo en combinación con la temperatura como en el caso de *H. fulgens* (Maeda-Martínez, 1995). En el caso del abulón rojo toda vez que dispongan de alimento de buena calidad y cantidad pueden producir gónada durante todo el año (Ault, 1985).

La habilidad de controlar la temperatura ayuda a acortar el tiempo para que los abulones maduren (Ritar, 2004; Leighton, 2008). El efecto de la temperatura en la maduración ha sido ampliamente documentado (Kikuchi y Uki, 1974; Maeda-Martínez, 1995; Leighton, 2008). Se han realizado cálculos que predicen de manera segura el tiempo requerido para alcanzar la maduración en una especie expuesta a diferentes temperaturas. Uki y Kikuchi (1984) estimaron que la Temperatura Efectiva Acumulada (TEA) necesaria para que el abulón japonés *H. discus hannai* alcance un estado de gravidez adecuado es de 1500 °C·día o mayor. Similarmente, el abulón australiano *H. rubra* necesita una TEA mínima de 1350 °C·día (en machos) para alcanzar la madurez sexual, mientras que otro abulón australiano, *H. laevigata*, requiere de al menos 1700 °C·día (en machos; Grubert y Ritar, 2004). A pesar de la importancia de este parámetro en la producción de semillas, la temperatura efectiva acumulada para obtener organismos sexualmente maduros en las especies del noroeste del Pacífico, no se encuentra descrita.

1.1.2.2. Métodos para determinar el estado de madurez gonadal

Cuando los abulones presentan gónada se puede diferenciar el sexo observando su color. La gónada madura representa del 15 al 20 % del peso corporal del abulón (Hahn, 1989). Uno de los métodos utilizados para determinar el estado de madurez de los abulones es por medio de índices gonádicos, los cuales

relacionan el peso o talla de la gónada con respecto del organismo (Ault, 1985; Hahn, 1989; Capinpin *et al.*, 1998; Vélez-Arrellano *et al.*, 2016).

El Índice Gonádico (IG) se basa en el peso húmedo o seco de la gónada en relación al peso húmedo o seco del abulón. El Índice Gonádico Volumétrico (IGV) calcula el porcentaje de la gónada en el apéndice cónico, este considera la variación en tamaño de la glándula digestiva. El IGV de Tutschulte y Connell (1981; IGVTC) calcula un estimado del volumen de la gónada asumiendo que toda la gónada está contenida en un apéndice cónico.

El método histológico es un procedimiento práctico para evidenciar la estructura y composición celular de la gónada. Este procedimiento está compuesto de seis fases: (1) toma de la muestra, (2) fijación, (3) inclusión, (4) microtomía, (5) tinción y (6) montaje y observación al microscopio (Basto-Cuevas, 2009).

La asignación a un estadio de madurez se basa 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).

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.

Por otro lado, el método visual, denominado Índice Visual Gonadal (IVG) es el más utilizado en organismos que se usan como reproductores, dado que es el único método que no implica sacrificar al organismo. Leighton (2008), relaciona el estado de gravidez de los organismos con el abultamiento que presentan en la zona del complejo hepatogonadal (CHG). Este método asume que el abultamiento se debe a la cantidad de gametos que contiene la gónada y a su estado de madurez, no obstante, no considera el abultamiento que se debe a la cantidad de alimento en la glándula digestiva de un organismo bien alimentado (Booolootian *et al.*, 1962). El IVG es un método cualitativo al cual se asigna un estadio de madurez de acuerdo con una escala que va de 0 a 3 en donde 0 es asignado a organismos que se encuentran indiferenciados y que aún no presentan desarrollo de tejido gonadal y el 3 es el punto más alto de gravidez

que puede alcanzar un organismo, por lo regular a los organismos en los que el abultamiento del tejido gonadal sobresale de la concha cuando se ve al organismo horizontalmente (Fig. 3).

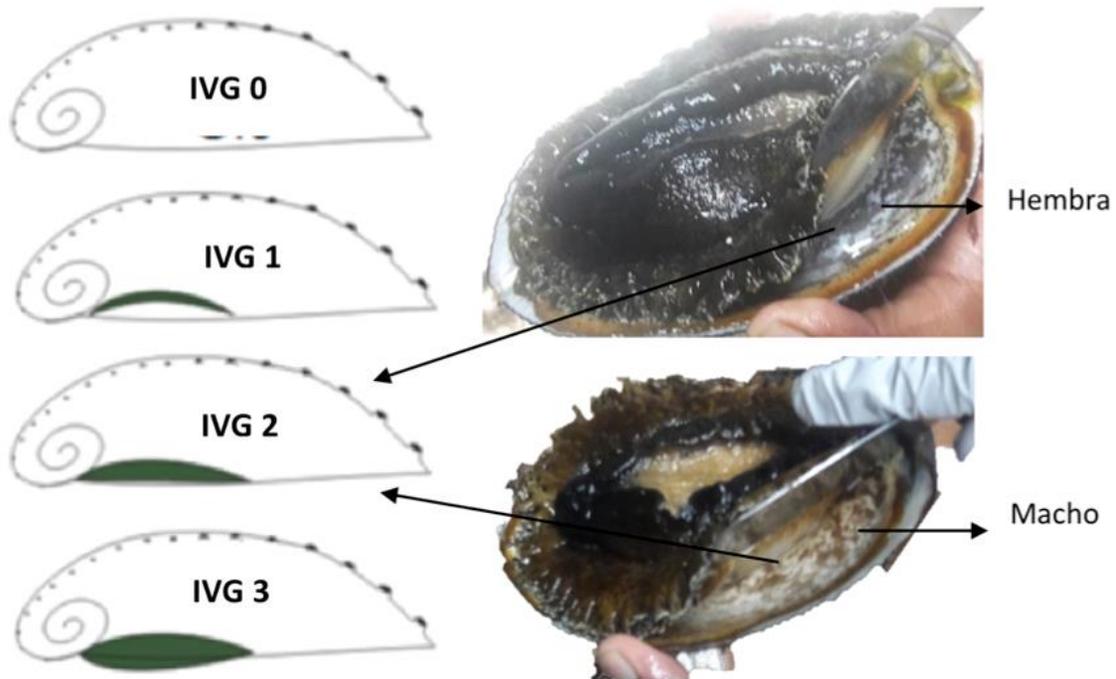


Figura 3. Apariencia de la gónada, sexado y asignación del Índice Visual Gonadal (IVG) de acuerdo con la gravidez del organismo en *Haliotis fulgens*.

1.1.2.3. Métodos de inducción al desove en abulón

El paso siguiente a la maduración, acondicionamiento y a la evaluación del estado de madurez de los reproductores es proveer a los organismos con los estímulos necesarios para activar la expulsión de los gametos (desove). El abulón desova en respuesta a una variedad de estímulos químicos como compuestos bioactivos presentes en el agua, incluyendo la señal de los mismos gametos; y físicos como rápidos cambios en la temperatura del agua, entre otros (Leighton, 2000; Setyono, 2006; Leighton, 2008). El desarrollo de las técnicas de inducción al desove por Morse *et al.* (1977) y Kikuchi y Uki (1974) permitió el cultivo de diferentes especies de abulones a nivel mundial. Estas técnicas implican exponer a los abulones por varias horas a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) o luz ultravioleta (UV) para producir radicales libres de hidroperóxido ($HOO\cdot$) y oxígeno ($O_2\cdot^-$), que inducen la actividad de la enzima ciclo-oxigenasa (COX) para promover la síntesis de prostaglandinas (PGs) a partir del ácido araquidónico, las cuales estimulan las gónadas e inducen la liberación de los gametos en organismos grávidos.

Sin embargo, la efectividad del método de TRIS-H₂O₂ descrito por Morse *et al.* (1977) depende del estado de madurez gonadal y en ocasiones el estímulo que la adición de estos reactivos produce en los organismos suele no ser suficiente para hacerlos desovar y es muy frecuente tener que incrementar las dosis de estos reactivos o combinar este método con un periodo previo de desecación de los organismos o bien, un aumento en la temperatura del agua para lograr que los organismos desoven (Leighton, 2008; Lafarga-De la Cruz, 2010). Por lo cual, otro estímulo comúnmente usado son periodos de exposición a la desecación, un rápido incremento de 3-5 °C de la temperatura del agua, seguida de un enfriamiento gradual en condiciones de obscuridad. Este último método puede ser usado en conjunto con la luz UV o el peróxido de hidrógeno para incrementar la probabilidad del éxito de los desoves (McCormick, 2000).

En sus hábitats naturales, los abulones tienden a agruparse para sincronizar los desoves liberando los gametos directamente en la columna de agua, por lo cual la presencia de gametos también se utiliza como un estímulo para inducir el desove masivo de abulones (Leighton, 2008).

Asegurar la obtención de gametos es un paso crucial para poder generar semilla y para poder impulsar el cultivo de cualquier especie de abulón. No obstante, de las especies de abulón que existen en México solo se ha logrado estandarizar la inducción en los cultivos comerciales del abulón rojo. Por otro lado, en especies como el abulón amarillo y el abulón azul la información sobre métodos de inducción al desove estandarizados por medio de los cuales se pueda obtener gametos viables en laboratorio es escasa y estos actualmente son reproducidos con una combinación de los métodos de exposición a la desecación seguida de choque térmico o exposición a agua irradiada con luz UV. En el caso de las cooperativas que producen larvas de abulón azul y amarillo para repoblamiento, éstos dependen de la temporada reproductiva natural dado que toman organismos silvestres durante su época reproductiva. Es común que organismos que no presentan desarrollo gonadal avanzado (IVG=3) expulsen pulsos de esperma u ovocitos y posteriormente inhiban su desove, o bien que estos nunca desoven (Comunicación personal Noé García Cruz, Abulones Cultivados S. A. de C. V.). En programas de mejoramiento genético es indispensable tener métodos estandarizados que aseguren la obtención de gametos viables (McCormick, 2000).

1.2.3. Programas de crianza selectiva y mejoramiento genético

Otro punto importante para un desarrollo de una industria acuícola competitiva es plantear estrategias de crianza selectiva y programas de mejoramiento genético (Liu y Cordes 2004; Gjedrem *et al.*, 2012; Gjedrem y Rye, 2016).

Algunos estudios han mostrado el incremento en las tasas de crecimiento de los organismos triploides, atribuible a su esterilidad, y que pueden crecer más rápido al no dirigir energía a la reproducción (Jee y Chang, 1995; Yan y Chen, 2001; Dunstan *et al.*, 2007). Por otro lado, se han generado planes de cría selectiva, que consisten en seleccionar familias de acuerdo a los promedios de los organismos cultivados y el desempeño que tengan dentro de la familia (Hayes *et al.*, 2007; Neira, 2010). Otro tipo de selección es la selección asistida por marcadores moleculares, la cual se basa en la detección de loci asociados a rasgos cuantitativos (QTLs), que permiten obtener una ganancia en rasgos como crecimiento, peso muscular, peso de concha, entre otros, en menor tiempo que la selección no asistida (Hayes *et al.*, 2007; Baranski *et al.*, 2008; Ren *et al.*, 2016). Asimismo, en varias especies se han descrito técnicas efectivas para almacenar a corto y largo plazo el esperma de abulones, lo que permitirá resguardar y optimizar el uso del material genético de progenitores de alto rendimiento (Salinas-Flores *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2014).

Por otro lado, la hibridación entre especies de abulones es otra alternativa para potenciar el rendimiento de los organismos (Elliot, 2000; Kijima *et al.*, 2002; Lafarga-De la Cruz y Gallardo-Escárte, 2011). La hibridación es la cruce de dos individuos o grupos genéticamente diferentes (Lafarga-De la Cruz y Gallardo-Escárte, 2011) y puede involucrar varios tipos de cruces, como la hibridación intraespecífica que se refiere a la cruce entre organismos que pertenecen a una misma especie, pero en este caso el material genético ya está diferenciado entre subpoblaciones; o bien la hibridación interespecífica que se refiere al cruzamiento entre organismos de diferentes especies, que pueden o no cohabitar un determinado espacio geográfico (Culley y Hardiman, 2009).

Los híbridos usualmente presentan característica morfológica intermedias entre las dos especies parentales, mayor crecimiento adaptación a condiciones ambientales y mejor calidad de carne, son las características más resaltables de los híbridos (Kong *et al.*, 2016).

En acuicultura, el uso de híbridos se ha visto como una alternativa para el mejoramiento de rasgos deseables en algunas especies de peces y moluscos, entre ellas los abulones (Allen *et al.*, 2016; Abass *et al.*, 2016; Lafarga-De la Cruz y Gallardo-Escárte, 2011; Michalek *et al.*, 2016).

1.2.4 Híbridos de abulón

Los híbridos entre abulones se han descrito desde los años 70s con los estudios realizados por Owen y colaboradores (1971), en donde se examinaron varios miles de especímenes y conchas de abulón provenientes de la actividad pesquera y se observó la presencia de una cantidad considerable de híbridos naturales entre muchas de las especies de abulón del Pacífico. Posteriormente, hibridaciones

experimentales realizadas por Leighton y Lewis (1982) corroboraron las afinidades interespecíficas entre algunas de las especies de abulón de California.

Trabajos posteriores han logrado establecer una mayor cantidad de cruzas híbridas posibles entre diversas especies de abulón alrededor del mundo (Zheng, 2006; Lafarga-De la Cruz y Gallardo-Escárate, 2011; Luo *et al.*, 2013; You *et al.*, 2015). Los organismos resultantes han logrado demostrar rasgos como: mayor resistencia a enfermedades (Dang, *et al.*, 2011; González, *et al.*, 2014), mayor tolerancia térmica (Lafarga-De la Cruz *et al.*, 2013; Hooper *et al.*, 2014; Liang *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2016), tasas de supervivencia y crecimiento superiores o promedio entre las especies parentales (Leighton y Lewis, 1982; Leighton, 2000; Lafarga-De la Cruz, 2010; Lafarga-De la Cruz y Gallardo-Escaráte, 2011); lo cual podrían potenciar el desarrollo de la industria acuícola. Por otra parte, en algunas progenies híbridas de abulón se ha evidenciado la capacidad de desarrollo gonadal, producción de progenie híbrida F2 o de retrocruzas de híbridos con alguna de sus especies parentales (Leighton y Lewis, 1982).

Algunos híbridos como el “abulón tigre” de Australia han sido producidos en cultivo debido a las características en términos de tasas de crecimiento, relación de músculo y concha, textura de carne y demanda del mercado (Allsopp *et al.*, 2011). Otras especies que se han utilizado para obtener híbridos son las especies de Japón *H. madaka*, *H. gigantea* y *H. discus*, de las cuales se obtuvieron tasas de crecimiento intermedias con respecto a las especies parentales (Koike *et al.*, 1988); Leighton y Lewis, (1982), generaron híbridos interespecíficos entre abulón rojo, amarillo y blanco, tres especies de California. La cruce de abulón rojo y blanco logró presentar tasas de fecundación similares a las de las especies parentales y heterosis en las tasas de crecimiento, la cruce de abulón rojo con amarillo mostró un incremento en la supervivencia de postlarvas (PL) y juveniles, así como tasas de crecimiento de juveniles mayores a los del abulón rojo. Por otro lado, Leighton (2000) menciona que los mejores organismos para realizar híbridos de las especies que habitan las costas de California son el abulón rojo y el azul, ya que a pesar de que el porcentaje de fecundación oscila entre el 10 y 30 %, la tolerancia térmica y el crecimiento han sido asociados a un efecto materno, de manera que estos organismos han demostrado presentar una ampliación en la tolerancia térmica mayor cuando la madre es de la especie azul y un crecimiento mayor en aguas templadas cuando la madre pertenece al abulón rojo.

Se ha demostrado que el éxito en la producción de híbridos interespecíficos de abulón depende de factores como la concentración de espermatozoides, la edad del ovocito y el tiempo de contacto en cruzas intraespecíficas e interespecíficas, (Leighton y Lewis, 1982). La interacción ovocito-espermatozoide que conduce a la fusión de los gametos generalmente exhibe cierto grado de especificidad de especie (Galindo

et al., 2009). La interacción ovocito-espermatozoide sugiere que este proceso ocurre mediante moléculas de reconocimiento en los gametos que actúan en combinaciones de ligando receptor mediante la quimiotaxis del espermatozoide al ovocito, seguida de la inducción de la reacción acrosomal en el espermatozoide, la interacción de los componentes del espermatozoide en la cubierta del ovocito y finalmente la unión de las membranas plasmáticas al ovocito (Epel, 1997 citado por Galindo *et al.*, 2009).

Anteriormente algunos rasgos fenotípicos eran usados para diferenciar entre especies de abulón y para asignar el estado híbrido de algunos organismos (Owen, 1971). No obstante características como el color y la morfología, pueden ser rasgos que presenten plasticidad en abulones dependiendo de la localidad, hábitat y dieta de cada organismo (Leighton, 2000). En muchos estudios se han descartado o comprobado el estado de híbridos de organismos cuyas características fenotípicas pueden semejarse a 2 especies parentales distintas (Gruenthal y Burton, 2005; Ibarra *et al.*, 2005). En otros estudios, los marcadores moleculares se han usado como herramientas para la certificación del estatus híbrido de algunas cruza experimentales entre especies de abulones (Ahmed *et al.*, 2008; Brown y Murray, 1992; Ibarra *et al.*, 2005; Luo *et al.*, 2010; Lafarga-De la Cruz, 2010; You *et al.*, 2015). Estas nuevas tecnologías moleculares permiten reconocer la proporción del aporte genético de cada parental en las progenies híbridas, Lafarga-De la Cruz (2010) reportó que el análisis de genotipificado con ocho loci microsatélites en híbridos de abulón rojo con japonés (*RJ*) comparten el 46 % de los alelos con abulón rojo, un 15 % con abulón japonés y un 26 % con ambos parentales, evidenciándose el aporte materno en las cruza.

1.2.5 Estado actual de la producción de abulón en México

Actualmente en México existen siete especies de abulón (*H. corrugata corrugata* W. Wood, 1828; *H. cracherodii cracherodii* Leach, 1814, *H. fulgens fulgens* Philippi, 1845; *H. kamtschatkana assimilis* Dall, 1878; *H. rufescens* Swainson, 1822; *H. sorenseni* Bartsch, 1940 y *H. walallensis* Stearns, 1899), y todas alcanzan tallas adecuadas para su comercio (Spencer, 2002). Además, se reconocen tres subespecies (*Haliotis fulgens guadalupensis* Talmadge, 1964; *Haliotis corrugata oweni* Talmadge, 1966 y *Haliotis cracherodii californiensis* Swainson, 1822) que son endémicas de Isla Guadalupe, México (Leighton, 2000; Geiger y Owen, 2012) y otra subespecie (*Haliotis fulgens turveri* Bartsch, 1942) que se distribuye en punta concepción (Ligia, 2016).

En México el abulón se posiciona en el lugar 49 de la producción pesquera total nacional por su volumen de producción. Sin embargo, por su valor comercial y los altos precios de venta este recurso ocupa el lugar 29 de las especies del país. En los últimos 10 años, los volúmenes de producción de este recurso se han

reducido, debido a múltiples factores como presencia de mortandades masivas asociadas a enfermedades, destrucción de hábitat y pesca ilegal, entre otros (Fig. 4A; Searcy-Bernal *et al.*, 2010; SAGARPA, 2013).

En la península de Baja California es donde se captura y cultiva el abulón, no obstante los niveles actuales de producción se encuentran muy por debajo de los observados en la década de los 60's donde se reportaban volúmenes de captura cercanas a las 3 mil t (Carta Nacional Acuícola, SAGARPA, 2013). La producción total de abulón en 2008 fue de 744 t, de la cual 67 % fue aportado por Baja California Sur y el resto por Baja California (SAGARPA, 2010). En este mismo año el aporte de la producción por acuicultura fue solo del 4.1 %, mientras que la producción por pesquería fue de 95.9 % aproximadamente (FAO, 2016b). En el 2014 la producción nacional se estimó en aproximadamente 479 t, de las cuales 411 t (85.8 %) provienen de la pesca y 68 t (15.2 %) provienen de la acuicultura (Fig. 4B; SEPESCA, 2015).

La producción pesquera está dominada por dos especies: *H. fulgens* y *H. corrugata*, que representan el 70 y 28 % de la producción total, respectivamente. *Haliotis rufescens*, *H. sorenseni* y *H. cracherodii*, contribuyen con la producción por pesca, pero en conjunto su aporte es menor al 2 %. Por otro lado, la especie que domina los cultivos acuícolas es *H. rufescens* con un aporte mayor al 98%, siendo Baja California el único estado en donde se tiene cultivos comerciales de abulón (SAGARPA, 2010; SAGARPA, 2013).

Uno de los principales problemas de la producción de abulón en cultivo es la baja tasa de crecimiento que presentan, ya que tardan entre tres y cinco años en llegar a la talla comercial (McBride, 1998). Por tal motivo, una alternativa que la industria acuícola está utilizando para resaltar rasgos de interés, es el mejoramiento genético (Elliott, 2000). Los programas de mejoramiento genético que pueden ayudar el desarrollo de diferentes pesquerías incluyen: la manipulación cromosómica (poliploidia), cruzamiento entre poblaciones (cruzas intraespecíficas), hibridación (cruzas interespecíficas) y aplicación de programas de selección asistida por marcadores moleculares, entre otros (Hulata, 2001).

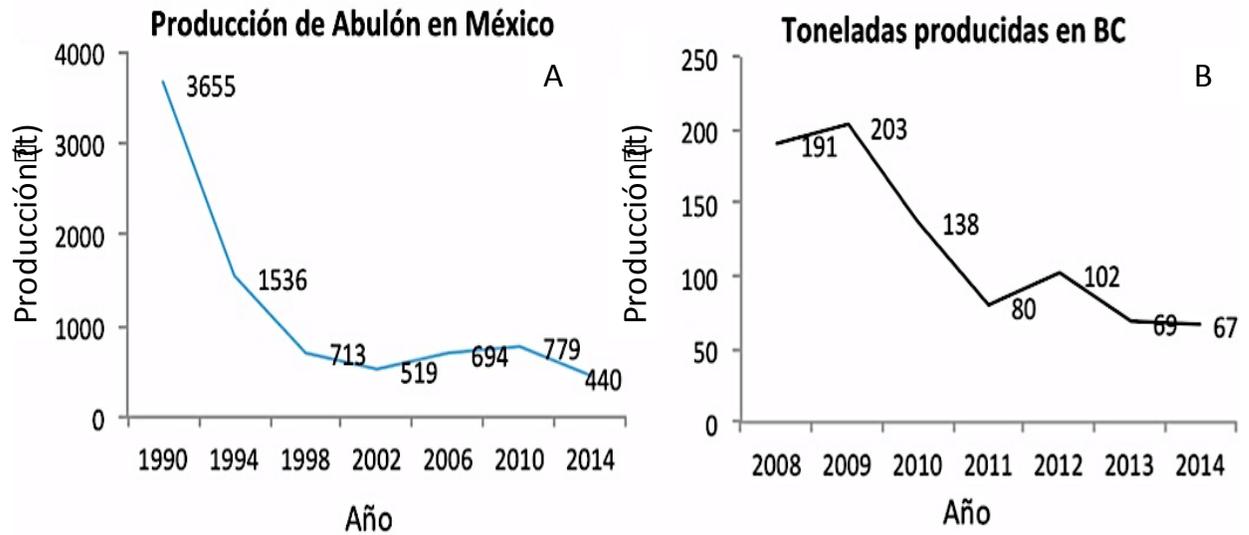


Figura 4. (A) Producción nacional total de abulón de 1990 al 2014 y (B) Producción de abulón en Baja California del 2008 al 2014 (FAO, 2016; SAGARPA, 2014; SEPESCA, 2015).

1.2.6 Generalidades de abulones de interés comercial en México

1.2.6.1 Abulón rojo *Haliotis rufescens*

El abulón rojo es la especie más grandes de abulón, cada organismo puede llegar a pesar hasta 5 kg y medir 30 cm de longitud (Leighton, 2000). Esta especie presenta concha gruesa con forma ovalada aplanada uniforme y en la superficie izquierda de la concha tiene de tres a cuatro poros respiratorios abiertos que no sobresalen (Carta Nacional Acuícola SAGARPA, 2013). La iridiscencia interna de la concha presenta tonos rosados, azules y verdes con una impresión del músculo central (Fig. 5). Se encuentran en las zonas intermareales y submareales rocosas hasta profundidades de 65 m, aunque la mayor abundancia se reporta entre los 10 y los 25 m (Leighton, 2000). Los abulones rojos presentan un rango térmicos de 14 a 18°C, aunque la temperatura de crecimiento óptimo es de 16°C.

Las poblaciones silvestres de esta especie han registrado su primera madurez cerca de los 4 años de edad, en cultivo se ha observado presencia de gónada en organismos machos de 2 años (Ault, 1985) Los abulones rojos pueden presentar gónada todo el año, sin embargo es de diciembre a mayo cuando se registran sus épocas reproductivas en el medio natural (Booolootian, 1962; Leighton, 2000).

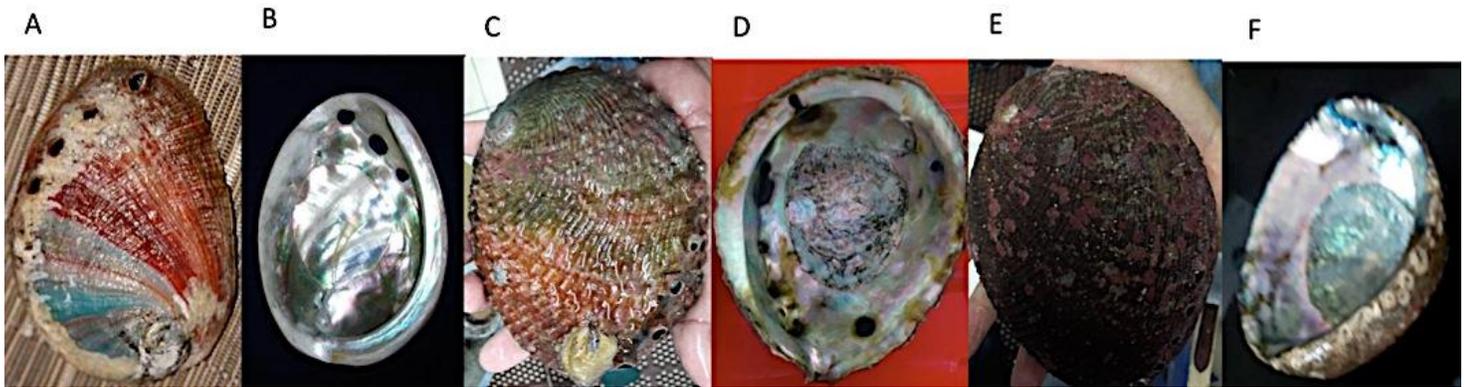


Figura 5. Características externas e internas de la concha del abulón rojo *H. rufescens* (A-B); abulón amarillo *H. corrugata* (C-D) y abulón azul de Isla Guadalupe *H. fulgens guadalupensis* (E-F).

1.2.6.2 Abulón amarillo *Haliotis corrugata*

El abulón amarillo, se caracteriza por tener una concha gruesa, ondulaciones muy marcadas y una forma más circular comparado con otros organismos del mismo género, llegan a medir hasta 17 cm de longitud, presenta de 2 a 4 poros respiratorios abiertos con bordes elevados por encima de la concha (Fig. 5 C y D). El abulón amarillo se distribuye desde Punta Concepción en California hasta Bahía Magdalena en Baja California Sur (Searcy-Bernal *et al.*, 2013). La mayor concentración de estos organismos se puede encontrar entre los 5 y 25 m de profundidad (Leighton, 2000). Los abulones amarillos alcanzan la madurez sexual a la edad de tres años y se han registrado dos épocas de desove (bimodal) al año, la primera abarca de marzo-julio y la segunda de septiembre-noviembre. Tutschulte y Conell (1981) determinaron que los organismos de esta especie solo pueden presentar gametos maduros una vez al año, por lo que, aunque presenten dos épocas de desove cada organismo se puede reproducir una vez en un año. La temperatura en la cual los abulones amarillos tiene mayor crecimiento es de 21-24.5°C (Leighton, 1974; Díaz *et al.*, 2006).

1.2.6.3 Abulón azul *Haliotis fulgens*

El abulón azul habita desde punta Concepción, California, a Bahía Magdalena, Baja California Sur, México. Esta especie reside en aguas poco profundas, la mayor densidad de estos organismos se localiza desde la zona intermareal hasta 9-18 m de profundidad. Esta especie presenta la concha de color marrón, marcada con muchas costillas bajas y planas que corren paralelas a los 5 a 7 poros respiratorios abiertos que se elevan por encima de la superficie de la concha (Geiger y Owen, 2012). El interior de la concha es un azul

iridiscente y verde (Fig. 5 E y F). El abulón azul tiene periodos reproductivos desde principios del verano hasta principios del otoño. La madurez se alcanza a una longitud de entre 61 y 128 mm o entre 5 y 7 años (Shepherd *et al.*, 1991). Por otro lado, Velasco-Echavarría (2014) determinó que el rango térmico del abulón azul oscila de 3 a 31°C, la temperatura en la cual presenta mayor crecimiento es de 20 a 26°C y este disminuye a 14 y 29°C.

En las diversas poblaciones de abulón azul, y principalmente las poblaciones insulares, se han encontrado evidencia que sugiere la presencia de subespecies (Geiger y Owen, 2012). En análisis genéticos con microsatélites se encuentran diferencias genéticas entre las poblaciones de abulón azul en las islas (Gutiérrez-González *et al.*, 2007). El abulón azul *Haliotis fulgens guadalupensis*, puede llegar a medir 143 mm de longitud, se distribuye entre los 20 y 30 m de profundidad y se trata de una subespecie endémica de Isla Guadalupe (Geiger y Owen, 2012). Sin embargo, la información sobre la biología reproductiva de la subespecie de abulón azul de Isla Guadalupe es escasa.

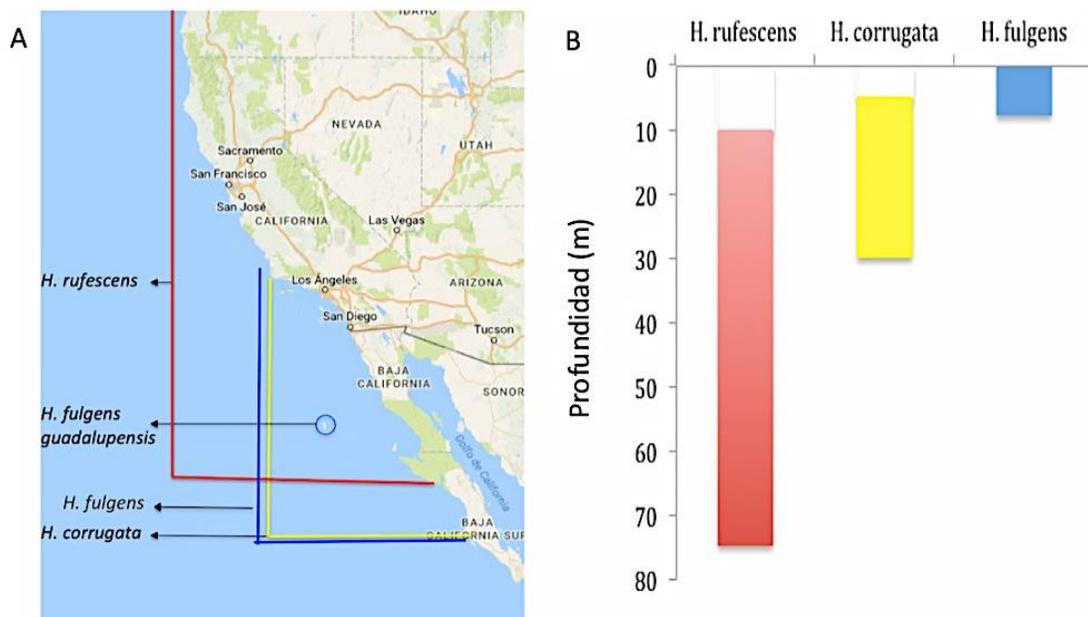


Figura 6. A) Distribución latitudinal y B) batimétrica de las poblaciones de abulón rojo *Haliotis rufescens*, amarillo *Haliotis corrugata* y azul *Haliotis fulgens*.

1.3 Justificación

La producción de abulón rojo (*H. rufescens*), amarillo (*H. corrugata*) y azul (*H. fulgens*) en México ha disminuido por múltiples problemas que se han derivado de su cultivo y explotación respectivamente. Por un lado, el abulón rojo ha sufrido pérdidas en la variabilidad genética debido cruzas entre reproductores emparentados, llevadas a cabo en cultivos comerciales. Esto ha generado que las progenies sean cada vez más susceptibles a contraer enfermedades y a una reducción en las tasas de fecundación, eclosión y supervivencia larval, lo cual culmina en una producción de semilla insuficiente para los requerimientos de producción actuales. Por otro lado, la pesquería del abulón amarillo y azul se ha visto afectado por la sobrepesca, la pesca ilegal y el deterioro de su hábitat (por causas antropénicas y/o ambientales). El recurso abulón alcanza altos valores en los mercados internacionales, principalmente en Asia. Los híbridos interespecíficos se proponen como una alternativa útil que permitirá el desarrollo del cultivo de abulón a través de una mayor variabilidad genética de los organismos cultivados, por tal motivo, es indispensable el desarrollo de metodologías que permitan aumentar los niveles de producción de híbridos, lo cual se traducirá en mejoras cuantitativas de algunos caracteres de interés para la acuicultura (vigor híbrido o heterosis), esto permitirá un mejor aprovechamiento y explotación del recurso.

1.4 Hipótesis

1. El aumento en la temperatura de cultivo del abulón amarillo *H. corrugata* silvestre permitirá que los organismos alcancen un estado de madurez gonadal avanzado con gametos viables, ya que en el medio natural la temperatura es uno de las principales factores exógenos que controlan el ciclo reproductivo en Haliótidós.
2. El método de biopsia gonadal permitirá obtener gametos viables para llevar a cabo protocolos de fecundación *in vitro* entre especies que presentan diferencias en sus épocas reproductivas y con un desarrollo gonadal variable.
3. El manejo de factores como la edad del ovocito y la concentración espermática durante la fecundación *in vitro* entre gametos de abulón rojo (*H. rufescens*), abulón amarillo (*H. corrugata*) y abulón azul (*H. fulgens guadalupensis*) permitirán obtener progenies híbridas viables.

1.5 Objetivos generales

1. Estandarizar los protocolos para obtener híbridos interespecíficos mediante fecundación *in vitro* entre hembras de abulón rojo (*H. rufescens*) y machos de abulón amarillo (*H. corrugata*) y azul (*H. fulgens guadalupensis*).
2. Evaluar el desempeño de la progenie híbrida en términos de crecimiento y supervivencia larval en estadios tempranos.

1.5.1 Objetivos específicos

1. Establecer la Temperatura Efectiva Acumulada (TEA) requerida para lograr la maduración gonadal del abulón amarillo *H. corrugata* silvestre bajo condiciones controladas.
2. Establecer un protocolo de obtención de gametos femeninos y masculinos viables basado en biopsia del tejido gonadal.
3. Optimizar los protocolos de fecundación *in vitro* para obtener progenies híbridas entre hembras de abulón rojo y machos de abulón amarillo y azul.
4. Evaluar las tasas de fecundación, eclosión, deformidad, crecimiento y supervivencia larval de la progenie híbrida.
5. Evaluar el desempeño en términos de crecimiento y supervivencia de las progenies híbridas entre hembras de abulón rojo y machos de abulón amarillo (RAm), y entre hembras de abulón rojo y machos de abulón azul de Isla Guadalupe (RAz-G), en estadios tempranos.

Capítulo 2. Material y métodos

2.1. Obtención de reproductores e inducción a la maduración gonadal

Diez abulones amarillos (*H. corrugata*) provenientes de Punta Canoas B.C.S., se trasladaron a las instalaciones del CICESE donde se determinó el estado de salud y el grado de madurez que presentaban con base al IVG. Se limpiaron y eliminaron los epibiontes de sus conchas y posteriormente los abulones se colocaron en estanques de cuarentena por 30 días (Fig. 7). Durante el periodo de cuarentena se mantuvo la temperatura del agua en 15 ± 1 °C y se alimento a todos los organismos *ad libitum* con *Macrosystis pirifera*.

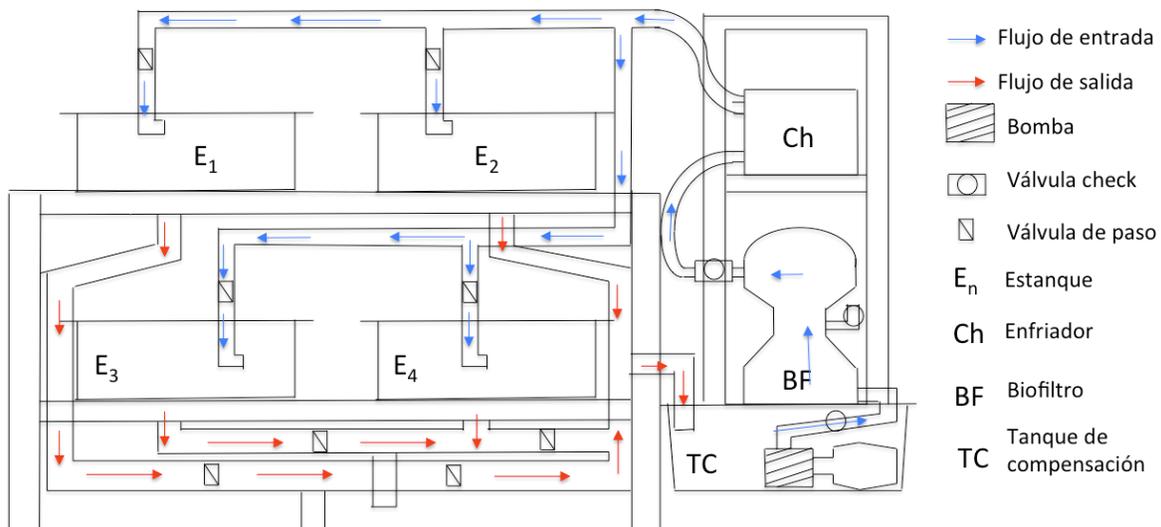


Figura 7. Sistema de recirculación para cuarentena, mantenimiento e inducción a la maduración de abulones.

Una vez terminado el periodo de cuarentena los organismos se colocaron en un sistemas de recirculación donde se indujeron a la maduración por 6 meses. Durante este periodo se mantuvo un monitoreo constante de los nutrientes en el agua, principalmente compuestos nitrogenados (Nitratos, Nitritos y Nitrógeno Amoniacal Total-NAT), además se registró la cantidad de oxígeno disuelto (mg/L), pH y la alcalinidad del agua del sistema. La temperatura es el principal factor promotor de la maduración en diversas especies de abulón (Shepherd *et al.*, 1991), por lo que ésta se incremento gradualmente 1 °C cada mes hasta alcanzar 18 °C, posteriormente se mantuvo constante por cinco meses. Se calculó la *Temperatura Efectiva Acumulada* (TEA) necesaria para generar gónada en *H. corrugata* utilizando la fórmula descrita para abulón por Uki y Kikuchi (1984):

$$Y_n = \sum_{i=1}^n (t_i - \theta),$$

donde Y_n es igual a la TEA para desarrollar gónada en grados centígrados por día ($^{\circ}\text{C}\cdot\text{día}$), t_i es igual a la temperatura diaria a la cual los animales fueron expuestos, y θ (cero biológico) es la temperatura mínima para el desarrollo de la gónada, la cual ha sido reportada en 5.7°C para *H. corrugata* (Maeda-Martínez, 1995). Mientras que, la maduración gonadal relativa se clasificó en tres etapas (inmaduro, maduro y completamente maduro) y se asoció a la cantidad de grados centígrados por día que los organismos acumularon hasta el momento del muestreo de acuerdo con lo descrito por Uki y Kikuchi (1984).

2.2. Identificación del sexo y estimación del grado de madurez sexual en abulón amarillo

El sexo y el grado de madurez se identificó usando dos métodos: 1) un método no invasivo, en el cual se observa el color de la gónada y su abultamiento (IVG, Tabla 1) y 2) un método invasivo y letal que consistió en analizar histológicamente las gónadas de los abulones y asignar un estadio de madurez con base en las características de las células germinales y del tejido gonadal (Tabla 2).

2.2.1. Determinación del Índice Visual Gonadal (IVG)

Cada 50 días se revisó a los organismos para evaluar visualmente el grado de desarrollo que presentaban. Para esto fue necesario exponer la gónada de los abulones, la cual se encuentra en la región inferior opuesta a los poros respiratorios, colocando a los abulones boca arriba, de manera que el pie quede expuesto y con una espátula, sin puntas ni filo, se levantó el pie en el sitio antes mencionado, y se observó la coloración del cono y el abultamiento de la gónada de cada abulón. Se identificó como hembras a todos los organismos que presentaron tonalidades que fueron de verdes a cafés pardos, mientras que se identificó como machos a aquellos con coloraciones amarillas o cremas; y organismos con coloración café oscura y ausencia de abultamiento fueron clasificados como indeterminados. Por otra parte, la madurez de los organismos con este método se asignó de acuerdo al IVG con una escala de cero a tres (Leighton, 2008). Donde cero corresponde a organismos sin desarrollo de tejido gonadal (indeterminado) y tres a organismos completamente maduros. El desarrollo gonádico se identificó y se asignó a una escala del IVG con base en las características de la escala descrita por Vélez-Arellano *et al.* (2015; Tabla 1).

Tabla 1. Descripción de estadios de madurez gonadal en *Haliotis fulgens* y *Haliotis corrugata*, características obtenidas y modificadas de Vélez-Arellano *et al.* (2015).

IVG	Estadio de Madurez gonadal	Características
0	Desovados o inmaduros	La gónada se sienten flácidas al tacto. El tejido gonadal aún ésta presente en el órgano cónico pero en muy poca cantidad. Externamente, se aprecia un color café opaco. No es posible diferenciar entre machos y hembras.
1	En desarrollo	El órgano cónico aun es flácido y blando, y la parte basal no ha sido cubierta por el tejido gonadal. Es posible diferenciar el sexo de los abulones por su coloración. La gónada de la hembra presenta color verde khaki, mientras que en los machos es beige. No se aprecia un abultamiento del tejido gonadal cubriendo el hepatopáncreas.
2	Desarrollados	La parte basal de la glándula digestiva esta cubierta con tejido gonadal, la parte apical comienza a prolongarse y a ensancharse. Se comienza a observar un abultamiento provocado por la acumulación de tejido gonadal sobre el hepatopáncreas, comienza a tomar una consistencia firme al tacto.
3	Completamente maduros	Las gónadas presentan una consistencia firme debido a que contienen un gran número de gametos. Está llena y parece una vaina cubriendo la glándula digestiva. Las hembras presentan un color verde khaki con apariencia granular por los ovocitos maduros. Los machos tienen un color blanco o crema. El abultamiento en el cono sobrepasa la concha viendo a los organismos horizontalmente.

2.2.2. Validación histológica del estado de madurez gonadal.

El segundo método para determinar el sexo y estado de madurez alcanzado por los abulones amarillos acondicionados se basó en análisis histológico del complejo hepatogonadal (CHG). Que se describe a continuación.

2.2.2.1. Colecta de organismos

De los 10 organismos acondicionados y madurados se colectaron siete abulones en diferentes periodos de exposición a las condiciones de maduración. El primer muestreo se realizó dos días después de la recepción en las instalaciones de CICESE, en este muestreo se colectó un organismo. El segundo muestreo se realizó 3 meses después de comenzar el periodo de maduración, en este muestreo se colectó un organismo. El último muestreo se realizó 5 meses después de haber iniciado el periodo de acondicionamiento, en este último muestreo se colectaron cinco organismos (los tres organismos restantes fueron machos utilizados como reproductores en las cruas híbridas). Los organismos muestreados fueron almacenados a -40°C por 6 meses. Posterior a este periodo los organismos se descongelaron y se extirpó el CHG.

2.2.2.2. Preparación de muestras

Se realizaron tres cortes transversales de 3 mm del CHG, en la parte alta, media y apical del cono como describe Capinpin *et al.*, (1998). Los cortes se colocaron en criomoldes (sakura Tissue-Tek de “15 x 15 x 5” y “25 x 20 x 5”) con medio para tejido (Gel O. C. T. 4583); el tejido quedó completamente inmerso en el Gel y los moldes se colocaron en un criostato Leica modelo CM1510S a -25°C y se dejaron reposar por 10 min hasta que el gel se congelara completamente. Estos cortes no fueron fijados previamente con ninguna solución. Posterior a esto, se realizaron cortes de 10 y 15 µm los cuales fueron montados en porta objetos (VWR super frost plus de 25 x 75 x 1) con película especial para tejido congelado y cubiertos con un cubre objetos. Los tejidos ya montados se colocaron en una superficie cálida (26°C), para que por diferencia de temperaturas el corte se adhiriera al porta objetos. Posteriormente se realizó la tinción con la técnica de Hematoxilina y Eosina (H y E; Anexo A I; Basto-Cuevas, 2009) y los tejidos se observaron en un microscopio óptico marca Zies a 100X de aumento.

Para comparar el grado de deterioro del tejido congelado y realizar una correcta asignación al estado de madurez de los organismos acondicionados, se procesaron 14 CHG frescos de abulón azul provenientes de Isla Guadalupe (*H. fulgens guadalupensis*) por dos métodos histológicos. Se realizó un sexado visual de todos los CHG y posteriormente se comenzó el procesamiento para confirmar el sexo y estimar el grado de madurez que presentaban los organismos al momento de ser sacrificados.

De los catorce CHG, doce se procesaron por histología de tejido fresco (histología con parafina Anexo A II) y dos más con sexos identificados (un macho y una hembra) se procesaron por el método de tejido congelado antes descrito. Se determinó el estado de madurez que presentaban y se compararon las características de los cortes histológicos de las muestras congeladas y frescas de *H. fulgens guadalupensis* con las muestras congeladas de *H. corugata*. Los CHG frescos se fijaron en solución Davidson (Humanson, 1962) por 24 h (Anexo A III). Se realizaron tres cortes transversales de 3 mm de grosor como se describió anteriormente. Los cortes se colocaron en moldes y fueron sometidos a un proceso de deshidratación para posteriormente ser procesados por histología en parafina. Finalmente todos los tejidos fueron teñidos con la técnica de tinción H y E, y se observaron en el microscopio a 100 X de aumento.

Tabla 2. Descripción de estadios de madurez gonadal en *Haliotis fulgens* y *Haliotis corrugata*, tomada y modificada de Capinpin *et al.* (1998) y Vélez-Arellano *et al.* (2015).

Estado de madurez gonadal	Macho	Hembra
Preproliferativo	La gónada es inmadura, caracterizada por poco o ningún epitelio germinal entre la epidermis y la glándula digestiva.	
Proliferativo	Las células germinales crecen desde los túbulos del tejido conectivo. Las espermatogonias de forma cuadrada miden $\approx 5 \mu\text{m}$. Tejido testicular cubre un cuarto de la glándula digestiva. la trabécula parece ensanchada debido a la cantidad de espermatogonias y espermatozoides adheridos a ella. La gónada ocupa entre el 4 % y el 60 % del área de un corte transversal.	Las células germinales crecen desde la trabécula ovogonias de forma cuadrada miden de $5-8 \mu\text{m}$ y alcanzan hasta las $25 \mu\text{m}$. Las ovogonias forman grupos sobre las paredes de la trabécula. Tejido ovárico cubriendo un cuarto de la glándula digestiva.
Parcialmente maduro	Estado de gametogénesis temprana alrededor de los túbulos. Una delgada membrana de espermatozoides puede estar presente. Tejido testicular cubre mitad de la glándula digestiva.	Amplio número de ovogonias y ovocitos pre-vitelogénicos adheridos a la trabécula del tejido conectivo. Al final, ovocitos mayores de $50 \mu\text{m}$ se extienden desde la trabécula hacia la glándula digestiva, cada uno adjuntó en forma entallada y de gota. Tejido ovárico cubre la mitad de la glándula digestiva.
Maduro	La gónada esta densamente ocupada con espermatozoides. Pueden estar presentes pocos estados gametogénicos tempranos alrededor de los túbulos. Tejido testicular cubre toda la glándula digestiva. La gónada parece una vaina cubriendo completamente la glándula digestiva. El tejido gonadal ocupa de 60% a 90% del área de un corte transversal.	La gónada esta llena de ovocitos maduros mayores a $125 \mu\text{m}$. Los ovocitos libres de la trabécula tienen diámetro medio de $150 \mu\text{m}$. Es común una ligera proliferación de ovocitos menores a $25 \mu\text{m}$ cerca de la pared de la gónada. Tejido ovárico cubre más de la mitad de la glándula digestiva. La gónada presenta apariencia granular por los ovocitos maduros.
Parcialmente desovado	La gónada muestra evidencia de expulsión de gametos hay espacios alrededor de los túbulos y otras áreas siguen densamente ocupadas por espermatozoides. No hay evidencia de necrosis en los espermatozoides residuales.	Se reduce la cantidad de ovocitos maduros, 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 y menos granular.
Desovado	La gónada es una delgada capa que ocupa menos de 10% de su área en corte transversal. El análisis histológico revela algunos ovocitos atrésicos y vitelo, carece de gametos maduros y tiene ligera actividad gametogénica. El lumen se colapsa con los túbulos y las trabéculas dobladas.	

2.2.2.3. Determinación del estado de madurez gonadal

El sexo se determinó observando la presencia de gametos femeninos o masculinos. Los estadios del ciclo reproductivo en el cual se encontraban los organismos fueron identificados, de acuerdo al tipo de células,

su forma, estructura y el nivel de desarrollo que presentaron usando los criterios establecidos por Capinpin *et al.* (1998), Najmudeen y Victor (2004) y Vélez-Arellano *et al.* (2015). La distribución de los gametos, el arreglo que presentaban en el tejido gonadal y el estado de madurez de los gametos fueron identificados en cada CHG procesado. Las fases asignadas fueron: 1) preproliferativo, 2) proliferativo, 3) parcialmente maduro, 4) maduro, 5) parcialmente desovado y 6) desovado (Tabla 2).

2.3. Métodos de inducción al desove y de obtención de gametos

Se probaron diferentes métodos de inducción al desove en abulones silvestres amarillos y azules de Isla Guadalupe, para estandarizar el tiempo de obtención de gametos y poder sincronizar los desoves de todas las especies de abulón utilizadas en este trabajo.

2.3.1. Método de inducción al desove con TRIS-H₂O₂

Los abulones rojos, amarillos y azules fueron inducidos con el método de TRIS-H₂O₂ descrito por Morse *et al.* (1977). Los organismos fueron depositados en recipientes de 8L, separados por sexo y especie con agua de mar filtrada e irradiada con luz UV, la solución de TRIS 2M fue adicionada en un volumen de 6.6 mL/L de agua de mar (dejando la solución en una concentración final de TRIS de 0.0134 M/L), y después se adicionó el H₂O₂ al 6% en un volumen de 3 mL/L de agua de mar (dejando la solución en una concentración final de H₂O₂ de 0.0134 M/L; Lafarga-De la Cruz, 2010; Anexo B). Posteriormente, se esperó por hora y media y después se monitoreó cada 10 min, para poder captar el momento en el que los organismos comenzaron a expulsar los gametos. La liberación de gametos en abulón rojo usando el método TRIS-H₂O₂ inició alrededor de 1 h 40 min a 2 h posteriores al inicio de la inducción.

Además del método de TRIS-H₂O₂, en eventos distintos se realizó la inducción al desove de los abulones amarillos y los abulones azules utilizando el método de desecación y posterior exposición a agua irradiada con UV (método tomado y modificado de Uki y Kikuchi, 1984). Primero se sacaron del agua a los organismos y se colocaron con el pie expuesto a los rayos del sol, posteriormente se pusieron en agua de mar irradiada con luz UV (en el caso de los abulones amarillos fue una lámpara de 50W y en el caso de los abulones azules fueron 8 lámparas de 50W), el agua tenía una temperatura de 23 ± 1 °C, 5 °C mayor que la temperatura a la que estaban expuestos antes de la desecación (18 °C). Finalmente, los organismos se dejaron reposar por 3 h y después de este periodo se revisaron cada 10 min para registrar cualquier expulsión de gametos.

Sin embargo, debido al escaso éxito obtenido en la inducción por el método de TRIS-H₂O₂ y el método combinado de desecación y exposición a agua irradiada con UV en abulón amarillo y azul, en combinación con el bajo número de reproductores utilizados en los desoves, fue necesario implementar y evaluar un método alternativo de obtención de gametos.

2.3.2. Biopsia del tejido gonadal en machos de abulón rojo

2.3.2.1. Obtención del esperma

Se realizó una cruce experimental para evaluar la viabilidad del esperma extraído con el método de biopsia gonadal en abulón rojo. Para esto se eligieron tres organismos machos que presentaban un IVG de 2 a 3, para asegurar la viabilidad de los gametos (Uki y Kikuchi, 1984). Se sacrificó a los organismos y se extrajo el CHG. Durante esta prueba, los abulones machos no fueron expuestos previamente a una solución de TRIS-H₂O₂ o a cualquier otro tipo de agente inductor.

Para extraer los gametos se hizo la disección de un organismo y la extracción del CHG completo (Anexo C); se realizaron cortes superficiales a la membrana que rodea al CHG con ayuda de un bisturí y se raspó el tejido gonadal. El tejido fue disgregado y concentrado dentro de recipientes de 200 mL con agua filtrada, y posteriormente se tamizó toda la solución con tamices de 40 µm de luz de malla y se diluyó en 2L de agua. Muestras de 1 mL de esperma se colectaron y se observaron en microscopio a 100X para estimar calidad espermática en el momento de la fecundación. Para esto se observó y registró la calidad espermática relativa que presentaba el esperma recién colectado, 20 y 40 min después de la extracción. Se verificó la motilidad de los espermatozoides, la cantidad de esperma en la muestra (escaso o abundante), la cantidad de esperma con movimiento (en porcentaje relativo), la intensidad de su movimiento y la dirección de su nado (Salinas-Flores, 2003).

2.3.2.2. Fertilización y evaluación del método de biopsia en machos de abulón rojo

Posteriormente se establecieron 6 tratamientos por triplicado (T1-T6) en los cuales se utilizaron tres concentraciones de esperma extraído por biopsia y dos tiempos de contacto esperma/ovocito; como control se utilizó una cruce con ovocitos y esperma extraídos con el método de TRIS-H₂O₂ (CC; Fig. 8).

Para estimar la concentración de espermatozoides se realizaron conteos por quintuplicado con muestras de espermatozoides fijadas en Lugol-Eosina (Anexo A I). Se colocaron 100 μL de muestra en una cámara de conteo celular Neubauer y se observaron en un microscopio óptico a 400X de aumento.

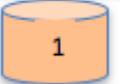
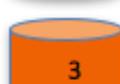
Prueba de biopsia gonadal de machos							
	Tiempo de contacto esp/ov 30 min				Tiempo de contacto esp/ov 50 min		
[] de espermatozoides	2.3×10^7	2.8×10^7	5.6×10^7	8.4×10^7	2.8×10^7	5.6×10^7	8.4×10^7
# Ovocitos/ tratamiento $77,714.1 \pm 4,069$							
							
							
Tratamiento	CC	T1	T2	T3	T4	T5	T6
Sexo y método de extracción de gametos	  H_2O_2	  H_2O_2 Biopsia			  H_2O_2 Biopsia		

Figura 8. Diseño experimental para evaluar la viabilidad del espermatozoides extraído por biopsia en abulón rojo; CC es el tratamiento control en donde se usaron gametos extraídos por el método de TRIS- H_2O_2 ; T1, T2 y T3 son tratamientos con diferentes concentraciones espermáticas evaluadas con un tiempo de contacto espermatozoides-ovocito de 30 min; T4, T5 y T6, son tratamientos con tiempo de contacto espermatozoides-ovocito de 50 min; T1 con T4 presentan la misma concentración de espermatozoides, al igual que T2 con T5 y T3 con T6.

La obtención de ovocitos se realizó con el método de TRIS- H_2O_2 , las hembras fueron inducidas al desove como se describió anteriormente. Una vez iniciado el desove, se lavaron los recipientes y los organismos vigorosamente con agua de mar para eliminar todos los restos de H_2O_2 . Los ovocitos obtenidos en agua limpia fueron colectados y tamizados a través de un tamiz con luz de malla de 350 μm , para eliminar suciedad, y retenidos con tamices de 100 μm . Posteriormente, los ovocitos fueron depositados en recipientes de 20L, los cuales se homogenizaron y se muestrearon 10 mL, para estimar la densidad de ovocitos/mL. Se realizaron conteos de 1 mL por triplicado de la muestra en cámaras Sedgewick-Rafter con ayuda de un microscopio óptico a 50X de aumento. Finalmente, los ovocitos se homogenizaron y se distribuyó 1L de la mezcla en cada tratamiento para su fecundación en recipientes de 20L. Después del tiempo de contacto espermatozoides-ovocito (TC esp/ov) establecido en cada cruce, los ovocitos fueron lavados

vertiendo la mezcla en tamices de 100 μm y enjuagándolos con abundante agua tres veces para eliminar el exceso de esperma. Posteriormente se colocaron en botes de 20L para su eclosión y cultivo larval. La relación esperma/ovocito (relación esp/ov) obtenida en cada tratamiento se obtuvo con la fórmula $\text{Relación esp/ov} = \frac{[\# \text{ total de ovocitos}]}{[\# \text{ total de espermatozoides}]}$.

Después de 2h postfecundación (pf) los ovocitos de cada tratamiento se muestrearon por triplicado para determinar la tasa de fecundación mediante conteos directos de ovocitos en segunda división mitótica, en la cámara de conteo Sedgewick-Rafter con ayuda de un microscopio óptico a 50X de aumento. La fórmula usada para este cálculo fue: $\text{Tasa de Fecundación (\%)} = \frac{[\# \text{ total de ovocitos fecundados}]}{[\# \text{ total de ovocitos}]} \times 100$. Después de 22 h los tratamientos se concentraron en recipientes de 2L, se tomaron muestras de 10 mL por triplicado de cada replica para determinar la tasa de eclosión y de deformidades con las fórmulas: $\text{Tasa de Eclosión (\%)} = \frac{[\# \text{ de larvas trocóforas}]}{[\# \text{ total de ovocitos fecundados}]} \times 100$; y $\text{Tasa de Deformidad (\%)} = \frac{[\# \text{ de larvas trocóforas deformes}]}{[\# \text{ total de larvas trocóforas}]} \times 100$. Posteriormente, se eliminó a los ovocitos sin eclosionar por medio de sifonéo del fondo de los recipientes de cultivo.

Las larvas trocóforas fueron recuperadas diariamente con un juego de tamices a 100, 150 y 200 μm , de acuerdo a la talla alcanzada. Las larvas retenidas en los tamices fueron concentradas en un recipientes de 2L y cuantificadas para determinar el número de larvas en cada tratamiento. La tasa de supervivencia larval de cada cruce se obtuvo con la fórmula $\text{Tasa de Supervivencia (\%)} = \frac{[\# \text{ total de larvas competentes}]}{[\# \text{ total de larvas trocóforas}]} \times 100$. La limpieza de los recipientes de cultivo se realizó diariamente.

2.3.3. Biopsia del tejido gonadal en hembras de abulón rojo

2.3.3.1. Obtención de ovocitos

Se realizó una cruce experimental para evaluar la viabilidad del ovocito extraído con el método de biopsia gonadal en hembras. Para esto se eligieron organismos que se encontraban con IVG de 3; el método se evaluó en dos hembras de abulón rojo. Una de las hembras fue previamente expuesta a una solución inductora de TRIS-H₂O₂ por 2 h (C/I: con inducción) y la otra hembra fue sometida a la biopsia sin previa inducción (S/I: sin inducción). Para obtener los ovocitos en ambas hembras se extirpó el CHG y este fue colocado individualmente en un recipiente de 4L con agua filtrada e irradiada con UV a 15°C. Manteniendo en todo momento el CHG sumergido se realizó un corte longitudinal superficial a lo largo de todo el órgano con una navaja curva, y después se comenzaron a disgregar los ovocitos en el recipiente.

Los ovocitos se lavaron para eliminar los restos de tejidos no deseados y se concentraron en tres recipientes de 4L (de acuerdo al tratamiento por el cual se obtuvieron). Posteriormente se homogenizó el medio y se tomaron muestras de 10 mL por triplicado para realizar el conteo y estimar la cantidad total de ovocitos. Los restos de gónada fueron fijados en solución Davidson's, incluidos en parafina, cortados transversalmente, montados en un portaobjetos y teñidos con la técnica H y E, para determinar el estado de madurez de las hembras en el momento de las biopsias por histología, registrándose el grado de madurez, el tamaño y las características de los ovocitos.

2.3.3.2. Fertilización y evaluación del método de biopsia en hembras de abulón rojo

Se establecieron tres tratamientos por cuadruplicado, un control (CC) y dos tratamientos experimentales (T1 y T2) donde la concentración de ovocitos ($\approx 9,000$ ov/mL), una concentración de esperma (1.47×10^6 esp/mL) y tiempo de contacto esperma-ovocito (20 min) se mantuvo constante. En el control (CC) se utilizó una cruce de ovocitos y esperma que fueron extraídos con el método tradicional de TRIS- H_2O_2 (Fig. 9). Cuando el desove de los machos inició, se lavaron los recipientes intensamente para eliminar todos los residuos de H_2O_2 . Posteriormente se filtró el esperma con tamices de $40 \mu m$, se acopió en recipientes de 1L y se colectaron muestras para estimar densidad espermática. Los conteos se realizaron por quintuplicado con muestras de espermatozoides fijadas en Lugol-Eosina, en cámara de conteo celular Neubauer y microscopio óptico (400X). La calidad espermática fue determinada mediante observación de la motilidad de los espermias (% relativo).

Posterior a la fertilización, los ovocitos fecundados se lavaron para eliminar el exceso de esperma y se colocaron en recipientes de 0.5L hasta su eclosión. La relación esperma/ovocito obtenida en cada tratamiento, la tasa de fecundación y eclosión se evaluaron como se describe en la sección 2.3.2.2.

Prueba de biopsia gonadal en hembras			
[] de espermia	1.47X10 ⁶	1.47X10 ⁶	1.47X10 ⁶
Tiempo de contacto espermia ovocito 15 min # Ovocitos/ tratamiento 8825±740			
			
			
			
Tratamiento	CC	T1	T2
Sexo y método de obtención de gametos	♀ ♂ H ₂ O ₂	♀ ♂ biopsia C/I H ₂ O ₂	♀ ♂ biopsia S/I H ₂ O ₂

Figura 9. Diseño experimental para evaluar la viabilidad de ovocitos extraídos por biopsia en abulón rojo; CC es el tratamiento control en donde se usaron gametos de abulón rojo obtenidos por el método de TRIS-H₂O₂ (H₂O₂); T1 tratamiento usando ovocitos obtenidos de biopsias del CHG de hembras de abulón rojo con previa inducción con TRIS-H₂O₂ (C/I) y T2, de hembras sin inducción con TRIS-H₂O₂ (S/I).

2.4. Protocolos de producción de híbridos de abulón

Para la producción de híbridos interespecíficas se realizaron cinco eventos de desove, con el objetivo de obtener información para estandarizar los protocolos de fecundación *in vitro* y la obtención de descendencia híbrida viable. De los cinco desoves, tres se realizaron usando hembras de abulón rojo provenientes de granjas comerciales y machos de abulón amarillo silvestre de Punta Canoas, para realizar las cruzas interespecíficas *RxA_m* y obtener la descendencia híbrida denominada *RA_m*. Mientras que, en los últimos dos desoves se usaron hembras de abulón rojo de cultivo y machos de abulón azul silvestre de Isla Guadalupe (*H. fulgens guadalupensis*), con el fin de obtener la craza *RxA_{z-G}* y obtener la descendencia híbrida *RA_{z-G}*. En ninguno de los casos fue posible obtener las cruzas recíprocas, dado que las hembras de abulón amarillo y azul no desovaron con los métodos de inducción usados. Las hembras silvestres, que además ya están acondicionadas a los sistemas de cultivo, se consideran un recurso muy valioso para ser sacrificado, dada su alta fecundidad. Por lo cual aún cuando se probó que se puede usar ovocito obtenido por biopsia gonadal en hembras previamente inducidas con TRIS-H₂O₂ se decidió no sacrificar organismos.

En todos los desoves las cruza control fueron hembras y machos de abulón rojo (*RxR*), obteniéndose la descendencia denominada *RR*.

2.4.1. Protocolo de producción de híbridos entre hembras de abulón rojo de granja y machos de abulón amarillo silvestre de Punta Canoas (cruza *RxAm*)

Para estandarizar los protocolos de obtención de híbridos entre abulón rojo *H. rufescens* y abulón amarillo *H. corrugata*, se realizaron tres eventos de desove. En el primer desove se utilizaron abulones rojos provenientes de la granja comercial Abulones Cultivados S.A. de C.V., mientras que, en para el segundo y el tercer desove se usaron abulones rojos provenientes de la granja comercial Productores Marinas Baja S.A. de C.V., para la cruza control *RxR*. En los tres desoves se utilizaron abulones amarillos silvestres provenientes de Punta Canoas para obtener los híbridos *RAm*. En todos los desoves experimentales se seleccionaron organismos con un IVG de 2 a 3, y las proporciones de hembras y machos de abulón rojo usados variaron según la disponibilidad de reproductores en cada granja.

2.4.1.1. Primer desove: viabilidad del método de biopsia gonadal en cruza interespecífica *RxAm*

En el primer desove se estableció una cruza control cruza *RxR* (CC) y una cruza interespecífica *RxAm* (T1) por triplicado (Fig. 10), para evaluar la viabilidad del esperma de abulón amarillo obtenido por biopsia gonadal en la fecundación de ovocitos de hembras de abulón rojo. En este desove, para la obtención de esperma y ovocitos los abulones rojos se indujeron con el método de TRIS-H₂O₂, mientras que para obtener el esperma de abulón amarillo se usó el método de biopsia gonadal. En el caso del abulón rojo, la liberación de esperma y ovocitos ocurrió después de 2 y 2:30 h después de la exposición con la solución inductora. Mientras que, la biopsia gonadal de un abulón amarillo se realizó en cuanto inicio el desove de las hembras de abulón rojo. El esperma de los machos de las dos especies fue lavado y concentrado por separado en recipientes de 2L, usando los métodos de limpieza de esperma descritos antes. El acopio de ovocitos se realizó posterior a los 20 min de iniciado el desove, después se lavaron, se mezclaron y se dosificaron en recipientes de 15L de acuerdo a los tratamientos propuestos. El esperma fue adicionado en diferentes volúmenes dependiendo de su concentración relativa y la cruza (Fig. 10).

La fertilización se realizó usando una mezcla de ovocitos en concentraciones de 180 ± 80 mil por tratamiento. Por otro lado, el esperma de abulón rojo se llevó a la concentración recomendada por los productores (dependiendo de la translúcida de la muestra). No se realizaron conteos para estimar la concentración de esperma en este primer evento, debido a que el esperma fijado se conglomeró y no se

pudo disgregar ni diluir. Por lo tanto, para asegurar concentraciones de espermatozoides mayores en la cruce interespecífica se fertilizó con 5 veces más volumen que en la cruce conespecífica y con una solución espermática con menor transparencia. Una vez confirmada la fecundación *in vitro* con la expulsión del primer cuerpo polar, los ovocitos fueron lavados tres veces y puestos en estanques de 60L sin flujo de agua, formando una capa delgada en el fondo. La temperatura de incubación fue de $17 \pm 1^\circ\text{C}$. Los ovocitos de 2h post-fecundación se muestrearon por triplicado para determinar la tasa de fecundación como se describe anteriormente.

Cruza interespecífica 1

Edad del ovocito 60 min		
Vol. de espermatozoides (mL)	40	200
Tiempo de contacto espermatozoides-ovocito 20 min		
# de ovocitos /tratamiento $180,000 \pm 80,000$	CC	T1
Sexo, y método de obtención de gametos	 H_2O_2	 H_2O_2 biopsia

Figura 10. Diseño experimental para evaluar la viabilidad del espermatozoides obtenido por biopsia en cruces interespecíficas *RxAm*. CC es el tratamiento de cruce control *RxR* y T1 el tratamiento experimental de cruce interespecífica *RxAm*.

2.4.1.2. Segundo desove: efecto de la edad del ovocito en cruce interespecífica *RxAm*

En el segundo desove se obtuvieron cuatro cruces control *RxR* (C1-C4) y cuatro cruces interespecíficas *RxAm* (T1-T4) por triplicado, con la finalidad de evaluar el efecto de la edad del ovocito. En este desove, los abulones rojos de granja usados fueron inducidos al desove con el método de TRIS- H_2O_2 , obteniéndose la liberación de espermatozoides en abulón rojo después de 1:40 h, mientras que las hembras desovaron 20 min después que los machos. El abulón amarillo se indujo con el método de TRIS- H_2O_2 en combinación con un aumento de la temperatura del agua de 6°C (de 17 a 23°C), y después de 3 h se obtuvieron pulsos de espermatozoides que fue colectado en un recipiente de 2L.

Cruza interespecífica 2

Edad del ovocito min	12	15	25	40	12	15	25	40
[] esperma	1.56 x 10 ⁷				1.11x10 ⁸			
Tiempo de contacto esp/ov 30 min	1	1	1	1	1	1	1	1
# de ovocitos/tratamiento 195,000 ±7,500	2	2	2	2	2	2	2	2
Tratamiento	3	3	3	3	3	3	3	3
	C1	C2	C3	C4	T1	T2	T3	T4
Sexo, y método de obtención de gamétos	♀ H ₂ O ₂ ♂ H ₂ O ₂				♀ H ₂ O ₂ ♂ biopsia			

Figura 11. Diseño experimental para evaluar el efecto de la edad de los ovocitos (12, 15, 25 y 40 min postdesove) en cruza interespecíficas *RxAm*. C1-C4 representan los tratamientos de crza control *RxR*; y T1-T4 los tratamientos experimentales de crza interespecífica *RxAm*.

Los ovocitos de abulón rojo de este desove fueron acopiados a los 12, 15, 25 y 40 min postdesove (edad de ovocito). Posteriormente se lavaron y se dosificaron en recipientes circulares de 15L con una cantidad de ovocitos de 195 ± 7.5 mil por tratamiento. El esperma fue adicionado en dos concentraciones dependiendo de la especie 1.56×10^7 y 1.11×10^8 espermatozoides/mL para las cruza control (C1-C4) y interespecíficas (T1-T4), respectivamente (Fig. 11). Posterior a la confirmación de la fecundación mediante la presencia de cuerpo polar, los ovocitos fueron lavados tres veces y puestos en recipientes de 15L hasta su eclosión a una temperatura de incubación de $16 \pm 1^\circ\text{C}$. Para determinar la tasa de fecundación, se tomaron por triplicado muestras de ovocitos fecundados de 3 h de edad en cada tratamiento y se realizaron conteos de ovocitos en segunda división mitótica. A las 17 h post-fecundación se volvieron a tomar muestras por triplicado de cada tratamiento para determinar la tasa de eclosión y de deformidades. Posteriormente, las larvas trocóforas fueron recuperadas con un juego de tamices a 150 y 100 μm , concentradas en un volumen conocido y cuantificadas para determinar el número de larvas en cada tratamiento. Finalmente, se mezclaron los tratamientos de cada crza (*RxR* y *RxAm*) en dos estanques estáticos de 4000L para su cultivo larval, teniendo densidades de 1.05 larvas/mL para la crza *RxR*, y de 0.15 larvas/mL para la crza *RxAm*. Durante este periodo los organismos se sifonearon y recuperaron diario como se describe anteriormente; los estanques de cultivo se lavaron antes de colocar nuevamente

las larvas en ellos. Por último, se obtuvo la tasa de supervivencia diaria de cada crua durante los seis días de cultivo larval usando la fórmula $TSD = (\# \text{ de larvas registradas} \times \text{día} / \# \text{ de larvas inicial}) * 100$.

2.4.1.3. Tercer desove: efecto de la concentración espermática en crua interespecífica *RxAm*

En el tercer desove se realizó una crua control *RxR* (CC) con una concentración de 4.9×10^6 espermatozoides/mL y tres cruas interespecíficas *RxAm* (T1-T3), en donde se evaluaron tres concentraciones espermáticas: 3.9×10^7 , 9.16×10^7 y 6.96×10^8 espermatozoides/mL por cuadruplicado (Fig. 12). Durante este desove la liberación de esperma en el caso del abulón rojo ocurrió después de 1:50 h en machos y 2:20 h en hembras inducidas con el método de TRIS-H₂O₂. Mientras que, para obtener esperma del abulón amarillo se realizó la biopsia del tejido gonadal de un macho, siguiendo los pasos descritos con anterioridad (sección 2.3.2.1). Una muestra de 10 ml del esperma se colectó para estimar la calidad espermática relativa y la concentración espermática (sección 2.3.2.2). Los ovocitos se acopiaron a los 25 min post-desove (edad) y se lavaron, mezclaron y dosificaron en recipientes de 15 L. La cantidad de ovocitos por tratamiento fue de 64895 ± 7741 y el tiempo de contacto entre gametos de 30 min, posterior al cual los ovocitos fecundados fueron lavados varias veces para eliminar el exceso de espermatozoides. El cultivo larval se llevó a cabo en recipientes de 15L y las larvas fueron lavadas y recuperadas diariamente con un juego de tamices de 200, 150 y 100 μm , posteriormente se concentraron en recipientes de 2L y se muestrearon por triplicado para cuantificarlas, después fueron transferidas nuevamente en los recipientes de cultivo. La supervivencia se evaluó diariamente a partir de los conteos larvales.

2.4.2. Producción de híbridos entre hembras de abulón rojo de granja y machos de abulón azul silvestre de Isla Guadalupe

En total se realizaron dos desoves experimentales (cuarto y quinto) en los cuales se usaron abulones rojos provenientes de la granja comercial Abulones Cultivados S. A. de C. V y abulones azules silvestres de Isla Guadalupe (*RAz-G*). En cada una de las cruas experimentales se sometió a un organismo macho de abulón azul al método de biopsia de tejido gonadal para obtener esperma. Mientras que, los abulones rojos fueron inducidos al desove con el método de TRIS-H₂O₂.

Cruza interespecífica 3

Edad del ovocito (min)	30	30	30	30
[]de esperma	4.95×10^6	3.9×10^7	9.16×10^7	6.96×10^8
Tiempo Contacto esp/ov 30 min				
				
# Ovocitos / tratamiento $64,895 \pm 7741$				
				
Tratamiento	CC	T1	T2	T3
Sexo, y método de obtención de gametos	  H ₂ O ₂	  H ₂ O ₂ biopsia		

Figura 12. Diseño experimental para evaluar el efecto de la concentración espermática en cruza interespecíficas *RxA_m*; CC es el tratamiento de crza control *RxR* y T1-T3 los tratamientos experimentales de crza interespecífica *RxA_m*.

2.4.2.1. Cuarto desove: efecto de la concentración espermática en crza interespecífica *RxAZ-G*

En este cuarto desove, se establecieron tres cruza control *RxR* (C1-C3) y tres cruza interespecíficas *RxAZ-G* (T1-T3), por triplicado, para evaluar el efecto de la concentración espermática en las tasas de fecundación, eclosión y supervivencia (Fig. 13). Los abulones rojos fueron inducidos con el método del TRIS-H₂O₂; los machos desovaron 2 h posterior a la inducción, mientras que las hembras desovaron a las 2:40 h. En el caso del abulón azul, la biopsia del tejido gonadal se realizó 30 min antes del inicio del desove de las hembras de abulón rojo. El esperma de los machos de las dos especies fue lavado y concentrado por separado en recipientes de 4L, usando los métodos de limpieza de esperma ya descritos. Mientras que, los ovocitos de 15 min de edad, se acopiaron en recipientes de 15L y se lavaron, mezclaron y dosificaron por volumen en los diferentes tratamientos para su posterior fecundación.

Se realizó una evaluación relativa del esperma obtenido por biopsia y se determinó el porcentaje de esperma viable. La fecundación se realizó usando ovocitos en concentraciones de 540416 ± 215980 por tratamiento. El tiempo de contacto entre gametos fue de 15 min, después de los cuales, los ovocitos fecundados fueron lavados tres veces con abundante agua para eliminar el exceso de esperma.

Finalmente, los ovocitos fecundados fueron dejados en reposo sin flujo de agua, en recipientes de 15L a temperatura de incubación de $18\pm 1^\circ\text{C}$.

Cruza interespecífica 1 RAz-G

Edad del ovocito (min)	15	15	15	15	15	15
[] de esperma	3.4×10^6	6.8×10^6	6.8×10^7	4.8×10^6	1.8×10^7	1.2×10^8
# de ov/ tratamiento 540416 ± 215980	1 2 3	1 2 3	1 2 3	1 2 3	1 2 3	1 2 3
Tratamiento	C1 C2 C3			T1 T2 T3		
Sexo, y método de obtención de gametos	♀ ♂ H_2O_2 H_2O_2			♀ ♂ H_2O_2 biopsia		

Figura 13. Diseño experimental para evaluar el efecto de la concentración espermática en cruza interespecíficas *RxAz-G*; C1-C3 es el tratamiento de crza control *RxR* y T1-T3 los tratamientos experimentales de crza interespecífica *RxAz-G*.

En este evento se estimaron las tasas de fecundación, eclosión, deformidad y supervivencia larval como se describió anteriormente (sección 2.3.2.2). Las larvas fueron recuperadas a diario con juegos de tamices de 100, 150, 180 y 200 μm , posteriormente fueron concentradas en un volumen conocido, cuantificadas y transferidas a recipientes de 15L acondicionados con una manguera de aireación en la parte superficial para su cultivo larval; diariamente se realizaron cambios de agua y se eliminaron los restos de organismos muertos.

2.4.2.2. Quinto desove: efecto de la edad del ovocito en crza interespecífica *RAz-G*

En el quinto evento de desove, con la finalidad de evaluar el efecto de la edad del ovocito en las cruza interespecíficas se establecieron tres cruza control *RxR* (C1-C3) y tres cruza experimentales *RxAz-G* (T1-T3) por triplicado usando ovocitos de 11, 15 y 24 min de edad obtenido de hembras de abulón rojo de cultivo inducidas con el método de TRIS- H_2O_2 (Fig. 14). El esperma de abulón rojo se obtuvo con el mismo método a las 2:40 h después de haber iniciado la inducción, mientras que el esperma de abulón azul se obtuvo a través de biopsia del tejido gonadal de un organismo. La biopsia del abulón azul se realizó cuando

comenzaron a desovar los abulones rojos machos. El esperma fue concentrado en recipientes de 4L, posteriormente el esperma de abulón rojo se diluyó usando una proporción de 1:10 de solución concentrada de esperma y agua marina filtrada e irradiada con luz UV y el esperma de abulón azul se uso concentrado. Ambas soluciones fueron usadas para fecundar los tratamientos en un volumen de 40 mL de esperma de abulón rojo y 200 mL de esperma azul. Antes de la fecundación los ovocitos fueron pasados por un juego de tamices de 200, 150 y 100 μm , y los gametos retenidos en 150 y 100 μm se mezclaron en un recipiente de 15L y posteriormente se dosificaron en los tratamientos. El tiempo de contacto entre esperma y ovocito se fijó a 15 min, posterior a los cuales se lavo el ovocito y fue depositado en los recipientes de eclosión. Las tasas de fecundación, eclosión, deformidad y supervivencia larval fueron evaluadas.

Cruza interespecífica 2 *RAz-G*

Edad del ovocito (min)	11	15	24	11	15	24
Vol. de esperma	40mL			200 mL		
# de ov/ tratamiento 612,187 ± 225,003	1	1	1	1	1	1
	2	2	2	2	2	2
	3	3	3	3	3	3
Tratamiento	C1	C2	C3	T1	T2	T3
Sexo, y método de obtención de gametos	♀ H ₂ O ₂	♂ H ₂ O ₂		♀ H ₂ O ₂	♂ biopsia	

Figura 14. Diseño experimental para evaluar el efecto de la edad de los ovocitos (11, 15 y 24 min postdesove) en cruza interespecífica *RxAz-G*; C1-C3 es el tratamiento de cruce control *RxR* y T1-T3 los tratamientos experimentales de cruce interespecífica *RxAz-G*.

2.5. Desarrollo embrionario y larval en abulones híbridos

Los ovocitos fecundados pasan por una serie de etapas de desarrollo embrionario durante las primeras 16-22 h post-fecundación, dependiendo de la temperatura de incubación, hasta convertirse en una larva trocófora. Durante las pruebas experimentales de híbridos se registraron los tiempos para alcanzar las diferentes etapas de desarrollo embrionario y larval obtenidos de las progenies *RAM* y *RAz-G*, y se compararon con los tiempos que le tomó a la progenie pura *RR* alcanzar las mismas etapas. Para esto se muestrearon 10 mL de cada uno de los tratamientos cada hora durante los primeras 22 h y posteriormente

se realizaron cada 24 h. Los ovocitos y las larvas se observaron al microscopio a 100X de aumento. Se realizó una captura de imágenes de forma aleatoria usando una cámara Samsung J700M. Las etapas de desarrollo embrionario se determinaron según lo descrito por Leighton (2000); mientras que las etapas de los estadios larvales se determinaron según las descripciones de De-Vicosé *et al.* (2007). La talla de las larvas de las diversas progenies se obtuvieron calculando el tamaño de la longitud de la concha a través de mediciones directas. La longitud de la concha (LC) se midió con ayuda de un microscopio marca Zeiss Primo Star, al cual se adaptó con una reglilla ocular y posteriormente se calibró con una reglilla de 1 mm. La tasa de crecimiento larval diaria fue calculada hasta que las larvas alcanzaron el estadio de larva competente con la fórmula: $TCD (\mu\text{m}/\text{día}) = (LC_i - LC_f) / t$; donde: LC_f y LC_i corresponden a la longitud final e inicial de las conchas de las larvas, y t es el tiempo entre las mediciones.

2.6. Fijación de larvas competentes y cultivo de juveniles

Después del periodo de cultivo larval, se colectaron las larvas retenidas a 200 μm en recipientes de 4L, se determinó la densidad larval y se realizó la siembra en los recipiente de fijación. Para la fijación de las larvas *RAm* y su control, se utilizaron dos tipos de recipientes de tereftalato de polietileno (PET) con un área de 1,015 cm^2 y dos recipientes de polietileno con una superficie de 3,239 cm^2 , mientras que para la cruce *RAz-G* y su control se utilizaron recipientes con una superficie de 3,110 cm^2 . En ambos casos los recipientes fueron inoculados con *Navicula incerta* 24 h previas a la fijación. Los recipientes fueron acondicionados con aire e iluminación constante.

La densidad larval de la cruce *RxA*m y su control fue de 1,300 larvas/recipiente equivalentes a 1.6 y 5.1 larvas competentes/ cm^2 , para los recipientes de 3,239 y 1,015 cm^2 , respectivamente. Por otro lado la densidad larval utilizada en de la progenie *RAz-G* y *RR* fue de 4,000 larvas competentes en cada recipiente equivalente a 0.8 larvas competentes/ cm^2 . La densidad larval obtenida al día 30 de cada una de las cruces se comparó con el total de larvas sembradas inicialmente en el estanque para determinar la tasa de fijación larval, con la fórmula Tasa de Fijación (%) = $[\# \text{ total de larvas fijadas} / \# \text{ total de larvas sembradas}] \times 100$.

Los organismos en ambos casos fueron alimentados cada semana con *Navicula incerta*, durante los primeros 150 días posterior al asentamiento. A partir del día 110 se inició el suministro de *Macrocystis pyrifera* sin retirar la adición de *Navicula incerta* a los cultivos para acondicionar paulatinamente a los abulones juveniles al cambio de alimentación. Los organismos permanecieron en los recipientes de asentamiento hasta el final de las pruebas experimentales.

2.7. Desempeño de abulones híbridos

Las condiciones de cultivo de postlarva (PL) y juveniles se mencionaron anteriormente para las progenies de las cruzas interespecíficas y sus controles. El período de cultivo total evaluado fue de 180 días (6 meses) para la craza *RxA_m*, los muestreos para medir crecimiento de PL y juveniles se realizaron los días 0, 90, 150, 180 (cuando los organismos presentaron una edad de 7, 67, 157 y 187 días), mientras que, la supervivencia se registró los días 0, 30, 90, 150, 180 post-asentamiento (fijación larval).

Para la craza *RAz-G* el tiempo de cultivo de PL y juveniles fue de 60 días en ambos, los muestreos de crecimiento fueron los días 0, 30 y 60 de cultivo (cuando los organismos presentaron una edad de 6, 36 y 66 días de edad) y supervivencia se midieron los días 0, 8, 15, 30 y 60 post-asentamiento (fijación larval).

La Tasa de Crecimiento Diario (TCD) fue determinada con la fórmula : $TCD (\mu\text{m}/\text{día}) = [(LC_i - LC_f) / t]$; donde LC_i y LC_f corresponden a la longitud de la concha inicial y final de los organismos, respectivamente, y t es el tiempo entre mediciones. Por otra parte, la Tasa de Crecimiento Específica (TCE) se calculó con la fórmula: $TCE (\%/día) = [(\ln(LC_i) - \ln(LC_f))] / t$, donde $\ln(x)$ es el logaritmo natural de la medición. Mientras que, la tasa de supervivencia fue calculada con respecto al número de larvas fijadas al día 30, con la fórmula $T_{\text{Supervivencia}} (\%) = [\# \text{ total de organismos en } t / \# \text{ total de larvas fijadas}] \times 100$. El número de organismos en el tiempo t , se realizó con conteo directo de la superficie inundada de los recipientes.

2.8. Análisis estadístico de las cruzas

Para comparar que los tratamientos presentaban el orden de magnitud deseado en el incremento de la concentración de esperma se evaluó la relación esperma/ovocito con una prueba de ANOVA de una vía. Con el fin de normalizar la distribución de los datos los resultados obtenidos en porcentaje en las pruebas realizadas se transformaron a raíz de arco-seno previo a su análisis estadístico (McDonald, 2009), posteriormente los datos fueron sometidos a las pruebas de normalidad de Shapiro-Wilk, Liliford y Kolmogorof-Smirnof y de homogeneidad de varianza con la prueba de Levene. Cuando los datos cumplieron con los supuestos de normalidad se realizó un análisis paramétrico de ANOVA de una vía seguido de una prueba a *post hoc* de Tukey, cuando los datos no cumplieron con los supuestos de normalidad se realizó una prueba de ANOVA no paramétrico Kruskal-Wallis y una prueba *post hoc* de Dunn's. Los porcentajes de fecundación y eclosión de las evaluaciones de esperma y ovocito obtenido por

biopsia, además del porcentaje de deformidad en el caso de la evaluación de la biopsia en machos no cumplieron con los supuestos de normalidad por lo que se analizaron con la prueba de ANOVA no paramétrica de Kruskal-Wallis con un nivel de confianza del 95% para determinar si había diferencia significativa entre los tratamientos. Los tratamientos que presentaron diferencias en cada prueba se determinaron con la prueba *post hoc* de Dunn's. El porcentaje de supervivencia al finalizar el cultivo larval de la prueba de biopsia gonadal en machos cumplió con los supuestos de normalidad por lo que se analizó con la prueba paramétrica de ANOVA de una vía, para determinar si existían diferencias entre los tratamientos.

En las pruebas experimentales de híbridos entre hembras de abulón rojo y machos de abulón amarillo (*RxA_m*) se analizaron los porcentajes de fecundación, eclosión y supervivencia larval con la prueba de ANOVA no paramétrico de Krukal-Wallis con un nivel de confianza del 95%. Los tratamientos con diferencias significativas se obtuvieron con una prueba *post hoc* de Dunn's. Durante la evaluación del efecto de la edad del ovocito los tratamientos de la cruce *RxA_m* se mezclaron en un solo contenedor al igual que los tratamientos control, al no existir replicas la supervivencia larval solo se registró por cruce y no se realizaron pruebas estadísticas. Por otro lado, en la evaluación del efecto de la concentración de esperma en la cruce *RxA_m*, la supervivencia se analizó con un ANOVA de una vía, para determinar si existían diferencias significativas entre los tratamientos en cada día de cultivo larval, seguido de una prueba *post hoc* de Tukey para determinar los tratamientos que presentaban diferencias.

En las pruebas experimentales de híbridos entre hembras de abulón rojo y machos de abulón azul (*RxA_z-G*) se analizaron los porcentajes de fecundación, eclosión y supervivencia larval con la prueba de ANOVA no paramétrico de Krukal-Wallis con un nivel de confianza del 95%. Las diferencias entre tratamientos se obtuvieron con una prueba *post hoc* de Dunn's. Dado que no se contó con replicas suficientes por tratamientos ($n=2$ o menos) la supervivencia larval se registró por tratamiento en las dos pruebas experimentales.

La TCD de larval, postlarvas y juveniles, así como la TCE de cada cruce se evaluaron con la prueba de t de Student para dos muestras independientes (Conroy, 2012). Las tasas de fijación y supervivencia de postlarvas y juveniles solo se registraron y no fueron analizadas estadísticamente. Los análisis se llevaron a cabo con ayuda del programa R Commander versión 3.2.2 (Dinno, A. 2014; Mangiafico, S. S. 2015).

Capítulo 3. Resultados

3.1. Temperatura de maduración de abulón amarillo

Durante el periodo de maduración los nutrientes y los parámetros fisicoquímicos se mantuvieron estables, no se registraron concentraciones o valores que pudieran representar riesgos para los organismos. Los niveles de NO_2^- , NO_3^- y NAT se mantuvieron en 0.175 ± 0.07 mg/L, 60 ± 10 mg/L y 0.2 ± 0.05 mg/L, respectivamente. EL oxígeno, el pH y la alcalinidad se mantuvieron estables en el sistema. Los niveles máximos y mínimos de oxígeno alcanzados fueron 8.24 ± 0.54 mg L^{-1} y 6.37 ± 0.54 mg $\cdot \text{L}^{-1}$, el pH promedio registrado fue de 8.0 ± 0.2 y la alcalinidad promedio fue de 200 ± 36 mg/L.

La Temperatura Efectiva Acumulada calculada durante el periodo de acondicionamiento, desde el final del periodo de cuarentena hasta que los organismos obtuvieron un IVG de 2 a 3 fue de 2000 a 2400 °C·día, respectivamente (Fig. 15). El acondicionamiento duró 20 semanas y el gradiente de temperatura demostró ser suficiente para madurar abulones amarillos con una longitud de concha de 155.33 ± 30.32 mm.

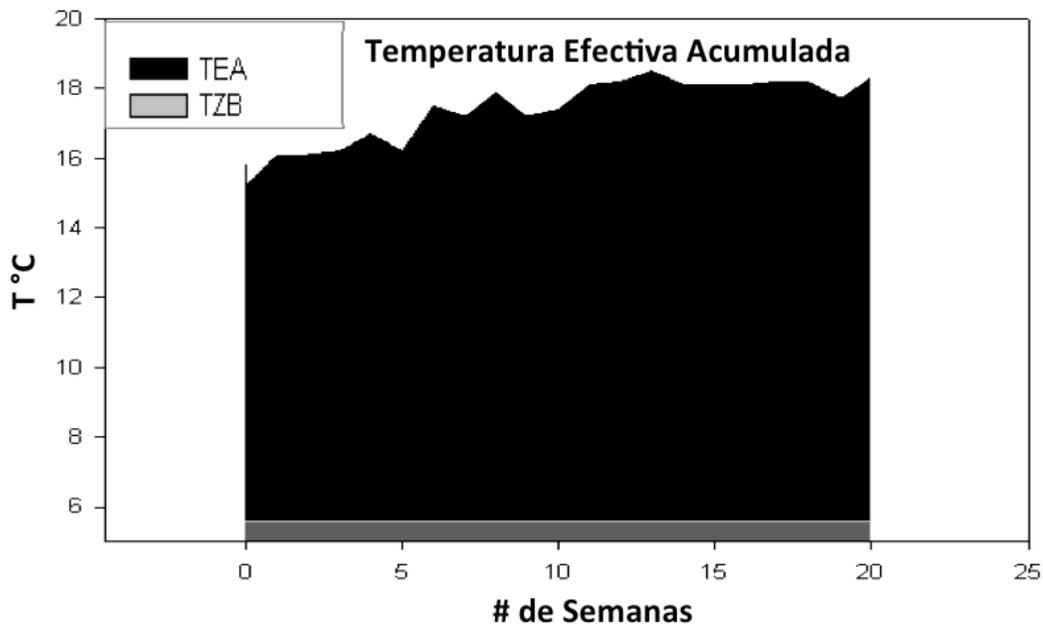


Figura 15. Temperatura registrada durante el acondicionamiento; TEA corresponde al área sombreada.

El momento en el que se comenzó a observar la gónada correspondió a los 800 °C·día (durante la séptima semana después de la cuarentena). El periodo en el que los organismos presentaron un Índice Visual Gonadal de 3 se alcanzó después de 20 semanas de acondicionamiento equivalente a 2400 °C·día (Fig.16).

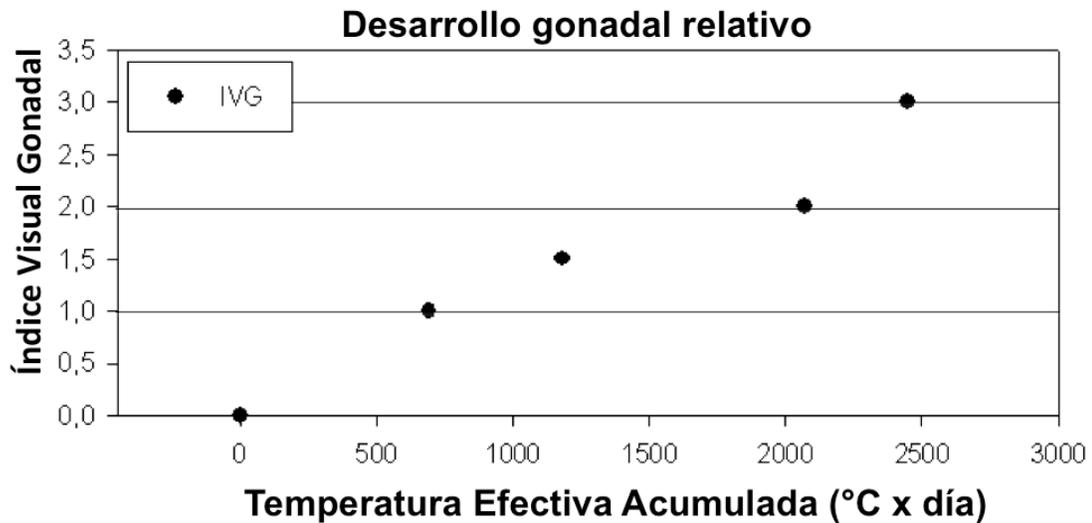


Figura 16. Incremento del Índice Visual Gonadal (IVG) y °C-día acumulados para alcanzar los diferentes estadios de madurez en abulón amarillo

3.2. Identificación del sexo y estimación del grado de madurez sexual

El complejo hepatogonadal (CHG) de los abulones comenzó a mostrar abultamiento a partir del día 50, no obstante, la pigmentación del tejido gonadal solo permitió identificar puntualmente a los machos. Las hembras mostraron pigmentación similar a la de los organismos indiferenciados hasta el quinto mes del periodo de acondicionamiento y solo después del análisis histológico fue posible corroborar su sexo y asociarlo a un nivel de madurez gonadal, con base en las características descritas en la Tabla 2 (Fig. 17). La expansión del CHG durante el periodo de acondicionamiento se observó claramente en los organismos machos mientras que en las hembras solo se observó un incremento de volumen en la zona de la glándula digestiva. El abultamiento en las zonas apicales de los organismos machos se comenzó a observar después de los 100 días de acondicionamiento. Este abultamiento estuvo acompañado de una cobertura total de la parte basal de la glándula digestiva por tejido gonadal. En el día 150 de acondicionamiento se observaron organismos con CHG que sobresalían de la concha, en el caso de las hembras la coloración comenzó a cambiar dejando ver un color caqui, mientras que en el caso de los machos la gónada, en algunos casos cambia de crema a tonalidades naranjas. Los organismos hembras y machos presentaron abultamientos similares al mismo tiempo, no obstante, en el caso de los machos el color de la gónada de algunos organismos comenzó a tornarse con tonalidades amarillas.

Nueve de los diez organismos acondicionados pudieron ser sexuados y clasificados en una escala de desarrollo al final del periodo de acondicionamiento. La proporción de sexos en el lote de reproductores fue de 2:1 machos y hembras, teniendo en total seis machos y tres hembras.

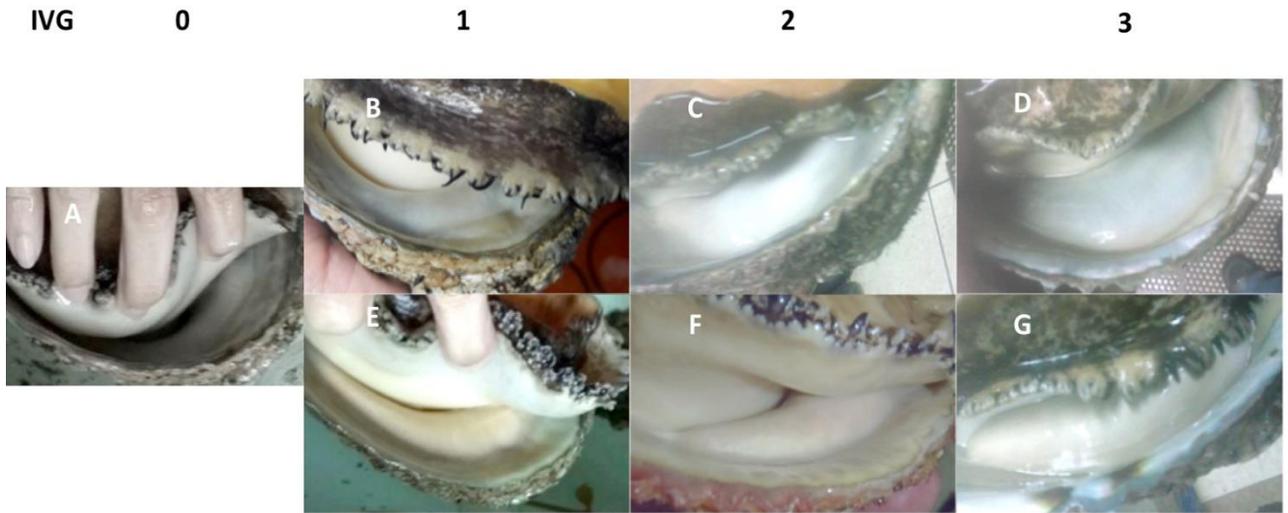


Figura 17. Asignación del grado de madurez de acuerdo al incremento en el IVG. A) Se muestra un organismo sin desarrollo gonadal (IVG 0); B), C) y D) se muestran las fases del desarrollo gonadal de una hembra con IVG de 1, 2 y 3, respectivamente. En E), F) y G) se muestra el desarrollo gonadal de un macho con un IVG de 1, 2 y 3, respectivamente.

3.3. Histología del complejo hepatogonadal congelado

En abulón azul, al comparar los CHG procesados por el método de histología de tejido congelado y el método de inclusión en parafina se observaron células con el mismo grado de madurez tanto en machos como en hembras. Sin embargo, en ambos sexos, en el tejido congelado se observaron cambios en el estado general de las membranas que rodean los tejidos y en la forma de los ovocitos, principalmente en su tamaño.

La microtomía realizada en el criostato provocó una mayor separación entre los gametos, lo cual dificultó la asignación de madurez, no obstante, las células presentaron otras estructuras que se asocian a diferentes estadios de desarrollo (Tabla 2). Por ejemplo, el CHG de machos de *H. fulgens guadalupensis* procesado por el método de histología del tejido congelado, presentó una mayor cantidad de espacios en las zonas del tejido gonadal que el CHG procesado por inclusión en parafina (Fig 18 A-C). A pesar de esto, se observaron paquetes de esperma arreglados uniformemente y túbulos definidos en la gónada congelada. Las partes medias (B, E, H) y apicales (C, F, I) presentaron paquetes de esperma con mayor arreglo comparados con la parte basal (A, D, G), lo cual se debe al grado de compactación que presentaba el tejido gonadal en esas zonas. Los CHG de organismos machos de abulón azul (A-F) y abulón amarillo (G-I) presentaron características similares en las tres zonas observadas (Fig. 18).

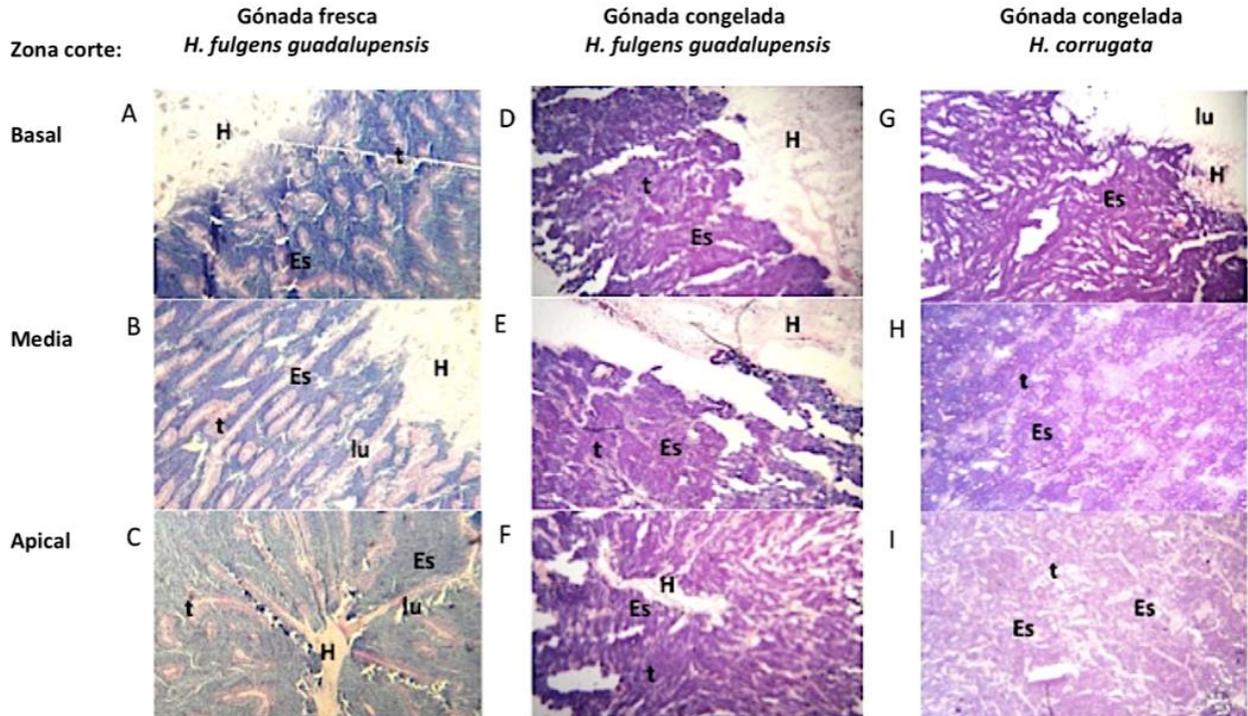


Figura 18. Características histológicas de tejido gonadal fijado y congelado de machos de abulón. A), B) y C) muestran la parte basal, media y apical, respectivamente, de una gónada fresca de *H. f. guadalupensis*; las imágenes D), E) y F) muestran la parte basal, media y apical, respectivamente, de una gónada congelada de *H. f. guadalupensis* y las imágenes G), H) e I) muestran las partes basal, media y apical, respectivamente, de una gónada congelada de *H. corrugata*. Las letras muestran los lugares en donde se pueden observar algunas estructuras como: **H**: hepatopáncreas, **Ec**: espermatocito, **Es**: espermatozoides, **L**: lumen, **t**: túbulos espermáticos.

En el caso de las hembras, los ovocitos de los CHG congelados se observaron deformados, y con espacios entre ellos, no obstante, en algunos cortes aún se podían diferenciar las trabéculas en forma de vainas con ovocitos semi redondos mayores a 100 μm en su interior. En el CHG congelado de abulón azul se observaron ovocitos con un mayor grado de desarreglo y con la cromatina nuclear sin forma definida, lo cual es una característica de ovocitos atrésicos o en proceso de reabsorción. Los ovocitos atrésicos también se observaron en las muestras procesadas con parafina, lo cual sugiere que los organismos se encontraban desovados al momento del muestreo (Fig. 19 A-C). Al comparar estos cortes con las muestras de tejido obtenidas de los abulones amarillos parcialmente desovados se pudo observar un mayor grado de conservación de la cromatina nuclear, así como de ovocitos de mayor tamaño y con forma más redondeada. De igual manera, se observaron las trabéculas con mayor contenido de ovocitos y no se observaron ovogonias u ovocitos en crecimiento (Fig. 19G-I).

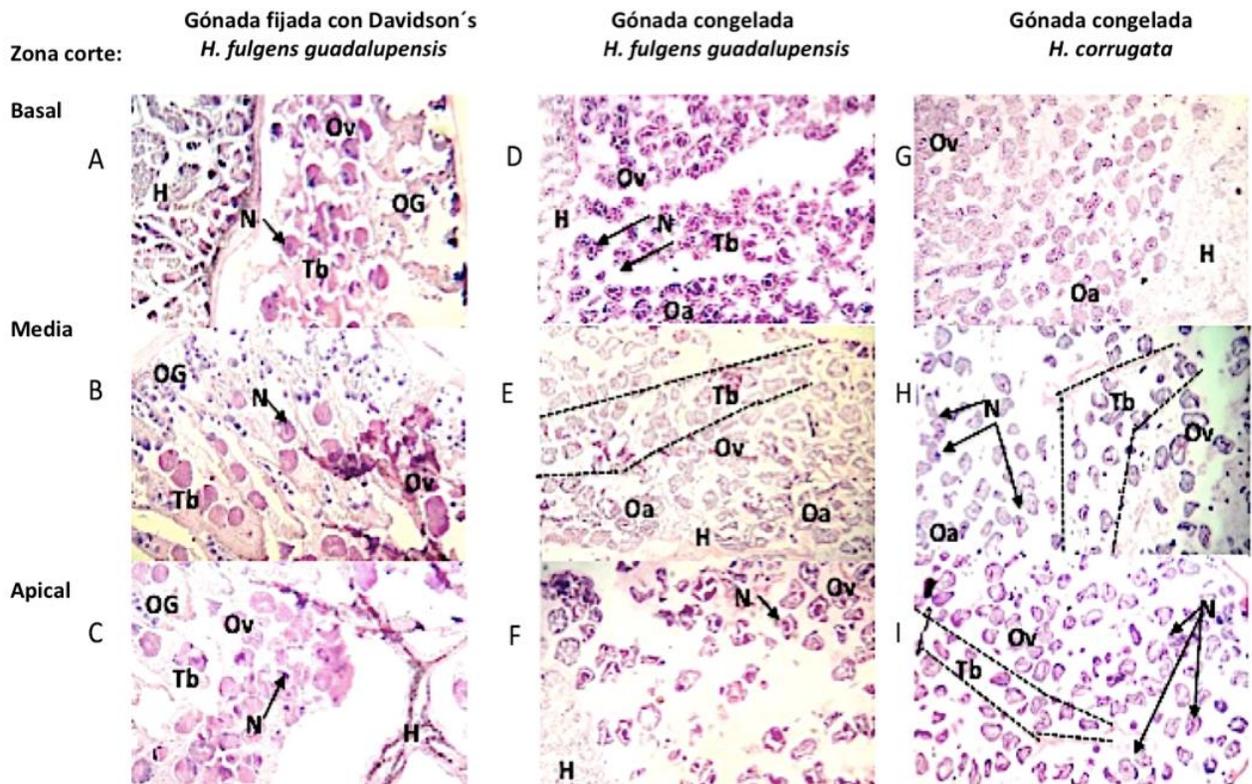


Figura 19. Características histológicas de tejido gonadal fresco y congelado de hembras de abulón. A), B) y C) muestran la parte basal, media y apical, respectivamente, de una gónada fresca de *H. fulgens guadalupensis*; las imágenes D), E) y F) muestran la parte basal, media y apical, respectivamente de una gónada congelada de *H. fulgens guadalupensis* y las imágenes G), H) e I) muestran las partes basal, media y apical, respectivamente de una gónada congelada de *H. corrugata*. Las letras muestran los lugares en donde se pueden observar algunas estructuras como: **H**: hepatopáncreas, **Tb**: Trabécula, **OG**: ovogonias, **Oa**: Ovocito atrésico, **Ov**: Ovocito **N**: núcleo.

En seis de los siete abulones amarillos analizados histológicamente, se corroboró la presencia de gametos. El organismo muestreado al inicio del experimento no presentó formación epitelio gonadal (Fig. 20. a-b). En los tejidos analizados de los seis organismos restantes, no se observaron células germinales primordiales en las gónadas, lo cual es un indicio de que los gametos estaban en estadios avanzados de madurez. Todos los organismos machos presentaron un IVG de 2 (Fig. 20. c-d) a 3 (Fig. 20. g-h) al momento de ser muestreados. En el caso de las hembras, solo una presentó un IVG de 2 (Fig. 20. e-f), mientras que otras dos hembras se encontraban maduras con signos de un desove parcial (Fig. 20. i-j). En ellas se encontraron ovocitos maduros y atrésicos cubriendo la glándula digestiva. En la parte apical del tejido gonadal de todas las hembras presentaron una membrana interna vestigial, que indicaba la sustitución del hepatopáncreas por tejido gonadal.

En los CHG de abulones amarillos machos se observó una abundante cantidad de espermatozoides. El tejido gonadal abarcó más área que el hepatopáncreas en la parte media y basal de los conos. En la parte apical de los machos no se encontraron vestigios del epitelio que delimita la glándula digestiva.

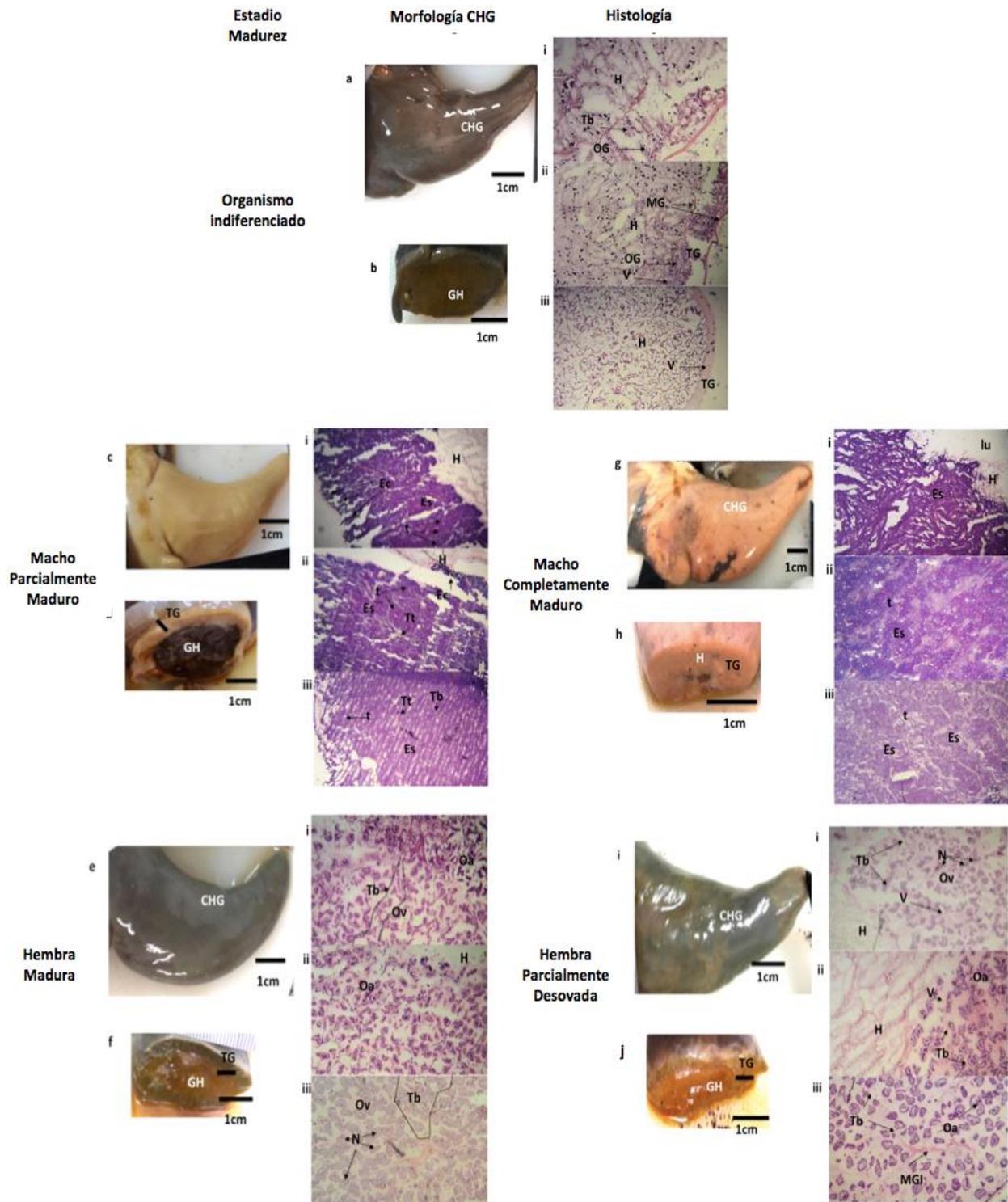


Figura 20. Características morfológicas e histología de las glándulas cónicas del complejo hepatogonadal (CHG) de abulón amarillo en diferentes estados de desarrollo: a) y b) indiferenciado; c) y d) macho en desarrollo, e) y f) hembra madura; g) y h) macho completamente maduro; i) y j) hembra parcialmente desovada. Cortes histológicos del CHG de abulón amarillo: i, ii y iii, corresponden a la parte basal, media y apical del cono, respectivamente. Las letras muestran los lugares donde se observan algunas estructuras como: **H**: hepatopáncreas, **Tb**: Trabécula, **OG**: ovogonias, **TG**: tejido gonadal, **GH**: glándula hepatopáncreal, **MG**: membrana gonadal, **MGI**: membrana gonadal interna, **V**: vitelo, **Oa**: Ovocito atrésico, **Ov**: Ovocito, **Ec**: Espermatozoides, **Es**: Espermatozoides, **L**: Lumen y **t**: túbulos espermáticos.

Las hembras presentaban ovocitos deformados por el congelamiento y descongelamiento, no obstante, mantenían un arreglo uniforme en la trabécula, un núcleo definido, tamaño mayor a 150 μm y la parte apical del cono poblada completamente por ovocitos lo cual permitió identificar a las hembras maduras y diferenciarlas de las hembras desovadas.

3.4. Viabilidad espermática del método de biopsia gonadal en machos de abulón rojo

Los resultados obtenidos de la biopsia gonadal de machos de abulón rojo, muestran que en el momento de la extracción de esperma un mayor porcentaje se encuentra aletargado, con poco o nulo movimiento autónomo. Pero, después de 10 min el esperma mostró mayor movimiento unidireccional, la natación comenzó a ser vigorosa y aproximadamente un 60 % de esperma mostró movimiento. Después de 20 min la cantidad de esperma con movimiento fue de aproximadamente 90 % y a los 50 min la intensidad del nado en el esperma activo comenzó a disminuir, incrementándose la cantidad del esperma que nadaba en círculos o que no presentaba movimiento, teniendo como resultado una viabilidad relativa de 40 %.

En este experimento se utilizaron tres concentraciones espermáticas (2.8 , 5.6 y 8.4×10^7 esp/mL) y dos tiempo de contacto entre espermas y ovocitos (TC esp/ov; 30 y 50 min) para evaluar la capacidad del esperma colectado a través de biopsia del tejido gonadal. En el control (CC) y en los primeros cinco tratamientos (T1-T5) la relación esperma:ovocitos (esp/ov) cumplió con lo planteado. Mientras que, el ultimo tratamiento con una concentración espermática de 8.4×10^7 esp/mL (T6) no mostró diferencias con el tratamiento donde se usaron concentraciones de esperma de 5.6×10^7 esp/mL (T5), por lo que evaluar los efectos de una alta relación esp/ov (8.4×10^7 esp/mL) con un TC esp/ov de 50 min no fue posible (Fig. 21A).

El porcentaje de fecundación más alto lo presentó el tratamiento T5 (con una concentración de esperma de 5.6×10^7 esp/mL; y un TC esp/ov de 50 min) con 85 %, resultado que fue ligeramente mayor pero no significativo que el obtenido en la cruce control (75 %; $P= 0.505$). El tratamiento T4, con menor concentración espermática (2.8×10^7 esp/mL) y TC esp/ov de 50 min, presentó la tasa de fecundación más baja con una mediana de 33 % mostrando diferencias significativas con los tratamientos T5 y T6 ($P < 0.05$; Fig. 21B).

Por otra parte, la mayor tasa de eclosión la presentó la cruce control con 96 %, seguida del tratamiento T1 con 94 % y T3 con 90 %. Mientras que, las tasas de eclosión más bajas las presentaron los tratamientos T5

y T6 con 63 y 72 %, respectivamente (Fig. 21C; Tabla 5, Anexo F). Los porcentajes de eclosión no mostraron diferencias significativas entre tratamientos debido a la alta variabilidad de los datos (rangos, Fig. 21C).

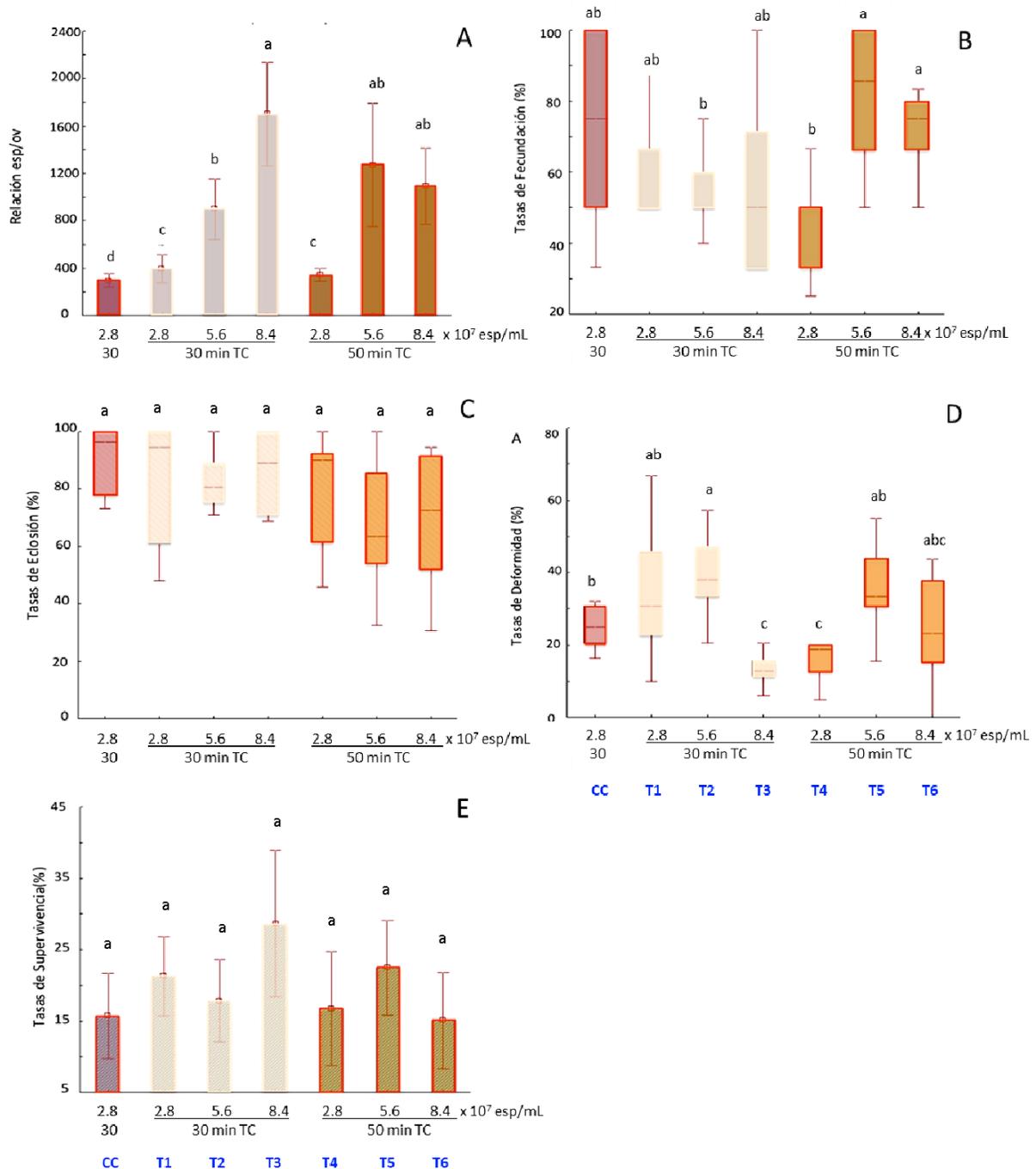


Figura 21. A) Relación espermatozoides/ovocito (esp/ov), B) Tasa de fecundación (%), C) Tasa de eclosión (%), D) Tasa de deformidad (%), E) Tasa de supervivencia (%) de los tratamientos. TC=tiempo de contacto esp/ov. La relación esp/ov y tasa de supervivencia se analizaron con un ANOVA paramétrico de una vía. La gráfica muestra la media y las barras indican el error estándar. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0.05$). Las tasas de fecundación, eclosión y deformidades se analizaron con un ANOVA no paramétrico de Kruskal-Wallis. La gráfica muestra la mediana como una línea roja, las cajas indican los cuartiles y las barras indican los rangos registrados y las letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

La mediana de las tasas de deformidades variaron de 12 a 38 % y fueron significativamente diferentes entre tratamientos ($P < 0.01$). El tratamiento T3 mostró el porcentaje más bajo de larvas deformes y el tratamiento T2 el valor más alto (Fig. 21D). Por último las tasas de supervivencia no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos ($P > 0.05$) debido a la alta dispersión de los datos (Fig. 21E). No obstante, el tratamiento T3 (con una concentración espermática de 8.4×10^7 esp/mL y TC esp/ov de 30 min) presentó la mayor supervivencia larval y el mejor rendimiento (cantidad de larvas respecto al número de ovocitos totales) con 28.6 y 12.5 %, respectivamente (Fig. 21E; Tabla 6, Anexo F).

3.5. Viabilidad de ovocitos obtenidos con biopsia

En esta prueba se utilizó una concentración espermática constante (1.47×10^6 esp/mL) y un TC esp/ov de 15 min, la relación esperma ovocito no presentó diferencias significativas entre los tratamientos ($P > 0.05$; Fig. 22A) aunque fue mayor en el control (> 700 esp/ov) comparado con T1 y T2 (500-550 esp/ov) debido a la variabilidad en las réplicas ocasionada por la dispersión en el número de ovocitos de cada unidad experimental. La evaluación de los ovocitos obtenidos a través de la biopsia de una hembra previamente expuesta a solución de TRIS- H_2O_2 (BCI), no mostró diferencias significativas con los ovocitos desovados con el método tradicional con respecto a su viabilidad determinada por la tasa de fecundación, la cual presentó un rango muy similar al del control (66-100 % vs 60-100 %) e inclusive una mediana ligeramente mayor (96 vs 83 %, respectivamente). Por otra parte, los ovocitos extraídos con el método de biopsia a un organismo que no fue previamente expuesto a la solución de TRIS- H_2O_2 (BSI) no tuvieron la misma viabilidad, dado que la tasa de fecundación obtenida fue de 0-25 % en las réplicas y significativamente diferente con respecto a los otros tratamientos ($P > 0.01$; Fig. 22B).

El desarrollo embrionario de los ovocitos extraídos con el método de biopsia fue normal en los gametos provenientes del organismo con previa inducción y comparable con los obtenidos con el grupo control, reflejándose esto en las tasas de eclosión obtenidas de 88 y 82 % para el método tradicional y el método de BCI, respectivamente. Mientras que, con el método BSI no se obtuvieron larvas trócoforas (Fig. 22C; Tabla 7, Anexo F).

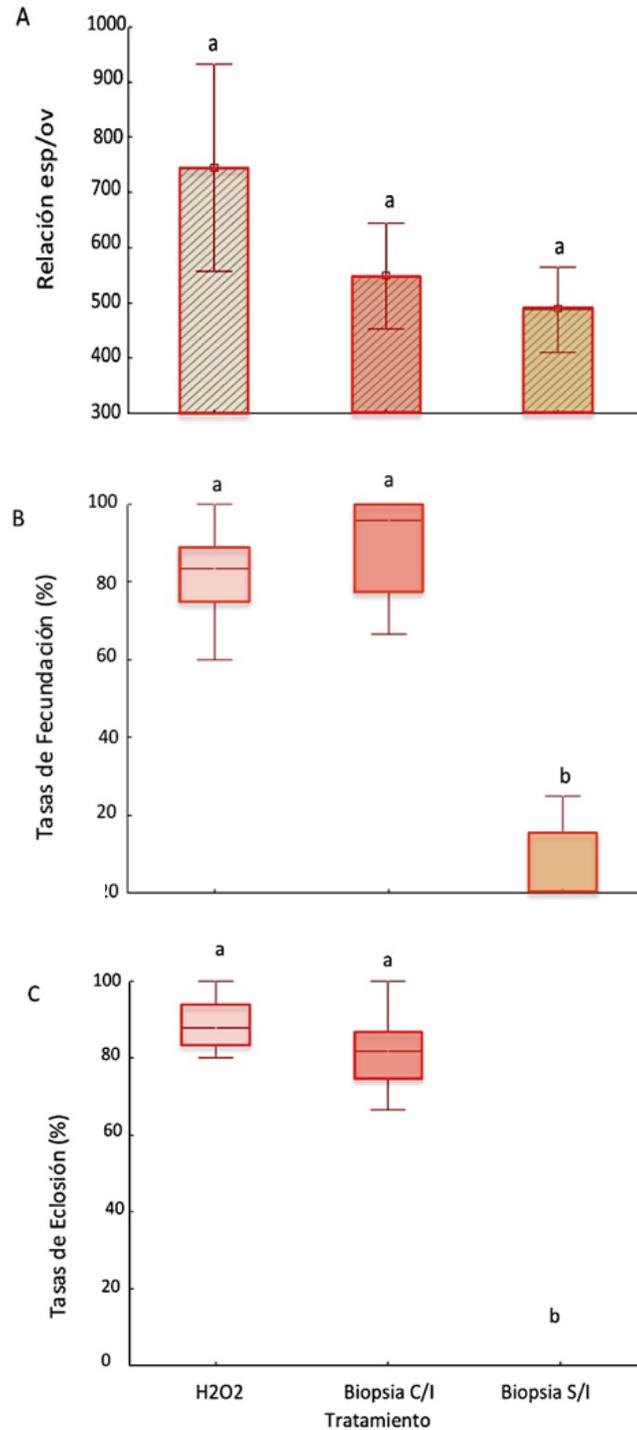


Figura 22. A) Relación esperma/ovocito (esp/ov), B) Tasa de fecundación (%) y C) Tasa de eclosión (%) de los tratamientos con ovocitos obtenidos por biopsia con (BCI) y sin (BSI) previa exposición al método de inducción con TRIS-H₂O₂. La relación esp/ov se analizó con un ANOVA paramétrico de una vía. La gráfica muestra la media y las barras indican el error estándar. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0.05$). Las tasas de fecundación y eclosión se analizaron con un ANOVA no paramétrico de Kruskal-Wallis. La gráfica muestra la mediana como una línea roja y las barras indican los rangos registrados y las letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

3.5.1. Análisis histológico de CHG de hembras sometidos a biopsia

Adicionalmente, se realizó el análisis *in situ* de las características que presentaban los ovocitos extraídos por biopsia, haciendo énfasis en la forma, tamaño y estructura del vitelo para evaluar el grado de madurez de las hembras usadas. El análisis histológico mostró que los ovocitos obtenidos en los tres tratamientos presentaban un tamaño similar de entre 180 y 200 μm ($P>0.05$), con una forma circular y un núcleo bien definido (Fig. 23). Los ovocitos de la hembra que no fue expuesta a la solución de TRIS- H_2O_2 (BSI) estaban empaquetados y presentaron dificultad para ser disgregados durante su colecta. El tejido gonadal de las dos hembras con biopsia, presentó ovocitos desordenados en las trabéculas, debido al mismo efecto de las biopsias; y ambas hembras presentaron ovocitos en diferentes estadios de desarrollo, desde ovogonias hasta ovocitos maduros, e inclusive ovocitos atrésicos (Fig. 23).

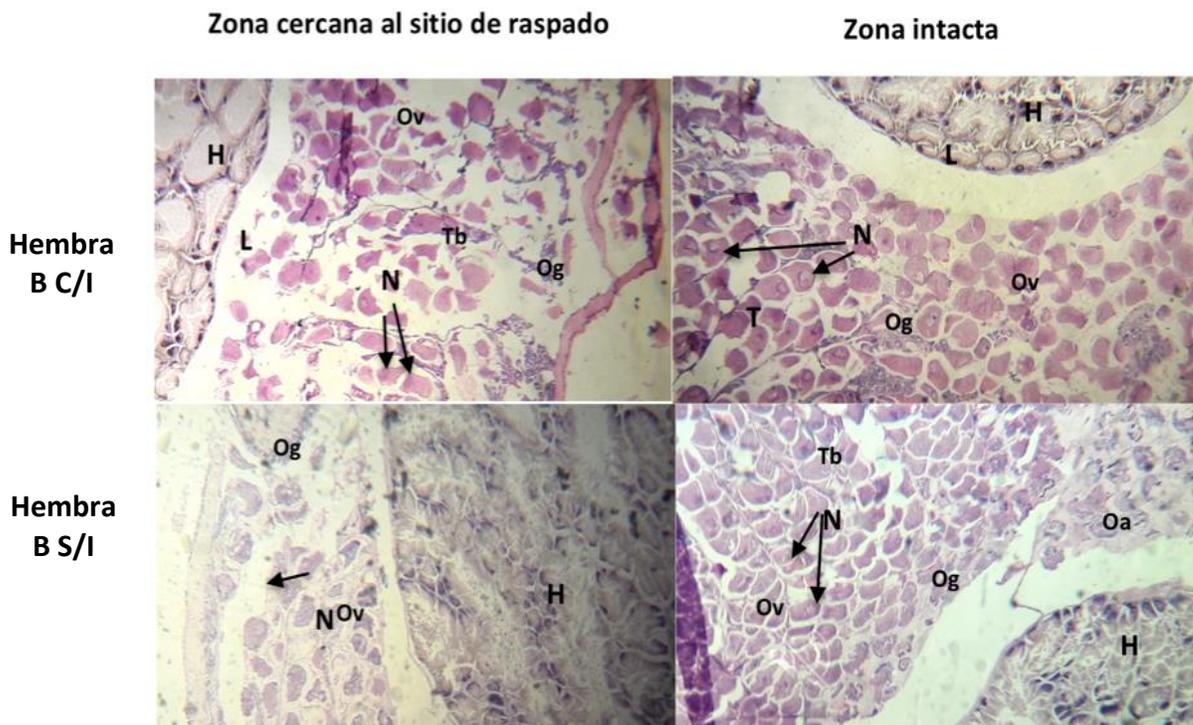


Figura 23. Características histológicas de las glándulas cónicas del CHG de hembras de abulón rojo *H. rufescens* sometidas a biopsias con previa exposición a TRIS- H_2O_2 (B C/I) y sin exposición (B S/I); corte transversal de la parte media y apical: **H:** hepatopáncreas, **Tb:** Trabécula, **N:** núcleo, **L:** lumen, **Og:** ovogonias, **Ov:** Ovocito y **Oa:** Ovocito atrésico.

3.6. Producción de híbridos interespecíficos

3.6.1. Hibridación entre hembras de abulón rojo y machos de abulón amarillo

Para poder generar un protocolo de fecundación interespecífica para hembras de abulón rojo y machos de abulón amarillo (*RxA_m*) se realizaron tres cruzas experimentales, en las cuales se evaluó la viabilidad del esperma extraído con el método de biopsia gonadal en abulón amarillo, el efecto de la edad del ovocito y la concentración de esperma en diferentes parámetros productivos, así como las tasas de fecundación, eclosión, deformidad y supervivencia.

Considerando los tres desoves, los resultados en las tasas de fecundación variaron en todos los tratamientos realizados, no obstante la crusa interespecífica mostró siempre una tasa de fecundación menor a la crusa pura. Las tasas de fecundación de la crusa conespecíficas de abulón rojo variaron de 41 a 100%; mientras que, en las cruzas interespecíficas *RxA_m* el porcentaje de fecundación fue de 0 a 25%, siendo en todos los casos significativamente menor que el obtenido en las cruzas control *RxR* (Tabla 8, Anexo F).

3.6.2 Viabilidad del método de biopsia gonadal en crusa híbrida *RxA_m*

Las tasas de fecundación registradas en el primer experimento para las cruzas *RxR* y *RxA_m*, fueron las más bajas de todos los eventos realizados (41 ± 8.6 y 11 ± 2 , respectivamente) utilizando los ovocitos con mayor edad (60 min). En este primer desove experimental, el desarrollo embrionario de la crusa control *RxR* se detuvo en mórula y en la crusa híbrida *RxA_m* en segunda división, lo cual pudo haber estado asociado a algún parámetro de calidad de agua que estuvo fuera de nuestro control en esta primera experiencia. A pesar de ello, se pudo corroborar la capacidad del esperma de abulón amarillo obtenido a través de la biopsia gonadal para fecundar ovocitos de abulón rojo.

3.6.3 Efecto de la edad del ovocito en la crusa híbrida *RxA_m*

En el segundo desove, aunque se pretendió trabajar con una concentración de esperma constante entre los tratamientos control (C1-C4) de 1,040 esp/mL y los experimentales (T1-T4) de 7,406 esp/mL; la variación en el número de ovocitos en cada unidad experimental dio como resultado diferentes relaciones esperma/ovocito en los tratamientos. La relación esp/ov registrada en este segundo desove fue de 63 ± 7 a 268 ± 79 esp/ov para las cruzas de abulón rojo, para las cruzas interespecíficas la relación varió de 421 ± 11 a 858 ± 133 (Tabla 8, Anexo F). La crusa conespecífica de abulón rojo denominada C2 donde se usó ovocito de 15 min de edad y la relación esp/ov más baja (63 esp/ov), mostró la menor tasa de fecundación con 66 %, presentando diferencias significativas con respecto al resto de los tratamientos control ($P < 0.05$;

Fig. 24A y B). Por otro lado la cruce C4 donde se usó ovocito de 40 min de edad y una relación esp/ov de 149, mostró la mayor tasa de fecundación (90 %). En las cruces control *RxR* de 12 y 25 min (C1 y C3) de edad del ovocito y relaciones de 158 y 286 esp/ov, las tasas de fecundación no presentaron diferencias significativas y variaron de 74 a 80 % (Fig. 24A; Tabla 9, Anexo F). Por otro lado, las cruces interespecíficas *RxA_m* tuvieron tasas de fecundación significativamente menores (14 a 25 %; $P < 0.05$) a las cruces puras de abulón rojo, las mayores tasas de fecundación en cruce *RxA_m* se obtuvieron al usar ovocitos de 12 a 15 min de edad (T1 y T2) y la relación esp/ov fue mayor (857 ± 134 esp/ov).

La edad del ovocito tuvo un efecto significativo en la tasa de eclosión del tratamiento control C4 con ovocitos de 40 min de edad, donde se registró el menor valor (50 %) con respecto a demás tratamientos control (C1, C2 y C3 con porcentajes de eclosión de 76, 89 y 71 %, respectivamente). Por otro lado las cruces interespecíficas *RxA_m* no presentaron diferencias significativas ($P > 0.05$) en las tasas de eclosión entre tratamientos experimentales, pero si comparados con los tratamientos control *RxR*, mostrando porcentajes con diferencias significativamente menores (12-25 %; $P \leq 0.01$; Tabla 9, Anexo F; Fig. 24B). Los ovocitos que no eclosionaron presentaron división irregular e interrupción del desarrollo entre las primeras 4 divisiones celulares.

Para el cultivo larval (día 1 al 6) se juntaron todos los tratamientos control en un estanque (unidad experimental) y todos los tratamientos híbridos en otro, y fue ahí donde se evaluó la supervivencia larval diaria, por ello, no se contó con réplicas. Los datos en porcentaje mostraron diferencias en el número de larvas obtenidas a partir del día 1 hasta el final de la prueba experimental entre las dos cruces evaluadas (Fig. 25). En las progenies *RR* y *RA_m*, las tasas de supervivencias disminuyeron hasta alcanzar un 30 y 14% de larvas eclosionadas, respectivamente, durante los primeros cinco días de cultivo larval; en el sexto día la tasa de supervivencia de los híbridos *RA_m* fue de 0.16% mientras que la progenie *RR* terminó con 25 % (Fig. 25). La progenie *RR* presentó un mayor porcentaje de larvas competentes al final del cultivo larvario. La progenie pura *RR* comenzó con 4.2 millones de larvas y finalizó con 1.07 millones de larvas competentes, mientras que la progenie *RA_m* comenzó con 0.6 millones de larvas y para el quinto día se registraron 100 larvas sobrevivientes. Las larvas *RR* presentaron la cuarta ramificación de los tentáculos cefálicos y cambiaron su comportamiento, comenzando a explorar las paredes de los recipientes y a fijarse de manera eventual en todas las superficies al sexto día de cultivo.

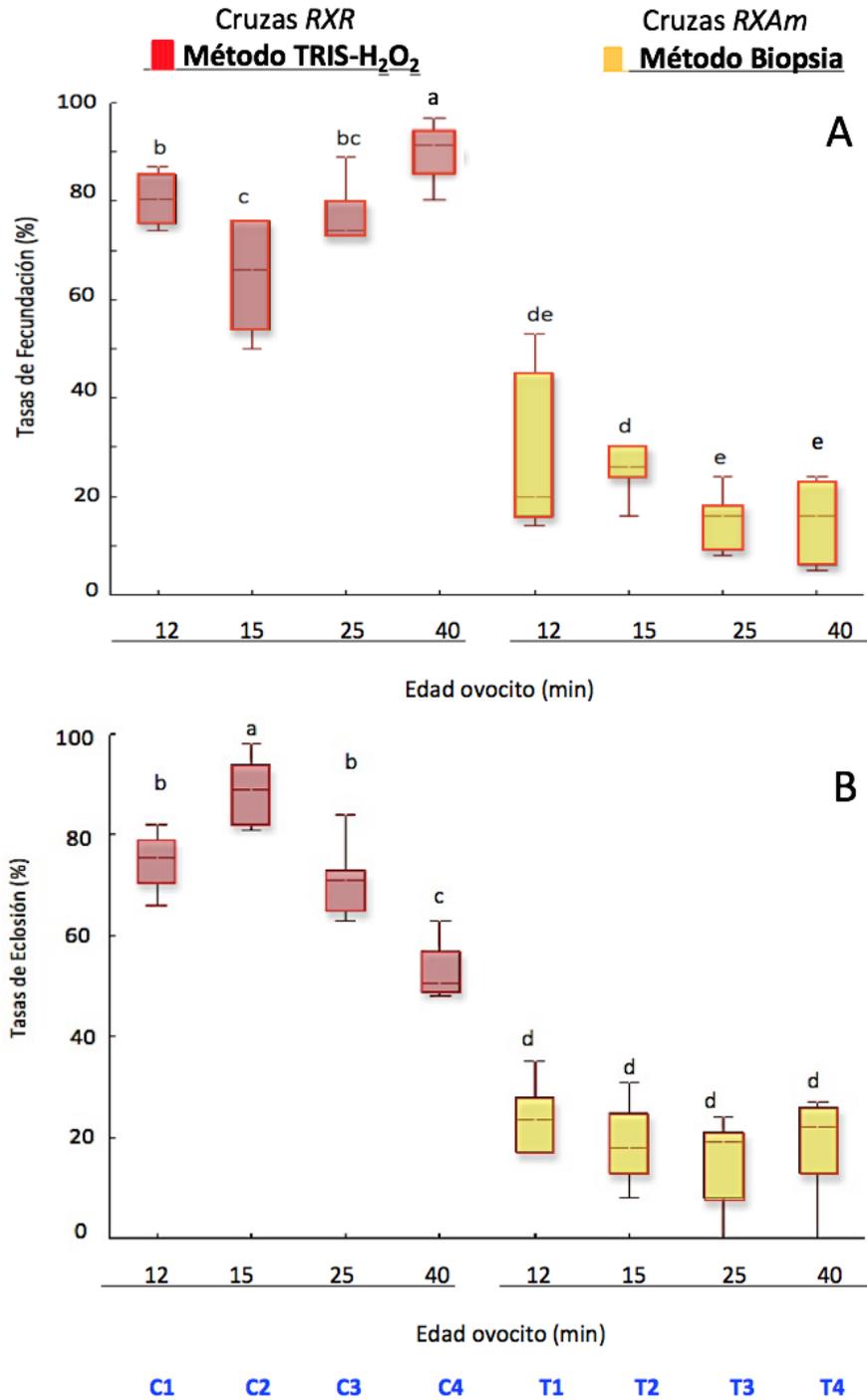


Figura 24. A) Tasa de fecundación (%) y B) Tasa de eclosión (%) de las cruzas conespecíficas *RxR* e interespecíficas *RxAm*. Tasas de fecundación y eclosión se analizaron con un ANOVA no paramétrico de Kruskal-Wallis. La gráfica muestra la mediana como una línea roja, las barras indican los rangos registrados y las letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

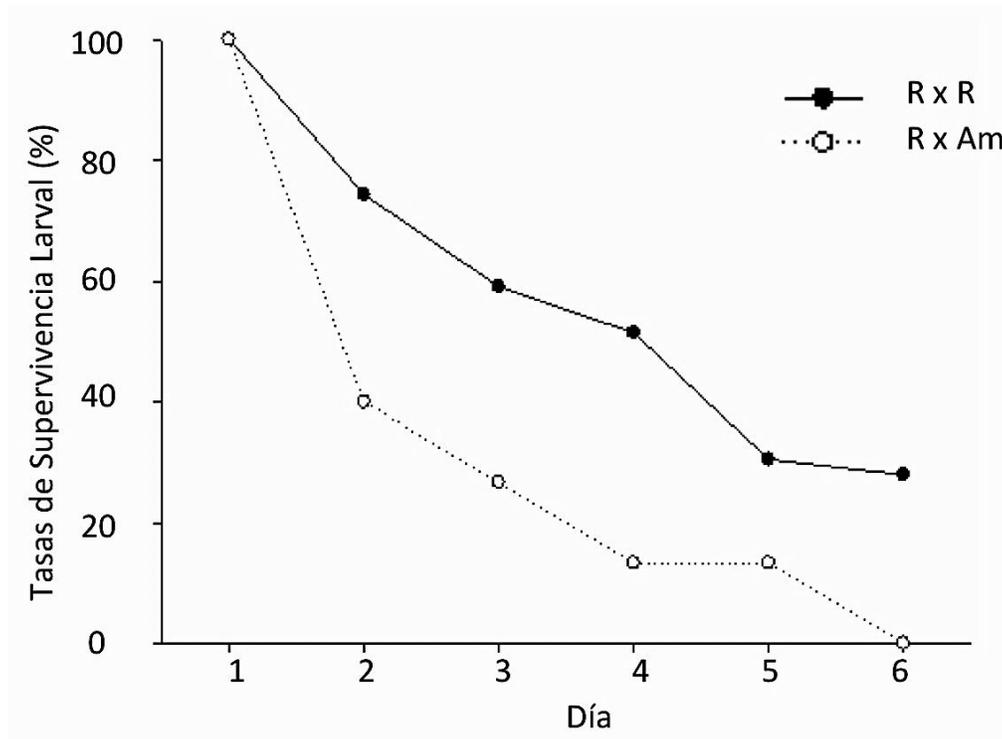


Figura 25. Tasas de supervivencia de las progenies *RR* y *RAm* durante la evaluación del efecto de la edad del ovocito.

3.6.4. Efecto de la edad de la concentración de esperma en la cruce híbrida *RxA_m*

En el tercer desove experimental se evaluó el efecto de la densidad espermática en la producción de híbridos *RA_m*, usando ovocitos de 30 min de edad en el momento de la fecundación. La relación esp/ov, mostró diferencias significativas entre todos los tratamientos, incrementándose en relación a la concentración de esperma en los tratamientos *RA_m*. Para la cruce control (*RxR*) se registró una relación de 497 esp/ov; mientras que en las cruces interespecíficas se registraron relaciones de 4,800, 13,000 y 25,600 esp/ov en los tratamientos T1, T2 y T3, respectivamente (Fig. 26A).

Las tasa de fecundación y eclosión para la cruce *RxR* fue de 100 % encontrándose diferencias significativas ($P < 0.01$) mayores que las observadas en las cruces experimentales *RxA_m*. La cruce experimental *RxA_m* con mayor concentración espermática (T3) obtuvo el porcentaje de fecundación y eclosión más alto con 22 y 28 %, respectivamente (Fig. 26B y C). Los tratamientos T1 y T2 presentaron valores en la fecundación de 0 a 28 % y de 0 a 22 %, respectivamente. La tasa de eclosión para el tratamiento T1 fue de 0 a 10 %, mientras que para el tratamiento T3 varió de 0 a 11 %. Por otro lado la tasa de deformidad fue mayor en la

descendencia control *RR*, mientras que no se observaron organismos deformes en las descendencias experimentales *RxAm* (Fig. 26D; Tabla 10, Anexo F).

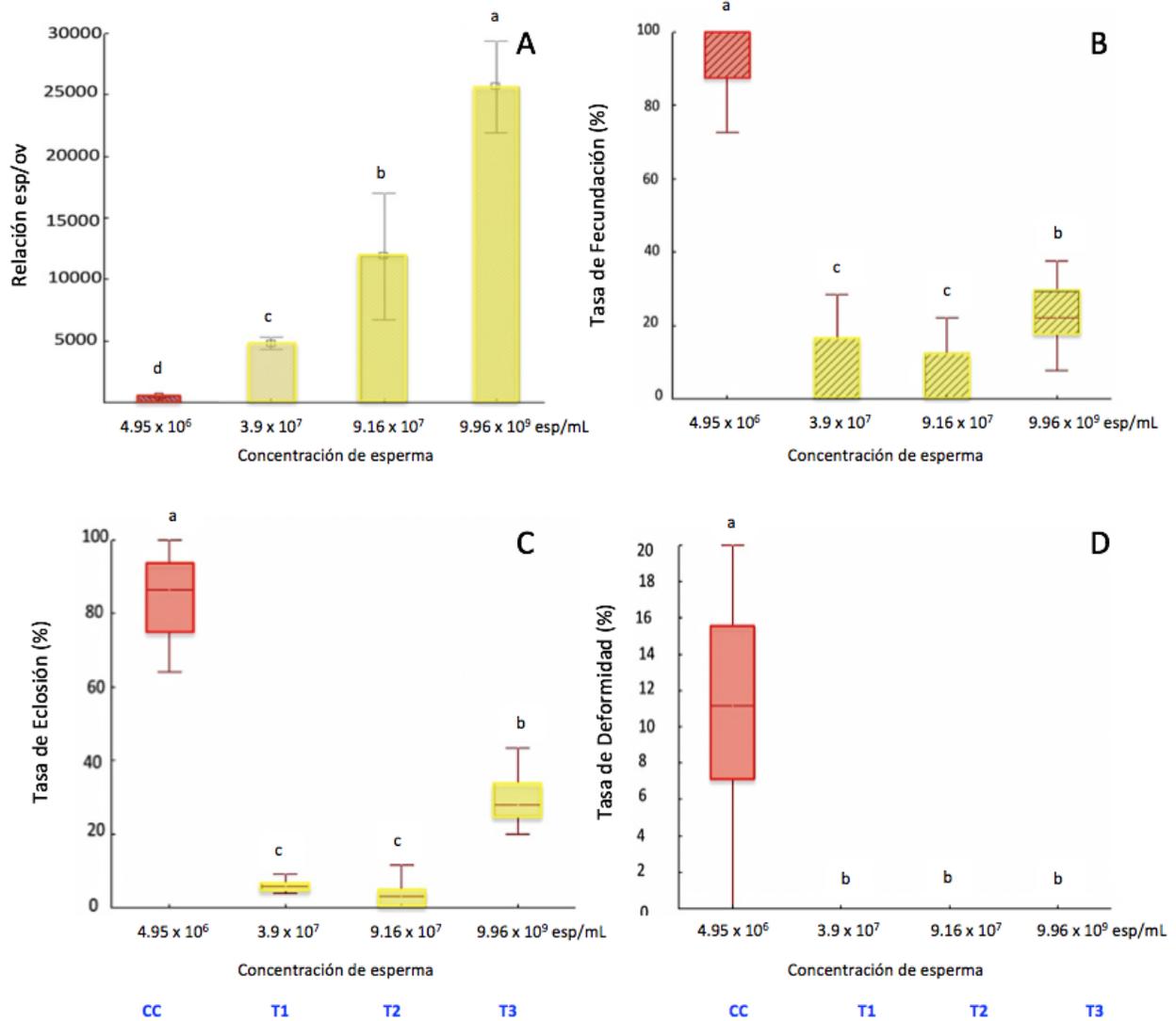


Figura 26. A) Relación esperma/ovocito (esp/ov), B) Tasa de fecundación (%), C) Tasa de eclosión (%) y D) Tasa de deformidad (%) de la cruce conespecífica *RxR* (CC) e interespecíficas *RxAm* (T1, T2 y T3). La relación esp/ov se analizó con un ANOVA paramétrico de una vía. La gráfica muestra la media y las barras indican el error estándar. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0.05$). Las tasas de fecundación, eclosión y deformidad se analizaron con un ANOVA no paramétrico de Kruskal-Wallis. La gráfica muestra la mediana como una línea roja y las barras indican los rangos registrados, y las letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

La supervivencia larval se registro del primer día (larva trocófora) al quinto día (larva veliger tardía) del cultivo (Fig. 27). A partir del segundo día, se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) en la supervivencia entre los tratamientos T1 y T2 con respecto del tratamiento control C1, siendo mayor el porcentaje de supervivencia en las cruces control, T3 no presentó diferencias con respecto del control en este día. Al tercer día de cultivo larval se encontraron diferencias significativas ($P < 0.01$) entre todos los

tratamientos experimentales y el tratamiento control siendo mayor el porcentaje de supervivencia en la progenie *RR* (69 % contra 40, 47 y 50 % de los tratamientos T1, T2 y T3). No obstante también se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre las cruza experimentales T1 y T3, siendo T3 la crusa con mayor tasa de supervivencia y T1 la de menor. En el cuarto día T3 presentó diferencias significativas ($P < 0.05$) con respecto a sus homólogos, por otro lado, el tratamiento control siguió siendo el tratamiento con mayor supervivencia. Al quinto día de cultivo, la supervivencia fue de 50 % para la progenie *RR* y de 10-15 % para la progenie *RAm*. De los tratamientos experimentales *RxA*m, T3 que fue fertilizado con la mayor concentración espermática, fue el que presentó la mayor tasa de supervivencia final, obteniéndose un total de 1600 larvas totales con tentáculos cefálicos sin ramificaciones. Después del quinto día, solamente se registraron los estadios de desarrollo larval hasta que la larva desarrolló la tercera y cuarta ramificación del tentáculo cefálico.

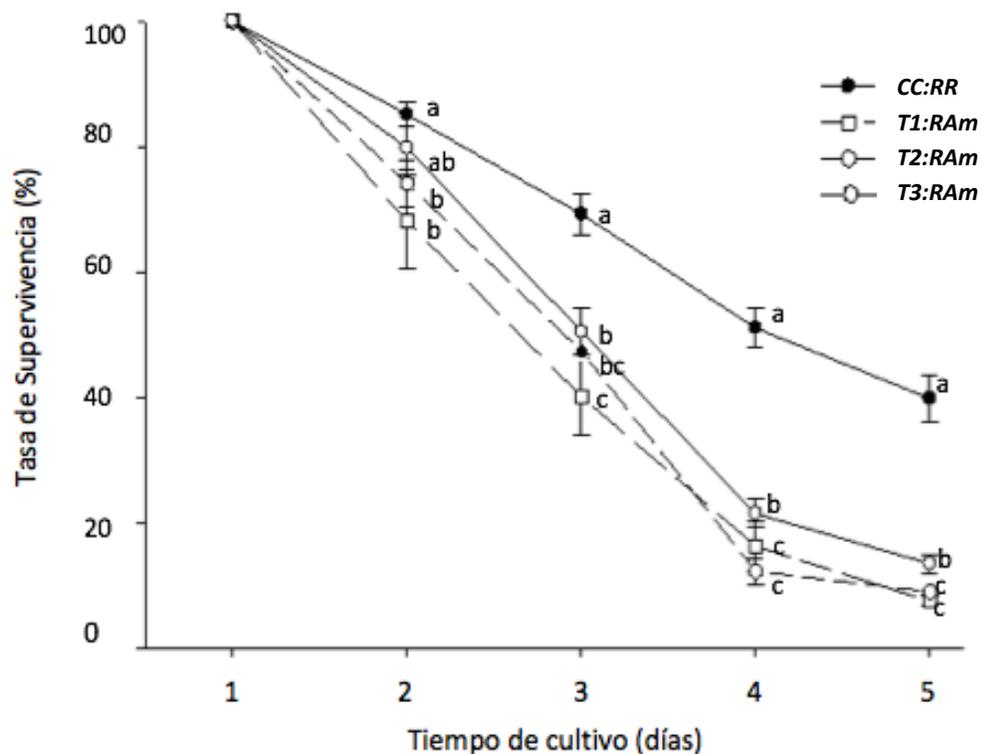


Figura 27. Tasas de supervivencia de las progenies *RR* y *RAm* obtenidas en el tercer desove donde se evaluó el efecto de la concentración espermática. Las letras indican los tratamientos con diferencias significativas ($P < 0.05$).

3.7. Hibridación entre hembras de abulón rojo y machos de abulón azul de Isla Guadalupe

Una vez corroborado que el método de biopsia gonadal de machos nos permite obtener esperma viable y dado que no fue posible inducir el desove “natural” en abulón azul, se realizaron dos pruebas para generar información sobre la concentración de esperma y la edad de ovocitos adecuada para obtener descendencia interespecífica (*RAz-G*) entre hembras de abulón rojo y machos de abulón azul de Isla Guadalupe. La combinación de ambos factores en donde se observó mayor éxito sirvió como base para poder generar un protocolo de fecundación interespecífica para esta cruce.

3.7.1. Efecto de la concentración espermática en la cruce híbrida *RxAz-G*

Durante la primera prueba se realizaron tres cruces experimentales *RxAz-G* (T1-T3) con sus respectivos controles *RxR* (C1-C3) de viabilidad de ovocito, donde se evaluó la concentración del esperma de abulón azul en la cruce *RxAz-G* (Fig. 13, sección de materiales y métodos). La relación esp/ov varió de 204 a 4,700 en las cruces puras mostrando un efecto positivo en las tasas de fecundación, conforme aumenta la relación esp/ov. El tratamiento C1 que presentó una relación esp/ov de 204 mostró diferencias significativas ($P < 0.05$) en la tasa de fecundación (64-78 %) con respecto a los tratamientos C2 y C3, los cuales presentaron tasas de 80-93 y de 85-100 %, respectivamente (Fig. 28A y B). En las cruces interespecíficas la relación esp/ov varió de 162 a 6,500, observando un efecto similar en el que se registró un incremento en las tasas de fecundación interespecíficas cuando la relación esp/ov incrementa, pero no se registraron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre tratamientos (Tabla 11, Anexo F; Fig. 28A y B). Los porcentajes de fecundación en las cruces híbridas variaron de 3 a 18 %, siendo T3 el tratamiento con el mayor valor de mediana con 11 %. Los porcentajes de fecundación mostraron diferencias significativas ($P < 0.01$) entre los tratamientos control y los tratamientos experimentales, siendo estos últimos los tratamientos con menores tasas de fecundación.

El tratamiento control C1 mostró la menor tasa de eclosión en las cruces puras con 69 %, mientras que el tratamiento con mayor tasa de eclosión fue C2 con 88 % (valores de mediana). En las cruces experimentales *RxAz-G* el tratamiento T1 mostró las menores tasas de eclosión presentando rangos de 0 a 37 % con una mediana de 0, mientras que el tratamiento T3 que presentó la mayor concentración de esperma mostró un incremento en las tasas de eclosión presentando una mediana de 28 % (con valores en un rango de 0 a 32 %). No obstante no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos experimentales. Las tasas de eclosión para las cruces *RxR*, presentaron diferencias significativas ($P < 0.01$) con las cruces *RxAz-G* las cuales mostraron tasas de eclosión que variaron de 0 a 37 % (Tabla 12, Anexo F;

Fig. 28 C). Por otra parte, las tasas de deformidad en las cruzas control variaron de 5 a 43 % aumentando con respecto al incremento de la concentración espermática y la relación esperma/ovocito ($P<0.01$; Fig. 28D). Mientras que, en las cruzas *RxAz-G* el bajo porcentaje de larvas que logró eclosionar no presentó deformidades, por lo cual se observaron diferencias significativas ($P<0.01$) en las tasas de deformidad de los tratamientos experimentales con respecto a los tratamientos control (Tabla 12, Anexo F; Fig. 28 D).

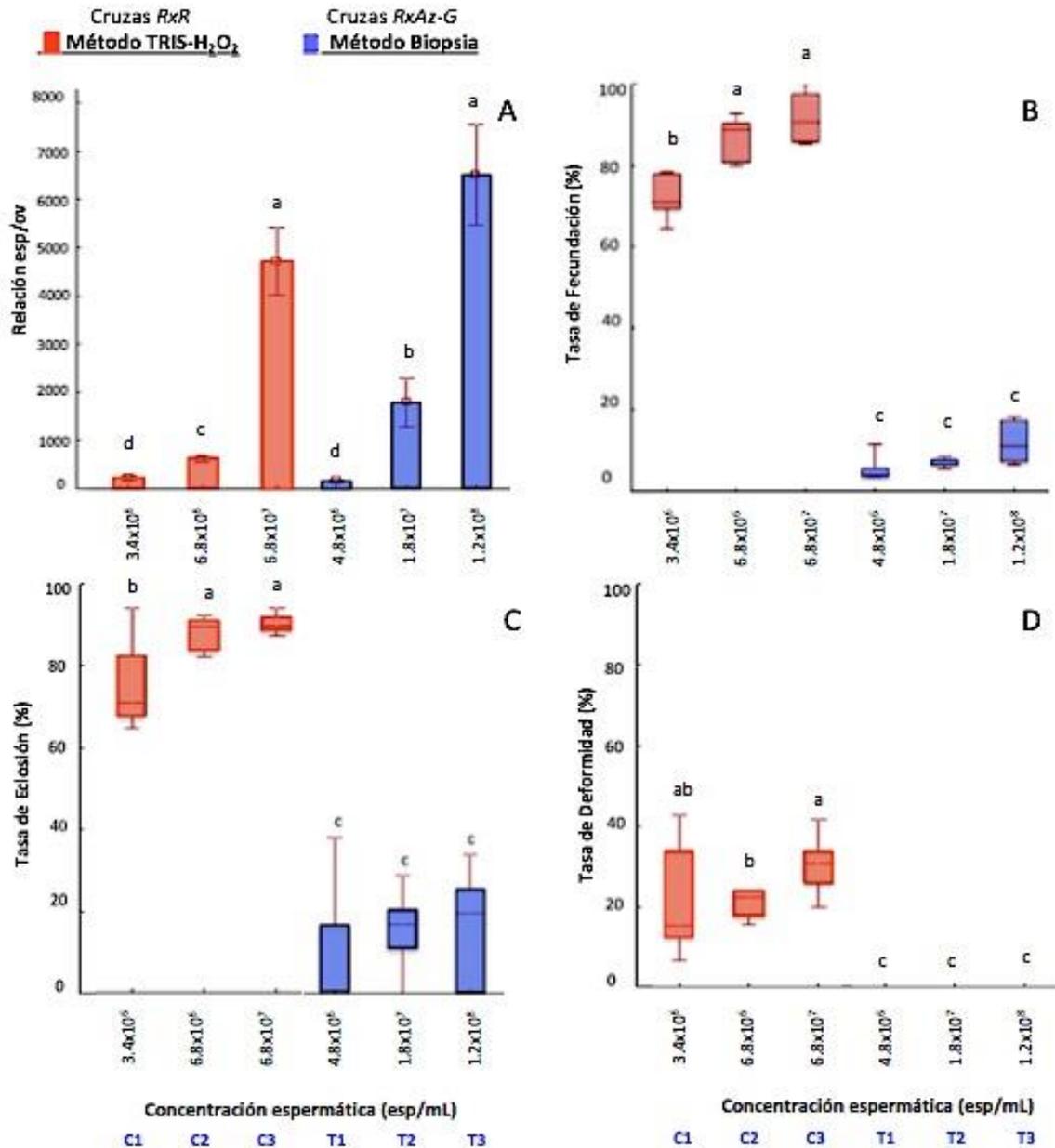


Figura 28. Relación esperma/ovocito (esp/ov), B) Tasa de fecundación (%) C) Tasa de eclosión (%) y D) Tasa de deformidad (%) de las cruzas conespecíficas *RxR* (C1, C2 y C3) e interespecíficas *RxAz-G* (T1, T2 y T3) con diferentes concentraciones de esperma. La relación de esp/ov se analizó con un ANOVA paramétrico de una vía. La gráfica muestra la media y las barras indican el error estándar. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos ($P<0.05$). Las tasas de fecundación, eclosión y deformidad se analizaron con un ANOVA no paramétrico de Kruskal-Wallis. La gráfica muestra la mediana como una línea roja y las barras indican los rangos registrados, y las letras indican diferencias significativas ($P<0.05$).

Durante esta prueba experimental las tasas de supervivencia mostraron tendencias diferentes entre los tratamientos. En el día cinco las cruza control presentaron supervivencias de 19 a 66 %, siendo el tratamiento C3 el que mostró la menor supervivencia de la progenie *RR* y C2 la que mostró la mayor. Mientras que los tratamientos experimentales en general mostraron altas mortalidades con tasas de supervivencias que fueron de 0 a 48 %, siendo T3 la única crusa experimental cuya descendencia presentó supervivencia de 48 % de larvas eclosionadas (29 % más que C3 la descendencia *RR* con menor supervivencia), por otro lado los tratamientos experimentales T1 y T2 no presentaron supervivencia para el día cinco (Fig. 29). La supervivencia en los tratamientos control pudo haber estado influenciada por la cantidad de larva en los recipientes de cultivo dado que la crusa control C3 (con tasas de supervivencia de 19%) presentó mayor cantidad de larva inicial con 244 mil larvas por tratamiento y una final de 46 mil, comparado con los controles C1 y C2 que presentaron 148 y 144 mil larvas por tratamiento, respectivamente y una concentración final de 88 y 94 mil larvas por tratamiento. Por otro lado, los tratamientos experimentales se registró un número de larvas inicial de 6600, 10000 y 11000 larvas en los tratamientos T2, T1 y T3, respectivamente. El tratamiento experimental T3 contó con 5,333 larvas totales al finalizar el cultivo larval.

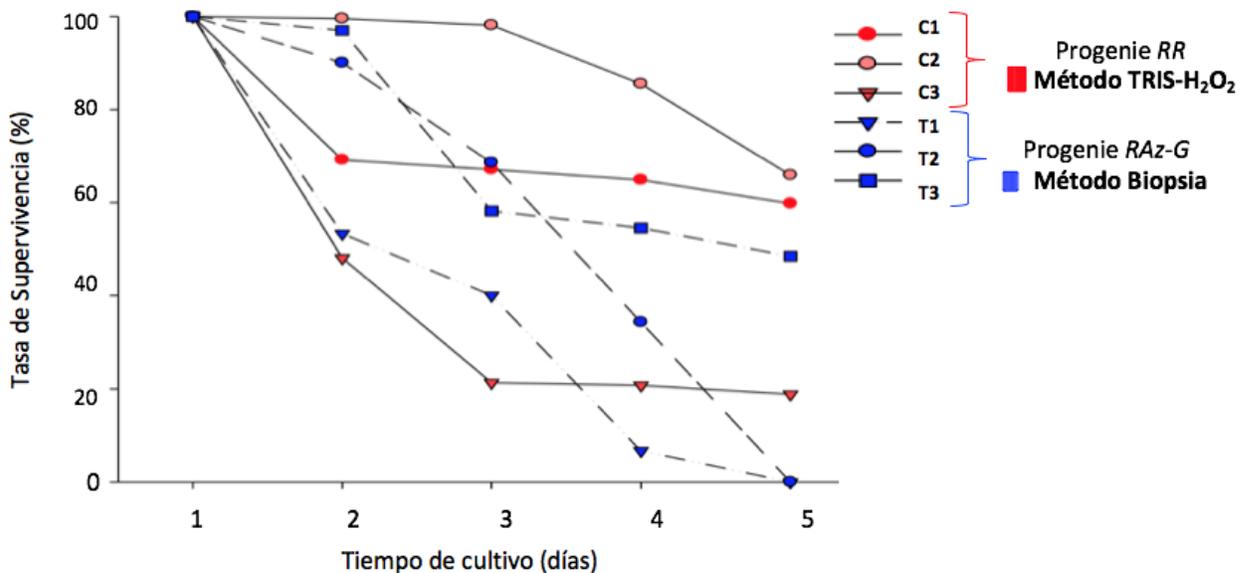


Figura 29. Tasas de supervivencia de las progenes *RR* (C1, C2 y C3) y *RAz-G* (T1, T2 y T3) obtenidas en el cuarto desove donde se evaluó el efecto de la concentración espermática.

3.7.2. Efecto de la edad del ovocito en la cruce híbrida *RxAz-G*

Para evaluar el efecto de la edad del ovocito en las cruces híbridas *RxAz-G*, se usaron ovocitos de hembras de abulón rojo de cultivo de 11, 15 y 24 min de edad (C1-C3; T1-T3); manteniendo constantes las concentraciones espermáticas entre los tratamientos de cada cruce usando el mismo volumen de esperma (40 y 200 mL, para *RxR* y *RxAz-G*, respectivamente; Fig. 14).

Las tasas de fecundación de los tratamientos control *RxR* (C1-C3) mostraron una ligera tendencia a disminuir conforme aumento la edad de los ovocitos fecundados de 11 a 24 min, presentando diferencias significativas ($P < 0.05$) de los tratamientos C1 y C2 que alcanzaron valores de 89 -100 % de fecundación (con medianas de 94 y 96 %) con respecto de C3 con valores de 81-97 % (con mediana de 88 %). En las cruces híbridas *RxAz-G* las tasas de fecundación disminuyeron cuando los ovocitos presentaban incrementaban su edad. El tratamiento T1 con ovocitos de 11 min de edad registró valores de 31-73 % (con una mediana de 40), mientras que los tratamientos T2 y T3 con 15 y 24 minutos de edad, registraron tasas de fecundación de 0 -11 y 0- 15 %, respectivamente (en ambos casos con medianas de 0 %; Fig. 30A). Las tasas de fecundación presentaron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los tratamientos control y experimentales (Tabla 13, Anexo F).

El porcentaje de eclosión varió de 76 a 98 % en las descendencias control *RR* y de 20 a 78 % en las descendencia interespecífica *RAz-G*. Los tratamientos C1 y C3 mostraron diferencias significativas ($P < 0.05$) con respecto a su homólogo C2, el cual mostró las tasas de eclosión más bajas de los tratamientos control con valores de 46-88 %. El tratamiento experimental T1 cuyo valor de mediana fue de 78 % (con un rango de 63 -86 % de eclosión) no mostró diferencias significativas con respecto al tratamiento control C2, no obstante, sí se observaron diferencias significativas con el resto de los tratamientos control ($P < 0.05$; Fig. 30 B; Tabla 13, Anexo F). Los tratamientos T2 y T3 de las cruces híbridas *RxAz-G* presentaron valores de mediana de 20 y 46%, respectivamente con rangos que fueron desde 0 hasta 78 %.

Las tasas de deformidad en los tratamientos control presentaron medianas de 1 y 2 % con rangos que fueron de 0.1 a 16 %, no obstante no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos control. Por otro lado la cruce interespecíficas *RxAz-G* donde se obtuvieron las mayores tasas de deformidad fue T1, no se observaron larvas deformes en los otros tratamientos experimentales T2 y T3 (Fig. 30 C).

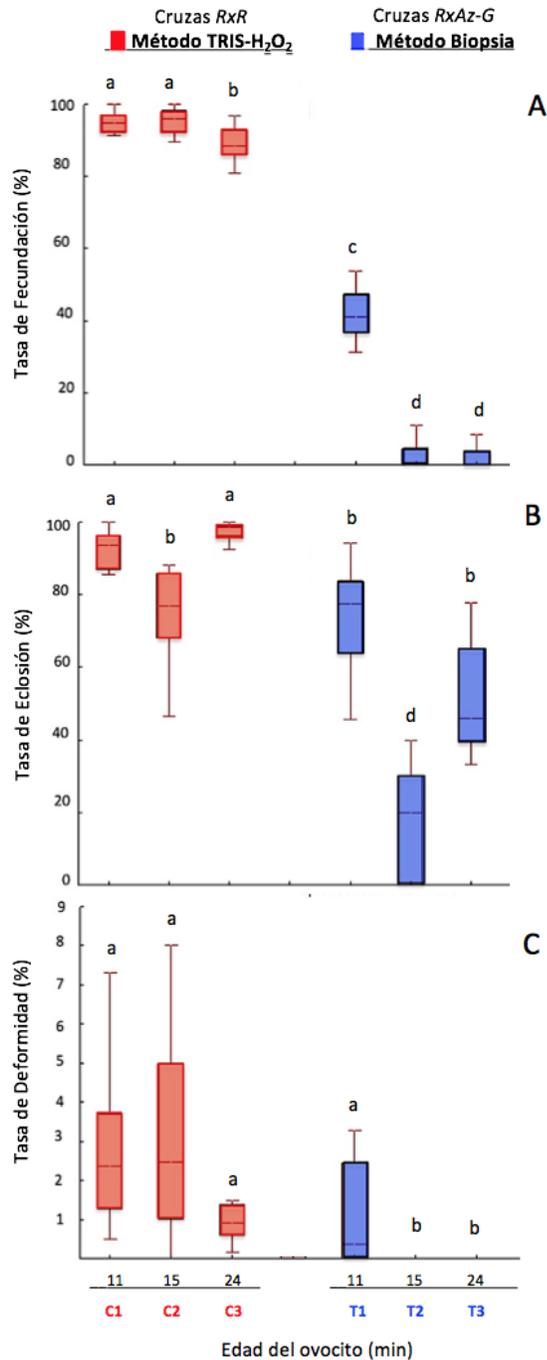


Figura 30. A) Tasa de fecundación (%), B) Tasa de eclosión (%) y C) Tasa de deformidad (%) de las cruces conespecíficas *RxR* (C1-C3) e interespecíficas *RxAz-G* (T1-T3) a diferente edad de ovocito. Los datos se analizaron con un ANOVA no paramétrico de Kruskal-Wallis. La gráfica muestra la mediana como una línea roja, las barras indican los rangos registrados y las letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$)

La supervivencia en este evento experimental se evaluó hasta el cuarto día de cultivo larvario, debido a que se registró una mortalidad total en todos los tratamientos en este día. Todos los tratamientos

mostraron tendencias similares en la supervivencia, no obstante durante el día dos la supervivencia registrada en las cruzas *RAz-G* mostró valores promedios superiores a los registrados en las cruzas control C1 y C3, presentando T1, T2 y T3 valores por encima de 75 %, mientras que C1 y C3 presentaron valores menores a 70 %, C2 fue el tratamiento con mayor supervivencia durante el primer día con 88 %. Al tercer día los tratamientos control mostraron tasas de supervivencia mayores a 55 %, no obstante la descendencia *RAz-G* de los tratamientos T2 y T3 disminuyó por debajo de 50 %, solo T1 se mantuvo con valores de 66 %. Al cuarto día se registraron porcentajes de supervivencia de 0 % (Fig.31).

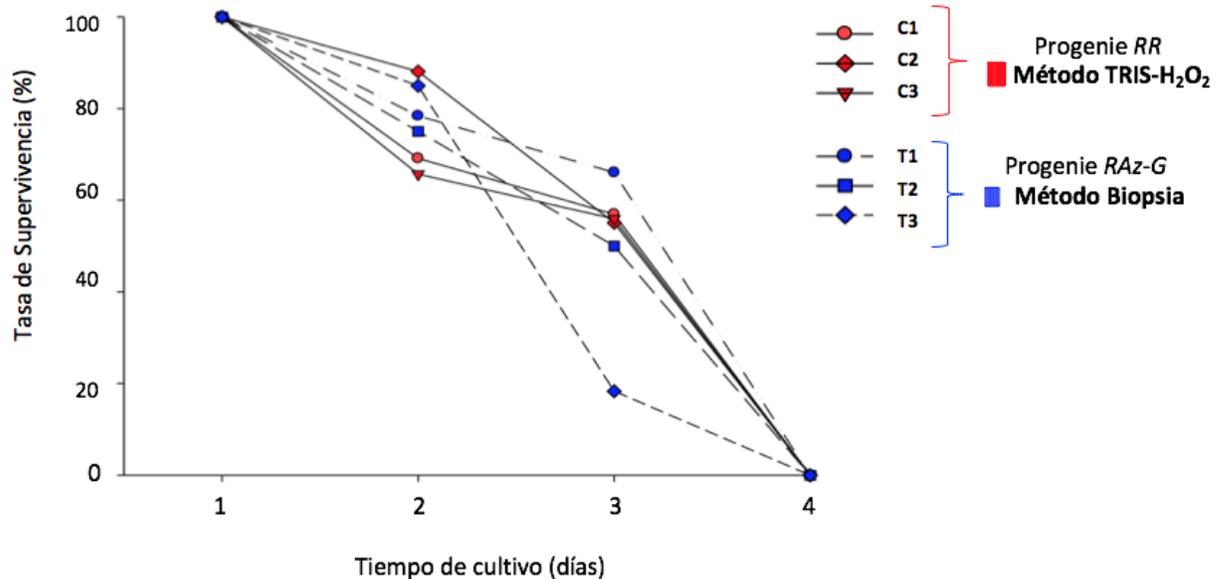


Figura 31. Tasas de supervivencia de las progenies *RR* (C1-C3) e interespecíficas *RAz-G* (T1-T3) obtenidas en el quinto desove donde se evaluó el efecto de la edad del ovocito.

3.8. Desarrollo ontogénico

El tiempo de desarrollo embrionario fue menor en las cruzas puras *RxR* que en las cruzas interespecíficas *RxA_m*. Durante el seguimiento del desarrollo de estas cruzas se observó que ambas presentaron primera y segunda división dentro de las primeras 4 h, registrándose un desarrollo normal por parte de la craza control y un retraso de hasta 1.5 h en la primera y segunda división de la craza *RxA_m* (Tabla 3). Posteriormente, el desarrollo embrionario siguió de manera normal. Los estadios de desarrollo subsecuentes y los tiempos en los que se alcanzaron se resumen en la tabla 3. En la craza *RxA_m* se observó un aumento en la cantidad de embriones con desarrollo irregular, principalmente entre la expulsión de los cuerpos polares y el estadio de mórula; los cigotos detenían el desarrollo en el momento en el que aparecían las anomalías entre estas etapas. Mientras que, en algunos casos los embriones de las cruzas *RxR* detenían el desarrollo no se observaron divisiones irregulares en el desarrollo embrionario; sin

embargo, en el momento de la eclosión o posterior a esta se observaron larvas con deformidades que presentaron muerte temprana.

El tiempo en el que se observaron las primeras larvas trocóforas eclosionando en los tratamientos con la craza *RxR* fue después de 16 h post fecundación, mientras que la eclosión en la craza *RxAm* se registró hasta después de las 21 hpf. El desarrollo larval no presentó diferencias en el tiempo de formación de las estructuras que definen los estadios alcanzados (Fig. 32). Ambas cruza alcanzaron el estadio de larva competente en el sexto día de cultivo, no obstante, la craza *RxAm* presentó la formación del tercer túbulo en los tentáculos cefálicos 8 h antes de que la craza control.

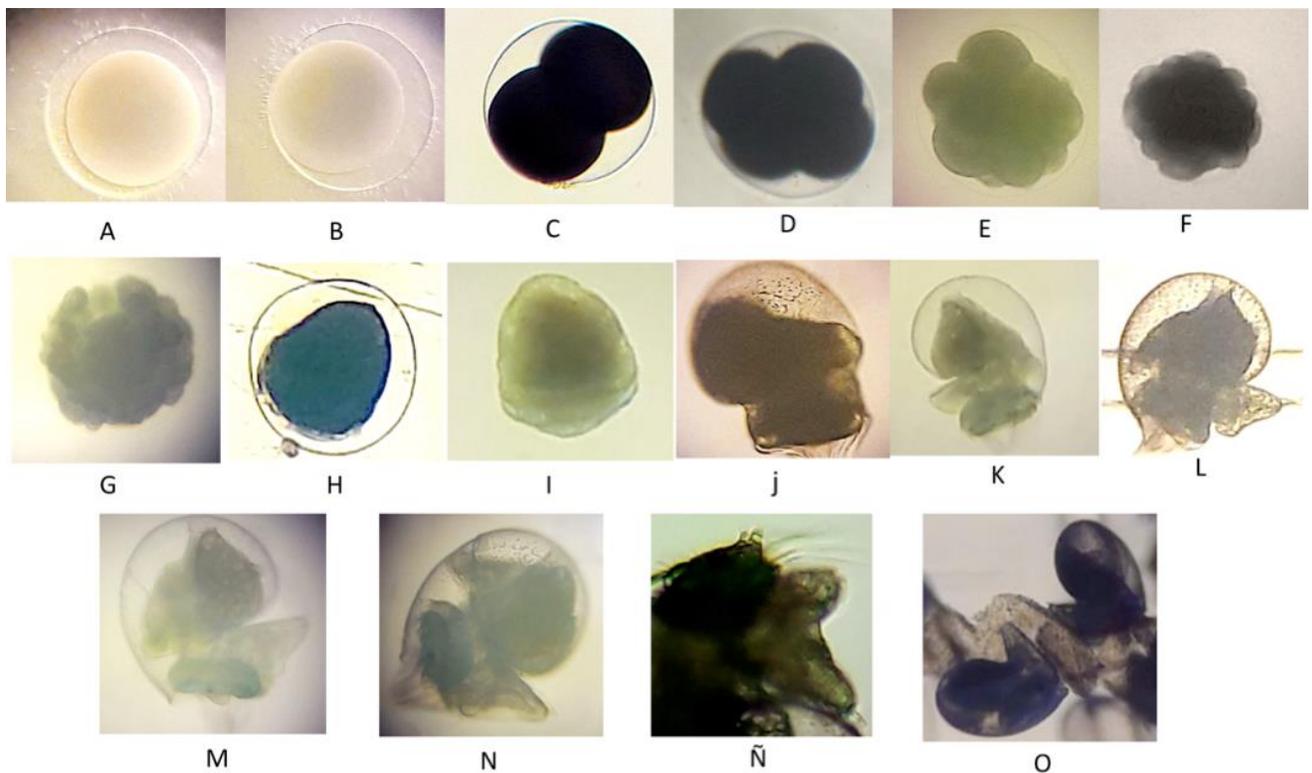


Figura 32. Estadios de clivaje y desarrollo ontogénico de larvas híbridas *RAm*. A) Fecundación B) expulsión del primer cuerpo polar, C) primera división, D) segunda división, E) 6 a 16 células, F) mórula G) blástula H) larva trocófora sin eclosionar, I) larva trocófora temprana (recien eclosionada), J) larva veliger con protoconcha formada, K) aparición de manchas oculares, L) formación de la espina en el metápodo y aparición del opérculo, M) aparición de tentáculo cefálico, N) aparición de cilios en la parte plana del pie, Ñ) tentáculo cefálico con la tercera ramificación y O) postlarva.

Por otro lado, la craza *RxAz-G* (Fig. 33) no mostró diferencias durante el desarrollo embrionario con respecto de la craza control *RxR*. Los cigotos de ambas cruza presentaron la primera y segunda división

en un periodo de 2 a 3 hpf, y las divisiones posteriores y la formación de estructuras del cigoto en tiempos similares (Tabla 3).

La eclosión durante los periodos de cultivo larval para la craza *RR* se comenzó a registrar a partir de las 18 hpf, mientras que la craza *RxAz-G* se observó 30 min después. Durante el desarrollo larvario, el tiempo de formación de las estructuras no mostró diferencias durante los primeros 5 días de cultivo. Sin embargo, se observaron diferencias al final de la etapa del cultivo larvario, dado que las larvas híbridas alcanzaron el estadio de larva competente al menos 12 h antes que la craza control. Las larvas competentes de la craza *RxAz-G* comenzaron a explorar las superficies de los recipientes de cultivo y a asentarse en el mismo recipiente durante el sexto día.

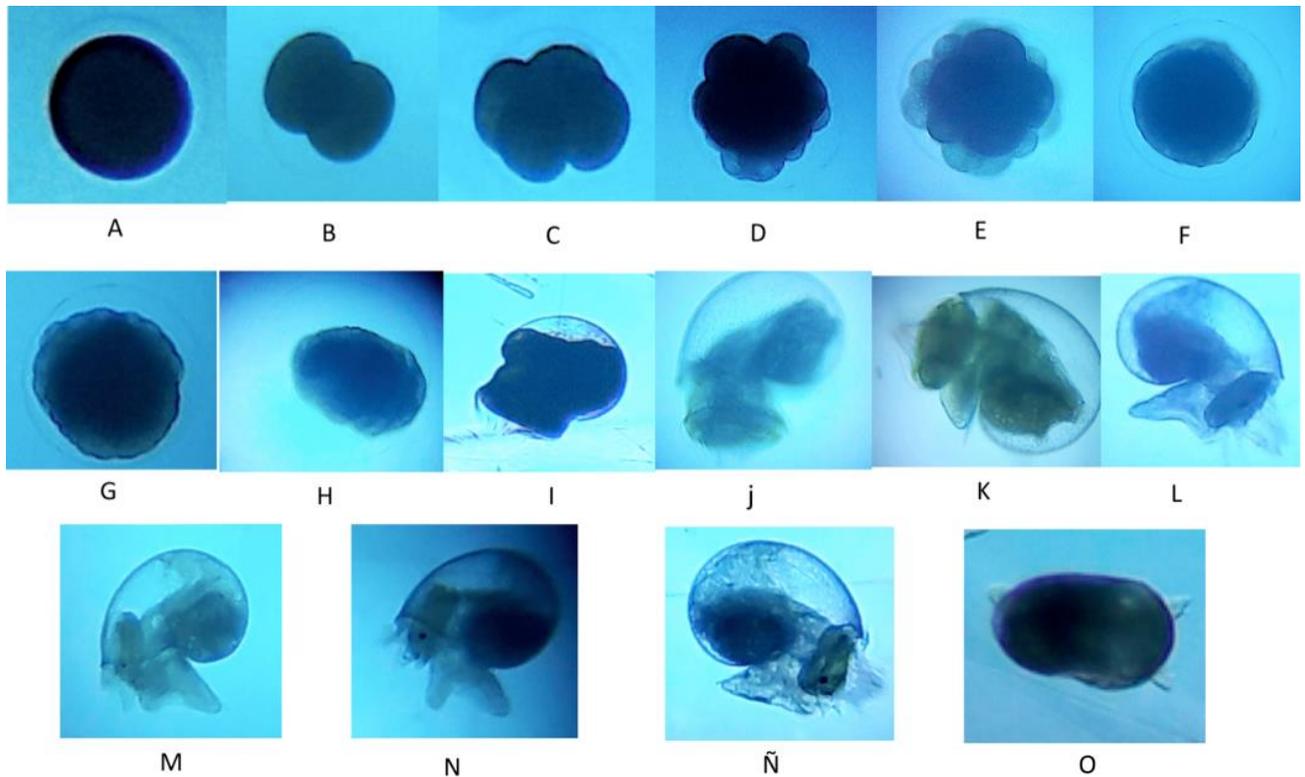


Figura 33. Estadios de clivaje y desarrollo ontogénico de larvas híbridas *RAz-G*. A) fecundación B) primera división, C) segunda división, D) 6 a 16 células, E) mórula F) gástrula G) formación de la cintura prototroncal, H) larva trocófora I) larva veliger con protoconca formada, J) torción de la masa cefalopedal, K) formación de la espina en el metápodo y aparición del opérculo, L) aparición de tentáculo cefálico, M) aparición de cilios en la parte plana del pie, N) aparición de espina corta en el tentáculo cefálico, Ñ) tentáculo cefálico con la tercera ramificación y O) postlarva.

Tabla 3. Tiempos de desarrollo embrionario y larval en progenie híbridas de *H. rufescens* x *H. corrugata* (RAm) y *H. rufescens* x *H. fulgens guadalupensis* (RAz-G).

Estadio	Etapa de desarrollo	tiempo h:min		
		<i>H. rufescens</i> RR 15±1°C	<i>H. rufescens</i> x <i>H. corrugata</i> RAm 15±1°C	<i>H. rufescens</i> x <i>H. fulgens</i> <i>guadalupensis</i> RAz-G 17±1°C
1	Fecundación	00:00	00:00	00:00
2	1er. cuerpo polar	00:25	00:40	00:30
3	2do. cuerpo polar	00:35	01:20	00:40
4	Primera división	01:20	02:00	01:40
5	Segunda división	01:50	03:05	02:20
6	Tercera división	02:30	03:50	02:50
7	Mórula	06:30	08:00	06:30
8	Blástula	07:40	09:45	07:25
9	Gástrula	08:45	11:15	09:20
10	Formación de cilios cintura prototochal	10:00	13:05	10:55
11	Formación completa de la cintura prototroncal	13:30	16:20	14:00
12	Trocófora lista para eclosionar	15:00	19:45	15:50
13	Trocófora	16:00	21:00	17:30
14	Formación de la concha larval	18:20	22:00	18:50
15	Formación completa del velo de la larva veliger	24:50	28:30	25:00
16	Aparición del musculo retractor larval	32:10	32:40	34:30
17	Aparición del ligamento integumental a la concha larval	-	-	-
18	Terminación del desarrollo de la concha larval	36:10	38:00	39:50
19	Torsión de la masa céfalo-pedal 90°	37:50	39:45	-
20	Torsión de la masa céfalo-pedal 180°	-	-	-
21	Presencia de espina al final del metapodio y formación del opérculo	49:20	49:50	53:10
22	Aparición de cilios en la parte plana del pie	-	-	-
23	Aparición de cilios en el propodium	68:20	69:40	70:10
24	Aparición de tentáculos cefálicos	91:50	92:30	94:20
25	Aparición de apófisis en el propodium	100:30	100:20	102:50
26	Aparición de otolito y espina corta en el túbulo cefálico	123:10	124:00	123:00
27	Aparición del tercer túbulo en los tentáculos cefálicos	142:00	142:50	146:00

3.9. Desempeño de progenies híbridas

Durante el crecimiento y supervivencia larval se dio seguimiento a las progenies obtenidas de la tercer cruza híbrida *RxA_m* producidas en la granja comercial Productores Marinos Baja S.A de C.V y la primera descendencia híbrida de la cruza *RxAz-G*, producida en la granja comercial Abulones Cultivados S.A. de C.V. El seguimiento de los estadios de ambas cruza híbridas y sus controles se llevo a cabo en las instalaciones del departamento de acuicultura del CICESE.

3.9.1. Crecimiento de progenies híbridas

Durante el cultivo larval de las progenies *RR* y *RA_m* se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) en la talla que los organismos alcanzaron en el quinto y sexto día, siendo mayores las tallas registradas en las larvas *RA_m* que en las larvas *RR*. Las tallas finales alcanzadas durante estas pruebas fueron de $227.1 \pm 1.5 \mu\text{m}$ y $234.8 \pm 2.4 \mu\text{m}$, para las larvas *RR* y *RA_m*, respectivamente (Fig. 34A). Las TCD no presentaron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre las progenies, las TCD promedio alcanzada durante el periodo de cultivo larvario fueron de 15.6 ± 1.8 y $17.1 \pm 2.4 \mu\text{m/día}$ en las progenies *RR* y *RA_m*, respectivamente (Tabla 14, Anexo F).

Por otro lado, las descendencias *RR* y *RAz-G* mostraron diferencias significativas ($P < 0.01$) en la LC a partir del segundo día de cultivo larvario, presentándose tallas mayores en la progenie *RR* la cual alcanzo $271.5 \pm 1.4 \mu\text{m}$ de LC en el sexto día, mientras que la progenie *RAz-G* presentó tallas de $243.9 \pm 1.3 \mu\text{m}$ de LC en el sexto día de cultivo larval (Fig. 34B). Las TDC promedio de estas cruza presentaron diferencias significativas ($P < 0.05$) con valores promedios de 25.4 ± 3.8 y $19.2 \pm 3.8 \mu\text{m/día}$, para *RR* y *RAz-G*, respectivamente (Tabla 15, Anexo F).

Las diferencias en la talla final alcanzada en las progenies *RR* (A: $227 \pm 1 \mu\text{m}$ vs B: $271.5 \pm 1.4 \mu\text{m}$) en estos dos eventos pueden estar relacionadas con las temperaturas de cultivo (15°C vs 17°C) y los lotes de hembras usadas.

3.9.2 Crecimiento de progenies híbridas en etapa postlarval y juvenil

El crecimiento en terminos de longitud de concha (LC) en estadios de postlarva y juveniles de las progenies híbridas y puras de abulón obtenidas durante los eventos experimentales se comenzó a registrar posterior al periodo de cultivo larvario, tomando como base la talla que los organismos presentaron en el momento de la inducción al asentamiento, este día se tomo como día 0 o inicio del periodo de cultivo de abulón en

esta etapa. La duración del cultivo en el caso de las progenies *RAm* y su control *RR* duró 180 días, mientras que las progenies de la cruce *RAz-G* y su control *RR* duró 60 días.

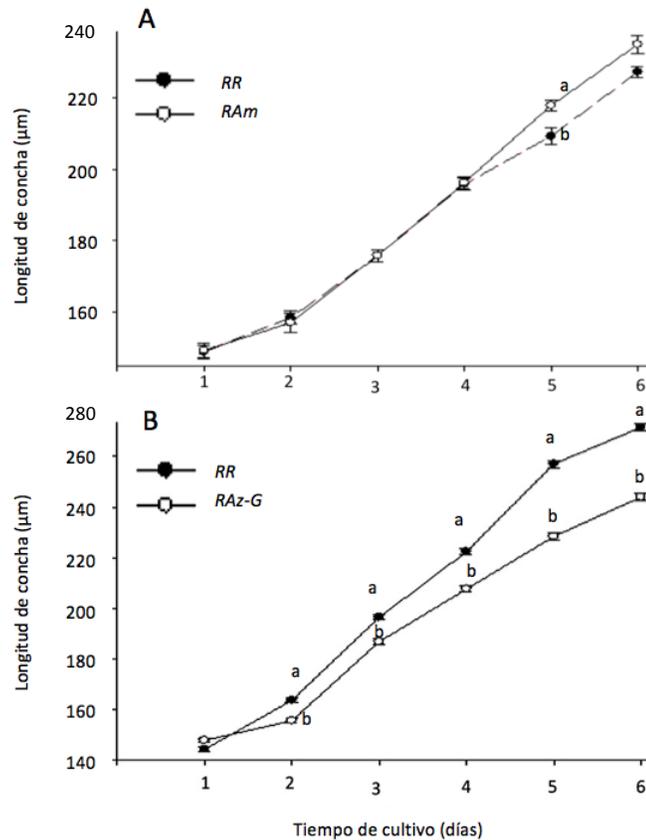


Figura 34. Crecimiento larval de las progenies *RR* y *RAm* (A) y *RR* y *RAz-G* (B) durante seis días de cultivo. Las barras indican el error estándar y las letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los tratamientos.

La talla inicial promedio de las larvas *RAm* y su control *RR* fue de 0.23 ± 0.02 mm, para el día 90 de cultivo las tallas de los organismos presentaron diferencias significativas en la LC ($P \leq 0.05$), mostrando mejor crecimiento en la progenie *RAm* que en la progenie *RR* con 4.8 y 3.2 mm de LC, respectivamente. Posteriormente, a partir del día 90, el crecimiento presentó una tendencia casi lineal (Fig. 35A). Para los días 150 y 180 los juveniles *RAm* alcanzaron tallas de 8 y 11 mm de LC, las tallas de la descendencia *RR* no se pudieron registrar debido a que después del día 110 no se encontraron organismos sobrevivientes. Las TCD calculada en el día 90 de cultivo fue de $33 \mu\text{m}/\text{día}$ para la progenie *RR* y de $51 \mu\text{m}/\text{día}$ para los abulones híbridos *RAm*, posteriormente aumento a $69 \mu\text{m}/\text{día}$ para el día 180 de cultivo en la progenie *RAm*. La TCE promedio de los primeros 90 días de cultivo para la progenie *RR* y *RAm* fueron de 0.03 y de 0.4 %/día, respectivamente, posteriormente la TCE en la progenie *RAm* mostró una reducción a 0.1 %/día (Tabla 4).

Por otro lado, la talla inicial promedio de las larvas de las progenies *RAz-G* y su control *RR*, fue de 0.26 ± 0.03 mm al inicio de la evaluación, no obstante para el día 30 de cultivo las tallas de los organismos presentaron diferencias significativas en LC ($P < 0.05$), mostrando mejor crecimiento en la progenie control *RR* con 0.68 ± 0.5 mm que en la progenie híbrida *RAz-G* con 0.43 ± 0.01 mm. Para el día 60 de la evaluación se mantuvieron las diferencias en la LC, presentando tallas de 1.6 y 1.1 mm, en las cruzas *RR* y *RAz-G*, respectivamente. Las TCD calculadas para el día 60 de cultivo fueron de 36.9 y 15.9 $\mu\text{m}/\text{día}$ para la progenie *RR* y *RAz-G*, respectivamente. La TCE promedio a los 60 días de cultivo fueron de 0.03 y de 0.02% por día entre las progenie *RR* y *RAz-G*, respectivamente (Tabla 4).

Tabla 4. Resumen de parámetros de producción de progenies híbridas *RAm/RAz-G* y sus respectivos controles *RR*.

Tasas (%)	<i>RR</i> (día 90)	<i>RAm</i> (día 90)	<i>RAm</i> (día 180)	<i>RR</i> (día 60)	<i>RAz-G</i> (día 60)
Tasa de fijación (día 7)	1.9	3.2	3.2	9.9	6.2
Tasa de supervivencia final	4.3	33.1	26.5	0.44	39.6
Talla inicial (mm)	0.227 ± 0.001	0.234 ± 0.002		0.288 ± 0.001	0.259 ± 0.001
Talla final (mm)	3.2 ± 0.67 (10) ^b	$4.8 \pm .76$ (15) ^a	$11 \pm .3$ (30)	1.5 ± 0.3 (17) ^a	1.1 ± 0.2 (47) ^b
TCD ($\mu\text{m}/\text{día}$) ¹	33 ± 7.5 (10) ^b	50.9 ± 8.5 (15) ^a	69 ± 7.2 (30)	36.9 ± 3.5 (17) ^a	15.9 ± 1.2 (47) ^b
TCM (mm/mes) ²	0.99 ± 0.22 (10) ^b	1.5 ± 0.25 (15) ^a	0.9 ± 0.35 (30)	0.66 ± 0.17 (17) ^a	0.37 ± 0.11 (47) ^b
TCE (%/día) ³	0.03	0.4	0.1	0.03	0.02

Haliotis rufescens (*RR*), *H. rufescens* x *H. corrugata* (*RAm*) y *H. rufescens* x *H. fulgens guadalupensis* (*RAz-G*). Los valores son los promedios \pm error estándar, el *n* está indicado en los paréntesis. Los valores con letra diferente en la fila representan diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$).¹Tasa de crecimiento diario, ²Tasa de crecimiento mensual y ³Tasa de crecimiento específico.

3.9.2 Supervivencia de progenies híbridas

Los porcentajes de supervivencia en la etapa de postlarva y juveniles fueron calculados con respecto al total de larvas competentes inducidas al asentamiento (6 días de edad en todas las cruzas híbridas y sus controles). En todos los casos el porcentaje de supervivencia disminuyó drásticamente en los primeros días posterior al asentamiento (Fig. 36). No obstante los primeros registros de supervivencia que se pudieron obtener variaron en tiempo entre las diferentes cruzas experimentales dependiendo de los recipientes en los que se llevó a cabo el cultivo.

El porcentaje de mortandad fue de más de un 95% en el periodo de cultivo comprendido del la inducción al asentamiento al día 30, obteniéndose supervivencias de 1.9 y 3.2%, para las progenies *RR* y *RAm*, respectivamente, estimándose una densidad de 160 PL/placa para la progenie *RR*, mientras que para la progenie *RAm* la densidad fue de 104 PL/placa. Posteriormente, del día 30 al 90, se registraron supervivencias de 0.2 y 1.4%, equivalentes a una densidad de 16 PL/placa de la descendencia *RR*, mientras

que la descendencia *RAm* presentó una densidad de 67 juveniles/placa (día 90). Para el día 110 la supervivencia de juveniles de abulón rojo *RR* fue de 0%, registrándose la muerte de todos los juveniles de esta cruce. En el caso del híbrido *RAm*, se registraron supervivencias del 1% el día 150 y se mantuvo hasta el día 180 (Fig. 36A), obteniéndose finalmente una densidad de 57 juveniles/placa para el día 180.

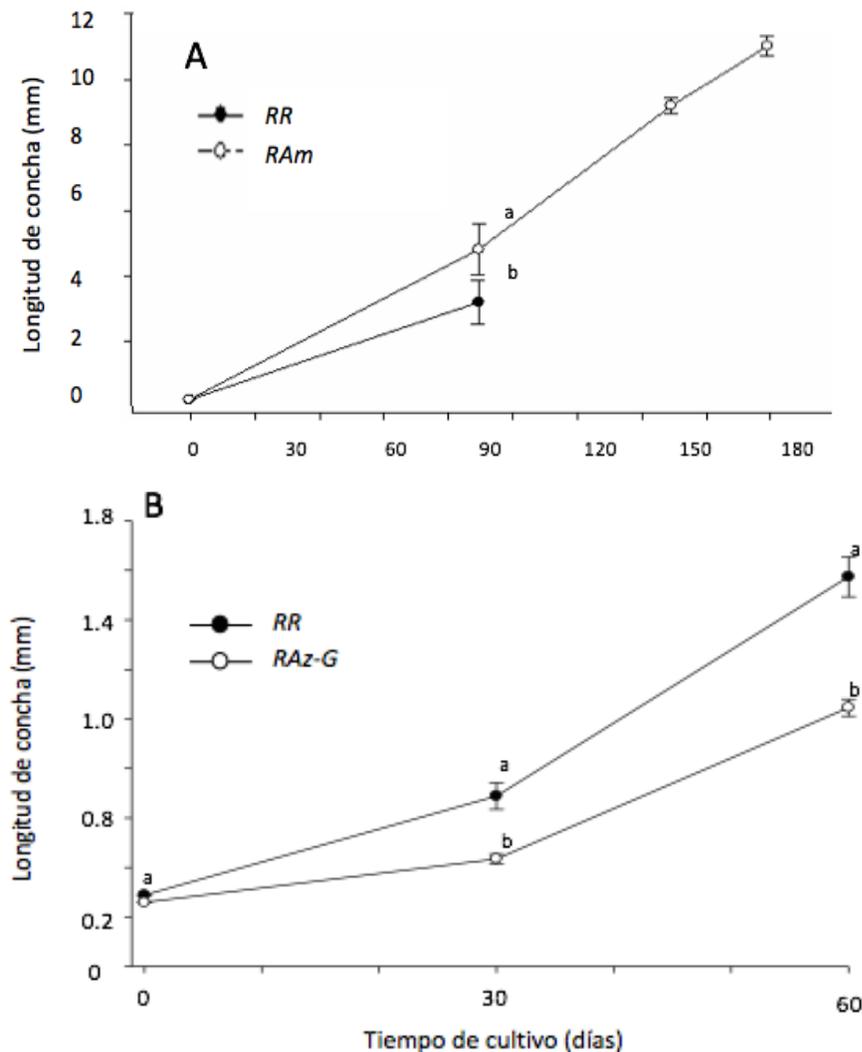


Figura 35. Crecimiento de PL de las progenies *RR* y *RAm* (A) y *RR* y *RAz-G* (B) durante 180 y 60 días de cultivo, respectivamente. Las barras indican el error estándar. $n=10$ y 15 en las progenies *RR* y *RAm*, respectivamente; $n=17$ en la progenie *RR* y $n=47$ en la progebie *RAz-G*; las letras indican diferencias significativas ($P<0.05$) entre los tratamientos.

Las progenies *RR* y *RAz-G*, presentaron una densidad inicial de 5,333 larvas totales en el momento de la inducción al asentamiento. En el octavo día posterior al asentamiento se registró una mortalidad mayor al 90% en ambas progenies (Fig. 36B). Para el día 14 la supervivencia fue de 10 y 6% para las progenies *RR* y

RAz-G, respectivamente. Posteriormente, la cantidad de larvas en los tratamientos disminuyó a menor ritmo, el día 30 se registró una supervivencias de 0.53 y 2.48 % para las progenie *RR* y *RAz-G*, respectivamente. Para el día 60 la progenie *RR* tuvo una supervivencia de 0.04 %, mientras que la progenie *RAz-G* obtuvo una supervivencia de 2.1 %. Las densidades de abulones para el día 60 fue de 28 juveniles/placa para la crusa *RxR*, y 132 juveniles/placa para la crusa *RxAz-G*.

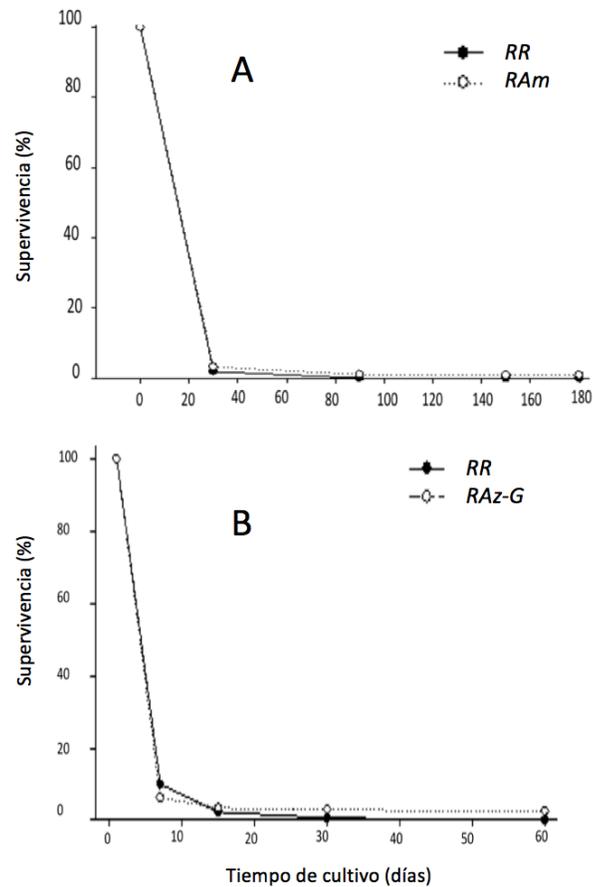


Figura 36. Supervivencia de PL de las progenies *RR* y *RAm* (A) y *RR* y *RAz-G* (B) durante 180 y 60 días de cultivo, respectivamente.

Capítulo 4. Discusión

4.1. Temperatura como el principal factor promotor de la maduración del abulón amarillo

En el medio natural, las principales variables ambientales asociadas al crecimiento y ciclo reproductivo de abulones son temperatura, fotoperíodo y la abundancia de alimento (Leighton, 2000). El efecto de la temperatura está comprobado en algunas especies como *H. discus hannai*, *H. iris*, *H. australis*, *H. rubra* y *H. laevigata* (Kikuchi y Uki, 1974; Kabir, 2001; Grubert y Ritar, 2004). En diversos estudios la temperatura ha demostrado ser especie y estadio específica, por ello evaluar la respuesta a este factor en una especie durante su desarrollo ha permitido determinar las temperaturas óptimas para su cultivo larval, crecimiento, maduración sexual y desove (Harris *et al.*, 2001; Díaz *et al.*, 2006; Badillo *et al.*, 2007; Leighton 2000; Morash y Alter, 2015; Vélez-Arellano *et al.*, 2016). También se ha observado que la temperatura de crecimiento difiere de la de maduración y en algunos cultivos comerciales tratan de evitar la pérdida de biomasa relacionada con el proceso reproductivo (Botwright *et al.*, 2014). En el estudio realizado en abulón azul (*H. fulgens*) silvestre por Vélez-Arellano y colaboradores (2016) observaron un aumento en el desarrollo de gónada y las reservas energéticas durante periodos con temperaturas menores a 20 °C, ya que en su medio natural cuando la temperatura es cercana a este valor, aumentan los desoves. En esta especie, la temperatura de crecimiento óptima reportada es de 24.5 °C (Díaz *et al.*, 2006), 4.5 °C superior a la requerida para formar gonada (Vélez-Arellano *et al.*, 2016).

En el caso de *H. corrugata*, la temperatura óptima de crecimiento está reportada entre 21 y 24.5 °C (Leighton, 1974; Díaz *et al.*, 2006), pero no existen antecedentes sobre la temperatura óptima de maduración en cautiverio ni en el medio natural. Por lo que en este trabajo, un aspecto importante fue determinar un rango térmico en el cual se pueden obtener organismos maduros. Los resultados obtenidos demuestran que un incremento gradual en la temperatura de 16.2 a 18.5 °C es suficiente para inducir la maduración gonadal en abulón amarillo en un periodo de cinco meses. Sin embargo, también podría ser posible lograr la maduración de esta especie manteniendo una temperatura más alta constante de entre 19 a 21 °C, durante el tiempo necesario para poder acumular los 2400 °C·día, que es la TEA necesaria para alcanzar un IVG mayor a 2 y obtener organismos maduros. Resultados similares han sido reportados por Uki y Kikuchi (1984) al mantener abulón japonés *H. discus hannai* a diferentes temperaturas donde observaron que el tiempo de obtención de gametos varía dependiendo de la cantidad de °C·día ganados en el régimen de temperatura proporcionado. Por ejemplo, a temperaturas mayores de 17 °C, los abulones alcanzaron un IVG de 3 en 70 días con 1500 °C·día. Por lo que el manejo de la temperatura de mantenimiento en diferentes lotes de abulones permite obtener abulones maduros durante todo el año

y aumentar la producción de PL y juveniles. En abulón amarillo, la TEA necesaria para alcanzar la madurez sexual no mostró diferencias entre machos y hembras, como en el caso de otras especies, por lo que se puede pensar que la madurez de esta especie es sincrónica entre sexos, cuando existe alimento en abundancia. Lo anterior, no siempre es así, por ejemplo Grubert y Ritar, (2004) encontraron que la temperatura necesaria para obtener organismos maduros y asegurar una alta tasa de desoves y producción de gametos en *H. rubra* varía de 1540 a 1350°C·día, y en *H. laevigata* varía de 1930 a 1700°C·día para hembras y machos respectivamente.

En moluscos se ha observado que el estrés, la disponibilidad de alimento y la temperatura son los factores que más influyen en la formación del tejido gonadal debido al efecto que tienen en el flujo de las reservas de lípidos y carbohidratos (en forma de glucógeno) hacia la gónada (Velasco, 2013). En este estudio, aunque no se realizaron análisis bioquímicos, se observó un cambio evidente en las proporciones que ocupaban las gónadas y el hepatopáncreas en los cortes de la parte basal, media y apical del CHG de abulón amarillo entre organismos con madurez parcial, madurez completa y desovados. Las proporciones más marcadas se observaron en la parte media (en donde la gónada llegaba a ocupar más de la mitad del área observada) y apical (en donde el hepatopáncreas se observaba de forma vestigial en organismos, con estadios de madurez avanzada). Lo anterior sugiere que la cantidad y tipo de alimento proporcionado (*Macrosistys pyrifera*) cumplió con los requerimientos nutricionales de *H. corrugata* para generar gónada. Durante el proceso de maduración en el abulón se han observado variaciones bioquímicas marcadas, que conllevan a una relación inversamente proporcional entre el volumen ocupado por la glándula digestiva y el tejido gonadal (Booolootian *et al.*, 1962; Najmudeen, 2007; Vélez-Arellano *et al.*, 2016). En *H. rubra* se ha demostrado que los lípidos y carbohidratos presentan mayor influencia en la formación de la gónada, la proporción de cada una de estas moléculas tiende a ser mayor en el tejido que ocupe una mayor área en el organismo (Najmudeen, 2007; Vélez- Arellano *et al.*, 2016). El abultamiento del tejido gonadal y la reducción del área ocupada por la glándula digestiva en los cortes transversales evidencian el estadio de madurez de los organismos y reafirman, la hipótesis de que regulando la temperatura en conjunto con una alimentación constante se promueve la maduración gonadal del abulón amarillo. Además, se ha demostrado que la generación de gametos se asocia principalmente al esfuerzo reproductivo, lo cual se define como la energía asignada a la reproducción (Thompson y MacDonald, 1991, citado por Velasco, 2013).

Algunos otros factores que hay que tomar en cuenta son los estresores que pueden reducir el crecimiento de los organismos, aumentar la probabilidad de enfermedades e inhibir el desarrollo gonadal (Burke *et al.*, 2001). Por ejemplo, las concentraciones de nutrientes, principalmente de los compuestos nitrogenados, y

la temperatura, oxígeno, pH y la salinidad son factores críticos que provocan un incremento en el gasto energético cuando los organismos son expuestos a condiciones fuera del rango óptimo (Harris *et al.*, 2001; Morash y Alter, 2015). Durante el periodo de acondicionamiento de este trabajo, los nutrientes, la temperatura y el pH se mantuvieron estables y en intervalos que se recomiendan para el cultivo de diferentes especies de abulón y en pruebas de crecimiento de abulón amarillo (Leighton 2008; Badillo *et al.*, 2007; SAGARPA, 2013). Los compuestos nitrogenados que más influyen en la salud y en el crecimiento del abulón son los nitritos (NO_2^-) y el amoníaco (NH_3). El amoníaco es el compuesto más tóxico debido a su rápida difusión a través de las membranas celulares y al efecto inhibitorio que tienen en la respiración celular (Morash, y Alter, 2015). Por otro lado, los nitritos pueden reducir la cantidad de hemocianina y por lo tanto la capacidad de transportar oxígeno, lo cual incrementa el metabolismo anaerobio y el nivel de estrés en los abulones (Hindrum *et al.*, 2000). Además, con el aumento de la temperatura y con las variaciones en el pH, ambos compuestos aumentan su toxicidad (Harris *et al.*, 2001; Morash y Alter, 2015).

4.2. Histología del CHG congelado

Con el análisis histológico del tejido gonadal congelado se corroboró la presencia de gametos en diferentes estadios de desarrollo en las gónadas de los abulones acondicionados con el intervalo de temperatura mencionado anteriormente. A pesar de que se observaron daños tisulares y cambio en la morfología de los gametos, por efecto del congelamiento y descongelamiento del tejido, se pudieron reconocer características clave que permitieron diferenciar los estadios de madurez en los abulones sacrificados; por ejemplo: el tamaño de los gametos, la densidad de gametos, el arreglo de tejidos como la trabécula en hembras y los túbulos en machos.

En este trabajo los análisis histológicos del tejido gonadal se enfocaron en la forma de los gametos, la presencia o ausencia de células germinales y sus estadios de desarrollo. Algunos autores han demostrado la prevalencia de características similares a las descritas en los resultados de este trabajo en otras especies de abulón y han determinado estadios avanzados de madurez en los organismos que las presentan (Booolootian *et al.*, 1962; Basto-Cuevas 2009; Vélez-Arellano *et al.*, 2015).

El grado de conservación de los gametos masculinos fue mayor que el de los gametos femeninos; en las hembras la mayoría de los ovocitos sufrieron severas deformaciones, aunque se registraron ovocitos mayores a 100 μm de diámetro. El hecho de realizar los cortes en un criostato a -20°C permitió que los espermias se mantuvieran empaquetados sin afectar su morfología. Por otra parte, los ovocitos

presentaron un tamaño similar al de ovocitos maduros con un núcleo bien definido y pigmentado lo que indica que las cromatinas aún no se encontraban degradadas como sucede con ovocitos atrésicos; además, las trabéculas mantuvieron el arreglo de los ovocitos y su abundancia dentro de las vainas. Wood y Buxton (1996) mencionan que se puede considerar a un organismo maduro cuando en machos los espermatozoides están bien definidos y cuando en hembras se observan ovocitos vitelogénicos. Humanson (1962) menciona que la histología de tejido congelado brinda ciertas ventajas, ya que es una forma rápida de conservar el tejido y que puede ser utilizada en tejidos que contengan compuestos que puedan perderse por el alcohol, los solventes o el calor como son las proteínas o ácidos grasos. Estas características pueden permitir que los tejidos puedan ser analizados por técnicas cromatográficas y determinar la proporción de proteínas, carbohidratos o lípidos en órganos o tejidos. Humason (1962) también menciona que la cantidad de agua en las células congeladas es determinante, dado que en el proceso de congelación el agua tiende a salir de las membranas de las células disminuyendo su tamaño y deformando sus características, además de aumentar la formación de cristales dentro de ellas. Los análisis histológicos en tejidos de moluscos congelados son escasos, Kanwisher (1959) observó en el tejido congelado y descongelado del pie de *Littorinas littorea* un fuerte desarreglo cuando el tejido fue procesado de esta manera, atribuyendo estos resultados al congelamiento lento del tejido. Otros estudios en donde se analizaron cortes de tejido congelado se observó la presencia de cristales aún cuando el tejido fue previamente fijado con formalina; pero cuando los tejidos fueron previamente fijados en glicerol y dimetilsulfoxido en combinación con hielo seco y posteriormente congelados rápidamente a -75°C los cristales no afectaron los tejidos analizados (Rosen *et al.*, 1985).

Por otro lado Gaviño-De la Torre y colaboradores (1972), mencionan que la exposición a una solución concentrada de formol después de que los organismos han sido congelados puede ayudar en el estudio de estructuras en nudibranchios y gasteropodos marinos. Aún así no existen antecedentes, en moluscos ni en otros organismos, del análisis histológico de gónadas congeladas, ya que lo más recomendable para analizar las células germinales es trabajar con técnicas que involucren el tejido fresco (comunicación personal Yanet Guerrero, Laboratorios de Patología del CICESE). Por ejemplo, la técnica de fijación de tejidos en solución Davidson's junto con la técnica de inclusión en parafina permiten conservar la integridad de las estructuras del tejido gonadal y mantener la morfología de los gametos (Harris, *et al.*, 2006). El desarrollo y validación de esta técnica para tejido gonadal congelado de abulón permitirá preservar en plantas de procesamiento las gónadas de los abulones capturados por pesquería para evaluar el estado de desarrollo en poblaciones silvestres de diferentes especies de importancia comercial.

4.3. Viabilidad de los gametos obtenidos por biopsia gonadal

La estandarización de un método de inducción al desove de la especie de abulón objetivo es un paso sumamente importante para asegurar la obtención de gametos viables cuando se realizan fecundaciones *in vitro*. Entre los métodos reportados en abulones están: desecación (una hora o más), choque térmico (cambio de la temperatura del agua de 5-10°C en 30 min), exposición a agua irradiada con luz UV, aireación vigorosa y el uso de soluciones químicas (TRIS-H₂O₂) o una solución de gametos previamente obtenida (Leighton, 2000; Setyono, 2006). No obstante, estos métodos suelen tener un éxito variable y su efectividad es especie-dependiente, por ejemplo la mayoría de las especies responden a las 2 a 3 h; no obstante, algunas especies pueden tardar hasta 6 h como en el caso de *H. midae* o inclusive no responder a este estímulo químico (Leighton y Lewis 1982; Moss *et al.*, 1995; Moss, 1998; Najmudeen y Victor, 2004; Leighton, 2008; York *et al.*, 2012; Mendoza-Porras *et al.*, 2016). Leighton y Lewis (1982) evaluaron la respuesta de cuatro especies de abulón de California y encontraron que el abulón chino responde en el menor tiempo (1.7-2.3 h), seguido del rojo (2.5-2.9 h), amarillo (2.6-2.8 h) y azul (3-3.8 h); observándose que los machos responden primero y que la temperatura influye en los tiempos de respuesta. Además, el éxito de los desoves fue variable entre sexos, siendo del 33-38 % en hembras (a excepción de hembras de abulón rojo con 98 %) y en machos del 64% en abulón azul al 100 % en abulón chino. En su estudio, reportan que las especies con mayor éxito en el desove son abulón rojo y chino, y las de menor éxito abulón amarillo y azul cuando se usa la técnica de TRIS-H₂O₂.

Durante las pruebas tanto hembras como machos de abulón rojo fueron exitosamente desovados con el método de TRIS-H₂O₂, pero los abulones amarillo y azul machos no respondieron a ninguno de los métodos de inducción al desove usados; aún y cuando se encontraban con un IVG de 2.5 a 3. Por lo cual, se propuso y probó la técnica de biopsia gonadal como un método alternativo para asegurar la obtención de esperma viable de estas especies y poder llevar a cabo las fecundaciones cruzadas.

Esta técnica, comúnmente citada como raspado o escisión de gónada, ha sido utilizada para realizar extracciones de gametos de diversas especies de moluscos bivalvos. Obata *et al.* (2008) y Martínez-Guzmán *et al.* (2007) utilizaron el raspado de gónada para realizar fecundaciones *in vitro* de diferentes especies de ostiones logrando obtener descendencia viable. Mientras que para abulones, Leighton reporta que es factible obtener esperma de abulón de las especies de California mediante biopsia gonadal, activarlo en agua de mar y fecundar ovocitos obtenidos por el método tradicional de TRIS-H₂O₂ (Leighton, 2000).

En el presente trabajo, la viabilidad relativa del espermatozoides en cada evento experimental realizado fue variable y siempre fue menor a la viabilidad registrada cuando los gametos son expulsados naturalmente después de la inducción con TRIS-H₂O₂ (> a 80 %; Salinas-Flores *et al.*, 2005). Sin embargo, en todos los eventos donde se utilizó el método de biopsia gonadal de machos se obtuvieron buenos resultados de fecundación (33-85 %) y eclosión (63-86 %) y se logró obtener descendencia viable (15-29 % de supervivencia), comparables con los resultados obtenidos en la cruce control donde se fecundaron ovocitos rojos con espermatozoides obtenido por inducción con TRIS-H₂O₂. Resultados similares han sido reportados por Roux y colaboradores (2014), quienes lograron obtener prole del abulón africano *H. midae* utilizando espermatozoides extraído directamente de la gónada por medio de una jeringa, presentando intervalos en los porcentajes de fecundación de 31 a 96 %.

Además, durante la prueba de espermatozoides extraído por biopsia la concentración de espermatozoides mostró un efecto positivo en la fecundación, al igual que la exposición a un mayor tiempo de contacto espermatozoides/ovocito. Eccena *et al.* (1998) y Roux *et al.* (2014) coinciden en que dos de los factores más importantes que influyen para maximizar la fecundación y obtener desarrollo normal de larvas trocóforas son la concentración de espermatozoides y el tiempo de contacto espermatozoides/ovocito, estos autores mencionan que concentraciones mayores a las registradas como óptimas suele tener un efecto negativo en la eclosión de las larvas, algunos autores atribuyen esto a un efecto dado por la poliespermia, no obstante Stephano y colaboradores (1992) demostraron que la poliespermia en abulón es un evento poco frecuente debido a mecanismos de defensa de los ovocitos como el cambio en el potencial de membrana.

El éxito en la fecundación de los ovocitos cuando se utilizó el método de biopsia gonadal de machos en cruces híbridas de abulón rojo con amarillo y rojo con azul permitió aplicar las evaluaciones de los protocolos de fecundación *in vitro* interespecíficos y generar larvas viables en todos los casos. Por otro lado, se ha demostrado que la concentración de espermatozoides necesaria para realizar cruces exitosas es afectada por la cantidad de receptores de VERL que se encuentran en la capa vitelina y la capacidad de lisis de la lisina (Roux *et al.*, 2014). Al utilizar espermatozoides extraído con biopsia y registrar el porcentaje relativo de espermatozoides viables se hizo necesario el aumento en la concentración de espermatozoides y en el tiempo de exposición, para asegurar una proporción de espermatozoides por ovocito que no afectará la fecundación. Las tasas de eclosión no fueron afectadas en ningún tratamiento, no obstante las tasas de deformidad aumentaron considerablemente en la mayoría de los tratamientos experimentales. Roux *et al.* (2014) menciona que la exposición prolongada de espermatozoides y ovocitos suele generar una lisis excesiva de la capa vitelina y provocar deformidades en la descendencia, lo cual coincide con los resultados obtenidos a pesar de que un gran porcentaje del espermatozoides no presentaba movimiento. En el caso de las deformidades, el

colapso y la dilución de capa vitelina podría ser la principal causa del desarrollo anormal del cigoto debido a las altas concentraciones de esperma. Diversos autores coinciden en que los altos niveles de lisina acrosomal del esperma y un aumento en el tiempo de exposición esp/ov puede disolver la membrana de los ovocitos y promover un desarrollo anormal (Leighton y Lewis, 1982; Encena *et al.*, 1998; Galindo *et al.*, 2009).

La biopsia de ovocitos de abulón no es un método utilizado actualmente, debido a que los intentos realizados en el pasado han demostrado que no es posible obtener gametos viables de hembras grávidas de abulón. Aún y cuando este método ha sido utilizado en hembras de otros gasterópodos como la lapa gigante *Megathura crenulata* con resultados satisfactorios (Leighton, 2000).

En abulón las hipótesis que se manejan sobre la viabilidad de los ovocitos extraídos por biopsia son que: 1) los ovocitos deben de pasar por el oviducto para ser fecundables, relacionado su activación con sustancias segregadas en el oviducto o bien, 2) que los ovocitos solo pueden fecundarse cuando son liberados de la trabécula (tejido conectivo y estructural que los retiene en el ovario). Los resultados obtenidos de la biopsia gonadal en hembras de abulón, contradicen la primera hipótesis ya que fue posible obtener ovocitos viables cuando las hembras fueron sometidas a un previo proceso de inducción con TRIS-H₂O₂, sugiriendo que los procesos enzimáticos que activan los ovocitos o los hacen viables tienen lugar en la gónada y no en el oviducto. Existen antecedentes del uso de peptidos para obtener gametos viables en pruebas de maduración de ovocitos *in vitro* en bivalvos como *Argopecten purpuratus* y *Tivela stultorum*, (Alvarado-Alvarez, *et al.*, 1996; Martínez *et al.*, 2000). En estos bivalvos se evaluó el efecto de la serotonina en la maduración de los ovocitos para que éstos puedan ser fecundados, no obstante, también se ha evidenciado el efecto que tiene este neurotransmisor en el desove ya que la concentración de serotonina aumenta considerablemente en el tejido gonadal después de la inducción y además es capaz de cambiar el potencial de membrana de ovocitos extraídos por biopsias para que éstos puedan ser fecundados (Alvarado-Álvarez *et al.*, 1996; Matsutani *et al.*, 1987; Martínez *et al.*, 2000). Además, investigaciones recientes de York *et al.* (2012) demuestran que siete neuropéptidos son diferencialmente expresados en los ganglios anteriores de abulón tropical *H. asinina* durante un ciclo de desove semilunar, y evidencian que éstos péptidos juegan un papel regulatorio en traducir las señales ambientales experimentadas por una población a una respuesta fisiológica sincrónica de liberación de gametos (desove). En el caso específico de las hembras, los genes *Has-Myomodulin*, *Has-Whitnin* y *Has-FMRFamide* presentaron una expresión máxima doce horas antes del desove, mientras que el gen *Has-APGWamide* presentó su mayor expresión durante el desove. Mientras que en machos, la expresión de los genes *Has-APGWamide*, *Has-Myomodulin*, *Has-Whitnin*, *Has-SPL*, *Has-MIP* y *Has-HGAP* registró un pico máximo en el momento del

desove. Por lo cual, se observó que cada gen tiene una expresión única y sexo-específica, y en el caso de las hembras el incremento en la expresión de estos genes están relacionados con el rompimiento de la vesícula germinal al inicio de la maduración del ovocito y a la disociación de la primer cohorte de ovocitos de la trabécula, dado que estos disminuyen durante el momento del desove.

La activación de los ovocitos en la gónada así como los trabajos que evidencian el incremento de algunas proteínas durante la inducción permiten plantear la hipótesis de que existen varios neuropéptidos que aumentan su actividad en el organismo durante el proceso previo al desove que pueden influir en la capacidad de los ovocitos para ser fecundados, especialmente influyendo su maduración final y disociación de la trabécula. Por lo cual, cuando los organismos son previamente expuestos a algún agente que gatille la señalización de los neuropéptidos (hormonas) que regulan el desove es factible obtener gametos femeninos viables de abulón. Esto además fue congruente con la baja tasa de fecundación en los ovocitos de hembras sin previa exposición al peróxido de hidrógeno, donde se observó además un empaquetamiento de los ovocitos y falta de una disgregación de los mismos inadecuada (observación personal). Caso contrario, los ovocitos de la hembra previamente expuesta y los obtenidos por expulsión natural presentaron una disgregación buena al ser enjuagados y un alto porcentaje de fecundación (>80 %) y eclosión (>70 %). Este comportamiento sugiere que los procesos moleculares y fisiológicos que suceden en la gónada pueden ser las causas por las que es necesario realizar una previa inducción en hembras de abulón para que los ovocitos sean viables.

Además, existen otra serie de genes y péptidos que se han asociados a procesos específicos dentro de las diferentes etapas del desove en abulones y que quizá puedan influir en la viabilidad de los gametos o en la obtención natural de éstos. En abulón se ha observado la influencia de la actividad de la enzima ciclooxigenasa y la síntesis de prostaglandinas en el proceso de liberación de gametos en organismos grávidos (Morse *et al.*, 1977). Se ha observado que la cantidad de prostaglandinas aumenta en las gónadas durante el proceso de desove y decrece cuando éste se ha completado. Pinder *et al.* (1999) menciona que la prostaglandina E y F han demostrado inducir al desove a algunos gasterópodos marinos. Nuurai *et al.* (2010) demostraron que la hormona de la puesta de huevos (ELH), al igual que la gonadotropina (GtH) tienen un efecto en promover la formación de gametos y su expulsión en los desoves que han demostrado su efecto en *H. asinina*.

El desove de abulón en cautiverio es producido por condiciones estresantes inducidas por métodos físicos y químicos principalmente, como el estrés térmico y la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) producidas por la irradiación de agua con luz UV y el peróxido de hidrógeno (Morse *et al.*, 1977;

Botwright, 2014; Morash y Alter, 2015). El desove puede ser inducido por incrementos en la temperatura del agua, por lo que se ha propuesto que en poblaciones naturales la mortalidad de verano puede deberse a una combinación de altas temperaturas y desove no controlado, dado que el estrés por calor e hipoxia probablemente deja a los abulones energicamente agotados y susceptibles a patógenos (Travers *et al.*, 2008; Botwright, 2014). Por otra parte, el estrés oxidativo inducido por la luz UV y el H₂O₂, puede ser mitigado por mecanismos de defensa antioxidante o a través de las proteínas de choque térmico (HSPs) que degradan las ROS en compuestos menos reactivos mientras que al mismo tiempo las HSPs degradan las proteínas demandantes de oxígeno (Morash y Alter, 2015). En estudios recientes en abulón verde australiano *H. laevisgata* se identificó un aumento en la expresión de las HSPs en hembras y machos de abulón que han sido inducidos al desove con agua irradiada con UV (Mendoza-Porras *et al.*, 2014). El aumento en su expresión en abulones esta sujeto a agentes estresores como la temperatura y nivel de radicales de oxígeno o peróxido en el agua, factores que se ha comprobado, tienen un papel determinantes en la inducción al desove de abulones (Uki y Kikuchi, 1984). Por otro lado, Mendoza-Porras y colaboradores (2016) evaluaron la expresión génica en tejido gonadal durante un evento de inducción al desove de hembras de *H. laevisgata* en desove, post-desove y aquellas que no desovaron. La enzima antioxidante superóxido dismutasa se encontró en mayor cantidad en hembras desovando comparado con aquellos que habían terminado de desovar. Además, los organismos que no desovaron no presentaron esta proteína en su gónada, esto sugiere que la proteína superóxido dismutasa es necesaria para mitigar los efectos del estrés durante la expulsión de los gametos.

Adicionalmente, el estrés por la manipulación de los reproductores es relativamente desconocido, y puede ser un factor, que en sinergia con temperaturas cambiantes y al agua irradiada con rayos UV estimule el desove (Grubert y Ritar, 2004; Freeman *et al.*, 2006; Daume 2007).

Los resultados de viabilidad en ovocitos extraídos por biopsia en abulón rojo, demuestran que esta técnica puede ser una buena opción para realizar cruza programadas o para aumentar el número de gametos disponibles en desoves comerciales, donde tan sólo el 30% de las hembras (con IVG de 2.5-3) que son inducidas desovan (comunicación personal Leticia Badillo, granja Productores Marinos Baja, S. A. de C. V.).

4.4 Optimización de los protocolos de fecundación interespecífica en tres especies de abulón efecto de la concentración de esperma

Actualmente existen numerosas investigaciones que ponen en evidencia la viabilidad de algunas cruzas híbridas de abulón de forma natural y experimental (Owen *et al.*, 1971; Leighton y Lewis, 1982; Leighton, 2000; Zheng, 2006; Ahmed *et al.*, 2008; Lafarga-De la Cruz *et al.*, 2013; You *et al.*, 2015). Sin embargo, uno de los principales puntos negativos que se ha reportado cuando se pretende obtener híbridos de abulón es la baja tasa de fecundación obtenida (Leighton, 2000). En este trabajo se demostró que es posible optimizar los protocolos para realizar las cruzas híbridas entre tres especies de abulón del Pacífico Mexicano, a través del manejo de factores como la densidad espermática y la edad del ovocito. No obstante es necesario aclarar que con fines comparativos y dado que no se tiene información sobre diversos aspectos de la biología reproductiva de las subespecie de abulón azul de Isla Guadalupe, los resultados de la progenie *RAz-G* son comparados con la especie más cercana a ellos y de la cual, ya se han realizado estudios de hibridación.

La concentración de esperma fue un factor determinante en las tasas de fecundación tanto en las cruzas puras como en las cruzas híbridas. La concentración óptima con la cual se maximiza la obtención de progenie depende en gran medida de la especie y el tipo de crua. En este sentido, se ha reportado que las cruzas puras de las tres especies objeto de este estudio, presentan altos porcentajes de fecundación (80-100%) cuando se utilizan concentraciones de 1×10^6 esp/mL (Leighton, 2000). Por otro lado, en cruzas interespecíficas diversos autores han evidenciado la necesidad de aumentar la concentración espermática de 10 a 100 veces más de lo que se requiere para generar tasas de fecundación óptimas en especies puras (Leighton y Lewis, 1982; Leighton, 2000; Lafarga-De la Cruz y Gallardo-Escaráte, 2011). Durante las diferentes pruebas donde se evaluó el efecto de la concentración espermática se corroboró que los mejores resultados en las tasas de fecundación interespecíficas corresponden a tratamientos con concentraciones espermáticas mayores a 1×10^6 , en el caso de la crua *RxA_m* las mejores tasas de fecundación se alcanzaron cuando la concentración de esperma fue de 6.9×10^8 esp/mL, resultando en una relación de 25,000 esp/ov (cincuenta veces mayor a la usada en las cruzas *RxR* de este estudio), mientras que la crua híbrida *RxAz-G* presentó su máxima tasa de fecundación cuando se usó una concentración espermática de 1.2×10^8 esp/mL y una relación de 6,500 esp/ov (veinte veces más que las usadas en cruzas puras en este trabajo). Leighton y Lewis, (1982) encontraron que al utilizar una concentración espermática de 1×10^7 , la probabilidad de obtener fecundación en cruzas interespecíficas aumenta. Lafarga-De la Cruz, (2010) registró una mejora en la fecundación interespecífica en cruzas recíprocas de abulón rojo y abulón japonés con concentraciones de esperma de (1×10^7). Hamilton y colaboradores (2009) mencionan que la

producción de abulón tigre, híbrido entre *H. rubra* y *H. leavigata*, se puede optimizar con concentraciones espermáticas de 8×10^6 . Todas las concentraciones son mayores a las recomendadas en las especies puras.

En abulones las proteínas reproductivas son las que regulan y facilitan la fecundación en cruzas conespecíficas, y debido a la especie-especificidad de estas proteínas es que se requiere incrementar las concentraciones de espermatozoides al realizar cruzas interespecíficas, (Vacquier *et al.*, 1999; Swanson y Vacquier 2002; Galindo *et al.*, 2009). La interacción espermatozoides-ovocito es mediada por estas proteínas reproductivas, las cuales están ubicadas en la vesícula acrosomal (como la lisina y sp18) del espermatozoides y en la capa vitelina (como el receptor VERL y la proteína dominante de la capa pelúcida VEZP14) el ovocito (Vacquier *et al.*, 1997; Swanson y Vacquier 2002).

La similitud entre las proteínas reproductivas de diferentes especies de abulón, principalmente la lisina, y su capacidad para disolver las capas vitelinas también influye en la concentración de espermatozoides necesaria para fecundar ovocitos en cruzas interespecíficas (Vacquier *et al.*, 1990; Vacquier *et al.*, 1997). Leighton y Lewis (1982) mencionan que en cruzas interespecíficas el incremento de la concentración de espermatozoides promueve la lisis de la capa vitelina permitiendo que el espermatozoides pueda fecundar al ovocito. En este trabajo el incremento en la concentración de espermatozoides (y por ende el incremento de lisina disponible en la solución espermática) presentó mejores resultados en la cruce interespecífica *RxAm* la cual registró tasas de 7-37 % de fecundación cuando se usó la concentración espermática de 6.96×10^8 esp/mL, mientras que la cruce interespecífica *RxAz-G* presentó tasas de fecundación de 6-18 % cuando se usó la concentración de 1.2×10^8 esp/mL. Estos resultados sugieren que el incremento en la concentración de espermatozoides para llevar a cabo la fecundación *in vitro* de hembras de abulón rojo con machos de abulón amarillo, puede estar relacionado con una mayor cercanía filogenética de *H. rufescens* con *H. corrugata* que con *H. fulgens guadalupensis*. Galindo y colaboradores (2009) mencionan que el porcentaje de fecundación en diversos organismos está influenciado por la especificidad de especie de las proteínas reproductivas que presentan los gametos para promover la fecundación y evitar la poliespermia. Y a su vez, estas proteínas presentan un mayor grado de similitud en las secuencias de sus aminoácidos en especies con mayor cercanía filogenética (Swanson y Vacquier, 2002). En cruzas híbridas se ha observado mayor éxito en la fecundación entre especies que presentan mayor grado de similitud en las secuencias de la proteína espermática lisina (Vacquier *et al.*, 1999; Leighton, 2000). Galindo *et al.* (2009) reportan que la lisina del abulón rojo y la de amarillo presentan un 78 % de similitud en su secuencia de aminoácidos; mientras que, la lisina de abulón rojo y azul presentan el 65 % de similitud. Esto podría ser uno de los factores que expliquen por que se registró mayor tasa de fecundación interespecífica en la cruce *RxAm* que en la cruce *RxAz-G* con el aumento en la concentración espermática.

Por otro lado, el porcentaje de similitud en la proteína sp18 de abulón rojo y amarillo es del 31%, mientras que entre abulón rojo y azul es de 34% (Galindo *et al.*, 2009). La lisina es la proteína encargada en disolver la envoltura vitelina de los ovocitos y abrir el paso para que el espermatozoide alcance la membrana plasmática del ovocito, y una vez ahí el espermatozoide libera la proteína sp18, que es la que media la fusión de las membranas plasmáticas espermatozoide-ovocito (Vacquier *et al.*, 1999; Leighton, 2000). Los porcentajes de similitud entre las proteínas reproductivas del espermatozoide, podrían ser uno de los motivos por los cuales la cruce *RxAz-G* fue exitosa aunque con bajos porcentajes de fecundación cuando se manipuló la concentración de espermatozoide. Sin embargo, hay que considerar que los organismos de abulón azul utilizados en nuestro estudio pertenecen a una subespecie *H. fulgens guadalupensis*, que está bajo un proceso de especiación al ser poblaciones aisladas con distribución restringida a Isla de Guadalupe, por lo cual es posible que estas proteínas presenten secuencias con diferente similitud de la reportada en abulón azul subespecie continental.

4.5 Optimización de los protocolos de fecundación interespecífica en tres especies de abulón efecto de la edad del ovocito.

La edad del ovocito demostró ser otro factor relevante en el éxito de la fecundación de las cruces interespecíficas *RxAz-G* y *RxAz-G*, las cuales alcanzaron valores de 14-53 % y de 31-73 %, respectivamente. Leighton y Lewis (1982) mostraron el efecto de la edad de los ovocitos al registrar disminuciones en las tasas de fecundación en cuatro especies de abulones californianos cuando la edad de los ovocitos usados en cruces híbridas excedía los 10 min. Por otro lado, Lafarga-De la Cruz (2010) reportó una disminución del porcentaje de fecundación conforme aumenta la edad de los ovocitos en cruces híbridas recíprocas de las especies alopátricas *H. rufescens* y *H. discus hannai*. Cumplir con este requisito en cautiverio, es complicado ya que obtener una cantidad de ovocitos significativa en menos de diez minutos involucra un control preciso de la sincronía en los desoves de las hembras, además se tiene que tener en cuenta el tiempo que se necesita para lavar y dosificar los ovocitos antes de fecundarlos. No obstante, al evaluar las tasas de fecundación en las cruces interespecíficas se observaron los mayores porcentajes cuando los ovocitos presentaron 10 min de edad o menos. Leighton (2000) encontró que en la cruce híbrida de *H. rufescens* y *H. fulgens* el porcentaje de fecundación podría llegar a 50 % cuando se realizan fecundaciones en los primeros 10 min, no obstante si el tiempo es mayor los porcentajes comienzan a disminuir drásticamente. Nuestros resultados coinciden con los descritos por Leighton, al mostrar una disminución significativa en la cruce *RAz-G* cuando la edad de los ovocitos rebasaba los 15 min de edad, pasando a tener porcentajes menores al 15 %. En el caso de la cruce *RAm* el porcentaje de fecundación disminuyó a

menos del 30% cuando la edad de los ovocitos alcanzo los 15 minutos, posteriormente la fecundación se observó en un rango de 5 a 24 %. Por otra parte, las cruzas puras también se vieron afectadas con el aumento en la edad de los ovocitos, al registrarse en algunos tratamientos con tasas de fecundación por debajo de 80 % cuando la edad de los ovocitos excedía los 25 min. Es importante remarcar que no todos los tratamientos que excedieron esta edad se vieron afectados de la misma manera.

Ahmed y colaboradores (2008) reportaron que el proceso de envejecimiento de los ovocitos puede afectar inclusive las cruzas conespecíficas en el abulón japonés *H. gigantea*, donde las tasas de fecundación pueden disminuir hasta 0.3% a los 5 min después de que los ovocitos han sido expulsados. Lafarga-De la Cruz y colaboradores (2013), mencionan que el tiempo es un factor crítico para evitar el proceso de bloqueo de los ovocitos. Stephano y colaboradores (1992) encontró que el bloqueo de los ovocitos es dado por el cambio en el potencial de membrana, este mecanismo de defensa se ha descrito en abulón y en otras especies de invertebrados para evitar la poliespermia, también se ha detectado que después de cierto tiempo los ovocitos se bloquean al cambiar el potencial de membrana de negativo a positivo, disminuyendo así el porcentaje de fecundación en cruzas conespecíficas. En estos eventos el éxito en la fecundación de las diferentes cruzas fue diferente al éxito logrado cuando se manipuló la concentración de esperma. La edad del ovocito mostró una influencia significativa en el incremento del éxito en la craza *RAz-G*, la cual llevo a registrar valores similares a los obtenidos en algunas cruzas puras, por otra parte la craza híbrida también mostró un incremento en las tasas de fecundación no obstante este fue menor.

Las tasas de fecundación obtenidas en las evaluaciones del efecto de la concentración de esperma y edad del ovocito de las dos cruzas híbridas (*RAm* y *RAz-G*) fueron mayores a los reportados por Leighton y Lewis (1982) y Leighton (2000), en donde mencionan que la craza *RxA_m* presenta porcentajes de fecundación que van de 4 a 24 %, mientras que la craza híbrida *RxA_z* varía de 10 a 25 %. A pesar de esta ganancia las tasas de fecundación de las cruzas híbridas se mantuvieron bajas comparadas con los porcentajes que registraron las cruzas control.

Otro factor que se ha sugerido que influye en el éxito en la fecundación y que resultan determinantes en la formación de cigotos y el desarrollo embrionario de la progenie híbridas de abulón es la cercanía filogenética y la similitud en el cariotipo. La baja viabilidad de progenie híbrida podría relacionarse con barreras postcigóticas como el número de cromosomas o la incompatibilidad genética (Mayer 1968 citado por Lafarga-De la Cruz *et al.*, 2013). En un estudio de cariotipos realizado por Gallardo-Escárate *et al.* (2005) sobre las especies *H. corrugata*, *H. rufescens* y *H. fulgens* presentan un número diploide (2n) de 36 cromosomas. Además, se muestra que existen diferencias morfológicas entre los cromosomas de estas

especies, la relación de longitudes de los brazos cromosómicos mostró que *H. rufescens* posee un cariotipo de 8M+9SM+1ST, *H. fulgens* posee 8M+8SM+2ST y *H. corrugata* posee 10M+7SM+1ST.

4.6 Desempeño de las progenies híbridas durante el desarrollo embrionario y el cultivo larval

Uno de los principales factores que regulan el desarrollo embrionario y larval en abulones es la temperatura (Leighton, 2000). La temperatura puede prolongar o acortar el periodo de gestación e influir en las tasas de eclosión de los organismos, la temperatura óptima durante el desarrollo embrionario y larval de abulón rojo se ha registrado entre 14-16 °C, para abulón amarillo de 20-22 °C y para abulón azul en 22-24 °C (Maeda-Martínez, 1995). Con estas temperaturas se espera que las larvas de abulones eclosionen después de 18 h post fecundación y que se encuentren competentes en seis o siete días posteriores a la eclosión (Leighton, 2000). Las temperaturas usadas durante el periodo de desarrollo embrionario de las cruzas *RxAm* fue de 15 a 16 °C, ideal para el desarrollo de abulón rojo y 4 °C menos que la ideal para abulón amarillo, mientras que la crusa *RxAz-G* se cultivo a 17°C, un °C por encima de la Temperatura reportada por Maeda-Martínez, 1995 como óptima para abulón rojo y 5 °C por debajo que la que se requiere para abulón azul. La eclosión de las larvas *RR* ocurrió 18 h posterior a la fertilización, registros similares fueron reportados por Lafarga-De la Cruz (2010). En las cruzas interespecíficas se registró un retraso de cinco horas para la crusa *RxAm* y de una hora y media para la crusa *RxAz-G*. Leighton (2000) y Grubert y Ritar (2004) han mostrado que la variación en las temperaturas de cultivo puede acelerar o retrasar el momento en que las larvas eclosionan o se vuelven competentes y asociaron los estadios alcanzados a una temperatura efectiva acumulada necesaria para que larvas de *H. laevigata* y *H. rubra*, pudieran alcanzarlos. Mientras que Leighton (2000) observó que la crusa híbrida de abulón rojo y abulón azul presenta un retardo de hasta 10 h en la eclosión comparada con ambas especies parentales, pero posterior a la eclosión las diferentes estructuras se desarrollan en periodos muy similares.

En general, la eclosión se vio más afectada en las cruzas *RxAm*, ya que el valor más alto registrado fue de 45 %, no obstante ,la mediana se mantuvo por debajo del 25 %. Por otro lado, en las cruzas *RxAz-G* la tasa de eclosión alcanzó valores de hasta 86% con medianas superiores a 28 %. Algo interesante fue que la mayor cantidad de ovocitos fecundados en la crusa *RxAm*, que no eclosionaron detuvieron su desarrollo en primera y segunda división, y no presentaban divisiones irregulares; mientras que en la crusa *RxAz-G* y en todos los controles evaluados los ovocitos que no eclosionaron presentaron división irregular evidenciadas en un desarrollo a normal. Posiblemente una causa de esto es la diferencia en la forma de los cromosomas que existe entre las especies, ya que *H. corrugata* es la especie de abulón con mayor

variación en la forma de los cromosomas con respecto al abulón rojo presentando cuatro pares de cromosomas con morfología distinta, a diferencia del abulón azul el cual solo difiere del rojo en dos pares de cromosomas. Gallardo-Escárte y colaboradores (2005) mencionan que las diferencias observadas en los cariotipos de estas especies indican posible existencia de un mecanismo de aislamiento reproductivo postcigótico entre estas dos especies.

Las tasas de eclosión registradas durante los eventos experimentales demostró una notable mejora para el híbrido *RAz-G*, dado que inclusive llegó a alcanzar rangos registrados en cruza puras (86 %). Desafortunadamente, al no tener la cruce control de abulón azul y a la falta de pruebas con las temperaturas óptimas de cada una de las especies parentales, no podemos determinar si existe vigor híbrido en este caso. Aún así, el hecho de que esta cruce haya presentado una fecundación moderada, una tasa de eclosión y de supervivencia buena lo postulan como una cruce híbrida con alto potencial de desarrollo para la acuicultura. Adicionalmente, Leighton (2000) mencionó que la progenie híbrida entre abulón rojo y azul, puede ampliar su rango de tolerancia térmica, agregando una característica deseable en cualquier cultivo comercial que es la ampliación del intervalo de tolerancia térmica (You, et al., 2015).

Por otro lado, las tasas de deformación no mostraron estar ligadas a un efecto del método de extracción de esperma, al tiempo de exposición o al aumento en la concentración de esperma, dado que los resultados fueron muy variables y estuvieron presentes en todos los desoves de las cruza conespecíficas donde el esperma se obtuvo por desove natural. Grubert *et al.* (2005) mencionó que un factor que puede influir en la obtención de larvas híbridas de abulón además de la concentración de esperma, es el tiempo de contacto esperma y ovocito, debido a que este aumenta la probabilidad de que se presente "poliespermia". El tiempo de contacto esperma/ovocito utilizado en este trabajo rebasó los 30 minutos en gran parte de los tratamientos, mostrando resultados aceptables, a pesar de exponer los ovocitos a concentraciones altas de esperma durante todo este tiempo (de 10 a 50 veces la concentración recomendada), presentando porcentajes de deformidad solo en las progenies puras y siendo en casi todos los casos menor a 20 %. Por otra parte, la cruce *RxAz-G* solo presentó larvas deformes (< 3%) en el tratamiento con los porcentajes más altos de fecundación y eclosión.

El crecimiento registrado durante el desarrollo larval fue diferente en todas las progenies evaluadas. La progenie *RAm* mostró un mayor tamaño alcanzado al final del cultivo larvario con 234 μm con respecto a la progenie control *RR* que presentó un tamaño promedio de 227 μm . Por otro lado, la progenie *RAz-G* mostró un tamaño menor que el de su control *RR* para el sexto día de cultivo larval con tamaños de 243 y 271 μm , respectivamente. Es posible que las tallas alcanzadas se deban a un efecto combinado de la

temperatura a la cual estuvieron expuestos y al aporte paterno en la descendencia. Leighton et al., 1974 registró que de las tres especies en cuestión los que presentan un crecimiento más acelerado en estadios tempranos es el abulón amarillo y rojo, y el que presenta la menor tasa de crecimiento es el abulón azul (Leighton, 2000; Badillo *et al.*, 2007). El bajo crecimiento de la craza que involucró al abulón azul pudo verse afectada por la diferencia de temperatura entre la usada en el cultivo y la registrada como su rango óptimo. Por otra parte, las diferencias en la talla final alcanzada en las progenies *RR* (227 vs 271.5 μm) y entre los híbridos *RAm* y *RAz-G* (234 vs 243 μm) en estos dos eventos pueden estar relacionadas con las temperaturas de cultivo (15°C vs 17°C), el tamaño inicial de los ovocitos y probablemente con las características de lotes de hembras usadas.

Las descendencias híbridas *RAm* tuvo mayor mortalidad durante el cultivo larvario, quizá uno de los factores que pudo influir fue que se utilizaron ovocitos con tamaños más variados dado que se colectaron ovocitos de 100 μm hasta 150 μm en este desove, por otro lado en la craza *RAz-G* solo se usaron ovocitos mayores a 150 μm . Leighton (1974) y Huchette et al (2004) sugieren que la supervivencia de las larvas depende en gran medida de la cantidad de reservas que tengan en el ovocito, por lo cual la supervivencia en estadios larvarios es posible que este determinada por el tamaño que presentan los ovocitos. Se han realizado diferentes estudios en los cuales se ha analizado la influencia del tamaño de los ovocitos y su composición en el desarrollo larvario de abulón y en la supervivencia, en estos estudios se sugiere que la composición bioquímica de los ovocitos puede tener más influencia que el tamaño (Fukazawa et al., 2005; Fukazawa et al., 2007).

Se ha registro que *H. fulgens* puede tardar hasta 12 días en alcanzar el estadio de larva competente cuando se cultiva a 18°C (Maeda-Martínez, 1995; Leighton, 1974), sin embargo, en nuestro caso el híbrido *RAz-G* tardó solo 6 días en alcanzar el estadio de larva competente en esta temperatura, teniendo retardo de unas horas más que la craza pura usada como control. Esto pudo haber sido ocasionado por el aporte materno, ya que el abulón rojo presenta un desarrollo óptimo a 16°C, lo cual explica el hecho de que durante la evaluación de esta craza las larvas hayan alcanzado el estadio de larva competente en 6 días a 18°C.

4.7 Desempeño de las progenies híbridas durante la etapa postlarval y juvenil

Existen diversos factores que influyen en el crecimiento y en la supervivencia de las postlarvas y juveniles de abulón, los más sobresalientes son la densidad y condiciones de cultivo, la cantidad del alimento, la temperatura y la diversidad genética de los organismos (Leighton, 2000; Badillo et al., 2007; You et al.,

2009; Gorrostieta-Hurtado et al., 2009; Saucedo et al., 2011). En este trabajo el crecimiento y la supervivencia se asociaron con la influencia de la temperatura de cultivo y la diversidad genética que presentan las descendencias híbridas.

Las tasas de crecimiento de las descendencias obtenidas en este estudio mostraron variaciones relacionadas con la temperatura, el tipo de cruce y con las especies usadas como reproductores. La descendencia que presentó una mayor tasa de crecimiento fue la cruce *RAm* con 50 $\mu\text{m}/\text{día}$ (cultivada a 17 °C), seguida de la cruce control con 33-37 $\mu\text{m}/\text{día}$ (cultivadas a 17 y 18 °C) y por último la cruce *RAz-G* en la cual se registró una tasa de crecimiento de 15.9 $\mu\text{m}/\text{día}$ (cultivada a 18 °C). Leighton (1974) encontró que la mejor temperatura de crecimiento del abulón rojo es de 18 °C, mientras que las de los abulones amarillos y azules son de 18-21 °C y de 20-23 °C, por lo cual es posible que la obtención de tasas de crecimiento mayores de la descendencia *RAm* se debe a la cercanía de su temperatura óptima, con la temperatura a la cual fue cultivadas. Por otro lado, el pobre crecimiento del híbrido *RAz-G* pudo estar influenciado por la baja temperatura del cultivo de este híbrido con respecto a la temperatura óptima para abulón azul, ya que Leighton (2000) menciona que cuando el abulón azul es expuesto a una temperatura menor que su óptima puede reducir su tasa de crecimiento hasta 50%, lo cual podría ser una posible explicación del desempeño de la cruce *RAz-G*. Por otro lado, el abulón rojo comparado con las otras especies usadas en este trabajo es la especie que se ha reportado con mayor tasa de crecimiento, no obstante la progenie *RAm* superó con casi 70 % el crecimiento de la cruce pura. Lafarga-De la Cruz (2010) menciona que el efecto del crecimiento está ligado al aporte materno, no obstante en este caso el crecimiento de la descendencia *RAz-G*, se vio limitado por el aporte paterno, lo que sugiere que el desempeño puede estar influenciado por un efecto acumulativo de la heterocigocidad de los alelos en combinación con el ambiente (Shapira et al., 2014).

La obtención de una ganancia en el desempeño de los abulones híbridos evaluados, permite confirmar la hipótesis de que la descendencia híbrida puede mostrar vigor híbrido en crecimiento en la cruce *RAm* y en supervivencia en las cruces *RAm* y *RAz-G*. Leighton y Lewis (1982) y Leighton (2000), al evaluar estas cruces (en el caso del azul, la evaluación fue con las especies *H. fulgens fulgens*) encontraron que la cruce *RAm* presenta una tasa de crecimiento mayor que el abulón rojo, lo cual coincide con los resultados encontrados en este trabajo.

A pesar de que los abulones rojos provenían de dos granjas diferentes, ambas ubicadas en Eréndira, la tasa de crecimiento registrada en este estudio fue muy similar para las dos cruces puras evaluadas, registrando por un lado tasas de 33 ± 7 y por otro 37 ± 4 , en algunas evaluaciones de la descendencia de organismos

que pertenecen a la misma especie pero que provienen de diferentes poblaciones se ha demostrado que la procedencia de los abulones puede influir en el desempeño de estos en condiciones de cultivo (You et al., 2009) en este estudio no se observaron diferencias en el desempeño asociadas a la procedencia en términos de crecimiento y supervivencia.

También Leighton (2000) menciona que la supervivencia de las cruzas híbridas *RAm* y *RAz-G*, es mayor que las cruzas puras de los progenitores a partir de la fijación hasta después de alcanzar el estadio juvenil. En este trabajo se observó un decrecimiento en la supervivencia de más del 95 % en todas las cruzas evaluadas durante los primeros 30 días de cultivo posterior a la fijación. Estos datos coinciden con lo reportado por Leighton (1974), el observó una mortalidad mayor al 90 % durante el estadio de postlarva. Posterior a este estadio la mortalidad disminuye y la supervivencia aumenta y puede llegar a ser mayor al 90 % (Leighton, 1974). Durante el cultivo de postlarva y juveniles de abulón realizado en este estudio se observó una pérdida total de la descendencia pura de abulón rojo, lo cual se asoció al estrés causado por el sistema de cultivo, no obstante, bajo las mismas condiciones los híbridos pudieron presentar una mayor supervivencia, lo cual coincide con lo reportado por Leighton y Lewis (1982) en descendencias híbridas similares. Chen (2010) menciona que en cruzas entre poblaciones diferentes se espera que incremente la heterocigocidad, reduce el efecto de genes recesivos letales y mejora la línea resultando en heterosis.

Saucedo et al., (2011) observó la influencia del alimento en la supervivencia, no obstante, al ser alimentadas todas las postlarvas y juveniles con *Navicula inserta* en la misma cantidad, se asumió que toda la descendencia contaba con el mismo aporte nutricional, por lo que las diferencias en la supervivencia se debían solo al tipo de craza. Por último, la densidad larval manejada durante los experimentos fue menor a 1 org/cm² la cual es menor a densidades usadas con abulones amarillos y rojos en donde se observaron un buen desempeño de los organismos en términos de crecimiento y supervivencia (Badillo et al, 2007).

Capítulo 5. Conclusiones

- Fue posible obtener abulones amarillos silvestres acondicionados con un IVG > 2 mediante la exposición de los organismos a un incremento paulatino en la temperatura, pasando de 16.2 a 18.5 °C en un periodo de cinco meses, alcanzar una TEA de 2400 °C·día al finalizar este tiempo. Este es el primer reporte de maduración de abulón amarillo en condiciones de laboratorio.
- El análisis histológico del tejido congelado es una técnica útil para evaluar y asignar estadios de madures en abulón usando complejos hepatogonadales congelado, ya que las células conserván algunos rasgos característicos de los diferentes estadios de madurez.
- La biopsia del tejido gonadal en abulones mostró ser un buen método para obtener gametos viables en machos y en hembras con altos porcentajes de fecundación y con la generación de larvas normales, sin embargo es necesario exponer a las hembras a un estímulo previo a una solución inductora dado que los ovocitos necesitan activarse antes de poder ser fecundados.
- Fue posible realizar fecundación interespecífica *in vitro* utilizando esperma de machos obtenido por biopsia del tejido gonadal.
- Las condiciones óptimas de fecundación para la obtención de híbridos entre hembras de abulón rojo y machos de abulón amarillo incluyeron ovocitos de 12 min de edad, concentraciones espermáticas del orden de 1.1×10^8 esp/mL y una relación mínima de 25000:1 esperma/ovocito para la cruce *RxA_m* registrando tasas máximas de fecundación del 53% para esta cruce,
- Las condiciones óptimas de fecundación para la cruce de hembras de abulón rojo y machos de abulón azul de Isla Guadalupe son de una concentración de esperma de 1.2×10^8 esp/mL, con una relación mínima de 6500 esperma/ovocito y tiempo menor a los 11 minutos de edad del ovocito dando tasas de fecundación de hasta 73%.
- Las tasas de fecundación, fijación y supervivencia mostraron una mayor viabilidad de la progenie híbrida *RAz-G* comparado con la progenie *RA_m*. Mientras que, en términos de crecimiento la talla final promedio y la tasa de crecimiento mensual fue superior en el híbrido *RA_m*.

- Con la generación de progenies híbridas fue posible aumentar la eficiencia productiva en términos de crecimiento y supervivencia en el caso de la cruce *RAm* y supervivencia en el caso de la cruce *RAz-G* en condiciones de cultivo. Los híbridos *RAm* presentaron heterosis en crecimiento y los híbridos *RAz-G* presentaron heterosis en rendimiento con respecto a la especie parentales.
- En términos de crecimiento, los híbridos *RAm* evidenciaron un efecto paterno alcanzando una tasa máxima de crecimiento mensual mayor a la presentada en abulón rojo (1.5 y 0.99 $\mu\text{m}/\text{día}$, respectivamente).
- Los híbridos *RAm* y *RAz-G* presentaron mayor resistencia a las condiciones de cultivo a las cuales fueron expuestos mostrando supervivencia superior que las progenies puras de abulón rojo.

Recomendaciones

Evaluar el incremento de la gónada de organismos expuestos a rangos térmicos que vayan de 18 a 24 °C para probar si es posible reducir el tiempo de maduración de abulónes amarillos.

Evaluar la cantidad de ciclos reproductivos que un abulón amarillo puede tener en un año y la calidad de los gametos de estos organismos.

Realizar evaluaciones de TEA en todas las especies de abulón de baja california, dado que es uno de los pasos iniciales para poder generar lotes de reproductores y controlar sus ciclos reproductivos.

Probar métodos de fijación de tejido gonadal posterior a la congelación, ya que posiblemente de esta manera los tejidos puedan presentar un mayor grado de conservación de las características que presentaban en el momento del congelamiento y los cristales no afecten tanto la estructura celular.

Evaluar en las especies de Baja California la expresión génica durante los desoves, para poder conocer los péptidos que más influyen en los desoves, si estos coinciden en las diferentes especies de abulón y determinar la concentración necesaria para que los organismos desoven de manera natural, pudiendo así desarrollar metodologías que permitan la sincronía de los desoves y el incremento del éxito en la fecundación de las cruas híbridas de abulón.

Evaluar las cruas puras de todas las especies utilizadas en este estudio y las que habitan en la península de Baja California y determinar las tasas de fecundación, eclosión y supervivencia en condiciones de cultivo comercial.

Evaluar el desarrollo embrionario, larval y de estadios tempranos de cruas híbridas recíprocas de abulónes de Baja California para observar si estas cruas presentan vigor híbrido en algún rasgo de interés acuícola como crecimiento, supervivencia, resistencia a enfermedades o a cambios ambientales.

Evaluar el efecto del tamaño del ovocito en la supervivencia de las cruas híbridas.

Generar marcadores moleculares que permitan identificar el aporte genético de cada especie parental y certificar la semilla

• Literatura citada

- Abass, N. Y., Elwakil, H. E., Hemeida, A. A., Abdelsalam, N. R., Ye, Z., Su, B., Alsaqufi, A.S., Weng, C., Trudeau, V. L., and Dunham, R. A. (2016). Genotype–environment interactions for survival at low and sub-zero temperatures at varying salinity for channel catfish, hybrid catfish and transgenic channel catfish. *Aquaculture*, 458, 140-148. Recuperado de <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.02.031>
- Ahmed, F., Koike, Y., Strüssmann, C. A., Yamasaki, I., Yokota, M., and Watanabe, S. (2008). Genetic characterization and gonad development of artificially produced interspecific hybrids of the abalones, *Haliotis discus discus* Reeve, *Haliotis gigantea* Gmelin and *Haliotis madaka* Habe. *Aquaculture Research*, 39(5), 532-541. DOI:10.1111/j.1365-2109.2008.01911.x
- Allen, B. E., Anderson, M. L., Mee, J. A., Coombs, M., and Rogers, S. M. (2016). Role of genetic background in the introgressive hybridization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with Westslope cutthroat trout (*O. clarkii lewisi*). *Conservation Genetics*, 17(3), 521-531. DOI:10.1007/s10592-015-0801-6
- Allsopp, M., Lafarga-De la Cruz, F., Flores-Aquilar, F., and Watts, E. (2011). Abalone Culture In: Recent advances and new species in aquaculture. R.K. Fortedar and B.F. Phillips (eds) Blackwell Publishing Ltd., Oxford. pp. 231-236. DOI: 10.1002/9781444341775.ch8
- Alvarado-Álvarez, R., Gould, M. C., and Stephano, J. L. (1996). Spawning, in vitro maturation, and changes in oocyte electrophysiology induced by serotonin in *Tivela stultorum*. *The Biological Bulletin*, 190(3), 322-328. Disponible en: <http://www.journals.uchicago.edu/doi/citedby/10.2307/1543024>
- Ault, J. S. (1985). Some quantitative aspects of reproduction and growth of the red abalone, *Haliotis rufescens* Swainson. *Journal of the World Mariculture Society*, 16(1-4), 398-425. DOI:10.1111/j.1749-7345.1985.tb00221.x
- Badillo, L., Segovia, M., and Searcy-Bernal, R. (2007). Effect of two stocking densities on the growth and mortality of the pink abalone *Haliotis corrugata* in recirculating and flow-through systems. *Journal of Shellfish Research*, 26(3), 801-807. [http://dx.doi.org/10.2983/0730-8000\(2007\)26\[801:EOTSDO\]2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.2983/0730-8000(2007)26[801:EOTSDO]2.0.CO;2)
- Baker, M. C., and Tyler, P. A. (2001). Fertilization success in the commercial gastropod *Haliotis tuberculata*. *Marine Ecology Progress Series*, 211, 205-213. DOI:10.3354/meps211205
- Baranski, M., Rourke, M., Loughnan, S., Hayes, B., Austin, C., and Robinson, N. (2008). Detection of QTL for growth rate in the blacklip abalone (*Haliotis rubra* Leach) using selective DNA pooling. *Animal genetics*, 39(6), 606-614. DOI:10.1111/j.1365-2052.2008.01773.x
- Bartley, D. M., K. Rana and A. J. Immink. (2001). The use of inter-specific hybrids in aquaculture and fisheries. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 10: 325-337. DOI:10.1023/A:1016691725361
- Basto-Cuevas, A.M. (2009). Identificación del sexo y del desarrollo gonadal en abulón rojo *Haliotis rufescens*, en cautiverio. Tesis de maestría en ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California, México. 22-56

- Booolootian, R. A., Farmanfarmaian, A., and Giese, A. C. (1962). On the reproductive cycle and breeding habits of two western species of *Haliotis*. *The Biological Bulletin*, 122(2), 183-193. DOI: 10.2307/1539587
- Brown, L.D. and Murray, N.D., (1992). Population genetics, gene flow, and stock structure in *Haliotis rubra* and *Haliotis laevigata*. En: Abalone of the World Biology, Fisheries and Culture. Fishing News Books, Cambridge, pp. 24-33.
- Botwright N, Colgrave M, Cook M, and Elliott N (2014) Prevention and Control of Maturation to Address Multiple Key Abalone Production Constraints, pp. 1–37. Disponible en: <http://www.seafoodcra.com/abalone/molluscs/abalone/2010-767-prevention-and-control-of-maturation-to-address-multiple-key-abalone-production-constraints.html>
- Burke, C. M., Harris, J. O., Hindrum, S. M., Edwards, S. J., and Maguire, G. B. (2001). Environmental requirements of abalone. *FRDC Project*, (97/323School). pp10-32
- Capinpin, E.C., Encena, V.C. and Bayona, N.C., (1998). Studies on the reproductive biology of the Donkey's ear abalone, *Haliotis asinina* Linne. *Aquaculture* 166, 141-150. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00275-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00275-0)
- Chen, Z. J. (2010). Molecular mechanisms of polyploidy and hybrid vigor. *Trends Plant Sci.* 15: 57–71. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2009.12.003>
- Chen, N., Luo, X., Gu, Y., Han, G., Dong, Y., You, W., and Ke, C. (2016). Assessment of the thermal tolerance of abalone based on cardiac performance in *Haliotis discus hannai*, *H. gigantea* and their interspecific hybrid. *Aquaculture*, 465, 258-264. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.09.004>
- Conroy, R. M. (2012). What hypotheses do "nonparametric" two-group tests actually test?. *Stata Journal*, 12(2), 182. Disponible en: <https://www.econ.uzh.ch/dam/jcr:00000000-5766-84b0-ffff-ffffa80635e1/sj12-2.pdf#page=22>.
- Cook P. A. (2014). The Worldwide Abalone Industry. *Modern Economy*. 5, 1181-1186. DOI: 10.4236/me.2014.513110
- Culley, T. M., and Hardiman, N. A. (2009). The role of intraspecific hybridization in the evolution of invasiveness: a case study of the ornamental pear tree *Pyrus calleryana*. *Biological Invasions*, 11(5), 1107-1119. DOI: 10.1007/s10530-008-9386-z
- Dang, V. T., Speck, P., Doroudi, M., Smith, B., and Benkendorff, K. (2011). Variation in the antiviral and antibacterial activity of abalone *Haliotis laevigata*, *H. rubra* and their hybrid in South Australia. *Aquaculture*, 315(3), 242-249. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.03.005>
- Daume, S. (2003). Improvement and evaluation of greenlip abalone hatchery and nursery production. *Final FRDC Report–Project*, 203. Disponible en: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.231.8043&rep=rep1&type=pdf>
- De-Vicose, G. C., Viera, M. P., Bilbao, A., and Izquierdo, M. S. (2007). Embryonic and larval development of *Haliotis tuberculata coccinea* Reeve: an indexed micro-photographic sequence. *Journal of Shellfish*

Research, 26(3), 847-854. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.2983/0730-8000\(2007\)26\[847:EALDOH\]2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.2983/0730-8000(2007)26[847:EALDOH]2.0.CO;2)

- Difford, G. F., Vlok, A. C., Rhode, C., and Brink, D. (2017). Heritability of growth traits in South African Abalone (*Haliotis midae* L.) using the 'internal reference' method. *Aquaculture*, 468, 451-457. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.10.042>
- Díaz F., Re A. D., Medina Z, Re G., Valdez G., and Valenzuela F. (2006) Thermal preference and tolerance of green abalone *Haliotis fulgens* (Philippi, 1845) and pink abalone *Haliotis corrugata* (Gray, 1828). *Aquaculture Research* 37: 877–884. DOI:10.1111/j.1365-2109.2006.01506.x
- Dinno, A. (2014). dunn. test: Dunn's test of multiple comparisons using rank sums. *R package version, 1(0)*. Disponible en: <https://cran.r-project.org/web/packages/dunn.test/dunn.test.pdf>
- Dunstan, G. A., Elliott, N. G., Appleyard, S. A., Holmes, B. H., Conod, N., Grubert, M. A., and Cozens, M. A. (2007). Culture of triploid greenlip abalone (*Haliotis laevis* Donovan) to market size: commercial implications. *Aquaculture*, 271(1), 130-141. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.06.023>
- Ebert, E. E., and Hamilton, R. M. (1983). Ova fertility relative to temperature and to the time of gamete mixing in the red abalone, *Haliotis rufescens*. *California Fish and Game*, 69(2), 115-120. https://scholar.google.com.mx/scholar?q=Ova+fertility+relative+to+temperature+and+to+the+time+of+gamete+mixing+in+the+red+abalone%2C+Haliotis+rufescens.+&btnG=&hl=es&as_sdt=0%2C5
- Elliott, N. G. 2000. Genetic improvement programmes in abalone: What is the future? *Aquaculture Research* 31:51 - 59. DOI:10.1046/j.1365-2109.2000.00386.x
- Encena. C., Capinpin, E. C., and Bayona, N. C. (1998). Optimal sperm concentration and time for fertilization of the tropical abalone, *Haliotis asinina* Linne 1758. *Aquaculture*, 165(3), 347-352. Disponible en https://cibnor.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1001/161/1/velasco_h.pdf
- FAO. 20016a. Global aquaculture production. Disponible en: <http://www.Fao.Org/fishery/statistics/global-aquaculture-production/query/en>
- FAO. 20016b. Global capture production. Disponible en: <http://www.Fao.Org/fishery/statistics/global-capture-production/query/en>
- Freeman Kylie A. (2001). Aquaculture and related biological attributes of abalone species in Australia. A Review. *Fisheries Western Australia* 128. Disponible en <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=XF2015028620>
- Freeman, K., Daume, S., Rowe, M., Parsons, S., Lambert, R., and Maguire, G. B. (2006). Effects of season, temperature control, broodstock conditioning period and handling on incidence of controlled and uncontrolled spawning of greenlip abalone (*Haliotis laevis* Donovan) in Western Australia. *Journal of Shellfish Research*, 25(1), 187-194. doi: [http://dx.doi.org/10.2983/0730-8000\(2006\)25\[187:EOSTCB\]2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.2983/0730-8000(2006)25[187:EOSTCB]2.0.CO;2)

- Fukazawa, H., Takami, H., Kawamura, T., & Watanabe, Y. (2005). The effect of egg quality on larval period and postlarval survival of an abalone *Haliotis discus hannai*. *Journal of Shellfish Research*, 24(4), 1141-1147. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.2983/0730-8000\(2005\)24\[1141:TEOEQQ\]2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.2983/0730-8000(2005)24[1141:TEOEQQ]2.0.CO;2)
- Fukazawa, H., Kawamura, T., Takami, H., & Watanabe, Y. (2007). Oogenesis and relevant changes in egg quality of abalone *Haliotis discus hannai* during a single spawning season. *Aquaculture*, 270(1), 265-275. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.03.015>
- Galindo, B. E. and Vacquier. V. D. (2009). Mecanismo molecular de la fecundación en el abulón. En Paniagua-Michel, J. J., *Biocología Marina*. AGT Editor., S. A, México.227-261.
- Gallardo-Escarate, C., Alvarez-Borrego, J., Rio-Portilla, M. A. D., von Brand-Skopnik, E., Cross, I., Merlo, A., and Rebordinos, L. (2005). Karyotype analysis and chromosomal localization by FISH of ribosomal DNA, telomeric (TTAGGG) n and (GATA) n repeats in *Haliotis fulgens* and *H. corrugata* (Archeogastropoda: Haliotidae). *Journal of Shellfish Research*, 24(4), 1153-1159. [http://dx.doi.org/10.2983/0730-8000\(2005\)24\[1153:KAACLB\]2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.2983/0730-8000(2005)24[1153:KAACLB]2.0.CO;2)
- Gaviño-De la Torre, G., Juárez L. C. y Figueroa T. H., (1972). *Técnicas Biológicas Selectas de Laboratorio y de Campo/Gonzalo Gaviño de la Torre*. Ed. Limusa. pp185-186
- Geiger, D.L. and Owen, B. (2012). Abalone: world-wide Haliotidae. *ConchBooks*. pp52-53
- Gjedrem, T., Robinson, N., and Rye, M. (2012). The importance of selective breeding in aquaculture to meet future demands for animal protein: a review. *Aquaculture*, 350, 117-129. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.04.008>
- Gjedrem, T., and Rye, M. (2016). Selection response in fish and shellfish: a review. *Reviews in Aquaculture*. DOI:10.1111/raq.12154
- González, R., Lohrmann, K. B., Pizarro, J., and Brokordt, K. (2014). Differential susceptibility to the Withering Syndrome agent and renal coccidia in juvenile *Haliotis rufescens*, *Haliotis discus hannai* and the interspecific hybrid. *Journal of invertebrate pathology*, 116, 13-17. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2013.12.002>
- Gorrostieta-Hurtado, E., Searcy-Bernal, R., Anguiano-Beltrán, C., García-Esquivel, Z., & Valenzuela-Espinoza, E. (2009). Efecto de la oscuridad sobre el desarrollo postlarval inicial del abulón *Haliotis corrugata* alimentado con diferentes densidades de diatomeas. *Ciencias marinas*, 35(1), 113-122. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-38802009000100009
- Grubert, M. A. and Ritar, A. J. (2004). Temperature effects on the dynamics of gonad and oocyte development in captive wild-caught blacklip (*Haliotis rubra*) and greenlip (*H. laevigata*) abalone. *Invertebrate Reproduction and Development* 45:185-196. <http://dx.doi.org/10.1080/07924259.2004.9652590>
- Gruenthal, K. M., and Burton, R. S. (2005). Genetic diversity and species identification in the endangered white abalone (*Haliotis sorenseni*). *Conservation Genetics*, 6(6), 929-939. DOI:10.1007/s10592-005-9079-4

- Gutierrez-Gonzalez, J. L., Cruz, P., Del Rio-Portilla, M. A., and Perez-Enriquez, R. (2007). Genetic structure of green abalone *Haliotis fulgens* population off Baja California, Mexico. *Journal of Shellfish Research*, 26(3), 839-846. [http://dx.doi.org/10.2983/0730-8000\(2007\)26\[839:GSOGAH\]2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.2983/0730-8000(2007)26[839:GSOGAH]2.0.CO;2)
- Hahn, K. O. (1989). Handbook of culture of abalone and other marine gastropods. *Handbook of culture of abalone and other marine gastropods* <http://193.190.8.15/dpm/handle/0/3487>
- Hamilton, M. G., Kube, P. D., Elliott, N. G., McPherson, L. J., & Krsinich, A. (2009). Development of a breeding strategy for hybrid abalone. In *18th Conference of the Association for the Advancement of Animal Breeding and Genetics Conference*. Barossa Valley, South Australia (pp. 350-353). Disponible en: <http://www.aaabg.org/proceedings18/files/hamilton350.pdf>
- Harris J. O., Maguire B., Edwards S. J., and Hindrum S. M., (2001). Effect of ph on two australian abalone species. *Environmental requirements of abalone*. En Burke, C. M., Harris, J. O., Hindrum, S. M., Edwards, S. J., & Maguire, G. B. (2001). Environmental requirements of abalone. *FRDC Project*, (97/323School). pp10-32. Disponible en: http://www.imas.utas.edu.au/data/assets/pdf_file/0007/743065/Environmental-Requirements-of-Abalone.pdf
- Harris, L., Lambkin, H., and O'Byrne-Ring, N. (2006). Characterisation of cell types in abalone (*Haliotis* spp.) tissues using immunohistochemical techniques. *Aquaculture*, 261(4), 1413-1421. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.09.021>
- Hart, A. M., Strain, L. W., Fabris, F., Brown, J., and Davidson, M. (2013). Stock enhancement in Greenlip Abalone part I: Long-term growth and survival. *Reviews in Fisheries Science*, 21(3-4), 299-309. <http://dx.doi.org/10.1080/10641262.2013.812503>
- Hayes, B., Baranski, M., Goddard, M. E., and Robinson, N. (2007). Optimisation of marker assisted selection for abalone breeding programs. *Aquaculture*, 265(1), 61-69. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.02.016>
- Hindrum, S. M., Burke, C. M., Edwards, S. J., and Johns, D. R. (2000). Growth reductions in greenlip (*Haliotis laevis*) and blacklip (*Haliotis rubra*) abalone resulting from chronic exposure to sublethal combinations of elevated ammonia and low dissolved oxygen levels. In *Fourth International Abalone Symposium: Biology, Culture, Fisheries* (p. 29).
- Hooper, C., Day, R., Slocombe, R., Benkendorff, K., Handler, J., and Goulias, J. (2014). Effects of severe heat stress on immune function, biochemistry and histopathology in farmed Australian abalone (hybrid *Haliotis laevis* × *Haliotis rubra*). *Aquaculture*, 432, 26-37. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.03.032>
- Huchette, S. M. H., Souldard, J. P., Koh, C. S., & Day, R. W. (2004). Maternal variability in the blacklip abalone, *Haliotis rubra* Leach (Mollusca: Gastropoda): effect of egg size on fertilisation success. *Aquaculture*, 231(1), 181-195. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.08.027>
- Humason, G. L. (1962). Animal tissue techniques. *Animal tissue techniques*. 33-67. Disponible en: <https://archive.org/details/animaltissuetech00huma>

- Hulata, G. (2001). Genetic manipulations in aquaculture: a review of stock improvement by classical and modern technologies. *Genetica*, vol. 111, no 1-3, p. 155-173. DOI:10.1023/A:1013776931796
- Ibarra, A. M., N. K. Hernández-Ibarra, P. Cruz, R. Pérez-Enríquez, S. Ávila and J. L. Ramírez (2005). Genetic certification of presumed hybrids of blue x red abalone (*Haliotis fulgens* Philippi and *H. rufescens* Swainson). *Aquaculture Research* 36:1356 – 1368. DOI:10.1111/j.1365-2109.2005.01353.x
- Jee, Y.J. and Chang, Y.J. (1995). Induction of triploid abalone, *Haliotis discus hannai*, and its biological characteristics. I. Induction of triploid abalone. *Journal of Aquaculture*, 8: 159-170. http://www.koreascience.or.kr/article/ArticleFullRecord.jsp?cn=GSHHBD_1995_v8n3_159
- Kanwisher, J. (1959). Histology and metabolism of frozen intertidal animals. *The Biological Bulletin*, 116(2), 258-264. Disponible en: <http://www.journals.uchicago.edu/doi/abs/10.2307/1539211?journalCode=bbl>
- Kabir, N. M. J. (2001). Environmental, chemical and hormonal regulation of reproduction in two commercially important New Zealand abalone, *Haliotis iris* and *H. australis*. Unpublished PhD thesis. University of Otago, Dunedin, New Zealand. 236 pp.
- Kijima, A., Li, Q., and Park, C. (2002). Development of genetics and breeding in abalone culture. *Fisheries science*, 68(sup1), 730-733. Disponible en: http://doi.org/10.2331/fishsci.68.sup1_730
- Kikuchi, S. and N. Uki. 1974. Technical study on artificial spawning of abalone, genus *Haliotis* III. Reasonable sperm density for fertilization. *Bull. Tohoku Reg Fish Res Lab* 34:67-71. Disponible en: <http://ci.nii.ac.jp/ncid/AN00167637>
- Koike Y., Sun Z. & Takashima F. (1988) On the feeding and growth of juvenile hybrid abalones. *Suisanzoshoku* 36, 231–235 (in Japanese). Disponible en: <http://doi.org/10.11233/aquaculturesci1953.36.231>
- Kong, L., Song, S., and Li, Q. (2016). The effect of interstrain hybridization on the production performance in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Aquaculture*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.07.018>
- Kube, P. D., Appleyard, S. A., and Elliott, N. G. (2007). Selective breeding greenlip abalone (*Haliotis laevigata*): preliminary results and issues. *Journal of Shellfish Research*, 26(3), 821-824. doi: [http://dx.doi.org/10.2983/0730-8000\(2007\)26\[821:SBGAHL\]2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.2983/0730-8000(2007)26[821:SBGAHL]2.0.CO;2)
- Lafarga De la Cruz, F. (2010). Producción y caracterización de híbridos interespecíficos de abalón rojo (*Haliotis rufescens*) and abalón Japonés (*H. discus hannai*). Tesis Doctoral. Universidad de Chile. Universidad Católica de Valparaíso. 13-82.
- Lafarga de la Cruz, F., and Gallardo-Escárate, C. (2011). Intraspecies and interspecies hybrids in *Haliotis*: natural and experimental evidence and its impact on abalone aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 3(2), 74-99. DOI:10.1111/j.1753-5131.2011.01045.x
- Lafarga-De la Cruz F., Núñez-Acuña, and G Gallardo-Escárate, C. (2013). Hybridization between *Haliotis rufescens* and *Haliotis discus hannai*: evaluation of fertilization, larval development, growth and

thermal tolerance. *Aquaculture Research*, 44(8), 1206-1220. DOI:10.1111/j.1365-2109.2012.03121.x

Leighton, D. L. (1974). The influence of temperature on larval and juvenile growth in three species of southern California abalones. *Fish. Bull*, 72(4), 1137-1145. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/David_Leighton/publication/237590928_The_influence_of_temperature_on_larval_and_juvenile_growth_in_three_species_of_Southern_California_abalones/links/5556d45008ae6fd2d8237448.pdf

Leighton, D., L. (2000). The biology and culture of the California abalones. *Dorrance Publishing Co., Inc.*

Leighton, D. L. and Lewis, C. A. (1982). Experimental hybridization in abalone. *International Journal of Invertebrate Biology* 5:273 - 282. <http://dx.doi.org/10.1080/01651269.1982.10553479>

Leighton, P. (2008). Abalone Hatchery Manual. *Aquaculture Technical Section, Aquaculture Development Division. Co. Dublin, Ireland, 95.* Disponible en: http://www.bim.ie/media/bim/content/publications/bimno_25_Abalone_Hatchery_Manual_2008.pdf.

Lindberg, D., R. (1992). Evolution, distribution and systematics of haliotidae. En: S. S, M. Tegner & S. Guzmán del Prío, editors. *Abalone of the world: Biology, fisheries and culture: London: Blackwells Scientific Publishers.* pp. 3-18. Disponible en: <http://www.wiley.com/WileyCDA/WileyTitle/productCd-0852381816.html>

Liang, S., Luo, X., You, W., Luo, L., and Ke, C. (2014). The role of hybridization in improving the immune response and thermal tolerance of abalone. *Fish & shellfish immunology*, 39(1), 69-77 <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2014.04.014>

Liggia, B. (2016). WMSDB. Worldwide Mollusc Species Data Base. Disponible en: <http://www.bagniliggia.it/WMSD/HtmSpecies/5018000068.htm>

Liu, Y., Xu, T., Robinson, N., Qin, J., and Li, X. (2014). Cryopreservation of sperm in farmed Australian greenlip abalone *Haliotis laevigata*. *Cryobiology*, 68(2), 185-193. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2014.01.002>

Liu, Z. J. and Cordes. J. F. (2004). DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture* 238:1–37. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.05.027>

Luo, X., Ke, C., You, W., Wang, D., and Chen, F. (2010). Molecular identification of interspecific hybrids between *Haliotis discus hannai* Ino and *Haliotis gigantea* Gmelin using amplified fragment-length polymorphism and microsatellite markers. *Aquaculture Research* 41: 1827–1834. doi:10.1111/j.1365-2109.2010.02568.x

Luo, X., Ke, C., and You, W. (2013). Estimates of correlations for shell morphological traits on body weight of interspecific hybrid abalone (*Haliotis discus hannai* and *Haliotis gigantea*). *Journal of Shellfish Research*, 32(1), 115-118. <http://dx.doi.org/10.2983/035.032.0117>

Maeda-Martínez, A. (1995). Desarrollo científico y tecnológico del cultivo del abulón. *Secretaría de Pesca. Dirección General de Acuicultura.* <http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=SUV.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=000776>

- Mangiafico, S. S. 2015. An R companion for the handbook of biological statistics. Recurso online. Disponible en: http://rcompanion.org/rcompanion/d_06.html
- Matsutani, T., and Nomura, T. (1987). In vitro effects of serotonin and prostaglandins on release of eggs from the ovary of the scallop, *Patinopecten yessoensis*. *General and comparative endocrinology*, 67(1), 111-118. [http://dx.doi.org/10.1016/0016-6480\(87\)90210-3](http://dx.doi.org/10.1016/0016-6480(87)90210-3)
- Martínez, G., Olivares, A. Z., and Mettifogo, L. (2000). In vitro effects of monoamines and prostaglandins on meiosis reinitiation and oocyte release in *Argopecten purpuratus* Lamarck. *Invertebrate Reproduction & Development*, 38(1), 61-69. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1080/07924259.2000.9652437>
- Martínez- Guzmán, G. (2007). Control de la reproducción y producción de semillas de bivalvos en sistemas controlados, *in*: Lovatelli, A. et al. (Ed.) *Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura. factores que afectan su sustentabilidad en América Latina. Taller Técnico Regional de la FAO, 20-24 de agosto de 2007, Puerto Montt, Chile. FAO Actas de Pesca y Acuicultura*, 12: pp. 267-275. Disponible en: www.fao.org/3/a-i0444s/i0444s22.pdf
- McBride, S. C. (1998). Current status of abalone aquaculture in the Californias. *J. Shellfish Res* 17:593–600. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20001804122>
- McCormick, T. (2000). Abalone (*Haliotis* spp.) aquaculture: present status and a stock enhancement tool. *Canadian special publication of fisheries and aquatic sciences*, 55-60. DOI: 10.1139/978066018292642841
- McDonald, J. H. (2009). *Handbook of biological statistics* (Vol. 2, pp. 173-181). Baltimore, MD: Sparky House Publishing. Disponible en: <http://udel.edu/~mcdonald/HandbookBioStat.pdf>
- Mendoza-Porras, O., Botwright, N. A., McWilliam, S. M., Cook, M. T., Harris, J. O., Wijffels, G., & Colgrave, M. L. (2014). Exploiting genomic data to identify proteins involved in abalone reproduction. *Journal of proteomics*, 108, 337-353. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.06.001>
- Mendoza-Porras, O., Botwright, N. A., Reverter, A., Cook, M. T., Harris, J. O., Wijffels, G., and Colgrave, M. L. (2016). Identification of differentially expressed reproductive and metabolic proteins in the female abalone (*Haliotis laevigata*) gonad following artificial induction of spawning. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbd.2016.04.005>
- Michalek, K., Ventura, A., and Sanders, T. (2016). *Mytilus* hybridisation and impact on aquaculture: A minireview. *Marine genomics*, 27, 3-7. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.margen.2016.04.008>
- Morse, D. E., Duncan, H., Hooker, N., and Morse, A. (1977). Hydrogen peroxide induces spawning in mollusks, with activation of prostaglandin endoperoxide synthetase. *Science*, 196(4287), 298-300. DOI: 10.1126/science.403609

- Morash, A. J., and Alter, K. (2015). Effects of environmental and farm stress on abalone physiology: perspectives for abalone aquaculture in the face of global climate change. *Reviews in Aquaculture*. DOI: 10.1111/raq.12097
- Moss, G. A., Illingworth, J., and Tong, L. J. (1995). Comparing two simple methods to induce spawning in the New Zealand abalone (paua), *Haliotis iris*. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1080/00288330.1995.9516667>
- Moss G. A. (1998). Effect of temperature on the breeding cycle and spawning success of the New Zealand abalone, *Haliotis australis*, *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 32:1, 139-146, DOI: 10.1080/00288330.1998.9516813
- Najmudeen, T. M., and Victor, A. C. C. (2004). Seed production and juvenile rearing of the tropical abalone *Haliotis varia* Linnaeus 1758. *Aquaculture*, 234(1), 277-292. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.12.013>
- Najmudeen, T. M. (2007). Variation in biochemical composition during gonad maturation of the tropical abalone *Haliotis varia* Linnaeus 1758 (Vetigastropoda: Haliotidae). *Marine Biology Research*, 3(6), 454-461. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1080/17451000701696252>
- Neira, R. (2010). Breeding in aquaculture species: genetic improvement programs in developing countries. *In Proceedings of the 9th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production* (Vol. 8). Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/265313094>
- Nurrai, P., Engsusophon, A., Poomtong, T., Sretarugsa, P., Hanna, P., Sobhon, P., & Wanichanon, C. (2010). Stimulatory effects of egg-laying hormone and gonadotropin-releasing hormone on reproduction of the tropical abalone, *Haliotis asinina* Linnaeus. *Journal of shellfish Research*, 29(3), 627-635. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.2983/035.029.0311>
- Owen, B., McLean J. and R. Meyer (1971). Hybridization in the Eastern Pacific abalones (*Haliotis*). *Bulletin of the Los Angeles County Museum of Natural History Science* 9:1-37. https://books.google.com.mx/books/about/Hybridization_in_the_Eastern_Pacific_Aba.html?id=xUAJAQAAMAAJ&redir_esc=y.
- Obata, M., Shimizu, M., Sano, N., and Komaru, A. (2008). Maternal inheritance of mitochondrial DNA (mtDNA) in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*): a preliminary study using mtDNA sequence analysis with evidence of random distribution of MitoTracker-stained sperm mitochondria in fertilized eggs. *Zoological science*, 25(3), 248-254. doi: <http://dx.doi.org/10.2108/zsj.25.248>
- Pinder, L. C. V., Pottinger, T. G., Billingham, Z., & Depledge, M. H. (1999). *Endocrine function in aquatic invertebrates and evidence for disruption by environmental pollutants*. Environment Agency. Disponible en: <http://nora.nerc.ac.uk/7206/>
- Ren, P., Peng, W., You, W., Huang, Z., Guo, Q., Chen, N., and Ke, C. (2016). Genetic mapping and quantitative trait loci analysis of growth-related traits in the small abalone *Haliotis diversicolor* using restriction-site-associated DNA sequencing. *Aquaculture*, 454, 163-170. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.12.026>

- Ritar, A.J. (2004). The commercial control of spawning in temperate abalone. *Ab-brief, Fisheries Research and Development Corporation, West Deakin, ACT, Australia*, 7, 10. Disponible en: http://www.imas.utas.edu.au/_data/assets/pdf_file/0017/743210/Abalone-Aquaculture-Subprogram-The-Commerical-Control-of-Spawning-in-Temperate-Abalone-.pdf
- Rosen P. P., Lesser M. L., and Kinne D. W. (1985). Breast carcinoma at the extremes of age: a comparison of patients younger than 35 years and older than 75 years. *J Surg Oncol*. Feb;28(2):90–96. DOI: 10.1002/jso.2930280204
- Roux, A., Lambrechts, H., and Roodt-Wilding, R. (2014). Development of an experimental laboratory fertilization protocol for the South African abalone, *Haliotis midae* (Linnaeus 1758). *Invertebrate Reproduction & Development*, 58(1), 42-48. <http://dx.doi.org/10.1080/07924259.2013.802261>
- SAGARPA. (2003). Alternativas para Fortalecer la Cadena Productiva de la Pesquería de Abulón. Reporte Técnico. 215 p. <http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/work/sites/cona/resources/LocalContent/6129/3/AbulonCadenaProductivaVbn.pdf>
- SAGARPA. (2010). Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca. Sepesca. <http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/anuario2010>
- SAGARPA. (2013). Carta Nacional Acuícola. Disponible en: <http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:cX1MEGwyq3EJ:www.gob.mx/inapesca/acciones-y-programas/carta-nacional-acuicola+&cd=1&hl=es&ct=clnk&gl=mx&client=safari>
- SAGARPA. (2014). Anuario estadístico de acuicultura y Pesca. Sepesca. http://www.conapesca.gob.mx/wb/cona/anuario_2013.
- Salinas-Flores, L. (2003). Criopreservación de esperma del abulón rojo *Haliotis rufescens*. Tesis de Maestría (Acuicultura), CICESE, México. 12-24.
- Salinas-Flores, L., Paniagua-Chavez, C. G., Jenkins, J. A., and Tiersch, T. R. (2005). Cryopreservation of sperm of red abalone (*Haliotis rufescens*). *Journal of Shellfish Research*, 24(2), 415-420. DOI: [http://dx.doi.org/10.2983/0730-8000\(2005\)24\[415:COSORA\]2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.2983/0730-8000(2005)24[415:COSORA]2.0.CO;2)
- Saucedo, C. M. M. (2011). Crecimiento y supervivencia de poslarvas de abulón (*Haliotis rufescens*) alimentadas con dietas monoespecíficas de diatomeas bentónicas conservadas en frío. Tesis de Maestría. Centro de Investigaciones Científicas y de Educación Superior de Ensenada. pp 47-56 Disponible en: <https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1007/110/1/187231.pdf>
- Searcy-Bernal, R., Ramade-Villanueva, M. R., and Altamira, B. (2010). Current status of abalone fisheries and culture in Mexico. *Journal of Shellfish Research*, 29(3), 573-576. doi: <http://dx.doi.org/10.2983/035.029.0304>
- Searcy-Bernal, R., Anguiano B. C., Espinoza M. J A., and Carpizo I. E. (2013). Restocking of abalone populations (*Haliotis* spp.) in Mexico. *Journal of Shellfish Research*, 32(1): 189:195. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.2983/035.032.0125>
- SEPESCA, (2014). Carta Estatal Pesquera. Disponible en: <http://www.sepescabc.gob.mx/x/salaDePrensa/difusionAcciones/docs/CartaEstatalPesquera.pdf>

- SEPESCA (2015). Carta Estatal Acuicola. Disponible en: <http://www.sepescabc.gob.mx/x/salaDePrensa/difusionAcciones/docs/CartaEstatalAcuicola.pdf>
- Setyono, D. D. (2006). Induction spawning for the tropical abalone (*Haliotis asinina*) in the laboratory. *Indonesian Aquaculture Journal*, 1(1), 20-23 DOI: <http://dx.doi.org/10.15578/iaj.1.1.2006.17-27>
- Shapira, R., Levy, T., Shaked, S., Fridman, E., & David, L. (2014). Extensive heterosis in growth of yeast hybrids is explained by a combination of genetic models. *Heredity*, 113(4), 316-326. DOI:10.1038/hdy.2014.33
- Shepherd, S.A., Guzmán del Prío, S.A., Turrubiates, J., Belmar, J., Baker, J.L. and P.R., Sluczanowski. (1991). Growth, size at sexual maturity, and egg-per-recruit analysis of the abalone *Haliotis fulgens* in Baja California. *Veliger*, 34: 324-330. [http://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/40406912/GROWTH_SIZE_AT_SEXUAL_MATURETY_AND_EGG-PER-RECRUIT_ANALYSIS_OF_HALIOTIS_FULGENS .pdf](http://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/40406912/GROWTH_SIZE_AT_SEXUAL_MATURETY_AND_EGG-PER-RECRUIT_ANALYSIS_OF_HALIOTIS_FULGENS.pdf)
- Spencer, B. E. (2002). Molluscan shellfish farming. *John Wiley & Sons*. 185-203. Recuperado de: <https://books.google.com.mx/books?id=ooVvna2w9lOC&hl=es&num=100>
- Stephano, J. L. 1992. A study of polyspermy in abalone. Shepherd, S. A., M. J. Tegner, and S. A. Guzman del Prío, editors. *Abalone of the world*. Oxford, UK Blackwell. 518-526. Disponible en: <http://www.wiley.com/WileyCDA/WileyTitle/productCd-0852381816.html>
- Swanson, W. J., & Vacquier, V. D. (2002). The rapid evolution of reproductive proteins. *Nature Reviews Genetics*, 3(2), 137-144. DOI:10.1038/nrg733
- Troell, M., Robertson-Andersson, D., Anderson, R. J., Bolton, J. J., Maneveldt, G., Halling, C., and Probyn, T. (2006). Abalone farming in South Africa: an overview with perspectives on kelp resources, abalone feed, potential for on-farm seaweed production and socio-economic importance. *Aquaculture*, 257(1), 266-281. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.02.066>
- Tutschulte, T., and Connell, J. H. (1981). Reproductive-biology of 3 species of abalones (*Haliotis*) in southern-california. *Veliger*, 23(3), 195-206.
- Uki, N. and Kikuchi. S. (1984). Regulation of maturation and spawning of an abalone, *Haliotis* (Gastropoda) by external environmental factors. *Aquaculture* 39:247-261. [http://dx.doi.org/10.1016/0044-8486\(84\)90270-9](http://dx.doi.org/10.1016/0044-8486(84)90270-9)
- Vacquier, V. D., Carner, K. R., and Stout, C. D. (1990). Species-specific sequences of abalone lysin, the sperm protein that creates a hole in the egg envelope. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(15), 5792-5796. DOI: 10.1073/pnas.87.15.5792
- Vacquier, V. D., Swanson, W. J., and Lee, Y. H. (1997). Positive Darwinian selection on two homologous fertilization proteins: what is the selective pressure driving their divergence?. *Journal of Molecular Evolution*, 44(1), S15-S22. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a003813>
- Vacquier, V. D., Swanson, W. J., Metz, E. C., and Stout, C. D. (1999). Acrosomal proteins of abalone spermatozoa. *Advances in Developmental Biochemistry*, 5, 49-81. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S1064-2722\(08\)60016-X](https://doi.org/10.1016/S1064-2722(08)60016-X)

- Velasco, L. A. (2013). Esfuerzo reproductivo en moluscos: Una revisión. *Intropica*, 8, 87. Disponible en? <http://search.proquest.com/openview/5645cfbae029c77797564d23c616b332/1?pg-origsite=gscholar&cbl=2043248>
- Velasco-Echavarría, H. (2014). Marco ambiental y capacidad de recuperación ante estrés térmico del abulón azul (*Haliotis fulgens*, Philippi 1845) provenientes de la zona de Bahía Tortugas, BCS. Tesis de Maestría, Centro de Investigaciones Biológicas de Noreste, S. C. pp 29-30
- Vélez-Arellano, N. , F. A. García-Domínguez , D. B. Lluch-Cota , J. L. Gutiérrez-González and R. A. Sánchez-Cárdenas . (2015). Histological validation of morphochromatically-defined gonadal maturation stages of green abalone (*Haliotis fulgens*) Philippi, 1845 and pink abalone (*Haliotis corrugata*) Wood, 1828. *Int. J. Morphol.* 33:1054–1059. Disponible en: http://www.intjmorphol.com/wp-content/uploads/2015/10/art_39_333.pdf
- Velez-Arellano, N., Garcia-Dominguez, F. A., Lluch-Cota, D. B., Gutierrez-Gonzalez, J. L., Holguin-Quinones, O. E., and Ramirez-Rodriguez, M. (2016). Biochemical changes during the reproductive cycle of *Haliotis fulgens* (Philippi, 1845)(gastropoda: archaeogastropoda) on the Baja California Sur West Coast. *Journal of Shellfish Research*, 35(1), 199-206. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.2983/035.035.0121>
- Wood, A. D., and Buxton, C. D. (1996). Aspects of the biology of the abalone *Haliotis midae* (Linne, 1758) on the east coast of South Africa. 2. Reproduction. *South African Journal of Marine Science*, 17(1), 69-78. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.2989/025776196784158590>
- Yan, Z., and Chen, J. (2001). Seed breeding and culturing of triploid abalone *Haliotis diversicolor* aquatilis. *Shuichan xuebao*, 26(1), 54-60. Disponible en: http://www.scxuebao.cn/scxuebao/ch/reader/view_abstract.aspx?file_no=20020109
- York, P.S., Cummins, S.F., Degnan, S.M., Woodcroft, B.J. and Degnan, B.M. (2012) Marked changes in neuropeptide expression accompany broadcast spawning in the gastropod *Haliotis asinina*, *Frontiers in Zoology*, 9: 9 DOI: 10.1186/1742-9994-9-9
- You, W. W., Ke, C. H., Luo, X., & Wang, D. X. (2009). Growth and survival of three small abalone *Haliotis diversicolor* populations and their reciprocal crosses. *Aquaculture research*, 40(13), 1474-1480. DOI: 10.1111/j.1365-2109.2009.02247.x
- You, W., Guo, Q., Fan, F., Ren, P., Luo, X., and Ke, C. (2015). Experimental hybridization and genetic identification of Pacific abalone *Haliotis discus hannai* and green abalone *H. fulgens*. *Aquaculture*, 448, 243-249 Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.05.043>
- Young, J. S. and J. D. DeMartini. (1970). Reproductive cycle, gonadal histology and gametogenesis of the red abalone *Haliotis rufescens* (Swainson). *California Fish and Game* 56:298-309. Disponible en: https://archive.org/details/californiafishga56_4cali
- Zheng S. (2006). Preliminary study on hybridization between *Haliotis sieboldii* and *Haliotis discus hannai*. *Fujian Journal of Agricultural Sciences* 21: 296–298). Disponible en: http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTOTAL-FJNX200603027.htm

Anexos

Anexo A. Método de tinción de Hematoxilina-Eosina:

La hematoxilina es un colorante básico capaz de teñir los componentes ácidos de los tejidos, a los que da una coloración violeta. Tiñe intensamente los núcleos de las células, por los ácidos nucleicos.

La eosina es un colorante ácido, capaz de teñir el citoplasma. La mayor parte de la célula es teñida de color rosado o rojo.

Procedimiento de tinción:

Solución	Tiempo en minutos	Solución	Tiempo en minutos
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

A I. Técnica fijación y tinción de esperma

El esperma se conserva y tiñe para su conteo, agregando 1 gota de la solución de Lúgol-Eosina por cada mL de solución espermática. La solución de Lúgol-Eosina se preparó mezclando:

- H2O destilada	100 ml
- Yoduro de Potasio	1 g
- Eosina	1g

Todo se almacenó en frascos ámbar.

A II. Inclusión en parafina

Las muestras se deshidrataron y se completó la impregnación con benceno para disolver de la parafina. Para la inclusión se utilizó un histoquinete LEICA TP 1400 de la siguiente manera:

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. Benceno	2
5. Etanol-Benceno	3		

El tiempo total del proceso de inclusión es de 23 hrs.

Después del último baño en parafina, el tejido se colocó en moldes metálicos y cuando se habían solidificado los bloques con tejido se colocaron en una solución ablandadora por 24.

Solución ablandadora	
Glicerina	5 mL
Agua destilada	25 mL
Alcohol 95%	70 mL

Microtomía y montaje

Los cortes del CHG se realizaron con un microtomo modelo Spencer 820. Posteriormente se montaron en un portaobjetos y se adicionaron gotas de alcohol al 30% entre el tejido y el portaobjeto hasta que el tejido quedara parcialmente extendido. Por último el tejido se extendió completamente usando un baño de agua

a 46°C. Para terminar el montaje se agregó resina y se colocó el cubreobjetos. La resina utilizada fue Cytoseal 60.

Anexo B. Preparación de soluciones

El volumen de cada reactivo utilizado para preparar la solución Davidson's se obtuvo de Basto-Cuevas (2009).

Solución Davidson's

Para preparar un litro se necesitan mezclar:

Solución Davidson's conservante	900 mL
Ácido acético	100 mL

Para preparar un litro de solución Davidson's conservante:

Glicerina	111 mL
Formol	222 mL
Alcohol (95 %)	334 mL
Agua de mar filtrada	333 mL

Anexo C. Solución inductora

En cada desove se prepararon 15 L de solución inductora para poder estimular a los organismos.

La solución inductora se preparo de la siguiente manera:

TRIS (hidroximetil-amino-metano)	24g
H ₂ O ₂ 35% (Peróxido de hidrógeno)	15mL
Agua de mar filtrada por 1µm e irradiada con UV	15L

La cantidad de cada reactivo adicionado se obtuvo sacando las equivalencias de el método descrito por Morse et al., 1989 TRIS (hidroximetil-amino-metano) al 2M (242.3 gr/L) y H₂O₂ (peróxido de hidrógeno) al 6% v/v (20 mL de H₂O₂ al 30% + 80 mL de agua destilada). El TRIS fue adicionado en un volumen de 6.6 mL/L de agua de mar en la primer dosis, y 15 min después se adicionó el H₂O₂ en un volumen de 3 mL/L de agua de mar.

Anexo D. Obtención de gametos por biopsia

a. Disección de abulón

Para hacer una disección de abulones es necesario apoyarse de una espátula o algún cuchillo de aproximadamente 12 cm de largo (el tamaño puede variar dependiendo de la talla de los organismos) para poder separar el callo de la parte interna de la concha. Para poder observar los órganos y estructuras internas del abulón es necesario:

- introducir una espátula entre la concha y el manto, de manera firme y fuerte se debe hacer presión hacia el interior del organismo para separar el callo del pie de la concha.
- Hacer palanca con la espátula para separar el musculo de la concha.
- Desprender el resto del manto de la concha, tratando de no dañar el CHG, ya que éste solo está cubierto por una membrana delgada que se puede rasgar fácilmente.

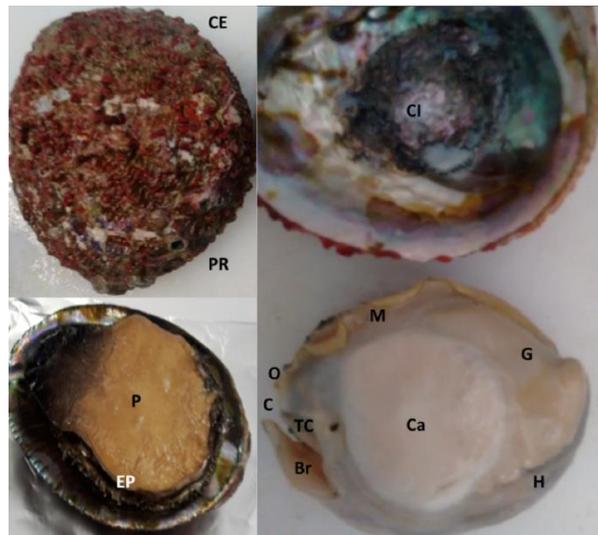


Figura 37. Vista externa e interna de la concha del abulón y vista de un organismo con concha y desconchado. Se puede observar la ubicación de los principales órganos internos y externos de un abulón amarillo (*Haliotis corrugata*). En la imagen se señala la ubicación de las branquias (Br), tejido gonadal (G), hepatopáncreas (H), callo (Ca), manto (M), cabeza (C), tentáculo cefálico (TC), ojos (O), pie (P), epipódios (EP); de igual forma se muestra la vista externa e interna de la concha (CE y CI, respectivamente) así como los poros respiratorios (PR).

b. Método de biopsia gonadal con un estímulo previo (probado solo en machos de abulón rojo, amarillo y azul):

Este método solo debe ser usado como último recurso en caso de que no exista una expulsión natural de gametos. Elegir organismos machos con un IVG de 2 a 3 y en el caso de hembras que estas hayan sido inducidos al desove con el método de peróxido de hidrógeno y shock térmico.

- Separar el músculo de la concha con una espátula como se describe anteriormente.
- Separar las vísceras del pie cortando con un bisturí todo el tejido que rodea el callo y extraer el CHG de la membrana que lo rodea.
- Con un bisturí hacer un corte longitudinal superficial sobre la membrana del cono, de manera que solo quede expuesto el tejido gonádico.
- Con el cono sumergido en un vaso de precipitado de 500 ml, lleno hasta la mitad con agua de mar filtrada e irradiada con luz UV, comenzar a raspar el tejido gonádico.
- Realizar lavados con una pisetas.
- Limpiar los espermatozoides verificar la viabilidad y contarlos antes de realizar las fecundaciones (repetir del paso 7 al 13 del proceso descrito anteriormente).

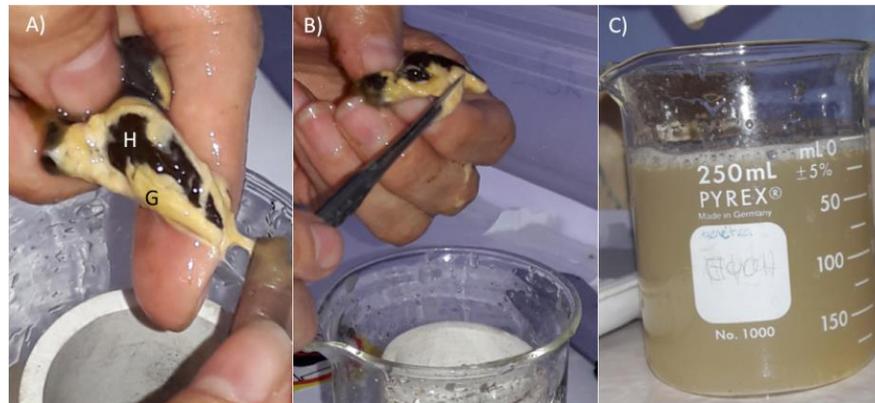


Figura 38. Biopsia del complejo hepatogonadal para la extracción de esperma viable A) cono de abulón rojo macho. B) colecta de esperma C) concentración de esperma.

Anexo E. Analisis de gónadas de abulón azul de Isla Guadalupe procesadas por inclusión en parafina

Los CHG de abulón azul que fueron fijados en solución Davidson's y procesados por inclusión en parafina mostraron tejidos con un alto grado de conservación de las células germinales. En total se observaron cuatro machos, cuatro hembras y cuatro organismos indiferenciados. En el caso de las hembras las cuatro presentaron signos de desove, caracterizadas por una ligera capa de tejido gonadal en la cual se observaron ovogonias, ovocitos maduros, ovocitos atrésicos y trabéculas desarregladas, los ovocitos maduros y atrésicos se encontraban más próximos al hepatopáncreas, mientras que las ovogonias se encontraron más próximas al epitelio exterior. En tres de los cuatro casos los machos mostraban una ligera capa de esperma, en donde se observaron espermatozoides desarreglados con gran cantidad de tejido circundante, los túbulos no se encontraron bien definidos y no se observaron espermatogonias. Además se observó un macho parcialmente maduro, el cual presentó paquetes de espermatozoides y túbulos definidos, en la parte apical de la gónada se observaron signos vestigiales del hepatopáncreas. Los organismos indeterminados se encontraron en un estado de desarrollo preproliferativo, estos presentaban delgadas capas de tejido gonadal con pequeñas células en el interior, no se pudo distinguir si las pequeñas células, en estos CHG's se observaron zonas ampliamente cubiertas con el hepatopáncreas.

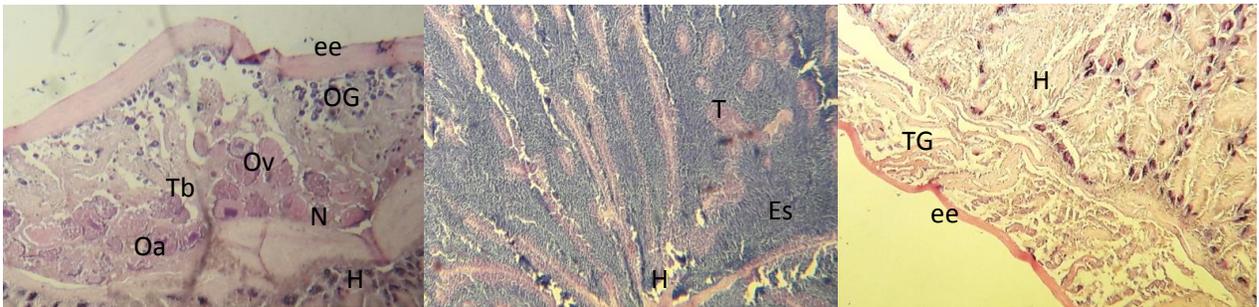


Figura 39. Características histología de la zona apical del CHG de *H. fulgens guadalupensis* en diferentes estadios de desarrollo. a) hembra desovada, b) macho maduro, c) indeterminados. Las letras muestran los lugares en donde se pueden observar algunas estructuras como: H) hepatopáncreas, Tb)Trabécula, OG)ovogonias, MG)membrana gonadal, ee)epitelio externo, Oa) ovocito atrésico, Ov) ovocito, Ec) espermatozoides, L) lumen, T) túbulos espermáticos, TG) tejido gonadal.

Anexo F. Tablas de datos de las diferentes cruzas realizadas

Tabla 5. Porcentajes de fecundación, eclosión, deformidad y supervivencia larval registrados en la prueba experimental de viabilidad de esperma extraído a través de biopsia del tejido gonadal. Las letras indican diferencias significativas.

Tratamiento	Tasa de Fecundación (%)		Tasa de Eclosión (%)		Tasa de Deformidad (%)	
	Mediana	Rango	Mediana	Rango	Mediana	Rango
CC	75	50-100 ^{ab}	96	78-100 ^a	25	20-30 ^b
T1	66.6	50-66 ^{ab}	94	61-100 ^a	30	22-45 ^{ab}
T2	50	50-60 ^b	80	75-88 ^a	38	33-47 ^a
T3	50	31-71 ^{ab}	88	71-100 ^a	12	11-15 ^c
T4	33	33-50 ^b	90	61-92 ^a	18	12-20 ^c
T5	85	66-100 ^a	63	54-85 ^a	33	30-43 ^{ab}
T6	75	66-80 ^a	72	52-91 ^a	23	15-37 ^{abc}

Tabla 6. Porcentajes supervivencia larval y tasa de rendimiento por tratamiento registrados en la prueba experimental de viabilidad de esperma extraído a través de biopsia del tejido gonadal.

Tratamiento	Tasa de Supervivencia (%)		Tasa de Rendimiento Final (%)	
	Media	Error estandar		
CC	15.71	± 5.98 ^a		7.7
T1	21.29	± 5.96 ^a		7.5
T2	17.84	± 5.82 ^a		5.3
T3	28.61	± 10.27 ^a		12.5
T4	16.72	± 8 ^a		4.7
T5	22.45	± 6.62 ^a		9.8
T6	15.09	± 6.74 ^a		5.7

Tabla 7. Porcentajes de fecundación y eclosión larval registrados en la prueba experimental de viabilidad de ovocitos extraído a través de biopsia del tejido gonadal en hembras de abulón. Los tratamientos con diferencias significativas ($P > 0.05$) se describen con una letra.

Tratamiento	Tasa de Fecundación (%)		Tasa de Eclosión (%)	
	Mediana	Rango	Mediana	Rango
Control	83	60-100 ^a	88	± 67-100 ^a
Método BCI	96	66-100 ^a	82	± 67-100 ^a
Método BSI	0	± 0-25 ^b	0	± 0 ^b

Tabla 8. Resumen de parámetros en las cruza *RxR* y *RxAm* realizadas durante la optimización de los protocolos de fecundación *in vitro*.

		Edad de ovocito minutos	Concentración de esperma	relación esp/ov Promedio ± E.E.	Tasa de Fecundación (%)		Estadio de desarrollo alcanzado
					Promedio	E.E.	
Primer desove							
1	<i>RxR</i>	60	--	--	41	± 8.6 ^a	Mórula
1	<i>RxAm</i>	60	--	--	11	± 2.0 ^b	Segunda división
Segundo desove					Mediana	Rango	
2	<i>C1-RxR</i>	10	1.56 x 10 ⁷	158.6 ± 40 ^a	80	± 74-87 ^b	Postlarva
2	<i>C2-RxR</i>	15	1.56 x 10 ⁷	63.1 ± 6.9 ^{b*}	66	± 50-76 ^c	Postlarva
2	<i>C3-RxR</i>	25	1.56 x 10 ⁷	268.1 ± 79.6 ^a	74	± 70-81 ^{bc}	Postlarva
2	<i>C4-RxR</i>	40	1.56 x 10 ⁷	149.7 ± 3.9 ^a	90	± 76-95 ^a	Postlarva
2	<i>T1-RxAm</i>	10	1.11x10 ⁸	857.8 ± 133.4 ^{c**}	20	± 14-53 ^{de}	Larva competente
2	<i>T2-RxAm</i>	15	1.11x10 ⁸	719.8 ± 25.6 ^{c**}	26	± 16-30 ^d	Larva competente
2	<i>T3-RxAm</i>	25	1.11x10 ⁸	458 ± 44 ^{d**}	16	± 8-24 ^e	Larva competente
2	<i>T4-RxAm</i>	40	1.11x10 ⁸	421.1 ± 11.7 ^{d**}	16	± 5-24 ^e	Larva competente
Tercer desove					Mediana	Rango	
3	<i>CC- RxR</i>	30	4.95 x 10 ⁶	497.92 ± 82.58 ^a	100	± 75-100	juvenil
3	<i>T1-RxAm</i>	30	3.9 x 10 ⁷	4,806.23 ± 9,420.22 ^c	0	± 0-28	juvenil
3	<i>T2-RxAm</i>	30	9.16 x 10 ⁷	11,869.06 ± 5,131.29 ^d	0	± 0-22	juvenil
3	<i>T3-RxAm</i>	30	6.96 x 10 ⁸	25,643.48 ± 3,725.22 ^e	22	± 7-37	juvenil

Tratamientos que presentaron diferencia significativas (*; $P < 0.05$) y diferencias altamente significativas (**; $P < 0.01$); con letra se describen las diferencias entre los tratamientos.

Tabla 9. Porcentajes de fecundación y eclosión registrados en la cruce experimental *RxAm* (segundo desove); C1 - C4 son las tratamientos control *RxR*, mientras que T1 – T4, son los tratamientos experimentales *RxAm*.

Tratamiento	Tasa de Fecundación (%)		Tasa de Eclosión (%)	
	Mediana	rango	Mediana	rango
C1	80	74-87 ^b	76	66-82 ^b
C2	66	50-76 ^c	89	81-98 ^a
C3	74	70-81 ^{bc}	71	63-84 ^b
C4	90	76-95 ^a	50	48-63 ^c
T1	20	14-53 ^{de}	25	17-35 ^d
T2	26	16-30 ^d	18	8-31 ^d
T3	16	8-24 ^e	19	0-24 ^d
T4	16	5-24 ^e	22	0-27 ^d

Las letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

Tabla 10. Porcentajes de fecundación, eclosión, deformidad y supervivencia larval registrados durante la evaluación de concentración de esperma en cruza *RxAm* (tercer desove); CC es el tratamiento control *RxR*, mientras que T1 – T3, son los tratamientos experimentales *RxAm*.

	Concentración de esperma	Tasa de Fecundación (%)		Tasa de Eclosión (%)		Tasa de Deformidad (%)	
		Mediana	Rango	Mediana	Rango	Mediana	Rango
CC- <i>RxR</i>	4.95 x 10 ⁶	100	75-100 ^a	86	64-100 ^a	11	0-20 ^a
T1- <i>RxAm</i>	3.9 x 10 ⁷	0	0-28 ^c	6	0-10 ^c	0	0 ^b
T2- <i>RxAm</i>	9.16 x 10 ⁷	0	0-22 ^c	3	0-11 ^c	0	0 ^b
T3- <i>RxAm</i>	6.96 x 10 ⁸	22	7-37 ^b	25	0-45 ^b	0	0 ^b

Las letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

Tabla 11. Resumen de parámetros en las cruza *RxR* y *RxAz-G* realizadas durante la evaluación de concentración de esperma para optimizar protocolos de fecundación *in vitro* (cuarto desove); C1 – C3 son las tratamientos control *RxR*, mientras que T1 – T3, son los tratamientos experimentales *RxAz-G*.

Cruza	Edad de ovocito (min)	[] de esperma esp/mL	relación esp/ov		Tasa de fecundación (%)		Estadio de desarrollo alcanzado
			Promedio	E E	Mediana	Rango	
C1	15	3.4x10 ⁶	204.42	± 10.92 ^b	71	64-78 ^b	Postlarva
C2	15	6.8x10 ⁶	612.89	± 57.32 ^c	89	80-93 ^a	Postlarva
C3	15	6.8x10 ⁷	4,713.83	± 698.81 ^d	90	85-100 ^a	Postlarva
T1	15	4.8x10 ⁶	162.23	± 32.27 ^b	4	3-11 ^c	Postlarva
T2	15	1.8x10 ⁷	1,792.69	± 511.97 ^e	7	5-18 ^c	Larva veliger
T3	15	1.2x10 ⁸	6,503.08	± 1,046.26 ^{ad}	11	6-18 ^c	Postlarva

Las letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

Tabla 12. Porcentajes de de eclosión y deformidad larval registrados en la primera prueba experimental de cruza *RxAz-G* (cuarto desove); C1 – C3 son las tratamientos control *RxR*, mientras que T1 – T3, son los tratamientos experimentales *RxAz-G*.

Cruza	Tasa de Eclosión		Tasa de Deformidad		Tasa de supervivencia (%)	Tasa de rendimiento final (%)
	Mediana (%)	Rango (%)	Mediana (%)	Rango (%)		
C1	69	63-92 ^b	17	5-43 ^a	60	9.0
C2	88	80-90 ^a	22	15-24 ^a	66	4.8
C3	85	80-88 ^a	30	20-40 ^a	19	1.0
T1	0	0-37 ^c	0	0 ^b	0	0.0
T2	18	0-28 ^c	0	0 ^b	0	0.0
T3	28	0-32 ^c	0	0 ^b	48	12.1

Las letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

Tabla 13. Resumen de las condiciones de las cruzas *RxR* y *RxAz-G* y los parámetros obtenidos de la prueba en donde se evaluó el efecto de la edad del ovocito para optimizar los protocolos de fecundación *in vitro* de la cruce *RxAz-G*; C1 – C3 son las tratamientos control *RxR*, mientras que T1 – T3, son los tratamientos experimentales *RxAz-G*.

Tratamiento	Edad de ovocito	Tas de Fecundación (%)		Tasa de Eclosión (%)		Tasa de Deformidad (%)		Estadio de desarrollo alcanzado
	(min)	Mediana	Rango	Mediana	Rango	Mediana	Rango	
C1	11	94	91-100 ^a	98	85-100 ^a	2	0-9 ^a	Larva veliger
C2	15	96	89-100 ^a	76	46-88 ^b	2	0-16 ^a	Larva veliger
C3	24	88	81-97 ^b	98	82-100 ^a	1	0.1-4 ^a	Larva veliger
T1	11	40	31-73 ^c	78	63-86 ^b	0.3	0-3 ^a	Larva veliger
T2	15	0	0-11 ^d	20	0-40 ^d	0	0 ^b	Larva veliger
T3	24	0	0-15 ^d	46	33-78 ^c	0	0 ^b	Larva veliger

Las letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

Tabla 14. Tasa de crecimiento diario de la progenie híbrida RAm y su control RR.

Día	R x R			R x Am		
	Promedio	E E		Promedio	E E	
	LC* (μm)			LC* (μm)		
1	149.07	±	1.80	149.48	±	2.02
2	158.58	±	1.84	157.20	±	2.65
3	175.88	±	1.62	175.88	±	1.68
4	195.78	±	1.74	196.19	±	1.74
5	209.19	±	2.25	217.72	±	1.56
6	227.06	±	1.52	234.78	±	2.37
TCD	15.59	±	1.85	17.06	±	2.45

*LC = longitud de concha

Tabla 15. Tasa de crecimiento diario de la progenie híbrida RAz-G y su control RR

Día	R x R			R x Az		
	Promedio	E E		Promedio	E E	
	LC (μm)			LC (μm)		
1	144.41	±	0.79	147.94	±	0.83
2	163.77	±	0.89	155.73	±	0.87
3	196.52	±	1.07	186.87	±	1.05
4	222.40	±	1.21	207.64	±	1.16
5	257.06	±	1.40	228.40	±	1.28
6	271.50	±	1.48	243.97	±	1.37
TCD	25.42	±	3.85	19.21	±	3.81