



# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

EFFECTO DE LA TEMPERATURA, SALINIDAD Y TIEMPO  
EN LA CAPACIDAD DE FERTILIZACION DE LOS GAMETOS DEL  
CARACOL MARINO Astraea undosa (MOLLUSCA: GASTEROPODA)



**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

**OCEANOLOGO**

PRESENTA

**JORGE EDUARDO CHULINI OLIVARES**

ENSENADA, B.C., MAYO DE 1990.

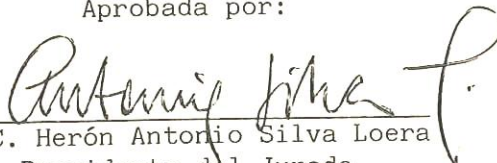
EFEECTO DE LA TEMPERATURA, SALINIDAD Y TIEMPO EN LA  
CAPACIDAD DE FERTILIZACION DE LOS GAMETOS DEL  
CARACOL MARINO Astraea undosa (MOLLUSCA: GASTEROPODA)

T E S I S

QUE PRESENTA:

JORGE EDUARDO CHULINI OLIVARES

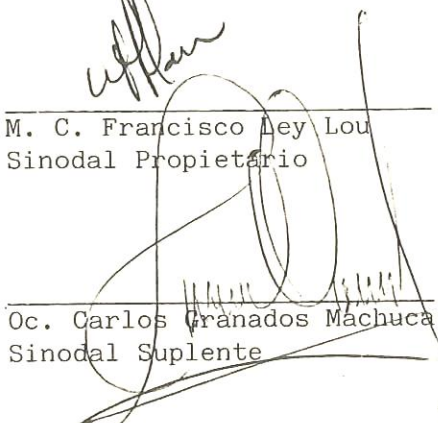
Aprobada por:



M. C. Herón Antonio Silva Loera  
Presidente del Jurado



M. C. Francisco Ley Lou  
Sinodal Propietario



Oc. Carlos Granados Machuca  
Sinodal Suplente



Oc. Arturo Siqueiros Valencia  
Sinodal Propietario



Oc. Eugenio Carpizo Ituarte  
Sinodal Suplente

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA  
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

EFEECTO DE LA TEMPERATURA, SALINIDAD Y TIEMPO  
EN LA CAPACIDAD DE FERTILIZACION DE LOS GAMETOS DEL  
CARACOL MARINO Astraea undosa (MOLLUSCA:GASTROPODA)

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO  
OCEANOLOGO  
PRESENTA  
JORGE EDUARDO CHULINI OLIVARES

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA

MAYO DE 1990

Este trabajo de tesis forma parte del proyecto de Investigación: "EVALUACION INTEGRAL DE LOS RECURSOS -- CON POTENCIAL ECONOMICO DE LA COSTA OESTE DE BAJA CALIFORNIA. EL CARACOL Astraea undosa (MOLLUSCA:GASTROPODA)". En la etapa de acuicultura del caracol Astraea undosa, que se desarrolla en la Facultad de Ciencias Marinas, con apoyo de la Universidad Autónoma de Baja California y la Secretaría de Educación Pública, convenio Número C 87-01-0136.

DEDICADA :

A mis padres :

Luciano Chulini y Mercedes Olivares

A mi abuela y segunda madre :

Julia Perez Vda. de Olivares

A mis Hermanas :

Martha Elena y Ericka Janette

A Geraldine Escobar Romero

## A G R A D E C I M I E N T O S

Al M.C. H. Antonio Silva Loera por la oportunidad que me dió de realizar este trabajo, así como también brindarme su amistad y confianza.

Al M.C. Francisco Ley Lou, a los Oceanólogos Arturo Siqueiros, Carlos Granados y Eugenio Carpizo por sus asesorías que facilitaron la labor de este trabajo.

A los maestros de la Facultad de Ciencias Marinas por darme los conocimientos que ahora tengo.

A Geraldine, la "Chapis", el "Depo", a Victor Zavala, al "Shaka", a Jose Carlos Martinez, que de alguna forma colaboraron en la realización de este trabajo.

A todos mis amigos y compañeros.

## RESUMEN

Se promovió la fertilización con gametos expulsados por el caracol Astraea undosa así como en gametos extraídos manualmente. La fertilización fué posible solamente con óvulos expulsados y espermatozoides extraídos indistintamente. Se utilizaron tres concentraciones distintas de hidróxido de amonio (0.5, 0.1 y 0.05 M) con diferente duración (30, 20 y 10 seg.) para disolver la capa vitelina del óvulo extraído, considerada como inhibidor del espermatozoides en el proceso de fertilización. Se observó que los óvulos pierden su capacidad de fertilización ya que estos se degeneran en aproximadamente 8 horas después de su expulsión. Los espermatozoides presentaron un tiempo de vida de 28 horas después de la expulsión. Se estableció la capacidad de fertilización de los gametos en laboratorio (20 ± 1 oC y salinidad de 35 ppm) en función del tiempo, siendo esta del 80% entre las 5 y 6 horas y menor del 50% después de las 8 horas de la expulsión de los gametos. El efecto de temperatura (16, 17.5, 20, 22.5, 25 oC) y tiempo posterior a la emisión de gametos (1:50', 3:50', 6:10', 8:50' y 11:20') sobre la capacidad de fertilización de estos, en tres salinidades distintas (25, 35 y 45 ppm), mostró que es significativamente afectada por la interacción de estos factores ( $P < 0.05$ ), la mayor influencia fué en temperaturas mayores de 22.5 oC y tiempo posterior de 5:00' horas.

## INDICE

INTRODUCCION.....	1
OBJETIVO.....	7
MATERIALES Y METODO.....	8
1)Descripción del area de colecta.....	8
2)Descripción del experimento.....	10
RESULTADOS.....	16
DISCUSIONES.....	26
CONCLUSIONES.....	32
RECOMENDACIONES.....	34
BIBLIOGRAFIA CITADA.....	35

## LISTA DE TABLAS

- TABLA I.- Resultados de la fertilización inducida con gametos expulsados y extraídos de Astraea undosa, en temperatura de 20 °C y salinidad de 35 ppm.....17
- TABLA II.- Resultados de pruebas utilizando diferentes concentraciones de hidróxido de amonio (0.5, 0.1 y 0.05 M) en óvulos extraídos manualmente de la gonada de Astraea undosa, mantenido durante 10,- 20 y 30 seg en cada concentración.....18
- TABLA III.- ANOVA multifactorial (no paramétrico) realizado con los porcentajes de fertilización del caracol Astraea undosa obtenidos en función de temperatura y tiempo de exposición en salinidades distintas.....25

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.- Localización del área de colecta de los organismos.....9
- Figura 2.- Diagrama de la mesa de gradientes con fuente de luz.....14
- Figura 3.- Efecto del tiempo sobre la capacidad de Fertilización de gametos expulsados en Astraea undosa, (20 1 oC y 35 ppm). Las barras verticales representan la desviación estandard del promedio de las mediciones.....19
- Figura 4.- Efecto combinado de temperatura y tiempo sobre la capacidad de fertilización de gametos de Astraea undosa expresado como porcentaje en salinidad de 25 ppm.....21
- Figura 5.- Efecto combinado de temperatura y tiempo sobre la capacidad de fertilización de gametos de Astraea undosa expresado como porcentaje en salinidad de 35 ppm.....22
- Figura 6.- Efecto combinado de temperatura y tiempo sobre la capacidad de fertilización de gametos de Astraea undosa expresado como porcentaje en salinidad de 45 ppm.....23

## INTRODUCCION

En la naturaleza algunos invertebrados marinos están expuestos a cambios ambientales como salinidad, temperatura oxígeno, pH y cantidad de alimento disponible, esto enmarca los límites de distribución de las especies. Sobre esto Kinne (1971) Brenko y Calabrese (1969) establecen que los estudios donde se emplean combinaciones de varios factores ambientales controlados, permiten un entendimiento más profundo de las relaciones sutiles entre el medio y el organismo.

De los factores ecológicos, la salinidad y temperatura son considerados como los más importantes (Brenko y Calabrese, 1969; Alderdice, 1972). Es ampliamente conocido que la temperatura es el factor que afecta con más intensidad los procesos biológicos y fisiológicos de los seres vivos (Bayne, 1965; Alderdice, 1972; Cadman y Weinstein, 1978). Sastry (1979), expone que el ciclo reproductivo de las especies (invertebrados) es controlado genéticamente en respuesta al medio ambiente, especialmente a la temperatura, salinidad, luz y concentración de alimento. De éstos factores la temperatura es considerada como la más importante.

Orton (1920), sugiere que algunos animales desovan cuando la temperatura excede el nivel crítico característico de la especie, mientras que otros lo hacen cuando hay un cambio particular en la temperatura ambiental.

De esta manera los factores exogénicos y endogénicos interactúan para promover la maduración de ovocitos y espermatoцитos maduros (Giese y Pearse, 1974; Vernberg, 1981). Bayne (1983) menciona que los factores ambientales que afectan el patrón normal del desarrollo y desove de los gametos podrían provocar una menor viabilidad.

En muchas especies el crecimiento de la gónada y la gametogénesis ocurren ya sea con el incremento de temperatura en primavera y verano, o con decremento de la misma en otoño (Sastry, 1975).

El ciclo gametogénico a sido subdividido en un número de estadios los cuales incluyen la activación de la gónada y diferenciación de gametos (gametogénesis), maduración de los gametos, desove y por último un período de reposo (Giese y Pearse, 1974; Vernberg, 1981).

La biología reproductiva de los prosobranquios es la más variada de todo el grupo de los moluscos. Esto está relacionado con su amplio rango de estructura y habitat. Los prosobranquios son los gasterópodos más primitivos y la mayoría son gonocorísticos, exhibiendo dos grados de organización, el diotocardiano (Astraea undosa) y monotocardiano (más avanzado). Cada uno tiene una gónada sencilla; el diotocardiano descarga sus

gametos por medio de la abertura del riñón derecho y la fertilización es externa. Mientras tanto, el monotocardiano descarga sus gametos por medio del grupo glandular paleal genital, el cual corre paralelo con el recto y la fertilización es interna (Fretter, 1984).

En muchas especies el crecimiento de la gónada y la gametogénesis ocurren ya sea con el incremento de temperatura en primavera y verano, o con decremento de la misma en otoño (Sastry, 1975).

La salinidad es un factor que también influye en la gametogénesis (Vernberg, 1981). Rao (1967) menciona que éste proceso no se inhibe en todas las especies a bajas salinidades, como por ejemplo en la almeja Donax cunneatus. Los ostiones no presentan gametos si la salinidad es menor de 6 ppm (Butler, 1949). En el ostión Cassostrea gigas la salinidad entre 23 y 28 ppm provee condiciones óptimas para la fertilización y desarrollo embrionario. Los intervalos de salinidad que permiten este desarrollo son más amplios en valores más bajos de temperatura (Fujiya, 1970), en el ostión Crassostrea virginica el tiempo requerido para la maduración de los gametos depende de la temperatura y salinidad a la que se mantengan. (Fujiya, 1970).

Los gasterópodos Eupleura caudata y Urosalpinx cinerea no expulsan los óvulos en salinidades menores o cercanas a 15 ppm (bajo condiciones de laboratorio). En 20 ppm Eupleura caudata expulsa algunos óvulos, mientras que Urosalpinx cinerea no expulsa ninguno en temperatura de 15 C, a esta misma salinidad. En salinidad de 26.5 ppm ambas especies producen óvulos maduros a las diferentes temperaturas de 15, 20, y 25 C (Manzi, 1970).

Kinne (1971) refiriendo el trabajo de Yamamoto (1951a), menciona que los ovocitos de la almeja Pecten yessoensis se colocaron in vitro y puestos a altas temperaturas para acelerar su madurez; está fué alcanzada mucho antes que los ovocitos de la población natural.

Los óvulos de los prosobranquios están cubiertos por una membrana vitelina la cual es la única cubierta en algunas especies con fertilización externa y puede ser delgada o escasamente visible. La membrana puede estar rodeada de una capa gelatinosa también derivada del ovocito, la cual se dilata en el agua y protege al embrión durante el inicio del desarrollo. Berg (1967), menciona que la manera más conveniente y productiva de disolver las cubiertas de los óvulos es por métodos químicos. Por lo tanto la presencia de una membrana secundaria es usualmente asociada con la fecundación externa (Kinne, 1971). Los

espermatozoides tienen una cabeza corta con nucleo ovoide y un acrosoma, la parte intermedia es corta con cuatro o cinco esferas mitocondriales y un largo flagelo.

En los óvulos y espermatozoides se han identificado -- las sustancias (fertilizina y antifertilizina) las cuales intervienen en la fertilización. La sustancia secretada por el óvulo activa el espermatozoide y promueve la atracción hacia la membrana.

La fertilización entre óvulos y espermatozoides esparcidos en el medio ambiente marino es casual, ya que un gran número de individuos, de ambos sexos, expulsan sus gametos en forma sincrónica.

La función reproductiva del adulto está limitada a la emisión de una gran cantidad de gametos y no a la protección especial del desarrollo embrionario.

Una alta concentración de gametos asegura el éxito del proceso casual de fertilización y la producción de un gran número de larvas. Lanon (1980) menciona que la fertilización de los gametos es mayor cuando éstos son desovados en su punto máximo de maduración. Si llega a suceder un desove antes o después ésta condición la capacidad de fertilización es menor.

En la búsqueda de las condiciones óptimas para el cultivo de moluscos en laboratorio se han llevado a cabo un

gran número de estudios multifactoriales para encontrar los puntos óptimos de maduración, expulsión de gametos, fertilización y cultivo de larvas.

Young (1941) trabajando con el mejillón Mytilus californianus en procesos de fertilización, encontró que está puede ser afectada por la salinidad en diluciones menores de 25 ppm. En tanto Bayne (1965) observó que en Mytilus edulis la fertilización ocurre en un rango de temperatura de 5-22 oC y salinidad de 15 - 40 ppm. Losanoff y Davis (1952) trabajando con el ostión Crassostrea virginica en procesos de gametogénesis, encontraron que el tiempo requerido para la maduración de los gametos depende de la temperatura a la que se encuentran. Ebert y Houk (1984) en pruebas de fertilización en el cultivo del abulón rojo Haliotis rufescens encontraron que el exceso de esperma no es determinante para el éxito de fertilización. Ebert y Hamilton (1983) en los ensayos sobre la capacidad de fertilización del abulón Haliotis rufescens utilizando cinco temperaturas diferentes (9, 12, 15, 18, y 21 oC) para comparar el tiempo de fertilidad de los gametos; sus resultados mostraron que a temperatura de 9 y 21 C la fertilidad es mínima y la temperatura óptima se encuentra en 15 oC. Asimismo las comparaciones sobre la pérdida de viabilidad

entre esperma y ovulo a la temperatura óptima revelaron que los espermatozoides pierden viabilidad mas rapido que el óvulo conforme pasa el tiempo.

El presente trabajo tiene como proposito contribuir al conocimiento en la capacidad de fertilización de los gametos del caracol Astraea undosa proporcionando información para posibles fines acuaculturales, tales como la obtención de semilla y cultivo del organismo.

#### OBJETIVO

Establecer el efecto de la salinidad y temperatura sobre la capacidad de fertilización de los gametos del caracol marino Astraea undosa en función del tiempo.

## MATERIALES Y METODO

### 1) Descripción del área de colecta.

La zona de colecta de los organismos se localiza en las islas de Todos Santos, B.C. ubicada dentro de la Bahía del mismo nombre (entre los  $31^{\circ} 43'$  y  $31^{\circ} 54'$  de latitud norte y entre los  $116^{\circ} 36'$  y  $116^{\circ} 49'$  de longitud oeste), ubicada al oeste del puerto de Ensenada ( $31^{\circ} 40' N$  y  $116^{\circ} 40' W$ )(fig.1).

Las islas Todos Santos constan aproximadamente de 3.5 km de superficie total, separadas entre sí por un canal, siendo este lugar donde se realizó la colecta de los organismos, en un área protegida del oleaje. Estos fueron extraídos (por medio de buceo autónomo) de una profundidad de 20 pies aproximadamente y temperatura de 16 oC.

Los caracoles se colocaron en recipientes termoaislados con agua de mar. Se transportaron al laboratorio de acuicultura de la Facultad de Ciencias Marinas, en donde fueron colocados en estanques de fibra de vidrio de 500 l de capacidad, con flujo continuo de 3 l/min. de agua de mar filtrada y con una temperatura de  $20 \pm 1$  oC. Como alimento se les proporcionó macroalgas del género Macrocystis sp.

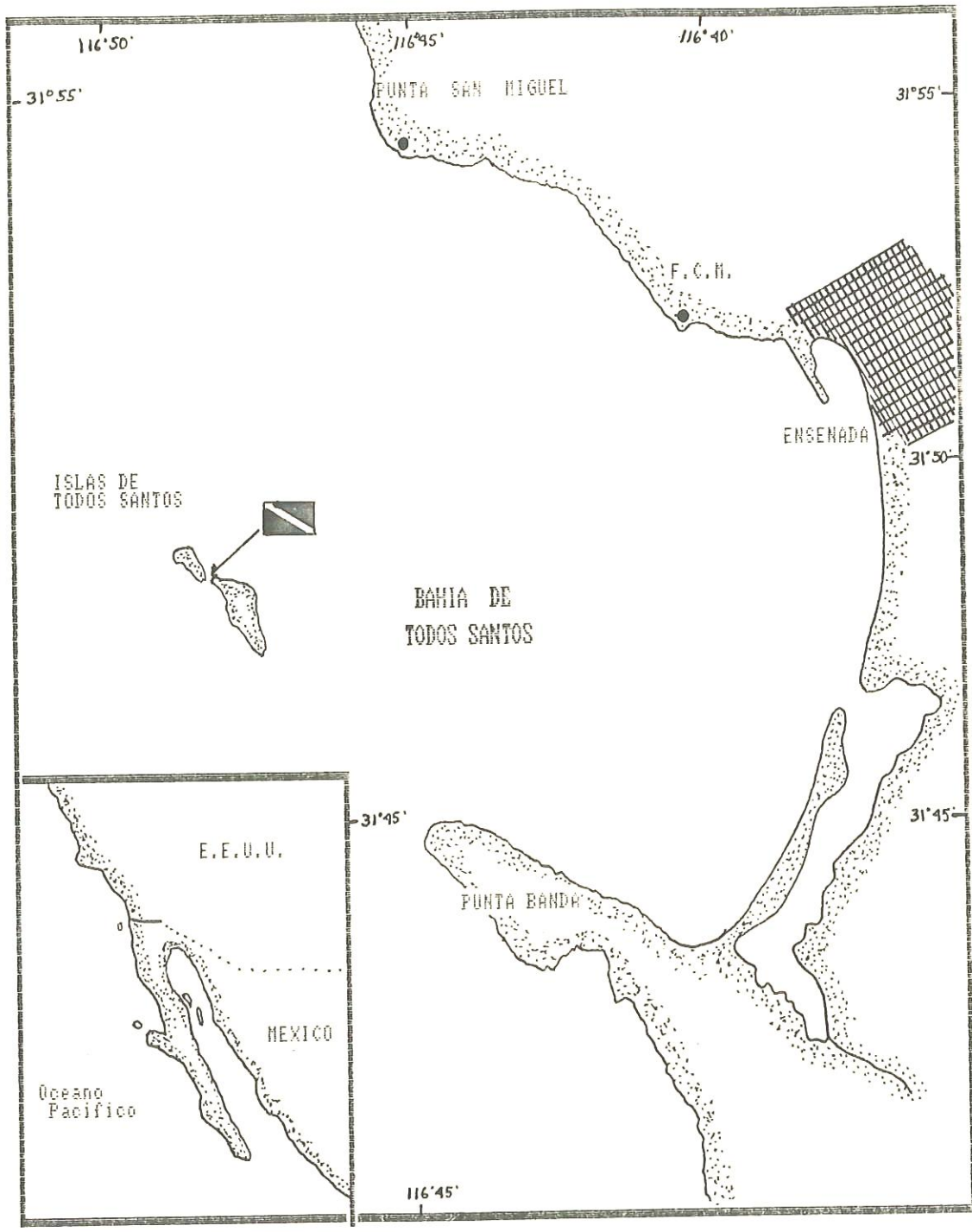



Fig.- Localizacion del area de colecta de los organismos 

## 2) Descripción del experimento.

Esta investigación se llevo a cabo en tres etapas diferentes.

En la primera etapa se realizaron cuatro experimentos con gametos expulsados por los caracoles (no se hicieron replicas, dado que la naturaleza del experimento no lo requirio). Los desoves se promovieron usando variación termica, de acuerdo a la metodología usada por Silva ; Ibarra (comunicación personal). Se estableció un control de fertilización utilizando óvulos y espermatozoides expulsados naturalmente de la siguiente manera. Los gametos se colocaron por separado en cristalizadores de 1 l con agua de mar (filtrada e irradiada con UV) a temperatura de  $20 \pm 1$  oC. Se tomaron óvulos y espermatozoides, por separado con una pipeta pasteur y se hizo la mezcla de gametos. Después de 15 minutos, tiempo requerido para la fertilización y formación de la primera división celular, se filtraron y enjuagaron los gametos en un tamiz de 35  $\mu$ m, para eliminar el exceso de espermatozoides. Posteriormente se colocaron en un vaso de precipitado de 200 ml aforando con agua de mar hasta 150 ml y se contó el número de huevos con la primera división. Las observaciones fueron hechas con microscópio compuesto (Bausch & Lomb) y una cámara Sedwich-Rafter. Se consideraron

como óvulos fecundados los que presentaron al menos la primer división celular.

La metodología antes mencionada se aplicó en las siguientes etapas del experimento pero se diferenció unicamente en la forma de obtener los gametos tanto masculinos como femeninos.

El segundo experimento se realizó con óvulos y espermatozoides extraídos directamente de la gónada (sacrificando al organismo) se hicieron cortes en la gonada del macho enjuagandose en agua de mar y se uso el sobrenadante. Los óvulos se obtuvieron al rasgar el epitelio que cubria la gónada dejando en libertad a éstos. Se hizo la mezcla inmediatamente en vasos de precipitados de 200 ml.

En el tercer experimento se probó la capacidad de fertilización entre óvulos desovados por el animal y espermatozoides extraídos de la gónada manualmente, haciendo la unión de gametos inmediatamente.

El cuarto experimento se realizó con óvulos extraídos manualmente y espermatozoides expulsados por el caracol, haciendo la mezcla de gametos inmediatamente.

Con el fin de disolver la capa gelatinosa que rodea al óvulo y tratar de promover la fertilización.

En esta etapa experimental se probó hidróxido de amonio (NH<sub>4</sub> OH) a diferentes concentraciones (0.5, 0.1 y 0.05 M) y diferentes tiempos de exposición de los óvulos (30, 20 y 10 seg. para cada una de las concentraciones).

Esta parte del trabajo se realizó bajo condiciones de laboratorio con temperatura de  $20 \pm 1$  °C y salinidad de 35 ppm. Se hizo un promedio de cinco conteos del total de óvulos fertilizados y no fertilizados, estableciendo un porcentaje de la capacidad de fertilización según la siguiente expresión.

$$\% \text{ Fertilización} = \frac{\# F}{\# F + \# NF} = 100$$

Por ejemplo:

Fecundados	No Fecundados
17	17

$$\frac{17}{17 + 17} \times 100$$

En la segunda etapa del estudio, se estimó la viabilidad de los gametos en función del tiempo, usando la misma metodología que en el primer experimento pero ésta vez se efectuaron las fertilizaciones a

intervalos de tiempo de una hora, o más, con los gametos de un mismo desove, hasta no encontrar divisiones celulares. Lo anterior se realizó en condiciones de temperatura y salinidad ambiental ( $20 \pm 1$  oC y 35 ppm). La capacidad de fertilización se realizó de la manera descrita.

En la tercera etapa del trabajo, se evaluó el efecto combinado de la temperatura y salinidad en función del tiempo sobre la capacidad de fertilización siguiendo la metodología anterior.

Los gametos utilizados fueron obtenidos mediante inducción de temperatura en salinidad ambiental ( $20 \pm 1$  oC y 35 ppm) se colocaron por separado en vasos de precipitado a salinidades de (25, 35 y 45 ppm). La salinidad se preparó usando agua de mar sintética (Instant Ocean) y fué medida con un refractómetro. Inmediatamente los vasos con gametos fueron puestos sobre una mesa de gradientes a diferentes temperaturas (16, 17.5, 20, 22.5 y 25 oC) como muestra la figura 2.

Después de 30 minutos de haberse colocado los vasos de precipitado sobre la mesa de gradientes, se hizo la mezcla de gametos dentro de cajas petri a las diferentes temperaturas y salinidades. Se dejó pasar un tiempo de 10-15 minutos y se usó la misma metodología que en la primer

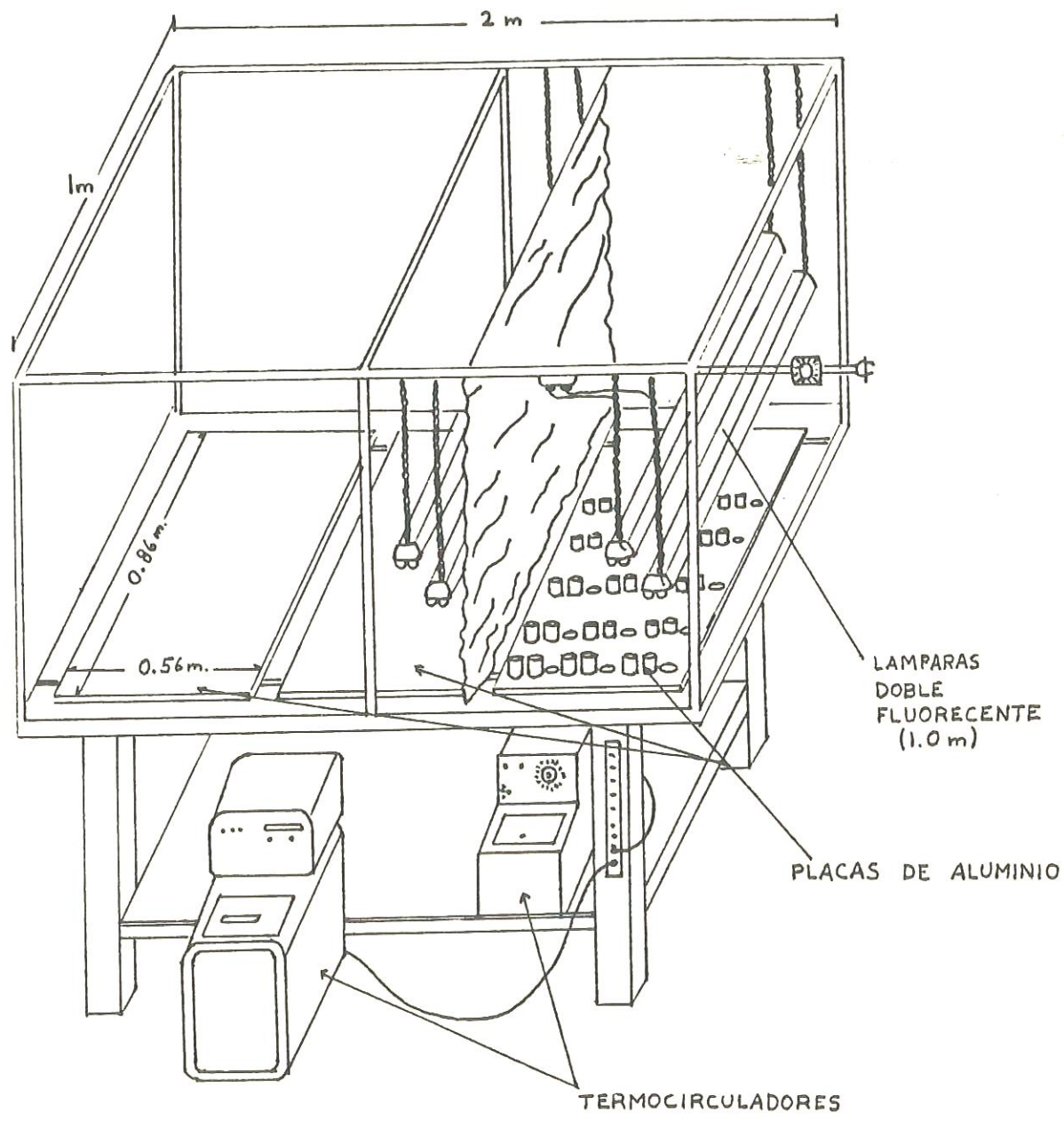


Fig. 2.- Diagrama de la mesa de gradientes con fuente de luz.

etapa para filtrar y enjuagar los huevos, así como para el cálculo del porcentaje de gametos fertilizados.

Este procedimiento se repitió en cinco tiempos diferentes posteriores a la expulsión de gametos (1:50', -- 3:50', 6:10', 8:50' y 11:20') hasta que no se observó la -- primer división en el huevo.

Las observaciones y conteos fueron hechos en el microscopio compuesto.

Los porcentajes de fertilización obtenidos en los experimentos fueron tratados mediante la prueba de bondad de ajuste para la distribución normal de Kolmogorov-Smirnov (Sokal y Rohlf, 1981). Posteriormente se probaron mediante un ANOVA multifactorial no paramétrico (Zar, 1984), para observar si existieron diferencias a las distintas salinidades y temperaturas respecto al tiempo. Se utilizó ANOVA de una Vía (Zar, 1984), para estimar la significancia de las diferencias encontradas en función del tiempo.

En las pruebas empleadas se utilizaron niveles de confianza al 95% y se realizaron mediante el paquete estadístico BIOMETRY para microcomputadoras (Sokal y -- Rohlf, 1981).

## RESULTADOS

### 1) Primera etapa experimental.

Se trabajo con temperatura de  $20 \pm 1$  oC y salinidad de 35 ppm.

Los resultados de la fertilización inducida a partir de gametos expulzados y extraídos manualmente se presentan en la tabla 1. Es notable observar como la capacidad de fertilización esta presente en los espermatozoides tanto expulsados por el organismo como extraídos manualmente, en tanto que unicamente son potencialmente fertilizables los óvulos que son expulsados por la hembra, más no así los que fueron extraídos.

Las pruebas que se realizaron con diferentes concentraciones de hidróxido de amonio ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ), en óvulos extraídos directamente de la gónada, muestran que la capa gelatinosa es disuelta en los distintos tiempos, pero los óvulos son dañados mostrando deformaciones internas y perdida de coloración de verde olivo a café claro (Tabla II).

### 2) Segunda etapa experimental.

En la fig. 3, se presentan los porcentajes promedio de fertilización respecto al tiempo, disminuyendo gradualmente hasta llegar a cero en 17 horas. Se observó que después de ocho horas, los óvulos comenzaron a perder su coloración normal (verde olivo) a café claro.

Tabla I. Resultados de la fertilización inducida con gametos expulsados y extraídos de Astraea undosa en temperatura de  $20 \pm 1$  oC y salinidad de 35 ppm.

Condición de los gametos		Resultado	
Ovulos expulsados	+	Espermatozoides expulsados	Sucede la fertilización.
Ovulos expulsados	+	Espermatozoides extraídos	Sucede la fertilización.
Ovulos extraídos	+	Espermatozoides extraídos	No sucede la fertilización.
Ovulos extraídos	+	Espermatozoides expulsados	No sucede la fertilización.

Tabla II. Resultados de pruebas utilizando diferentes concentraciones de hidróxido de amonio (0.5, 0.1 y 0.05 M) en óvulos extraídos manualmente de *Astraea undosa*, mantenido durante 10, 20 y 30 seg en cada concentración.

Concentración	Tiempo	Condición obtenida
0.5 M	10 seg	Deformación rugosa del óvulo.
	20 seg	Desintegración total del óvulo.
	30 seg	Desintegración total del óvulo.
0.1 M	10 seg	Deformación rugosa del óvulo.
	20 seg	Deformación rugosa del óvulo.
	30 seg	Desintegración total del óvulo.
0.05 M	10 seg	Desintegración de la capa vitelina, llegando a afectar la morfología del óvulo.
	20 seg	Misma condición que la anterior llegando a perder su coloración.
	30 seg	Desintegración de la capa vitelina y decoloración del óvulo.

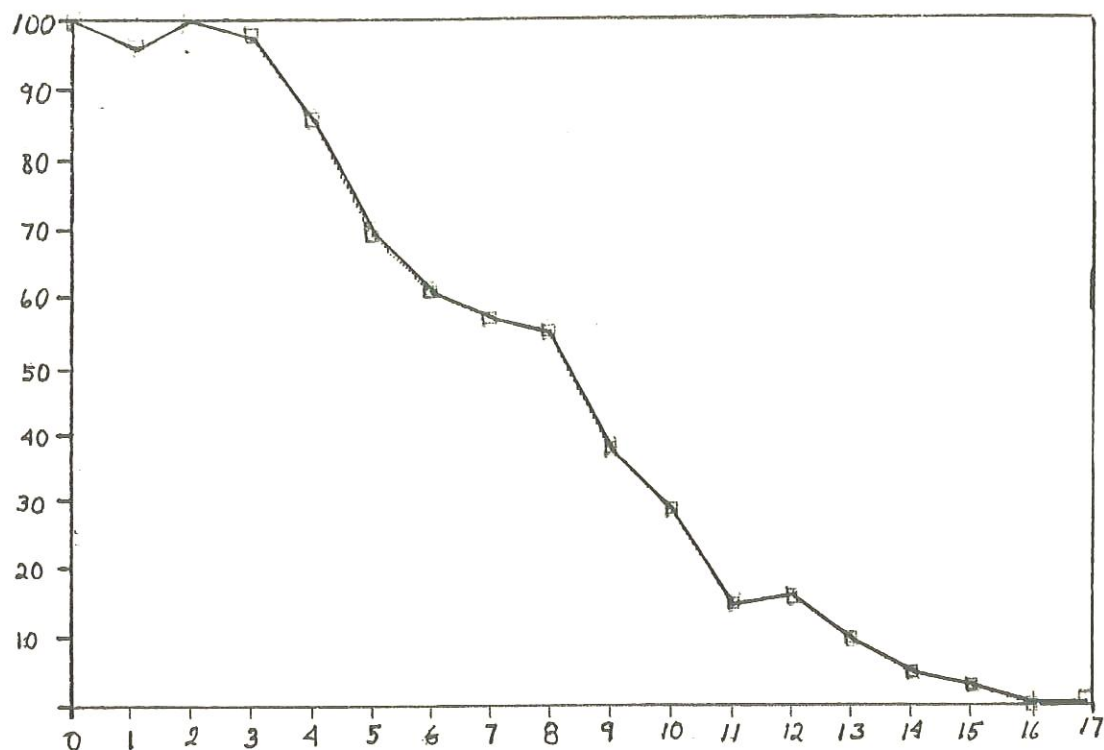


Figura 3.- Efecto del tiempo sobre la capacidad de fertilización de gametos expulsados a *Astrae undosa*, ( $20 \pm 1$  oC y 35 ppm). Las barras verticales representan la desviación estandar de promedio de las mediciones.

El ANOVA de una vía mostró ( $P < 0.05$ ), que el factor tiempo tiene un efecto significativo sobre la sobrevivencia conforme este avanza.

### 3) Tercera etapa experimental.

El efecto combinado de temperatura y tiempo de exposición a salinidades de 25, 35 y 45 ppm. se presentan en las figuras 4, 5 y 6.

En salinidad de 25 ppm y temperatura de 25 oC (máxima superior)(fig. 4), es importante hacer notar que no se observó fertilización en ningún tiempo. En la temperatura mínima (16 oC), se obtuvo el mayor número de fertilizaciones a todos los tiempos experimentados y el mayor porcentaje de fertilización se presentó a los 20 oC y en un tiempo de una hora con cincuenta minutos.

En la salinidad de 35 ppm (Fig. 5), los porcentajes menores de fertilización se presentaron a 22.5 y 25 C, mientras que en 17.5 oC, se observó un mayor número de fertilizaciones en todos los tiempos utilizados. El mayor porcentaje de fertilización se registró nuevamente a 20 oC y en el mismo tiempo que en la salinidad de 25 ppm.

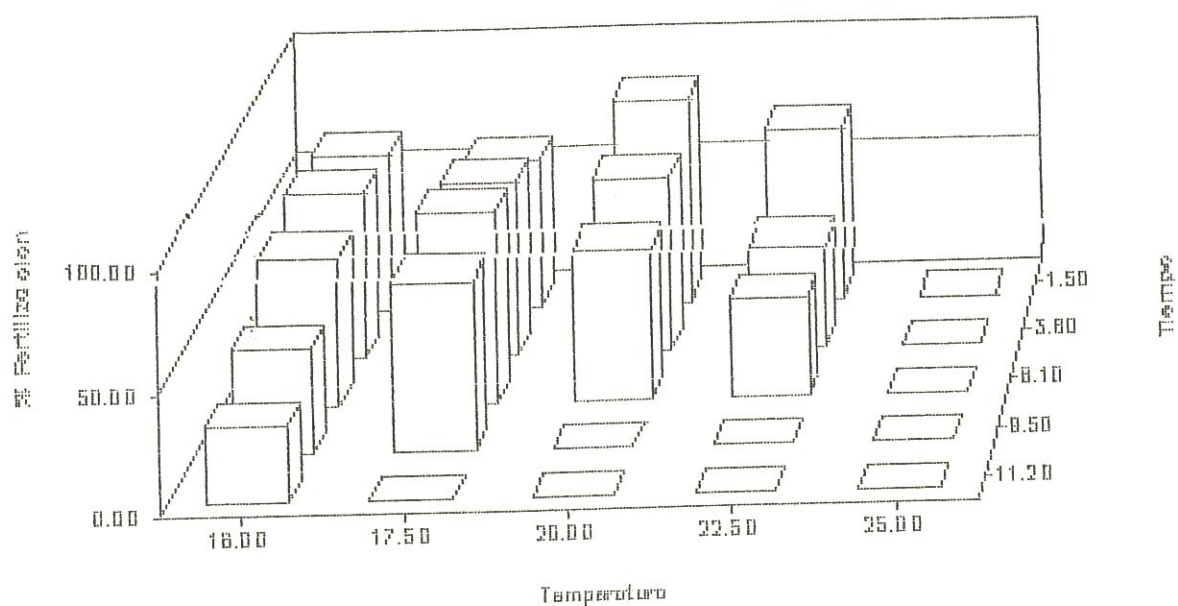


Figura 4.- Efecto combinado de temperatura y tiempo sobre la capacidad de fertilización de gametos de *Astraea undosa* expresado como porcentaje en salinidad de 25 ppm.

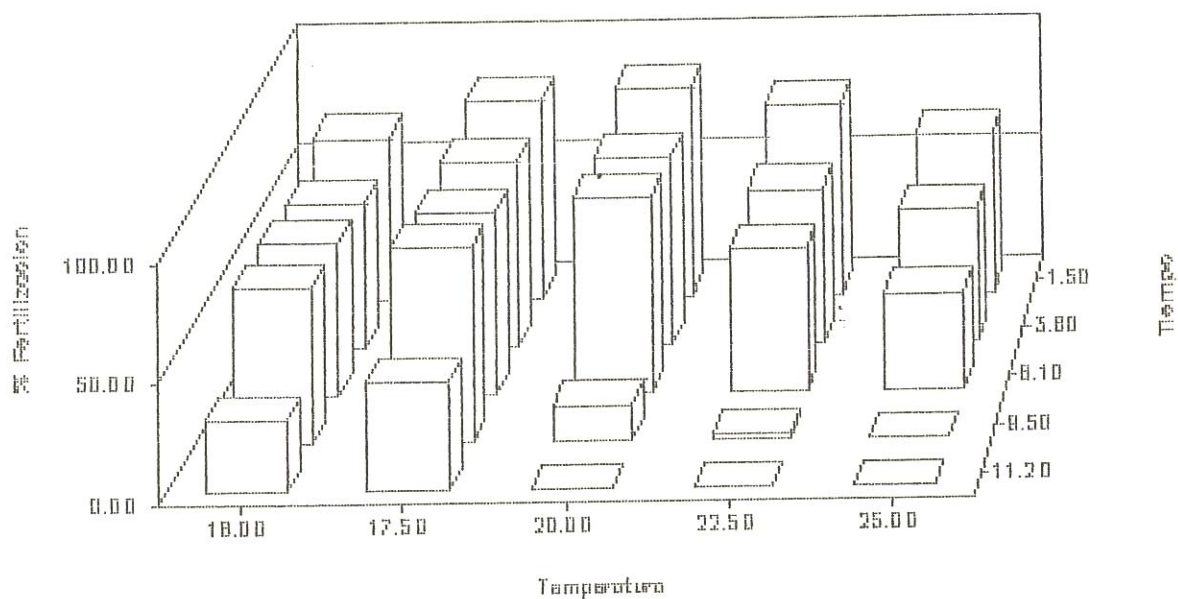


Figura 5.- Efecto combinado de temperatura y tiempo sobre la capacidad de fertilización de gametos de *Astraea undosa* expresado como porcentaje en salinidad de 35 ppm.

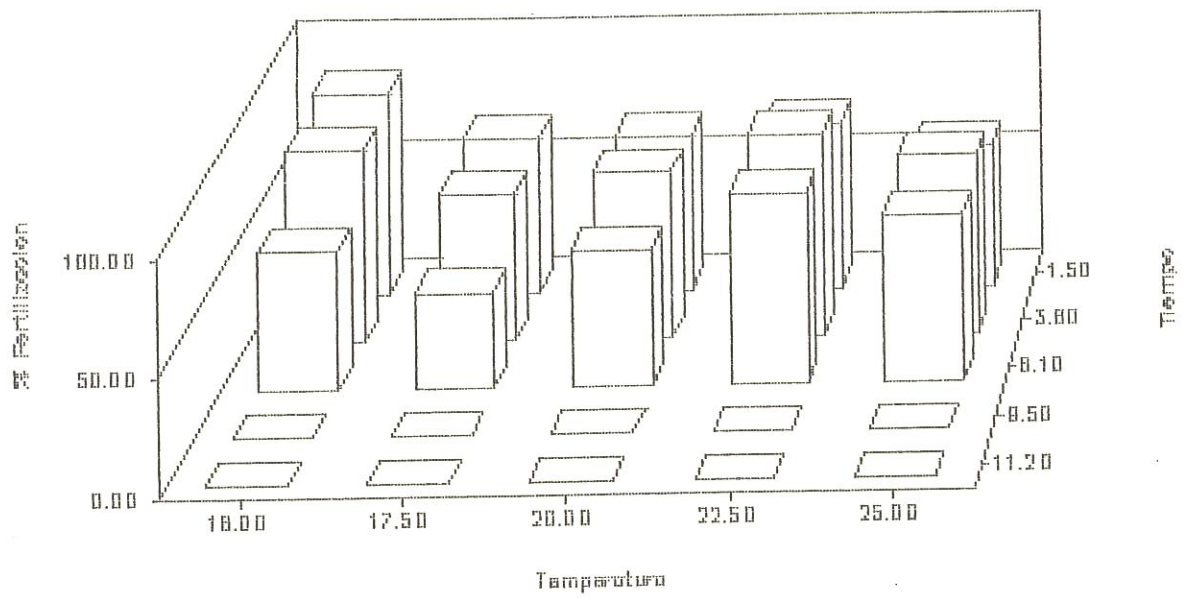


Figura 6.- Efecto combinado de temperatura y tiempo sobre la capacidad de fertilización de gametos de *Astraea undosa* expresado como porcentaje en salinidad de 45 ppm.

En salinidad de 45 ppm (Fig. 6), se presentó un alto porcentaje de fertilización en los tres primeros tiempos (1:50, 3:50 y 6:10 horas) y en todas las temperaturas utilizadas. En los dos últimos tiempos (8:50 y 11:50 horas), no se observó fertilización en ninguna temperatura.

Por medio del ANOVA multifactorial no paramétrico, se observó que el tiempo y la temperatura experimentadas influyen significativamente ( $P < 0.05$ ), mientras que la salinidad no fué un factor significante en la fertilización, el efecto combinado de dos y tres factores es de mayor influencia que uno solo (Tabla III).

TABLA III. Anova multifactorial (no parametrico) -- realizado con los porcentajes de fertilización del caracol Astraea undosa obtenidos en función de temperatura - y tiempo de exposición en salinidades distintas.

Fuente	SC	GL	MC	Significancia
A	788.06	2	394.03	*
B	2611.16	4	652.79	*
C	16983.37	4	4245.84	NS
AxB	5018.47	8	627.30	*
AxC	2160.97	8	270.12	*
BxC	2844.46	16	177.77	*
AxBxC	3442.49	32	107.57	*

A Tiempo

B Temperatura

C Salinidad

\* Significativo

NS No significativo

## DISCUSION

### a) Primera etapa:

De acuerdo a lo mostradó en la tabla I, la fertilización de los gametos de Astraea undosa no sucede cuando los óvulos son extraídos manualmente. Esto es debido a que el óvulo extraído está rodeado de una capa viscosa en la cual queda atrapados los espermatozoides y finalmente mueren. De acuerdo a Kinne (1971) menciona que en algunas especies con fertilización externa, los óvulos estan rodeados por una membrana vitelina, la cual esta cubierta por una segunda capa gelatinosa (capa vitelina), que protege al óvulo. En Astraea undosa al hacer la extracción directa de los óvulos, estos quedan cubiertos por la capa vitelina la cual impidió el proceso de fertilización. En comunicación personal Gould, Meredith (\*) hace mención que los óvulos expulsados no presentan la capa vitelina, ya que al momento del desove, hormonas segregadas por el organismo rompen dicha capa y liberan los óvulos.

Cabe considerar la posibilidad de que la fertilización no haya sucedido debido al óvulo inmaduro, sin embargo esto no sucedió con los gametos utilizados, ya que al aplicar presión en el cubre objetos y romper los óvulos, no se observó la vacuola típica de ovocitos inmaduros.

En el caso de los espermatozoides extraídos siempre se les encontro con plena actividad flagelar, lo cual era

(\*) Meredith Gould Chambers. Ph. D. Escuela superior de Ciencias. U.A.B.C Ensenada B.C.

vibratorio dentro de la misma gonada, y completamente activos una vez que se les separaba de la matriz gonádica.

Las pruebas realizadas con el hidroxido de amonio no fueron las convenientes, ya que la alta alcalinidad que presentó el compuesto disolvió la capa vitelina pero deforma de manera muy severa la membrana y contenido interior llegando este a ser traslucido (Tabla I). Berg (1967), menciona que la manera más conveniente y productiva de disolver las cubiertas de los óvulos para promover la fertilización es por métodos químicos. Kopac (1940) removió la capa gelatinosa de óvulos del erizo de mar con cloruro de sodio (no se mencina la concentración); Krauss (1950), disolvió la capa gelatinosa utilizando agua de mar acidificada a pH de 3.5 - 4.5. Lewis et. al., (1982), removieron la capa vitelina de óvulos de Haliotis rufescens por medio de la extracción de la lisina (proteína) del espermatozoide, la cual disuelve a ésta, Se considera que éste último método sea el más conveniente ya que se remueve la capa sin dañar al óvulo y con la posibilidad de ser fecundado.

a) Segunda etapa:

El efecto del tiempo sobre la capacidad de fertilización de los gametos despues de las cinco primeras

horas se vuelve crítico pues de un 80 % (capacidad de fertilización) disminuye en forma casi lineal hasta llegar al 0 % a las 17 horas. Lo anterior se considera como reflejo de lo que puede suceder en el medio natural, ya que las condiciones experimentales (20 °C y 35 ppm.) son muy semejantes a las del medio cuando suceden los desoves (fines de verano). De acuerdo a las observaciones en laboratorio se considera que el gameto que es más afectado por el tiempo (postdesove) es el óvulo. En laboratorio esto a las 8 horas empieza a mostrar un cambio de coloración (de verde olivo a café claro), y el contenido plasmático de un aspecto granular pasa a uno más fluido.

Este cambio de color y aspecto en 8 horas y la disminución de la capacidad de fertilización después de las 5 horas (fig. 3) se asocia al óvulo, el cual pierde su capacidad de fertilización antes que el espermatozoide en función del tiempo. En cambio el espermatozoide se mantiene móvil hasta 28 horas después de su expulsión. Por lo que se considera que este, al no sufrir cambio morfológico en este tiempo, se refleje en alguna forma en su capacidad de fertilización. En el abulón rojo Haliotis rufescens sucede lo contrario ya que el espermatozoide pierde más rápido su viabilidad que los óvulos (Ebert y Hamilton, 1983). Harvey (1956) y Ebert y Hamilton (1983), hacen mención que

posiblemente la duración de vida del espermatozoide depende de varios factores, principalmente de la temperatura, de exposición, concentración de espermatozoides (consumo de oxígeno) , alcalinidad o alguna combinación de estos. En comunicación personal, Gould Meredith Ph. D. menciona que la temperatura puede influenciar el mecanismo de activación del espermatozoide y posiblemente la pérdida de la capacidad de fertilización. Bayne (1983) menciona que los factores ambientales que afectan el patron normal de desarrollo y desove de los gametos podria provocar una menor viabilidad en estos.

c) Tercera etapa:

En salinidad de 25 ppm. en temperatura de 25 oC la pérdida de capacidad de fertilización fué total, lo que hace pensar que estas condiciones hayan influido en los gametos posiblemente, la temperatura en conjunción con la baja salinidad acelerarón el metabolismo y el gasto energetico de los gametos. En salinidad de 25 ppm. entre los tiempos experimentados de 1:50 a 6:10 y temperaturas de 16 a 22.5 oC, se observaron los mayores porcentajes de fertilización, por lo que se puede decir que estos intervalos de tiempo y temperatura son los mejores para que se lleve a cabo la fertilización en condiciones de

laboratorio. En el ostión Cassostrea gigas la salinidad entre 23 y 28 ppm promueve condiciones favorables para la fertilización y desarrollo embrionario. Los intervalos de salinidad que permiten este desarrollo son más amplios hacia valores más bajos de temperatura (Fujiya, 1970). En contraste, Young (1941), encontró que Mytilus californianus pierde capacidad de fertilización cuando se somete a una salinidad de 25 ppm o menores.

Los mayores porcentajes de fertilización fueron obtenidos en la salinidad de 35 pmm. Este resultado coincide con el experimento anterior (etapa 2, figura 3), donde la fertilización más grande sucede durante las primeras cinco horas, cuando no se modificaron condiciones de temperatura y salinidad. Al parecer salinidades en el intervalo de 25 - 35 ppm como el experimentado, no tiene un efecto intenso sobre la capacidad de fertilización de Astraea undosa, salvo en los tiempos mayores de seis horas.

Al exponer los gametos en salinidad de 45 ppm la capacidad de fertilización se vió reducida conforme aumentó el tiempo, observandose una disminución total a partir de 8:50 horas por lo que se supone, que el tiempo fué el factor que más afectó esta salinidad (fig. 6), debido posiblemente a la deshidratación de los gametos y pérdida de capacidad de fertilización del óvulo.

Tettelback y Rhodes (1981), probaron que salinidades mayores de 35 ppm afectan el desarrollo y sobrevivencia de embriones del bivalvo Agaropecten irradians irradians; Amemiya (1962), considero que salinidades mayores de 39 ppm representan los limites mas altos en el desarrollo inicial del ostión americano Ostrea virginica.

En el medio natural los desoves de Astraea undosa ocurren al romperse la termoclina, lo cual sucede a fines de verano al alcanzar una temperatura de 18.5 oC aproximadamente en el fondo, en contraste con los meses restantes que se encuentran en 14.5 oC promedio.

En este estudio, los factores que más afectaron la capacidad de fertilización son el tiempo (mayor de 6 horas) y la temperatura (mayor de 20 oC).

## CONCLUSIONES

- La pérdida de capacidad de fertilización no sucede sobre la totalidad de los gametos al mismo tiempo, algunos logran mantener esta capacidad por un tiempo mayor.
- La capacidad de fertilización del espermatozoide esta presente tanto en la expulsión natural como en la extracción manual. En óvulos sin tratamiento alguno solamente se encuentra en los expulzados naturalmente.
- En condiciones de laboratorio (20 °C y 35 ppm) los óvulos pierden más rápido su capacidad de fertilización que los espermatozoides en función del tiempo.
- El tiempo favorable para promover la fertilización en un 80 % es antes de las cinco horas después de la emisión de gametos y temperatura de 20 °C y salinidad de 35 ppm.
- El efecto combinado de temperatura, tiempo transcurrido postdesove y salinidad modifican significativamente la capacidad de fertilización:
  - a) En salinidad de 45 ppm el tiempo postdesove inhibe la capacidad de fertilización.
  - b) En salinidad de 25 ppm temperatura de 25 °C inhibe la capacidad de fertilización.

c) En las primera 8 Horas, entre 16 y 20 oC y 25, 35 y 45 ppm no sucede variación notable en la capacidad de fertilización.

## RECOMENDACIONES

En estudios relacionados con la fertilización, es necesario tener cuidado con el manejo de los gametos, sobre todo tener pipetas específicas de óvulos y espermatozoides ya que pueden ocurrir intercambios o mezclas de estos al momento de las transferencias.

La temperatura es un factor importante, el cual debe mantenerse constante tanto al momento de obtención como en el manejo de los gametos, ya que las variaciones de temperatura afectan la viabilidad de estos.

El hidróxido de amonio si disuelve la capa vitelina, pero es necesario hacer pruebas futuras en concentraciones más diluidas y probar con los mismos tiempos o diferir en estos.

## BIBLIOGRAFIA

- Alderdice, D.F., (1972). Factor combinations responses of marine poikilotherms to enviromental factors acting in concert. In: Marine Ecology. 1, Part 3. pp 1651-1660. Ed by O. Kinne, London Wiley Interscience.
- Amemiya, I. (1926). Notes on experiments on the early developmental stages of the portuguese, American and English native oysters, with special reference to the effect of varyng salinity. New series-Vol.XIV No.1 pp 161-174.
- Bayne, B.L. (1965). Growth and delay of metamorphosis of larvae of Mytilus edulis (L). Ophelia 2(1):1-47.
- Bayne, B.L. Gabbott, P.A. and Widdows, J.(1975). Some effects of stress in the adult on the eggs and larvae of Mytilus edulis L.J. Mar.Biol.,U.K., 55, 675-689.
- Berg, W. E., (1957). Chemical analysis of anterior and posterior blastomeres of Cionas intestinalis. Biol. Bull., 113: 365.
- Brenko-Hrs, M. y Calabrase, A. (1969). The combined effects of temperature and salinity on larvae of mussel Mytilus edulis. Marine Biology 4:224-226.
- Butler, P.A.(1949). Gametogenesis in the oyster under conditions of depresses sality. Biol. Bull. (Woods Hole, Mass.) 96, 263-269.
- Cadman, R.L. y M.P. Weinstein, (1988). Effects of temperature and salinity on the growth of laboratory-reared juvenile blue crabs Callinectes sapidus. Rathbun.J. Exp. Mar. Biol. Ecol.121:193-207.

- Ebert, E.E. and R.M. Hamilton (1983). Ova fertility relative to temperature and to the time of gamete mixing in the red abalone, Haliotis rufescens. Calf. Fish and Game 69(2):115 -120.
- Ebert, E.E. and J.L. Houk (1984). Elements and innovations in the cultivation of red abalone Haliotis rufescens. Aquaculture, 39: 375-392.
- Fretter, V, (1984). Prosobranch (reproduction). The mollusca. Edit. Academic Press. Vol 7. pp 1 - 45.
- Fujiya, M. (1970). Oyster farming in Japan. Helgolander wiss. Meeresunters., 20: 464-479.
- Giese, A.C. and Pearse, J.S. eds (1974). Reproduction of marine Invertebrates. Vol.2 pp 249-268. Academic Press, New York.
- Harvey, B. E. (1956). The american Arbacia and other sea Urchins Princeton University Press. pp 87-74.
- Kikuchi, S. and N. Uki (1974a). Technical study on artificial spawning of abalone, genus Haliotis. Effect of irradiated sea water with ultraviolet rays on inducing spawning. Bull. Tohoku Reg. Fish. Res. Lab. 33:79-86. In:
- Kinne, O. (1971). Salinity-invertebrate animals. Marine Ecology. Wiley Interscience. New York. Vol. 1, 2, 3.
- Kopac, M.J., (1940). Properties of extraneous coats of cell. In: Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 8: 154.
- Krauss, M., (1950). Lytic agents of the sperm of some marine animals II: Extraction of hetero-egg membrane lysin from sea urchin sperm. J. Exptl Zool., 114: 279.

- Lewis, C. A., F. Craig y V.D. Vacquier, (1982). A protein from abalone sperm dissolves the egg vitelline layers by a nonenzymatic mechanism. *Developmental Biology* 92, 227-239.
- Loosanoff, V.L. and Davis, H.C.(1952). Temperature requirements for maturation of gonads of northern oyster. *Biol. Bull. mar. biol. Lab., Woods Hole*, 103, 80-96.
- Manzi, J.J. (1970). Combined effects of salinity and temperature on the feeding, reproductive, and survival rates of Eupleura caudata (SAY) and Urosalpinx cinerea (SAY) (Prosobranchia: Murcidae). *Biol. Bull. mar biol. Lab., Woods Hole*, 138: 35-46.
- Orton, J.H. (1920) Sea temperature, breeding and in marine animals. *J. mar. biol. Ass. U.K.* 12: 339-366.
- Rao, K.S.(1967). Annual reproductive cycle of the wedge clam, Donax cuneatus Linnaeus. *J. Mar. Biol. Assoc. India* 9;:141-146.
- Sastry, A.N. (1975). Physiology and ecology of reproduction in marine invertebrates. In: *Physiological ecology of estuarine organisms* (F.J. Vernberg, ed.) pp 279-299. Univ. of South Carolina Press, Columbia.
- Sastry, A.N. (1979). Pelecypoda (excluding Ostridae). In: *Physiological Adaptation to the Environment* (F.J. Vernberg, ed.) Crowell-Collier, New York pp 521-538.
- Sokal, R. and Rohlf, F.J. (1981). *Biometry*. 2nd. Edn. W.H. Frelman and Co., San Francisco. pp 859.

- Tettelbach, S.T. y E. W. Rhodes (1981). Combined effects of temperatura and salinity on larvae of the Northern Bay Scallop Argopecten irradians. Marine Biology 63 : 249-256.
- Vernberg, W.B. and F.J. Vernberg, (1981) Benthic Functional adaptations of marine organisms. Edit. Academic Press. pp 211.
- Yamamoto, G. (1951a). On acceleration of maturation and ovulation of the ovarian eggs in vitro in the scallop, Pecten yessoensis Jay. sci. Rep. Tohoku Univ. (Ser.4), Vol.19: 161-166. En
- Yong, M., (1941). The distribution of the mussel Mytilus californianus in relation to the salinity of its environment. Ecology.22: 379-386.
- Zar, J.H., 1984. Biostatistical Analysis. 2nd. Ed. Prentice-Hall pp 185-205.