

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS



“Movilización de reservas bioquímicas y expresión del gen de la vitelina (mRNA VT/VTG), durante el desarrollo gonádico de la almeja de sifón, *Panopea globosa*”

T E S I S

QUE PARA CUBRIR LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

SANDRA TAPIA MORALES

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO. ENERO DEL 2014

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS



“Movilización de reservas bioquímicas y expresión del gen de la vitelina (mRNA VT/VTG), durante el desarrollo gonádico de la almeja de sifón, *Panopea globosa*”

T E S I S

QUE PARA CUBRIR LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

SANDRA TAPIA MORALES

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO. ENERO DEL 2014

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS
MAESTRIA EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA

"Movilización de reservas bioquímicas y expresión del gen de la vitelina (mRNA VT/VTG), durante el desarrollo gonádico de la almeja de sifón, *Panopea globosa*"

TESIS

QUE PARA CUBRIR LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

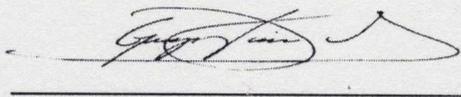
SANDRA TAPIA MORALES

Aprobado por:

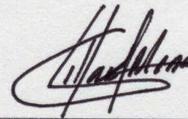


Dr. Zaúl García Esquivel

Director de tesis



Dra. Fabiola Guadalupe Arcos Ortega
Sinodal



Dra. Ivone Giffard Mena
Sinodal

Ensenada, B.C., México a 06 de enero del 2014

RESUMEN

Entre octubre de 2011 y febrero de 2012 se colectaron mensualmente 30 organismos de *Panopea globosa* en San Felipe Baja California con el fin determinar el papel que juegan la glándula digestiva, la hemolinfa y la gónada como sitios de almacenamiento y/o movilización de reservas energéticas (proteínas, lípidos y carbohidratos totales; glucosa, glucógeno y triglicéridos) en esta almeja, así como determinar si el gen de la vitelogenina/vitelina (mRNA Vtn/Vtg) se expresa en estos órganos durante la maduración gonadal. Se identificaron cinco estadios de madurez reproductiva durante el estudio, estadios tempranos de madurez gonadal de ambos sexos en octubre y desoves parciales de ambos sexos a partir de noviembre, un mes antes de lo reportado en trabajos previos. Se sugiere que el inicio anticipado de la gametogénesis se debió a las temperaturas registradas durante nuestro muestreo. En el presente estudio se propone utilizar el porcentaje de cobertura de esperma y el diámetro de ovocitos, con el fin de establecer cuantitativamente el grado de madurez de los gametos durante el desarrollo gonadal de esta especie. Las evaluaciones histoquímicas evidenciaron patrones inversos de acumulación de carbohidratos y lípidos, disminuyendo los primeros y aumentando los segundos conforme avanzó la gametogénesis de *P. globosa*. El análisis estadístico de los datos confirma que *P. globosa* es una especie con una estrategia reproductiva que se ajusta al modelo conservador, pues la acumulación de reservas ocurrió previo a la gametogénesis. El glucógeno jugó un papel importante como compuesto de reserva en la glándula digestiva de las hembras. Sin embargo el resto de los componentes bioquímicos evaluados no mostraron cambios significativos en este órgano, por lo que se sugiere que existen otros sitios con mayor importancia en el almacenaje de reservas energéticas en este organismo. En el presente estudio se aisló, purificó y secuenció por primera vez el gen de la vitelogenina/vitelina (Vtn/Vtg) de *P. globosa* y se observó su síntesis en la glándula digestiva y gónada de hembras en estadios avanzados de madurez. Lo cual valida el uso de este gen como indicador de sexo en *P. globosa*.

Palabras clave: *Panopea globosa*, gametogénesis, reservas energéticas, vitelogenina, vitelina.



Dr. Zaúl García Esquivel

DEDICATORIA

A mi mamá por ser un gran ejemplo de esfuerzo y superación, porque a pesar de todos los obstáculos siempre me dio su apoyo incondicional, por hacerme saber que siempre está ahí.

A mis hermanos y a mis sobrinitos Rafa y Miguel por darle a mi vida otro motivo más para superarme como persona.

A todas las personas que durante este proceso han llegado a mi vida, me han acompañado y se quedaran en ella, que hoy forman parte de mi familia. Que han sido un gran apoyo y han estado en los momentos difíciles, que hicieron más llevadero este proceso...Aurora, Adri, Dani, Bianca, Viry, Victoria, Carlos, El Profe, Milton...

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Baja California ya que mediante el proyecto "ESTUDIOS BASE PARA EVALUAR LA FACTIBILIDAD TECNICA DE CULTIVO Y/O REPOBLAMIENTO DE LA ALMEJA GENEROSA, PANOPEA GENEROSA, EN EL CAMPO" de la 15a. Convocatoria Interna de proyectos de investigación se financió parcialmente este trabajo. También por el apoyo otorgado mediante la beca de movilidad estudiantil para realizar una estancia de investigación en el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, B.C.S

A CONACYT por la beca de maestría otorgada durante el periodo de estudios así como por el otorgamiento de la beca mixta para el análisis de muestras relacionadas con el tema de tesis en el CIBNOR, La Paz, B.C.S.

También a la Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca (CONAPESCA, SAGARPA) a través de su proyecto "Consolidación de la infraestructura y optimización de la tecnología para la producción de semilla de almeja generosa (*Panopea spp*)".

A la Dra Fabiola Arcos Ortega por facilitarme la entrada al CIBNOR, La Paz, B.C.S, por el uso de las instalaciones, equipos y reactivos para los análisis histológicos, histoquímicos, bioquímicos y moleculares necesarios para realizar este trabajo. En especial al personal de los siguientes laboratorios por su apoyo y capacitación: del Laboratorio de Histología e Histoquímica, a la M.C. Ma. del Carmen Rodríguez Jaramillo y a la T. María Eulalia Meza Chávez, del Laboratorio de Bioquímica Fisiológica al M.C. Roberto Hernández Herrera y del Laboratorio de Biología Molecular al M.C. Jesús Neftalí Gutiérrez Rivera así como a la M.C. Gallegos Simental Griselda.

A la Dra Roció Canche por su capacitación para los análisis moleculares, por su tiempo y paciencia, y por siempre estar dispuesta a ayudarme.

A la Dra Ivone Giffard Mena, por su tiempo, asesoría, eficiencia y compromiso con los alumnos.

A los compañeros que me ayudaron en distintas fases del trabajo de tesis: A Aurora Tinajero (por estar siempre dispuesta) y a Mauricio Buitimea, por su apoyo durante la toma de muestras y a Alejandro Rodríguez Gama por su ayuda con las

extracciones de RNA. A todos los compañeros del laboratorio de Biotecnología de Moluscos de la UABC, que de alguna u otra manera han formado parte de mi crecimiento y se convirtieron en una familia a lo largo de todo este tiempo.

Al Dr. Zaúl García Esquivel, por todo el apoyo y guía a lo largo de este proceso, por siempre estar dispuesto a ayudar. Por su paciencia y por facilitar siempre el desarrollo académico a través de sus conocimientos. Y además de lo académico, por ser una gran persona, por sus pláticas y consejos, por seguir adelante con el trabajo a pesar de las dificultades presentadas.

A mi mamá y hermanos por estar ahí, por apoyarme, por creer siempre en mí.

CONTENIDO

RESUMEN.....	II
DEDICATORIA.....	III
AGRADECIMIENTOS.....	IV
CONTENIDO.....	VI
LISTA DE FIGURAS.....	VIII
LISTA DE TABLAS.....	X
LISTA DE ABREVIACIONES.....	XIII
INTRODUCCIÓN.....	14
ANTECEDENTES.....	18
CICLO REPRODUCTIVO DE PANOPEA SPP.....	18
RESERVAS BIOQUÍMICAS DURANTE LA GAMETOGÉNESIS	20
VITELOGENINAS / VITELINAS	21
OBJETIVO GENERAL.....	26
OBJETIVOS PARTICULARES.....	26
METODOLOGÍA.....	27
MUESTREO MENSUAL DE ORGANISMOS EXPERIMENTALES.....	27
OBTENCIÓN DE MUESTRAS.....	28
<i>Extracción de Hemolinfa.....</i>	28
<i>Obtención de tejidos.....</i>	28
ANÁLISIS HISTOLÓGICOS.....	29
ANÁLISIS HISTOQUÍMICOS.....	31
ANÁLISIS BIOQUÍMICOS.....	33
.....	35
ANÁLISIS MOLECULARES.....	35
ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	37
RESULTADOS.....	39
VARIABLES MORFOMÉTRICAS Y PROPORCIÓN DE SEXOS.....	39
<i>Biometrías.....</i>	39
<i>Proporción de sexos</i>	40
HISTOLOGÍA E HISTOQUÍMICA.....	40
<i>Histología</i>	40
<i>Histoquímica.....</i>	44
TEMPERATURA Y ESTADIOS DE DESARROLLO.....	48
CAMBIOS BIOQUÍMICOS.....	50
<i>Hembras.....</i>	50

<i>Machos</i>	52
OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DEL TRANSCRITO DEL GEN DE VT/VTG....	55
DISCUSIONES	60
.....	65
CONCLUSIONES	66
LITERATURA CITADA	67
APÉNDICES	75
APÉNDICE A	75
<i>Deshidratación</i>	75
<i>Inclusión</i>	76
<i>Corte</i>	76
<i>Tinción</i>	77
APÉNDICE B	79
<i>Reactivo BCA</i>	79
<i>Solución reactiva de triglicéridos</i>	79
<i>Solución reactiva de glucosa</i>	79
APÉNDICE C	80
BIOMETRÍAS COMPARACIÓN ENTRE SEXOS.....	80
BIOMETRIAS AMBOS SEXOS POR MES.....	80
DIÁMETRO DE OVOCITOS POR ESTADIO Y TIEMPO.....	81
% DE COBERTURA DE ESPERMA POR ESTADIO Y TIEMPO.....	81
HISTOQUÍMICA	82
COMPONENTES BIOQUÍMICOS EN HEMBRAS POR ESTADIOS.....	83
<i>Hemolinfa</i>	83
<i>Gónada</i>	84
<i>Glándula digestiva</i>	86
COMPONENTES BIOQUÍMICOS MACHOS POR ESTADIOS.....	87
<i>Hemolinfa</i>	87
<i>Gónada</i>	88
<i>Glándula digestiva</i>	90

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Serie histórica de la producción anual de almeja generosa en Baja California (modificada del DOF, 27 de febrero del 2012).	2
2	Modelo general de síntesis y transporte de vitelogenina, propuesto a partir del conocimiento generado de varios estudios (Mommsen y Walsh 1988; Li et al. 1998; Osada et al. 2003; Matsumoto et al. 2003; Serrano-Pinto et al. 2005).	10
3	Localización de la zona de colecta de organismos experimentales de la almeja de sífon <i>Panopea globosa</i> , en San Felipe, Baja California, México.	15
4	Metodología utilizada para la obtención de muestras de tejido <i>Panopea globosa</i> . A) Toma de la muestra de hemolinfa de la cavidad pericardial de la almeja. B) Eliminación de la concha para tomar la gónada. C) Vista de la gónada antes de tomar las muestras. D) Corte de la gónada en el cassette de inclusión para los análisis histológicos.	17
5	Secuencia de pasos utilizados para la preparación y cortes histológicos de tejido de <i>P. globosa</i> , así como su tinción final con la técnica Hematoxilina – Eosina (adaptado de Humanson, 1977).	18
6	Tratamiento de muestras histológicas y técnicas Azul Alciano PAS y Sudán Negro para la tinción de carbohidratos y lípidos en tejidos.	20
7	Diagrama de flujo sobre el procedimiento utilizado para la evaluación cuantitativa de proteínas, triglicéridos, glucosa y lípidos totales realizados con las muestras de hemolinfa, glándula digestiva y gónada de <i>P. globosa</i> .	22
8	Diagrama de flujo sobre el procedimiento utilizado para la evaluación cuantitativa de glucógeno y carbohidratos totales en muestras de hemolinfa, glándula digestiva y gónada de <i>P. globosa</i> .	23
9	Cambios mensuales en el porcentaje mensual de machos y hembras (barras) y proporción final de sexos muestreados (pastel, 2:1).	28
10	Fotomicrografías representativas de los estadios de desarrollo gonadal observados en machos y hembras de <i>Panopea globosa</i> . A= Previtelogénesis (PVt), B = espermatogénesis temprana (ES), C = vitelogénesis temprana (EVt), D = espermatogénesis tardía (LS), E = vitelogénesis tardía (LVt), F = espermiogénesis (SG), G y H = desove parcial (PS), I y J = desovado o en reabsorción (SPS). og , ovogonias; opv , ovocitos previtelogénicos; om , ovocitos maduros; or , ovocitos residuales o atrésicos; n , núcleo; nc , nucléolo; l , lumen; gn , gonoducto; fc , folículo; pf , pared folicular; sg , espermatogonias; sy , espermatocitos; sz , espermatozoides; sd , espermoducto; sr , espermatozoides residuales; tc , tejido conectivo; mf , macrófagos; fg , fagocitos.	30
11	Mediana (Md) del diámetro de ovocitos y porcentaje de cobertura de esperma por estadio reproductivo. Pre-vitelogénesis (PVt); vitelogénesis temprana (EVt); vitelogénesis tardía (LVt); espermatogénesis temprana (ES); espermatogénesis tardía (LS); desove parcial (PS); postdesove (PSP). Letras distintas a un lado de los símbolos indican diferencias significativas ($P < 0.05$). Las barras de error indican percentiles del 25%.	31
12	Cambios temporales de la mediana (Md) del diámetro de ovocitos y porcentaje de cobertura de esperma durante los meses de madurez reproductiva. Letras distintas a un lado de los símbolos indican diferencias significativas ($P < 0.05$) Las barras de error indican percentiles del 25%	32
13	Fotomicrografías mostrando la tinción de triglicéridos (A – E) y carbohidratos (F – J) en cortes histológicos de gónada de hembras de <i>Panopea globosa</i> durante	34

	la gametogénesis.	
14	Fotomicrografías mostrando la tinción de triglicéridos (A – E) y carbohidratos (F – J) en cortes histológicos de gónada de machos de <i>Panopea globosa</i> durante la gametogénesis.	35
15	Contenido relativo (%) de carbohidratos (C) y triglicéridos (T) en gónadas de machos de <i>Panopea globosa</i> evaluados histoquímicamente a lo largo de la gametogénesis. Previtelogénesis (PVt); vitelogénesis temprana (EVt); vitelogénesis tardía (LVt); desove parcial (PS); postdesove (PSP).	36
16	Contenido relativo (%) de carbohidratos (C) y triglicéridos (T) en gónadas de machos de <i>Panopea globosa</i> evaluados histoquímicamente a lo largo de la gametogénesis. Espermatogénesis temprana (ES); espermatogénesis tardía (LS); espermiogénesis (SG); desove parcial (PS); postdesove (SPS).	36
17	Cambios temporales en los estadios de desarrollo gonadal de hembras (A) y machos (B) de <i>P. globosa</i> , y registros continuos de temperatura (C) observados en la zona de estudio, San Felipe B. C.	38
18	Cambios cuantitativos de los componentes bioquímicos evaluados en: A) hemolinfa, B) glándula digestiva y C) gónada de hembras de <i>Panopea globosa</i> a lo largo de la gametogénesis. Previtelogénesis (PVt); vitelogénesis temprana (EVt); vitelogénesis tardía (LVt); desove parcial (PS); postdesove (PSP).	40
19	Cambios cuantitativos de los componentes bioquímicos evaluados en: A) hemolinfa, B) glándula digestiva y C) gónada de machos de <i>Panopea globosa</i> a lo largo de la gametogénesis. Espermatogénesis temprana (ES); espermatogénesis tardía (LS); espermiogénesis (SG); desove parcial (PS); postdesove (SPS).	42
20	Bandas del transcrito del gen Vt/Vtg expresados en gel de agarosa, utilizando muestras de glándula digestiva de hembras de <i>P. globosa</i> . Se usaron primers de ostión (banda 1 y 2) y de escalopas (banda 3). Bandas 1 y 2 = hembras en estadio SP, banda 3 = hembras en estadio LVt.	44
21	Bandas purificadas del transcrito del gen Vtn/Vtg de glándula digestiva de hembras de <i>P. globosa</i> . Se utilizaron primers de ostión (banda 1 y 2) y de escalopas (banda 3). Bandas 1 y 2 = hembras en estadio SP, banda 3 = hembras en estadio LVt.	46
22	Bandas del transcrito del gen Vtn/Vtg de <i>P. globosa</i> obtenidas mediante electroforesis en gel de agarosa en machos maduros (estadio SG), hembras inmaduras (estadio PVt) y hembras maduras (Evt y LVt). ESC = Marcador de ADN.	48
23	Comparación de los registros continuos de temperatura durante invierno 2011-2012 (línea continua) y 2010 – 2011 (línea punteada, Sánchez León-Hing, 2012).	50

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Descripción de las fases y los estadios de desarrollo gonádico de hembras y machos de la almeja <i>Panopea zelandica</i> (adaptada de Gribben, 2004).	7
2	Secuencias de ARNm y peptídicas de vitelinas, reportadas en la base de datos "Genbank", para diferentes especies de bivalvos marinos (adaptada de Sánchez León-Hing, 2012).	11
3	Promedio mensual de las variables morfométricas registradas en <i>P. globosa</i> durante el periodo de muestreo.	27
4	Coeficiente de correlación de Pearson (r) entre las variables histológicas cuantitativas (diámetro y área de ovocito y % de cobertura de esperma) y las variables bioquímicas obtenidas de hemolinfa, gónada y glándula digestiva de hembras y machos de <i>P. globosa</i> . CHOS = carbohidratos totales, PT= proteínas totales, GLU= glucosa, TGC = triglicéridos, GCG = glucógeno, LT = lípidos totales. ne = no evaluado. * = Correlación significativa con un nivel de significancia < 0.05).	43
5	Mezcla de reacción utilizada para amplificar el transcrito del gen Vt/Vtg mediante PCR, en muestras de glándula digestiva de <i>P. globosa</i> .	45
6	Secuencias de primers específicos del transcrito del gen Vtn/Vtg de <i>P. globosa</i> diseñados para PCR punto final y PCR tiempo real.	47
Apéndice A		
7	Rutina de deshidratación del procesamiento histológico.	64
8	Rutina de inclusión en parafina del procesamiento histológico.	65
9	Rutina de tinción Hematoxilina-Eosina.	66
Apéndice C		
10	T-Student para para comparar el peso de machos y hembras de <i>Panopea globosa</i> .	69
11	T-Student para para comparar la longitud de machos y hembras de <i>Panopea globosa</i> .	69
12	T-Student para para comparar el ancho de machos y hembras de <i>Panopea globosa</i> .	69
13	ANOVA para probar el efecto del tiempo sobre el peso de <i>Panopea globosa</i> (los datos incluyen ambos sexos).	69
14	ANOVA para probar el efecto del tiempo sobre la longitud de <i>Panopea globosa</i> (los datos incluyen ambos sexos).	70
15	ANOVA para probar el efecto del tiempo sobre el ancho de <i>Panopea globosa</i> (los datos incluyen ambos sexos).	70
16	Prueba de Kruskal-Wallis y prueba de Dunn para el probar el efecto del estadio de desarrollo sobre el diámetro de los ovocitos.	70
17	Prueba de Kruskal-Wallis y prueba de Dunn para el probar el efecto del tiempo de desarrollo sobre el diámetro de los ovocitos.	70

18	Prueba de Kruskal-Wallis y Prueba de Dunn para probar el efecto del estadio de desarrollo sobre el porcentaje de cobertura de esperma en gónada.	71
19	Prueba de Kruskal-Wallis y Prueba de Dunn para probar el efecto del tiempo sobre el porcentaje de cobertura de esperma en gónada.	71
20	Prueba de Kruskal-Wallis y Prueba de Dunn para probar el efecto de los estadios de desarrollo sobre el porcentaje carbohidratos en gónada de hembras.	71
21	Prueba de Kruskal-Wallis y Prueba de Dunn para probar el efecto de los estadios de desarrollo sobre el porcentaje de carbohidratos en gónada de machos.	71
22	ANOVA de una vía y prueba de Tukey para probar el efecto del periodo de muestreo sobre el porcentaje de lípidos en gónadas de hembras.	72
23	ANOVA de una vía y prueba de Tukey para probar el efecto del periodo de muestreo sobre el porcentaje de lípidos en gónadas de machos	72
24	Prueba de Kruskal-Wallis y Prueba de Dunn para probar el efecto de los estadios de desarrollo sobre las concentraciones de CHOS en hemolinfa (hembras).	72
25	ANOVA de una vía para probar el efecto de los estadios de desarrollo sobre las concentraciones de PT en hemolinfa (hembras).	73
26	Prueba de Kruskal-Wallis y prueba Dunn para probar el efecto de los estadios de desarrollo sobre la concentración de GLU en hemolinfa (hembras).	73
27	ANOVA de una vía y prueba de Tukey para probar el efecto de los estadios de desarrollo sobre las concentraciones de TGC en hemolinfa (hembras).	73
28	ANOVA de una vía y prueba de Tukey para probar el efecto de los estadios de desarrollo sobre las concentraciones de CHOS en gónada (hembras).	73
29	ANOVA de una vía y prueba de Tukey para probar el efecto de los estadios de desarrollo sobre las concentraciones de GCG en gónada (hembras).	74
30	ANOVA de una vía para probar el efecto de los estadios de desarrollo sobre las concentraciones de PT en gónada (hembras).	74
31	ANOVA de una vía y prueba de Tukey para probar el efecto de los estadios de desarrollo sobre las concentraciones de LT en gónada (hembras).	74
32	ANOVA de una vía para probar el efecto de los estadios de desarrollo sobre las concentraciones de GLU en gónada (hembras).	74
33	ANOVA de una vía para probar el efecto de los estadios de desarrollo sobre las concentraciones de TGC en gónada (hembras).	75
34	ANOVA para probar el efecto de los estadios de desarrollo sobre las concentraciones de CHOS en glándula digestiva (hembras).	75
35	ANOVA de una vía y prueba de Tukey para probar el efecto de los estadios de desarrollo sobre las concentraciones de GCG en glándula digestiva (hembras).	75
36	ANOVA de una vía para probar el efecto de los estadios de desarrollo sobre las concentraciones de PT en glándula digestiva (hembras).	75
37	ANOVA de una vía para probar el efecto de los estadios de desarrollo sobre las concentraciones de LT en glándula digestiva (hembras).	76

38	ANOVA de una vía para probar el efecto de los estadios de desarrollo sobre las concentraciones de GLU en glándula digestiva (hembras).	76
39	ANOVA de una vía y prueba de Tukey para probar el efecto de los estadios de desarrollo sobre las concentraciones de TGC en glándula digestiva (hembras).	76
40	ANOVA de una vía para probar el efecto de los estadios de reproductivos sobre las concentraciones de CHOS en hemolinfa (machos).	76
41	ANOVA de una vía para probar el efecto de los estadios de reproductivos sobre las concentraciones de PT en hemolinfa (machos)..	77
42	ANOVA de una vía para probar el efecto del estadio reproductivo sobre las concentraciones de GLU en hemolinfa (machos).	77
43	ANOVA de una vía para probar el efecto de los estadios de reproductivos sobre las concentraciones de TGC en hemolinfa (machos).	77
44	Prueba de Kruskal-Wallis y de Dunn para probar el efecto del estadio reproductivo sobre las concentraciones de CHOS en gónada (machos).	77
45	Prueba de Kruskal-Wallis y de Dunn para probar el efecto del estadio reproductivo sobre las concentraciones de GCG en gónada (machos).	78
46	ANOVA de una vía para probar el efecto del estadio reproductivo sobre las concentraciones de PT en gónada (machos).	78
47	ANOVA de una vía y prueba de Tukey para probar el efecto del estadio reproductivo sobre las concentraciones de LT en gónada (machos).	78
48	ANOVA de una vía y prueba de Tukey para probar el efecto del estadio reproductivo sobre las concentraciones de GLU en gónada (machos).	78
49	Prueba de Kruskal-Wallis y de Dunn para probar el efecto del estadio de desarrollo sobre las concentraciones de TGC en gónada (machos).	79
50	ANOVA de una vía para probar el efecto del estadio reproductivo sobre las concentraciones de CHOS en glándula digestiva (machos).	79
51	ANOVA de una vía para probar el efecto del estadio reproductivo sobre las concentraciones de CHOS en glándula digestiva (machos).	79
52	ANOVA de una vía para probar el efecto del estadio reproductivo sobre las concentraciones de PT en glándula digestiva (machos).	79
53	ANOVA de una vía para probar el efecto del estadio reproductivo sobre las concentraciones de LT en glándula digestiva (machos).	80
54	ANOVA de una vía para probar el efecto del estadio reproductivo sobre las concentraciones de GLU en glándula digestiva (machos).	80
55	ANOVA de una vía y prueba de Tukey para probar el efecto del estadio reproductivo sobre las concentraciones de TGC en glándula digestiva (machos).	80

LISTA DE ABREVIACIONES

ADN: Ácido desoxirribonucleico	IIO: Instituto de Investigaciones Oceanológicas
ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario	CONAPESCA: Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca, México
ANOVA: Análisis de varianza	LT: Lípidos totales
ARN: Ácido ribonucleico	LTC: Longitud total de concha
ARN _m : Ácido ribonucleico mensajero	LS: Late Spermatogenesis
ATC: Ancho total de concha	LVt: Late Vitellogenesis
BCA: Ácido bicinconánico	NCBI: National Center for Biotechnology Information
C: Citocina	P ₁ : Secuencia parcial
C ₁ : Secuencia completa	PBS: Buffer Fosfato Salino
CHOS: Carbohidratos totales	PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
CIBNOR: Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste	PSP: Post-Spawned
CPG: Ganglio cerebral (Cerebral Pedal Ganglia)	PT: Proteínas totales
DEPC: Dietilpirocarbonato	PTG: Peso total en gramos
DIG: Digoxigenina	PVt: Pre-vitellogenesis
DNAsa: Desoxirribonucleasa	rpm: Revoluciones por minuto
ELISA: Ensayo de inmunoabsorción enzimática (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).	SG: Spermiogenesis
ES: Early Spermatogenesis	SP: Spawning
EVt: Early Vitellogenesis	SPS: Spawned
G: Guanina	TGC: Triglicéridos
GCG: Glucógeno	UABC: Universidad Autónoma de Baja California
GLM: General Lineal Model	VPF: Factor promotor vitelogénico
GLU: Glucosa	Vt: Vitelina
HE: Hematoxilina-Eosina	Vtg: Vitelogenina

INTRODUCCIÓN

Las almejas del genero *Panopea* (*P. generosa*) se han convertido en un valioso recurso desde que inició su pesquería en 1976, alcanzando valores para el año 2000 de hasta \$35 millones de dólares (Calderón-Aguilera et al., 2010). En México se cuenta con dos especies de almeja generosa, *P. generosa* en la Costa Pacífico de Baja California y *P. globosa* en el Golfo de California, la cual es endémica de México y tiene poco tiempo de estar siendo explotada, sin embargo su pesquería ha aumentado en los últimos años debido a su alto valor comercial (20 dólares por kg) y a su alta demanda en países asiáticos. En el año 2000 se capturaban 8.5 toneladas, mientras que para el 2002 la captura ascendía a 19 toneladas. Para el periodo del 2006 la pesca de almejas del genero *Panopea* en ambas costas de Baja California se encontró alrededor de las 1300 ton/año (Fig. 1), representando ingresos anuales de más de 18 millones de dólares (Calderón-Aguilera et al., 2010).

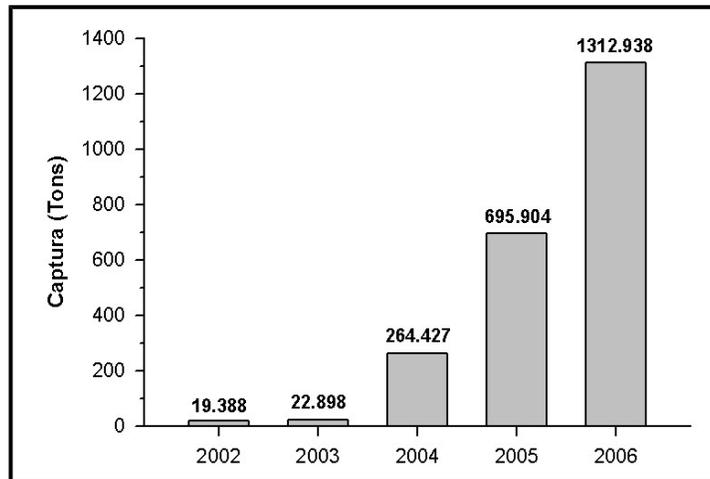


Figura 1. Serie histórica de la producción anual de almeja generosa en Baja California (modificada del DOF, 27 de febrero del 2012).

La almeja generosa presenta un crecimiento lento y una alta captura de pesca, por lo que recientemente se le ha dado importancia a su estudio, y se ha impulsado el desarrollo de la biotecnología para su cultivo y reproducción en condiciones controladas. Motivo por el cual se iniciaron trabajos desde el 2007 en el Laboratorio de Biotecnología de Moluscos del IIO de la UABC orientados a la producción de semilla de dicha especie.

El cultivo de cualquier especie en laboratorio requiere del conocimiento preciso sobre su ciclo reproductivo, así como de los mecanismos exógenos y endógenos involucrados en su control. Entre estos mecanismos se encuentran el almacenamiento y movilización de reservas energéticas hacia la gónada y la síntesis de otros metabolitos que forman parte crítica del desarrollo gonadal. La vitelogenina es una proteína crucial que típicamente se sintetiza en el hepatopáncreas y es transportada hacia la gónada para convertirse en vitelina, la cual constituye la principal reserva energética en el ovocito. Esta proteína es abundante particularmente en las hembras maduras, por lo que su uso potencial como indicador de sexo y grado de madurez puede ser importante, especialmente en almejas del género *Panopea* quienes no presentan dimorfismo sexual y sus gónadas están permanentemente cubiertas por el manto.

Todos los bivalvos marinos, presentan ciclos reproductivos que constan de periodos de formación de gametos, desove, fertilización, desarrollo larval, asentamiento, metamorfosis y crecimiento o madurez reproductiva (Sastry, 1979). Los ciclos gametogénicos ocurren regularmente durante toda la vida de adulto de algunos bivalvos e incluye periodos vegetativos seguidos por periodos de diferenciación, crecimiento citoplasmático, vitelogénesis/espermioagénesis (maduración), desove

(liberación de gametos) y reabsorción de los gametos que no fueron liberados, teniendo todo esto un efecto en el tamaño de la gónada (Sastry, 1979).

Estos periodos tienen un inicio y duración particular, y estarán regulados por factores endógenos (compuestos neuroendocrinos), los cuales requieren de una coordinación fisiológica que es estimulada por factores exógenos (temperatura, alimento, fotoperiodo, etc.). La intensidad del efecto de estos factores depende de la especie y del ambiente (Blancas-Arroyo, *et al.* 2008; Giese y Pearse 1979; Sastry, 1979). La temperatura del agua es el principal factor exógeno que influye sobre la gametogénesis de organismos acuáticos, en particular de los moluscos bivalvos (Sastry, 1979). Otro factor exógeno importante en la maduración gonadal es la disponibilidad de alimento ya que la gametogénesis es un proceso que demanda mucha energía para el organismo. Por lo tanto se requiere de un almacenamiento de nutrientes proporcionado por el alimento durante los periodos vegetativos y de una movilización de estos hacia la gónada. Está documentado que los moluscos bivalvos almacenan sus reservas energéticas principalmente en la glándula digestiva (lípidos), el manto (glucógeno) y el musculo aductor y (glucógeno y proteínas). De acuerdo con Bayne (1976), las especies oportunistas utilizan la energía del alimento recientemente ingerido para la gametogénesis, mientras que las especies conservadoras usan la energía almacenada previamente en varios órganos. Sin embargo, algunas especies pueden presentar ambos tipos de estrategias dependiendo del hábitat particular (Arellano-Martínez, 2005). La movilización de reservas desde los órganos de almacenamiento hacia la gónada ha sido probada en distintas especies a partir del aumento de dichas reservas en la gónada y la disminución simultánea de estas en el

órgano de almacenaje (Lodeiros et al., 2001; Ojea et al., 2002; Racotta et al., 2003; Vite-García, 2005). Entre las principales reservas están los lípidos y el glucógeno.

La maduración de los ovocitos se conoce como vitelogénesis y se caracteriza por la acumulación de las proteínas del vitelo, las cuales constituyen la fuente más importante de nutrientes para el desarrollo de los ovocitos, así como también para el desarrollo embrionario posterior (Serrano-Pinto et al., 2003). Las vitelinas (Vtn) de organismos ovíparos son generalmente sintetizadas fuera de los ovocitos, siendo su precursor la vitelogenina (Vtg). Esta molécula es sintetizada en el hígado (vertebrados), en el intestino (nematodos) o en el cuerpo graso (insectos) (Wahli, 1988). La Vtg es transportada por medio de la hemolinfa hacia los ovocitos en desarrollo. Las células de la pared folicular transforman la Vtg en Vtn mediante la adición de polisacáridos y lípidos (Tsukimura, 2001; Chen et al. 1999, en crustáceos). Durante esta fase se almacenan en el citoplasma del ovocito en desarrollo una serie de inclusiones, que Dorange y Le Pennec (1989) para *Pecten maximus* clasifican en: granos de secreción o inclusiones I (formadas por proteínas básicas, las cuales intervienen en la elaboración de una membrana de fecundación), inclusiones II (de tipo lipídico, que contienen tanto lípidos neutros como fosfolípidos), inclusiones III (glucoproteínas, pueden ser lisosomas) e inclusiones IV (partículas de glucógeno β).

Estudios previos llevados a cabo en *Panopea globosa* han descrito con cierto grado de detalle el ciclo reproductivo de esta especie tanto en las costas de Sonora (Aragón-Noriega et al. 2007) como de Baja California (Calderón-Aguilera et al., 2010; Sánchez-León-Hing, 2012). Sin embargo estos estudios no incluyen información sobre los procesos específicos involucrados en la gametogénesis, incluyendo el almacenamiento y movilización de reservas bioquímicas, o la síntesis y expresión de

proteínas específicas involucradas en la reproducción de *P. globosa*. Por esta razón, la presente investigación tuvo como objetivo principal identificar y cuantificar los principales sustratos energéticos presentes durante el desarrollo gonadal de *P. globosa*, así como determinar la expresión del transcrito del gen de vitelina (mRNA Vtn/Vtg).

ANTECEDENTES

CICLO REPRODUCTIVO DE Panopea spp.

Las almejas del género *Panopea* son organismos dioicos y no presentan dimorfismo sexual. La gónada es de color cremoso y forma un conjunto de órganos con el intestino, el estómago y glándula digestiva (Arambula-Pujol, 2008).

El desarrollo gametogénico de *P. generosa* y de *P. zelandica* inicia cuando la temperatura del agua disminuye, seguido de la maduración y desove al aumentar la temperatura del agua. La gametogénesis de *P. generosa* generalmente tiene una duración de 6 meses (Goodwin y Pease, 1989) y la *P. zelandica* 5 meses (Gribben et al., 2004). En contraste el desarrollo gametogénico de *P. globosa* tiene una duración de 3 meses. Inicia cuando la temperatura del agua es alta (28 °C) y desova en invierno, cuando la temperatura alcanza aproximadamente los 18 °C (Arambula-Pujol et al., 2008). Calderón-Aguilera et al. (2010) estudiaron el ciclo reproductivo de *P. globosa* en el alto Golfo de California, observando que el desove coincide con una alta productividad de fitoplancton en la zona.

El diámetro de los ovocitos parece ser un buen indicador del grado de madurez de las hembras. En este sentido Aragón-Noriega et al. (2007) observaron que el

diámetro de los ovocitos aumentó conforme avanzó la gametogénesis de *P. globosa*. Estos autores observaron cinco grados de madurez gonadal en los organismos muestreados en las costas de Sonora: 1) Actividad temprana, 2) Actividad tardía, 3) Madura, 4) Parcialmente desovado y 5) Desovado.

Recientemente Sánchez-León-Hing (2012), estandarizó un método no invasivo para extracción de hemolinfa y realizó una caracterización del ciclo gametogénico de *P. globosa* en San Felipe, B.C. Mediante técnicas histológicas e histoquímicas, este autor corroboró 5 estadios de madurez para la misma especie (Aragón et al., 2007; Calderón et al, 2010) (Tabla 1).

Tabla 1. Descripción de las fases y los estadios de desarrollo gonádico de hembras y machos de la almeja *Panopea zelandica* (adaptada de Gribben, et al. 2004).

Estadio	Machos	Hembras
	Espermatogénesis temprana	Pre-Vitelogénesis
Activo temprano	Folículos pequeños, con espermatogonias y paredes gruesas. Poco volumen de gónada y abundante tejido conectivo. Espermoductos contraídos	Folículos pequeños con ovogonias y ovocitos primarios. Paredes gruesas. Presencia de algunos ovocitos secundarios. Poco volumen de gónada y abundante tejido conectivo.
	Espermatogénesis tardía	Vitelogénesis temprana
Activo Tardío	Folículos más grandes, paredes no tan gruesas. Espermatogonias ocupan ~1/3 del folículo y predominan densas áreas de espermátides y espermatoцитos. Presencia de espermatozoides. Menos tejido conectivo y Espermoductos expandidos.	Folículos más grandes, paredes no tan gruesas. Mayor cantidad de ovocitos secundarios (elongados) y menos ovogonias y ovocitos primarios. Menor cantidad de tejido conectivo.
	Espermiogénesis	Vitelogénesis tardía
Maduro	Espermatogonias en actividad tardía. Predominan densas columnas de espermatozoides con las colas hacia el lumen. Muy poco tejido conectivo y Espermoductos totalmente expandidos.	Folículos grandes y paredes delgadas, los óvulos se encuentran libres en el lumen y tienen forma esférica. Poca actividad ovogénica dentro del folículo, excepto por unos pocos ovocitos primarios y

secundarios. Muy poco tejido conectivo.

	Desove parcial	Desove parcial
Desove Parcial	Folículos de menor tamaño y paredes delgadas. Espermatozoides, espermátides y espermatocitos menos abundantes. Aparecen espacios vacíos en el centro del lumen. Poco tejido conectivo y espermoductos expandidos. Espermatozoides visibles en los conductos.	Folículos grandes y paredes delgadas. Grandes espacios vacíos dentro del lumen, con algunos ovocitos libres y otros en el folículo. Presencia de ovocitos maduros. Muy poco tejido conectivo.
Desovado/ Reabsorción	Folículos pequeños y paredes gruesas. Gónada de menor tamaño y desorganizada. Abundante tejido conectivo (menos que en el estadio activo temprano). Presencia de espermatozoides (Espermoductos contraídos), ovocitos y óvulos remanentes remanentes. Gametos en procesos de reabsorción y fagocitosis.	

RESERVAS BIOQUÍMICAS DURANTE LA GAMETOGENESIS

Existen varios estudios sobre el almacenamiento y movilización de reservas en moluscos bivalvos. Lodeiros et al. (2001) demostraron que los carbohidratos almacenados en el manto de *Nodipecten sp.*, se consumieron hacia la etapa final de la gametogénesis, por lo que estos autores sugirieron que juegan un papel importante como reserva energética. Arellano-Martínez (2005) analizó la relación entre el ciclo de almacenamiento de reservas energéticas, la actividad reproductiva y el alimento disponible para la almeja mano de león, *Nodipecten subnodosus*. Los cambios estacionales en la composición bioquímica de los tejidos somáticos evidenciaron el almacenamiento y movilización de reservas energéticas durante la gametogénesis. Así en la gónada se observó una acumulación de proteínas, carbohidratos y lípidos. Al inicio de la gametogénesis las proteínas fueron transferidas desde la glándula digestiva y el manto, y a la mitad de la gametogénesis estos mismos compuestos además de los carbohidratos fueron movilizados desde el musculo aductor. Los carbohidratos fueron

movilizados desde el manto durante toda la actividad reproductiva. Finalmente, los lípidos se transfirieron desde la glándula digestiva durante la fase media y final de la gametogénesis. Darriba et al. (2005) analizaron los componentes bioquímicos en glándula digestiva, musculo aductor anterior, pie y gónada de la almeja *Ensis arcuatus* (Jeffreys, 1865), y su relación con los eventos reproductivos. Observaron que en el periodo de reposo de la gónada se acumularon lípidos (triglicéridos principalmente) en la glándula digestiva y glucógeno en el musculo aductor anterior y pie. También que al inicio de la gametogénesis, la energía requerida para este proceso fue proporcionada por triglicéridos y glucógeno movilizados desde la glándula digestiva y musculo hacia la gónada. Recientemente Sánchez León-Hing (2012) cuantificó los niveles de proteínas, lípidos y carbohidratos en la gónada y hemolinfa de hembras y machos de *P. globosa* a lo largo de un ciclo de maduración, y observó un aumento en la concentración de lípidos conforme avanzó la gametogénesis, así como una alta variabilidad de los carbohidratos por lo que se sugirió una utilización inmediata de este componente. Ese fue el primer estudio relacionado con la composición bioquímica de hemolinfa y gónada de *P. globosa*. No obstante hasta ahora no existe información sobre el papel que juegan los distintos órganos en la movilización reservas hacia la gónada en esta almeja. Lo cual es fundamental tanto para comprender su proceso reproductivo como para su reproducción en laboratorio.

VITELOGENINAS / VITELINAS

La Vtg es un precursor de la Vtn cuyo papel en la vitelogénesis está ampliamente documentado en vertebrados e invertebrados. En vertebrados como los peces, las células foliculares liberan estrógenos al torrente sanguíneo bajo la influencia de hormonas producidas por la glándula pituitaria (Fig. 2). El estrógeno entra al hígado

por difusión facilitada y estimula la síntesis de Vtg en los hepatocitos. La Vtg sintetizada es transportada por el torrente sanguíneo hacia la gónada, donde se une a un receptor proteínico específico en la membrana del ovocito y es introducida por micropinocitosis a los cuerpos microvesiculares. Los cuerpos microvesiculares transportan la Vtg hacia el núcleo donde se descompone por la acción de catepsinas en una cadena de lipovitulina pesada (LvH), la fosvitina (Pv), una cadena ligera de lipovitulina (LvL) y una glucoproteína (Nagel e Idler 1983; Mommsen y Walsh 1988; Specker y Sullivan 1994). Se ha sugerido que el mismo mecanismo de síntesis y transporte de Vtg/Vtn ocurre en moluscos (Matsumoto et al., 1997).

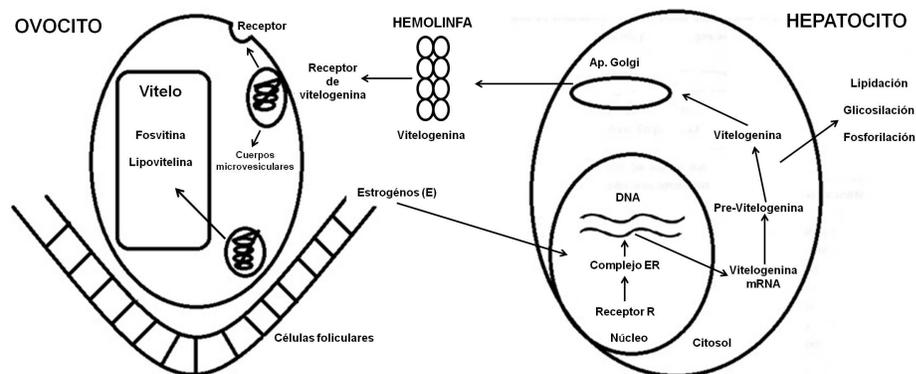


Figura 2. Modelo propuesto para el mecanismo de síntesis y transporte de vitelogenina (modificado de Mommsen y Walsh 1988; Li et al. 1998; Osada et al. 2003; Matsumoto et al. 2003; Serrano-Pinto et al. 2005).

Las técnicas moleculares desarrolladas a la fecha, han permitido la identificación de las secuencias completas y parciales de los ARN mensajeros (ARNm) que codifican para el gen de vitelina para algunas especies de bivalvos marinos, las cuales han sido reportadas en la base de datos llamada Genbank (Tabla 2).

Tabla 2. Secuencias de ARNm y peptídicas de vitelinas, reportadas en la base de datos “Genbank”, para diferentes especies de bivalvos marinos, C₁= Secuencia completa; P₁= Secuencia parcial (modificada de Sánchez-León-Hing, 2012).

Especie	Cdna	Secuencia de mRNA (id genbank)	Secuencia Peptídica (id genbank)	Referencia
<i>Mytilus edulis</i>	P ₁ (713bp)	AY679116.1	AAT72932.1	Puinea y Rotchell, 2006
<i>Crassostrea gigas</i>	C ₁ (5023bp)	AB084783.1	BAC22716.1	Matsumoto et al., 2003
<i>Pecten maximus</i>	P ₁ (1290bp)	AM943022.1	CAQ06469.1	Mauriz et al., 2008
<i>Chlamys farreri</i>	C ₁ (7604bp)	GQ227743.1	ADE05540.1	Qin et al., 2012
<i>Patinopecten yessoensis</i>	P ₁ (1698bp)	AB055960.1	BAB63260.1	Osada et al., 2004
<i>Mimachlamys nobilis</i>	C ₁ (7760bp)	JN638064.1	AFO66775.1	Zheng et al., 2012

La proteína Vtg/Vtn puede ser detectada y cuantificada mediante el ensayo inmunoenzimático conocido como ELISA, el cual puede realizarse utilizando anticuerpos monoclonales o policlonales, dirigidos contra este tipo de proteínas. Con esta aproximación se ha determinado que la Vtg es una proteína específica presente de manera abundante en las hembras de peces y moluscos marinos (Sumpter y Susan, 1995; Burgos-Aceves, 2003; Osada et al., 2003; Serrano-Pinto et al., 2005; Arcos et al., 2009), lo cual puede ser importante como una herramienta para determinar el grado de madurez de las hembras, y para identificar el sexo de especies cuya gónada no queda expuesta a la vista. Por ejemplo, en el lenguado de California

Paralichthys californicus, Burgos-Aceves (2003) estableció un inmunoensayo ELISA que le permitió evaluar cambios en los niveles de las vitelinas durante el ciclo reproductivo en hembras y encontró niveles de vitelogenina hepática, sanguínea y ovárica elevados y significativamente relacionados con el desarrollo gonádico. También en crustáceos como la langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus* se han detectado niveles elevados de Vtg hepática, sanguínea y ovárica asociados al grado de madurez (Serrano-Pinto et al., 2005). Los mismos autores determinaron mediante técnicas moleculares que la Vtg se expresó en el hepatopáncreas durante la vitelogénesis secundaria y que el ovario juega un papel importante en la producción Vtn, pero solamente en ciertas etapas de la vitelogénesis. En el camarón peneido *Marsupenaeus japonicus*, la Vtg es sintetizada en el ovario y hepatopáncreas, y se acumula en los ovocitos durante la madurez gonadal (Okamura et al., 2007). Los niveles de Vtg en la hemolinfa y de Vtg mRNA en el ovario y hepatopáncreas fueron altos durante la vitelogénesis, y se mantuvieron así hasta la maduración final, disminuyendo después de la ovoposición, además encontraron que hay una diferencia en la síntesis de Vtg mRNA en gónada y hepatopáncreas.

Estudios realizados en el ostión *Crassostrea gigas* (Li et al., 1998) y la escalopa *Patinopecten yessoensis* (Osada et al., 2003) demostraron que los tratamientos con estradiol *in vivo* estimularon la vitelogénesis e incrementaron los niveles de las vitelinas en la gónada. Llera-Herrera (2008) realizó un análisis de expresión cuantitativa por PCR tiempo real y encontró que la expresión de dos genes distintos de vitelogeninas en *Crassostrea gigas* es máxima cuando los ovocitos se encuentran completamente maduros. Recientemente Arcos et al. (2009) encontraron una estrecha relación entre las concentraciones de Vtn/Vtg y el grado de madurez gonadal de las hembras en el

ostión de placer *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1951) mediante el uso de técnicas histológicas cuantitativas e inmunológicas.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el papel que juegan la glándula digestiva, la hemolinfa y la gónada como sitios de almacenamiento y movilización de reservas energéticas en *Panopea globosa*, así como en la expresión del gen de la vitelogenina/vitelina (mRNA VTG/VT) durante la maduración gonadal.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar los niveles de reservas energéticas (proteínas, carbohidratos, lípidos, glucosa, triglicéridos y glucógeno) presentes en hemolinfa, glándula digestiva y gónada durante el desarrollo gonadal de *Panopea globosa*.
- Aislar y secuenciar el gen de la vitelogenina /vitelina específico de *Panopea globosa*.
- Comprobar si el gen de la vitelogenina /vitelina (mRNA Vtn/Vtg) se expresa en glándula digestiva y gónada durante la madurez reproductiva de *Panopea globosa*.
- Establecer indicadores bioquímicos potenciales para la identificación del sexo y grado de madurez de *Panopea globosa*.

METODOLOGÍA

MUESTREO MENSUAL DE ORGANISMOS EXPERIMENTALES

Para la realización de este estudio se obtuvieron organismos silvestres de la almeja *Panopea globosa* de Campo Núñez, ubicado en San Felipe, Baja California, México (Fig. 3) durante el periodo comprendido de septiembre de 2011 a febrero 2012. Se analizaron mensualmente 30 almejas, las cuales fueron marcadas individualmente y se registraron las siguientes variables morfométricas: longitud total de la concha (LTC), ancho total de la concha (ATC) y peso total en gramos (PTG), en el laboratorio de Biotecnología de moluscos del Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la UABC de Ensenada.

Después de la obtención de las variables morfométricas las almejas se pasaron a un tanque de 700 L acondicionado con agua de mar a la temperatura a la que se encontraba el agua en San Felipe al momento del muestreo, con recirculación continua y alimentadas con *Isochrysis* sp y *Chaetoceros* sp. Las almejas se mantuvieron en el tanque durante dos días para posteriormente tomar las muestras necesarias para las variables a analizar: hemolinfa, glándula digestiva y gónada.

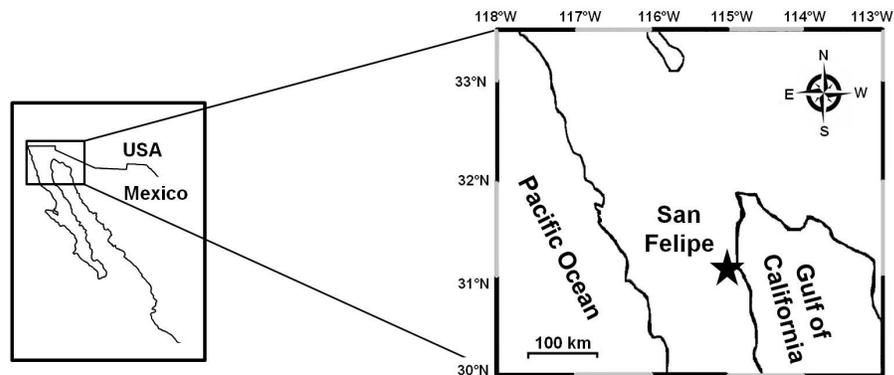


Figura 3. Localización de la zona de colecta de organismos experimentales de la almeja de sifón *Panopea globosa*, en San Felipe, Baja California, México.

OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Extracción de Hemolinfa

La obtención de hemolinfa de cada almeja se realizó con un método de extracción no invasivo estandarizado por Sánchez León-Hing (2012) (Fig. 4a). Se obtuvo un volumen de 500 µL de hemolinfa directamente de la cavidad pericardial de cada organismo con una jeringa para insulina de 1 mL previamente humedecida con una solución anticoagulante de oxalato de sodio al 5%. Cada muestra fue transferida a tubos eppendorf de 1.5 mL y se centrifugaron a 3600 rpm con una temperatura de 4 °C por 10 minutos. El sobrenadante fue colectado y las muestras se almacenaron a -80 °C hasta su envío al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) en la Paz, B.C.S., México, en donde se realizaron los análisis bioquímicos.

Obtención de tejidos

Con una navaja para micrótopo marca LEICA 818, pinzas y guantes, se obtuvo una muestra de glándula digestiva y dos muestras de gónada de la zona ventral media de cada una de las almejas de *P. globosa* (Figs. 4b, 4c y 4d). Una de las muestras de gónada (de aprox. 2 cm de largo) de cada almeja fue colocada en cassettes de inclusión para el análisis histológico con la etiqueta correspondiente, posteriormente se introdujeron en un recipiente de vidrio de 500 mL con solución Davidson y se almacenaron a temperatura ambiente para el análisis histológico. Las porciones de gónada y de glándula digestiva restantes (del tamaño de un frijol) fueron destinadas para los análisis bioquímicos y para la expresión del gen de la vitelina/ vitelogenina y se colocaron en tubos eppendorf nuevos de 1.5 mL con solución RNA-*later*® (Ambion).

Estas muestras fueron almacenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ y posteriormente enviadas con hielo seco al CIBNOR para su análisis.

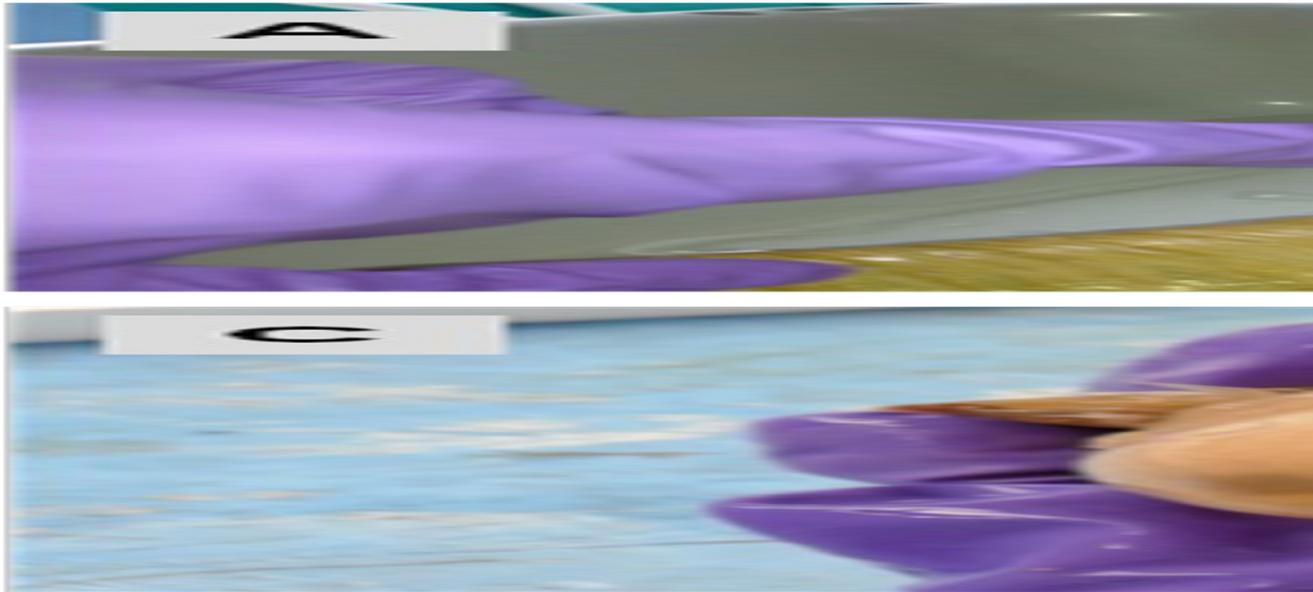


Figura 4. Metodología utilizada para la obtención de muestras de tejido de *Panopea globosa*. A) Toma de la muestra de hemolinfa de la cavidad pericardial de la almeja. B) Eliminación de la concha para tomar la gónada. C) Vista de la gónada antes de tomar las muestras. D) Corte de la gónada en el cassette de inclusión para los análisis histológicos.

ANÁLISIS HISTOLÓGICOS

Las porciones de gónadas embebidas en solución Davidson se utilizaron para determinar el sexo y estadio de madurez de cada almeja, estas fueron procesadas mediante técnicas histológicas ya establecidas en el Laboratorio de Histología del CIBNOR, La Paz, las cuales de manera general consisten en (Fig. 5):

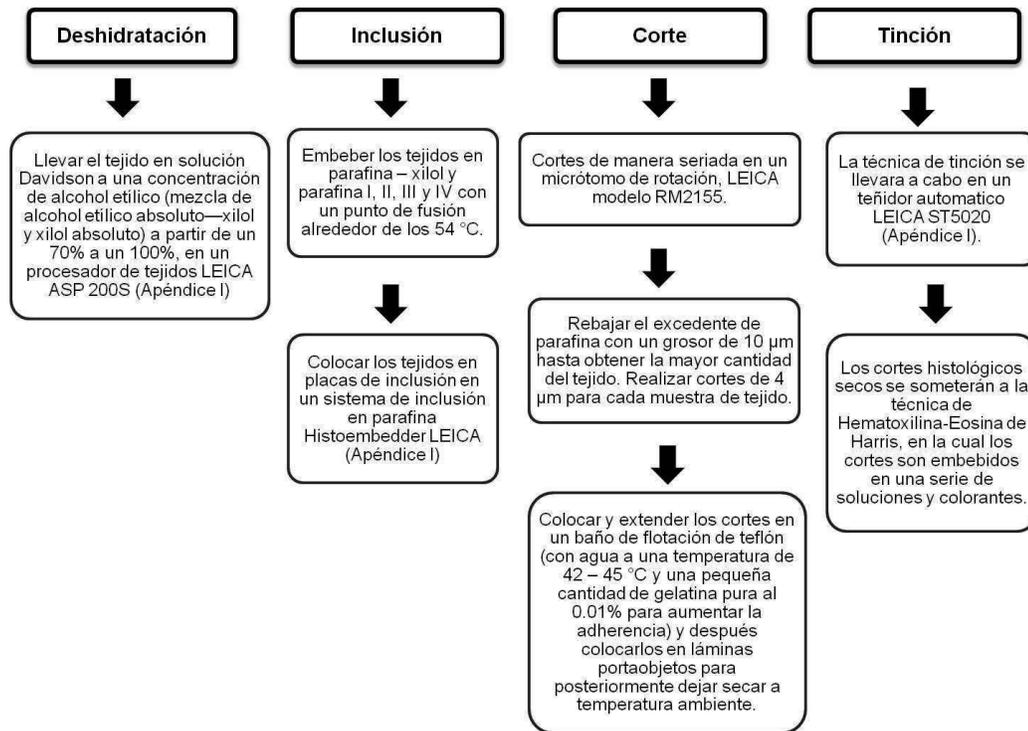


Figura 5. Secuencia de pasos utilizados para la preparación y cortes histológicos de tejido de *P. globosa*, así como su tinción final con la técnica Hematoxilina – Eosina (adaptado de Humanson, 1977).

De cada corte de tejido gonádico se generaron imágenes con los objetivos 10X y 20X y se analizaron mediante un sistema de análisis llamado ImagePro Plus versión 6.0.

La identificación de los estadios de desarrollo gonadal para machos y hembras se realizó en base a la clasificación propuesta por Gribben *et al.* (2004) y Sánchez-León-Hing (2012), considerando los siguientes estadios de desarrollo gonádico: 1) Previtelogénesis/Espermatogénesis temprana, 2) Vitelogénesis

temprana/Espermatogénesis tardía; 3) Vitelogénesis tardía/Espermiogénesis; 4) Parcialmente desovado y 5) Desovado/Reabsorción (Tabla 1; sección de Antecedentes).

De cada hembra se realizó un análisis cuantitativo de la gónada mediante el software SigmaScan Pro, versión 5.0. Las medidas obtenidas fueron el área y diámetro teórico en micras de cada uno de los ovocitos presentes. El diámetro teórico se calculó mediante la fórmula de la circunferencia propuesta por Saout *et al.* (1999):

$$D_T = \sqrt{4A/\pi}$$

donde,

D_T = diámetro teórico

A = área

π = 3.1416

Los cortes de gónada de los machos fueron analizados mediante el software Image-Pro Plus, versión 6.0, determinando el porcentaje de cobertura de esperma en base a la coloración que obtiene con la tinción hematoxilina-eosina.

Todas las mediciones realizadas fueron registradas en una hoja de cálculo en Excel.

ANÁLISIS HISTOQUÍMICOS

Una porción de las muestras conservadas en solución Davidson se utilizaron para determinar la concentración de lípidos y carbohidratos presentes en gónada y glándula digestiva durante los estadios reproductivos de *P. globosa*, mediante las técnicas Sudan Negro y Azul Alciano PAS. Estas muestras se procesaron mediante técnicas histológicas ya establecidas en el laboratorio de Histología del CIBNOR y se muestran en la figura 5, para lípidos se utilizó la tinción Sudán Negro y para carbohidratos Azul Alciano PAS (Fig. 6).

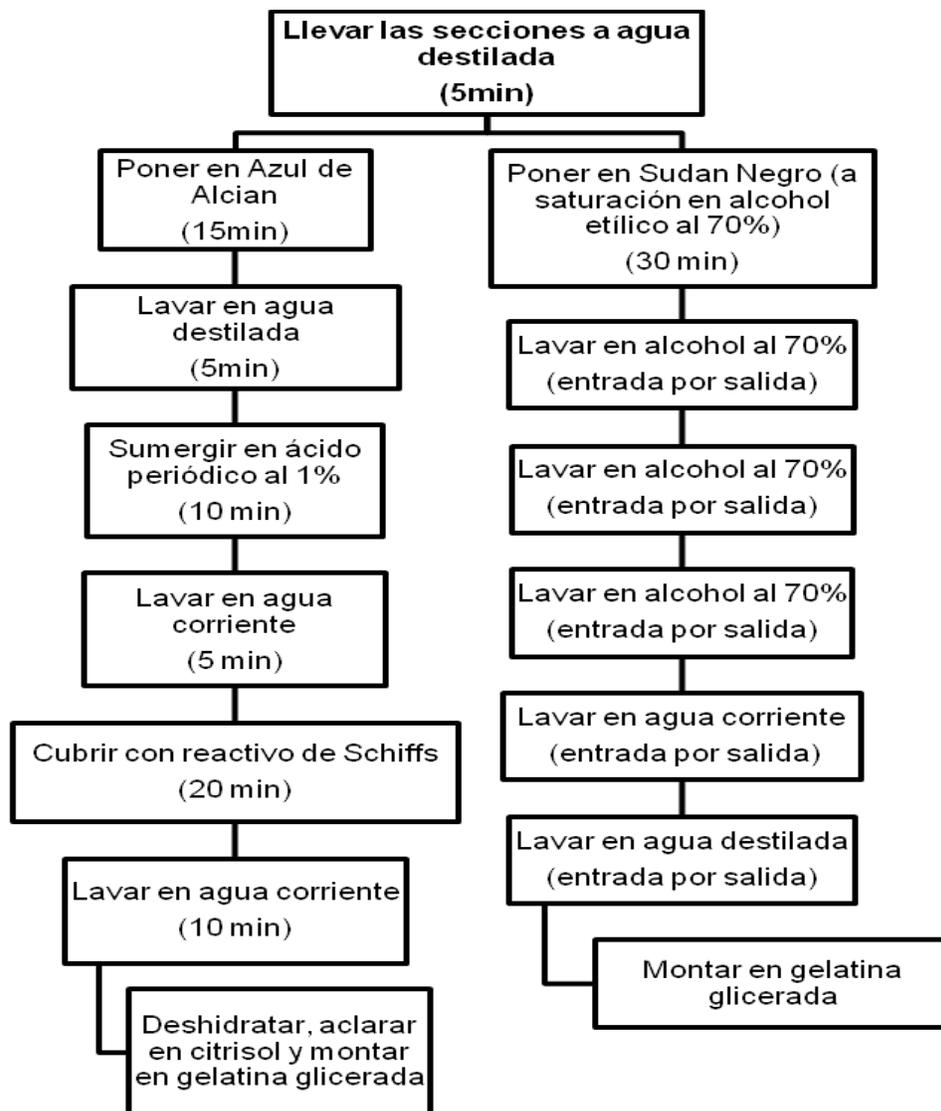


Figura 6. Tratamiento de muestras histológicas y técnicas Azul Alciano PAS y Sudán Negro para la tinción de carbohidratos y lípidos en tejidos.

De cada corte de tejido gonádico y de ambas tinciones se generaron imágenes con los objetivos 10X y 20X mediante un sistema de análisis llamado Image-Pro Plus versión 6.0. Para posteriormente obtener el porcentaje de cobertura de cada componente obtenido.

ANÁLISIS BIOQUÍMICOS

En las muestras de hemolinfa obtenidas de cada organismo se realizaron cuantificaciones de los niveles de los siguientes componentes bioquímicos: proteínas totales (PT) mediante el método de BCA (Sigma-Aldrich), carbohidratos totales (CHOS) mediante el método de Antrona (Roe, 1955), glucosa (GLU) mediante el método enzimático de la glucosa oxidasa y triglicéridos (TGC) mediante la determinación enzimática de glicerol utilizando la enzima glicerol fosfato oxidasa después de la hidrólisis por la lipoproteína lipasa. Para las muestras de gónada y glándula digestiva también se realizaron las determinaciones de los componentes obtenidos hemolinfa y además se cuantificaron lípidos totales (LT) por el método de la fosfovainillina (Barnes y Blackstock 1973) y glucógeno (GCG) mediante el método de antrona (Roe, 1955, previamente separado de los monosacáridos y otros compuestos hidrosolubles por precipitación con alcohol) (Fig. 7 y Fig. 8). Estos análisis se realizaron en el Laboratorio de Bioquímica Fisiológica, de CIBNOR, La Paz.

Antes de realizar las cuantificaciones las muestras de hemolinfa, de tejido gonádico y de glándula digestiva, fueron descongeladas. Del tejido gonádico y de glándula digestiva se pesó 0.1 gramos y se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 mL, posteriormente pasaron a un liofilizador Lyo-Centre Virtis por un período de 24 horas aproximadamente. Una vez terminado el proceso, se pesó la muestra seca y se colocaron en tubos nuevos previamente etiquetados. Posteriormente las muestras se hidrataron con 10% de agua destilada y se les colocaron unas esferas de cerámica con un poco de arena con el fin de mejorar el proceso de homogenización y fueron colocadas en un homogenizador de tejidos FAST PREP-24 por 1 minuto. Se eliminó la

arena y posteriormente se realizaron las cuantificaciones de los componentes bioquímicos antes mencionados.

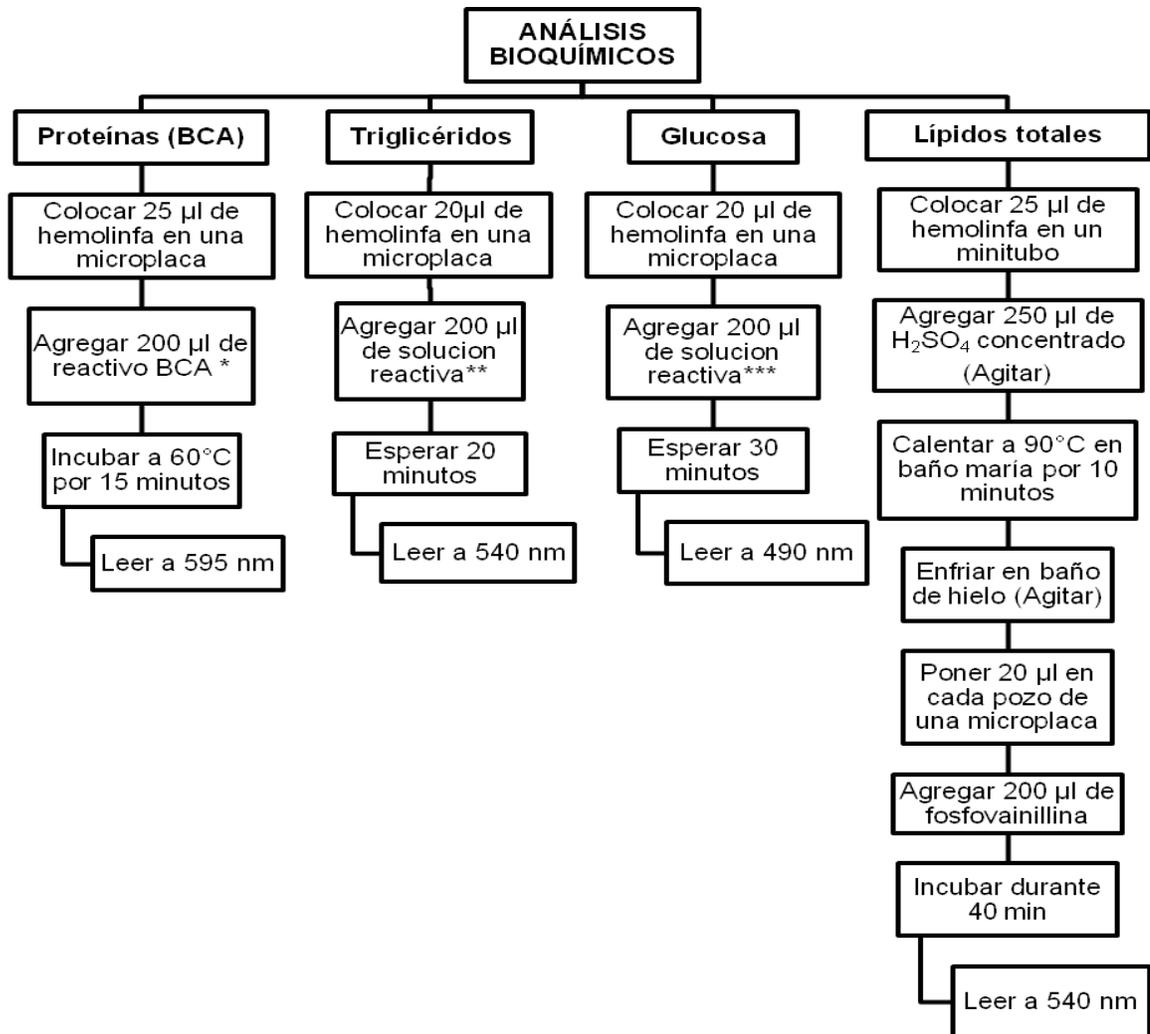


Figura 7. Diagrama de flujo utilizado para la evaluación cuantitativa de proteínas, triglicéridos, glucosa y lípidos totales en muestras de hemolinfa, glándula digestiva y gónada de *P. globosa*.

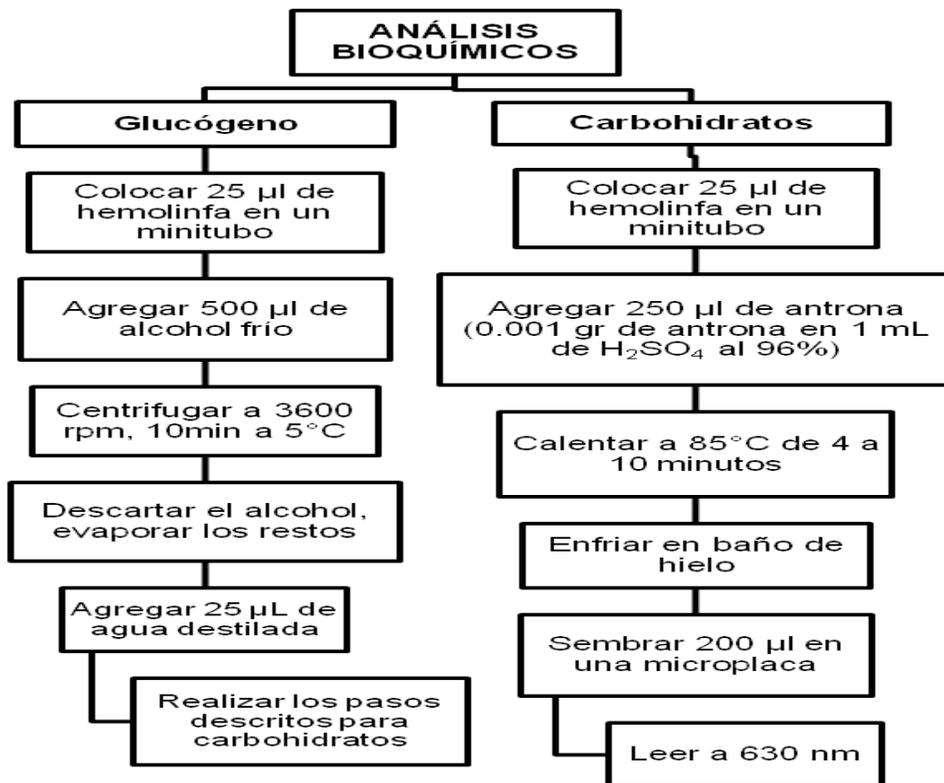


Figura 8. Diagrama de flujo utilizado para la evaluación cuantitativa de glucógeno y, carbohidratos totales s en muestras de hemolinfa, glándula digestiva y gónada de *P. globosa*.

ANÁLISIS MOLECULARES

Se estandarizó la técnica de extracción de ARN total de tejido gonádico y glándula digestiva por el método Tripure Isolation Reagent (ROCHE) (40% de fenol, 24% de guanidina y tiocianato) empleado organismos de prueba obtenidos del laboratorio de Biotecnología de moluscos del Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la UABC de Ensenada, B.C.

El DNA genómico residual se eliminó empleando DNAsa I (Promega). La integridad del RNA fue evaluada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% con

MOPS. Y su pureza mediante las relaciones 260/280 y 260/230 obtenidas a través del espectrofotómetro Nano Drop Thermo Scientific. El sistema de transcripción reversa Improm II (Promega) fue utilizado para la síntesis de cDNA.

Se probaron los *primers* del gen de vitelina/vitelogenina (VTGpgF 5'-GATGCTSGAAATGGCYGT-3'; VTGpgR 5'-TCTGTTCTTCTTGAATAAAGCA-3'; TM: 55 °C y con un producto de 841 pb) que fueron diseñados a partir de la presencia de un *motif* conservado de acuerdo a un alineamiento múltiple de este gen en *Chlamys farreri*, *Mimachlamys nobilis* y *Pecten maximus* (Tabla 2, sección de Antecedentes) partiendo de RNA total- cDNA de tejido gonadal de machos y hembras de los organismos de prueba. Una vez que se obtuvo el producto de amplificación se purificó y se envió a secuenciar a Macrogen (Korea).

Las secuencias obtenidas fueron analizadas en NCBI a través de blast ([http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastx&BLAST_PROGRAMS=blastx&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINK_LOC=blasthome) PROGRAM=blastx&BLAST_PROGRAMS=blastx&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINK_LOC=blasthome) para determinar la homología de las mismas con secuencias depositadas en GenBank para genes de la vitelina de moluscos bivalvos.

Con las secuencias evaluadas, se diseñaron *primers* específicos para *P. globosa* en ambos sexos, o considerando las posibles diferentes formas, utilizando el programa Primer3 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) de Rozen & Skaletsky (2000), considerando un tamaño de 19-21 bases, un porcentaje de G+C entre 50-60%, Tm entre 65-80°C, terminaciones en G o C, CG y GC. Evitando que los extremos 3' de los *primer* sean complementarios por la formación de dímeros además

de evitar la complementariedad, impidiendo la capacidad de formar estructuras tales como horquillas.

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Para comparar las variables morfométricas (peso total, longitud y ancho de concha) entre machos y hembras se utilizó una prueba t-Student.

Se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) considerando como factor el estadio de madurez gonadal (considerando hembras y machos por separado), para comparar promedios de cada una de las siguientes variables:

- a) Las concentraciones de los diferentes componentes bioquímicos obtenidos en hemolinfa y tejido gonádico: proteínas totales, lípidos totales, carbohidratos totales, glucosa, glucógeno y triglicéridos.
- b) El área y diámetro teórico de los ovocitos así como el porcentaje de cobertura de esperma.

Cuando los datos no pasaron los análisis de normalidad y de varianzas se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para comparación de medianas.

El nivel de significancia considerado fue de 0.05. En los casos donde se encontraron diferencias significativas se realizó un análisis “a posteriori” de comparación múltiple de promedios, usando la prueba de Tukey-Kramer para comparación de medias (paramétrica) o la prueba de Dunn para comparación de medianas (Zar, 1999).

También se realizaron análisis de correlación lineal simple de Pearson (r , Snedecor y Cochran, 1989) entre las siguientes variables:

- a) Componentes bioquímicos de la hemolinfa (proteínas totales, carbohidratos, triglicéridos y glucosa) de las hembras y aquellas variables asociadas con el grado de

madurez gonádica: el diámetro de los ovocitos y el porcentaje de cobertura de esperma.

b) Componentes bioquímicos analizados en la gónada (proteínas totales, lípidos totales, carbohidratos, triglicéridos, glucosa y glucógeno) de las hembras y aquellas variables asociadas con el grado de madurez gonádica: el diámetro de los ovocitos y el porcentaje de cobertura de esperma.

c) Componentes bioquímicos analizados en la gónada (proteínas totales, lípidos totales, carbohidratos, triglicéridos, glucosa y glucógeno) de las hembras y aquellas variables asociadas con el grado de madurez gonádica: el diámetro de los ovocitos y el porcentaje de cobertura de esperma.

Todos los análisis se realizaron mediante los programas de cómputo SigmaSTAT (versión 3.5).

RESULTADOS

VARIABLES MORFOMÉTRICAS Y PROPORCIÓN DE SEXOS

Biometrías

El peso promedio de hembras (1060 ± 33 gr, $n = 35$) y machos (1049 ± 20 gr, $n = 68$) no fue significativamente distinto (Prueba t-Student, $t = 0.286$, $P = 0.775$), por lo que se decidió manejar el promedio de todos los organismos para el procesamiento de las variables morfométricas. El peso promedio varió significativamente en función del tiempo (ANOVA, $F = 30.490$, $P = < 0.001$). Así en octubre se registró el menor peso promedio en los organismos (802 ± 18), aumentando significativamente para los meses de noviembre y diciembre (1179 ± 29 y 1204 ± 35) y disminuyendo nuevamente en enero y febrero (Prueba de Tukey, $P < 0.050$) (Tabla 3). También en la longitud de concha se observaron diferencias significativas (ANOVA, $F = 28.043$, $P = < 0.001$), siendo el mes de noviembre en el que se colectaron organismos con longitud de concha significativamente más larga (15.6 ± 0.21 cm) que en el resto de los meses de muestreo (Prueba de Tukey, $P < 0.05$). No se observaron diferencias significativas en el ancho de la concha en función del tiempo (ANOVA, $F = 1.238$, $P = 0.298$).

Tabla 3. Promedio mensual de las variables morfométricas registradas en *Panopea globosa* durante el periodo de muestreo.

	Octubre	Noviembre	Diciembre	Enero	Febrero
Peso promedio (gr)	^a 802.4 \pm 17.64	^b 1179.3 \pm 29.32	^b 1203.6 \pm 34.62	^c 1024.6 \pm 24.45	^c 1037 \pm 18.52
Largo promedio (cm)	^a 13.4 \pm 0.15	^b 15.6 \pm 0.21	^c 14.1 \pm 0.18	^c 13.95 \pm 0.10	^a 13.52 \pm 0.14
Ancho promedio (cm)	^a 8.6 \pm 0.08	^a 10.3 \pm 0.09	^a 9.6 \pm 0.14	^a 9.0 \pm 0.08	^a 8.90 \pm 0.06

Proporción de sexos

El porcentaje de hembras muestreadas fue mayor que el de machos durante los meses de octubre y noviembre (56 y 61% respectivamente), pero en los meses subsecuentes esta tendencia se invirtió, con un mayor porcentaje de machos (diciembre 83%; enero 74% y febrero 81%). Considerando el total de organismos muestreados (n=140), se observó un 67% de machos y un 33% de hembras, lo que arroja una proporción final de sexos de 2:1 (Fig. 9).

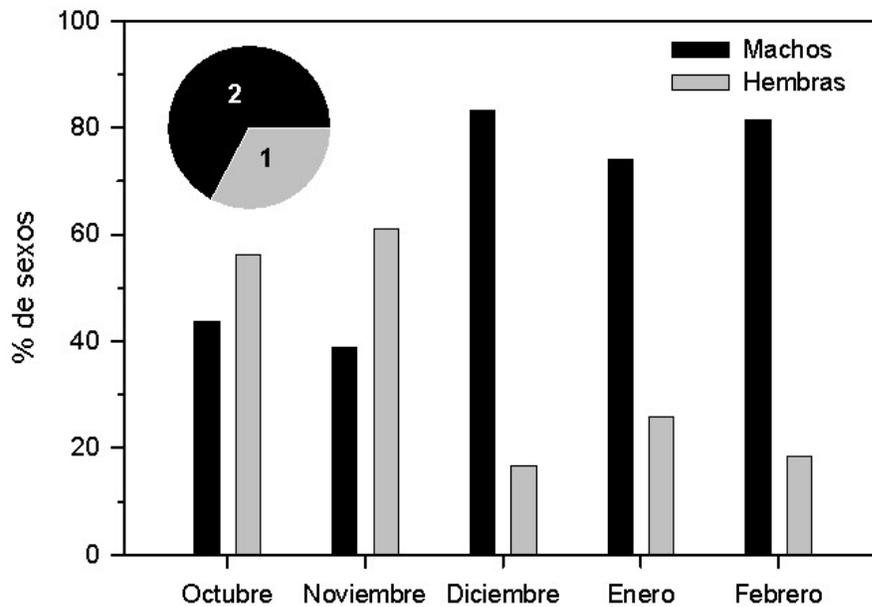


Figura 9. Cambios mensuales en el porcentaje mensual de machos y hembras (barras), y proporción final de sexos muestreados (pastel, 2:1).

HISTOLOGÍA E HISTOQUÍMICA

Histología

En el presente estudio se identificaron cinco estadios de madurez gonadal de hembras y machos de *P. globosa* con las siguientes características: 1) La previtelogénesis (PVt, Fig. 10 A) y espermatogénesis temprana (ES, Fig. 10 B) se

caracterizaron por la presencia de abundante tejido conectivo y folículos pequeños con ovogonias (hembras) y espermatogonias (machos); 2) Los estadios de vitelogénesis temprana (EVt, Fig. 10 C) y espermatogénesis tardía (LS, Fig. 10 D) presentaron una menor cantidad de tejido conectivo y folículos más grandes con ovocitos primarios, algunos secundarios y una menor cantidad de ovogonias (hembras) o espermatogonias (machos); 3) En el estadio de vitelogénesis tardía (LVt) se observaron folículos más grandes rellenos de ovocitos maduros en el lumen y algunos secundarios (Fig. 10 E), así mismo los machos en espermiogénesis (Sg) exhibieron folículos con una alta concentración de espermatozoides maduros (Fig. 10 F). En ambos casos se observó muy poco tejido conectivo; 4) El estadio de desove parcial (SP) se caracterizó por la reincorporación de tejido conectivo y folículos con una menor cantidad de ovocitos maduros en el lumen (hembras, Fig. 10 G). En los machos se observó menor densidad de espermatozoides en los folículos y conductos espermáticos de mayor tamaño (Fig. 10 H); 5) Los organismos desovados o con gónadas en proceso de reabsorción (PSP) presentaron gónadas con grandes espacios vacíos, fagocitos y macrófagos, así como un aumento en la cantidad de tejido conectivo entre los folículos (Fig. 10 I y 10 J).

El diámetro de los ovocitos y el porcentaje de cobertura de espermatozoides en la gónada variaron significativamente a lo largo del tiempo (ovocitos, Kruskal-Wallis, $H = 757.130$, $P < 0.001$; espermatozoides, $H = 152.190$, $P < 0.001$), y manifestaron un patrón tipo parábola (Fig. 11), que coincidió con los cambios en los estadios de madurez. Así, durante la vitelogénesis tardía se registraron los ovocitos con diámetro significativamente más grande ($Md = 84.512 \mu m$) que en el resto de los estadios (Prueba de Dunn, $P < 0.05$). En el caso de los machos se observó un pico

significativamente más alto de cobertura de espermatozoides durante la espermiogénesis (Md = 63.044 %) que en el resto de los estadios de desarrollo (Prueba de Dunn $P < 0.05$).

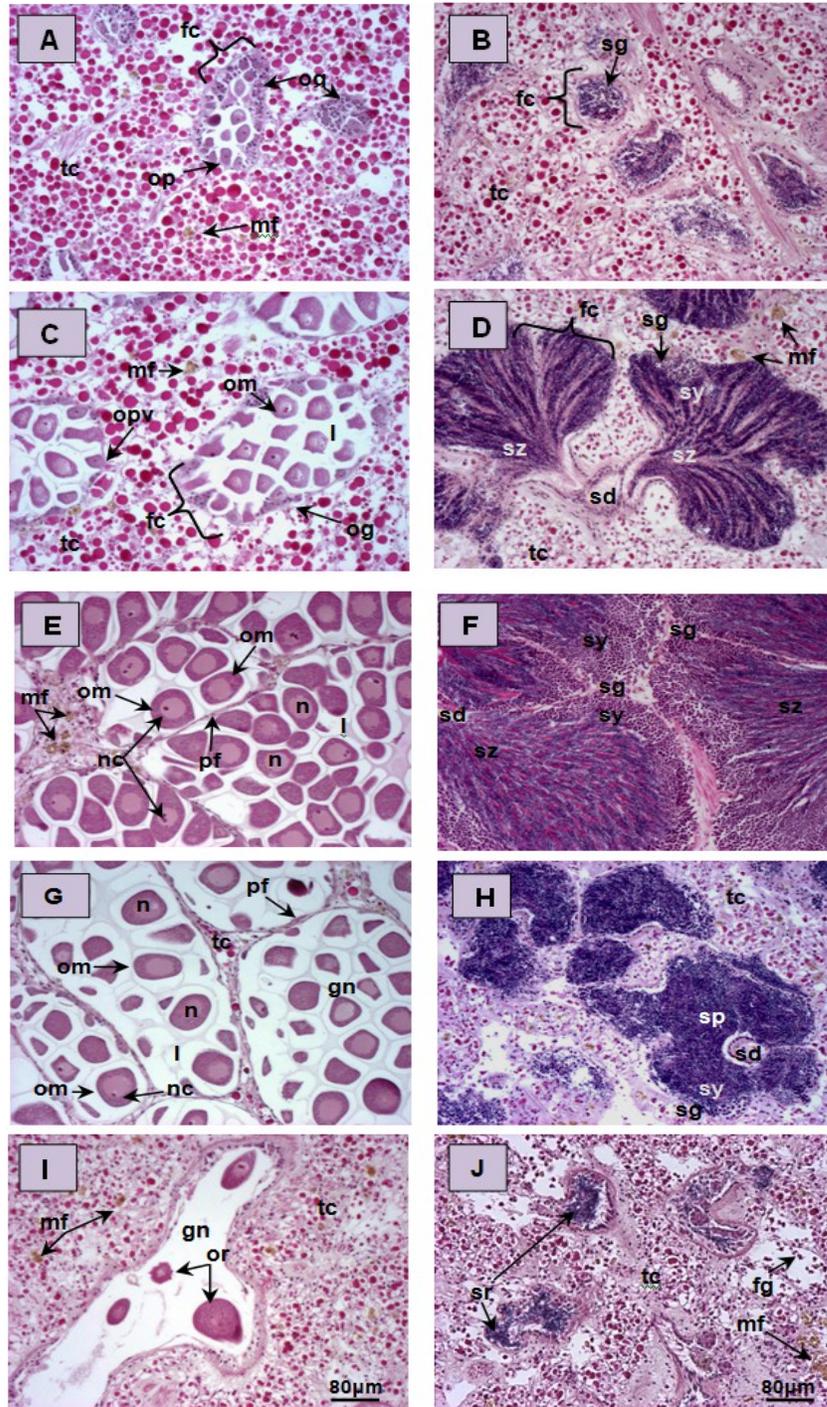


Fig. 10. Fotomicrografías representativas de los estadios reproductivos observados en hembras (A, C, E, G, I) y machos (B, D, F, H, J) de *Panopea globosa*. A= Previtelogénesis (PVt), B = espermatogénesis temprana (ES), C = vitelogénesis temprana (EVt), D = espermatogénesis tardía (LS), E = vitelogénesis tardía (LVt), F = espermiogénesis (SG), G y H = desove parcial (PS), I y J = desovado o en reabsorción (SPS). **og**, ovogonias; **opv**, ovocitos previtelogénicos; **om**, ovocitos maduros; **or**, ovocitos residuales o atrésicos; **n**, núcleo; **nc**, nucléolo; **l**, lumen; **gn**, gonoducto; **fc**, folículo; **pf**, pared folicular; **sg**, espermatogonias; **sy**, espermatocitos; **sz**, espermatozoides; **sd**, espermoducto; **sr**, espermatozoides residuales; **tc**, tejido conectivo; **mf**, macrófagos; **fg**, fagocitos.

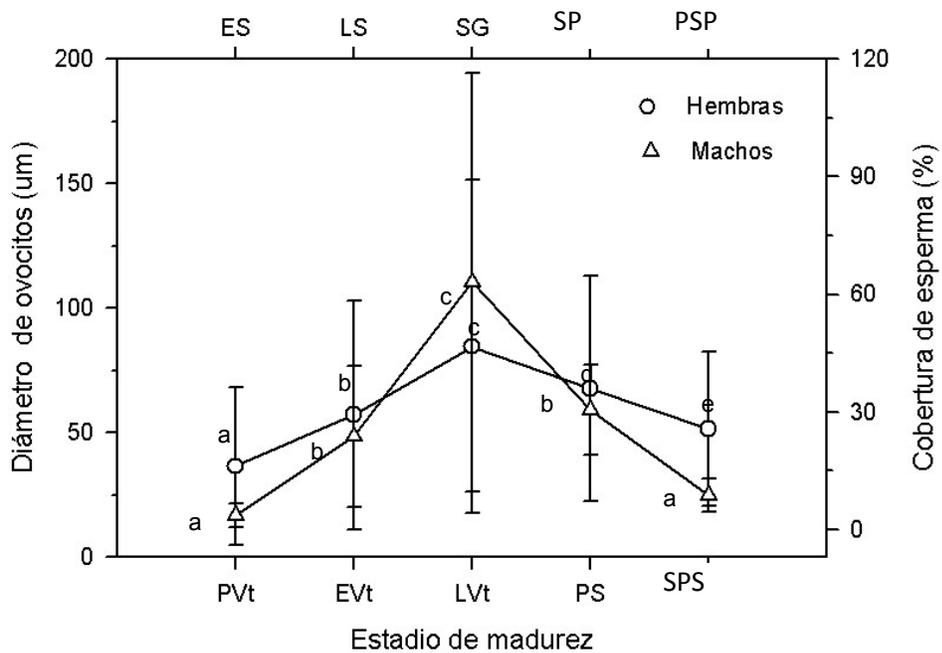


Figura 11. Mediana del diámetro de ovocitos y porcentaje de cobertura de espermia por estadio reproductivo. Pre-vitelogénesis (PVt); vitelogénesis temprana (EVt); vitelogénesis tardía (LVt); espermatogénesis temprana (ES); espermatogénesis tardía (LS); desove parcial (PS); postdesove (PSP). Letras distintas a un lado de las barras de error indican diferencias significativas entre los estadios de madurez gonadal ($P < 0.05$). Las barras de error indican percentiles del 25%.

El diámetro de los ovocitos expresado en función del tiempo también presentó diferencias significativas entre los meses muestreados (Kruskal-Wallis, $H = 1576.488$,

$P = <0.001$). Los valores máximos (Fig. 12) se observaron en noviembre (Md = 85.470) y enero pero en febrero disminuyeron significativamente los diámetros (Md = 40.543) (Prueba de Dunn $P < 0.05$). En el caso de los machos también se observaron diferencias significativas en función del tiempo (Kruskal-Wallis, $H = 132.455$, $P = <0.001$), con un máximo porcentaje de cobertura en diciembre (Md = 68 %). En enero esta variable presentó un valor mínimo (Md = 13 %, Prueba de Dunn $P < 0.05$), lo cual indica que para este mes ya estaban totalmente desovados.

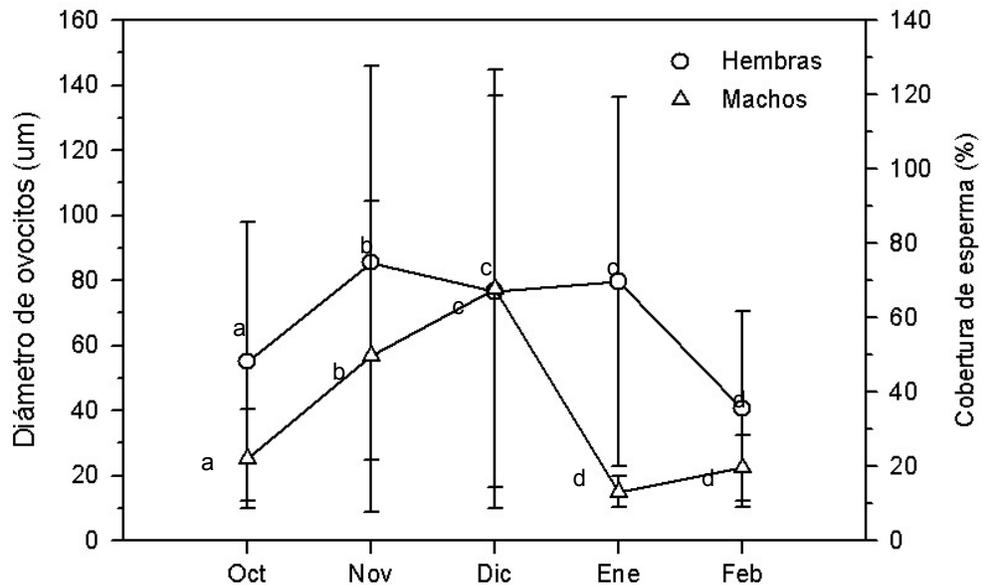


Figura 12. Cambios temporales de la mediana del diámetro de ovocitos y porcentaje de cobertura de esperma durante los meses de madurez reproductiva. Letras distintas a un lado de las barras de error indican diferencias significativas entre los meses muestreados ($P < 0.05$). Las barras de error indican percentiles del 25%.

Histoquímica

Los triglicéridos (tinción Sudán Negro) presentes en la gónada de machos y hembras fueron mas abundantes en los estadios PVt, EVt, ES y LS, y se observaron

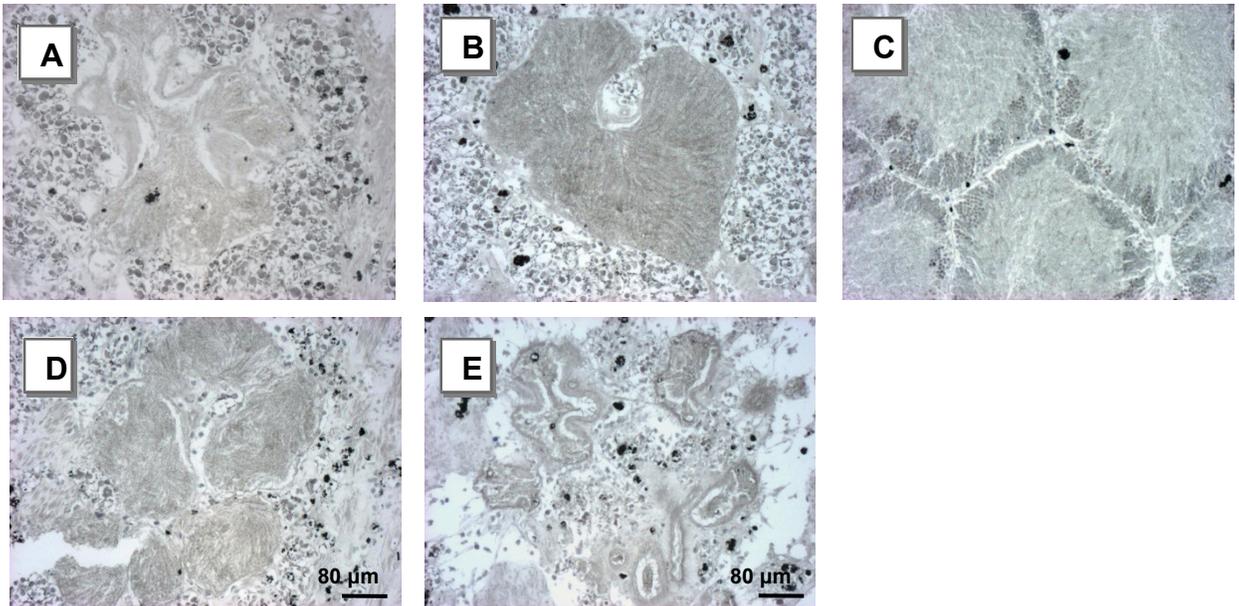
como pequeñas gotas de color negro con un diámetro aproximado entre 5 y 20 μm (Fig 13 y 14). En las hembras este componente disminuyó durante el cambio de previtelogénesis a vitelogénesis temprana (0.80% a un 0.29% respectivamente). Los valores más altos (1.91%) se observaron en el estadio de postdesove (ANOVA, $F = 3.859$, $P = 0.006$; Prueba de Tukey, $P < 0.050$) (Fig. 15). En los machos los triglicéridos disminuyeron desde 1.86% a un mínimo de 0.77% durante el cambio de espermatogénesis temprana a espermatogénesis tardía. En los siguientes estadios se observó un aumento gradual hasta alcanzar el máximo (2.03%) en organismos con gónadas en el estadio postdesove (ANOVA de una vía, $F = 7.936$, $P = < 0.001$; Prueba de Tukey, $P < 0.050$) (Fig. 16).

Los carbohidratos (tinción Azul Alciano PAS) presentes en las gónadas de hembras (Fig 13) y machos (Fig 14), se tiñeron en tonos magenta. Estos se localizaron principalmente en el tejido conectivo durante el inicio y final de la gametogénesis de hembras y machos, mientras que en los estadios intermedios se acumularon dentro de los ovocitos en forma de pequeñas gotas. Los porcentajes más altos de carbohidratos se detectaron durante la PVt (26 %), y tendieron a disminuir con el avance de la gametogénesis (PSP, 18%), sin embargo esta diferencia no fue significativa (Kruskal-Wallis, $H = 6.273$, $P = 0.180$). Durante la espermatogénesis temprana los carbohidratos presentaron los porcentajes más bajos (7.52%), y alcanzaron su máximo valor en la espermatogénesis tardía (28.68%). A partir de ahí disminuyeron paulatinamente hasta alcanzar nuevamente valores bajos en el estadio de desove/reabsorción (16.74%) (Kruskal-Wallis, $H = 46.322$, $P = < 0.001$; Prueba de Dunn, $P < 0.05$).

Figura 13. Fotomicrografías mostrando la tinción de triglicéridos (A – E, puntos negros) y carbohidratos (F – J, puntos rosas y magenta) en cortes histológicos de gónada de

hembras de *Panopea globosa* durante la gametogénesis.

TRIGLICÉRIDOS



CARBOHIDRATOS

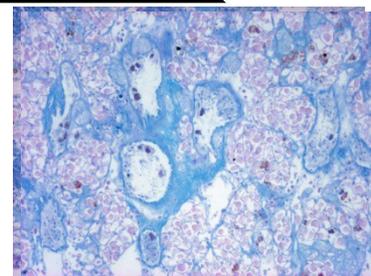
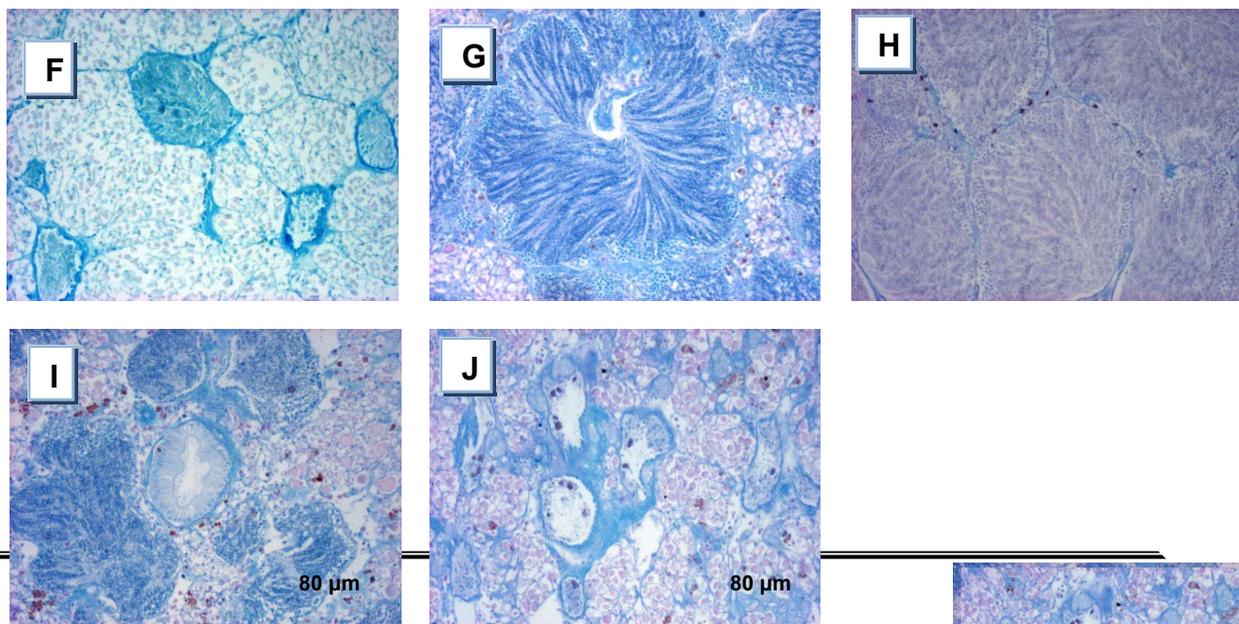


Figura 14. Fotomicrografías mostrando la tinción de triglicéridos (A – E, puntos negros) y carbohidratos (F – J, puntos rosas y magenta) en cortes histológicos de gónada de machos de *Panopea globosa* durante la gametogénesis.

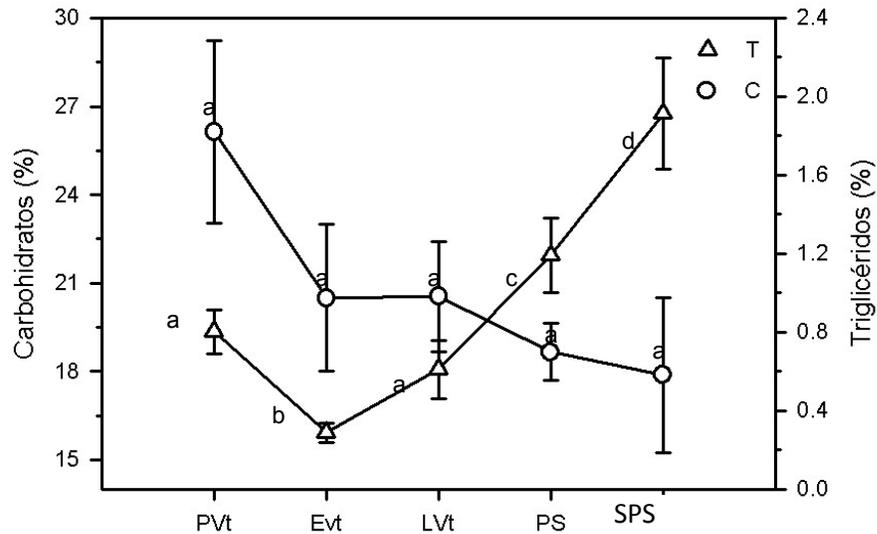


Fig. 15. Contenido relativo (%) de carbohidratos (C) y triglicéridos (T) en gónadas de machos de *Panopea globosa* evaluados histoquímicamente a lo largo de la gametogénesis. Previtelogénesis (PVt); vitelogénesis temprana (EVt); vitelogénesis tardía (LVt); desove parcial (PS); postdesove (PSP). Letras distintas a un lado de las barras de error indican diferencias significativas entre los estadios de madurez gonadal ($P < 0.05$)

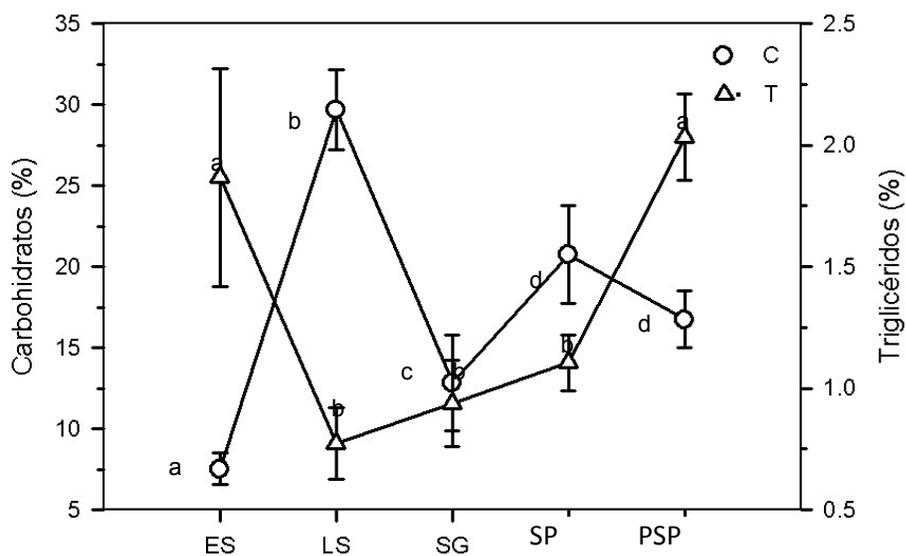


Fig. 16. Contenido relativo (%) de carbohidratos (C) y triglicéridos (T) en gónadas de machos de *Panopea globosa* evaluados histoquímicamente a lo largo de la gametogénesis. Espermatogénesis temprana (ES); espermatogénesis tardía (LS); espermiogénesis (SG); desove parcial (PS); postdesove (SPS). Letras distintas a un lado de las barras de error indican diferencias significativas entre los estadios de madurez gonadal ($P < 0.05$).

TEMPERATURA Y ESTADIOS DE DESARROLLO

En octubre la temperatura disminuyó de 29 a 27 °C (Fig.17 C) y durante este periodo alrededor del 90 % de las hembras y machos se encontraron en estadios tempranos de madurez gonadal (EVt y LS respectivamente). En noviembre cuando la temperatura bajó entre 22 y 19 °C, el 45% de las hembras se encontraron en LVt y otro 55% en SP (Fig. 17 A), mientras que el 100% de los machos estaban en el estadio SG (Fig.17 B). En diciembre cuando la temperatura bajo hasta 16 °C (Fig. 17C) se observó al 60% de las hembras en LVt y el resto en proceso de desove (SP). En contraste, cerca del 90 % de los machos se encontraron en estadio de máxima madurez (SG, Fig. 17 B). Para enero se observo todavía un alto porcentaje de hembras en proceso de desove (56% SP), pero el resto se encontró ya desovado y/o en proceso de reabsorción. En este mismo periodo se observaron los 5 estadios de madurez reproductiva para los machos, con mayores porcentajes en SP y ES. Finalmente, en febrero se observó más de la mitad de las hembras indiferenciadas y el resto en proceso de desove y postdesove, mientras que la mayoría de los machos (71%) también se encontró en fase de postdesove o indiferenciados (Fig. 17 C).

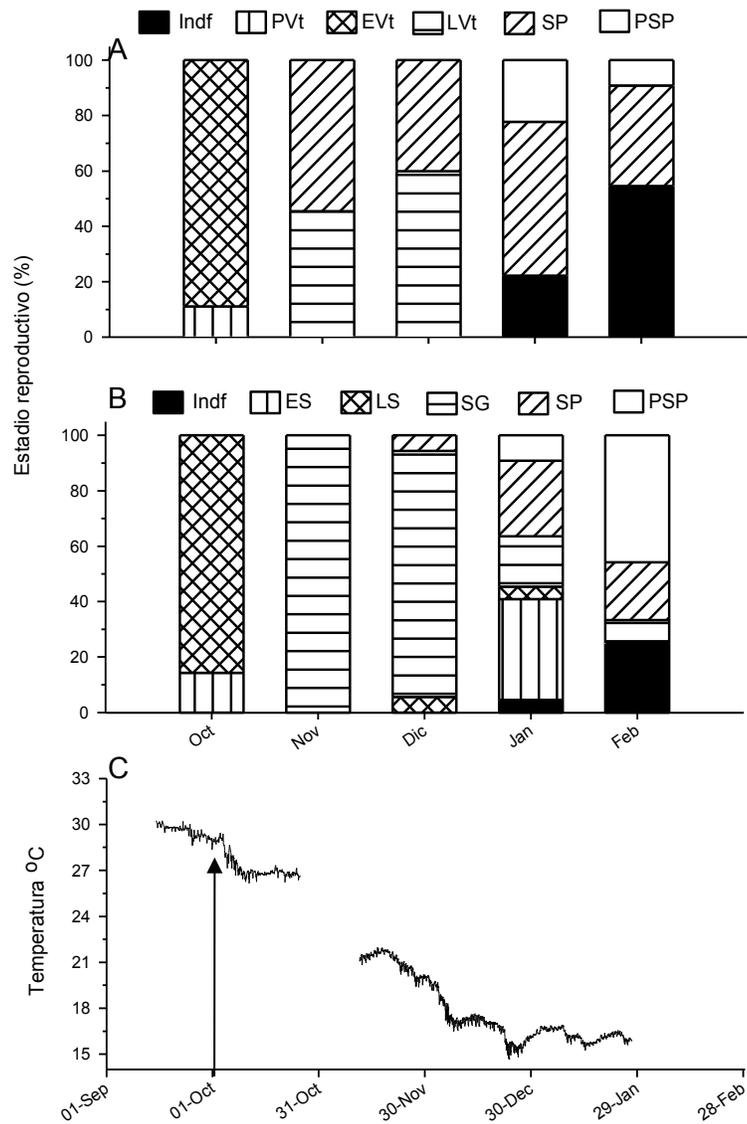


Figura 17. Cambios temporales en los estadios de desarrollo gonadal de hembras (A) y machos (B) de *P. globosa*, y registros continuos de temperatura superficial del agua (C) observados en la zona de estudio, San Felipe B. C.

CAMBIOS BIOQUÍMICOS

Hembras

Las proteínas y carbohidratos presentes en hemolinfa de hembras manifestaron una variación significativa en función del estadio de desarrollo gonadal (PT: ANOVA, $F = 5.343$, $P = 0.002$; CHOS: Kruskal-Wallis, $H = 9.787$, $P = 0.020$). Ambos componentes presentaron su máxima concentración en la EVt, y mantuvieron valores constantes a partir de LVt (PT: Prueba de Tukey, $P < 0.050$; CHOS: Prueba de Dunn, $P < 0.05$). En contraste los triglicéridos aumentaron de manera sostenida a partir de la LVt (ANOVA, $F = 3.087$, $P = 0.033$; Prueba de Tukey, $P < 0.050$). La glucosa se mantuvo constante durante todo el periodo reproductivo (GLU: Kruskal-Wallis, $H = 4.176$, $P = 0.243$) (Fig. 18 A).

Con excepción del glucógeno que disminuyó significativamente (ANOVA de una vía, $F = 4.463$, $P = 0.038$, Prueba de Tukey, $P < 0.050$) de forma casi lineal desde EVt hasta PSP (Fig. 18 B), el resto de los componentes bioquímicos cuantificados en la glándula digestiva no presentaron variaciones significativas durante la gametogénesis de *P. globosa* (ANOVA, $P > 0.05$).

La cantidad de glucosa, triglicéridos y proteínas totales presentes en las gónadas no varió significativamente durante la gametogénesis de *P. globosa* (ANOVA, $P > 0.05$) (Fig. 18 C). En contraste el resto de los componentes, manifestaron valores máximos al inicio de la gametogénesis (EVt) y disminuyeron a valores constantes a partir de LVt, con excepción del glucógeno que volvió a aumentar en organismos desovados (PSP, Fig. 18 C) (CHOS: ANOVA, $F = 14.009$, $P = 0.005$; LT: ANOVA, $F = 35.055$, $P = <0.001$; CGC: ANOVA, $F = 11.641$, $P = 0.008$, Prueba de Tukey, $P < 0.050$).

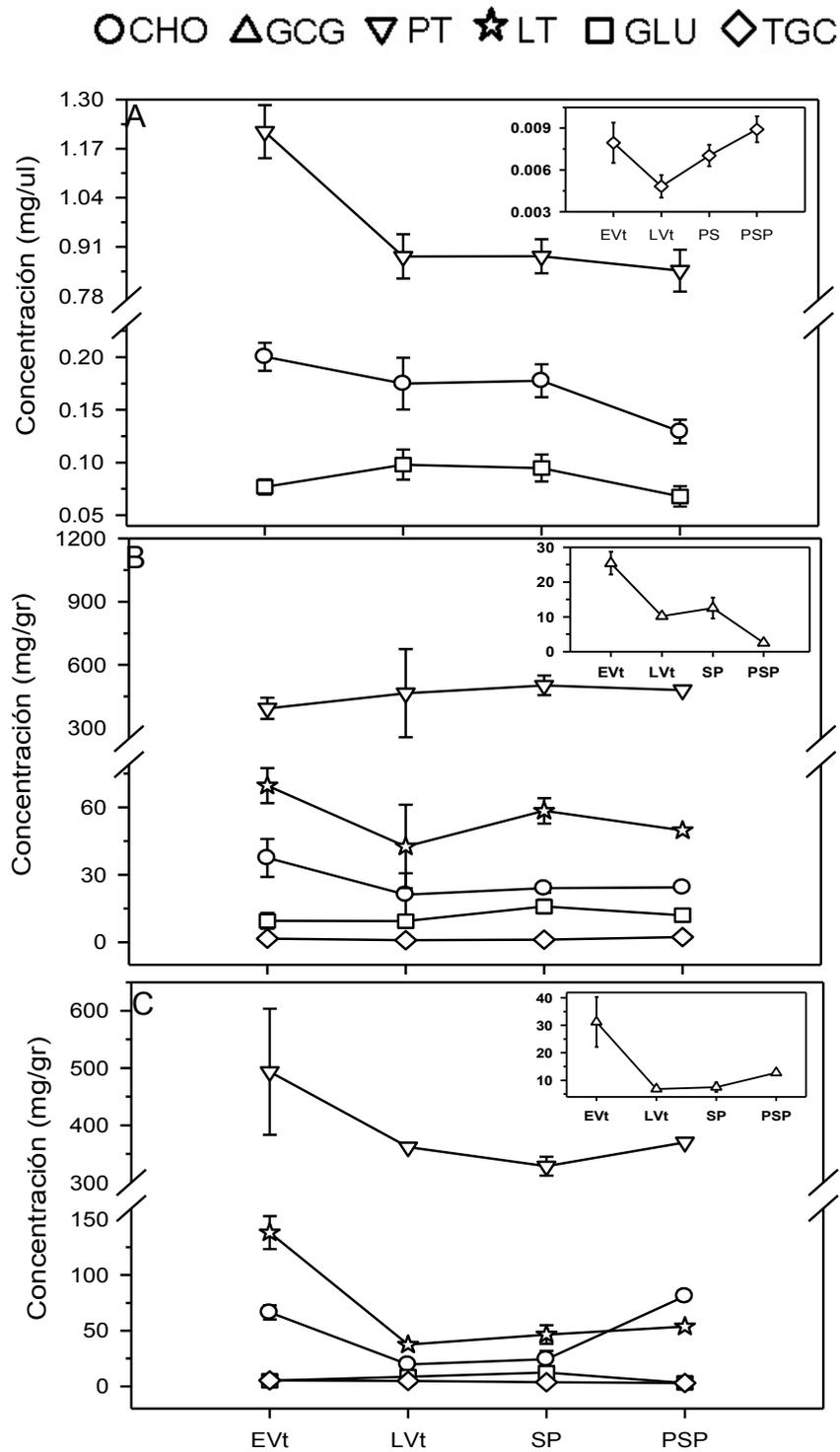


Figura 18. Cambios cuantitativos de los componentes bioquímicos evaluados en: A) hemolinfa, B) glándula digestiva y C) gónada de hembras de *Panopea globosa* a lo

largo de la gametogénesis. Previtelogénesis (PVt); vitelogénesis temprana (EVt); vitelogénesis tardía (LVt); desove parcial (PS); postdesove (PSP).

Machos

En hemolinfa al igual que en glándula digestiva ninguno de los componentes bioquímicos cuantificados presentó una variación significativa durante el desarrollo gonadal de *P. globosa* (ANOVA de una vía, $P > 0.05$) (Fig. 19 A).

Con excepción de las proteínas, el patrón por estadio de todos los componentes bioquímicos fue similar, disminuyendo significativamente del estadio LS al SG y aumentando en el estadio de PSP (Kruskal-Wallis, $P < 0.05$, Fig. 19 C).

I

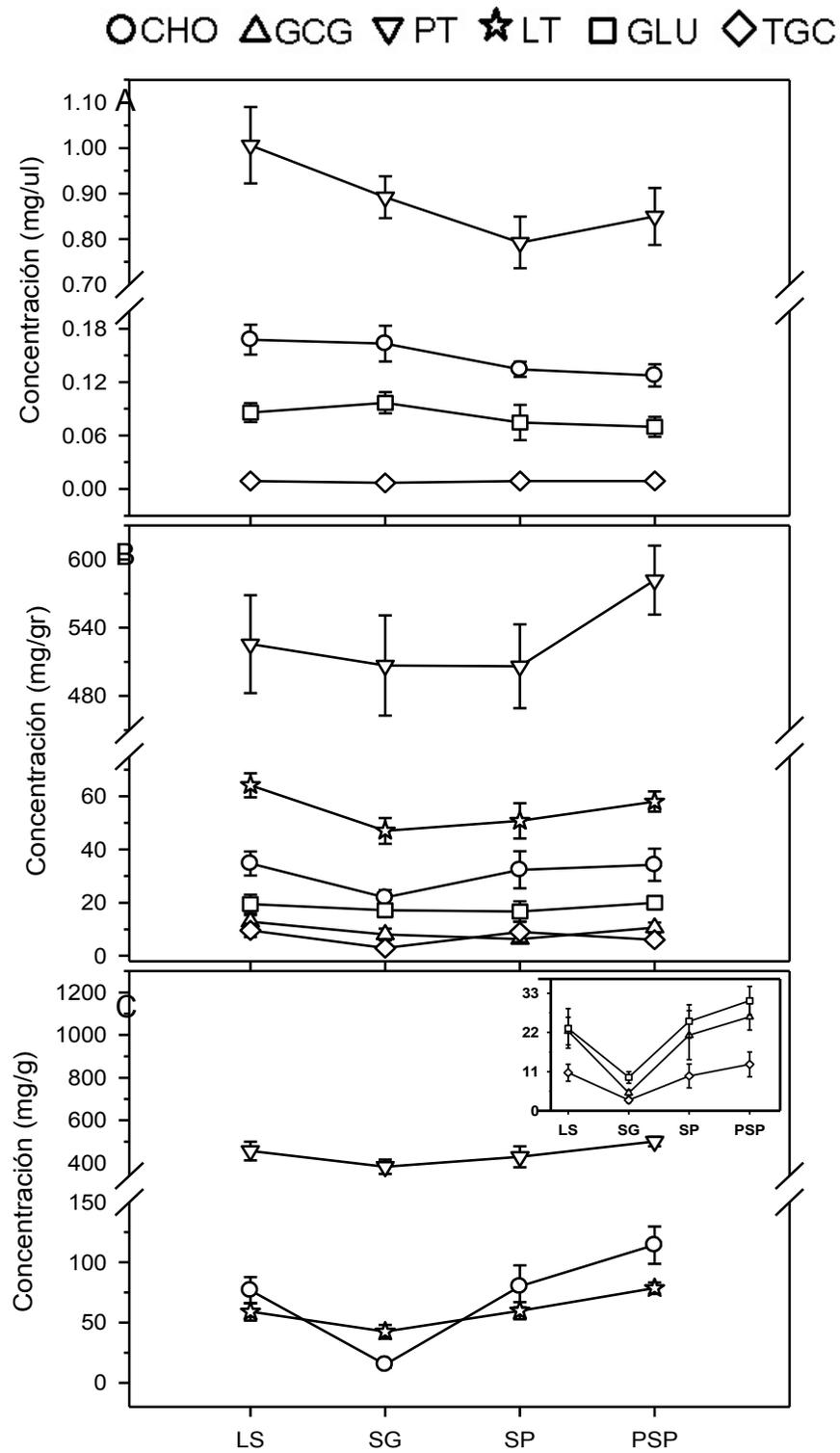


Figura 19. Cambios cuantitativos de los componentes bioquímicos evaluados en: A) hemolinfa, B) glándula digestiva y C) gónada de machos de *Panopea globosa* a lo

largo de la gametogénesis. Espermatogénesis temprana (ES); espermatogénesis tardía (LS); espermiogénesis (SG); desove parcial (PS); postdesove (SPS).

Al considerar todos los datos se observó una correlación significativa entre algunos de los componentes bioquímicos y el diámetro de los ovocitos o el porcentaje de cobertura de esperma. En las hembras el coeficiente de correlación de Pearson en hemolinfa fue directamente proporcional entre CHOS, GLU y el diámetro de los ovocitos; mientras que en la gónada fue inversamente proporcional. En la glándula digestiva se observó una correlación inversamente proporcional entre los TGC y el diámetro de ovocitos. En el caso de los machos no se observó ninguna correlación significativa entre las variables bioquímicas presentes en hemolinfa y el porcentaje de cobertura de esperma. En contraste, todas las variables evaluadas en la gónada tuvieron una correlación significativa. En el caso de los TGC fue negativa y en el resto fue positiva. En glándula digestiva solo los CHOS y LT presentaron una correlación inversamente proporcional con el porcentaje de cobertura de esperma (Tabla 4).

Tabla 4. Coeficientes de correlación de Pearson (r) entre las variables histológicas cuantitativas (diámetro y área de ovocito y % de cobertura de esperma) y las variables bioquímicas obtenidas de hemolinfa, gónada y glándula digestiva de hembras y machos de *P. globosa*.

	Hemolinfa		Gónada		Glándula	
	D (µm) (n=33)	C (%) (n=66)	D (µm) (n=14)	C (%) (n=57)	D (µm) (n=15)	C (%) (n=56)
CHOS	0.51*	-0.05	-0.76*	-0.73*	-0.18	-0.40*
PT	0.21	-0.16	0.13	-0.38*	0.10	-0.23
GLU	0.62*	0.03	-0.51	-0.52*	-0.37	-0.16
TGC	-0.29	-0.17	-0.24	0.49*	-0.71*	-0.26

GCG	ne	Ne	-0.31	-0.59*	-0.13	-0.17
LT	ne	Ne	-0.34	-0.61*	0.06	-0.32*

OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DEL TRANSCRITO DEL GEN DE VT/VTG

Las pruebas preliminares para probar la presencia del transcrito del gen Vtn/Vtg en *P. globosa* se realizaron utilizando tejido de glándula digestiva. Con los primers Vtg-ostión para qPCR y Vtg-ostión para PCR (se muestran en la metodología) se obtuvieron dos bandas, una de aproximadamente 200 pb (Fig. 20, banda 1) y otra de 400 pb (Fig. 20, banda 2). El par de primers obtenidos a partir de las secuencias de escalopas *Pecten maximus*, *Chlamys farreri* y *Mimachlamys nobilis* fueron:

VTGpgF 5'-GATGCTSGAAATGGCYGT-3'

VTGpgR 5'-TCTGTTCTTCTTGAATAAAGCA-3'

Las reacciones de PCR con VTGpg F y R se realizaron a una temperatura de anillado (TM) de 60 °C, que generó un producto de aproximadamente 600 pb (Fig. 20, banda 3).

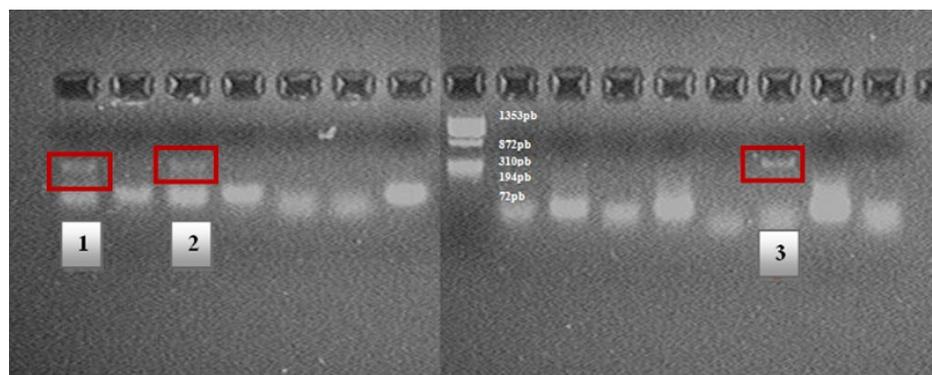


Figura 20. Bandas del transcrito del gen Vt/Vtg expresados en gel de agarosa, utilizando muestras de glándula digestiva de hembras de *P. globosa*. Se usaron

primers de ostión (banda 1 y 2) y de escalopas (banda 3). Bandas 1 y 2 = hembras en estadio SP, banda 3 = hembras en estadio LVt.

Las condiciones óptimas para la obtención del transcrito del gen de Vtn/Vtg para *P. globosa* fueron (Tabla 5): a) TM = 60 °C y b) volumen total de la mezcla de reacción.

Tabla 5. Mezcla de reacción utilizada para amplificar el transcrito del gen Vt/Vtg mediante PCR, en muestras de glándula digestiva de *P. globosa*.

Mix PCR	1x (µl)	10x (µl)
Agua	7.23	72.3
Buffer	1.25	12.5
MgCl ₂	2	20
dNTP's	0.66	6.6
oligo F	0.13	1.3
oligo R	0.13	1.3
Taq	0.1	1.0
Total :	11.5 µl	115 µl por tubo + 2µl de muestra

Al volver a correr las muestras purificadas bajo las condiciones óptimas de incubación se observaron nuevamente las bandas (Fig. 21), una sola por cada reacción, por lo que se enviaron a secuenciar correspondiendo a la secuencia parcial del transcrito del gen Vtn/Vtg, específica para *P. globosa*.

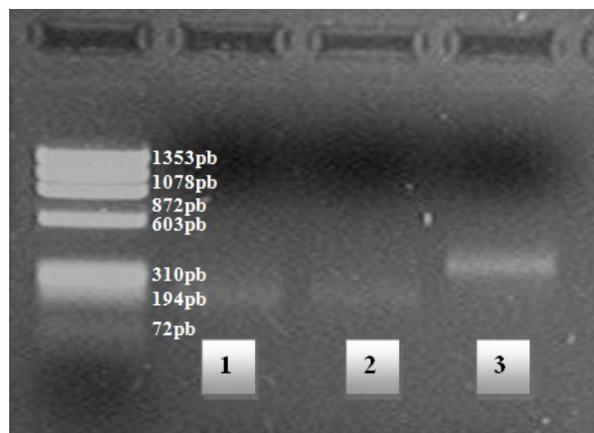


Figura 21. Bandas únicas a partir de los productos de PCR purificados que corresponden al transcrito del gen Vtn/Vtg de glándula digestiva de hembras de *P. globosa*. Se utilizaron primers de ostión (banda 1 y 2) y de escalopas (banda 3). Bandas 1 y 2 = hembras en estadio SP, banda 3 = hembras en estadio LVt.

Las secuencias nucleotídicas obtenidas se revisaron con los cromatogramas proporcionados por la compañía de secuenciación. Para realizar un primer análisis de similitud in silico, se empleó el programa en línea BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>), encontrando para el fragmento obtenido de 600 pb, una similitud del 96% (E= 0.0) con la secuencia reportada para *Crassostrea gigas* (5023 pb; Genbank AB084783.1), 85% (E= 2-114) respecto de la secuencia reportada para *Mytilus edulis* (713 pb; Genbank AY679116.1), 93% (E= 7-152) con la secuencia reportada para *Pecten maximus* (1290 pb; Genbank AM943022.1), 84% (E= 3-115) con la secuencia reportada para *Chlamys farreri* (7604 pb; Genbank GQ227743.1), 90% (E= 9-197) con la secuencia reportada para *Patinopecten yessoensis* (1698 pb; Genbank AB055960.1) y 84% (E= 7-163) con la secuencia reportada para *Mimachlamys nobilis* (7760 pb; Genbank JN638064.1). Las secuencias nucleotídicas y de aminoácidos (peptídica) fueron posteriormente alineadas con el programa MUSCLE – Multiple Sequence Alignment (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>). Adicionalmente, se realizó un alineamiento múltiple en el programa en línea Clustal W (http://www.ebi.ac.uk/Tools/services/web_clustalw2), el criterio de selección de las secuencias se basó en el valor de significancia (E), eligiendo las diez secuencias con valores más altos. Así mismo, se alinearon con la secuencia obtenida de pedúnculo empleando el programa en línea MULTIALIN (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>), encontrando una similitud del

98% entre ellas, presentando diferencias menores. Con estos análisis, se corroboró que las secuencias aisladas se agrupan dentro de las proteínas catalogadas únicamente como vitelinas.

Los primers específicos para PCR de punto final y PCR tiempo real obtenidos a partir de la secuencia parcial del transcrito del gen Vt/Vtg de *P. globosa* se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Secuencias de primers específicos del transcrito del gen VT/VTG de *P. globosa* diseñados para PCR punto final y PCR tiempo real.

Nombre	Uso	Secuencia	Tm (° C)	Tamaño (pb)
VTGlf_F	Vtg (Punto final)	AGTGTGCTGGTGAATGTGAA	60	877
VTGlf_R	Vtg (Punto final)	CCAYTTAGCGACRCAAAT	59	877
VTGqF	Vtg qPCR	CGAGGAGAAATGGAAATGGA	60	169
VTGqR	Vtg qPCR	CCAGCCTGGCAATTTTCT	60	169

Utilizando estos primers, se evidenció la presencia del transcrito del gen Vtn/Vtg en gónada de hembras maduras (EVT y LVt). En el estadio PVt no se detectó la expresión del transcrito del gen. En los machos tampoco detectamos la expresión de este gen (Fig. 22)

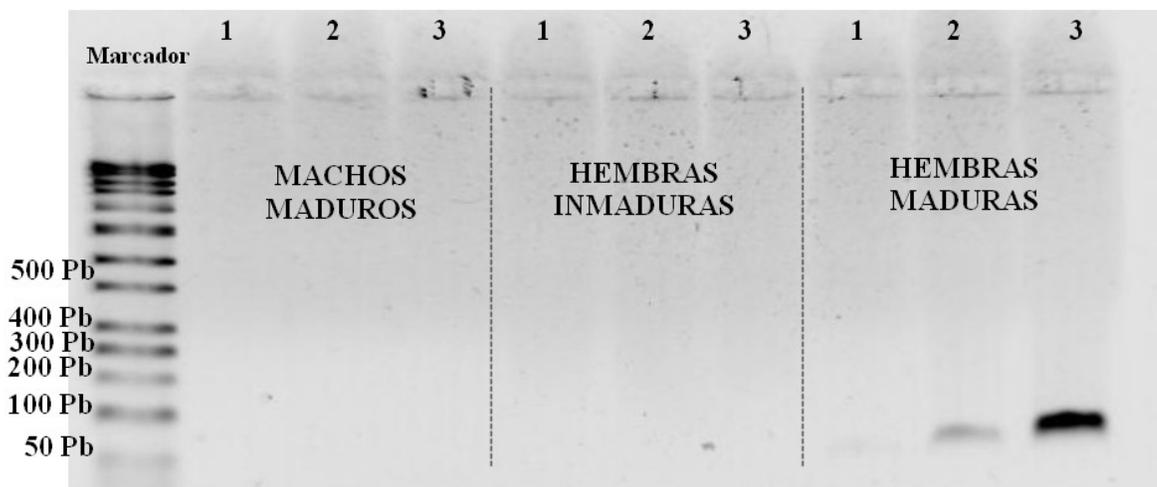


Figura 22. Bandas amplificadas por PCR del transcrito del gen Vtn/Vtg de *P. globosa* obtenidas mediante electroforesis en gel de agarosa en machos maduros (estadio SG),

hembras inmaduras (estadio PVt) y hembras maduras (Evt y LVt). ESC = Marcador de ADN.

DISCUSIONES

En el presente estudio se identificaron los mismos cinco estadios desarrollo gonadal reportados previamente por otros autores para *P. globosa* del alto Golfo de California (Aragón-Noriega et al. ,2007; Arambula-Pujol et al. ,2008; Calderón-Aguilera et al., 2010; Sánchez-León Hing, 2012). Sin embargo en este trabajo se registró una mayor cantidad de estadios al final del ciclo reproductivo (5 estadios en machos y 3 en hembras). Además se observó un desfase significativo en la temporalidad en la que ocurrió en la gametogénesis. Por ejemplo, alrededor del 85% de las hembras y machos estaban en vitelogénesis temprana (EVt) y espermatogénesis tardía (LS) en octubre, mientras que Aragón-Noriega et al. (2007) y Calderón-Aguilera et al. (2010) reportaron para este mismo mes más del 50% de organismos indiferenciados y el resto en los estadio de actividad temprana (ES y PVt). Así mismo los organismos del presente estudio iniciaron con desoves parciales desde noviembre, mientras que en estudios anteriores esto ocurrió a partir del mes de diciembre (Calderón-Aguilera et al., 2010) y otros casos hasta enero (Aragon-Noriega et al., 2008; Sánchez León-Hing, 2012). Finalmente los organismos indiferenciados (gametos reabsorbidos) se presentaron a partir de enero en este trabajo y a partir de febrero o marzo en trabajos previos (Aragon-Noriega et al., 2007; Calderón-Aguilera et al., 2010). Con lo anterior es posible concluir que comparado con otros años la gametogénesis de *P. globosa* se adelantó en el invierno del 2011-2012 por efecto de la temperatura. En este sentido, al comparar los datos de registro continuo de temperatura de San Felipe, B. C. se observó que en el invierno del 2011-2012 (presente estudio) la temperatura disminuyó más rápidamente que en 2010-2011 (Sánchez León-Hing, 2012). Además durante el mes de diciembre se observaron diferencias promedio de hasta dos grados entre años (Fig.

24). Cervantes-Diaz (2013) reporta que durante el periodo de 2010 se observó la condición El Niño y en el periodo del 2011 la condición observada fue La Niña, la cual se caracteriza por una disminución en la temperatura del agua, lo que coincide con lo observado en este trabajo para ese periodo.

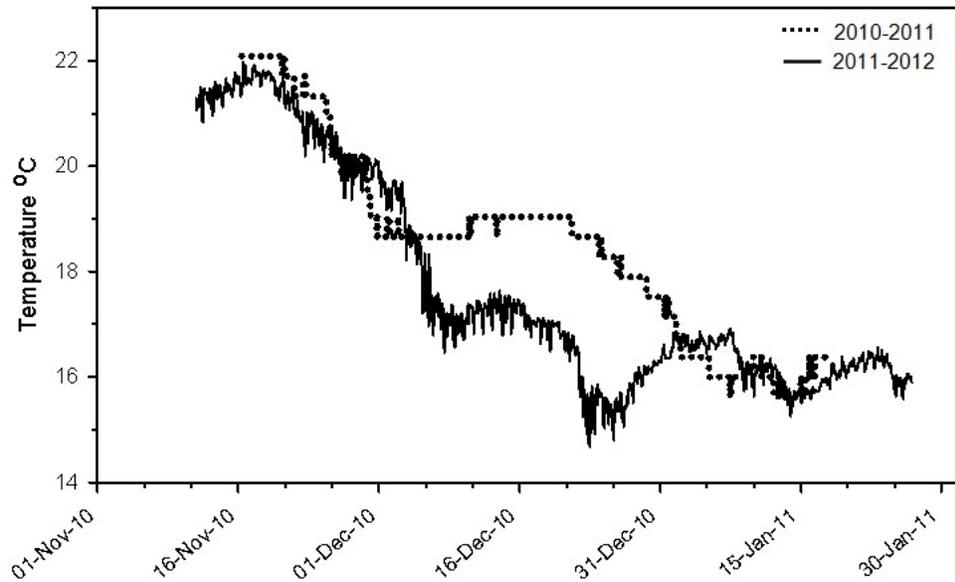


Figura 23. Comparación de los registros continuos de temperatura durante invierno 2011-2012 (línea continua) y 2010 – 2011 (línea punteada, Sánchez-León Hing, 2012).

El diámetro de los ovocitos resultó un buen indicador de los estadios de madurez y/o grado de desarrollo gonadal de las hembras. Este patrón de correspondencia ya había sido previamente observado por otros autores en almejas del genero *Panopea* (Gribben et al., 2004; Arambula-Pujol et al., 2008; Aragon-Noriega et al., 2007; Arcos-Ortega et al., 2014, por lo que su utilidad fue comprobada en el presente trabajo. Sin embargo esta es la primera vez en que se utiliza el porcentaje de cobertura de esperma para establecer una relación entre las etapas de desarrollo gonadal de los machos y la cantidad relativa de esperma presente. Esta variable nos

permitió detectar un desfase en la duración del periodo de desove de machos y hembras de *P. globosa*. Así, las hembras iniciaron el desove en noviembre y continuaron hasta enero (Figs. 12 y 17A), mientras que los folículos de los machos se vaciaron en diciembre, y para enero ya están prácticamente desovados, con folículos con menos del 20% de cobertura (Figs. 12 y 17B). Este desfase pudo deberse a las condiciones ambientales reportadas durante estos meses (fenómeno La Niña), lo cual afecta principalmente a las hembras, ya que se adelantaron sus desoves, lo que pone en riesgo la fertilización de los ovocitos. Mori et al. (2011) observaron un cambio en la estrategia reproductiva (desfase en el ciclo reproductivo, disminución de la fecundidad de hasta en un 50% y una disminución en la frecuencia de desove) de la anchoveta peruana tras el evento El Niño 1997–1998.

Las tinciones histoquímicas evidenciaron que los triglicéridos se acumularon principalmente en el tejido conectivo durante los estadios tempranos de desarrollo gonadal de machos y hembras (PVt y ES respectivamente), mientras que en estadios de mayor madurez (EVt, LVt, LS y SG) se movilaron hacia el interior de los folículos, esto se evidenció por la presencia de pequeños puntos oscuros dentro de los gametos. Este tipo de transporte es novedoso para *P. globosa*, y ya ha sido descrito con detalle en *Crassostrea virginica* por Eckelbarger y Davis (1996). Estos autores mencionaron que los folículos están rodeados por una matriz de tejido conectivo vesicular cuya función es almacenar de nutrientes y por un fluido dentro del tejido conectivo circundante que se encarga de transportar nutrientes a los ovocitos. Los datos semicuantitativos histoquímicos de la gónada evidenciaron un patrón inverso entre los carbohidratos y lípidos totales, de tal forma que los carbohidratos disminuyeron y los lípidos aumentaron conforme avanzó la gametogénesis. Es posible que estos últimos hayan aumentado al depositarse en los ovocitos, lo cual ocurrió a expensas de la

conversión de los carbohidratos en lípidos (Darriba et al., 2005). Los datos cuantitativos de componentes bioquímicos también evidenciaron una disminución significativa del glucógeno conforme avanzó la gametogénesis, aunque no se observó un patrón inverso en el caso de los lípidos totales o triglicéridos, ya que estos se mantuvieron constantes. El hecho de que no aumentaran los lípidos hacia el final de la gametogénesis pero sí los carbohidratos, sugiere que hubo una disminución neta de los primeros al momento del desove y que el aumento de los carbohidratos estuvo enmascarado por la disminución neta del peso de la gónada. En conjunto los análisis cuantitativos sugieren que la evaluación histoquímica utilizada en el presente estudio fue lo suficientemente sensible para detectar la depositación de reservas energéticas durante la maduración de la gónada. Por otra parte en la hemolinfa se observó un aumento en la concentración de triglicéridos conforme aumentó la madurez gonadal, lo cual sugiere que hubo un aporte de lípidos desde un órgano distinto a la glándula digestiva. En este órgano solamente el glucógeno tuvo cambios significativos conforme aumentó la madurez gonadal, lo cual indica por una parte que los carbohidratos fueron una reserva de energía muy importante en hembras de *P. globosa* y que la glándula digestiva jugó un papel secundario como órgano de reserva. Es probable que otros órganos como el manto estén jugando el papel principal como órgano de reserva. En este sentido, se pudo observar en el presente estudio que el manto de *P. globosa* cambió su grosor, textura y coloración conforme avanzó la gametogénesis. Así mismo se reportó recientemente que el manto de *P. generosa* contiene comparativamente un mayor porcentaje de carbohidratos (27%) y lípidos (10%) que el sifón (11% y 4% respectivamente) (Oliveira et al., 2011). Con lo anterior es posible sugerir que el manto juega un papel de reserva en *P. globosa*. Lo obtenido concuerda con lo reportado por Berthelin et al. (2000), estos autores encontraron que las proteínas no contribuyen en

el desarrollo gametogénico de *Crassostrea gigas*; en cambio el glucógeno y los lípidos fueron almacenados en la glándula digestiva, gónada y en la zona circundante al manto, siendo la principal fuente de reservas durante el periodo reproductivo.

En base a los análisis anteriores, podemos decir que *P. globosa* es una especie con una estrategia reproductiva que se ajusta al modelo conservador, pues la acumulación de reservas es previa a la gametogénesis, y el ciclo de estas, inverso al desarrollo gametogénico (Ojea et al., 2002).

En relación al transcrito del gen de la Vt/Vtg, esta es la primera vez que se obtiene su secuencia y esta tuvo una similitud de arriba del 84% con las reportadas para otros bivalvos (96% con la de *Crassostrea gigas*, 85% con *Mytilus edulis*, 93% con *Pecten maximus*, 84% con *Chlamys farreri*, 90% con *Patinopecten yessoensis* y 84% con la de *Mimachlamys nobilis*). También es la primera vez que se detecta en la glándula digestiva y gónada de hembras maduras (estadios EVt y LVt) de *P. globosa*. El hecho de que se haya expresado en hembras con cierto grado de madurez, y no en machos, confirma que el transcrito del gen puede ser usado como indicador de sexo en el género *Panopea* y coincide con la detección de altos niveles de vitelogenina encontrada previamente en la hemolinfa de hembras de *P. globosa* por nuestro grupo de laboratorio (Arcos et al., 2014). Es posible que el transcrito del gen se comience a expresar en los períodos tardíos de la vitelogénesis debido a que es en esta etapa cuando ocurre el mayor almacenamiento de reservas nutritivas en los ovocitos, siendo uno de estos componentes la vitelina. Durante este proceso la vitelogenina estaría siendo sintetizada en la glándula digestiva y transportada a través de la hemolinfa hacia la gónada, donde se pasa hacia los ovocitos a través de pared folicular (Nagel y Idler 1983; Mommsen y Walsh 1988; Specker y Sullivan 1994; Matsumoto et al., 1997). Debido a esto se pudo observar una diferencia en la intensidad de las bandas, la

menor intensidad se pudo observar en hembras en vitelogénesis temprana y la mayor en vitelogénesis tardía, para comprobar esto se podría realizar un experimento posterior en el que se realizaran reacciones de PCR en tiempo real de manera simultánea en gónada y glándula digestiva durante la madurez gonadal de *P. globosa* y así determinar en qué tejido se expresa en mayor cantidad. Recientemente Arcos-Ortega et al. (2014) determinaron las concentraciones de vitelogenina y vitelina en la hemolinfa y tejido gonádico de *P. globosa* mediante un ensayo ELISA utilizando un anticuerpo policlonal anti-vitelina desarrollado para el ostión *Crassostrea corteziensis* por Arcos et al. (2009). Osada et al. (2003) ubicaron la expresión de la vitelogenina en *Patinopecten yessoensis* en células auxiliares (análogas a las células foliculares en las gónadas de ostión). En *Haliotis discus hannai* (Matsumoto et al., 2008) y *Crassostrea gigas* (Llera-Herrera, 2008 y Dheilly et al., 2012) se identificó la expresión del gen Vtn/Vtg en las células foliculares de la gónada. También ha sido reportada la presencia de este gen en el hepatopáncreas de algunos crustáceos como *Macrobrachium rosenbergii* (Chen et al., 1999) y *Penaeus semisulcatus* (Avarre et al, 2003). Vazquez-Boucard et al. (2002) observaron que las concentraciones de Vtg en la hemolinfa y hepatopáncreas del camarón *Fenneropenaeus indicus* se incrementaban en los estadios tempranos del desarrollo gonadal y disminuían significativamente en los estadios de madurez avanzada, para aumentar subsecuentemente en la gónada.

CONCLUSIONES

→ En el invierno 2011-2012 se observó un desfase en el inicio y término de la gametogénesis de *P. globosa* en San Felipe, B.C., iniciando un mes antes que lo reportado en estudios previos. Dicho desfase se debió principalmente a la temperatura.

→ El porcentaje de cobertura de esperma se introdujo por primera vez en el presente estudio como un indicador cuantitativo del estadio de desarrollo gonadal *P. globosa*.

→ *Panopea globosa* presentó una estrategia reproductiva que se ajusta al modelo conservador, con acumulación de reservas energéticas principalmente antes de iniciar la gametogénesis.

→ La glándula digestiva no parece funcionar como un órgano de reserva en *P. globosa*, excepto en el caso del glucógeno. El glucógeno fue el principal componente energético que fue movilizado y/o convertido a lípidos para ser utilizado durante la maduración gonadal.

→ Se determinó por primera vez la presencia del transcrito del gen Vtn/Vtg gen en gónada y glándula digestiva de hembras maduras de *P. globosa*.

LITERATURA CITADA

- Aragón-Noriega, E. A., J. Chávez-Villalba, P. E. Gribben, E. Alcántara-Razo, A. N. Maeda-Martínez, E. M. Arambula-Pujol, A. R. García-Juárez. & R. Maldonado-Amparo. 2007. Morphometric relationships, gametogenic development and spawning of the geoduck clam *Panopea globosa* (bivalvia: hiatellidae) in the Central Gulf of California. *J. Shellfish Res.* 26: 423–431.
- Arambula-Pujol, E. M., A. R. García-Juárez, E. Alcántara-Razo, & E. A. Aragón-Noriega. 2008. Aspectos de biología reproductiva de la almeja de sifón *Panopea globosa* (Dall 1898) en el Golfo de California. *Hidrobiológica.* 18: 89-98.
- Arcos-Ortega, G. F., A. M. Ibarra, M. C. Rodríguez-Jaramillo, E. A. García-Latorre. & C. G. Vázquez-Boucard. 2009. Quantification of vitellin/vitellogenin-like proteins in the oyster *Crassostrea corteziensis* (Hertlein 1951) as a tool to predict the degree of gonad maturity. *Aquac Res.* 40: 644-655.
- Arcos-Ortega, G. F., S. J. SánchezLeón–Hing, C. Rodríguez-Jaramillo, M. A. Burgos-Aceves, Ivone Giffard-Mena & Z. García-Esquivel. 2014. Biochemical and histochemical changes associated with gonad development of the geoduck clam, *Panopea globosa* (Dall 1898), from the Gulf of California, Mexico. En revisión. 32pp.
- Arellano-Martínez, M. 2005. Características ecofisiológicas de la reproducción de *Nodipecten subnodosus* (Sowerby, 1835) (Pectinidae) en la laguna Ojo de Liebre, B. C. S., México. Tesis de Doctorado. Instituto Politécnico Nacional. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas. Departamento de Pesquerías y Biología.
- Avarre, J. C. R. Michelis, A. Tietz & E. Lubzens. 2003. Relationship Between Vitellogenin and Vitellin in a Marine Shrimp (*Penaeus semisulcatus*) and Molecular Characterization of Vitellogenin Complementary DNAs. *Biol Reprod.* 69: 355–364.

- Barnes, H. & J. Blackstock. 1973. Estimation of lipids in marine animals and tissues: Detailed investigation of the sulphophosphovanillin method for 'total' lipids. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 12:103–118.
- Bayne, B. L. 1976. Aspects of reproduction in bivalve mollusk. En: *Estuarine Processes* (Wiley, M. L. ed.). New York: Academic Press. 432-448 pp.
- Berthelin, C., K. Kellner & M. Mathieu. 2000. Storage metabolism in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in relation to summer mortalities and reproductive cycle (West Coast of France). *Comp. Biochem. Phys. B.* 125: 359–369.
- Blancas-Arroyo, G. A., I. A. Barriga-Sosa, T. Morato-Cartagena, C. M. Romero-Ramírez & J. L. Arredondo-Figueroa. 2008. Association between ovarian development and serum concentrations of 17 β -estradiol and 17 α -hydroxy-4-pregnen-3-one in first maturation females of the shortfin silverside fish, *Chirostoma humboldtianum* (Atheriniformes: Atherinopsidae). *Vet. Méx.* 39: 67-80.
- Burgos-Aceves, M. A. 2003. Maduración gonadal de hembras del lenguado de California *Paralichthys californicus* en el medio natural. Tesis de Maestría. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, B. C. S., México. 117 pp.
- Calderón-Aguilera, L. E., E. A. Aragón-Noriega, H. Reyes-Bonilla, C. G. Paniagua-Chávez, A. E. Romo-Curiel. & V. C. Moreno-Rivera. 2010. Reproduction of the Cortes geoduck *Panopea globosa* (bivalvia: hiatellidae) and its relationship with temperature and ocean productivity. *J. Shellfish Res.* 29: 135–141.
- Cervantes-Díaz, G. Y. 2013. Variabilidad temporal del sistema del CO₂ y nutrientes frente a las costas de Baja California. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Baja California. 132 pp.
- Chen, Y. N., D. Y. Tseng, P. Y. Ho & C. M. Kuo. 1999. Site of Vitellogenin Synthesis Determined From a cDNA Encoding a Vitellogenin Fragment in the Freshwater Giant Prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Mol. Reprod. Dev.* 54: 215–222.

- Darriba, S., F. San Juan & A. Guerra. 2005. Energy storage and utilization in relation to the reproductive cycle in the razor clam *Ensis arcuatus* (Jeffreys, 1865). *ICES J. Mar. Sci.* 62: 886-896.
- Dheilly, N. M., C. Lelong, A. Huvet, K. Kellner, M. P. Dubos, G. Riviere, P. Boudry & P. Favrel. 2012. Gametogenesis in the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*: A Microarrays-Based Analysis Identifies Sex and Stage Specific Genes. *PLoS ONE* 7(5): e36353. doi:10.1371/journal.pone.0036353
- DOF. 2012. Plan de manejo para la pesquería de almeja generosa (*Panopea* spp.) en las costas de Baja California, México. México. 27 de febrero del 2012.
- Dorange, G. & M. Le Pennec. 1989. Ultrastructural study of oogenesis and oocytic degeneration in *Pecten maximus* from the bay of St-Brieuc. *Mar. Biol.* 103: 339-348.
- Eckelbarger, K. J. & C. V. Davis. 1996. Ultrastructure of the gonad and gametogenesis in the eastern oyster *Crassostrea virginica*. I. Ovary and oogenesis. *Mar Biol.* 127: 79-87.
- Giese, A. C. & J. S. Pearse. 1974. Introduction: general principles. In: Reproduction of marine invertebrates. (A. C. Giese y J. S. Pearse ed) New York: Academic Press. pp. 1-49.
- Goodwin, C. L. & B. Pease. 1989. Species Profiles: life histories and environmental requirements of coastal fish and invertebrates (Pacific Northwest)—Pacific geoduck clam. U.S. Wild Fish. Serv. Biol. Rep. 82 (11.120). U.S. Army Corps of Engineers, TR EL-82-4. 15 pp.
- Gribben, P. E., J. Helson. & A. G. Jeffs. 2004. Reproductive cycle of the New Zealand geoduck, *Panopea zelandica*, in two north island populations. *Veliger.* 47: 53–65.

- Gribben, P. E., J. Helson. & R. Millar. 2004. Population abundance estimates of the New Zealand geoduck clam, *Panopea zelandica*, using North American methodology: Is the technology transferable? *J. Shellfish Res.* 23: 683–691.
- Humanson, G. L. 1972. *Animal Tissue Techniques*. Freeman and Company. San Francisco.
- Li, Q., M. Osada & K. Mori. 2000. Seasonal biochemical variation in *Pacific oyster* gonadal tissue during sexual maturation. *Fisheries Sci.* 66: 502-511.
- Llera-Herrera, R. A. (2008). Expresión molecular de vitelogeninas en el ostión japonés, *Crassostrea gigas*. Tesis de maestría. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. La Paz, B.C.S. 103 pp.
- Lodeiros, C. J., J. J. Rengel, H. Guderley, O. A. Nusetti & J. H. Himmelman. 2001. Biochemical composition and energy allocation in the tropical scallop *Lyropecten (Nodipecten) nodosus* during the months leading up to and following the development of gonads. *Aquaculture.* 199: 63-72.
- Matsumoto, T., M. Osada, Y. Osawa & K. Mori. 1997. Gonadal Estrogen Profile and Immunohistochemical Localization of Steroidogenic Enzymes in the Oyster and Scallop during Sexual Maturation. *Comp. Biochem. Physiol.* 118B: 811–817.
- Matsumoto, T., A. M. Nakamura, K. Mori, & T. Kayano. 2003. Molecular Characterization of a cDNA Encoding Putative Vitellogenin from the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. *Zool Sci.* 20: 37-42.
- Matsumoto, T., K. Yamano, M. Kitamura & A. Hara. 2008. Ovarian follicle cells are the site of vitellogenin synthesis in the Pacific abalone *Haliotis discus hannai*. *Comp Biochem Phys A.* 149: 293–298.

- Mauriz, O., A. J. Pazos, V. Lozano, R. Martínez-Escauriaza, L. Pérez-Paralle & J. L. Sánchez. 2008. Molecular cloning of a cDNA encoding putative vitellogenin from the bivalve mollusc *Pecten maximus*. Unpublished.
- Mommsen, T. P. y P. J. Walsh. 1988. Vitellogenesis and oocyte assembly. In: Fish Physiology Vol. 10A (Hoar, W. S. and D. J. Randall eds). Academic Press. E.U.A.
- Mori, J., B. Buitrón, A. Perea, C. Peña & C. Espinoza. 2011. Variabilidad interanual en la estrategia reproductiva de la anchoveta peruana en la región norte-centro del litoral del Perú. *Ciencias Marinas*. 37: 513–525.
- Nagel, J.J. & D. R. Idler. 1983. Ovarian uptake of vitellogenesis and another high density lipoprotein in winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) and their relationship to yolk proteins. *Biochem. Cell. Biol.* 68: 330-335.
- Ojea J., D. Martínez, S. Novoa, A. J. Pazos & M. Abad. 2002. Contenido y distribución de glucógeno en relación con el ciclo gametogénico de *Ruditapes decussatus* (L., 1758) en una población natural de las lagunas de Baldaio (Galicia, noroeste de España). *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.* 18: 307-313.
- Okamura, T., K. Yamano & K. Sakiyama. 2007. Vitellogenin gene expression and hemolymph vitellogenin during vitellogenesis, final maturation, and ovoposition in female kuruma prawn, *Marsupenaeus japonicus*. *Comp Biochem Phys A*. 147: 1028-1037.
- Oliveira, A. C. M., P. J. Bechtel, D. X. Nguyen, L. Gurer, C. A. Crapo, Q. Fong & R. Ralonde. 2011. Chemical Composition and Texture of Commercial Geoduck Clams (*Panopea abrupta*) Harvested in Southeast Alaska. *J. Shellfish Res.* 30: 761-769.
- Osada, M., T. Takamura, H. Sato & K. Mori. 2003. Vitellogenin Synthesis in the Ovary of Scallop, *Patinopecten yessoensis*: Control by Estradiol-17 β and the Central Nervous System. *J. Exp. Zool.* 299 (A): 172-179.

- Osada, M., M. Harata, M. Kishida & A. Kijima. 2004. Molecular cloning and expression analysis of vitellogenin in scallop, *Patinopecten yessoensis* (Bivalvia, Mollusca). *Mol. Reprod. Dev.* 67: 273-281.
- Puinean, A. M., C. M. Ciocan, E. Cubero-León, E. M. Hill, C. Minier, M. Osada, N. Itoh, & J. M. Rotchell. 2006. Vitellogenin gene expression as a biomarker of endocrine disruption in the invertebrate, *Mytilus edulis*. *Mar Environ Res.* 62: 211-214.
- Qin, Z. K., Y. Li, D. P. Sun, M. Y. Shao, Z. F. Zhang & Y. Li. 2012. Cloning and expression analysis of the vitellogenin gene in the scallop *Chlamys farreri* and the effects of estradiol-17beta on it synthesis. *Invertebr. Biol.* 131: 312-321.
- Racotta, I. S., J. L. Ramírez, A. M. Ibarra, M. C. Rodríguez-Jaramillo, D. Carreño & E. Palacios. 2003. Growth and gametogenesis in the lion's paw scallop *Nodipecten (Lyropecten) subnodosus*. *Aquaculture.* 217: 335-349.
- Roe, J. H. 1955. The determination of sugar in blood and in spinal fluid with anthrone 498 reagent. *J. Biol. Chem.* 212:335-343.
- Rodríguez-Jaramillo, C., M. A. Hurtado, E. Romero-Vivas, J. L. Ramírez, M. Manzano & E. Palacios. 2008. Gonadal Development and Histochemistry of the Tropical Oyster, *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1951) During an Annual Reproductive Cycle. *J. Shellfish Res.* 27: 1129-1141.
- Rozen, S. & H. J. Skaletsky. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. En: Krawetz S, Misener S (eds) Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386. Source code available at <http://fokker.wi.mit.edu/primer3/>.
- Sánchez-León-Hing, S. 2012. Cambios histológicos y bioquímicos asociados al ciclo de maduración de la almeja de sifón, *Panopea globosa* en San Felipe, B.C. México. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Baja California. Facultad de Ciencias Marinas. 102 pp.

- Saout, C., C. Quéré, A. Donval, Y. M. Paulet & F. F. Samain. 1999. An experimental study of the combined effects of temperature and photoperiod on reproductive physiology of *Pecten maximus* from the Bay of Brest (France). *Aquaculture*. 172: 301- 314.
- Sastry, A. N. 1979. Pelecypoda (excluding Ostreidae). In: Reproduction of Marine Invertebrates 5. (Eds. Giese, A. C. & J. S. Pearse). Academic Press. New York. 113-292 pp.
- Serrano-Pinto, V., M.G. Carrisoza-Valenzuela & M. Ramírez-Orozco. 2005. Determination site of vitellogenin synthesis in freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus* at different maturation stages females. *Invest. Mar.* 33: 195-200.
- Snedecor, G. W. and W. G. Cochran. 1989. Statistical Methods. Eighth Edition. Iowa State University Press. 503 pp.
- Specker, J. L. & C. V. Sullivan. 1994. Vitellogenesis in fishes status and perspectives. In: Davey, K. G., R. E. Peter and S. S. Tobe (eds). Perspective in Comparative Endocrinology. Ottawa Canada National Research Council of Canada. 301-315.
- Tsukimura, B., J. S. Bender & C. J. Linder. 2000. Developmental aspects of gonadal regulation in the ridgeback shrimp, *Sicyonia ingentis*. *Comp. Biochem. Physiol.* 127A: 215-224.
- Vázquez-Boucard, C. G., P. Levy, H. J. Ceccaldi & C. H. Brogren. 2002. Developmental changes in concentration of vitellin, vitellogenin and lipids in hemolymph, hepatopancreas and ovaries from different ovarian stages of Indian white prawn *Fenneropenaeus indicus*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 281: 63–75.
- Vite-García, M. N. 2005. Almacenamiento y Utilización de Reservas Energéticas en Relación con la Reproducción de las Ostras Perleras *Pteria sterna* (Gould, 1851) y

Pinctada mazatlanica (Hanley, 1856). Tesis de Maestría. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S. C. La Paz, B.C.S. 107 pp.

Wahli, W. 1988. Evolution and expression of vitellogenin genes. *Trends Genet.* 4: 227-232.

Zar, J. H. 1999. Bioestatistical analysis. Prentice-Hall. U.S.A. 663 pp.

Zheng, H., Q. Zhang, H. Liu, W. Liu, Z. Sun, S. Li & T. Zhang. 2012. Cloning and expression of vitellogenin (Vg) gene and its correlations with total carotenoids content and total antioxidant capacity in noble scallop *Chlamys nobilis* (Bivalve: Pectinidae). *Aquaculture.* 366-367: 46-53.

APÉNDICES

APÉNDICE A

De manera general el procesamiento histológico para la tinción Hematoxilina–Eosina, consistió de varias fases que se describen a continuación:

Deshidratación.

Con la finalidad de eliminar los niveles de agua del tejido, las porciones gonádicas fijadas en solución Davidson se colocaron en diferentes concentraciones de alcohol etílico (70%, 80% y 100%), posteriormente en una mezcla de alcohol etílico absoluto–xilol y xilol absoluto; este proceso se realizó en un procesador de tejidos LEICA ASP 200S como se describe en la siguiente tabla:

Tabla 7. Rutina de deshidratación del procesamiento histológico.

SOLUCIÓN	TIEMPO DE INCUBACIÓN
Alcohol etílico 70% I	1 hora
Alcohol etílico 70% II	1 hora
Alcohol etílico 80%	1 hora
Alcohol etílico 90%	1 hora
Alcohol etílico 96%	1 hora
Alcohol etílico 100% I	1 hora
Alcohol etílico 100% II	1 hora
Alcohol etílico 100% III.	1 hora
Mezcla de alcohol etílico absoluto–xilol (1:1)	20 minutos (tiempo crítico)
Xilol absoluto (100%)	5 – 10 minutos (tiempo crítico)

Inclusión.

Una vez finalizado el proceso de deshidratación, los tejidos se embebieron en parafina-xilol y parafina I, II, III y IV con un punto de fusión de alrededor de los 54°C como se muestra en la Tabla 8. Para finalizar el proceso, los tejidos fueron colocados en placas de inclusión en un sistema de inclusión en parafina Histoembedder LEICA.

Tabla 8. Rutina de inclusión en parafina del procesamiento histológico.

SOLUCIÓN	TIEMPO DE INCUBACIÓN
Parafina – xilol (1:1)	25 minutos (no dejar más tiempo)
Parafina I (Paraplast)	1 hora
Parafina II (Paraplast)	1 - 2 horas
Parafina III (Paraplast)	2 horas
Parafina IV (Paraplast)	1 hora (2 horas para tejidos grandes)

Corte

El proceso de cortado se realizó de manera seriada en un micrótopo de rotación, LEICA modelo RM2155. Primeramente se rebajó el excedente de parafina con un grosor de 10 micras hasta alcanzar obtener la aparición homogénea del tejido y después se realizaron cortes más finos de 4 micras para cada muestra de tejido gonadal. Los cortes se colocaron y extendieron en un baño de flotación de teflón con agua a una temperatura de 42 – 45°C y una pequeña cantidad de gelatina pura al 0.01% para aumentar la adherencia y se colocaron en portaobjetos previamente etiquetados y se dejaron secar a temperatura ambiente.

Tinción.

Una vez secos los cortes histológicos, se sometieron a la técnica de tinción de Hematoxilina –Eosina de Harris o llamada también HE, proceso en el cual los cortes son embebidos en una serie de soluciones y colorantes. La técnica se llevó a cabo en un teñidor automático LEICA ST 5020 como se indica en la Tabla 9.

Tabla 9. Rutina de tinción Hematoxilina–Eosina.

SOLUCIÓN	TIEMPO DE INCLUSIÓN
Xilol I	10 – 15 minutos
Xilol II	10 – 15 minutos
Xilol III	10 – 15 minutos
Alcohol etílico al 92%	2 minutos
Alcohol etílico al 70% I	2 minutos
Alcohol etílico al 70% II	2 minutos
Agua destilada o desionizada	5 minutos
Hematoxilina de Harris	4 minutos
Agua corriente	5 minutos
Agua destilada	5 minutos
Alcohol – ácido (1Lt de alcohol al 96% con 5 gotas de ácido clorhídrico)	10 – 15 segundos
Agua destilada	5 minutos
Agua amoniacal (hidróxido de amonio)	10 – 15 segundos
Agua destilada	5 minutos
Alcohol etílico 50%	2 minutos
Alcohol etílico al 70%	2 minutos
Eosina alcohólica	3 minutos (dependiendo del tiempo del colorante)
Alcohol 96% I	1 – 2 minutos
Alcohol 96% II	1 – 2 minutos
Alcohol 100% I	1 minuto
Alcohol 100% II	1 minuto

Citrosolv I (sustituto de xileno)	5 minutos
Citrosolv II	5 minutos
Citrosolv III	5 minutos

Montar en resina sintética o Entellan.

APÉNDICE B

Soluciones utilizadas en los análisis bioquímicos

Reactivo BCA

Ácido bicinconínico y Sulfato de cobre

Solución reactiva de triglicéridos

→Reactivo 1a. Tampón

Tampón pipes 40 mmol/l, pH 7.4

4-clorofenol 5.4 mmol/l

Iones de magnesio 5.0 mmol/l

ATP 1.0 mmol/l

Peroxidasa ≥ 0.5 U/ml

Glicerolkinasa ≥ 0.4 U/ml

Glicerol-3-Fosfato oxidasa ≥ 1.5 U/ml

Azida sódica 0.05%

→Reactivo 1b. Reactivo enzima

4-aminoantipirina 0.4 mmol/l

Lipasa ≥ 150 U/ml

Azida sódica 0.05 %

CAL. Patrón 2.29 mmol/l (200 mg/dl)

Solución reactiva de glucosa

→R1. Reactivo de glucosa

Buffer fosfato 50 mmol/l, pH 7.0

Buffer MOPS (Acido 3-Morfolinopropanosulfónico PB) 50 mmol/l, pH 7.0

Fenol 11 mmol/l

4-aminofenazona 0.77 mmol/l

Glucosa oxidasa ≥ 1.5 kU/l

Peroxidasa ≥ 1.5 kU

APÉNDICE C

BIOMETRÍAS COMPARACIÓN ENTRE SEXOS

Tabla 10. T-Student para para comparar el peso de machos y hembras de *Panopea globosa*.

Estadístico t = 0.286, g.l. 101, P = 0.775

Tabla 11. T-Student para para comparar la longitud de machos y hembras de *Panopea globosa*.

Estadístico t = 1.614, g.l. 101, P = 0.110

Tabla 12. T-Student para para comparar el ancho de machos y hembras de *Panopea globosa*.

Estadístico t = 1.562, g.l. 101, P = 0.121

BIOMETRIAS AMBOS SEXOS POR MES

Tabla 13. ANOVA de una vía para probar el efecto del tiempo sobre el peso de *Panopea globosa* (los datos incluyen ambos sexos).

Fuente de variación	gl	SC	F	P
Meses	1	2571.434	0.0818	0.775
Residual	101	31445.155		
Total	102			

Tabla 14. ANOVA de una vía para probar el efecto del tiempo sobre la longitud de *Panopea globosa* (los datos incluyen ambos sexos).

Fuente de variación	gl	SC	F	P
Meses	1	2.742	2.604	0.110
Residual	101	1.053		
Total	102			

Tabla 15. ANOVA de una vía para probar el efecto del tiempo sobre el ancho de *Panopea globosa* (los datos incluyen ambos sexos).

Fuente de variación	gl	SC	F	P
Meses	1	2.742	2.604	0.110
Residual	101	1.053		
Total	102			

DIÁMETRO DE OVOCITOS POR ESTADIO Y TIEMPO

Tabla 16. Prueba de Kruskal-Wallis y prueba de Dunn para el probar el efecto del estadio de desarrollo sobre el diámetro de los ovocitos.

Estadístico H = 757.130, g.l. 4, P = < 0.001

Prueba de Dunn PVt LVt EVt SPS SP_

Tabla 17. Prueba de Kruskal-Wallis y prueba de Dunn para el probar el efecto del tiempo de desarrollo sobre el diámetro de los ovocitos.

Estadístico H = 1576.488, g.l. 4, P = < 0.001

Prueba de Dunn N D E O F

% DE COBERTURA DE ESPERMA POR ESTADIO Y TIEMPO

Tabla 18. Prueba de Kruskal-Wallis y Prueba de Dunn para probar el efecto del estadio de desarrollo sobre el porcentaje de cobertura de esperma en gónada.

Estadístico H = 152.190, g.l. 4, P = < 0.001

Prueba de Dunn SG LS SP ES SPS

Tabla 19. Prueba de Kruskal-Wallis y Prueba de Dunn para probar el efecto del tiempo sobre el porcentaje de cobertura de esperma en gónada.

Estadístico H = 132.455, g.l. 4, P = < 0.001

Prueba de Dunn O N D E F

HISTOQUÍMICA

Tabla 20. Prueba de Kruskal-Wallis para probar el efecto de los estadios de desarrollo sobre el porcentaje de carbohidratos en gónada de hembras.

Estadístico H = 6.273, g.l. 4, P = 0.180

Tabla 21. Prueba de Kruskal-Wallis y Prueba de Dunn para probar el efecto de los estadios de desarrollo sobre el porcentaje de carbohidratos en gónada de machos.

Estadístico H = 46.322, g.l. 4, P = <0.001

Prueba de Dunn ES SPS LS SP SG

Tabla 22. ANOVA de una vía y prueba de Tukey para probar el efecto del periodo de muestreo sobre el porcentaje de lípidos en gónadas de hembras.

Fuente de variación	GI	SC	F	P
---------------------	----	----	---	---

Estadios reproductivos	4	4.370	3.859	0.006
Residual	91	1.132		
Total	95			

Prueba de Tukey PVt SPS EVt SP LVt

Tabla 23. ANOVA de una vía y prueba de Tukey para probar el efecto del periodo de muestreo sobre el porcentaje de lípidos en gónadas de machos.

Fuente de variación	GI	SC	F	P
Estadios reproductivos	4	11.829	7.936	<0.001
Residual	163	1.490		
Total	167			

Prueba de Tukey PVt SPS EVt SP LVt

COMPONENTES BIOQUÍMICOS EN HEMBRAS POR ESTADIOS

Hemolinfa

Tabla 24. Prueba de Kruskal-Wallis y Prueba de Dunn para probar el efecto de los estadios de desarrollo sobre las concentraciones de CHOS en hemolinfa.

Estadístico H = 9.787, g.l. 3 P = 0.020

Prueba de Dunn EVt LVt PS SPS

Tabla 25. ANOVA de una vía y prueba de Tukey para probar el efecto de los estadios de desarrollo sobre las concentraciones de PT en hemolinfa.

Fuente de variación	gl	SC	F	P
Estadios reproductivos	3	0.283	5.343	0.002

Residual	64	0.0530
Total	67	

Prueba de Tukey EVt LVt PS SPS

Tabla 26. Prueba de Kruskal-Wallis para probar el efecto de los estadios de desarrollo sobre la concentración de GLU en hemolinfa.

Estadístico H = 4.176, g.l. 3, P = 0.243
--

Tabla 27. ANOVA de una vía y prueba de Tukey para probar el efecto de los estadios de desarrollo sobre las concentraciones de TGC en hemolinfa.

Fuente de variación	GI	SC	F	P
Estadios reproductivos	3	0.0000468	3.087	0.033
Residual	64	0.0000152		
Total	67			

Prueba de Tukey EVt SPS LVt PS

Gónada

Tabla 28. ANOVA de una vía y prueba de Tukey para probar el efecto de los estadios de desarrollo sobre las concentraciones de CHOS en gónada.

Fuente de variación	GI	SC	F	P
Estadios reproductivos	1	4498.871	14.009	0.005
Residual	9	321.150		
Total	10			

Prueba de Tukey EVt LVt PS SPS

Tabla 29. ANOVA de una vía y prueba de Tukey para probar el efecto de los estadios de desarrollo sobre las concentraciones de GCG en gónada.

Fuente de variación	GI	SC	F	P
Estadios reproductivos	1	1435.761	11.641	0.008

Residual	9	123.336
Total	10	

Prueba de Tukey EVt LVt PS SPS

Tabla 30. ANOVA de una vía para probar el efecto de los estadios de desarrollo sobre las concentraciones de PT en gónada.

Fuente de variación	Gl	SC	F	P
Estadios reproductivos	1	69259.194	3.970	0.077
Residual	9	17445.591		
Total	10			

Tabla 31. ANOVA de una vía y prueba de Tukey para probar el efecto de los estadios de desarrollo sobre las concentraciones de LT en gónada.

Fuente de variación	Gl	SC	F	P
Estadios reproductivos	1	21375.969	35.055	< 0.001
Residual	9	609.779		
Total	10			

Prueba de Tukey EVt LVt PS SPS

Tabla 32. ANOVA de una vía para probar el efecto de los estadios de desarrollo sobre las concentraciones de GLU en gónada.

Fuente de variación	gl	SC	F	P
Estadios reproductivos	1	135.328	1.705	0.224
Residual	9	79.349		
Total	10			

Tabla 33. ANOVA de una vía para probar el efecto de los estadios de desarrollo sobre las concentraciones de TGC en gónada.

Fuente de variación	gl	SC	F	P
Estadios reproductivos	1	7.766	2.505	0.148

Residual	9	3.100
Total	10	

Glándula digestiva

Tabla 34. ANOVA de una vía para probar el efecto de los estadios de desarrollo sobre las concentraciones de CHOS en glándula digestiva.

Fuente de variación	GI	SC	F	P
Estadios reproductivos	2	287.797	2.490	0.128
Residual	11	115.561		
Total	13			

Tabla 35. ANOVA de una vía y prueba de Tukey para probar el efecto de los estadios de desarrollo sobre las concentraciones de GCG en glándula digestiva.

Fuente de variación	GI	SC	F	P
Estadios reproductivos	2	260.116	4.463	0.038
Residual	11	58.278		
Total	13			
Prueba de Tukey EVt <u>LVt</u> PS SPS				

Tabla 36. ANOVA de una vía para probar el efecto de los estadios de desarrollo sobre las concentraciones de PT en glándula digestiva.

Fuente de variación	GI	SC	F	P
Estadios reproductivos	2	15871.089	0.719	0.509
Residual	11	22069.720		
Total	13			

Tabla 37. ANOVA de una vía para probar el efecto de los estadios de desarrollo sobre las concentraciones de LT en glándula digestiva.

Fuente de variación	GI	SC	F	P
Estadios reproductivos	2	494.384	1.701	0.227
Residual	11	290.638		

Total	13
-------	----

Tabla 38. ANOVA de una vía para probar el efecto de los estadios de desarrollo sobre las concentraciones de GLU en glándula digestiva.

Fuente de variación	GI	SC	F	P
Estadios reproductivos	2	70.738	1.137	0.356
Residual	11	62.197		
Total	13			

Tabla 39. ANOVA de una vía y prueba de Tukey para probar el efecto de los estadios de desarrollo sobre las concentraciones de TGC en glándula digestiva.

Fuente de variación	GI	SC	F	P
Estadios reproductivos	2	0.545	3.449	0.069
Residual	11	0.158		
Total	13			

COMPONENTES BIOQUÍMICOS MACHOS POR ESTADIOS

Hemolinfa

Tabla 40. ANOVA de una vía para probar el efecto de los estadios de reproductivos sobre las concentraciones de CHOS en hemolinfa

Fuente de variación	GI	SC	F	P
Estadios reproductivos	4	0.00499	0.998	0.416
Residual	62	0.00500		
Total	66			

Tabla 41. ANOVA de una vía para probar el efecto de los estadios de reproductivos sobre las concentraciones de PT en hemolinfa

Fuente de variación	GI	SC	F	P
Estadios reproductivos	4	0.0823	1.312	0.275
Residual	62	0.0627		

Total	66
-------	----

Tabla 42. ANOVA de una vía para probar el efecto del estadio reproductivo sobre las concentraciones de GLU en hemolinfa.

Fuente de variación	gl	SC	F	P
Estadios reproductivos	4	0.00211	0.787	0.538
Residual	62	0.00268		
Total	66			

Tabla 43. ANOVA de una vía para probar el efecto de los estadios de reproductivos sobre las concentraciones de TGC en hemolinfa

Fuente de variación	GI	SC	F	P
Estadios reproductivos	4	0.0000241	1.534	0.204
Residual	62	0.0000157		
Total	66			

Gónada

Tabla 44. Prueba de Kruskal-Wallis y de Dunn para probar el efecto del estadio reproductivo sobre las concentraciones de CHOS en gónada.

Estadístico H = 33.059, g.l. 4, P = < 0.001
Prueba de Dunn ES <u>LS</u> <u>SP</u> SG SPS


Tabla 45. Prueba de Kruskal-Wallis y de Dunn para probar el efecto del estadio reproductivo sobre las concentraciones de GCG en gónada.

Estadístico H = 28.894, g.l. 4, P = < 0.001
Prueba de Dunn ES SPS <u>LS</u> <u>SP</u> SG

Tabla 46. ANOVA de una vía para probar el efecto del estadio reproductivo sobre las concentraciones de PT en gónada.

Fuente de variación	gl	SC	F	P
Estadios reproductivos	3	42474.305	2.365	0.081
Residual	54	17962.709		
Total	57			

Tabla 47. ANOVA de una vía y prueba de Tukey para probar el efecto del estadio reproductivo sobre las concentraciones de LT en gónada.

Fuente de variación	GI	SC	F	P
Estadios reproductivos	3	3820.260	7.133	< 0.001
Residual	54	535.613		
Total	57			

Prueba de Tukey ES LS SP SG SPS

Tabla 48. ANOVA de una vía y prueba de Tukey para probar el efecto del estadio reproductivo sobre las concentraciones de GLU en gónada.

Estadístico H = 15.043, g.l. 4, P = 0.005
Prueba de Dunn ES <u>LS</u> SP SG SPS

Tabla 49. Prueba de Kruskal-Wallis y de Dunn para probar el efecto del estadio de desarrollo sobre las concentraciones de TGC en gónada.

Estadístico H = 11.765, g.l. 4, P = 0.019
Prueba de Dunn ES LS <u>SG</u> SP SPS

Glándula digestiva

Tabla 50. ANOVA de una vía para probar el efecto del estadio reproductivo sobre las concentraciones de CHOS en glándula digestiva.

Fuente de variación	GI	SC	F	P
Estadios reproductivos	3	567.112	1.471	0.233
Residual	53	385.562		
Total	56			

Tabla 51. ANOVA de una vía para probar el efecto del estadio reproductivo sobre las concentraciones de GCG en glándula digestiva.

Fuente de variación	GI	SC	F	P
Estadios reproductivos	3	100.224	1.518	0.220
Residual	53	66.018		
Total	56			

Tabla 52. ANOVA de una vía para probar el efecto del estadio reproductivo sobre las concentraciones de PT en glándula digestiva.

Fuente de variación	GI	SC	F	P
Estadios reproductivos	3	20596.804	0.943	0.427
Residual	53	21851.088		
Total	56			

Tabla 53. ANOVA de una vía para probar el efecto del estadio reproductivo sobre las concentraciones de LT en glándula digestiva.

Fuente de variación	GI	SC	F	P
Estadios reproductivos	3	815.504	2.520	0.068

Residual	53	323.591
Total	56	

Tabla 54. ANOVA de una vía para probar el efecto del estadio reproductivo sobre las concentraciones de GLU en glándula digestiva.

Fuente de variación	Gl	SC	F	P
Estadios reproductivos	3	37.891	0.315	0.814
Residual	53	120.202		
Total	56			

Tabla 55. ANOVA de una vía y prueba de Tukey para probar el efecto del estadio reproductivo sobre las concentraciones de TGC en glándula digestiva.

Fuente de variación	gl	SC	F	P
Estadios reproductivos	3	131.262	2.094	0.112
Residual	53	62.697		
Total	56			

