

# UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA

ESCUELA SUPERIOR DE CIENCIAS MARINAS

FECUNDACION ARTIFICIAL Y DESARROLLO  
EMBRIONARIO DE Haliotis fulgens Phillipi, 1845 y Haliotis  
rufescens Swainson, 1822 EN CONDICIONES DE ACUARIO

T E S I S

Que para optar al título de

O C E A N O L O G O

p r e s e n t a

IGNACIO FELIX COTA

Ensenada, Baja California

1970

A MI ABUELO FERMIN COTA FERNANDEZ

Quien me legara su cariño por el  
mar

A MIS QUERIDOS PADRES:

En gratitud a su esfuerzo  
y apoyo

EL PRESENTE TRABAJO FUE REALIZADO EN LA ESTACION DE BIOLOGIA PESQUERA DEL SAUZAL, B.C. DEPENDIENTE DEL INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES BIOLOGICO PESQUERAS Y EN EL INSTITUTO OCEANOGRAFICO SCRIPPS, LA JOLLA CALIF. BAJO LA DIRECCION DE LA BIOLOGO SARA DE LA CAMPA DE GUZMAN Y ACTUANDO COMO CONSULTOR- EL DR. DAVID L. LEIGHTON.

## AGRADECIMIENTOS

AL DR. DAVID L. LEIGHTON POR SU VALIOSA Y DESINTERESADA ORIENTACION EN EL DESARROLLO DEL PRESENTE ESTUDIO, DE QUIEN ESTOY INMENSAMENTE AGRADECIDO.

A MI DIRECTORA DE TESIS BIOLOGO SARA DE LA CAMPA DE GUZMAÑ Y ESPOSO BIOLOGO SERGIO ANTONIO GUZMAN DEL PROO DE QUIENES -- CON SU SINCERA COLABORACION E INCANSABLE AFAN DE SUPERACION, RECI BI UN ORIGINAL EJEMPLO DE DEDICACION Y ESFUERZO.

AL SR. FERNANDO LOPEZ, EXPERTO BUZO CON QUIEN CONTE EN TODO MOMENTO.

AL DR. NICOLAS GRIJALVA O., DIRECTOR DE LA ESCUELA SUPERIOR DE CIENCIAS MARINAS Y A MI QUERIDO AMIGO DR. RICHARD GRIGG.

AL BIOLOGO MANUEL FLORES VILLEGAS, DIRECTOR DE LA ESTACION DE BIOLOGIA PESQUERA DEL SAUZAL, B.C. Y AL PERSONAL DE LA -- MISMA.

AL INSTITUTO OCEANOGRAFICO SCRIPPS.

"DEBEMOS TENER SIEMPRE PRESENTE QUE EL OCEANO ES NUESTRO  
MAS NOBLE PROVEEDOR; SUS RIQUEZAS NO SON INAGOTABLES Y  
LO QUE APRENDAMOS A CONSERVAR EN EL PRESENTE, PUEDE SIG  
NIFICAR NUESTRA SOBREVIVENCIA EN EL MAÑANA".

## C O N T E N I D O

	Pág
I. INTRODUCCION	1
Objetivos	1
Posición taxonómica y descrip. del género	2
Antecedentes	4
II. MATERIALES Y METODOS	7
III. RESULTADOS	16
<u>Haliotis fulgens</u>	16
<u>Haliotis rufescens</u>	24
Influencia de la temperatura en el desarrollo de <u>Haliotis rufescens</u>	29
IV. DISCUSION	32
V. CONCLUSIONES	36
VI. RECOMENDACIONES	39
VII. RESUMEN	42
LITERATURA CITADA	44

## I. INTRODUCCION

### OBJETIVOS.

El peligro que representa para la industria pesquera, - la explotación al parecer excesiva del recurso abulonero de México, acompañado de vedas inadecuadas, ha creado la necesidad de emprender estudios acerca de su biología, con especial interés en - sus hábitos reproductores, y en la obtención y cuidado de las etapas embrionarias; con el propósito de contribuir a lograr futuras técnicas de cultivo y repoblación de este preciado molusco.

Se han llevado a cabo, numerosos estudios de taxonomía, fisiología y anatomía de haliótidos, pero muy pocos sobre su propagación y embriología; agregándose a esto que lo poco que se ha publicado, contiene muy escasa información concerniente a métodos de obtención y cuidado de embriones y larvas.

El objetivo primordial de este trabajo fué conocer, mediante técnicas de desove y fecundación artificial en condiciones de acuario, el desarrollo embrionario de las especies de mayor tamaño Haliotis fulgens y Haliotis rufescens (abulón azul y rojo -- respectivamente), que son objeto de explotación comercial en Baja California. Asimismo, observar la influencia de la temperatura -

en su desarrollo.

Posición taxonómica y descripción del abulón. El género Haliotis es considerado como uno de los mas antiguos e importantes del phylum Mollusca, ya que según Cox (1962) se han reportado fósiles desde el Paleozoico y constituye una riqueza de explotación en diferentes costas del mundo y muy especialmente en nuestra península de Baja California.

Los abulones pertenecen de acuerdo con L. R. Cox (1962) a la

Clase: Gasterópoda

Subclase: Prosobranchia

Orden: Archaeogasteropoda

Suborden: Zygobranchia

Superfamilia: Pleurotomariacea

Familia: Haliotidae.

Los gasterópodos integran la clase mas grande y variada de Moluscos, donde la mitad de las 80,000 especies conocidas son marinas.

Todos los abulones pertenecen a la familia Haliotidae, Rafinesque (1815); el cual nombró a la subfamilia como Haliotidia, que fué corregida a Haliotidae por Fleming en 1922. Haliotis es el único género de la familia. Haliotis midae (Lineo, 1758) es el género tipo.

Descripción del género Haliotis. Caracteres externos.

El género se caracteriza por poseer una concha auriforme, región dorsal convexa, que puede variar de muy arqueada en la región posterior, aplanda en la región anterior, con una serie de perforaciones u orificios, alineados en la concha sobre la cavidad respiratoria. Las estructuras sensorias epipodiales bien desarrolladas, el cuerpo y masa visceral marcadamente aplanados, confinan al animal hasta el último recodo de su concha.

Caracteres internos. (Aparato reproductor). Los halió *Calif. Tich Bull # 118: 7 Calif. Abalones, Tenu Nalidid Cox.*  
 tidos son bisexuales. En la hembra la gónada es de color verde oscuro y color crema en el macho. Dicha gónada está desarrollada sobre la glándula digestiva y semeja la forma de un cuerno alargado, situado alrededor del lado izquierdo del músculo columnar del pie. Cuando está madura (época de desove), llega a ocupar gran parte de la actividad paleal, cubriendo en su parte anterior el estómago, hígado, órganos renales y al corazón.

La maduración tiene lugar por lo regular en primavera, desovando en los últimos meses del verano, aunque existe una gran variación de épocas de madurez y desove de acuerdo con las diferentes especies y localidades.

Los productos sexuales son descargados por medio de contracciones musculares hacia la cavidad renal donde son expulsados a la cavidad respiratoria y de ahí al exterior, a través de los orificios branquiales de la concha.

La formación de la concha tiene lugar desde los estados larvarios en los cuales se presenta un fenómeno muy característi-

co de la subclase prosobranchia, que es el fenómeno de torsión de la larva. En este género, según Crofts (1937), dicha torsión ocurre en dos fases.

#### ANTECEDENTES.

Desove. Se han realizado diversos estudios sobre desove en Haliotis y todos ellos parecen coincidir en que la liberación de productos sexuales depende, principalmente, del grado de madurez gonadal y de la temperatura.

El primero en trabajar con Haliotis rufescens en California, E.U.A., fué Carlisle (1945) quien indujo desoves en acuario, demostrando que la época de desove se extiende de julio a septiembre para esta especie; aunque, según Cox (1962), Heath en 1925 reportó la misma especie desovando en los meses de febrero a abril. Carlisle (op.cit) afirma, que aunque ocurren desoves, no siempre hay una buena fecundación. Dicho autor, empleando un método diferente, expuso al aire (deseccación) a los abulones maduros por espacio de 1 hr y 15 min, logrando gran cantidad de esperma que roció sobre las conchas de las hembras y obtuvo los desoves de las mismas en seis a siete horas después de haberlas depositado en tanques con agua bien oxigenados.

Según Cox (1962), Medem en 1948 trató de estimular desove de machos de Haliotis tuberculata en la presencia de hembras y viceversa, fracasando en ambos intentos. Sin embargo, observó que al imitar las contracciones musculares ocurridas en el desove, sumergiendo un vaso contra el fondo del tanque a intervalos -

ritmicos, lograba expulsiones de productos sexuales; por lo que Medem afirma, que el desove de haliótidos no se logra por medios quimicos sino a través de ciertos estímulos físicos.

Ino (1952) afirma; que una simple estimulación mecánica o incremento de temperatura, era suficiente para inducir desoves en adultos maduros, y agrega que, en los abulones japoneses no -- ocurren desoves, hasta que la temperatura del agua alcanza 20°C. "Los experimentos de fecundación en abulones, son difíciles de -- conducir debido al problema de adquirir adultos maduros en condiciones de desove".

Leighton (1959) reportó en Haliotis cracherodii (abulón negro) que los machos precedían a las hembras en su madurez gonadal, y que ésta se inicia en la primavera agotándose en el otoño.

Otro de los factores que influyen en el desarrollo gonadal es el alimento adecuado de los adultos; según Cox (1962) en los años de 1957 a 1959, un incremento excesivo en la temperatura del agua, provocó la destrucción de la mayoría de los mantos alquíferos, lo cual trajo por consecuencia, raquitismo en el desarrollo de las gónadas e incapacidad para desovar.

Desarrollo embrionario. Según Cox (1962) los estudios mas antiguos sobre desarrollo embrionario, fueron realizados por Kishinouye en 1894, quien trabajó con especies japonesas de abulón y trató de emprender estudios de fecundación, fracasando en su intento.

Este mismo autor afirma que Boutan en 1899, fué el pri-

mero que dió a conocer la embriología de la especie europea Haliotis tuberculata.

Murayama (1935) logró fecundar la especie japonesa Haliotis gigantea, conservando sus larvas por 6 semanas.

Crofts (1929, 1937) obtuvo desoves en el mar de Haliotis tuberculata y siguió su organogénesis por dos meses.

Carlisle (1962) logró observar Haliotis rufescens desde su fecundación, hasta siete días después cerca de la metamorfosis.

El primero en obtener una secuencia ontogénica completa fué Ino (1952), empleando las especies japonesas Haliotis discus y Haliotis sieboldii. Ino, logró llevar a cabo el desarrollo completo de Haliotis discus por 13 meses y únicamente por 20 días el de Haliotis sieboldii. Obtuvo con éxito alrededor de 100 abulones juveniles durante 1960 y 1961, logrando en 1962, una producción comercial en corta escala.

El último estudio embriológico de que se tiene conocimiento hasta la fecha es el de Oba (1962), que basó sus experimentos en la especie japonesa Haliotis diversicolor supertexta y observó el desarrollo de los abulones por espacio de 201 días después de su fecundación. Su trabajo es muy parecido al de Ino (op.cit.) aunque no tan extenso.

## II. MATERIALES Y METODOS

Antes de iniciar este capítulo, es necesario aclarar - que aunque básicamente fueron aplicados los mismos métodos de de~~de~~sove y fecundación en Haliotis fulgens y Haliotis rufescens, los experimentos fueron llevados a cabo en distintos laboratorios, - bajo condiciones diferentes.

Los estudios de Haliotis fulgens, fueron realizados en el acuario de la Estación de Biología Pesquera del Sauzal (I.N.-I.B.P.) de marzo a septiembre y los de Haliotis rufescens, en el acuario experimental del Instituto Oceanográfico Scripps, La Jolla, California, durante los meses de octubre, noviembre y diciembre.

Equipo de captura.-Los especímenes adultos de abulón azul (Haliotis fulgens) que sirvieron como reproductores, fueron recolectados en zonas cercanas a la Estación de Biología Pesquera del Sauzal y Punta San Miguel mientras que los de Haliotis rufescens fueron obtenidos en Punta Santo Tomás y Xatay.

El acceso a dichas zonas se logró a bordo de la lancha "Agardhiella", utilizándose equipo de buceo autónomo para la recolección. El traslado de los abulones capturados se realizó en-

dos cubetas de plástico polivinilo con 10-15 abulones en cada uno, como máximo.

Equipo de conservación.- Los abulones se mantuvieron en acuarios con agua de mar corriente, utilizando un sistema sencillo de bombeo. Se tomaron precauciones en cuanto a contaminantes, utilizando únicamente equipo y tubería de plástico polivinilo, evitando en todo caso, la presencia de metales.

El agua de mar, pasaba primeramente por un filtro de arena (Fig. 1, a y b) con el fin de eliminar toda clase de materia o basura en suspensión (algas, detritus, macroplancton, organismos muertos, etc.) descargando posteriormente el agua limpia al tanque de cautiverio. (Fig. 1, c).

Dicho tanque fue conservado con las mismas fluctuaciones de temperatura existentes en el mar, de acuerdo con los meses en que se trabajó, con una capacidad para conservar en cautiverio 30 abulones en perfectas condiciones.

La oxigenación de los tanques y tinas de desove se realizó usando una bomba de aire eléctrica, regulando la presión por medio de válvulas; en el agua el oxígeno era distribuido a través de burbujeadores, obteniendo de esta manera una oxigenación más satisfactoria (Fig. 1, e, h y g).

Equipo de desove.- Como recipientes de desove se utilizaron cuatro tinas blancas de plástico polietileno, con una capacidad de cuatro galones por unidad.

Es necesario contar con recipientes de menor tamaño -- que los de cautiverio, con el fin de reducir el medio y facilitar la reacción a los estímulos de inducción a que son sometidos los reproductores; evitando en todo implemento, la más mínima - partícula metálica que contamine el medio.

Para incrementar la temperatura en las tinas de desove, se utilizaron seis calentadores eléctricos cubiertos de vidrio - de 75 y 125 Watts, con un intervalo de variación de  $\pm 2^{\circ}\text{C}$  (Fig. - 1, F). La temperatura fue medida en grados centígrados, utilizando un termómetro con  $1^{\circ}\text{C}$  de precisión y con un rango de  $-30^{\circ}$  a  $+ 50^{\circ}\text{C}$ .

La recolección y manejo de productos sexuales, se efectuó a través de sifones de plástico, pipetas, goteros y recipientes de polietileno con una capacidad de 2.5 litros de agua. Para separar y limpiar los huevos se construyeron tamices de plástico con mallas de dos diferentes aberturas (250 y 150  $\mu$ ), por medio de los cuales se eliminaban sustancias y partículas indeseables.

Para la conservación y reposo de los huevos, se emplearon recipientes de vidrio Pyrex y agua de mar filtrada en "millipore" que era almacenada en garrafrones de vidrio, manteniéndolos en la obscuridad para evitar un posible desarrollo de microalgas.

#### METODOS.

Llevar a cabo estudios de desove, fecundación artificial y desarrollo embrionario, exige aparte del equipo necesario, contar con un buen número de abulones adultos, de ambos sexos y -

con un grado de madurez gonadal avanzado. El contar con una buena lancha y un experto buzo con amplios conocimientos de los bancos abuloneros, es de una valiosa y alentadora ayuda.

Captura, selección y traslado.- La captura de abulones adultos se emprendía por lo regular cada 10 ó 15 días dependiendo de las condiciones del mar. Ya en el área de captura el buzo desprendía con una espátula al abulón del sustrato, tratando de herirlo lo menos posible. Los especímenes desprendidos eran depositados en una jaba recolectora, la cual era llevada a la superficie al llenarse. A bordo, los ejemplares recolectados eran extraídos de la jaba y colocados pie arriba sobre cubierta, con el fin de contarlos, identificarlos y seleccionarlos en cuanto a sexo y madurez gonadal, repórtándose en una tarjeta con la siguiente inscripción:

JABAS	No. DE ABULONES	♂	♀	GRADO DE MADUREZ GONADAL		
				A	B	C

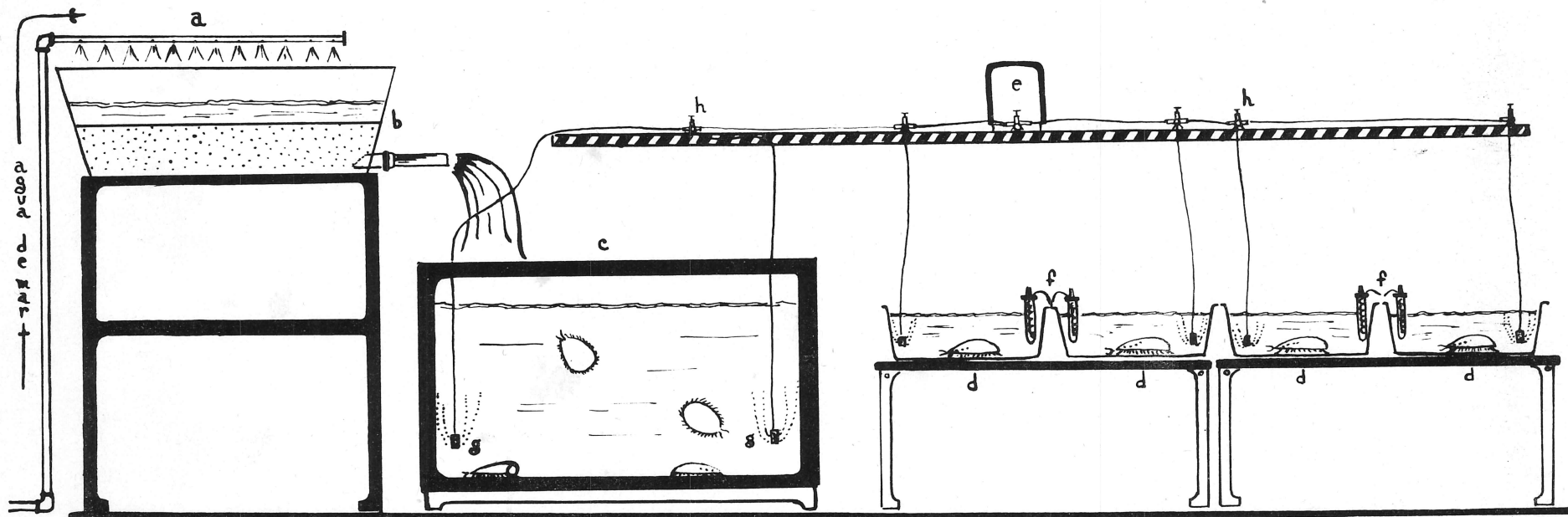
Lugar:  
Especie:  
Fecha:  
Hora:  
Temp.:  
H<sub>2</sub>O

A = GONADA MADURA

B = GONADA DE MADUREZ MEDIA

C = GONADA AGOTADA O FLACIDA

La separación por sexos se llevó a cabo basándose en la coloración de la gónada. Una coloración blanco-cremoso corresponde a los machos y verde oscuro a las hembras. La identifica--



**FIG.2. SECCION LONGITUDINAL DEL SISTEMA DE ACUARIOS.**  
**a: regadera, b: filtro de arena, c: tanque de cautiverio.**  
**d: tinas de desove; e: bomba de aire; f: resistencias,**  
**g: burbujeadores; h: valvulas.**

ción del grado de madurez fué en razón directa al abultamiento y desarrollo de la gónada.

Manejo. Al llegar al acuario, las conchas de los abulones eran despojadas de todo organismo epizoico (balanus, algas, - espiroboris, etc.), con el fin de evitar posibles complicaciones, ya que, en las tinas de desove el medio es reducido y fácil de -- contaminar.

Antes de ser depositados en el tanque de almacenamien-- to, cada abulón era marcado con una placa de plástico, sujeta a -- éstos a través de los orificios de la concha con hilo nylon. Cada placa llevaba marcado el sexo y un número que indicaba el grado de madurez gonadal.

Al ser colocados en el tanque de cautiverio se tenía ex-- tremo cuidado de que el agua fuera nueva, limpia y bien oxigena-- da, por lo que antes de depositar una nueva remesa de adultos, -- los tanques eran limpiados perfectamente cambiando el agua y pro--veyendo una adecuada oxigenación y circulación mediante burbujeadores. Durante el período de reposo, los abulones se mantuvieron con un alto nivel de alimentación, con el fin de evitar debilita-- miento.

Expulsión de Gametos. Primeramente, se escogieron abulones de ambos sexos con el máximo grado de madurez gonadal posible y se mantuvieron sin alimento por lo menos 24 horas, antes de los experimentos. Esto fué con el propósito de evitar expulsio-- nes de heces durante el desove, lo cual crea problemas en la reco

lección y limpieza de los huevos, motivando además la aparición - de protozoarios y bacterias en el medio.

A los machos se les dejaba fuera del agua (deseccación) durante 30-50 min, antes de aplicar el estímulo para la expulsión de esperma.

A continuación, se colocaron los especímenes escogidos en tinas de desove, donde mediante los siguientes métodos se obtuvo la descarga de productos sexuales.

- a). Incremento de temperatura en el agua.
- b). Estimulación mecánica.
- c). "Shock" térmico.
- d). Estimulación química.

a). La inducción por incremento en la temperatura del agua, se efectuó colocando resistencias de 75 a 125 Watts dentro de las tinas de desove, calentando gradualmente el agua hasta obtener la expulsión de gametos. El rango de incremento de temperatura utilizado varió desde 15° hasta 28°C.

b). La estimulación mecánica se basó en sujetar la concha con la mano, oprimiéndola repetidamente, creando de esta manera contracciones musculares similares a las efectuadas en el desove que ayudan a la expulsión de los gametos.

c). El estímulo de shock térmico se aplicaba introduciendo bruscamente los abulones en agua 10°C mas caliente ó mas fría de la que se encontraba anteriormente en reposo, esto daba -

lugar a una descarga inmediata de gametos.

d). La estimulación química fué aplicada unicamente a las hembras, ya que el someterlas a un medio saturado de esperma, provoca un fuerte efecto en la expulsión de óvulos.

Fecundación. En esta fase se siguieron dos procedimientos principalmente:

a). Tanto machos como hembras fueron colocados en una misma tina, en una proporción de dos hembras por cada macho, aplicándoles al mismo tiempo estímulos para desove, permitiendo que la fecundación ocurriera inmediatamente.

b). Las hembras y machos fueron colocados por separado en diferentes tinas, donde se indujo la expulsión de gametos. -- Los óvulos y el esperma fueron recolectados por medio de sifones de plástico o pipetas, depositándolos posteriormente en recipientes de plástico donde se realizó la fecundación.

Siguiendo las indicaciones del Dr. Leighton; para asegurar una fecundación satisfactoria, los óvulos se dejaban en el -- agua saturada de esperma por espacio de 30-45 min, después de lo cuál se lavaron eliminando esperma y fluidos mucosos, depositándolos en recipientes Pyrex con agua de mar filtrada, para evitar la contaminación de bacterias y el ataque de protozoarios presentes en el esperma al comenzar a descomponerse.

Conservación y limpieza. La separación de los huevos -- fecundados del esperma, fué realizada con mallas de plancton de --

diferente número, de la siguiente manera:

a). Se eliminaron heces fecales, al igual que desechos de adultos y restos de vesículas germinales, vertiendo el desove a través del tamiz de mayor diámetro de malla, en el cual quedaba atrapado este detritus, pasando únicamente los huevos y el esperma acompañado de fluidos mucosos de consistencia albuminosa, expulsados por la hembra en el desove.

b). En seguida se procedió a vertir lo recolectado a través de un tamiz de menor diámetro (150 u), donde quedaban atrapados los huevos, desechando de esta manera, esperma, catabolitos y toda clase de fluidos mucosos productores de bacterias y protozoarios.

Los huevos atrapados en la malla fueron enjuagados repetidamente con agua de mar, filtrada previamente con sistema "millipore", asegurando una limpieza efectiva. Posteriormente se depositaron en recipientes de vidrio "Pyrex" con agua de mar filtrada, dejándose reposar en un lugar oscuro, a una temperatura entre 15°-20°C. Los embriones se dejaron reposando por espacio de 24 horas, después de lo cual, se observaron larvas a media agua describiendo movimientos rotatorios, congregándose posteriormente en la superficie. Las larvas fueron extraídas por pipetas y depositadas en otro recipiente Pyrex con agua de mar filtrada. El resto de los embriones se conservó por espacio de 8-10 horas más, colectando cualquier trocofora de desarrollo atravesado y eliminándose posteriormente todo embrión anormal y no desarrollado.

### III. RESULTADOS

Haliotis fulgens. Uno de los principales inconvenientes fue que el agua de mar utilizada en la Estación de Biología - Pesquera, provenía de una área fuertemente contaminada con desechos industriales, procedentes de la planta empacadora de pescado adyacente al área.

En realidad, los primeros meses de trabajo (marzo y --- abril) fueron tomados como entrenamiento y depuración de las técnicas empleadas. Dada la marcada inmadurez gonadal en estos meses, los desoves fueron escasos y raquíuticos. Pues a pesar de -- que eran aplicados estímulos enérgicos, se obtenía únicamente la expulsión de huevos inmaduros, incluidos la mayoría, en paquetes de vesículas germinales o esperma bastante débil.

La fecundación alcanzó un 30%, pero el desarrollo ulterior no se observaba; los óvulos fecundados morían siendo atacados de inmediato por bacterias y protozoarios. Posteriormente y conforme la madurez gonadal de machos y hembras se fué incrementando (mayo), se comenzó a obtener mejores resultados; se colocaban los reproductores en las tinas de desove en una proporción de dos hembras por cada macho garantizando así la expulsión de pro--

ductos sexuales de las hembras, ya que éstas son mas difíciles de estimular. El desarrollo embrionario observado alcanzó en algunos casos hasta morula y en otros solamente de 16 blastómeros. -- (Fig. 5, B y C).

Los experimentos se continuaron sin modificaciones esperando únicamente que el grado de madurez gonadal fuera simultáneo para ambos sexos, y el día 12 de junio se obtuvieron las primeras larvas, producto de la fecundación de un macho, que había permanecido expulsando esperma a intervalos, por espacio de 12 días.

Dichas larvas fueron observadas en la etapa de veliger después de ocurrida la torsión, mostrando claramente el opérculo, concha, manto, la falda prototrocal y sus movimientos ciliares. - Se presenció, además la contracción del lóbulo ciliar y el opérculo dentro de su concha. Estas larvas murieron ocho horas después. (Fig. 4).

Pero en realidad se obtuvieron muy pocas larvas, persistiendo todavía fallas en el manejo y mantenimiento de los embriones, por lo que, se optó por cambiar a recipientes de vidrio, en el paso de reposo y mantenimiento, suponiéndose que alguna sustancia tóxica provenía de los recipientes de plásticos empleados anteriormente.

Para fines de agosto y septiembre, las técnicas de desove, cultivo y eficacia del equipo, se había perfeccionado bastante. Los adultos se encontraban en un grado ideal de maduración gonadal, contando con desoves abundantes y satisfactorios, aunque

la elevada contaminación del agua de mar en este mes, causó debilitamiento de los especímenes en cautiverio.

En octubre tanto el grado de madurez como la potencialidad de desove, comenzaron a disminuir aceleradamente sobre todo en las hembras. En seguida se optó por proseguir los estudios en el acuario experimental del Instituto Oceanográfico Scripps, bajo condiciones y equipo mas favorables.

En este mes se colectó una nueva remesa de especímenes adultos, en la zona de San Miguel, B.C.. Se capturaron 46, de los cuales 40 estaban totalmente gastados, utilizándose para los experimentos los seis restantes (tres hembras y dos machos de madurez media y únicamente un macho maduro). Estos fueron trasladados al Instituto Scripps donde se obtuvieron descargas satisfactorias de gametos de ambos sexos. Los desoves y la fecundación se llevaron a cabo con resultados negativos, similares a los obtenidos en Ensenada (divisiones anormales y bacterias) (Fig. 2 y 3), atribuyéndose esto, a que el esperma ya no estaba tan activo y las hembras demostraban inicio de agotamiento al expulsar paquetes de vesículas germinales, conteniendo huevos inmaduros. El desarrollo embrionario fué logrado hasta mórula, observándose gran porcentaje de divisiones anormales.

Dichas divisiones anormales, resultando de la inmadurez de los adultos, se caracterizaron principalmente en aberraciones en cuanto a la segmentación espiralada de los mismos y por divisiones en los micrómeros sin haber ocurrido segmentación alguna en los macrómeros. (Fig. 2).

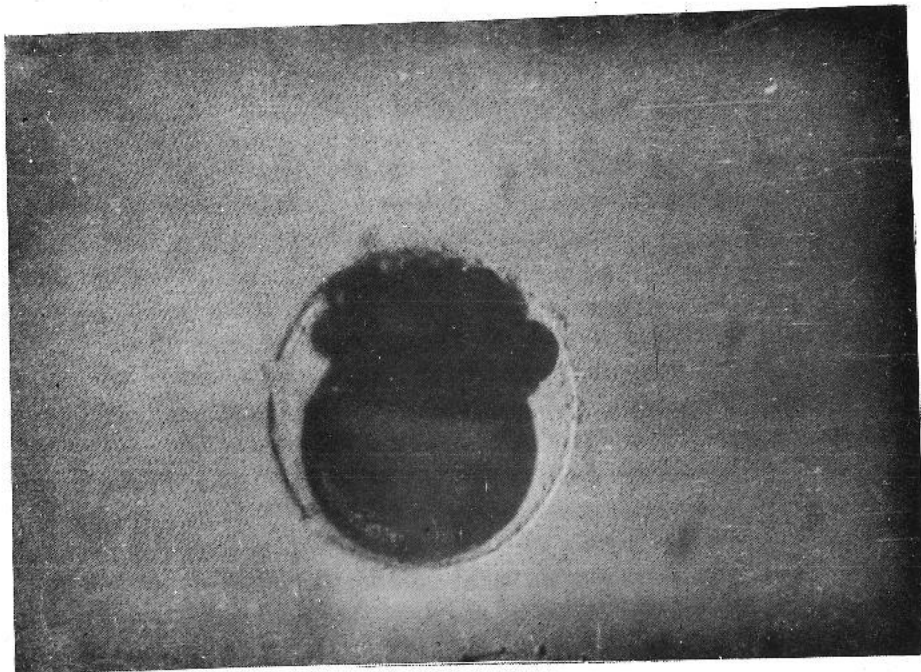


FIG. 2. EMBRION DE Haliotis fulgens con típica segmentación --  
anormal.

Se considera de utilidad aunque no es el principal propósito de este trabajo ofrecer la experiencia obtenida con el manejo de los huevos, que nos permitió determinar con relativa facilidad, y desde luego, en obvio de tiempo, los índices de viabilidad para huevos y embriones.

Cuando el desove no resultaba viable, se observaron los siguientes indicios:

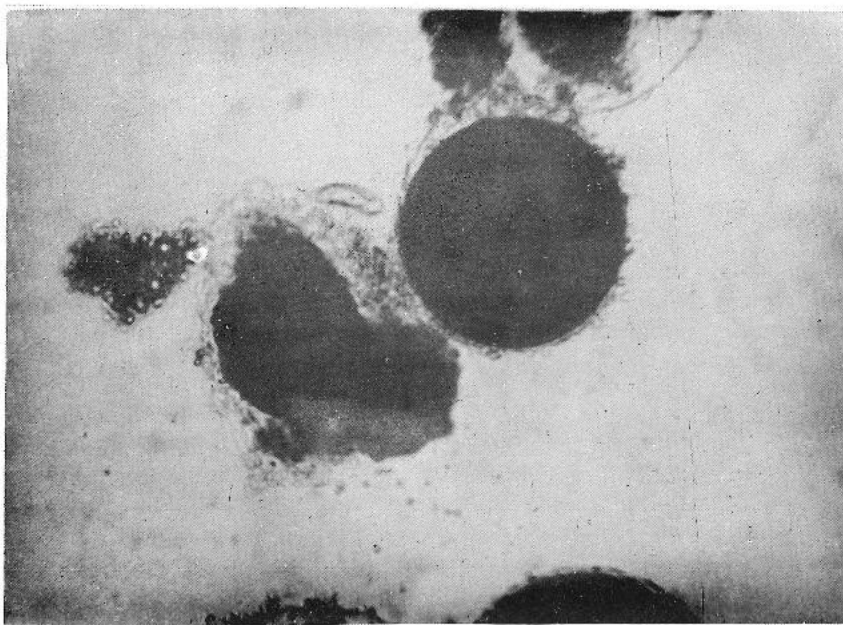
- a). Huevos de forma irregular.
- b). Mayoría de huevos no fecundados.
- c). Aspecto granuloso de los huevos, desintegración -- del citoplasma, rompimiento de las paredes de su -- membrana, por acción bacteriana. (Fig. 3).

- d). Presencia de tejido de vesícula germinal adherido a los huevos.
- e). Presencia de protozoarios en abundancia.
- f). Anormalidad en divisiones de etapas embrionarias. (Fig. 2).

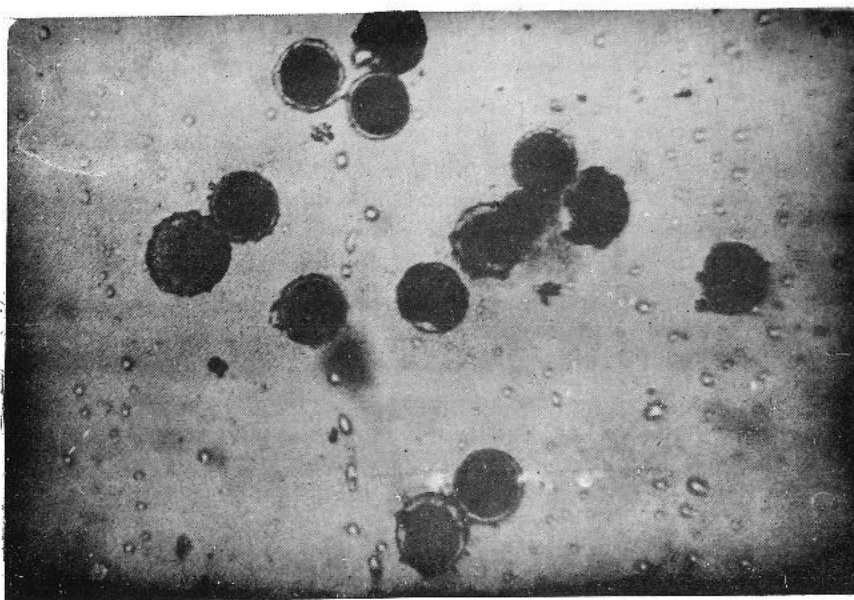
Cuando el desove resultaba viable, se observaron los siguientes indicios:

- a). Forma esférica en la mayoría de los huevos (Fig. - 4, A).
- b). Mayoría de huevos fecundados.
- c). Ausencia de tejido germinal en los huevos.
- d). Aspecto compacto del citoplasma. (Fig. 5, A).
- e). Ausencia de protozoarios, bacterias y organismos ciliados. (Fig. 5, B.C.).
- f). Normalidad en las divisiones de etapas embrionarias y larvarias.

En las observaciones de los índices de viabilidad, se notó que uno de los mayores problemas es causado por la presencia de bacterias, que atacan la membrana y destruyen el vitelo del óvulo. Se supone que este problema se hubiera podido evitar, utilizando lámparas de rayos ultravioleta para esterilizar el agua de mar filtrada. La aglomeración de embriones en los recipientes influenciaba la viabilidad negativamente, dañando la membrana vitelina de los oprimidos provocando mortalidad de huevos y aparición de bacterias.



A



B

FIG. 3. HUEVOS NO VIABLES DE Haliotis fulgens. A. Huevos de aspecto granuloso, presencia de protozoarios, desintegración del citoplasma y membrana vitelina. B. Aspecto general de un campo afectado por bacterias.

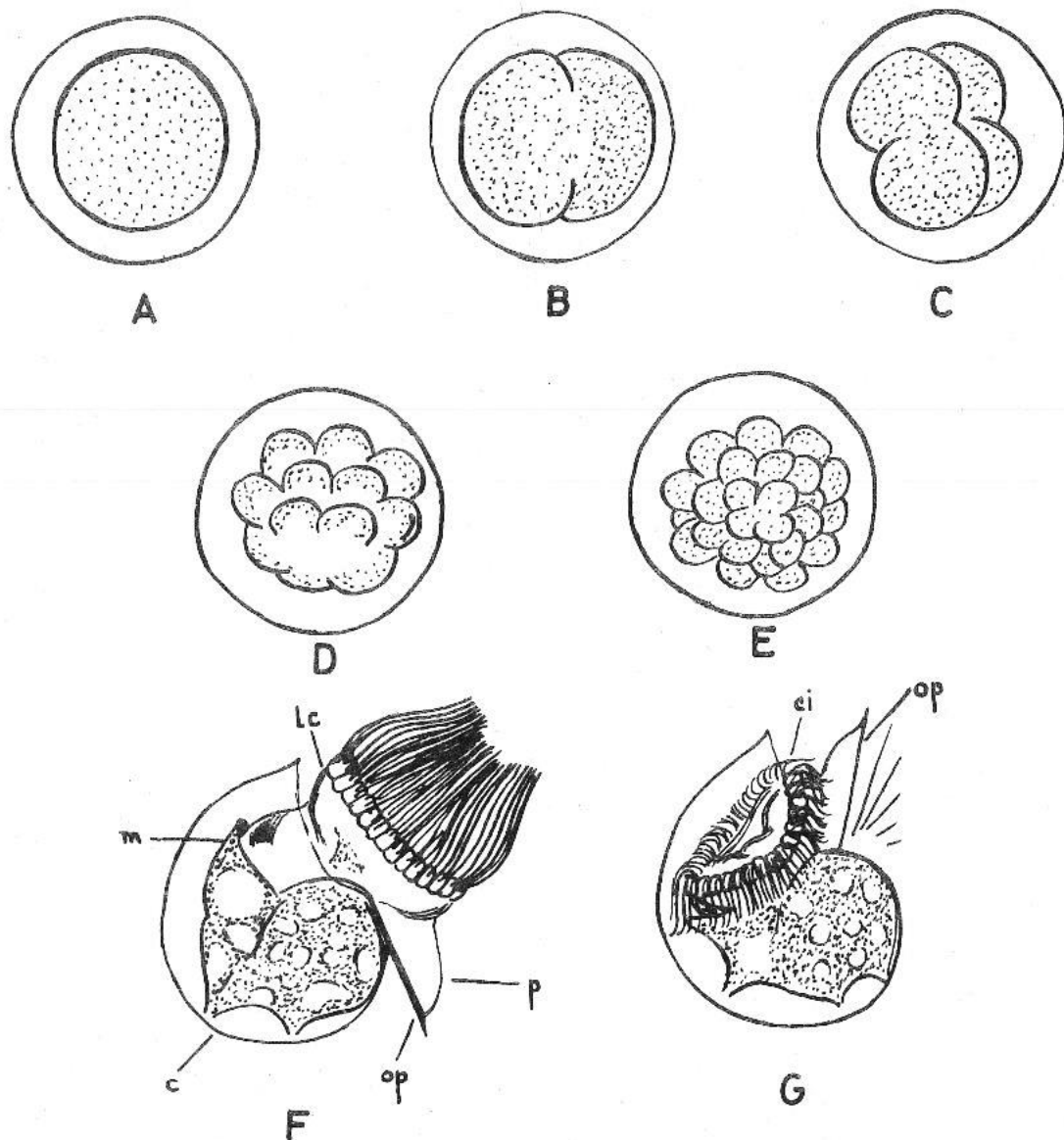
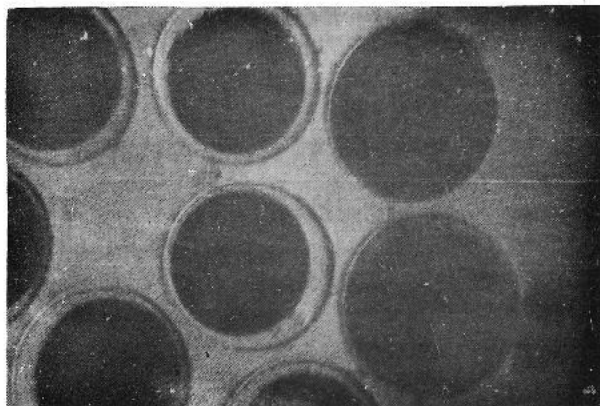
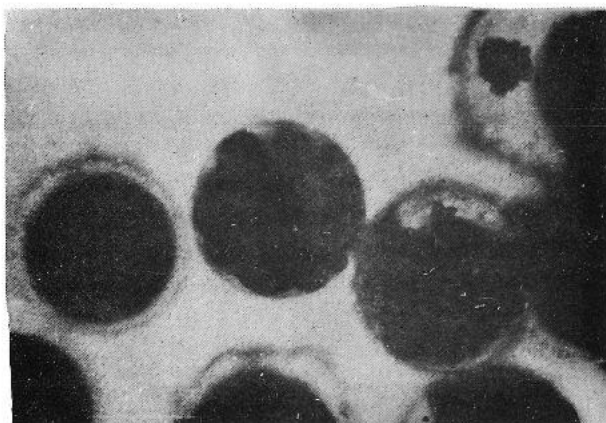


FIG. 4. ETAPAS DE DESARROLLO OBSERVADAS EN *Haliotis fulgens*.

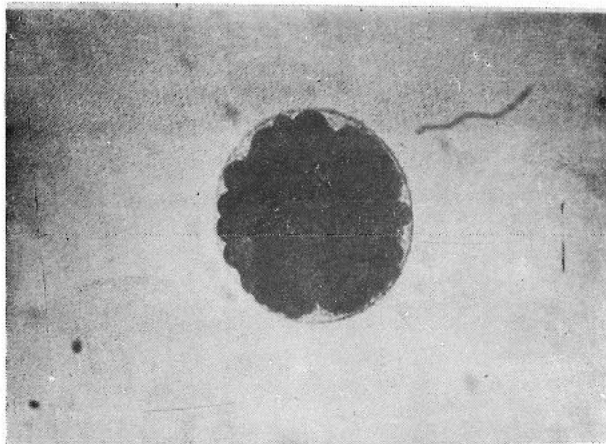
A. óvulo fecundado (vitelo expandido); B. bipartición  
 C. etapa de 4 células; D. etapa de 16 células; E. mo-  
 rula; F. veliger después de torsión; G. veliger con-  
 traída. c. concha; ci. cilios; lc. lóbulo ciliar; -  
 m. manto; op. operculo; p. pie.



A



B



C

FIG. 5. EMBRIONES DE Haliotis fulgens. A. Zygotos (huevos fecundados con membrana vitelina expandida) y óvulos no fecundados (derecha); B. Embrión segmentado en 16 blastómeros (centro); C. Etapa de mórula.

Haliotis rufescens. Los adultos fueron recolectados en el área de Xatay, B.C. y mostraron un elevado índice de madurez gonadal. Conviene destacar este hecho ya que la literatura (Sevilla et al, 1965) reporta únicamente los meses de verano como época de madurez en los haliótidos comerciales; sin embargo, en las mencionadas colectas realizadas el 30 de octubre y el 3 de noviembre, con temperaturas de 17°-18°C, el 75% del total de abulones rojos presentaron la gónada madura, mientras que el abulón azul en las mismas colectas, mostró en su mayoría la gónada gastada. Según Leighton (com. verbal) en el área de Morro Bay, Calif. Haliotis rufescens muestra dos épocas de madurez gonadal, durante el verano y en noviembre-diciembre.

Se trabajó con un promedio de 15-20 abulones y los desoves fueron muy satisfactorios. La fecundación alcanzó también altos porcentajes, presenciándose divisiones normales y ausencia de bacterias y protozoarios.

El desarrollo fué seguido hasta la fase larvaria de veliger después de torsión, logrando conservarlas por espacio de 3 días a partir de su fecundación.

Al ser descargados los óvulos, estos eran fecundados inmediatamente por el esperma presente, el cual nadaba activamente en el medio, mientras que los huevos tendían a reposar en el fondo, después de ser expulsados.

Al ser fecundado el óvulo, la membrana vitelina se observó notablemente expandida (Fig. 6, A) después de lo cual se --

inició la segmentación total espiralada, típica de estos moluscos. Las primeras segmentaciones (bipartición y cuatro células) (Fig. 6, B y C) daban lugar blastómeros de igual tamaño, pasando a la etapa de ocho células donde segmentación desigual comenzó en macrómeros (Blastómeros mayores) situados hacia el polo vegetal y micrómeros (blastómeros menores) situados hacia el polo animal (Fig. 6, D) sucediendo de igual manera en la etapa de 16 células (Fig. 6, E). A continuación se observaron las fases de mórula (Fig. 6, F) y de gástrula (Fig. 6, G) donde se completó la segmentación total.

A partir de la gástrula se formó gradualmente la larva trocófora (Fig. 6, J) apareciendo primeramente la falda prototrocal en forma primitiva, constituida por un cinturón de pequeños cilios, los cuales conforme iban creciendo activaban el movimiento elíptico de la larva en su esfuerzo por eclosionar rompiendo las paredes de la membrana (Fig. 6, J). En varias ocasiones, se observaron formas aberrantes de trocófora de menor tamaño, incluidas en la membrana vitelina junto con pequeños glóbulos de citoplasma las cuales morían antes de llegar a veliger.

Al concluir la eclosión, la larva trocófora se convertía en una activa libre-nadadora con reposos esporádicos en el fondo del recipiente.

Todos sus movimientos eran controlados y accionados por la corona de cilios, con los cuales creaba una corriente atrayendo microorganismos planctónicos. Después de la eclosión también fueron presenciadas varias formas de trocófora, notándose que las

trocóforas redondas se mostraban mas activas, logrando desarro--- llarse saludablemente hasta veliger después de torsión. En una - dase mas avanzada de esta etapa se observó el comienzo de la se-- cresión de la concha larval (Fig. 6, K) y el aumento de tamaño -- (longitud larva trocófora 221  $\mu$ ).

Ya en la fase larvaria de veliger, la concha se definió notablemente, adoptando un forma nautiloidea de color transparen- te, en la cual se encuentra embebida la masa visceral (Fig. 6,L). Tanto la falda prototrocal como la protuberancia ciliar se encon- traban mas desarrolladas. A continuación ocurre el fenómeno de - torsión, se nota la aparición del opérculo, pie y tentáculos cefá- licos aunque estos últimos son bastante inconspicuos. (Fig. 6,M) (Fig. 7,C).

Las larvas obtenidas de fecundaciones raquílicas o sea, cuando aproximadamente el 10% de los embriones llegaba a larva, - no vivieron mas de 24 horas. Por el contrario, las larvas obteni- das de desoves en los que el 20 o 30% de los embriones alcanzaba la fase larvaria, vivían hasta 3-5 días. Es decir, a mayor por-- centaje de larvas logradas, mayor longevidad de la larva.

Finalmente, cabe hacer notar la aparición de un cromató- foro de color verde-amarillo en los embriones que posteriormente alcanzaban un alto porcentaje de larvas. Dicho pigmento se loca- lizó en el polo animal de los embriones y en el lóbulo ciliar de las larvas.

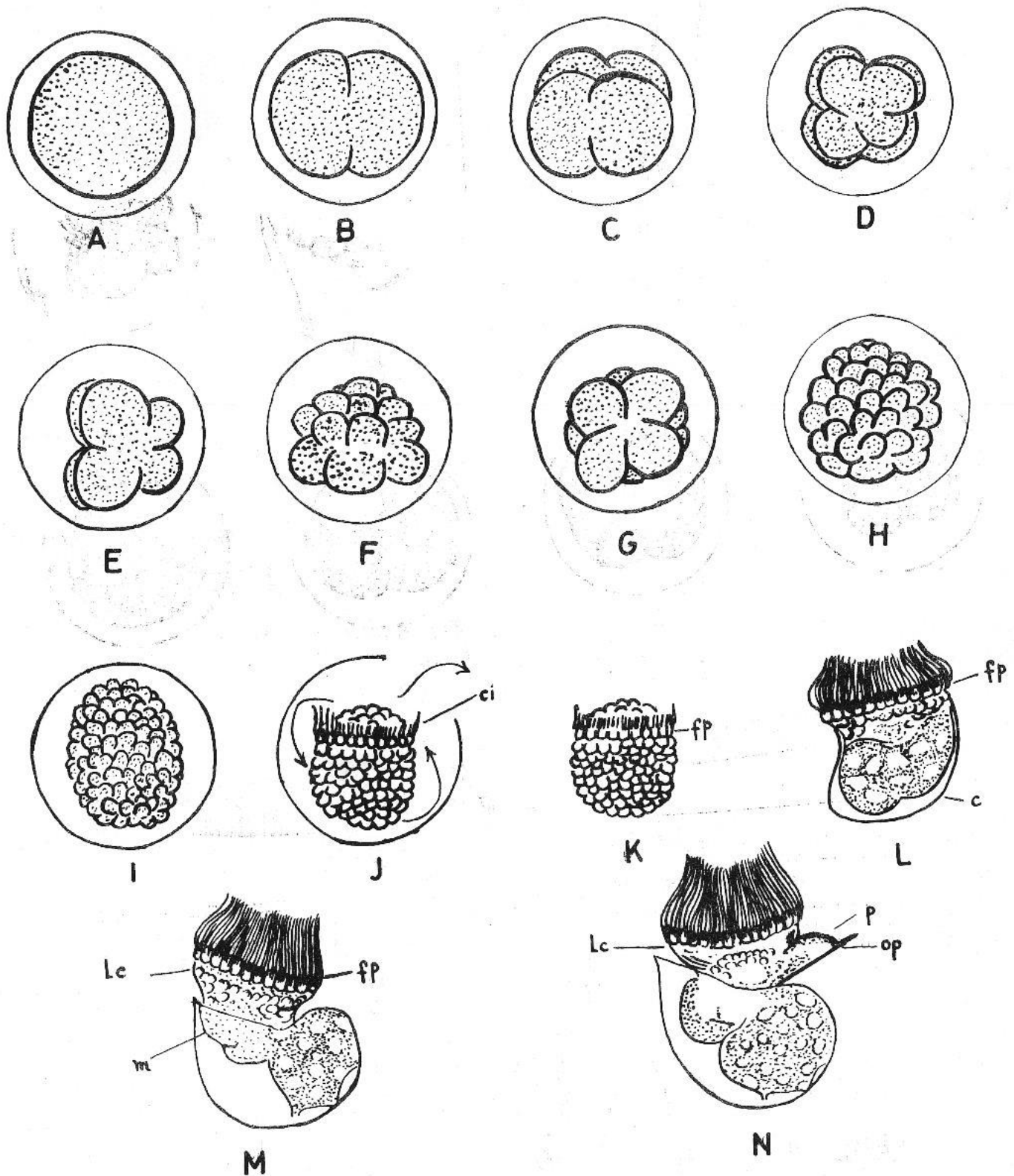


FIG. 6. ETAPAS DE DESARROLLO OBSERVADAS EN *Haliotis rufescens*.  
 Secuencia de óvulo a veliger después de torsión.

Explicación de la figura 6:

- A. Huevo fecundado con vitelo expandido (Vitelo:  $187\mu$  membrana vitelina =  $221\mu$ ).
- B. Bipartición (1:30 - 2:00 hrs).
- C. División en cuatro células (2:00 - 2:30 hrs).
- D. Estadio de ocho células (vista desde polo animal) (3:15 - 3:35 hrs).
- E. Estadio de ocho células (vista lateral)
- F. División de 16 células (vista lateral) (5:17 - 5:30 hrs).
- G. División de 16 células (vista desde polo vegetal).
- H. Mórula (6:10 - 6:35 hrs).
- I. Gástrula.
- J. Larva trocófora en eclosión (16 - 17 hrs).
- K. Trocófora en estado natatorio (con  $221\mu$ ) (23 hrs). (Indicaciones de secreción de la concha larval).
- L. Trocófora en estadio veliger (27 - 28 hrs) ( $306\mu$ ) (antes de torsión).
- M. Veliger después de torsión. (47 - 48 hrs).

NOTA: períodos de desarrollo por estadio, tomados a una temperatura de 16-17°C.

c, concha; ci, cilios; fp, falda prototrocal; lc, lóbulo ciliar; m, manto; op, opérculo; p, pie.

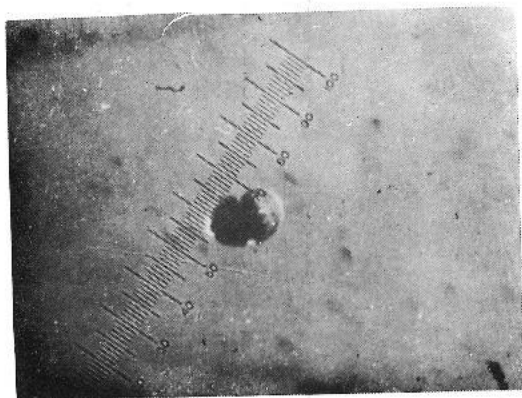
INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA SOBRE EL DESARROLLO EMBRIONARIO DE -

Haliotis rufescens.

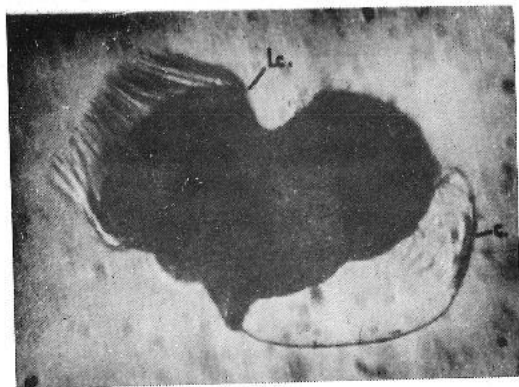
Al concluir la primera fase del trabajo, es decir, una vez lograda la larva, se procedió a observar la influencia de la temperatura en el desarrollo embrionario. Se usaron tres rangos de temperatura: 12-13°C, 16-17°C y 20-21°C, duplicando el experimento con desoves diferentes. Los resultados del experimento se encuentran resumidos en la tabla No. 1.

En el transcurso del estudio, se observó que el desarrollo de los embriones era acelerado o retardado en razón directa al incremento o disminución, respectivamente, de la temperatura del agua.

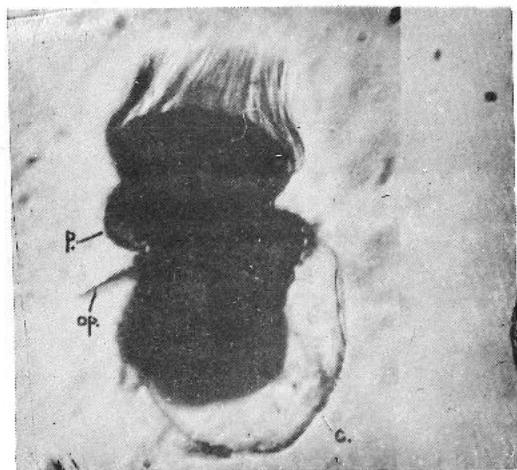
En los primeros estadios se observó similitud de periodos en las etapas con distintas temperaturas y conforme iba avanzando el desarrollo se notaron diferencias de periodo en entre las diferentes temperaturas. Hubo mas similitud entre 16-17°C y 20-21°C desde las etapas de trocófora en adelante. El estadio de veliger más torsión no se observó a las temperaturas de 12-13°C y 20-21°C debido a fallas en el manejo de las larvas.



A



B



C

FIG. 7. LARVAS DE Haliotis rufescens. A. veliger (306 $\mu$ ) escala 1:17; B. Veliger aumentada (x.45) antes de torsión; C. Veliger después de torsión. c, concha; lc, lóbulo ciliar; op, opérculo; p, pie.

TABLA I

DESARROLLO EMBRIONARIO Y LARVAL DE Haliotis-rufescens A DIFERENTES TEMP.

TEMPERATURA ESTADIOS	12-13°C	16-17°C	20-21°C
FECUNDACION	20-45min	20-45min	20-45min
2 CELULAS	1hr35min-2hr10min	1hr30min-2hr	1hr20min-1hr40min
4 CELULAS	3" 10 " -3" 25 "	2" 05 " -2" 25min	1" 50 " -2" 10 "
8 CELULAS	3" 34 " -4" 10 "	3" 15 " -3" 35 "	2" 50 " -3" 20 "
16 CELULAS	5" 50 " -6" 20 "	5" 17 " -5" 30 "	4" 35 " -5" 40 "
MORULA	6" 55 " -7" 15 "	6" 10 " -6" 35 "	5" 35 " -5" 50 "
GASTRULA	NO SE OBSERVO		
TROCOFORA ENQUISTADA	17hr00min-18hr00min	16hr00min-17hr00min	16hr
TROCOFORA ECCLUSIONADA	22" 20min-23" 00 "	19" 20 " -19" 45 "	18hr00min-18hr25min
TROCOFORA CON CONCHA		23" 00 " -23" 35 "	22hr10min
VELIGER	29hr00min-30hr00min	27" 00 " -28" 00 "	27hr
VELIGER MAS TORSION		47" 00 " -48" 00 "	

## IV. DISCUSION

Muchos fueron los tropiezos encontrados en el transcurso de los experimentos con abulon azul (Haliotis fulgens), debido principalmente a la inexperiencia y falta del equipo adecuado, sin embargo, la experiencia ganada a través de la práctica de varios y desiguales procedimientos permitió en gran parte la obtención de mejores resultados con el abulón rojo (Haliotis rufescens).

En la inducción de la descarga de gametos se emplearon diferentes técnicas, empleando con mas éxito metodos mixtos. La combinación de los estímulos mas eficaces, ahorró tiempo y sobre todo desgaste inútil de adultos.

La estimulación mecánica solía ser bastante efectiva -- con ejemplares maduros, cuando se aplicaba con el fin de ayudar al desove; pero cuando se forzaba a los adultos mediante enérgicas contracciones musculares, generalmente expulsaban óvulos acompañados de vesícula germinal o el esperma era raquíptico y poco activo, dando como resultado un bajo porcentaje de óvulos fecundados y anormalidad en las segmentaciones.

Las observaciones demostraron que por lo general el abulón no descarga exhaustivamente sus gametos en un desove, sino -- que continúa desovando a intervalos sobre largos períodos.

A través de las observaciones del grado de madurez gonadal, durante la selección de adultos para los experimentos de desove y fecundación, se notó que Haliotis fulgens madura y produce desoves abundantes durante los meses de junio a septiembre mientras que Haliotis rufescens además de madurar en los meses de verano, presenta una segunda etapa de maduración de octubre a principios de diciembre.

El desarrollo embrionario de Haliotis rufescens presenta gran similitud con la especie japonesa Haliotis sieboldii estudiada por Ino (1952), tanto en la forma de los estadios, como en sus períodos. Carlisle (1962) aún cuando trabajó con Haliotis rufescens presenta resultados que difieren un poco de los obtenidos en el presente estudio. Al parecer, los períodos de desarrollo embrionario fueron más largos en las etapas de cuatro y ocho células aunque el tiempo transcurrido para alcanzar la etapa de trocofora y veliger fueron casi similares en ambos trabajos. Sin embargo, recientemente Oba (1962) trabajó con la especie japonesa Haliotis diversicolor supertexta y obtuvo la fase veliger en solamente 19 horas.

Indudablemente, parece ser que existe poca diferencia en períodos y formas de desarrollo entre las especies de Haliotis ya que, los estudios llevados a cabo Murayama (1935), Ino (1962), Carlisle (1962), Oba (1962) y el presente (1970) son muy simila--

TABLA 2

## COMPARACION DE PERIODOS DE DESARROLLO REPORTADOS PARA HALIOTIS

ETAPAS	<u>H. rufescens.</u> Carlisle(1962)	<u>H. sieboldii.</u> Ino (1952) 16-18°C	<u>H. diversicolor</u> <u>supertexta.</u> Oba (1952)	<u>H. rufescens.</u> presente traba jo (1970) 16-17°C
Bipartición	2:15 hrs	1:40 hrs	30-60 min	1:30-2:00 hrs
4 células	5 hrs	2 hrs	45min-1:30 hrs	2:00-2:30 hrs
8 células	6 hrs	3 hrs	1:45 hrs	3:15-3:35 hrs
16 células		5 hrs	2:00 hrs	5:17-5:30 hrs
Mórula		8 hrs	2:50 hrs	6:10-6:35 hrs
Gástrula		10 hrs		
Trocófera en eclosión	16-18 hrs	19 hrs	4:40-5:00 hrs	16-17 hrs
Trocófera (secreción concha)		24 hrs	11 hrs	23 hrs
Veliger	28 hrs	29 hrs	13 hrs	27-28 hrs
Veliger después de torsión		28 hrs	19 hrs	47-48 hrs

res. Sin embargo, las pocas diferencias de períodos entre las especies son posiblemente debidas a las temperaturas en que fueron observados estos desarrollos. El presente estudio coincide mas con Ino, ya que los periodos fueron observados bajo casi el mismo rango de temperatura 16-17°C y 16-18°C respectivamente. Carlisle no reporta temperatura a la que observo el desarrollo embrionario, y parece ser de Ova utilizó una temperatura mas alta, ya que sus períodos son mas cortos y menciona temperaturas de 26.2-26.8°C en relación con la eclosión de la trocófora.

En el transcurso de la aplicación de la inducción de -- descargas de productos sexuales, se notó que la efectividad de -- los estímulos variaba de acuerdo con el sexo del espécimen en el cual eran aplicados, sin embargo, la estimulación térmica coincidió ser secundariamente efectiva para ambos, o sea esta era utilizada en combinación con la desecación y estímulo químico para macho y hembra respectivamente.

El cromatóforo verde-amarillo observado en embriones, - es debido posiblemente a un arreglo de materiales citoplasmáticos anteriores a la segmentación, asegurándonos un desarrollo normal ya que la mayoría de embriones con esta característica se desarrollaban normalmente hasta veliger después de torsión.

## V. CONCLUSIONES

De las observaciones efectuadas durante el presente trabajo se llegó a las siguientes conclusiones:

1. Haliotis fulgens en la región de Todos Santos y zonas contiguas, presenta su mayor grado de madurez gonadal de junio a septiembre.

2. Haliotis rufescens presenta dos épocas de maduración, cuando menos en la región Xatay, durante el verano en mayor grado y de octubre a principios de diciembre.

3. La época de madurez sexual, es mas prolongada en los machos de ambas especies, al parecer las hembras se agotan sexualmente primero que los machos.

4. El incremento o disminución de la temperatura actúa sobre el desarrollo embrionario en razón directa. Temperaturas mayores de 30°C son letales para los embriones. La durabilidad y resistencia de las larvas está en razón directa al porcentaje de larvas logradas en el desove. A medida que las etapas embrionarias y larvarias avanzan adquieren mayor resistencia a las adversidades del medio.

5. No todos los huevos fecundados y aparentemente viables se desarrollan normalmente en todas sus etapas. Los desoves varían en porcentajes de huevos anormales a normales. De los desoves con mayor viabilidad, únicamente el 10 ó 20% del total de huevos alcanzó estadios larvarios mas avanzados de veliger.

6. El estímulo de "shock" térmico, precedido de desecación parece ser el método de inducción mas efectivo para la descarga de esperma. La estimulación química (esperma en el medio) combinada con la térmica logra abundantes desoves de las hembras.

7. El someter abulones a extensos períodos de desove y estimulaciones intensivas trae como consecuencia el agotamiento físico y sexual pudiendo inclusive causarles la muerte.

8. Las larvas con masa visceral situada excentricamente en la concha, resultaron ser por lo regular anormales y las provistas de concha larval bien desarrollada con la masa visceral ocupando casi todo su interior, son mas resistentes y de desarrollo normal. Estas características son definidas a partir de veliger.

9. La presencia de pequeños gránulos incluidos en el embrión en estado trocóforo antes de la eclosión, representa una forma aberrante de larva que no llega a estadios mas avanzados.

10. El uso de agua filtrada por sistema "millopore" elimina en forma efectiva los problemas causados por la presencia de organismos ciliados y otros organismos contaminantes.

11. Los recipientes de plástico polivinilo son prácticos únicamente en el manejo y limpieza de embriones, ya que no todo plástico aun "curado" resulta ser no-contaminante, siendo mas seguro utilizar recipientes de vidrio en la operación del reposo de las larvas o embriones.

12. El empleo de los índices de viabilidad ayuda en -- gran parte a evitar el desgaste inútil de adultos maduros y a un mejor aprovechamiento de esperma y óvulos maduros.

## VI. RECOMENDACIONES

En este tipo de trabajos experimentales, es común encontrar una serie de pequeños problemas relacionados con el equipo y la metodología, que solamente después de varios intentos son resueltos. Por lo tanto, el autor considera de utilidad, hacer las siguientes recomendaciones:

a. Debe procurarse eliminar material, tóxico o contaminante en todo implemento que sea utilizado en la experimentación.

b. "Curar" previamente todo recipiente de plástico o resina con agua de mar con el fin de evitar una disolución de compuestos químicos tóxicos. Utilizar recipientes de vidrio en el reposo de embriones en agua filtrada.

c. Evitar, lavar recipientes o implementos con agua de la llave, con el fin de eliminar la contaminación causada por el desprendimiento de iones metálicos en tuberías de fierro y cobre.

d. Conservar el agua de mar filtrada con sistema "millopore" en un lugar oscuro y a baja temperatura, de preferencia en un refrigerador.

e. Al, concluir los experimentos de desove, es conveniente regresar los adultos al tanque de cautiverio en agua corriente para su reposo y alimentación con el fin de evitar ansiedad, agotamiento físico o sexual.

f. Restringir de alimentos 1 ó 2 días antes de los intentos de desove, con el fin de eliminar la expulsión de heces fecales con los productos sexuales.

g. En la fecundación es preferible utilizar espermatozoides bastante activo, lo que evita un alto porcentaje de huevos no fecundados y anormales.

h. Ya que la viabilidad varía en los desoves en porcentaje de anormales a normales es preferible separar los embriones viables de la contaminación de los no viables, depositándolos en otro recipiente con nueva agua de mar filtrada.

i. Para la conservación de las larvas durante su primera semana es recomendable efectuar un cambio diario de agua para evitar el desarrollo de bacterias siendo preferible trabajar con una temperatura de 16° a 20°C.

j. Finalmente, es recomendable que estudios de esta índole sean llevados a etapas mas avanzadas, logrando el perfeccionamiento de estas biotecnicas para ser aplicadas a un programa de cultivo a escala comercial.

Debemos tener siempre presente que el océano es nuestro mas noble proveedor; sus riquezas no son inagotables y lo que ---

aprendamos a conservar en el presente, puede significar nuestra -  
sobrevivencia en el mañana.

## VII. RESUMEN

El potencial tanto económico como nutricional que representa para nuestro país el recurso abulonero de Baja California -- sumado a los problemas de polución, vedas dudosas y un marcado -- descenso en las estadísticas de explotación de este molusco, obligan a prestar la debida atención al restablecimiento y conservación de tal riqueza.

El presente trabajo fue llevado a cabo con el propósito de dar el primer paso en México hacia estudios embriológicos y de reproducción de haliótidos como una contribución a futuras técnicas de acuicultura que reflejarían un beneficio, tanto para el -- pescador como para la economía del país.

Fueron aplicadas diversas técnicas de desove y fecundación artificial a dos especies de abulones: Haliotis fulgens y Haliotis rufescens.

En Haliotis fulgens el desarrollo fué observado hasta -- veliger después de torsión.

En Haliotis rufescens los experimentos se realizaron en condiciones de acuario a una temperatura de 16°-17°C. Se observó

desarrollo embrionario, logrando mantener los embriones por espacio de tres días, hasta estadios larvarios avanzados de veliger.

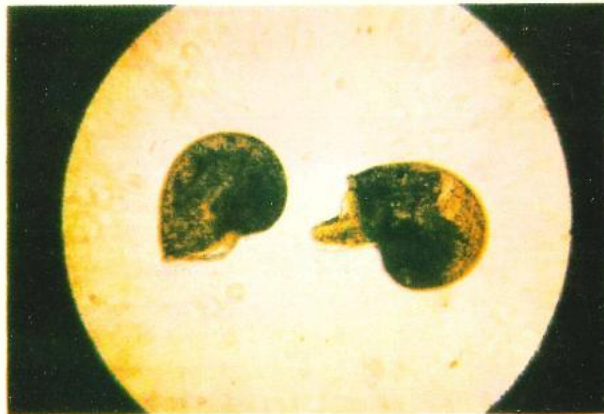
La fecundación se obtuvo entre 20-45 min. La mórula se observó después de transcurrir 6hr 10min - 6hr 35min. La larva - trocófora se alcanzó entre 16-17 hr y finalmente las etapas de veliger después de torsión se observaron a las 27-28 hr y 47-48 hr respectivamente después de la fecundación.

La temperatura muestra una estrecha relación en razón - directa con el desarrollo embrionario, para el rango de temperaturas observadas (21° - 21°C).

Comparaciones de este estudio con estadios y períodos - reportados por Ino (1952) con especies japonesas de abulón (Haliotis discus y Haliotis sieboldii) al igual que los reportados por Carlisle (1948) en Haliotis rufescens, demostraron ser muy similares.



A



B

Fig. 8.- A. Gonada madura de Haliotis rufescens hembra.  
B. Larvas de Haliotis rufescens de 3.5 días.

## LITERATURA CITADA

- Carlisle, J. G. Jr.  
1945                   The Technique of inducing spawning in-  
Haliotis rufescens, Swainson. Scien--  
ce, 102 : 566-567.
- Carlisle, J. G. Jr.  
1963                   Spawning and early life history of Ha-  
liotis rufescens,
- Cox, K. W.  
1962                   California abalones, family Haliotidae.  
Dept. Fish and Game. Fish Bull., 118,  
133.
- Crofts, D.  
1929                   Haliotis. Liverpool Biological Socie-  
ty, 43
- Ino, T.  
1952                   Biological studies on the propagation  
of Japanese abalone (genus Haliotis).  
Tokai Reg. Fisheries, Res. Lab., Bull.  
5 (Contrib. A,B).
- Leighton, D.L.  
Boolootian, R.A.  
1963                   Diet and growth in the black abalone,  
Haliotis craccherodii. Ecology 44, --  
22: 227-238.
- Murayama, S.  
1935                   On the development of the Japanese aba-  
lone, Haliotis gigantea. Coll. Agric.  
Tokyo Imp. Univ. Jour. 13(3): 227-233
- Oba, T.  
1964                   Studies on the propagation of an abalo-  
ne, Haliotis diversicolor supertexta,  
Lische. II on the development. Bull.  
Japanese Soc. Scientific Fish., 30 --  
(10).
- Sevilla-Hernández, M.L. et al.  
1965                   Estudio histológico comparativo de al-  
gunos moluscos de importancia económi-  
ca en México. Inst. Nac. Invest. Biol.  
Pesqs., Dir. Gral. Pesca. S.I.C. Serv.  
Trab. Div. III (22): 1-19.