

CUIDE EL LIBRO  
NO LO SUBRAYE

MÁSTER UNIVERSITARIO INTERNACIONAL EN ACUICULTURA

Las Palmas de Gran Canaria, España

2003-2004



**ESTUDIO PRELIMINAR DE LA CARACTERIZACIÓN DE  
HEMBRAS REPRODUCTORAS DE LA ALMEJA CANARIA**

***Haliotis tuberculata coccinea*, REEVE**

**U.L.P.G.C.**

Ciencias Básicas  
Biblioteca

Nº D.

Nº C. 782064

**AMAIA BILBAO VILLENA**

# **ESTUDIO PRELIMINAR DE LA CARACTERIZACIÓN DE HEMBRAS REPRODUCTORAS DE LA ALMEJA CANARIA**

***(Haliotis tuberculata coccinea, R)***

**AMAIA BILBAO VILLENA**

Trabajo realizado en el Instituto de Ciencias Marinas de Canarias, España, bajo la dirección de los Lcdos.: Dña. Maria del Pino Viera, Dña. Gercende de Courtois y D. Juan Socorro.

Y presentando como requisito parcial para la obtención del título de Máster Universitario Internacional en Acuicultura, otorgado por la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (ULPGC), el Instituto Canario de Ciencias Marinas (ICCM), y el centro de Altos Estudios Agronómicos Mediterráneos de Zaragoza (CIHEAM).

Director

Fdo.: Dña. Maria del Pino Viera

Director

Fdo.: Juan Socorro

Director

Fdo.: Dña. Gercende De Courtois

Autora

Fdo.: Sta. Amaia Bilbao

Las Palmas, a 9 de febrero de 2004



*Nire guraso, ilobak  
eta noski Andresentzat*

## AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer de corazón a todas las personas que me han prestado su apoyo durante estos últimos meses, que sin su ayuda hubiera sido imposible terminar la presente tesina para esta fecha.

Ante todo a mis tutores; A Mapi Viera y a Gercende De Courtois por su preocupación sincera, agradecerles su paciencia y su amistad incluso en los momentos en los cuales me he sentido más agobiada y he actuado de forma incorrecta. A Juan Socorro agradecerle su sencillez, su buen humor permanente y contagioso y sobre todo su sentido del compañerismo.

A Pipo, Dominique, Marian y Diana por orientarme en el mundo de la estadística y del tratamiento de fotos.

A mis compañeros (Natacha, Juanita, Tibi, Naira...) por formar un equipo unido durante todo el transcurso del Máster.

En general a todo el personal del Instituto Canario de Ciencias Marinas y en especial a Jezabel.

Y por último, a Andrés por apoyarme, mimarme y quererme.



## INDICE

Lista de figuras.....	I
Lista de tablas.....	III
Resumen.....	IV
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1.1 JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	2
1.2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	5
1.2.1. Sistemática.....	5
1.2.2. Distribución geográfica.....	7
1.2.3. Importancia de la pesquería de Haliotidae.....	10
1.2.4. Haliotis spp. como especie cultivada.....	12
1.2.5. Morfología.....	15
1.2.6. Fisiología de la reproducción en Haliotis.....	19
1.2.6.1. Anatomía del Aparato Reproductor.....	19
1.2.6.2. Ciclo reproductor.....	21
1.2.6.3. La reproducción.....	22
1.2.7. Métodos para la inducción al desove .....	25
<b>2. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>29</b>
2.1. RECOLECCIÓN Y ACONDICIONAMIENTO DE ANIMALES.....	30
2.2. SELECCIÓN DE HEMBRAS PARA EL EXPERIMENTO.....	31
2.3. ESTUDIO HISTOLÓGICO.....	33
2.3.1. Estados de desarrollo de los oocitos para <i>Haliotis</i> <i>tuberculata coccinea</i> R .....	34
2.3.1. Distribución de los oocitos en la gónada. ....	35
2.4. ESTUDIO DE LA FECUNDIDAD .....	36

<b>3. RESULTADOS</b>	<b>39</b>
<b>3.1. ESTUDIO HISTOLÓGICO</b>	<b>40</b>
<b>3.1.1. Estados de desarrollo de los oocitos</b>	<b>42</b>
<b>3.1.2. Distribución de los oocitos en la gónada</b>	<b>50</b>
<b>3.2. ESTUDIO DE LA FECUNDIDAD</b>	<b>61</b>
<b>4. DISCUSIÓN</b>	<b>66</b>
<b>5. CONCLUSIONES</b>	<b>75</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA CITADA</b>	<b>78</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Distribución de la almeja canaria.....	9
<b>Figura 2.</b> Capturas de <i>Haliotis ssp.</i> por países y evolución a escala mundial.....	11
<b>Figura 3.</b> Producción acuícola de <i>Haliotis ssp.</i> en toneladas métricas por países y evolución a escala mundial.....	13
<b>Figura 4.</b> Demanda y oferta de <i>Haliotis spp.</i> a escala mundial.....	14
<b>Figura 5.</b> Morfología externa del abalón sin la concha.....	17
<b>Figura 6.</b> Sistema Digestivo y Nervioso del abalón.....	18
<b>Figura 7.</b> Gónadas femenina y masculina del <i>H. tuberculata coccinea</i> .....	20
<b>Figura 8.</b> Gónada femenina y masculina del <i>H. tuberculata coccinea</i> a escala histológica.....	22
<b>Figura 9.</b> Desarrollo larvario del <i>H. tuberculata coccinea</i> R.....	25
<b>Figura 10.</b> Detalle de recolección y transporte de animales.....	30
<b>Figura 11.</b> Cajas tipo Taiwán.....	31
<b>Figura 12.</b> Zonas apical, media y basal del apéndice conical.....	34
<b>Figura 13.</b> Trabícula.....	41
<b>Figura 14.</b> Distribución de células sexuales en la gónada.....	41
<b>Figura 15.</b> Maduración de los gametos femeninos en la gónada.....	42
<b>Figura 16.</b> Oogonias.....	43
<b>Figura 17.</b> Oocitos en estado 1.....	44
<b>Figura 18.</b> Oocitos en estado 2.....	45

<b>Figura 19.</b> Oocitos en estado 3.....	47
<b>Figura 20.</b> Oocitos en estado 4.....	48
<b>Figura 21.</b> Oocitos en estado 5.....	49
<b>Figura 22.</b> Grupo de células sexuales presentes (%) en los diferentes índices gonadales.....	51
<b>Figura 23.</b> Grupo de células sexuales presentes (%) en las zonas de la gónada para el índice gonadal 1.....	53
<b>Figura 24.</b> Grupo de células sexuales presentes (%) en las zonas de la gónada para el índice gonadal 2.....	54
<b>Figura 25.</b> Grupo de células sexuales presentes (%) en las zonas de la gónada para el índice gonadal 3.....	56
<b>Figura 26.</b> Grupo de células sexuales presentes (%) en la zona apical de la gónada.....	57
<b>Figura 27.</b> Grupo de células sexuales presentes (%) en la zona media de la gónada.....	58
<b>Figura 28.</b> Grupo de células sexuales presentes (%) en la zona basal de la gónada.....	60
<b>Figura 29.</b> Fecundidad potencial y peso del apéndice conical (I.G, 3) para cada rango de Talla.....	61
<b>Figura 30.</b> Correlaciones entre la Fecundidad potencial, Talla del animal y Peso de la gónada (I.G. 3).....	63

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla I.</b> Hembras seleccionadas para el estudio histológico.....	32
<b>Tabla II.</b> Hembras seleccionadas para el experimento de fecundidad.....	32
<b>Tabla III.</b> Medidas de las células sexuales.....	50
<b>Tabla IV.</b> Porcentajes de los grupos de células sexuales en los diferentes índices gonadales observados macroscópicamente.....	52
<b>Tabla V.</b> Porcentajes de los grupos de células sexuales presentes en el índice gonadal 1 para cada zona de la gónada.....	53
<b>Tabla VI.</b> Porcentajes de los grupos de células sexuales presentes en el índice gonadal 2 para cada zona de la gónada.....	55
<b>Tabla VII.</b> Porcentajes de los grupos de células sexuales presentes en el índice gonadal 3 para cada zona de la gónada.....	55
<b>Tabla VIII.</b> Porcentajes de grupo de células sexuales en los diferentes índices gonadales observados macroscópicamente para la zona apical.....	58
<b>Tabla IX.</b> Porcentajes de grupo de células sexuales en los diferentes índices gonadales observados macroscópicamente para la zona media.....	59
<b>Tabla X.</b> Porcentajes de grupo de células sexuales en los diferentes índices gonadales observados macroscópicamente para la zona basal.....	60
<b>Tabla XI.</b> Fecundidad potencial y peso de la gónada para cada rango de Talla.....	62

## RESUMEN

Se ha estudiado la caracterización de reproductores de la almeja canaria a partir de una muestra de población recolectada en la Bahía del Castillo del Romeral en Gran Canaria (España), mediante estudios histológicos y de fecundidad. Dicha muestra fue estabulada durante un mes en la nave de cultivos marinos del Instituto de Ciencias Marinas de Canarias (Gran Canaria) previo a su sacrificio para el estudio.

Los estudios histológicos de las gónadas femeninas basados en los cambios morfológicos observados en las células sexuales, han concluido en la caracterización de seis estados durante el proceso oogénico (en los que se incluyen las oogonias y cinco estados de oocitos). A medida que madura la gónada, el porcentaje de oocitos en desarrollo (Oc1, Oc2 y Oc3) disminuye, mientras que los más maduros (Oc5) aumentan, manteniéndose constante la cantidad de Oc4, este patrón se repite a lo largo de la gónada, lo que nos sugiere que ésta se desarrolla de manera homogénea. La presencia de todos los estados de oocitos en la gónada en estado de prepuesta, sugiere que la gametogénesis de la *Haliotis tuberculata coccinea* R es continua.

El estudio de fecundidad de hembras maduras (observación macroscópica) a partir del contaje de todos los oocitos presentes en la gónada, ha demostrado que existe una correlación lineal (coeficiente de correlación 0.97) entre la longitud de la concha y la fecundidad para el rango de talla estudiado. El número de oocitos, significativamente más alto, para hembras de rango de talla 55-65mm sugiere que las hembras a partir de esta talla, serían las adecuadas para su uso como reproductores.

# INTRODUCCIÓN

## 1.1 JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La oreja de mar o abalón, es un molusco gasterópodo herbívoro que se alimenta de micro y macroalgas. Su cultivo se practica actualmente con éxito en varios lugares del mundo, siendo de gran importancia para la economía de muchos países (Gordon y Cook, 2001). En Canarias existe la especie *Haliotis tuberculata coccinea* (Reeve, 1846), conocida popularmente como almeja canaria, la cual ha sido explotada tradicionalmente a nivel local, siendo sometida a un elevado esfuerzo marisquero durante la últimas décadas, lo que ha motivado que su captura haya disminuido considerablemente y que este presente en el Catálogo de Especies Amenazadas de Canarias en la categoría de *especie vulnerable* por el Real Decreto 151/2001 de 23 Julio de 2001 (BOC-2001/097).

Desde el punto de vista de su aplicación industrial, la almeja canaria es una candidata idónea para su producción en acuicultura, puesto que permitiría por una parte, la diversificación de las especies producidas por la acuicultura en Canarias, centradas hasta el momento en peces marinos, y por otra, la posibilidad de regeneración de un recurso pesquero tradicional, de alto valor comercial y muy próximo a la extinción, mediante programas de repoblación, tal y como se realiza en países como Canadá, donde llevan a cabo proyectos a partir de su cultivo en cautiverio con el fin de recuperar una pesquería con un importante beneficio económico para el país (FISHERIES & OCEANS, 2002).

Así mismo, es importante destacar el efecto beneficioso que el cultivo de oreja de mar puede desempeñar desde un punto de vista medioambiental, considerando que su alimento durante la fase de engorde, consiste en el consumo de macroalgas, cuya producción en sistema de biofiltros integrado al cultivo



industrial de peces, ha demostrado su eficacia en la eliminación de gran parte de los nutrientes presentes en los efluentes de dichos cultivos (Cohen y Neori, 1991)

El Grupo de Investigación en Acuicultura (GIA) del Instituto Canario de Ciencias Marinas, ha llevado a cabo hasta el momento, experiencias de la inducción a la puesta, reproducción en cautividad, cultivo larvario, pre-engorde y engorde de *H. tuberculata coccinea* R., logrando cerrar el ciclo del cultivo de esta especie nativa. Esas experiencias han demostrado el interés de su cultivo y la potencialidad comercial del mismo. Los estudios preliminares realizados por (Peña, 1985; 1986) y el grupo de investigación GIA (Toledo et al., 2000) y (Viera et al., 2003) ofrecen resultados muy positivos y prometedores en cuanto a la optimización de la producción larvaria de *H. tuberculata coccinea* R., así como, de la mejora del crecimiento de juveniles mediante el uso de diversas macroalgas.

Sin embargo, para la puesta a punto de la tecnología de cultivo de esta especie, se hace imprescindible encaminar los esfuerzos investigadores hacia dos aspectos fundamentales, en primer lugar, la producción de semilla en cantidad y calidad suficiente de cara a una planificación de su futuro cultivo a escala industrial, y en segundo lugar, la identificación de una alimentación adecuada en el proceso de engorde que repercuta en una mejora del crecimiento obtenido hasta el momento.

Para alcanzar el primer objetivo, un primer paso sería mejorar el conocimiento de la biología reproductora de la especie *H. tuberculata coccinea* R., mediante la caracterización de las distintas etapas de desarrollo gonadal y la determinación de la talla en la que los animales pueden considerarse adecuados para uso como reproductores.

En este sentido, el objetivo principal de la presente tesina de Master Universitario Internacional en Acuicultura, **“ESTUDIO PRELIMINAR DE LA CARACTERIZACIÓN DE HEMBRAS REPRODUCTORAS DE LA ALMEJA CANARIA *Haliotis tuberculata coccinea* REEVE”**, es caracterizar las distintas etapas del desarrollo gonadal de este molusco mediante técnicas histológicas así como evaluar la talla adecuada de selección de individuos para uso reproductor mediante estudios de fecundidad.

Este estudio permitiría en primer lugar, determinar el proceso oogénico de *H. tuberculata coccinea* R. a nivel celular, verificar si la asignación macroscópica del estado de madurez sexual se corresponde con lo observado a nivel microscópico, y por último estimar la fecundidad potencial de esta especie para la valoración de la talla óptima de reproductores y la viabilidad de su introducción en los cultivos.

## 1.2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 1.2.1. Sistemática

La clasificación que aquí se describe es la utilizada por la FAO (1995):

Phylum Mollusca Linnaeus, 1758

Clase Gastropoda Cuvier, 1797

Subclase Prosobranchia H.M. Edwards, 1848

Orden Archaeogastropoda Thiele, 1929

Superfamilia Pleurotomarioidea Swainson, 1840

Familia Haliotidae Rafinesque, 1815

Género *Haliotis* Linnaeus, 1758

El Género *Haliotis* es el único relacionado con la Familia Haliotidae. Aunque existen numerosos taxos de Subgéneros, éstos han sido propuestos basados principalmente en características de la concha; *Haliotis tuberculata* Linnaeus 1758 fue atribuido al Subgénero *Sulculus* Adams & Adams, 1854 (Cox, 1960)

Existen subespecies asociadas a *H. tuberculata* L. aunque durante años ha existido controversia en cuanto a si eran especies diferentes o subespecies, como es el caso de *Haliotis lamellosa* que habita en el Mediterráneo (FAO, 1995) y *Haliotis tuberculata coccinea* Reeve, 1846

En la actualidad *H. lamellosa* y *H. tuberculata* son consideradas la misma especie, encontradas ambas conviviendo en una misma población (Geiger, 1998)

En cuanto a la almeja canaria, en los primeros estudios publicados sobre su inducción a la puesta (Peña, 1985) el nombre científico ilustrado es *Haliotis*

*coccinea canariensis* Nordsieck, 1975, la cual se consideraba una especie endémica macaronésica y diferente a *Haliotis tuberculata* L. Este estado taxonómico también es recogido en varias publicaciones de especies marinas de Canarias (Pérez y Moreno, 1991; Franquet y Brito, 1995) incluso en el Catálogo Nacional de Especies Amenazadas del Real Decreto 151/2001 del 23 de Julio de 2001 (BOC-2001/097).

El objetivo del presente estudio no es esclarecer la sistemática de *H. tuberculata coccinea* aceptándose lo descrito por el taxónomo Geiger, especialista en *Haliotis spp.*, que en el año 2000 publicó que es una subespecie de *H. tuberculata* L, ya que su secuencia de códigos de ADN difiere sólo en la posición de cuatro aminoácidos de una secuencia de 132. De igual forma, en la última publicación donde se revisan los taxones de las especies marinas de Canarias (Moro et al, 2003), *H. tuberculata coccinea* R. es considerada una subespecie de *H. tuberculata* L. y es sinonimia de *H. coccinea canariensis* R.

*H. tuberculata coccinea* es una especie muy variable en cuanto al tamaño y coloración. Por ejemplo en Sardina del Norte (Gran Canaria), sólo se encuentran ejemplares pequeños (hasta 3-4 cm) mientras que en Arinaga (Gran Canaria), a 1 metro de profundidad, en zonas muy ricas en algas, son frecuentes ejemplares del doble de tamaño. La coloración del pie varía posiblemente debido a la alimentación ingerida, ejemplares capturados en Sardina del Norte presentan un pie gris, mientras que en la zona del Castillo del Romeral (Gran Canaria) el pie es verdusco.

Existen infinidad de nombres comunes referentes a *Haliotis tuberculata*, la siguiente lista fue recopilada por Poutiers en 1993:

Ormer, Omar, Venus ear, Ear shell	Inglés
Oreille de mer, Ormeau, Ormier	Francés
Ohrschnecke, Meerohr, Seeohr	Alemán
Lapa Burra, Orelhas	Portugués
Señorina, Oreja de mar, Peneira	Español
Patella Reale	Italiano
Achivada chromasisti, Aftí tis, Afroditi	Griego
Petrovo uho, Uhomorsk	Yugolasvo
Havsöra	Suizo
Zee-oor	Flamenco
Deniz kulagi	Turco
Saeeya	Eslavo
Ozemyan	Hebreo

La especie de *Haliotis* presente en Canarias (*H. tuberculata coccinea*) se conoce con el nombre común de almeja canaria, Oreja de mar o Lapa burra (Franquet y Brito, 1995).

### **1.2.2. Distribución geográfica**

Haliotidae están distribuidos en todos los océanos. Se localizan en el trópico Pacífico Oeste, Australia, Japón, África del Sur, y a lo largo de las costas del Pacífico Noreste. Batimétricamente se localizan desde la zona de mareas hasta profundidades mayores de 40m y en Japón, Norteamérica, y África del Sur, las especies de abalón están comúnmente asociadas con algas gigantes (Lindberg, 1992)

Si bien existen alrededor de un centenar de especies, todas pertenecientes al género *Haliotis*, sólo alrededor de 10-15 de ellas tienen interés comercial (Hanh, 1989). Entre ellas cabe destacar *Haliotis discus hannai*, la especie con mayor producción en Asia que se localiza a 25 metros de profundidad (FAO, 1990).

En otros lugares del mundo, las especies comerciales incluyen a *Haliotis rubra* en Australia, *Haliotis iris* en Nueva Zelanda y *Haliotis midae* en Sudáfrica. De las diez especies que se encuentran distribuidas en la Costa Pacífica de América del Norte, tres son comercialmente importantes y cabe destacar, *Haliotis rufescens* (también conocido como el abalone rojo) con una longitud máxima de 30cm (Hanh, 1989)

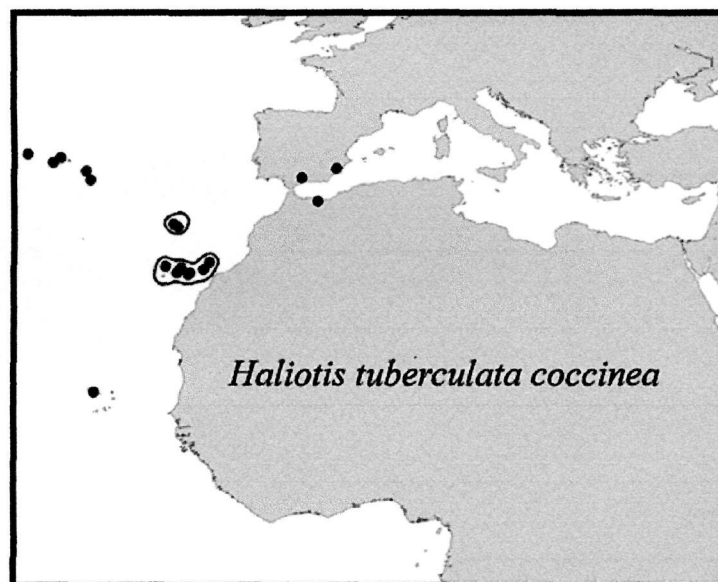
Otra especie de especial interés es *Haliotis asinina*, es muy inusual en la naturaleza pero debido a que su concha no cubre todo el cuerpo, es muy apreciable comercialmente. Se encuentra en regiones subtropicales y tropicales y presenta un tamaño máximo de longitud de concha de 10cm (Apisawetakan et al. 1997).

La profundidad óptima para el abalón depende de la especie y de las condiciones medioambientales del lugar. Normalmente se encuentran a profundidades por encima de los 30 metros en la zona intermareal, presentándose las máximas densidades entre 3-10 metros donde las algas, su alimento natural, crece abundantemente (FAO, 1990).

En Europa la única especie comercial en la actualidad, es *Haliotis tuberculata*. La distribución natural de esta especie es a lo largo de toda la costa nordeste de Francia, desde el Oeste de Normandía hasta el Sur de Bretaña

(Belle-Ile), así como alrededor de las Channel Islas. No se encuentra en las costas Británicas ni Irlandesas (Hahn, 1989).

En Canarias al igual que ha ocurrido con la sistemática de *Haliotis tuberculata coccinea* también ha existido controversia en cuanto a su distribución natural. Pérez y Moreno en 1985 consideran que el área de distribución del *H. tuberculata coccinea* R. está restringida a los archipiélagos macaronésicos de Canarias y Salvajes. Mientras que Geiger en 2000 publica citas en Melilla, Málaga, Lanzarote, Gran Canaria, Tenerife, Madeira, Salvajes, Cabo Verde y Azores (Figura 1).



**Figura 1. Distribución de la almeja canaria (Geiger, 2000)**

La estructura de las poblaciones de *H. tuberculata coccinea* es dispersa y los grupos de individuos aparecen disgregados en los pedregales encharcados mesolitorales y pedregales infralitorales (Espino y Herrera, 2002). Según Núñez et al (1994) la especie es ubiquista y muestra una gran selección por el hábitat. Suele presentar buenas densidades en pedregales formados por rocas de tamaño mediano y recubiertas por algas rojas calcáreas costrosas, entre 0 y 15 metros de

profundidad. Durante el día, viven adheridas a las piedras por su cara inferior, formando parte de la comunidad infralapidícola.

### **1.2.3. Importancia de la pesquería de Haliotidae**

Los países con mayor tradición en la pesca de abalón se hallan en Asia donde las poblaciones de abalón se encuentran asociadas a praderas de *Kelps* (algas pardas). El modo de extracción en muchos países (China, Taiwán, Tailandia), se sigue realizando de forma tradicional y lo acometen las mujeres, llamadas “amas” que con la ayuda de un cordel sujeto a un plomo, se sumergen hasta 20 metros de profundidad a pulmón libre.

En países como Japón, Australia, Nueva Zelanda, Sudáfrica y Estados Unidos su consumo es un hábito en la historia culinaria y la pesquería se ha realizado muchas veces de forma incontrolada llegando a la sobreexplotación. Gordon y Cook (2001), informan que este hecho junto con un aumento en la producción acuícola ha resultado en una disminución en las capturas. De hecho, como se observa en la figura 2, las pesquerías mundiales de *Haliotis spp.* han disminuido en un 30%.

En cambio, la pesquería de *H. tuberculata* L. presenta una importancia débil en Europa y es extraída en pequeñas cantidades en España, Francia y Las islas Channel (Hanh, 1989). Tradicionalmente, se mariscaba en la zona intermareal, pero al igual que ha ocurrido en los países más avanzados, la sobrepesca y los avances en los equipos de buceo han dado lugar a que las mayores concentraciones de poblaciones se encuentren bajo el nivel de la bajamar, siendo estas profundidades las zonas potenciales para su explotación.



En la última década, la extracción de este recurso se ha regulado prohibiendo el uso de cualquier actividad de buceo con botella y limitando su pesca a la zona intermareal donde sólo se permite el marisqueo con un cuchillo o una vara metálica (Clavier, 1992)

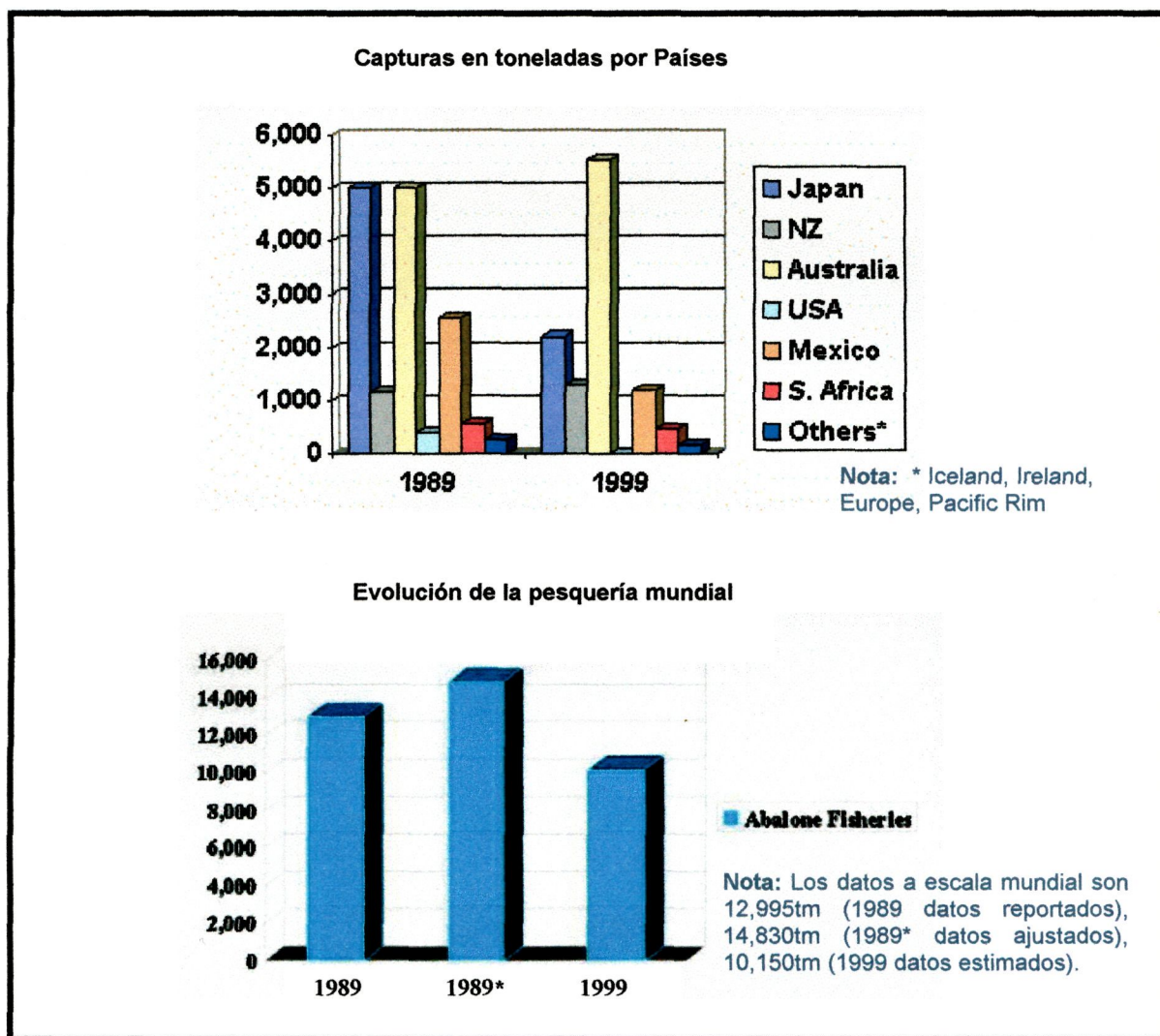


Figura 2. Capturas de *Haliotis ssp.* en toneladas métricas por países y evolución a escala mundial (Gordon y Cook, 2001)

Obtener datos reales de la explotación de esta especie es muy difícil ya que, aunque existan leyes que regulen su pesquería o incluso la protejan, esta actividad sufre la pesca ilegal. En 1992, datos oficiales informaban de una pesca de 2 Toneladas métricas (Tm) anuales en Francia; Clavier consideró esta cifra infravalorada y la estimó en unas 40-50Tm. De toda esta pesquería, alrededor de

la mitad de esta producción fue destinada al mercado quedando el restante para el consumo personal.

En Canarias no existen datos bibliográficos sobre la explotación que ha sufrido *H. tuberculata coccinea*, aunque su consumo en las islas ha sido un hábito reconocido en la historia culinaria de las mismas, formando parte del abanico de productos procedentes del marisqueo. Sin embargo, al igual que en otros lugares, éste se ha realizado sin una adecuada gestión de sus stocks y hoy en día se encuentra dentro del Catálogo Nacional de Especies Amenazadas en categoría de Vulnerable por el Real Decreto 151/2001 del 23 de Julio de 2001 (BOC-2001/097). La sobreexplotación de este recurso junto a su lento crecimiento y la destrucción de su hábitat natural han causado la esquilmación de los bancos locales. En la actualidad se sigue explotando este recurso de forma ilegal para consumo casero y hostelero local alcanzando un precio aproximado en su compra directa a los pescadores de 50€/Kg, siendo Tenerife la isla con mayor hábito consumidor.

#### **1.2.4. *Haliotis spp.* como especie cultivada**

El cultivo de abalone comenzó hace más de 70 años en Japón (Elbert y Houk, 1984) y hoy en día es muy importante para la economía de muchos países siendo una de las razones, el precio que alcanza en el mercado (Oakes y Ponte, 1996). China y Taiwán son líderes en su cultivo (Gordon y Cook, 2001) con una alta producción e incluso, países como Chile, sin un hábito reconocido en su consumo, han apostado por su producción en cautividad introduciendo especies foráneas (FAO, 1993). Los últimos estudios (Gordon y Cook, 2001) revelan que la

producción mundial alcanza las 7,165 toneladas métricas (figura 3) siendo Asia con un 75% (5,500tm) el principal productor.

En cuanto al sistema de acuicultura empleado, éste varía de país a país realizándose de una manera intensiva, extensiva, en instalaciones en tierra e incluso en jaulas flotantes (en la fase de engorde). La producción procede de pequeñas empresas, como es el caso de Taiwán y de grandes y sofisticadas como es el caso de Australia (FISCHTECH, 2004). De esta forma, los diferentes países a escala mundial han contribuido a un aumento de un 600% en la producción entre 1989 y 1999 (Gordon y Cook, 2001)

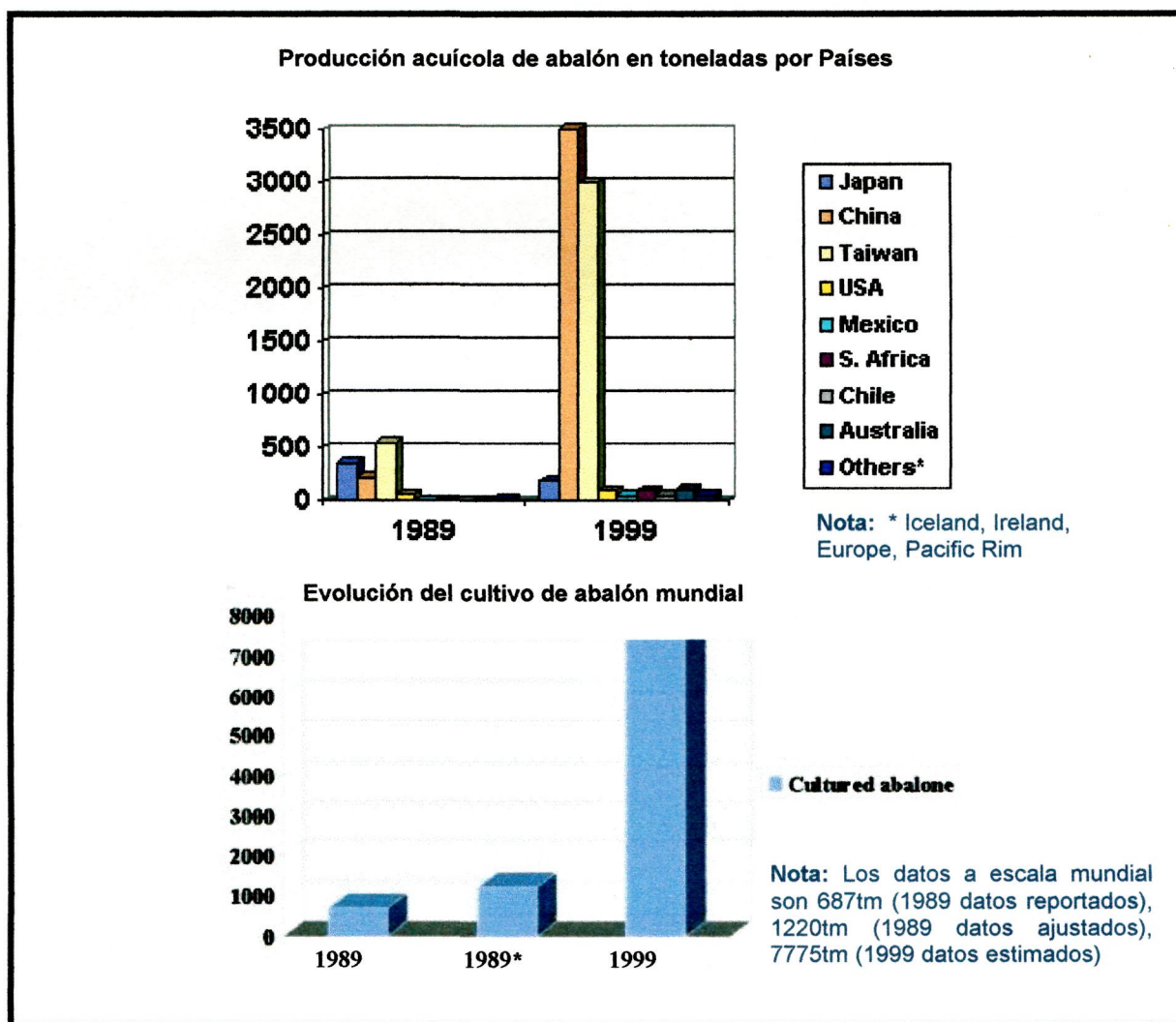


Figura 3. Producción acuícola de *Haliotis ssp.* en toneladas métricas por países y evolución a escala mundial (Gordon y Cook, 2001)



El mayor consumidor mundial es Japón donde *Haliotis* se consume fresco o procesado de diferentes formas (enlatado, seco, fileteado etc.) (FISCHTECH, 2004).

Gordon y Cook (2001) estimaron que para el presente año, la demanda mundial superará la oferta en aproximadamente 5.000Tm (Figura 4). En relación con los precios que alcanza en el mercado, éstos oscilan según sea presentado el producto, desde 32€ por kilogramo con concha, 45€ por kilo fresco y vivo, 80€ por kilogramo enlatado y 700€ por kilogramo seco.

Sin bien el crecimiento de abalón es lento, ya que tarda en llegar a la talla comercial hasta los 2 años de edad, se piensa que su precio en el mercado es lo suficientemente atractivo como para pensar en la rentabilidad de su cultivo (Okaes y Ponte, 1996).

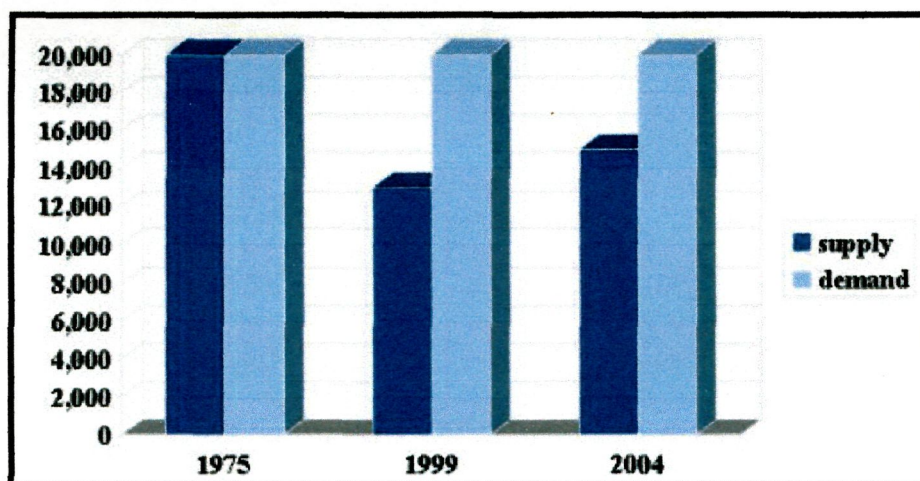


Figura 4. Demanda y oferta de *Haliotis* spp. a escala mundial (Gordon y Cook, 2001)

En Europa, la mayor parte de la producción se destina a Francia, donde la producción local no abastece la demanda. El caso de Irlanda es llamativo debido a que introdujeron especies foráneas (*H. tuberculata* L. desde Guernesey en 1977

y *H. discus hannai* perteneciente a Japón en 1986) para comenzar el desarrollo de una acuicultura como cambio de divisa a Francia (La Touche et al., 1993).

De tamaño medio, *Haliotis tuberculata* L. tiene un músculo pedal de color blanco muy apreciado comercialmente, siendo en la actualidad, la única especie de *Haliotis* autóctona considerada comercial en Europa (Clavier, 1992).

La almeja canaria, alcanza en el rango de su tamaño máxima la talla mínima exigida en el mercado internacional para su comercialización (Belasko, 2002). Su importancia en Canarias reside por un lado en que la acuicultura en general, se ha convertido en una actividad eficaz para el desarrollo económico del Archipiélago y por otro lado, en que la tecnología y metodología de producción de semillas en cautividad podrían aplicarse en programas de repoblación con el fin de recuperar la actividad de marisqueo (en la actualidad prohibida legalmente por el Real Decreto 151/2001 del 23 de Julio de 2001 (BOC-2001/097)).

La acuicultura comienza a desarrollarse en el Archipiélago Canario en la década de los 80, siendo dos especies de peces marinos, dorada y lubina, las que se comercializan en la actualidad. Sin embargo, estas especies compiten fuertemente con el mercado internacional donde productores como Grecia (con una mano de obra es más barata y donde prácticamente toda la producción tiene lugar en jaulas flotantes) han dado lugar a una reducción de los precios de venta tanto en los mercados nacionales como internacionales. Por tanto, se hace necesario el desarrollo del cultivo de nuevas especies, como complemento a los productos procedentes de la acuicultura ya existentes.

En este sentido, la especie de oreja de mar presente en Canarias, *H. tuberculata coccinea*, de tradicional consumo local y amplias perspectivas de

mercado, se perfila como una especie idónea para su introducción en el rango de productos procedentes del sector acuícola en Canarias, para lo que sería necesario la adaptación de la tecnología y metodología de producción desarrollada en otros países a la especie autóctona.

### **1.2.5. Morfología**

#### Morfología externa:

*H. tuberculata coccinea* puede alcanzar un tamaño máximo de unos 70mm de largo por unos 45mm de ancho (Espino y Herrera, 2002). La característica más llamativa de la almeja canaria y otras especies de abalón es la forma de oreja que tiene la concha, la cual protege las partes más blandas del animal.

Pérez y Moreno (1991) describieron la morfología externa del abalón (Figura 5) como un gasterópodo donde: la concha es de color marrón o rojizo con manchas blanquecinas, característica diferente en cada individuo. Contiene una espira corta formada por tres o cuatro vueltas de las cuales la última es muy amplia y presenta una serie de orificios redondeados u ovals, alrededor de los cuales la superficie de la concha se eleva ligeramente; los 5 o 6 últimos están abiertos y por cada uno de ellos aflora al exterior un tentáculo paleal. La superficie de la concha se encuentra adornada por crestas espirales anchas y estrechas de superficie ondulada, dispuestas alternativamente. Las estrías de crecimiento son apreciables. La abertura oblicua, es muy amplia y el labro se encuentra ligeramente dentado. La superficie interna de la concha contiene un grueso estrato de nácar.

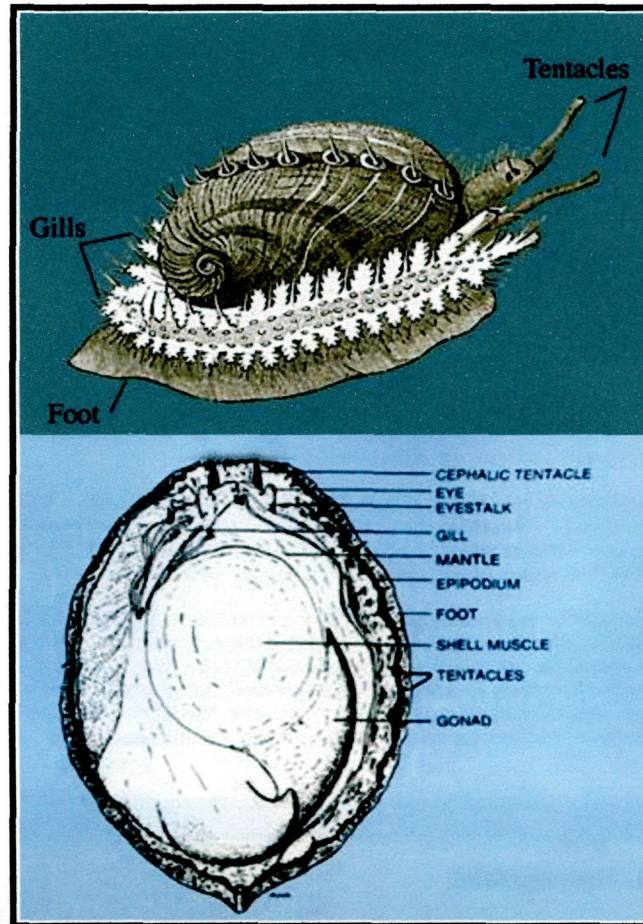


Figura 5. Morfología externa del abalone sin la concha. (FISHTECH, 1997)

La característica ventral más llamativa es el músculo largo del pie el cual deja al descubierto la concha (figura 5). La parte dorsal del pie está rodeado lateralmente por un collar llamado epipodium, el cual contiene pequeños órganos sensoriales y tentáculos. La parte anterior del pie es la cabeza, típico en los moluscos con tentáculos similares a los de encima de los labios pero largos.

Anatomía interna:

Según la FAO (1990):

1. El sistema digestivo: se encuentra en la parte izquierda del músculo aductor localizado en la mitad del cuerpo. Los órganos digestivos consisten en la lengua, traquea, estómago, intestino recto y el ano (figura 6). Debido a la

forma espiral del cuerpo, los órganos del digestivo aparecen curvados, y la lengua y el ano se encuentran en la misma orientación. La lengua tiene forma ovalada y sus paredes están compuestas de tejido fino muscular. En la lengua, se encuentran el lóbulo de calyx, la rádula y las glándulas salivares. La tráquea del abalón es larga y estrecha. El estómago tiene forma de V y se encuentra posterior a la tráquea. El apéndice vermiforme y el hígado (hepatopáncreas) se encuentran unidos al estómago. El hígado está localizado en la parte derecha del músculo aductor, protuberante y con forma de cuerno de buey. El intestino que finaliza siendo el recto, comienza en la parte trasera hacia la parte marginal delantera rodeando la parte izquierda del músculo aductor. El intestino mide unas 3.27 veces la concha. El sistema digestivo es largo y complejo, como ocurre en la mayoría de los herbívoros.

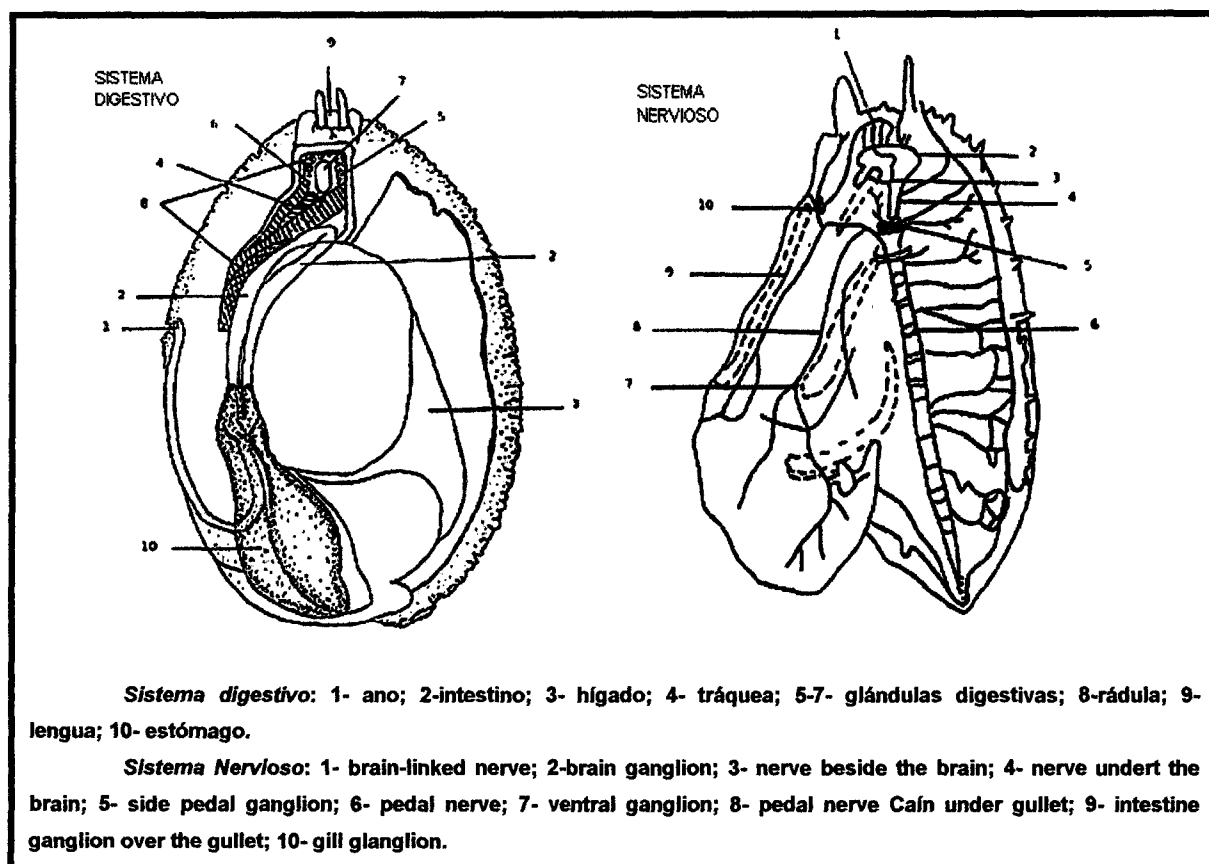


Figura 6. Sistema Digestivo y Nervioso del abalón. (FAO, 1990)



2. El sistema nervioso: Está poco desarrollado. Contiene cuatro pares de ganglios (cerebro, pie, ventral, branquial e intestinal) y una conjunción de nervios que están conectados longitudinal y transversalmente. En la figura 6 se observa más detalladamente el esquema del sistema nervioso del abalón.

3. El sistema respiratorio y circulatorio: Presenta dos branquias localizadas inmediatamente debajo de los poros de la concha y funcionan como órganos respiratorios. Se encuentran en el centro de la cámara respiratoria, y la de la derecha es más grande que la de la izquierda. La parte izquierda y el fondo de la cámara respiratoria está cerrada, de esta forma, el paso del agua hacia las branquias se realiza desde la parte superior y derecha. El agua de mar pasa a través de las branquias (intercambio gaseoso) y se dirige hacia los poros respiratorios de la concha junto con otros productos de excreción procedentes del ano. El corazón, localizado en la cavidad pericardial, consta de un ventrículo y dos aurículas. La sangre desde el corazón se transporta a través de las venas situadas entre los órganos por el Sistema Circulatorio, primero se dirige hacia las arterias de las branquias y una vez oxigenada, llega a la aurícula a través de las venas branquiales.

#### **1.2.6. Fisiología de la reproducción en *Haliotis spp.***

El abalón es dioico, es decir, presenta sexos separados, aunque se han encontrado casos aislados de animales hermafroditas, (Cochard, 1980; Girard, 1972). Los casos más recientes de hermafroditismo, parecen estar relacionados con las condiciones medioambientales. Horiguchi en el 2000, publica un estudio realizado en la bahía de Jogasmina en Japón, donde se observó que el 20% de

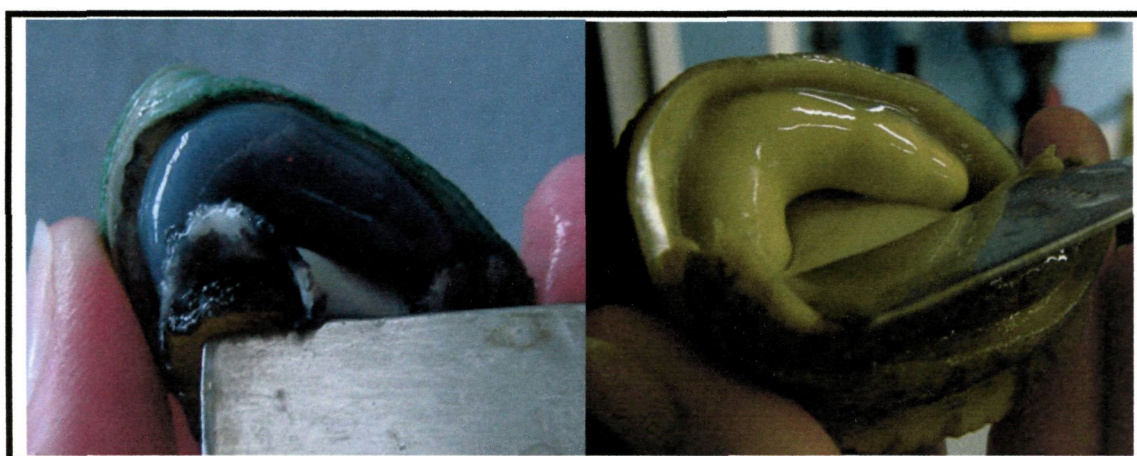
las hembras de *H. madaka* se encuentran masculinizadas (contienen ovarios y testículos) y al igual que sugirió Cochard en 1980 para *H. tuberculata*, relaciona este fenómeno con la contaminación de metales pesados en el agua.

A continuación se describen la Anatomía del Aparato Reproductor, el ciclo reproductor y la reproducción.

### 1.2.6.1. Anatomía del Aparato Reproductor

En la Familia Haliotidae, entre la concha y el pie en la parte posterior, la gónada envuelve la glándula digestiva (hepatopáncreas) y los dos órganos forman el apéndice conical (Booolootian et al., 1962; Mottet, 1978; FAO, 1995).

El color y el tamaño del apéndice conical indican el sexo y el estado de madurez. La gónada es generalmente beige en machos y grisáceo oscura en hembras y aumenta en tamaño durante la gametogénesis (figura 7). La función del hepatopáncreas en la reproducción, es el abastecimiento de material para el desarrollo de las células sexuales (Booolootian et al., 1962).



**Figura 7. Gónadas femenina y masculina de *H. tuberculata coccinea*. (Viera et al, 2003)**

Existen casos, donde la identificación entre sexos no es posible con una inspección visual, por ejemplo, el caso del omer (*H. tuberculata* L.), donde las gónadas maduras femeninas pueden adquirir un tono cremoso muy similar al de los machos (Belasko comunicación personal). En nuestra especie, los machos pueden presentar puntos grisáceos parecidos al color de los individuos femeninos, sin llegar a imposibilitar la identificación (figura 7).

A escala microscópica las células reproductivas son:

1. Huevos: Los oocitos se encuentran comprimidos en la gónada y adquieren formas irregulares a la vez que se desarrollan y aumentan de tamaño (figura 8). Cuando el animal alcanza el estado de máxima madurez, son expulsados directamente al agua de mar y se vuelven esféricos. El tamaño de los oocitos maduros varía de una especie a otra y en el caso de la almeja canaria, Belasko (2002) estima un diámetro de 155 micrómetros. Cabe destacar, que en desoves inducidos artificialmente, pueden aparecer agregaciones de huevos cilíndricos o con forma de matrás, éste es un indicativo de inmadurez y si se da el caso, éstos son raramente fertilizables (FAO, 1990).

2. Esperma: El esperma posee una cabeza con forma de lanza y una cola alargada. El tamaño varía en función de las especies, y es aproximadamente de 58 micrómetros (FAO, 1990). El desarrollo de estas células se realiza en pequeños compartimentos limitados por la trabícula (tejido conectivo) y finaliza en el lumen de la gónada (figura 8). El semen eyaculado por un macho maduro aparece como una línea cremosa y los espermatozoides se dispersan fácilmente. Los espermatozoides inmaduros poseen una cabeza difusa y una cola corta, y si son eyaculados se presentan como una masa irregular de células (FAO, 1990).



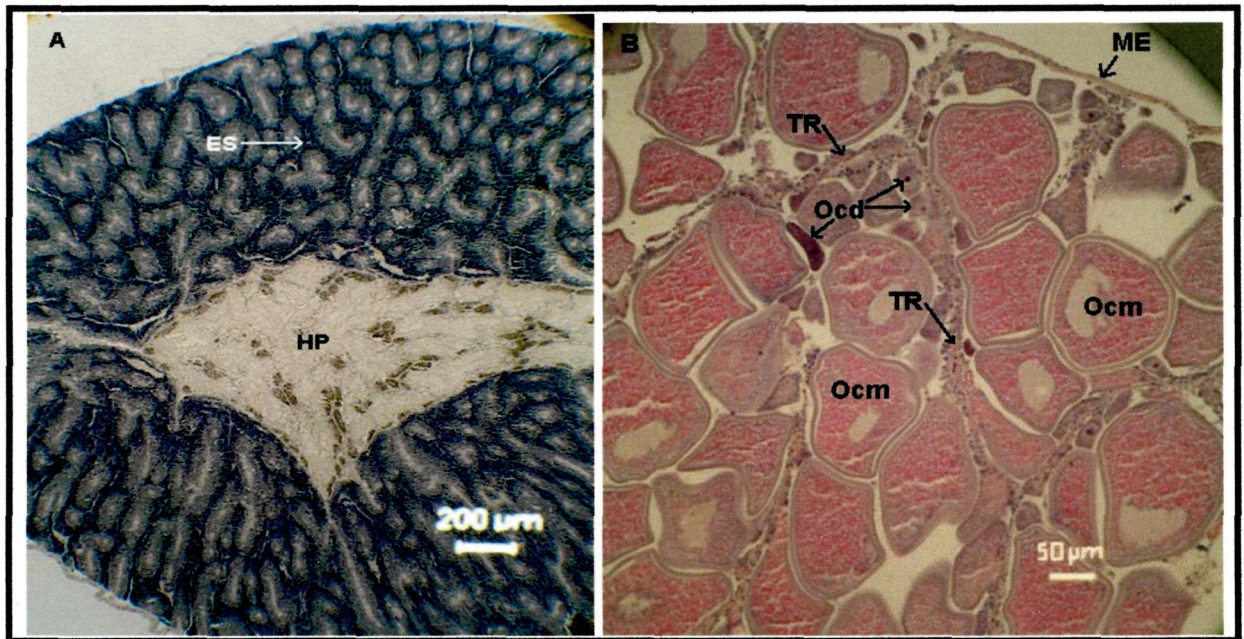


Figura 8. A) Gónada de *H. tuberculata coccinea* macho que rodea al hepatopráncreas (Hp) B) Aspecto de una gónada femenina donde los oocitos en desarrollo (Ocd) se encuentran adheridos a la trabícula (TR) y los maduros (Ocm) se localizan alejados de la misma.

#### 1.2.6.2. Ciclo reproductor

A escala mundial, las especies pertenecientes a regiones frías normalmente presentan una o dos épocas de desove anuales, en cambio las especies tropicales parecen desovar durante todo el año, debido a que en estas regiones la temperatura del agua presenta pequeñas variaciones (Bussarawit et al., 1990; Singhagraiwan y Doi 1992; Jarayabhand y Paphavasit, 1996).

Espino y Herrera (2002) a partir de un estudio de seguimiento de poblaciones naturales de la almeja canaria, sugieren que las puestas se realizan de forma sincrónica una vez al año entre Febrero y Abril, aunque algunos individuos presentan asincronía, probablemente debido a variaciones de la temperatura o de la disponibilidad de alimento en el emplazamiento (Núñez et al, 1994).

### 1.2.6.3. La reproducción

Las células neurosecretoras se encuentran en las glándulas cerebrales, pleuropedales y viscerales y son las encargadas de dar el impulso para la liberación de las hormonas reproductivas (Hanh, 1992). Estas hormonas reproductivas, incluyendo las hormonas que permiten la liberación de los huevos, identificada para el abalón como "egg-laying hormone" (aELH), son producidas en el tejido conectivo de la gónada (Chanpoo et al., 2001).

Pero aparte del control endocrino en la gametogénesis, la maduración de los gametos está influenciada por las fluctuaciones de la temperatura y existe una fuerte correlación entre el desarrollo gonadal y la temperatura del agua (Uki y Kikuchi, 1984), es por ello, que en cautiverio una práctica común es mantener la temperatura constante durante el acondicionamiento de reproductores y elevarla de forma gradual semanas antes a la inducción artificial.

Hayashi (1980) sugiere tres factores que desencadenan el desove en la población de la oreja de mar:

- (a) el estado de madurez
- (b) la intensidad del estímulo
- (c) la condición en que se encuentra la oreja de mar cuando se enfrenta al estímulo

Los otros factores que también influyen son: la presencia de gametos en el ambiente, factores neuronales u hormonales, y la disponibilidad de alimento.

La oreja de mar, normalmente desova durante el atardecer o anochecer y los machos expulsan el esperma antes que las hembras. Los gametos maduros desembocan en el nefridio y pasan a través del nefrioporo, para ser expulsados al

agua circundante por medio del segundo poro respiratorio. Los oocitos desovados presentan una densidad mayor que la del agua de mar y como consecuencia se hunden en el fondo, mientras que los espermatozoides muestran una gran motilidad.

En la fertilización, los factores influyentes son la temperatura del agua (cualquier variación altera la esperanza de vida de los espermatozoides) y el estado de madurez del animal (solo los espermatozoides y los oocitos totalmente maduros tiene un potencial de fertilización alto) (FAO, 1995). Clavier (1992) también considera un factor importante la concentración de esperma y muestra, para *H. tuberculata* L., que la incubación de los huevos con concentración creciente de esperma revela tasas de fertilización nulas o muy bajas para densidades de espermatozoides inferiores a  $10^3 \text{ml}^{-1}$  y tasas máximas para densidades de  $10^5$  a  $10^6 \text{ml}^{-1}$ . En la naturaleza, por los movimientos del agua, la concentración de esperma puede disminuir por debajo de  $10^3 \text{ml}^{-1}$  y como es un animal sedentario incluso durante el periodo de reproducción, se supone que la tasa de fertilización podría ser ineficaz cuando la densidad de animales es baja.

Después de la fertilización, el espacio previtelino entre la capa externa y la membrana del huevo aumenta en tamaño (Hanh, 1989). Estudios realizados por Viera et al. (2003) estiman para la almeja canaria, un diámetro entre 200-210 micras. Después, comienza el desarrollo embrionario que consiste en ocho estados celulares (figura 9) y una vez finalizado, comienza el desarrollo larvario; En el cabe destacar el estado trócoforo (nadador libre) y el véliger (se fija a un sustrato) antes de producirse la metamorfosis y dar lugar a un animal de las mismas características morfológicas que los adultos.



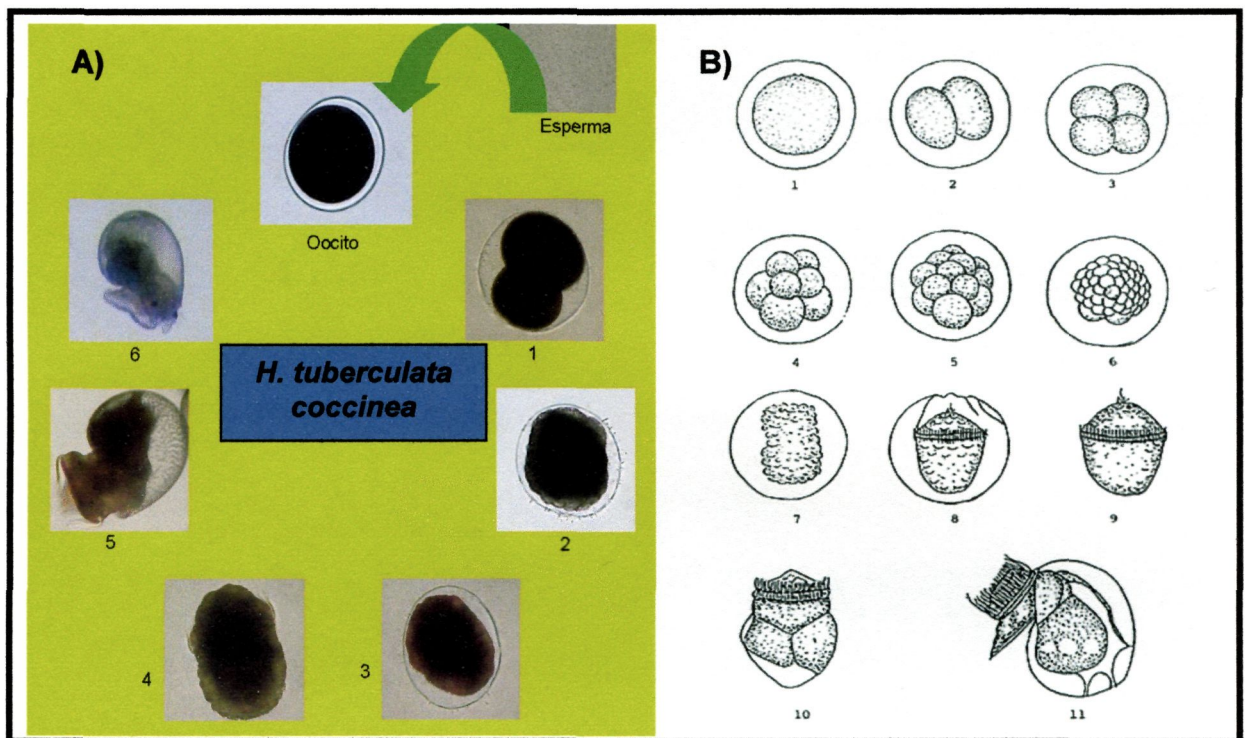


Figura 9. A) Desarrollo larvario de *H. tuberculata coccinea* R. 1- 2-estado celular; 2- estado de grástula; 3- trocófora dentro de la membrana; 4- trocófora; 5- velíger temprana; 6- velíger (Viera et al., 2003) B) Desarrollo embrionario y larvario del abalone. 1- el cuerpo polar aparece en el huevo fertilizado; 2- 2-estado celular; 3- 4-estado celular; 4- 8-estado celular; 5- 16- estado celular; 6- estado de mórula; 7- estado de grástula; 8-trocófora dentro de la membrana; 9- trocófora recién eclosionada; 10- velíger temprana; 11- velíger tardía. (FAO, 1990)

En cuanto a las gónadas, después del desove, se vuelven muy suaves y llenas de una sustancia gelatinosa, incluso pueden aparecer huecas (Hayashi, 1980).

### 1.2.7. Métodos para la inducción al desove

El término acondicionamiento se refiere a la inducción a la maduración no necesariamente en su época de puesta o reproducción en el medio natural. Independientemente de la condición alimenticia de los adultos en edad reproductiva así como factores del medio ambiente que no permitan el estrés, las diferentes técnicas de acondicionamiento se realizan para lograr la maduración y sincronización de las puestas. No todas las especies de abalón, maduran con la misma facilidad en cautiverio. Sin embargo, para lograr la maduración, todos los

organismos deben de haber sido acondicionados por lo menos un año antes de ser utilizados para desoves inducidos (Viana, 2002). Durante el período de acondicionamiento, se mantienen a los organismos con una buena alimentación y bajo condiciones ideales de temperatura, luz, salinidad, oxigenación en el agua y evitando su exposición a factores de contaminación.

El procedimiento puede ser combinado con mayor eficacia con un programa de temperaturas para la maduración (Uki y Kikuchi, 1984) Este método es ampliamente utilizado en Japón y consiste en la acumulación de grados °C / tiempo, iniciando con temperaturas bajas hasta llegar a una alta óptima alrededor de las 22 semanas; Esta temperatura se mantiene para volver a bajarla antes de su inducción al desove.

Son varios los métodos existentes para la inducción al desove, como el uso de radiación ultravioleta (U.V), desecación, Shock térmico y utilización de peróxido de hidrógeno (Hanh, 1989). La elección de uno u otro método se basa en la disponibilidad de la materia prima y/o instalaciones, así como del tipo de especie y experiencia del personal técnico (Belasko, 2002).

1. Desecación: se utiliza cuando los adultos están muy maduros. La metodología consiste en sacar del agua a los reproductores durante aproximadamente una hora. Este método no es muy eficiente ya que para ello el grado de madurez de los individuos ha de ser muy alto.

2. Shock térmico: los machos y las hembras se colocan en un mismo tanque y se procede a elevar la temperatura del agua bruscamente entre 3-6°C; luego se va bajando gradualmente durante 3 horas hasta alcanzar la temperatura



ambiente. Tampoco es un método aconsejable por la cantidad de gametos inmaduros liberados que se liberan.

3. Radiación ultravioleta: es un método cada vez más extendido utilizándose principalmente en Japón y Australia. El agua se filtra hasta 1 micra antes de pasarla a través de la luz ultravioleta. La puesta tiene lugar aproximadamente dos horas después de la estimulación y la ventaja que presenta este método, es que los gametos no se dañan puesto que no se utiliza ningún tipo de reactivo.

4. Peróxido de Hidrógeno: Morse et al. describieron este método en 1977 y en la actualidad está extendido mundialmente. Observaron que la liberación de gametos puede inducirse con la adición de peróxido de hidrógeno al agua de mar. Para ello, los machos y las hembras se colocan en contenedores separados. Se añade un buffer para controlar el PH, después el peróxido de hidrógeno y el desove tiene lugar aproximadamente en tres horas. La mayor desventaja que presenta este método consiste en que los reactivos son dañinos para los gametos así que una vez que los adultos empiezan a expulsar los gametos, los contenedores se aclaran con agua de mar limpia (es recomendable tratarla con radiación ultravioleta). La mayor ventaja es que es un método de bajo coste y los reactivos se pueden almacenar fácilmente.

Hanh en 1992 describe que el radical libre HOO o el bi-radical OO producido a partir del peróxido de hidrógeno en presencia de agua, así como el agua irradiada con luz ultravioleta actúan probablemente como donadores del oxígeno electrónicamente activado para la reacción de la catálisis de la enzima ciclo-oxigenasa, precursora de la formación de prostaglandinas. Al contrario a la inducción al desove, el bloqueo se lleva a cabo con la adición de aspirina, (la cual

actúa como un inhibidor de la enzima en la conversión del ácido araquidónico a la prostaglandina endoperoxidasa) o catalasa (la cual destruye H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Hahn, 1992)

La respuesta al estímulo del peróxido de hidrógeno en la almeja canaria, fue estudiada por Peña en 1985 y concluye que los resultados obtenidos son bastante alentadores, aunque el porcentaje de respuesta fue inferior al detectado en otras especies que se explotan comercialmente un (57.5% frente a un 92.3% en *Haliotis discus*, en las mismas condiciones). Más recientemente estudios llevados a cabo por Viera et al en 2003, muestran mejores resultados que los obtenidos por Peña, debido seguramente a la diferencia de temperatura utilizada durante la experimentación (19.2-20.1°C frente a 15.3-17.5°C) alcanzando una tasa de freza de un 100%. Así mismo sugieren que el método de Morse et al, 1977, para la inducción al desove presenta las ventajas de ser un método de bajo coste, sencillo de realizar, con resultados satisfactorios, pero animan a realizar el método de inducción por radiación ultravioleta del agua, el cual no requiere de reactivos que puedan dañar los gametos.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

## 2.1. RECOLECCIÓN Y ACONDICIONAMIENTO DE ANIMALES

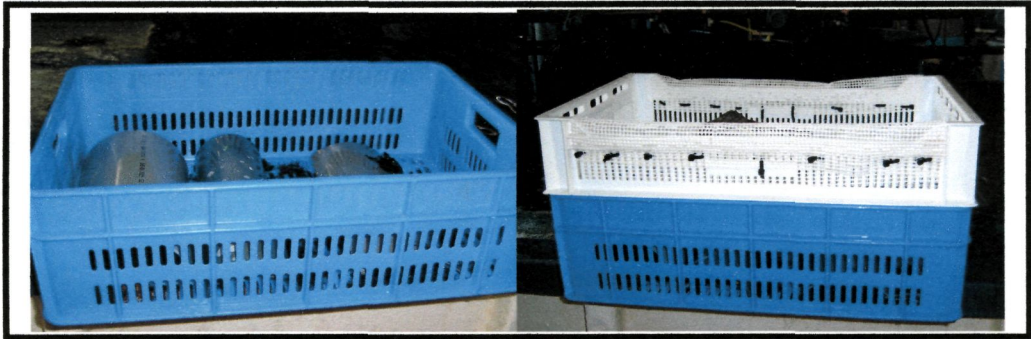
El presente estudio se basa en una muestra de una población recolectada en la bahía del Castillo del Romeral, en la isla de Gran Canaria, en el mes de Octubre del 2003 mediante scuba (figura 10). Un total de 460 individuos comprendidos entre la talla de 35-65mm en longitud de concha fueron aclimatados durante un mes en las instalaciones del Instituto Canario de Ciencias Marinas (ICCM).



**Figura 10. Detalle de recolección, y transporte de animales con abundante *Ulva rígida* (macroalga verde) e *Hypnea spinella* (macroalga roja).**

Atendiendo a los factores de acondicionamiento críticos citados por Fleming (2002), los individuos se mantuvieron durante un mes en tres tanques troncocónicos de fibra de vidrio de doble fondo de 1000 L y un tanque rectangular de 6000 L. Para reducir el contacto de los individuos con las heces y otros productos de excreción sólidos, en los tanques troncocónicos, se introdujo una cesta de malla rectangular (4mm de diámetro de luz) y en el tanque rectangular se colocaron listones de acero a una altura del fondo. Los animales se separaron por sexo y se dispusieron en las cestas de malla y en cajas de tipo Taiwán con tejas de PVC (figura 11).

Fueron alimentados hasta la saciedad dos veces por semana con una dieta mixta de *Ulva rígida* (macroalga verde) e *Hypnea spinella* (macroalga roja) procedentes del sistema de biofiltros de la nave de cultivos marinos del ICCM. La limpieza de los tanques se realizó una vez por semana.



**Figura 11. Cajas tipo Taiwán. Obsérvese en la primera fotografía las tejas de PVC donde los animales encuentran refugio; en la segunda fotografía la caja blanca actúa como tapa que imposibilita la huida.**

En cuanto a los parámetros físico-químicos; los tanques se mantuvieron en condiciones naturales de fotoperiodo y temperatura con una renovación de agua de 0.5 volúmenes por hora.

## **2.2. SELECCIÓN DE HEMBRAS PARA EL EXPERIMENTO**

Un total de 40 hembras fueron seleccionadas atendiendo a dos factores morfológicos, el tamaño de la concha para estudios de fecundidad y el estado de madurez observado macroscópicamente (tamaño del apéndice conical), para los estudios histológicos.

El tamaño del apéndice conical es un indicativo de su estado de madurez y fue estimado por el método no invasivo llamado índice gonadal (I.G.). Éste método de medición clasifica la gónada en tres niveles y se basa en la premisa de que la gónada inmadura presenta un apéndice conical de menor tamaño que la gónada madura (Hanh, 1989; Uki y Kikuchi, 1984):

Nivel 1: Hay diferenciación sexual con un ligero crecimiento del apéndice conical.

**Nivel 2:** El apéndice conical se encuentra más aparente llegando hasta la parte distal de la concha.

**Nivel 3:** El apéndice conical es tan grande que sobrepasa los límites de la concha. Este grado de maduración es incluso apreciable sin tener que auscultar al abalón.

Las hembras para el estudio histológico fueron seleccionadas en función de este índice (I.G.) (Tabla I)

**Tabla I. Hembras seleccionadas para el estudio histológico.**

<b>I.G.</b>	<b>N</b>	<b>PROMEDIO DE TALLAS (mm)</b>
<b>3</b>	<b>12</b>	<b>49</b>
<b>2</b>	<b>14</b>	<b>49,2</b>
<b>1</b>	<b>12</b>	<b>48,8</b>

El tamaño de la concha se consideró la longitud de la misma y se midió hasta 0.05mm, partiendo desde el límite posterior de la concha hasta el límite anterior (donde se encuentra la cabeza).

Los estudios de fecundidad potencial se realizaron en función del tamaño de la concha para hembras en estado de prepuesta (I.G.3).

En función de las tallas disponibles en la muestra, las hembras se clasificaron en tres rangos de talla, (35-44mm; 45-54mm y 55-64mm) (Tabla II).

**Tabla II. Hembras seleccionadas para el experimento de fecundidad.**

<b>RANGO DE TALLA (mm)</b>	<b>N</b>	<b>I.G.</b>	<b>PROMEDIO DE TALLAS (mm)</b>
<b>35-44</b>	<b>4</b>	<b>3</b>	<b>40</b>
<b>45-54</b>	<b>4</b>	<b>3</b>	<b>47,7</b>
<b>55-64</b>	<b>4</b>	<b>3</b>	<b>59,3</b>

### 2.3. ESTUDIO HISTOLÓGICO

Con el fin de verificar la asignación macroscópica del estado de madurez sexual, se realizó un estudio histológico a partir de 38 apéndices conicales de hembras comprendidas entre tallas de 35-64mm clasificadas en función del índice gonadal.

El estudio histológico se dividió en dos partes: se determinó el proceso oogénico de *H. tuberculata coccinea* R y una vez caracterizadas las células sexuales, se procedió al cálculo de porcentajes de oocitos presentes en los diferentes índices gonadales observados macroscópicamente.

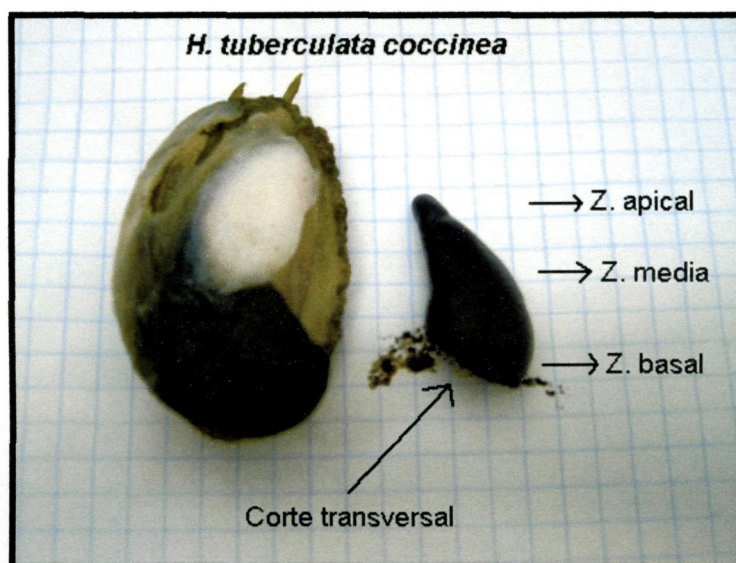
El protocolo aplicado tanto para caracterizar las células sexuales como para determinar el porcentaje de dichas células en los diferentes índices gonadales, fue el comúnmente empleado para este tipo de estudios (Young y DeMartini, 1970; Apisawetakan et al., 1997; Chanpoo et al., 2001; Litaay y DeSilva, 2003).

Consistió en la fijación de los individuos en formalina al 10% durante al menos 24 horas, disección de las tres zonas representativas del apéndice conical (basal, media y apical) como se indica en la figura 12 y seguidamente, deshidratación en serie creciente de alcoholes, clarificado en xilol, infiltración en parafina y preparación de bloques, obtención de cortes de 5 micras, desparafinado y tinción de los cortes con hematoxilina de Harris y eosina (H&E) y ácido peryódico–reactivo de Schiff y eoxina (PAS-eoxina); Finalmente, se procedió a la deshidratación y montaje de portas para la observación de los cortes al microscopio.



### 2.3.1. Estados de desarrollo de los oocitos para *Haliotis tuberculata coccinea* R

Todas las muestras histológicas de la zona media del apéndice conical (figura 12), fueron destinadas para evaluar los cambios morfológicos en el desarrollo de las células sexuales femeninas en el proceso oogénico (Young y DeMartini, 1970; Apisawetakan et al., 1997; Chanpoo et al., 2001; Litaay y DeSilva, 2003).



**Figura 12. Corte transversal del apéndice conical y zonas apical, media y basal.**

Por otro lado, con el fin de determinar el tamaño de cada célula se procedió a la medición de un total de 405 células y 264 núcleos utilizando el programa informático *Image Pro-Plus*. Para ello, se fotografiaron desde el microscopio (*Leitz DMRBE*), con la ayuda de una cámara digital *Olympus camera (c-5050 zoom)*, diferentes superficies de cortes histológicos y solamente se tuvieron en cuenta las células que presentaban núcleo. Los cortes histológicos para caracterizar y medir las oogonias y los oocitos en estado uno, se aumentaron 1000 veces y los restantes se aumentaron 400 veces.



En las primeras observaciones realizadas, se vio que la mayoría de las células presentaban formas poligonales, por lo que se tomaron dos mediciones para cada célula y núcleo. Se midieron el eje mayor y menor presentes cuando ambos cruzan el centro de la célula.

### **2.3.2. Distribución de los oocitos en la gónada.**

Como ocurre en otras especies de abalón, una gónada puede contener varios estados de células en desarrollo al mismo tiempo y la asignación de un estado de madurez para cada animal, se basa en la predominancia de las clases de células observadas (Chanpoo et al. , 2001).

Con el fin de determinar el porcentaje de las diferentes células sexuales en los tres niveles I.G. observados macroscópicamente, se identificaron un total de 8120 oocitos (aproximadamente 150 oocitos en cada gónada) para *H. tuberculata coccinea*.

Se procedió a fotografiar un total de 1080 muestras elegidas al azar de cortes histológicos de las tres zonas mencionadas del apéndice conical (9 fotografías para cada zona basal, media y apical por individuo). En cada fotografía se procedió al recuento de las células presentes, se anotaron el número de células identificables (las que presentaban el núcleo) y las restantes se consideraron no identificables.

La identificación se realizó sobre la base de las características morfológicas descritas en el proceso oogénico (resultado de la presente tesina, apartado 3.1.1.) y se clasificaron en tres grupos:

Grupo I: los oocitos en estado 1, 2 y 3 (son los oocitos en desarrollo)

Grupo II: los oocitos en estado 4 (previos a la madurez)

Grupo III: los oocitos en estado 5 (máxima madurez)

Finalmente se calcularon los porcentajes de las diferentes oocitos presentes en los índices gonadales observados macroscópicamente; Se procedió al contaje de cada grupo de células en cada zona representativa del apéndice conical y se calculó el promedio presente en toda la gónada para cada individuo de la tabla I.

Por último, se procedió a un análisis de la varianza (*Anova*), con un 95% de grado de confianza, de cada grupo de células respecto al índice gonádico observado macroscópicamente y también, respecto a cada zona del apéndice conical (apical, media y basal) con el programa estadístico *Statgraphics Plus 5.1*. Las muestras que no cumplían una distribución normal (Test de Kurtosis fuera del rango [-2, +2]) y homogeneidad en la varianza (Test de Bartlett ( $p < 0,05$ )), se transformaron a la función Arcsen (radian) y se procedió a la realización de un test no paramétrico (Test Kruskal-Wallis) en los casos donde los datos transformados aún no presentaban dichas características.

## 2.4. ESTUDIO DE LA FECUNDIDAD

Para determinar la fecundidad sólo se consideraron las hembras maduras en estado avanzado de pre-puesta (I.G. nivel 3), siguiendo el criterio de Clavier en 1992. Las estimaciones de la fecundidad de *H. tuberculata coccinea* R se efectuaron sobre la base de una muestra de 12 hembras clasificadas en tres rangos de talla (Tabla I) comprendidas entre 35-64mm en longitud de concha. Para este estudio, se considera que el mayor contenido de la gónada se encuentra en el apéndice conical (Hanh, 1989)

Los animales fueron fijados y preservados durante varios días, en un volumen de líquido de formalina al 10%, cada cono del apéndice conical fue cuidadosamente

diseccionado desde la base (figura 12), secado en papel de filtro y pesado. Se tomaron submuestras en la zona basal, zona media y en la zona apical y fueron pesadas hasta 0.0001g. (Litaay y DeSilva, 2003; Clavier, 1992). En todos los casos, la muestra fue tomada, en sección transversal (figura12)

Debido a la dificultad de contabilizar todos los oocitos presentes en las submuestras (González, 1993), el recuento de oocitos se llevó a cabo por un submuestreo aplicando un método húmedo por volumen.

Los oocitos fueron desprendidos de sus folículos arrancándolos de los tejidos conectivos con la ayuda de una aguja e individualizados por agitación manual en agua destilada. Seguidamente se añadió agua destilada hasta 40ml, procediéndose a la toma de submuestras. Cada submuestra se vertió en una placa de recuento y de cada muestra ovárica, se realizaron recuentos en 5 submuestras de 1ml, mediante lupa binocular x 400.

El número promedio de oocitos para cada animal se refiere como “fecundidad potencial”. Esto es debido a que no todos los oocitos maduros son expulsados durante el desove (Clavier, 1992), y además, en *H. tuberculata coccinea* R, la gónada en índice gonadal 3 (el estado de máxima madurez) contiene todos los estados de desarrollo de células sexuales femeninas (resultado obtenido en el apartado 3.1.1. de la presente tesina), por lo que en este estudio no sólo se contabilizan los oocitos que serán expulsados en la puesta (referidos como fecundidad real)

Los datos de fecundidad potencial obtenidos para cada rango de talla se analizaron mediante un análisis de la varianza *Anova* (programa estadístico *Statgraphics Plus 5.1.*) Cuando las muestras analizadas no presentaron una

distribución normal (Test de Kurtosis fuera del rango [-2,+2]) y homogeneidad en la varianza (Test de Bartlett ( $p>0,05$ )), los datos se transformaron a la función logarítmica.

Finalmente se hallaron diferentes correlaciones entre las características variables de cada rango de talla, como son la longitud de la concha, peso de la gónada y la fecundidad potencial calculada.

# RESULTADOS



### **3.1. ESTUDIO HISTOLÓGICO**

La disección del apéndice conical de la gónada muestra el hepatopáncreas en forma de cono rodeado por el ovario. De esta forma, atendiendo a la proporción de ambos órganos en la sección transversal, se pueden dividir tres zonas:

1. La zona basal donde el hepatopáncreas es de gran tamaño y ocupa la mayoría del perfil.
2. La zona media donde la mayoría de tejido pertenece a la gónada
3. La zona apical donde en los estados de índices gonadales avanzados, puede desaparecer el hepatopáncreas.

El estudio histológico muestra que el ovario está rodeado por dos envueltas, una externa, que lo aísla del manto y otra interna, que lo separa del hepatopáncreas. Éstas envueltas se extienden como tejido conectivo perpendicularmente hacia el interior de la gónada para formar la trabícula, como resultado, la gónada se encuentra dividida en pequeños compartimentos (figura 13). Tanto las membranas como la trabícula disminuyen de grosor al incrementar el estado de madurez de la gónada (figura 13).

Cada trabícula actúa como un eje a partir de la cual, se desarrollan las células sexuales. A medida que se desarrollan los oocitos se desprenden de la trabícula (figura 13 y 14). Los primeros estados, se encuentran fuertemente adheridas a la trabícula, mientras que en los estados intermedios aparecen menos adheridas y hacia el interior del compartimiento; para quedar por último, completamente independientes en el estado de máxima madurez.

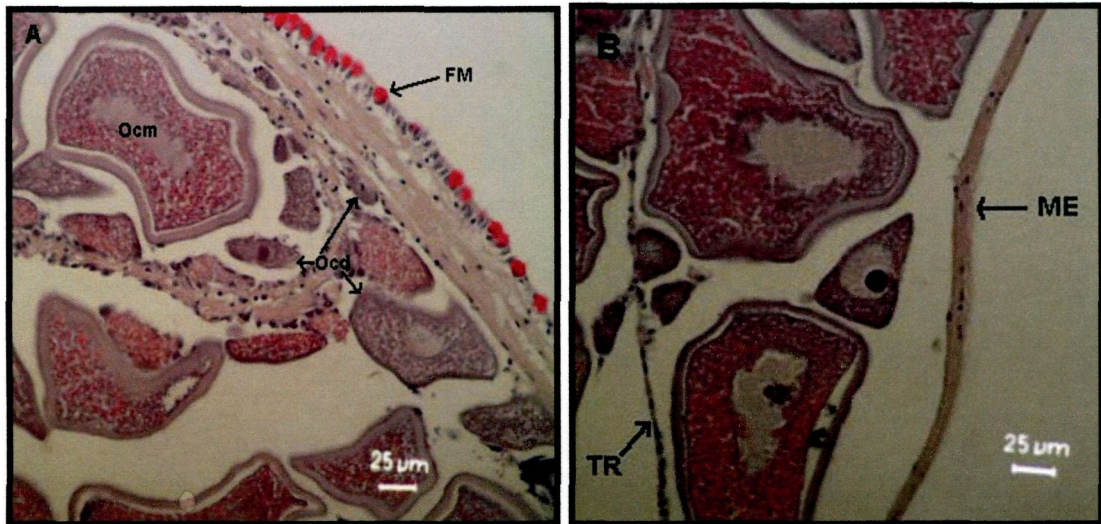


Figura 13. Trabícula. (Tinción con Hematoxilina–eoxina) A) corresponde a un índice gonadal 1 y B) corresponde a un índice gonadal 3. Se observa la disminución en grosor de la trabícula (TR) y la membrana exterior (ME) a medida que la gónada se desarrolla a estados de madurez más avanzados. En A) se observan las fibras colágenas mezcladas con células musculares (FM). Los oocitos en desarrollo se encuentran adheridos a la trabícula (Ocd) mientras que los oocitos maduros se localizan en el interior de cada compartimento formado por dos trabículas (Ocm)

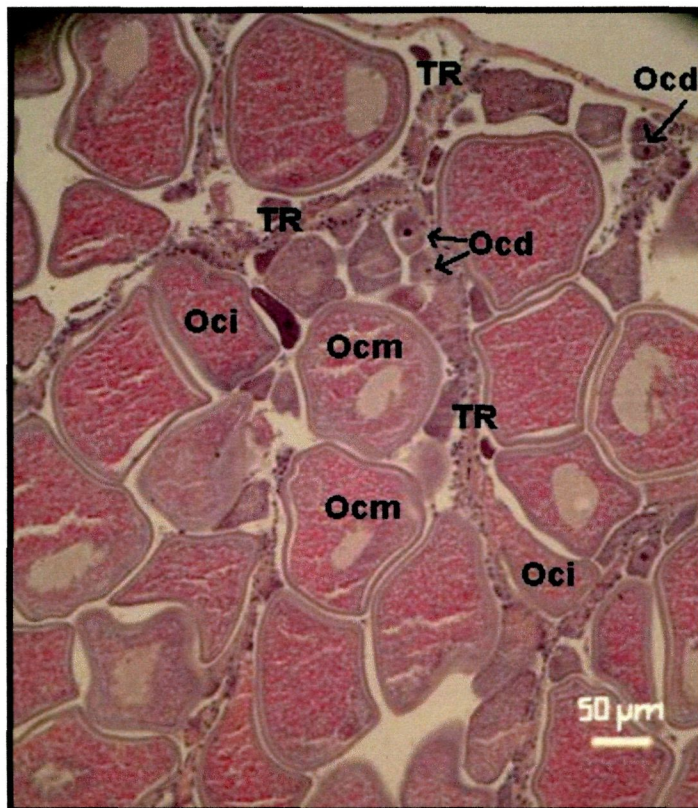


Figura 14. Distribución celular en la gónada. (Tinción Hematoxilina-eoxina)  
Se observa como la trabícula (TR) se divide en dos ramificaciones creando un compartimento. Los oocitos en los primeros estados de madurez (Ocd) se localizan unidos a la trabícula, los estados intermedios (Oci) se desplazan hacia el interior y los estados maduros (Ocm) son independientes de la trabícula y se encuentran en el centro del compartimento.

Como resultado, los diferentes estados de madurez coexisten en cada animal, independientemente de su índice gonádal observado macroscópicamente (figura13).

### 3.1.1. Estados de desarrollo de los oocitos para *Haliotis tuberculata coccinea*

Atendiendo a los cambios morfológicos observados bajo microscopía, se pueden enumerar seis tipos de células sexuales en la gónada independientemente del grado de maduración que presente, en las que se incluyen las oogonias como primer estadio y cinco estados de oocitos.

En general, la maduración de las unidades sexuales sigue el esquema mostrado en la figura 15. Este patrón de crecimiento nos da una idea de la infinidad de formas que pueden adquirir las células en los cortes histológicos dependiendo de la posición y la orientación del mismo, de hecho, las unidades sexuales, exceptuando a las Og y Oc<sub>1</sub>, presentan multitud de formas poligonales, imposibilitando la asignación a una figura geométrica establecida.

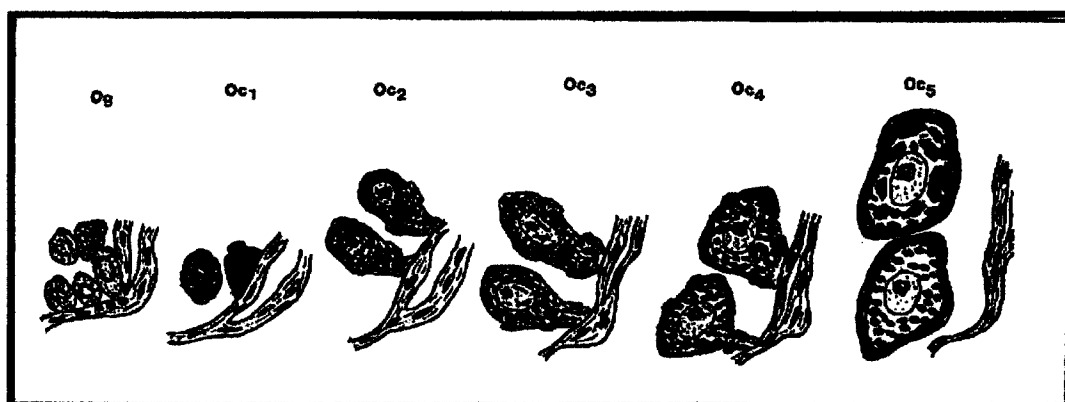


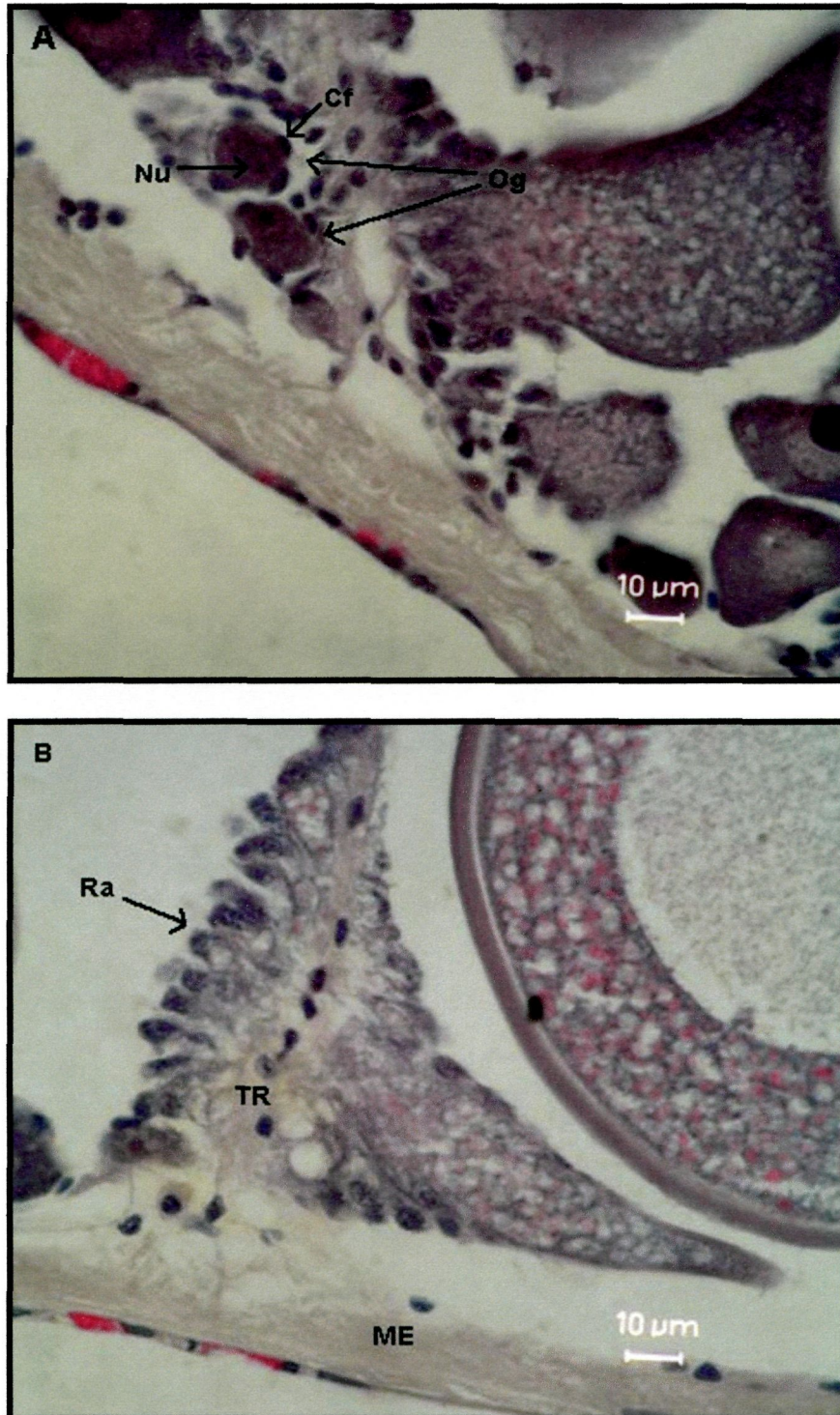
Figura 15. Maduración de los gametos femeninos en la gónada. Nota: Esquema adaptado de Apisawetakan et al. (1997) para *Haliotis asinina* L.

El tamaño de las células y los núcleos se presenta en la Tabla III (PG. 50). Exceptuando a las oogonias y a los oocitos en estado cinco, las medidas del eje mayor y menor que pasan por el centro de la célula, nos sugieren la longitud y la anchura respectivamente.



**Oogonias (Og)**

Está formada por células esféricas de  $10\pm 2.7 \mu\text{m}$  (Tabla III) con un único núcleo desplazado del centro.



**Fig. 16. Oogonias. (Tinción Hematoxilina- eoxina) En A) Presentan un núcleo desplazado del centro (Nu) y alrededor de cada Og se observan varias células foliculares (Cf). En B) Se muestran las Og a modo de racimos (Ra) fuertemente adheridas a la trabícula (TR).**

Presenta un citoplasma homogéneo basófilo y la célula se encuentra rodeada de células foliculares (figura 16 a)

Las oogonias se presentan fuertemente adheridas a la trabícula encapsuladas y dispuestas a modo de pequeños racimos. Cada Og se encuentra rodeada de células foliculares escamosas (figura 16 b).

### ***Oocito en estado I (Oc<sub>1</sub>)***

Los Oc<sub>1</sub> poseen forma ovalada o de concha y el tamaño varía entre valores de 26±6 μm de longitud y 15±4 μm de anchura (Tabla III).



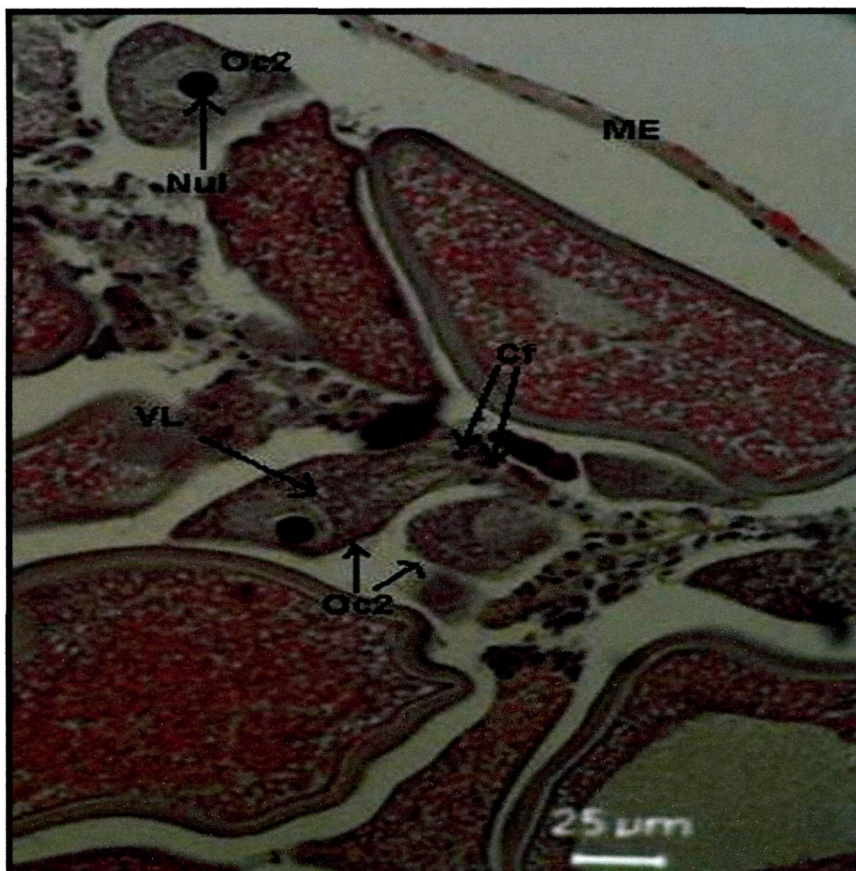
**Figura 17. Oocitos en estado 1. (Tinción Hematoxilina-eoxina) Se observa el nucleolo (Nul). Los oocitos 1 se encuentran rodeados de células foliculares (Cf). Se observan dos oocitos 2 donde la envuelta nuclear es claramente diferenciable.**



Presentan un núcleo esférico y una envuelta nuclear difusa al principio. Generalmente poseen un único nucleolo más denso. El citoplasma continúa manteniendo un comportamiento basófilo (figura 17). Al igual que las Og, se presentan fuertemente adheridos a la trabícula y rodeados de células foliculares (figura 17).

### ***Oocito en estado II (Oc<sub>2</sub>)***

Son más grandes que los Oc<sub>1</sub>, con valores de  $60 \pm 17\mu\text{m}$  en longitud y  $33 \pm 13\mu\text{m}$  de ancho y presentan forma columnar con un núcleo ovalado.



**Figura 18. Oocitos en estado 2. Tinción Hematoxilina-eoxina) Aparición de las vacuolas lipídicas (VL) en el citoplasma basófilo. Presentan el núcleo ovalado y el nucleolo (Nul) más denso. Presencia de células foliculares (Cf) alrededor.**

Se presentan adheridos a la trabícula por la base de la célula, siendo ésta la parte más estrecha. Cada Oc<sub>2</sub> se encuentra rodeado por varias células foliculares.

El nucleolo y la membrana nuclear son claramente diferenciables. En el citoplasma aparecen las primeras vacuolas lipídicas (figura 18).

### ***Oocito en estado III (Oc<sub>3</sub>)***

Estas células adquieren forma de pera, permaneciendo la base unida a la trabícula (figura 19).

Aumentan en tamaño presentando una longitud de  $110\pm 27\mu\text{m}$  y una anchura de  $59\pm 21\mu\text{m}$  (Tabla III).

El núcleo y el nucleolo son ovalados. En el citoplasma aumentan el número de vacuolas lipídicas y aparecen las primeras vacuolas vitelinas (figura 19). Se observan pequeños gránulos basófilos.

Las células foliculares rodean la base de la célula unida a la trabícula.

### ***Oocito en estado IV (Oc<sub>4</sub>)***

Las células poseen forma de pera, permaneciendo todavía unidas a la trabícula por una pequeña superficie de contacto. Tienen una longitud de  $162\pm 28\mu\text{m}$  y una anchura de  $103\pm 23\mu\text{m}$  (Tabla III).

Al igual que ocurre en los Oc<sub>3</sub>, las células foliculares están presentes en la base de los Oc<sub>4</sub> (figura 20).

El núcleo tiene forma redonda u ovalada y en su interior, pueden aparecer hasta tres nucleolos claramente visibles. El tamaño es de  $62\pm 12\mu\text{m}$  (Tabla III).



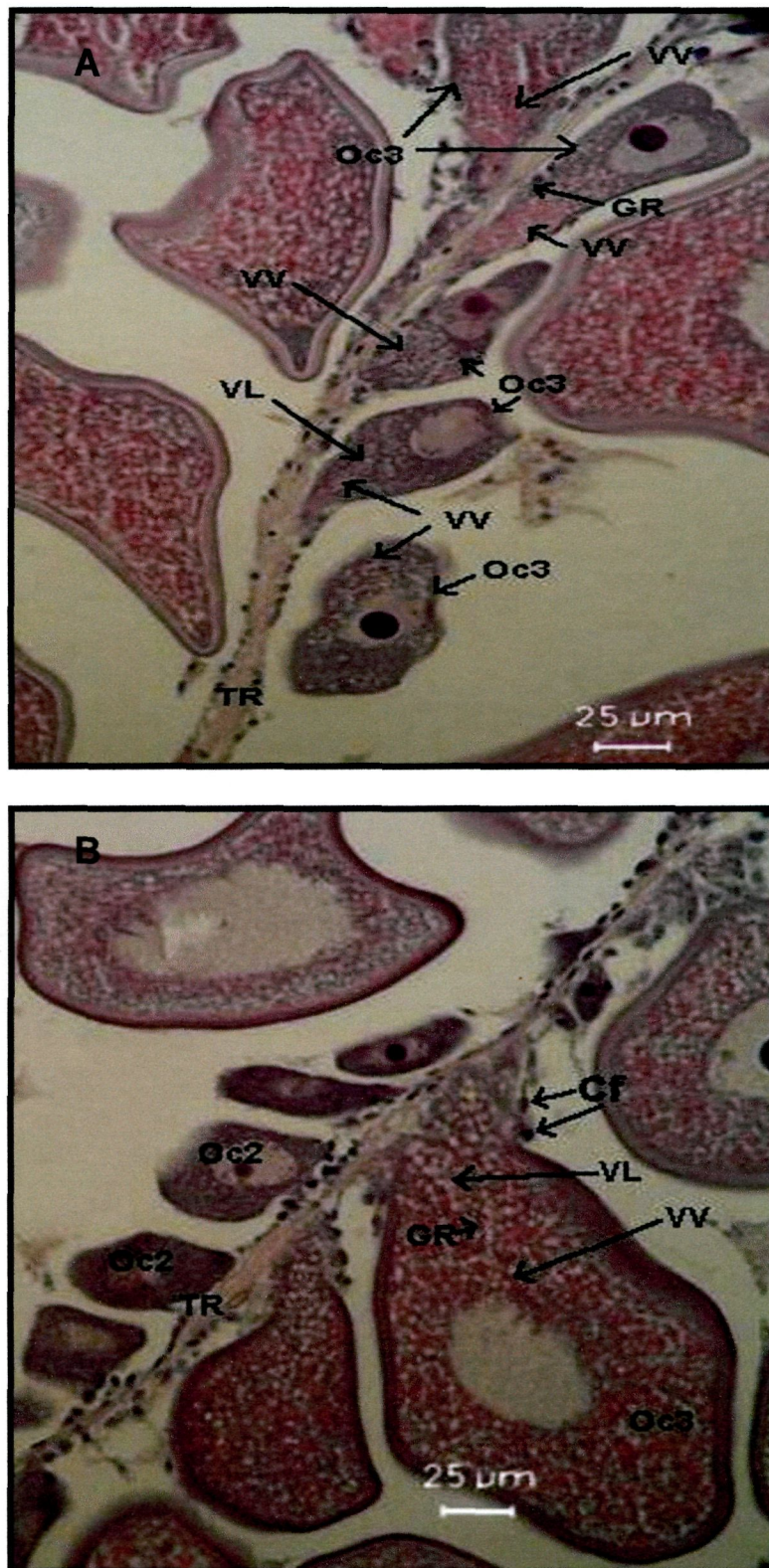
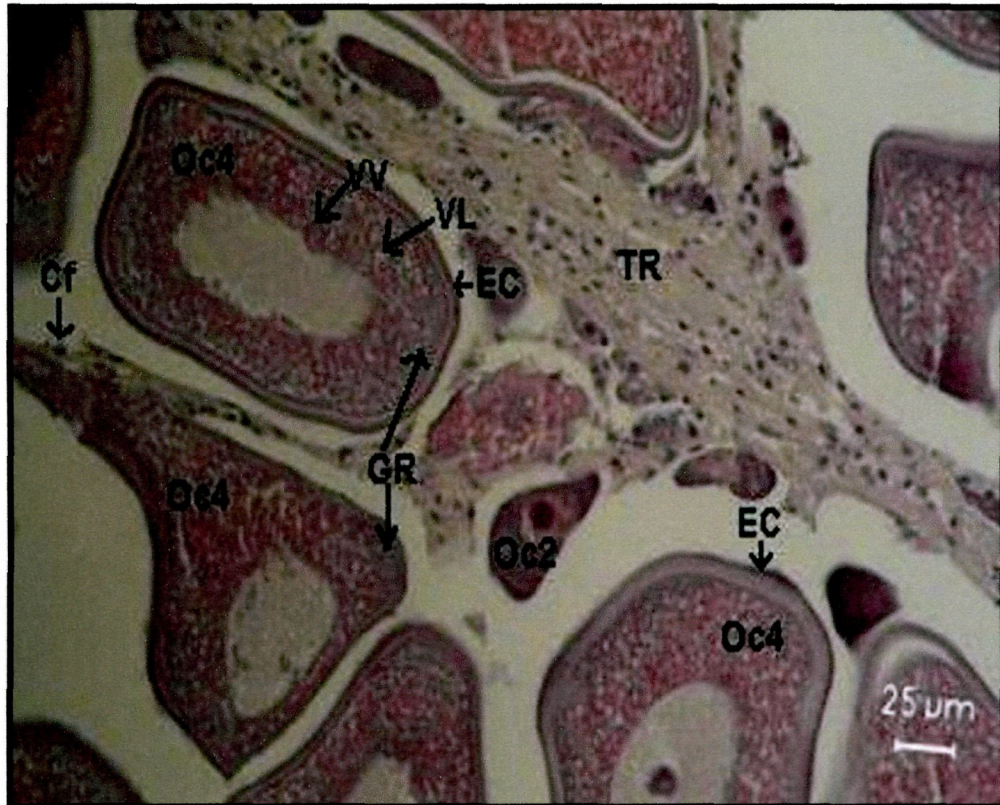


Figura 19. Oocitos en estado 3. (Tinción Hematoxilina-eosina) A) Aparición de vacuolas de vitelo (VV) con comportamiento eosinófilo. Entre las vacuolas lipídicas (VL) y las de vitelo (VV) presencia de gránulos basófilos (GR). B) Oocito en estado más avanzado con distribución homogénea de vacuolas y gránulos basófilos. Presencia de células foliculares (Cf).

En este estado, el citoplasma presenta vacuolas de vitelo y vacuolas lipídicas, uniformemente distribuidas. Los gránulos basófilos tienden a desplazarse hacia la periferia de la célula por debajo de la membrana plasmática.

Se observa un engrosamiento de la envuelta celular de naturaleza acidófila.



**Figura 20. Oocitos en estado cuatro. (Tinción Hematoxilina-eoxina) El citoplasma presenta vacuolas de vitelo (VV) y lipídicas (VL) en el citoplasma y los gránulos basófilos (GR) tienden a desplazarse hacia la periferia de la célula. Se observa un engrosamiento de la envoltura celular (EC).**

### **Oocito en estado V (Oc<sub>5</sub>)**

Los oocitos han alcanzado el estado de máxima madurez y están ya preparados para su liberación.



En la multitud de formas poligonales posibles, presentan un máximo de  $171,77 \pm 28,75 \mu\text{m}$  en las zonas más anchas y  $114,91 \pm 26,51 \mu\text{m}$  en las zonas más estrechas.



**Figura 21. Oocitos en estado cinco. Tinción hematoxilina – eosina. Los gránulos basófilos (GR) se condensan en la periferia de la célula, mientras que las vacuolas de vitelo (VV) y lipídicas (VL) se agrupan en bandas. El núcleo al igual que en el oocito en estado cuatro puede presentar varios nucleolos (Nul). La envoltura celular (EC) está totalmente desarrollada..**

Es el único estado que no aparece unido a la trabícula ni a células foliculares (figura 21). El núcleo presenta las mismas características que en el  $Oc_4$  e incluso el mismo tamaño. En el citoplasma, los gránulos azules están totalmente localizados por debajo de la membrana celular, mientras que las vacuolas de vitelo tienden a condensarse en bandas longitudinales.



**Tabla III. Resultados obtenidos en la medición de las unidades sexuales.**

<b>GAMETOS</b>	<b>N</b>	<b>EJE MAYOR (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>EJE MENOR (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>PROMEDIO (<math>\mu\text{m}</math>)</b>
Oogonias (célula)	38	12,51 $\pm$ 3,64	8,90 $\pm$ 2,60	<b>10,66 <math>\pm</math> 2,70</b>
Oocitos1 (célula)	106	<b>26,47<math>\pm</math> 6,44</b>	<b>15,48 <math>\pm</math> 4,05</b>	21,02 $\pm$ 4,01
Oocitos 2 (célula)	67	<b>60,51<math>\pm</math> 17,32</b>	<b>33,15 <math>\pm</math> 13,04</b>	46,46 $\pm$ 11,77
Oocitos 2 (núcleo)	67	27,34 $\pm$ 7,46	20,99 $\pm$ 5,57	<b>24,17 <math>\pm</math> 6,02</b>
Oocitos 3 (célula)	55	<b>110,30 <math>\pm</math> 27,63</b>	<b>59,64 <math>\pm</math> 21,02</b>	84,97 $\pm$ 20,93
Oocitos 3 (núcleo)	55	43,23 $\pm$ 9,84	30,30 $\pm$ 10,17	<b>36,77 <math>\pm</math> 8,41</b>
Oocitos 4 (célula)	76	<b>162,25 <math>\pm</math> 28,76</b>	<b>103,20 <math>\pm</math> 23,49</b>	132,72 $\pm$ 17,27
Oocitos 4 (núcleo)	76	79,29 $\pm$ 18,26	47,13 $\pm$ 13,41	<b>63,21<math>\pm</math> 12,72</b>
Oocitos 5 (célula)	66	<b>171,77 <math>\pm</math> 28,75</b>	<b>114,91 <math>\pm</math> 26,51</b>	143,34 $\pm$ 19,55
Oocitos 5 (núcleo)	66	76,10 $\pm$ 16,41	49,29 $\pm$ 13,32	<b>62,70 <math>\pm</math> 12,39</b>

La 2º y 3º columnas, corresponden a los ejes mayor y menor presentes en la célula y/o núcleo cuando ambos se cortan en el centro. La 4º, corresponde a un promedio de las dos mediciones para cada célula y/o núcleo.

El N representa el número de mediciones realizadas en cada célula sexual.

### **3.1.2. Distribución de los oocitos en la gónada.**

Se realizaron diferentes estadísticas para observar:

- a) La distribución de los oocitos en función del índice gonadal observado macroscópicamente,
- b) La distribución de oocitos para cada índice gonadal en función de las zonas de la gónada
- c) La distribución de oocitos para cada zona de la gónada en función del índice gonadal.

a) La distribución de los oocitos en función del índice gonadal observado macroscópicamente.

Los resultados (figura 22) muestran que existen diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) (Tabla IV) en la cantidad de oocitos en desarrollo (grupo I) y maduros (grupo III) para cada índice gonadal observado macroscópicamente. Se observa que la cantidad de células en desarrollo ( $Oc_1-Oc_3$ ) disminuye mientras que la cantidad de células maduras ( $Oc_5$ ) aumenta a medida que la gónada se desarrolla hasta alcanzar el estado de máxima madurez.

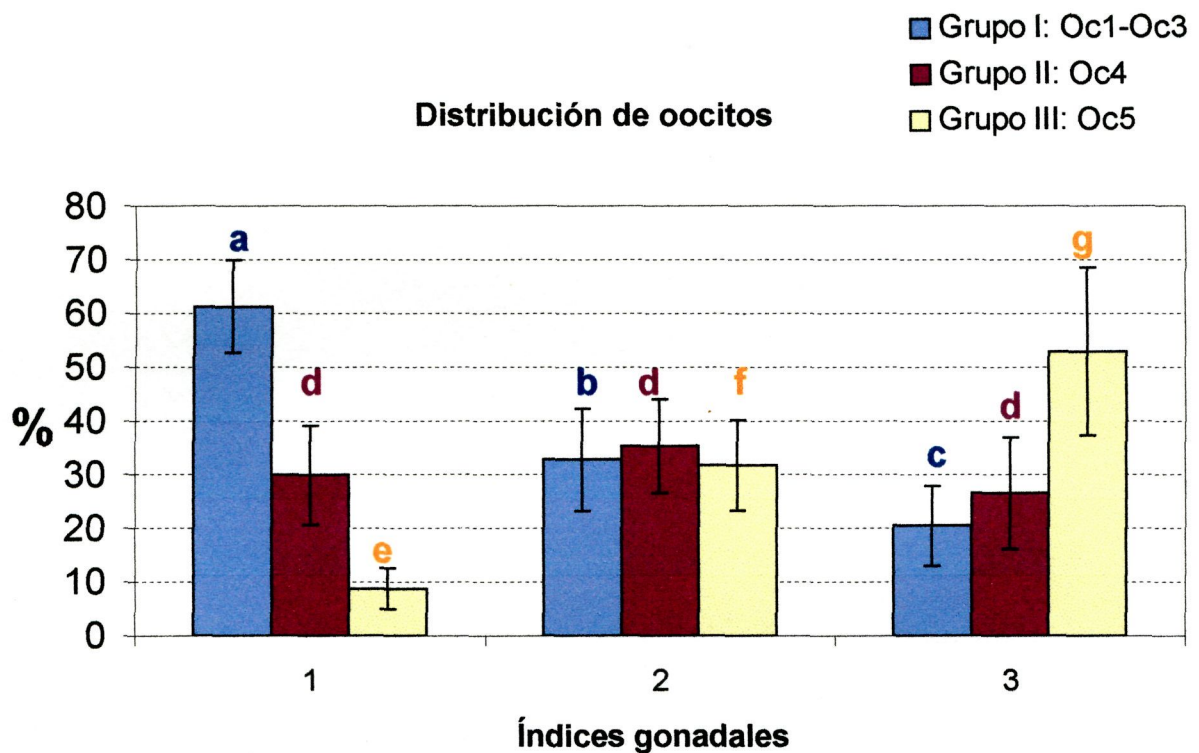


Figura 22. Grupo de unidades gaméticas presentes (%) en los diferentes índices gonadales observados macroscópicamente. Obsérvese que las barras del mismo color con o letra igual no presentan diferencias significativas, mientras que las barras del mismo color con letra diferente presentan diferencias significativas.

De esta forma, cuando la gónada comienza a crecer (I.G. 1) las células predominantes son las del grupo I ( $Oc_1$ ;  $Oc_2$ ;  $Oc_3$ ) presentándose en un 61%;

Mientras que en las gónadas maduras (I.G. 3) las células mayoritarias son las del grupo III (Oc<sub>5</sub>) presentándose en un 53% (Tabla IV).

En cambio, no existen diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) (Tabla IV) en la cantidad de oocitos previos a la maduración (Oc<sub>4</sub>). Estos se presentan entre un 26-29% durante todo el desarrollo de la gónada hasta el nivel 3 de máximo desarrollo (Tabla IV).

**Tabla IV. Porcentajes de los grupos de células sexuales en los diferentes índices gonadales observados macroscópicamente.**

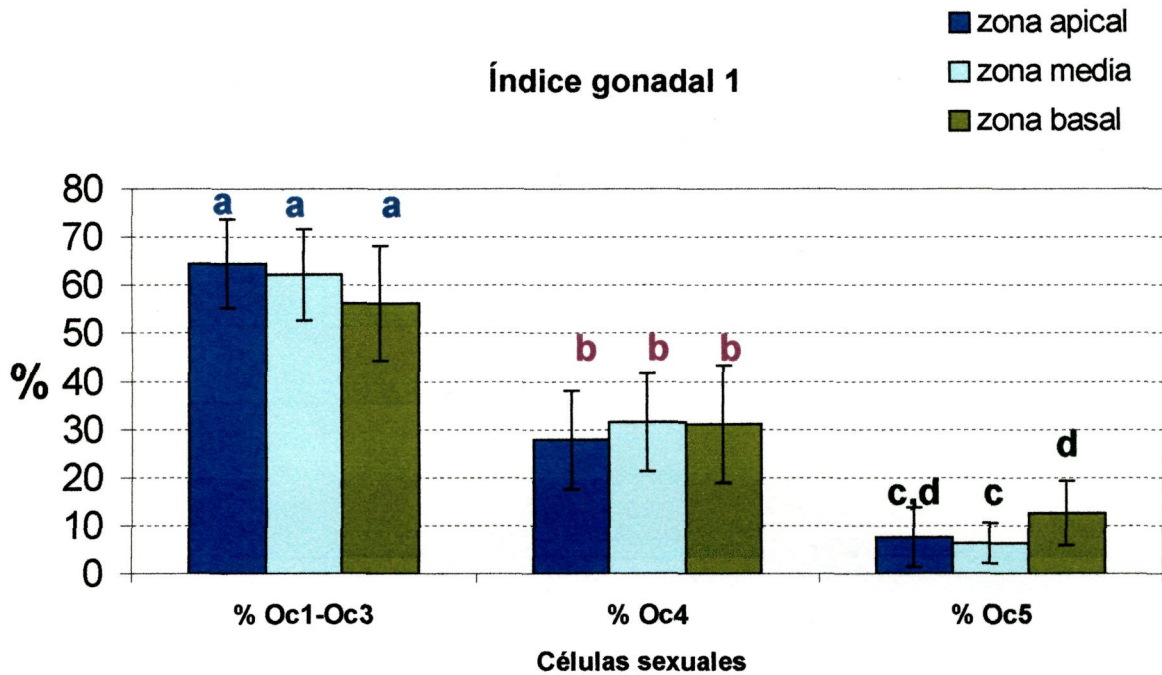
Índice	N	Grupo I: Oc1-Oc3	Grupo II: Oc4	Grupo III: Oc5	Sumatoria
1	13	61,2811 <sup>a</sup> ± 8,6	29,9239 <sup>d</sup> ± 9,1	8,79495 <sup>e</sup> ± 3,7	100
2	15	32,7972 <sup>b</sup> ± 9,5	35,3852 <sup>d</sup> ± 8,7	31,8176 <sup>f</sup> ± 8,3	100
3	12	20,4595 <sup>c</sup> ± 7,4	26,6067 <sup>d</sup> ± 10,4	52,9338 <sup>g</sup> ± 15,6	100

Obsérvese que las letras iguales y del mismo color no presentan diferencias significativas, mientras que las letras diferentes y del mismo color presentan diferencias significativas.

b) La distribución de oocitos para cada índice gonadal en función de las zonas de la gónada

Por otra parte, el análisis estadístico del **índice gonadal 1** para cada zona de la gónada se presenta la figura 23.

Los resultados demuestran que no existen diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) (Tabla V) en la cantidad de células sexuales en desarrollo (grupo I) y previas a la maduración (grupo II) para las mencionadas zonas de la gónada. En cambio, sí existen diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) (Tabla V) en el porcentaje de células sexuales maduras (grupo III).



**Figura 23.** Grupo de células sexuales presentes (%) en las zonas representativas de la gónada para el índice gonadal 1. Obsérvese que las letras del mismo color e iguales no presentan diferencias significativas, mientras que las letras del mismo color y diferentes presentan diferencias significativas.

Los porcentajes de las células sexuales para una gónada de índice 1, son aproximadamente de un 60% para los Oc<sub>1</sub>, Oc<sub>2</sub> y Oc<sub>3</sub>, de un 30% para los Oc<sub>4</sub> y entre un 6 y 12% para los Oc<sub>5</sub> (Tabla V).

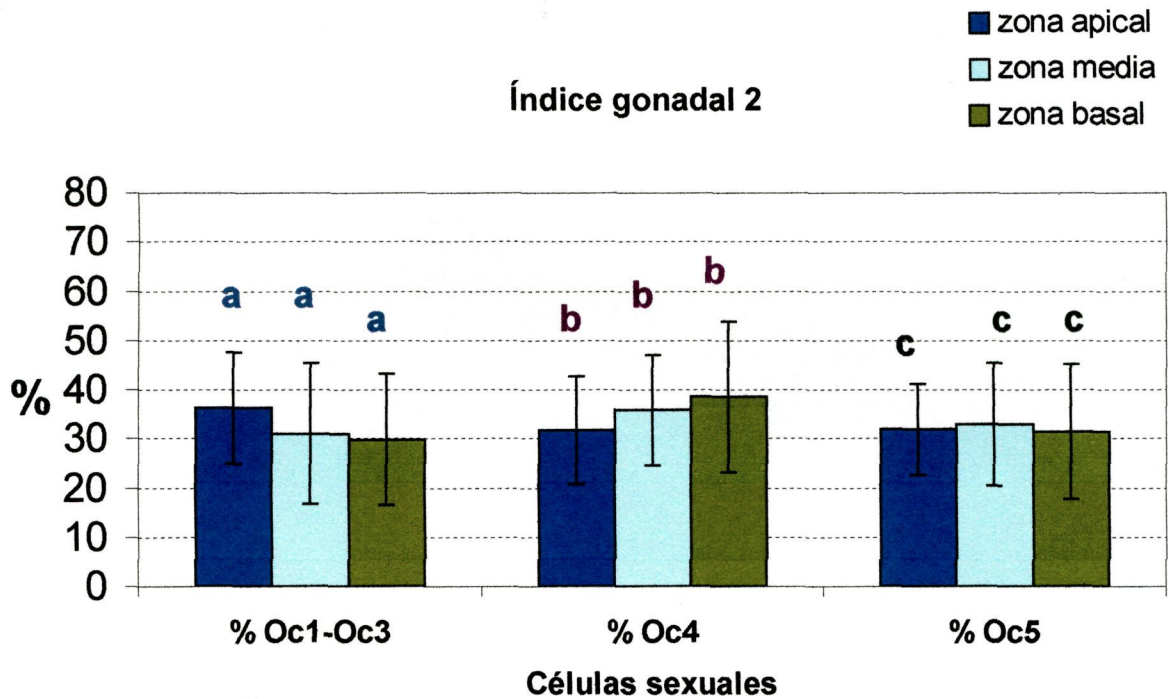
**Tabla V.** Porcentajes de los grupos de células sexuales presentes en el índice gonadal 1 para cada zona de la gónada.

Zona gónada	N	Grupo I: Oc1-Oc3	Grupo II: Oc4	Grupo III: Oc5	Sumatoria
z. apical	39	64,53 <sup>a</sup> ± 9,30	27,88 <sup>b</sup> ± 10,28	7,58 <sup>c,d</sup> ± 6,10	100
z. media	39	62,18 <sup>a</sup> ± 9,52	31,49 <sup>b</sup> ± 10,13	6,32 <sup>c</sup> ± 4,20	100
z. basal	39	56,25 <sup>a</sup> ± 12,04	31,14 <sup>b</sup> ± 12,16	12,60 <sup>d</sup> ± 6,65	100

Obsérvese que las letras iguales y del mismo color no presentan diferencias significativas, mientras que las letras diferentes y del mismo color presentan diferencias significativas.



El análisis estadístico del **índice gonadal 2** para cada zona de la gónada se presenta en la figura 24.



**Figura 24.** Grupo de células sexuales presentes (%) en las zonas representativas de la gónada para el índice gonadal 2. Obsérvese que las letras del mismo color e iguales no presentan diferencias significativas, mientras que las letras del mismo color y diferentes presentan diferencias significativas.

Los resultados demuestran que no existen diferencias significativas (Tabla VI) ( $P < 0,05$ ) en la presencia de las diferentes células sexuales para cada una de las zonas de la gónada.

En la tabla VI se observa que para una gónada de índice 2 los oocitos en desarrollo ( $Oc_1$ ,  $Oc_2$  y  $Oc_3$ ) presentan aproximadamente el 32% de las células presentes, mientras que los oocitos previos a la maduración ( $Oc_4$ ) presentan aproximadamente el 35% y por último los oocitos maduros ( $Oc_5$ ) el 33%.

Tabla VI. Porcentajes de los grupos de células sexuales presentes en el índice gonadal 2 para cada zona de la gónada.

Zona gónada	N	Grupo I: Oc1-Oc3	Grupo II: Oc4	Grupo III: Oc5	Sumatoria
z. apical	45	36,26 <sup>a</sup> ± 11,37	31,82 <sup>b</sup> ± 10,88	31,91 <sup>c</sup> ± 9,21	100
z. media	45	31,06 <sup>a</sup> ± 14,31	35,88 <sup>b</sup> ± 11,21	33,05 <sup>c</sup> ± 12,47	100
z. basal	45	29,94 <sup>a</sup> ± 13,41	38,58 <sup>b</sup> ± 15,26	31,49 <sup>c</sup> ± 13,74	100

Obsérvese que las letras iguales y del mismo color no presentan diferencias significativas, mientras que las letras diferentes y del mismo color presentan diferencias significativas.

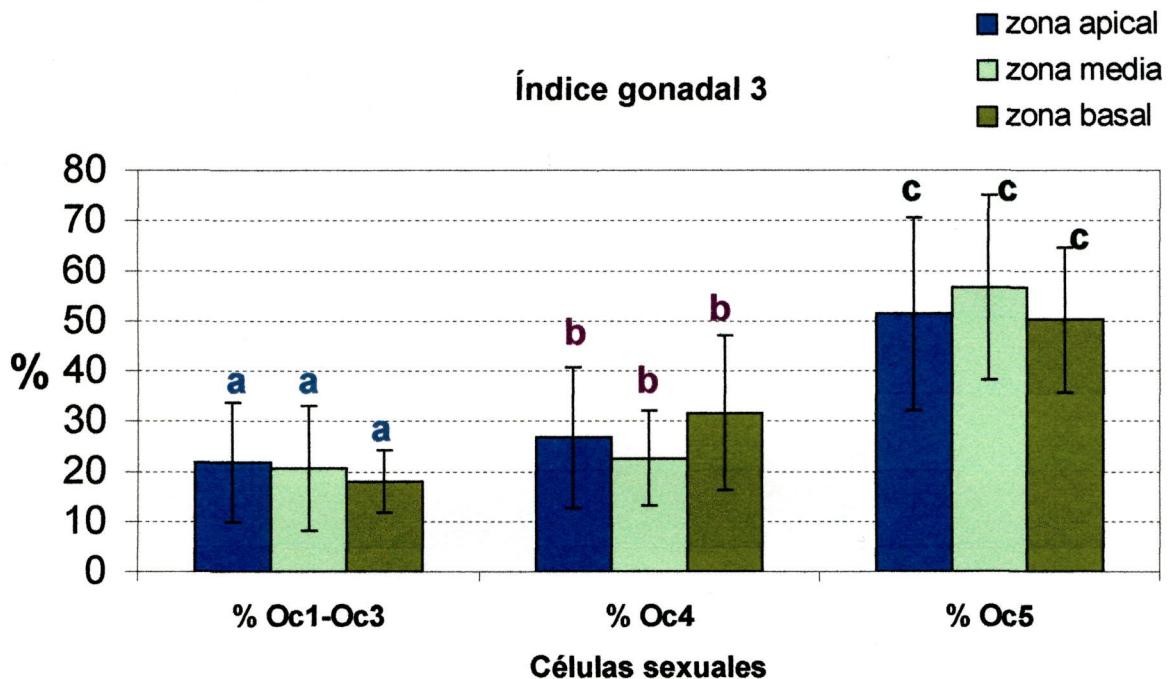
El análisis estadístico del índice gonadal 3 para cada zona de la gónada se presenta en la figura 25.

Se observa el mismo comportamiento que en el índice gonadal 2; No existen diferencias significativas (Tabla VII) ( $P < 0,05$ ) en la presencia de las diferentes células sexuales para cada una de las zonas de la gónada.

Tabla VII. Porcentajes de los grupos de células sexuales presentes en el índice gonadal 3 para cada zona de la gónada.

Zona gónada	N	Grupo I: Oc1-Oc3	Grupo II: Oc4	Grupo III: Oc5	Sumatoria
z. apical	34	21,83 <sup>a</sup> ± 11,91	26,76 <sup>b</sup> ± 14,07	51,41 <sup>c</sup> ± 19,26	100
z. media	34	20,70 <sup>a</sup> ± 12,42	22,60 <sup>b</sup> ± 9,48	56,68 <sup>c</sup> ± 18,31	100
z. basal	34	18,04 <sup>a</sup> ± 6,26	31,64 <sup>b</sup> ± 15,38	50,30 <sup>c</sup> ± 14,47	100

Obsérvese que las letras iguales y del mismo color no presentan diferencias significativas, mientras que las letras diferentes y del mismo color presentan diferencias significativas.



**Figura 25.** Grupo de células sexuales presentes (%) en las zonas representativas de la gónada para el índice gonadal 3. Obsérvese que las letras del mismo color e iguales no presentan diferencias significativas, mientras que las letras del mismo color y diferentes presentan diferencias significativas.

En la tabla VII se muestran los porcentajes y se observa que para una gónada de índice 3 los oocitos en desarrollo ( $Oc_1$ ,  $Oc_2$  y  $Oc_3$ ) presentan aproximadamente el 21% de las células presentes, mientras que los oocitos previos a la maduración ( $Oc_4$ ) presentan aproximadamente el 26% y por último los oocitos maduros ( $Oc_5$ ) el 53%.

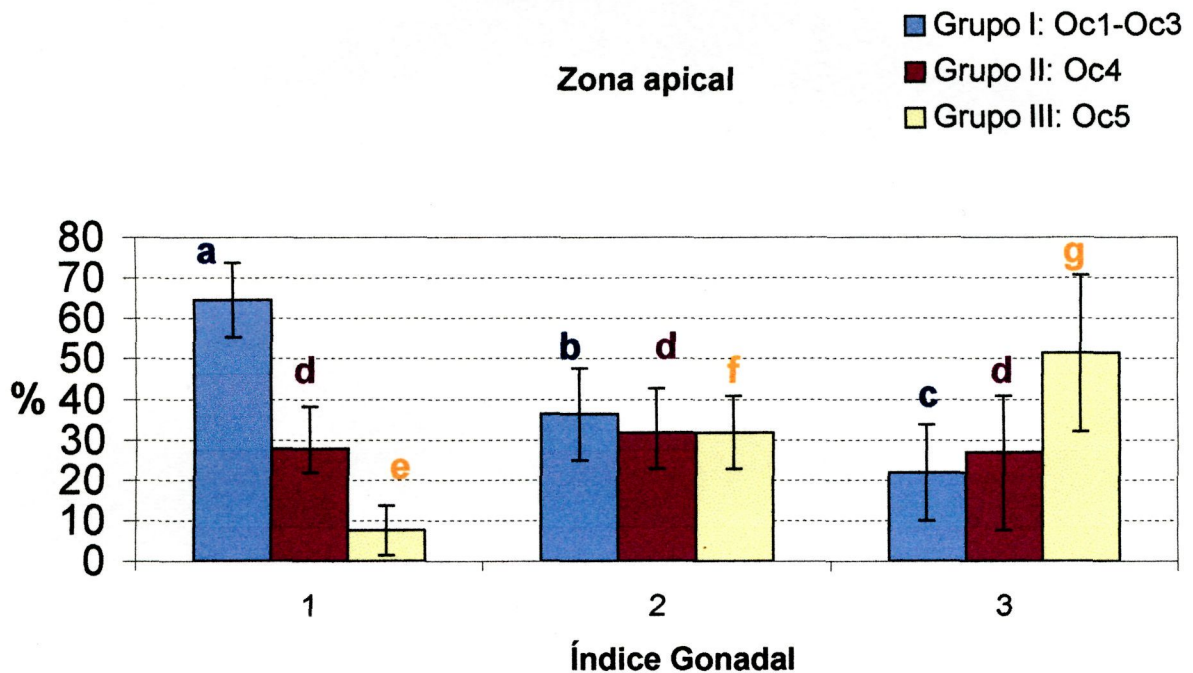
c) La distribución de oocitos para cada zona de la gónada en función del índice gonadal.

Un análisis más exhaustivo para la **zona apical** de la gónada, muestra que el grupo de células sexuales en desarrollo ( $Oc_1$ ;  $Oc_2$ ;  $Oc_3$ ) y maduras ( $Oc_5$ ) presentan diferencias significativas (Tabla VIII) ( $P < 0,05$ ) para cada nivel gonádal (figura 26). Se observa que los oocitos en desarrollo disminuye mientras que la cantidad de oocitos



maduros aumenta a medida que la gónada se desarrolla hasta alcanzar el estado de máxima madurez (figura 26).

De esta forma, cuando la gónada comienza a crecer (I.G. 1) las células predominantes son las del grupo I (Oc<sub>1</sub>; Oc<sub>2</sub>; Oc<sub>3</sub>) presentándose en un 64%, mientras que en las gónadas maduras (I.G. 3), las células mayoritarias son los Oc<sub>5</sub> en un 51% (Tabla VIII)



**Figura 26. Grupo de células sexuales presentes (%) en la zona apical de la gónada. Obsérvese que las barras del mismo color sin o con letra igual no presentan diferencias significativas, mientras que las barras del mismo color con letra diferente presentan diferencias significativas.**

En cambio, la proporción de Oc<sub>4</sub> no presentan diferencias significativas (Tabla VIII) ( $P > 0,05$ ) entre los diferentes índices gonadales observados macroscópicamente (figura 26). El porcentaje observado en los tres índices oscila entre un 31 y 36% (Tabla VIII).

Tabla VIII. Porcentajes de grupo de células sexuales en los diferentes índices gonadales observados macroscópicamente para la zona apical.

Índice	N	Grupo I: Oc1-Oc3	Grupo II: Oc4	Grupo III: Oc5	Sumatoria
1	13	64,5327 <sup>a</sup> ± 9,3	27,8849 <sup>d</sup> ± 9,1	7,58246 <sup>e</sup> ± 3,7	100
2	15	36,2602 <sup>b</sup> ± 11,3	31,8252 <sup>d</sup> ± 8,7	31,9146 <sup>f</sup> ± 8,3	100
3	12	21,8300 <sup>c</sup> ± 11,9	26,7604 <sup>d</sup> ± 10,4	51,4095 <sup>g</sup> ± 15,6	100

Obsérvese que las letras iguales y del mismo color no presentan diferencias significativas, mientras que las letras diferentes y del mismo color presentan diferencias significativas.

El análisis realizado para la zona media de la gónada, muestra un comportamiento diferente como se refleja en la figura 27.

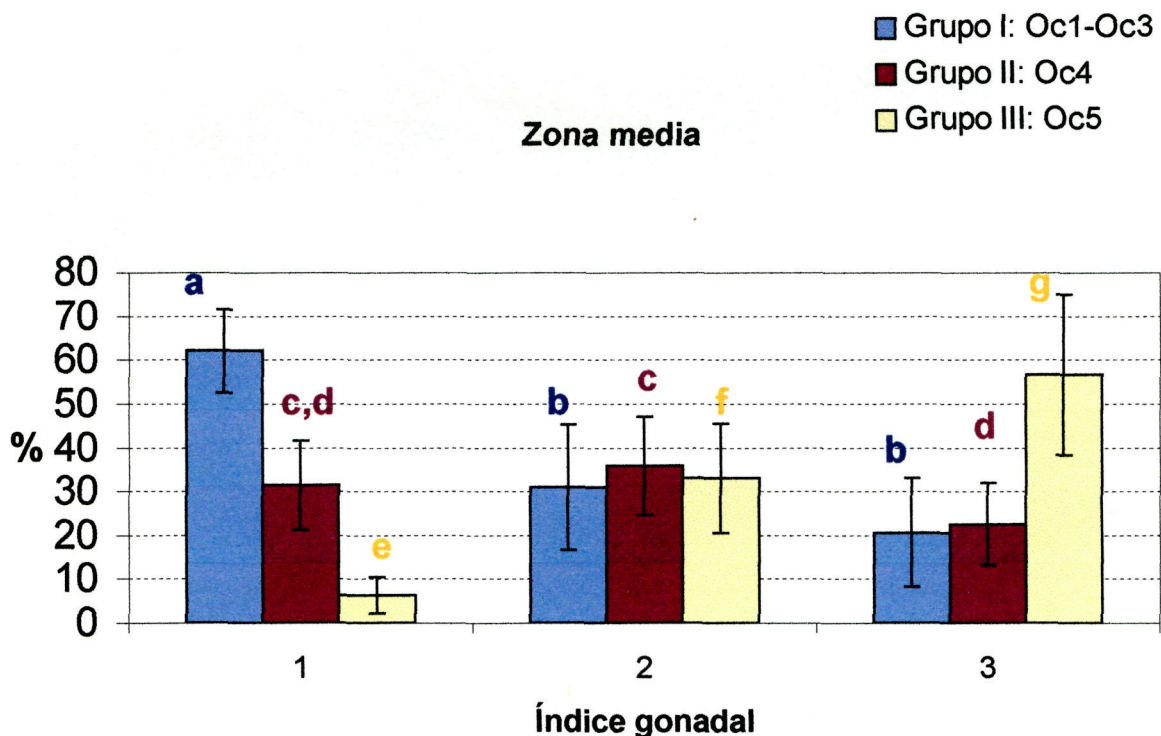


Figura 27. Grupo de células sexuales presentes (%) en la zona media de la gónada. Obsérvese que las barras del mismo color sin o con letra igual no presentan diferencias significativas, mientras que las barras del mismo color con letra diferente presentan diferencias significativas.

Las células sexuales en desarrollo (Oc<sub>1</sub>; Oc<sub>2</sub>; Oc<sub>3</sub>) presentan diferencias significativas entre el índice gonadal 1 y los índices 2 y 3 (P<0,05). Se observa que la gónada menos madura presenta un 62% de células del Grupo I y disminuye a valores entre un 20-31% cuando avanza el estado de madurez (Tabla IX).

**Tabla IX. Porcentajes de grupo de células sexuales en los diferentes índices gonadales observados macroscópicamente para la zona media.**

Índice	N	Grupo I: Oc1-Oc3	Grupo II: Oc4	Grupo III: Oc5	Sumatoria
1	13	62,1878 <sup>a</sup> ± 9,5	31,4914 <sup>c,d</sup> ± 10,1	6,32073 <sup>e</sup> ± 4,2	100
2	15	31,0622 <sup>b</sup> ± 14,3	35,8831 <sup>c</sup> ± 11,2	33,0547 <sup>f</sup> ± 8,3	100
3	12	20,7067 <sup>b</sup> ± 12,4	22,6086 <sup>d</sup> ± 9,4	56,6846 <sup>g</sup> ± 15,6	100

Obsérvese que las letras iguales y del mismo color no presentan diferencias significativas, mientras que las letras diferentes y del mismo color presentan diferencias significativas.

En cambio las células sexuales previas a la maduración (Oc<sub>4</sub>), no presentan diferencias significativas entre los índices gonadales 1 y 3 y entre los niveles 1 y 2 (Tabla IX) (P<0,05). La cantidad presente en los diferentes niveles oscila entre un 22-35% (Tabla IX).

Por último, las células sexuales maduras (Oc<sub>5</sub>) presentan diferencias significativas entre los tres índices gonadales (Tabla IX) (P<0,05). El máximo porcentaje se observa en la gónada madura (I.G.3) dispuesta para la puesta, representado el 56% de las células en este estado. Este porcentaje disminuye en las gónadas menos maduras (Tabla IX).

El análisis realizado en la **zona basal** de la gónada, presenta el mismo comportamiento que la zona apical. Como se muestra en la figura 28, las células sexuales en desarrollo (Oc<sub>1</sub>; Oc<sub>2</sub>; Oc<sub>3</sub>) presentan diferencias significativas entre los



diferentes índices gonadales, al igual que las células maduras (Oc<sub>5</sub>) (Tabla X) (P<0,05).

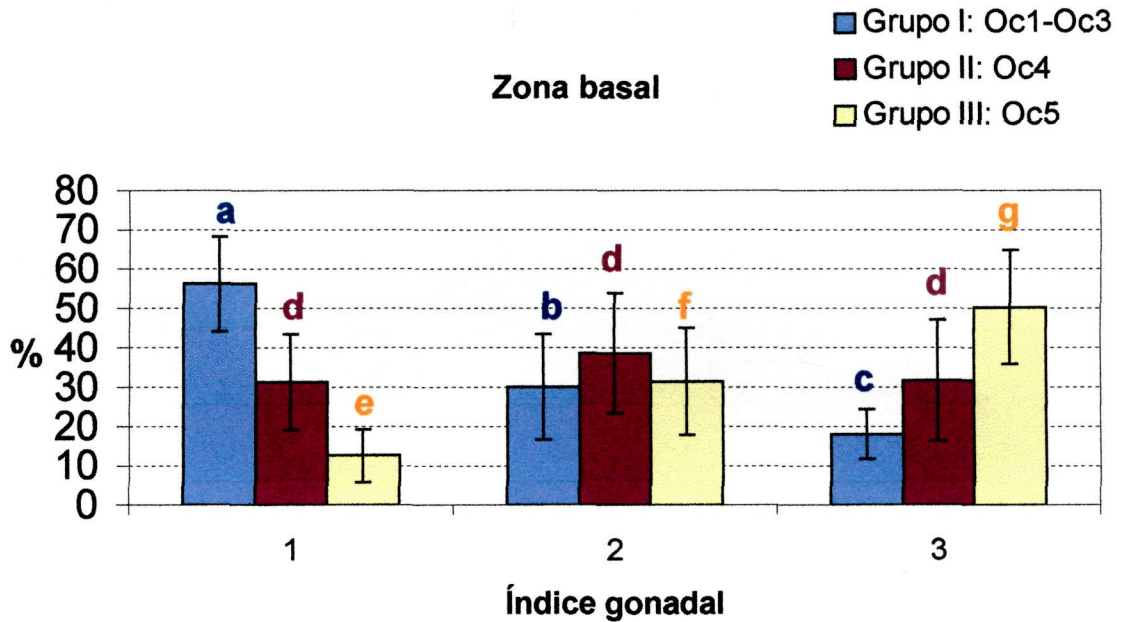


Figura 28. Grupo de células sexuales presentes (%) en la zona basal de la gónada. Obsérvese que las barras del mismo color sin o con letra igual no presentan diferencias significativas, mientras que las barras del mismo color con letra diferente presentan diferencias significativas.

A medida que la gónada crece y alcanza el estado de máxima madurez, el porcentaje de las células sexuales en desarrollo (Oc<sub>1</sub>; Oc<sub>2</sub>; Oc<sub>3</sub>) disminuye a la vez que aumenta el porcentaje de células sexuales maduras (Oc<sub>5</sub>) (Tabla X).

Tabla X. Porcentajes de grupo de células sexuales en los diferentes índices gonadales observados macroscópicamente para la zona basal.

Índice	N	Grupo I: Oc1-Oc3	Grupo II: Oc4	Grupo III: Oc5	Sumatoria
1	13	56,253 <sup>a</sup> ± 12,0	31,144 <sup>d</sup> ± 12,2	12,602 <sup>e</sup> ± 06,6	100
2	15	29,924 <sup>b</sup> ± 13,4	38,581 <sup>d</sup> ± 15,2	31,495 <sup>f</sup> ± 13,7	100
3	10	18,047 <sup>c</sup> ± 06,2	31,645 <sup>d</sup> ± 15,4	50,307 <sup>g</sup> ± 14,4	100

Obsérvese que las letras iguales y del mismo color no presentan diferencias significativas, mientras que las letras diferentes y del mismo color presentan diferencias significativas.

En cambio, las células sexuales previas a la maduración (Oc<sub>4</sub>), no presentan diferencias significativas en los diferentes índices gonadales (Tabla X) (P<0,05). El porcentaje en el desarrollo de la gónada oscila entre un 31-38% del total de células presentes (Tabla X).

### 3.2. ESTUDIO DE LA FECUNDIDAD

El estudio de fecundidad potencial se realizó atendiendo a la longitud de la concha de hembras clasificadas en tres rangos de talla (Tabla II). Todas se encontraban en estado de prepuesta (I.G. 3).

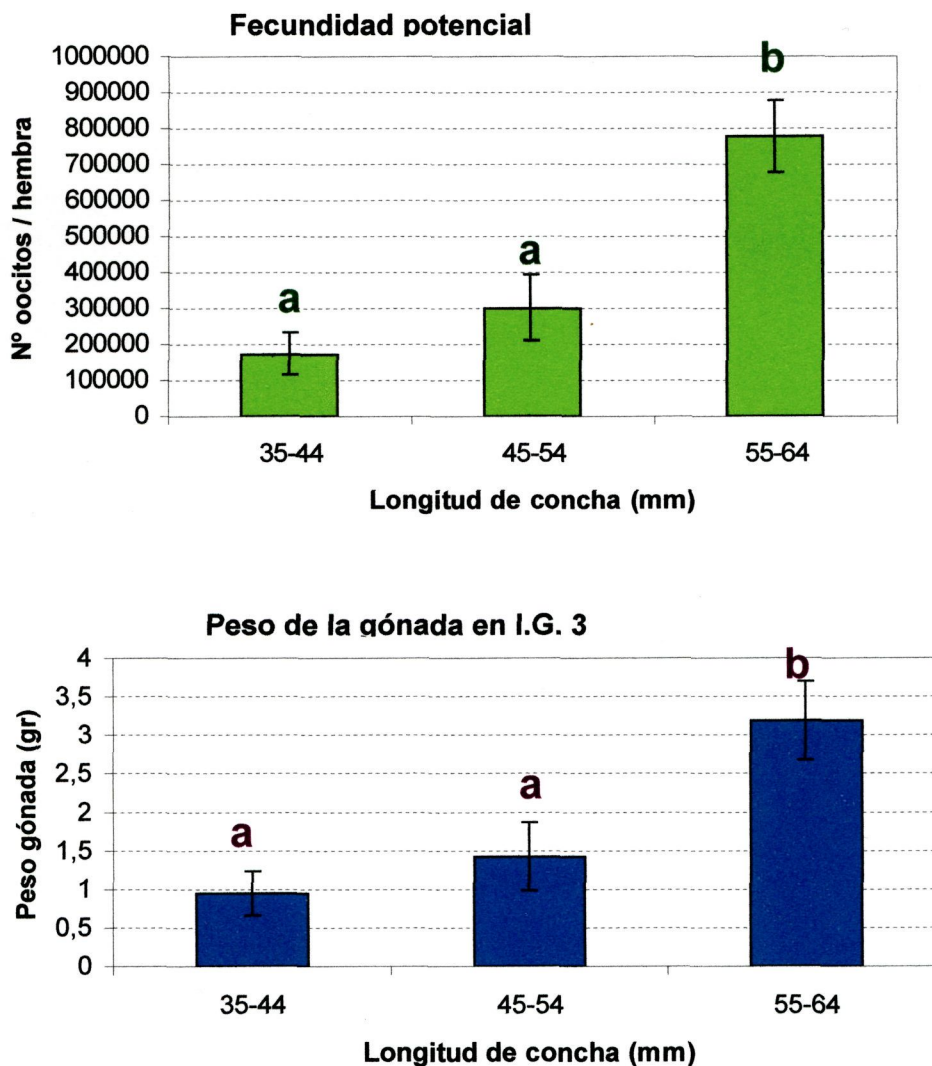


Figura 29. Fecundidad potencial y peso del apéndice conical (I.G, 3) para cada rango de Talla.

Los resultados obtenidos muestran que existe una correlación positiva entre la fecundidad potencial y la talla del animal y entre el peso del apéndice conical en índice gonadal 3 y la talla (figura 29).

El análisis estadístico nos muestra que la fecundidad potencial no presenta diferencias significativas  $173.720 \pm 57.162$  oocitos y  $301.565 \pm 90.196$  oocitos ( $P < 0,05$ ) entre los dos primeros rangos de talla, mientras que éstos sí difieren con el rango de talla mayor (55-64mm) (Tabla XI). Lo mismo ocurre con el peso del apéndice conical en estado de prepuesta; Se observa que los dos primeros rangos de talla no presentan diferencias significativas (Tabla XI) ( $P < 0,05$ ), y en cambio si existen diferencias significativas con el último rango (Tabla XI) ( $P < 0,05$ ).

**Tabla XI. Fecundidad potencial y peso del apéndice conical para cada rango de Talla.**

Talla (mm)	N	FECUNDIDAD POTENCIAL (oocitos totales)	PESO APÉNDICE CONICAL (gr)
35-44	4	$173.720^a \pm 57.162$	$0,943^a \pm 0,288$
45-54	4	$301.565^a \pm 90.196$	$1,421^a \pm 0,443$
55-64	4	$776.678^b \pm 99.035$	$3,189^b \pm 0,508$

Obsérvese que las letras iguales y del mismo color no presentan diferencias significativas, mientras que las letras diferentes y del mismo color presentan diferencias significativas.

Con el fin de observar la función matemática a la cual se aproximan las relaciones entre fecundidad potencial, longitud de la concha y el peso del apéndice conical (I.G. 3), se procedió al análisis de correlaciones (figura 30).

Se observa en la figura 30 (A), que la fecundidad potencial está fuertemente relacionada con la longitud de la concha de forma lineal (Coeficiente de correlación 0,99). La misma relación se encuentra entre el peso de apéndice conical y la



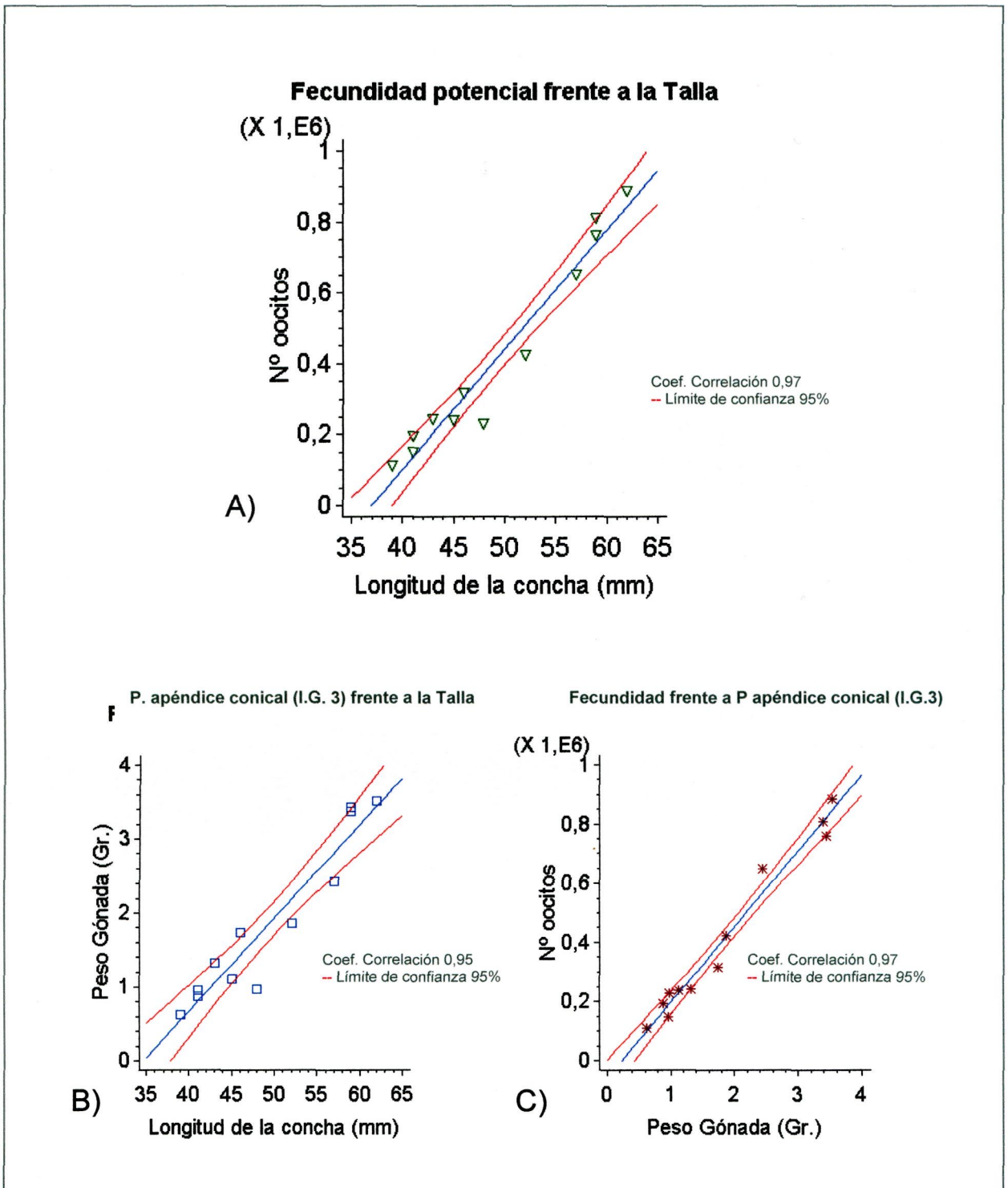


Figura 30. Correlaciones entre la Fecundidad potencial, Talla del animal y Peso del apéndice conical (I.G. 3). Gráfica A) Relación exponencial entre la Fecundidad potencial y la Longitud de la concha; B) Relación lineal entre la fecundidad potencial y el Peso del apéndice conical en índice gonadal 3; C) Relación exponencial entre el Peso del apéndice conical en índice gonadal 3 y la Longitud de la concha. Obsérvese que la línea roja indica el límite de confianza, es decir cualquier valor que se encuentre dentro de este rango en un 95% cumple la función exponencial con un Coeficiente de Correlación (Coef. Correlación) indicado en la gráfica.



longitud de la concha (Coeficiente de correlación 0,99) (figura 30 (B)), de esta forma, a medida que crece el animal, la fecundidad potencial y el peso del apéndice conical aumentan de forma lineal, para un rango de Talla entre 40-60,5 mm.

La relación entre la fecundidad potencial y el peso del apéndice conical también es lineal con un coeficiente de correlación del 0,97 (figura 30 (C)), es decir a medida que crece la gónada contiene mayor número de oocitos.

Las funciones de las relaciones entre Fecundidad potencial, Talla del animal y Peso del apéndice conical, se muestran a continuación:

$$\text{FECUNDIDAD POTENCIAL} = -1,2348E^6 + 33665 * \text{talla (mm)}$$

$$\text{PESO APÉNDICE CONICAL} = - 4,36084 + 0,125922 * \text{talla (mm)}$$

$$\text{FECUNDIDAD POTENCIAL} = -76236,8 + 266601 * \text{peso apéndice conical (gr)}$$

## **DISCUSIÓN**

### **Estudio histológico:**

En 1985 Peña sugiere el potencial acuícola que presenta la almeja canaria a partir de experiencias realizadas en la inducción al desove con hidrógeno de peróxido. Este hecho queda reflejado más recientemente por Viera et al, 2003. Llegados a este punto, como se hizo para otras especies de abalón, el conocimiento de la biología reproductiva es necesario con el propósito de conocer el ciclo reproductor de cara a aumentar la eficiencia de los desoves inducidos.

Crofts, en 1929, fue el primer investigador que estudió las características morfológicas de la gónada del abalón, concretamente para *H. tuberculata* L, identificando la trabícula a partir de la cual, se desarrollan las células sexuales. Más recientemente, en todos los estudios realizados para diferentes especies se confirma un patrón similar. En cambio, existe controversia en cuanto a la clasificación de las células sexuales en el proceso oogénico. Tomita (1969) clasifica estas células en 7 estados (oogonias y 6 estados de oocitos) para *H. discus hannai*, basados principalmente en el tamaño y las características morfológicas. Por otro lado, Takashima (1978), considera para *H. diversicolor*, 9 estados de células sexuales femeninas y Young y DeMartini (1970) sugiere solamente 4 estados para *H. rufescens*.

Para *H. tuberculata coccinea* R, hemos encontrado seis estados de células sexuales femeninas, atendiendo a los cambios morfológicos observados en las mismas (oogonias y cinco estados de oocitos). Las pautas entre estos estados se pueden resumir de la siguiente forma:

- 1) Aparición del nucleolo
- 2) Definición de la membrana nuclear
- 3) Presencia de vacuolas lipídicas

- 4) Aparición de vacuolas de vitelo
- 5) Agrupación de las vacuolas de vitelo.

Las **oogonias** se encuentran fuertemente adheridas a la trabícula. Son células germinales encargadas de la restauración de la gónada formándose para contrarrestar las células maduras liberados en la puesta.

Durante el desarrollo de los oocitos en estado uno (**Oc<sub>1</sub>**), la membrana nuclear aparece difusa y el citoplasma es basófilo, posiblemente debido a un aumento de la cantidad de ribosomas (encargados de la síntesis de proteínas de vitelo) (Sobhon et al, 1999).

En los oocitos en estado dos (**Oc<sub>2</sub>**) aparecen por primera vez las vacuolas lipídicas en el citoplasma como fuente de reserva de energía necesaria en el desarrollo del embrión.

En los oocitos en estado (**Oc<sub>3</sub>**) aparecen por primera vez las vacuolas de vitelo, como consecuencia de la actividad de síntesis durante los estados de **Oc<sub>1</sub>** y **Oc<sub>2</sub>** (Sobhon et al, 1999).

En los oocitos en estado cuatro (**Oc<sub>4</sub>**) se produce un engrosamiento de la envoltura celular, y comienza a desarrollarse el corión. Por otro lado, se observa la tendencia del desplazamiento de los gránulos basófilos hacia la periferia de la célula, posiblemente debido a la rotura de la mayoría de los ribosomas y a la regeneración de la masa residual (Sobhon et al., 1999)

Por último, los oocitos en estado cinco (**Oc<sub>5</sub>**) aparecen desplazados hacia el interior de cada compartimento entre dos trabículas. Estos oocitos son previos a la emisión de gametos en la reproducción y dentro del proceso oogénico es la célula que presenta máxima madurez. Las vacuolas de vitelo aparecen agrupadas en bandas,

posiblemente debido a la fusión de las mismas al incrementar en número del estado Oc<sub>3</sub> al Oc<sub>4</sub>, como consecuencia también desplazarían a las vacuolas lipídicas.

Esta clasificación divide el proceso oogénico de forma similar a la clasificación realizada por Apisewatakan en 1997 para *H. asinina*, exceptuando la composición de la envoltura celular, el modo de agruparse las vacuolas de vitelo en los Oc<sub>5</sub>, y la presencia del número de nucleolos presentes en el núcleo. La envoltura celular para *H. tuberculata coccinea* no se tiñe positivamente con la reacción del ácido Peryódico – reactivo de schiff (PAS), lo que implica que los carbohidratos no son su constituyente mayoritario.

En 1997, Apisewatakan et al. sugieren que la clasificación de los estados de oocitos se debe atender fundamentalmente a los cambios morfológicos más que al tamaño de las células observadas. Nosotros estamos de acuerdo con este criterio ya que en muchos casos, es imposible la asignación de una figura geométrica establecida para cada estado de madurez. Esto es debido a la orientación tridimensional de las células respecto a la trabícula, a la acumulación de las mismas a medida que crece la gónada y sobre todo a la orientación de los cortes histológicos. De esta forma, a diferencia de la práctica habitual en este tipo de estudios, la asignación del tamaño para cada estado, consideramos determinarla en nuestro estudio, indicando la longitud y la anchura de la célula (figura 15), exceptuando a las oogonias (de forma esférica) y a los oocitos en estado cinco (independientes de la trabícula).

Como consecuencia, hemos considerado adecuado realizar la determinación del estado de madurez del animal a escala histológica, determinando el porcentaje de los diferentes oocitos en la gónada en lugar de estimar el diámetro de las células como sugieren Hayashi (1980) para *H. tuberculata* y Hanh (1992) para todas las especies de abalón.

Siguiendo este criterio, el examen histológico de las gónadas ha revelado que en general, la cantidad de oocitos presentes en los diferentes estados gonadales sigue el patrón reflejado en la figura 22, donde a medida que madura la gónada el porcentaje de células sexuales en desarrollo ( $Oc_1$ ;  $Oc_2$  y  $Oc_3$ ) disminuye a la vez que aumenta el de células maduras ( $Oc_5$ ), mientras que los oocitos previos a la maduración ( $Oc_4$ ), se mantienen constantes. Así mismo, el índice gonadal 2 (estado intermedio) presenta porcentajes similares en los diferentes estadios de oocitos.

Este hecho también se refleja en el análisis histológico de oocitos para las zonas apical y basal de la gónada en función del índice gonadal (figuras 26 y 28). En cambio la zona media presenta el mismo número de oocitos en desarrollo ( $Oc_1$ ;  $Oc_2$  y  $Oc_3$ ) entre los índices gonadales 2 y 3 (figura 27); estos resultados nos sugieren el patrón de crecimiento de la gónada. De acuerdo con el crecimiento del apéndice conical observado macroscópicamente, en el paso del índice 1 al 2, la gónada crecería tanto en sentido longitudinal como transversal, mientras que del paso 2 al 3, cuando ha alcanzado ya su máxima longitud, tendería a hacerlo únicamente en grosor. Esto implicaría que la zona apical del índice gonadal 1 pasaría a ser parte de la zona media del índice gonadal 2, mientras que las zonas medias entre los índices 2 y 3 serían las mismas. En este sentido, el patrón de crecimiento de la gónada podría esclarecerse añadiendo análisis histológicos de cortes longitudinales del apéndice conical a los realizados.

El análisis, de la distribución de los diferentes tipos de oocitos en una gónada en estado de máxima madurez (I.G.3) muestra que contiene diferentes estados de oocitos (figura 22), hecho que sugiere que la gametogénesis para *H. tuberculata coccinea* R es continúa. Esta situación de acuerdo con lo observado por Capinpin et al. (1998) para la especie tropical, *H. asinina*, sugiere que la almeja canaria efectúa diversos actos

simples de desove durante el periodo de puesta, por lo que se trataría de una especie heterocrona o reproductora parcial (realiza la puesta fraccionada, seriada o múltiple), sin que podamos estimar, por ahora, ni el número de actos de puesta al año ni la periodicidad de los mismos. De esta forma, tras el desove, el proceso oogénico continuaría desarrollándose a partir de los oocitos no maduros y sugerimos que no se produciría una reabsorción total de la gónada, sabiendo que lo hemos observado al nivel macroscópico después de desoves inducidos artificialmente en el Instituto Canario de Ciencias Marinas. Este hecho está en desacuerdo con lo propuesto, por Espino y Herrera (2002) a partir de un estudio de seguimiento de poblaciones naturales de la almeja canaria, que sugieren que las puestas se realizan de forma sincrónica una vez al año (entre los meses de Febrero y Junio).

Por último, en lo referente al estudio histológico de la gónada por índices en función de las zonas (figuras 23, 24 y 25), se repite un patrón general lo que sugiere que la gónada es homogénea en cuanto a distribución de oocitos, como ocurre en *H. asinina* (Jebreen et al. 2000). Sin embargo, cabe destacar que en el índice gonadal 1 (Tabla V) el porcentaje de oocitos en estado cinco varía entre valores de un 1,5 a un 13,5%; estas diferencias nos sugieren que para este índice, a escala macroscópica pueden solaparse dos estados de madurez gonadales, mientras que a escala microscópica quedan reflejados; Este estado consideraría animales posteriores a la puesta. En la bibliografía existen diferentes clasificaciones referentes a la maduración de la gónada a lo largo del ciclo reproductivo; Tomita (1967) define para *H. discus hannai* (especie de una puesta sincrónica durante los meses de Septiembre y Octubre (Booolootian et al, 1962)) cinco estados en los que se incluye la reabsorción total de la gónada; Capinpin et al. (1998) en cambio, define 6 estados para *H. asinina* (especie que desova durante todo el año excepto en verano (Jarayabhand y Paphavasit, 1996))



e incluye el estado de “spent” posterior al estado “partly spawned”; En este estado observa que la gónada disminuye considerablemente en tamaño pudiendo contener algunos oocitos maduros (denominados residuales). Estas observaciones junto a la sugerencia que la almeja es una especie heterocrona refleja que efectivamente, se *tendría que considerar un estado más de madurez gonadal que índice el periodo entre la puesta y la maduración de la gónada.*

Por otra parte, la determinación de madurez mediante el método del índice gonadal (método visual), es en cierta manera subjetiva y para el caso de la almeja canaria, se desconoce el tamaño máximo que pueda alcanzar la gónada justo antes de la *puesta natural*. En este sentido, el análisis histológico de la gónada en nivel 3 (figura 18) muestra entre un 41 a 67% de oocitos en estado cinco (totalmente maduros) y entre un 16 a 36% de oocitos en estado cuatro (previos a la maduración), este hecho nos sugiere o bien, que parte de estos oocitos en estado cuatro se transformarán a oocitos en estado cinco cuando se establecen las condiciones idóneas para la puesta, o que no se haya considerado el volumen máximo de la gónada previo al desove en la selección de hembras para el experimento.

Para obtener información sobre las cuestiones referidas al ciclo reproductivo, estado de madurez y volumen de la gónada máximo, habría que proceder a la estabulación individual de hembras adultas en tanques de mantenimiento de reproductores asumiendo que el factor cautividad no introduce excesivas distorsiones en el comportamiento reproductivo de esta especie.

### **Estudio de la fecundidad:**

La talla máxima que alcanza esta especie en Canarias es entorno a 70mm en longitud de concha y las observaciones realizadas por Espino y Herrera (2002) muestran que la talla de primera madurez sexual, en la naturaleza, se produce cuando el animal presenta 30mm en longitud de la concha, aunque en condiciones de cultivo hemos observado animales de 22cm diferenciados, seguramente debido a la continua disponibilidad de alimento (Hanh, 1989)

En el presente estudio hemos encontrado que la fecundidad potencial sigue una relación lineal respecto a la longitud de la concha (coeficiente de correlación 0,97), de acuerdo con lo encontrado por Litaay y DeSilva (2003) para *H. rubra*, mientras que para otras especies de abalón, entre las que se incluyen *H. tuberculata* L. esta relación es exponencial (Hayashi, 1980). De esta forma, a medida que crece el animal el número de oocitos presentes en la gónada aumentan si bien, existe una diferencia significativa (figura 29) entre 35-44mm y 55-64mm de longitud de concha, en la cantidad de los mismos. Este hecho nos sugiere que la talla para considerar una hembra de *H. tuberculata coccinea* reproductora, es a partir de los 55mm en longitud de concha.

Considerando la talla máxima y de la primera madurez sexual, junto a los resultados obtenidos en este estudio, corroboran el dato que a partir de los 55mm en longitud de concha, el animal entra en la fase estacionaria del crecimiento, donde el metabolismo se reorienta hacia el aumento de la actividad gonadal en oposición al crecimiento somático observado en los dos primeros rangos de talla considerados para este estudio. Esta conclusión tiene aplicabilidad en sistemas de cultivo, en el hecho que, la investigación, en cuanto a aclimatación de reproductores se refiere, pueden orientarse a partir de tallas de 55mm en longitud de concha.

Si bien, los resultados obtenidos en la fecundidad potencial (Tabla IX) para esta especie son menores que en otras especies de abalón, como *H. rubra* que alcanza una talla máxima de 19cm y una hembra de 12-14.5 cm de longitud y 147-487g de peso corporal posee una fecundidad potencial de 1,09 a 7,5 millones de oocitos (Litaay y DeSilva, 2003) los resultados obtenidos para la almeja canaria con una talla máxima entorno a 7cm, son alentadores para su introducción en acuicultura, considerando que una hembra de 55-64mm de longitud y 27-38g de peso corporal posee una fecundidad potencial de 776.678 oocitos  $\pm$  99.035 ( $P < 0,05$ ).

Comparando los resultados de fecundidad potencial obtenidos con los de fecundidad real (número de oocitos expulsados en la puesta) realizados por Peña (1985) y Viera et al. (2003), constatamos que la fecundidad real es más pequeña que la fecundidad potencial en índices gonadales 3, debido a que una gónada madura contiene todos los estados de madurez de oocitos (resultado obtenido en este estudio), y en una puesta natural sólo son emitidos los oocitos en estado cinco, aunque pueda darse el caso en desoves inducidos, debido a la intensidad del estímulo, la emisión de parte de los oocitos en estado cuatro en forma de agregaciones, (FAO, 1990).

Peña (1985) estima una relación exponencial entre la fecundidad real y la longitud de la concha para la almeja canaria, utilizando hembras con tallas máximas de 49mm y considera que la fecundidad para esta especie es pequeña respecto a otras especies de abalón (estima que una hembra de 47.5 mm de longitud desova 56000 oocitos). Más recientemente Viera et al. (2003) estiman una fecundidad real para tallas entre 36-49 mm de longitud de concha de 48.400 oocitos por hembra y para tallas comprendidas entre 51-71mm de 87.000 oocitos por hembra, estos datos reflejan el incremento brusco, observado en este estudio, en la cantidad de oocitos para diferentes rangos de tallas.

La fecundidad real de la almeja canaria comparándola con otras especies de tamaño similar, como es el caso de *H. asinina*, es mucho menor (Capinpin et al, 1998) (87.000 oocitos para tallas comprendidas entre 51-71mm frente a 150.000-600.000 oocitos para tallas comprendidas entre 58,1-69mm. respectivamente). Las experiencias de acondicionamiento de stock de reproductores en torno a tallas de 55mm de longitud de concha, pueden resultar en un aumento de esta fecundidad, como se ha constatado en otras especies de abalón. Estas experiencias se basarían principalmente en la modificación del fotoperíodo y en la determinación de la temperatura idónea para el desarrollo de las gónadas (Fleming, 2002). En especies de aguas templadas, como es el caso de *H. tuberculata* L, y *H. discus hannai*, la temperatura se aumenta hasta 18°C y se mantiene constante resultando de esta variación, puestas de mejor calidad (Moylan y Mercer, 1993), en cambio para el caso de especies tropicales, (*H. asinina*) la temperatura se mantiene a 30°C (Sawatpeera et al. 2001), cabría determinar la temperatura idónea para la especie subtropical *H. tuberculata coccinea*.

## **CONCLUSIONES**

## CONCLUSIONES

1. El proceso oogénico para el *Haliotis tuberculata coccinea* R se puede dividir en seis estados (oogonias y cinco estados de oocitos) en función a los cambios morfológicos que presentan las células.
2. Debido a la multitud de formas posibles de las células en los cortes, la determinación del tamaño de los Oc<sub>1</sub>, Oc<sub>2</sub>, Oc<sub>3</sub> y Oc<sub>4</sub> se sugiere realizarla indicando la altura y anchura de la célula. De esta forma, el porcentaje de estados de oocitos presentes en la gónada, se recomienda realizarla por identificación de los mismos, más que por tamaño debido a la imposibilidad de asignar figuras geométricas establecidas a las células.
3. A medida que madura la gónada, el porcentaje de los oocitos en desarrollo (Oc<sub>1</sub>, Oc<sub>2</sub> y Oc<sub>3</sub>) disminuye mientras que los oocitos maduros (Oc<sub>5</sub>) aumentan; manteniéndose constantes la cantidad de Oc<sub>4</sub>.
4. La misma cantidad de oocitos en desarrollo (Oc<sub>1</sub>, Oc<sub>2</sub> y Oc<sub>3</sub>) entre los índices gonadales 2 y 3, sugiere que la gónada comienza creciendo en sentido longitudinal y transversal hasta llegar a su máxima longitud, donde tendería a hacerlo sólo transversalmente.
5. La presencia de todos los estados de oocitos en una gónada madura (estado de prepuesta) sugiere que la gametogénesis para el *H. tuberculata coccinea* R es continua.
6. La distribución de oocitos en toda la gónada es homogénea, puesto que se repite el mismo patrón de distribución en cada una de las zonas consideradas para cada índice gonadal.



7. La variación de un 1,5 a un 13,5% de oocitos maduros en gónadas inmaduras de índice 1, sugiere la existencia de un estado pospuesta no diferenciable macroscópicamente del índice 1.

8. Los estudios de fecundidad muestran que existe una relación lineal entre la talla del animal y el número de oocitos presentes en la gónada.

9. El número de oocitos, significativamente más alto, para hembras de rango de talla 55-65mm, sugiere que las hembras a partir de esta talla, serían las adecuadas para su uso como reproductores.

10. La fecundidad potencial absoluta de la almeja canaria es menor que en otras especies de abalón, sin embargo si se refiere al peso del animal la fecundidad potencial se puede considerar alta.

11. El *H. tuberculata coccinea* R parece tener un comportamiento similar al *H. asinina* L (especie tropical, que también puede habitar en zonas subtropicales) en cuanto a la reproducción.

12. Como continuación de este estudio preliminar, pretendemos realizar la caracterización histológica tanto de poblaciones naturales como en cautividad a lo largo un ciclo anual, que nos permita conocer el ciclo reproductor de esta especie con el fin de programar las futuras actividades de producción.

## **BIBLIOGRAFÍA**

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASPISAWETAKAN, S; CHANPOO, M.; WANICHANON, C.; LINTHONG, V.; KRUATRACHUE, M.; SUCHART, E.; PUMTHONG, T; SOBHON P. 1997. The gametogenic processes in a tropical abalone, *Haliotis asinina* Linnaeus. J. Sci. Soc. Thailand. 23, 225-240.

BELASKO, A. 2002. Mejora en el cultivo de *Haliotis tuberculata coccinea* R. Informe presentado al Instituto de Ciencias Marinas de Canarias (España). No publicado, pp 49.

BOC- 2001/097- Miércoles 1 de Agosto de 2001- 01107. Real Decreto 151/2001, de 23 de julio, por el que se elabora el Catálogo de Especies Amenazadas de Canarias (Consejería de Política Territorial y Medio Ambiente)

BOOLOOTIAN, R. A.; FARMANFARMAIAN, A.; GIESE, A.C. 1962. On the reproductive cycle and breeding habits of two western species of *Haliotis*, Biol. Bull. 122, 183-190.

BUSSARAWIT, S.; KAWINTERTWATHANA, P.; NATEEWATHANA, A. 1990. Preliminary study on reproductive biology of the abalone *Haliotis varia* at Phuket, Andaman Sea Coast of Thailand. Kasetsart J. Nat. Sci. 24, 529-539.

CAPINPIN E; ENCENA, V; BAYONA, N. 1998. Studies on the reproductive biology of the Donkey's ear abalone, *Haliotis asinina* Linné. Aquaculture. 166, 141-150.

CHANPOO, M.; APISEWATAKAN, S; THONGKUKIATKUL, C; WANICHANON, C; LINTHONG, V; KRUAETRACHUE, M; UPATHAN E; PUMTHONG, T; HANNA, P; SOBHON, P. 2001. Localization of egg-laying hormone in the gonads of a tropical abalone, *Haliotis asinina* Linnaeus. Journal of Shellfish Research, 20(2), 725-731.

CLAVIER, J. 1992. Fecundity and optimal sperm density for fertilization in the omer (*Haliotis tuberculata* L.) In: Guzman del Proo, S.A., Tegner, M.J., Shepherd, S.A. (Eds.), Abalone of the World. Fish. Rep. Dep. Fish. 24, Adelaide (Aust.), p86-92.

CLAVIER, J. 1992. The omer (*Haliotis tuberculata* L.) fishery of France and Chanel Islands. In: Guzman del Proo, S.A., Tegner, M.J., Shepherd, S.A. (Eds.), Abalone of the World. Fish. Rep. Dep. Fish. 24, Adelaide (Aust.), p 86-92.

COCHARD, J.C., 1980. Recherches sur les facteurs determinant la sexualité et la reproduction chez *Haliotis tuberculata* L. Translated from French in Can. Transl. Fish. aquat. Sci. (4946), 162.

COHEN, I.; NEORI, A. 1991. Ulva lactua biofilters for marine fishponds effluents. I. Amomonía uptake kinetics and Nitrogen content. Botánica Marina, 34, 475-482.

COX, K.W. 1960. Review of the abalone of California. Calif Fish Game, 46, 381-406.

CROFTS, D.R. (1929) *Haliotis*. Liverpool Mar. Biol. Comm. Mem. Liverpool University Press, Vol. 29, 1-174.



ESPINO, F; HERRERA, R. 2002. Seguimiento de poblaciones de especies amenazadas 2002 (*Haliotis tuberculata coccinea*, Nordsieck,1975) Gran Canaria. Informe final presentado por Gesplan y la Consejería de Política territorial y Medio Ambiente (Viceconsejería de Medio ambiente de Gran Canaria y Dirección General de Política Ambiental). Informe no publicado. 52pp.

ERBERT, E.; HOUK, L. 1984. Elements and innovations in the cultivation of red abalone *Haliotis rufescens*. *Aquaculture*. 39, 375-392.

FAO, 1990. Training Manual on Artificial Breeding of Abalone (*Haliotis discus hannai*) in Korea DPR. *Technical Review*, 7, pp 81.

FAO, 1995. Synopsis of biological data on the european abalone (ormer), *Haliotis tuberculata* Linnaeus, 1758 (Gastropoda: Haliotidae). *Fisheries Synopsis No. 156 FIR/S156*, pp 27.

FISCHTECK. Consultora especialista en el cultivo de abalón (Australia). (<http://www.FISCHTECK.com>).

FISHERIES & OCEANS, Canada. 2002. National Recovery Plan for Northern Abalone of British Columbia, ([oceanlink. Island.net/ abaloneproyect/ Abalone% 20 Survey %20Report%20Final.pdf](http://oceanlink.island.net/abaloneproyect/Abalone%20Survey%20Report%20Final.pdf)) 31pp

FLEMING, A.; VAN BARNEVELD, R.; HONE, P. 1996. The development of artificial diets for abalone: A review and future directions. *Aquaculture Production: 1984-1995*. (<http://www.frdc.com.au/research/programs/aas/pub/> )

FLEMING, A., 2002. Conditioning Australian Abalone Broodstock. Best practice manual. (<http://www.frdc.com.au/research/programs/aas/pub/> ), 40pp.

FRANQUET, F; BRITO, A. 1995. Especies de interés pesquero de Canarias. Ed. Gobierno de Canarias. Consejería de Pesca y transportes. 143pp.



GEIGER, 1998. Recent Genera and species of the family Haliotidae Rafinesque 1815 (Gastropoda: Vetigastropoda). *The Nautilus* 111(3), 85-116

GEIGER, 2000. Distribution and Biogeography of the recent Haliotidae World Wide. *Bulletino Malacologico* 35 (5/12): 57-118pp

GIRARD, A., 1972. La reproduction de l'ormeau, *Haliotis tuberculata* L. *Rev. Trav. Inst. Pêches marit.*, 36 (2), 163-184.

GONZÁLEZ, J.; LOZANO, I.; HERNÁNDEZ-CRUZ, C. 1993. Fecundidad de *Sparisoma (Euscarus) cretense* (L.) (Osteichthyes, Scaridae) en Canarias. *Bol. Inst Esp Oceanogr.* 9, 123-31.

GORDON, R. y COOK, P. 2001. World abalone supply, markets and pricing: historical, current and future. *Journal of Shellfish Research*, 20 (2), 567-570.

HANH, K.O., 1989. Gonad reproductive cycles of abalone. In: K.O. Hanh (Ed.), *Handbook of culture of Abalone an other Gastropods*. CRC Press, Boca Raton, FL, 13-39 pp.

HANH, K.O. 1992. Review of endocrine regulation of reproduction in abalone *Haliotis spp.* In: Guzman del Proo, S.A., Tegner, M.J., Shepherd, S.A. (Eds.), *Abalone of the World*. Fish. Rep. Dep. Fish. 24, Adelaide (Aust.), 49-56.

HAYASHI, I., 1980. The reproductive biology of the ormer, *Haliotis tuberculata*. *F. Mar. Biol. Ass. U.K.*, 60, 415-430.

HORIGUCHI, T. 2000. Ovo-testis and disturbed reproductive cycle in the giant abalone, *Haliotis madaka*: posible linkage with organotin contamination in a site of population declibe. *Marine Environmental Research* 50, 223-229.

JARAYABHAND, P; PAPHAVASIT, N.1996. A review of the culture of tropical abalone with special reference to Thailand. *Aquaculture* 140,159-168.

JEBREEN, E; COUNIHAN, T; FIELDDER, D; DEGNAN, B. 2000. Synchronous oogenesis during the semilunar spawning cycle of the tropical abalone *Haliotis asinina*. *Journal of Shellfish Research*.19 (2), 845-851.

LA TOUCHE, B.; MOYLAN K.; TWOMEY, W. 1993. Abalone On-growing Manual. *Aquaculture Explained*, Ed. An Bord lascaigh Mhara (Ireland).14, 39pp.

LEWIS, C.L. 1992. Abalone egg vitelline layers and hybrid gamete interactions. In: Guzman del Proo, S.A., Tegner, M.J., Shepherd, S.A. (Eds.), *Abalone of the World*. Fish. Rep. Dep. Fish. 24, Adelaide (Aust.), 59-75p.

LINDBERG, D.1992. Evolution, distribution and systematics of Haliidotae. In: Guzman del Proo, S.A., Tegner, M.J., Shepherd, S.A. (Eds.), *Abalone of the World*. Fish. Rep. Dep. Fish. 24, Adelaide (Aust.), 3-18p.

LITAAY, M; De SILVA, S. 2003. Spawning season, fecundity and proximate composition of the gonads of wild-caught blacklip abalone (*Haliotis rubra*) from Port Fairy waters, south eastern Australia. *Aqua. Living Resour* 16, 353-361.

MARTIN, G.G. (1983). Fine Structure of the ovary in the red abalone *Haliotis rufescens* (Mollusca: Gastropoda). *Zoomorphology*. 103, 89-102.

MOYLAN, K; MERCER, J. 1993. Abalone conditioning, spawning techniques, and nursery systems at the Shellfish Research Laboretory, Carna (Ireland). Abstracts of an Internacional Worksshop (Ed. Connecticut Sea Grant College Program CT-SG-93-05), 23-24.

MORO, L.; MARTÍN J.; GARRIDO, M.; IZQUIERDO, I. 2003. Lista de especies marinas de Canarias (algas, hongos, plantas y animales) 2003. Consejería de Política Territorial y Medio Ambiente del Gobierno de Canarias. 250pp.

MORSE, D.E.; DUNCAN, H.; HOOKER, N.; MORSE, A. 1997. Hydrogen peroxide induces spawning in molluscs, with activation of prostaglandin endoperoxide synthetase. *Science*, 196 (4287): 298-300.

MOTTET, M. 1978. A review of the fishery biology of abalones. Wash. Dept. Fish.Tech.Rep.37, 81-95.

NIKOLSKY, G.V. 1963. The ecology of fishes. Academic Press, Londres: 352pp.

NÚÑEZ, J.; BARQUÍN; A. BRITO. 1994. Cartografía de la distribución, biología y evaluación de los recursos marisqueros de moluscos litorales canarios: lapas, orejas de mar y mejillón. 1º fase: La Palma, Tenerife, Gran Canaria y Fuerteventura. Departamento de Biología Animal. Universidad de La Laguna. 323pp.

OAKES; PONTE. 1996. The abalone market: opportunities for cultured abalone. *Aquaculture* 140: 187-195.

PEÑA, J. 1985. Primeras experiencias de inducción a la puesta en *Haliotis coccinea canariensis* Nordsieck, 1975 (Gastropoda, Prosobranchia). *Int. Tecn..Inst. Inv. Pesq.* 130, 3-12.

PEÑA, J. 1986. Preliminary study on the induction of artificail spawning in *Haliotis coccinea canariensis* Nordsieck (1975). *Aquaculture*, 52, 35-41.

PÉREZ, J.; MORENO, E. 1991. Invertebrados Marinos de Canarias. Ed. Cabildo insular de Gran Canaria. 335pp.

POUTIERS, J. 1993. Les coquillages comestibles de France. In Coquillages, edited by P. Elzière-Papayanni. Paris, Informations Techniques des Services Vétérinaires Français, 13-102.

SAWATPEERA, S. 2001. Larval development in *Haliotis asinina* Linnaeus. Journal of Shellfish Research, Vol.20, No.2, 593-601.

SINGHAGRAIWAN, T; DOI, M. 1992. Spawning pattern and fecundity of the Donkey's ear abalone. *Haliotis asinina* Linné observed in captivity. Thai. Mar.Fish.Res. Bull. 3, 61-69.

SOBHON, P; APISEWATAKAN, S; CHAMPOO, M; WANICHANON, C; LINTHONG, V; KRUATRACHUE, M; SUCHART, E; PUMTHONG, T; POOMTHONG T. 1999. Clasification of germ cells, reproductive cycle and maturation of gonads in *Haliotis asinina* Linnaeus. Science Asia. 25, 3-21.

TAKASHIMA, F. (1978). Gametogenesis and reproductive cycle in *Haliotis diversicolor* Reeve. J. Tokyo Uni. Fish. 1, 1-8.

TOLEDO, P.; HAROUN, R.; PALACIOS, H.; IZQUIERDO, M.; PEÑA, J. 2000. First culture experiences of *Haliotis coccinea canariensis* in a biofilter system. Journal of Shellfish Research 19, 540.

TOMITA, K. 1967. The maturation of the ovaries of the abalone, *Haliotis discus hannai* Ino, in Rebun Island, Hokkaido, Japan. Sci. Rep. Hokkaido Fish. Exp. Sta. 7, 1-17.

UKI, N; KIKUCHI, S. 1984. Regulation of maturation and spawning of an abalone, *Haliotis* (Gastropoda) by external environmental factors. Aquaculture 39, 247-261.

VIANA, M.T. 1999. Curso impartido sobre cultivo de alubones en el Instituto de Ciencias Marinas de Canarias, Gran Canaria (España). 98pp.

VIERA, M. ; COURTOIS DE VICOSE, G.B.R., 2003. Inducción al desove de la almeja canaria *Haliotis tuberculata coccinea* mediante el método del Peróxido de Hidrogeno. Póster presentado en el IX Congreso Nacional de Acuicultura, Cádiz. (España).

YOUNG, J., DE MARTINI, J., 1970. The reproductive cycle, gonad histology and gametogenesis of the red abalone, *Haliotis rufescens* (Swainson). Calif. Fish Game 56, 298-309.