

EVALUACIÓN DE UNA TÉCNICA RÁPIDA NO DESTRUCTIVA PARA LA DETERMINACIÓN DEL SEXO Y MADUREZ GONÁDICA DE *Cittarium pica*, (Linnaeus, 1758)(ARCHEOGASTROPODA: TROCHIDAE).

CHRISTIAN FERNANDO ERAZO ACOSTA

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
PROGRAMA DE INGENIERÍA EN PRODUCCIÓN ACUÍCOLA
SAN JUAN DE PASTO, NARIÑO, COLOMBIA
2016**

EVALUACIÓN DE UNA TÉCNICA RÁPIDA NO DESTRUCTIVA PARA LA DETERMINACIÓN DEL SEXO Y MADUREZ GONÁDICA DE *Cittarium pica*, (Linnaeus, 1758)(ARCHEOGASTROPODA: TROCHIDAE).

CHRISTIAN FERNANDO ERAZO ACOSTA

Trabajo de Grado presentado como requisito parcial para optar al título de Ingeniero en Producción Acuícola

Directora:

Ph. D. LUZ ADRIANA VELASCO
Docente investigadora, Directora Grupo Moluscos Marinos,
Universidad del Magdalena, Laboratorio de Moluscos y Microalgas,
Santa Marta, Magdalena, Colombia

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
PROGRAMA DE INGENIERÍA EN PRODUCCIÓN ACUÍCOLA
SAN JUAN DE PASTO, NARIÑO, COLOMBIA
2016

**“Las ideas y conclusiones aportadas en el Trabajo de Grado,
son responsabilidad exclusiva de su autor.”**

**Artículo 1º del acuerdo No. 324 de Octubre 11 de 1966,
Emanado del Honorable Consejo Directivo de la Universidad
De Nariño.**

Nota de aceptación:

LUZ ADRIANA VELASCO, BM, PhD.
Directora

JULBRINNER SALAS BENAVIDES, Biol enf Eco.
Jurado delegado

VILMA YOLANDA GÓMEZ NIEVES, BM.
Jurado

San Juan de Pasto, Abril de 2016.

AGRADECIMIENTOS

Infinitas gracias a Dios y la Virgen por regalarme las bendiciones necesarias para afrontar dificultades y tropiezos presentados a lo largo de mi vida, por permitirme crecer cada día como persona y profesionalmente.

A mi directora de tesis PhD. Luz Adriana Velasco por su apoyo, orientación, seguimiento y supervisión en la culminación de la presente investigación, especialmente por la motivación, apoyo y paciencia recibido a lo largo de la elaboración del presente manuscrito.

Al Biólogo Walter Barbosa, por su amistad, colaboración y por el ánimo infundido, quien con sus principios y ejemplos me demostraron la fortaleza de la humildad para cada día ser una gran persona y en un futuro un muy buen profesional.

A COLCIENCIAS y a la Universidad del Magdalena, quienes me brindaron su apoyo, financiación y toda su colaboración para la realización del presente trabajo.

A la Universidad de Nariño, a mis docentes, directivos y coordinadores del Programa de Ingeniería en Producción Acuícola, por su colaboración y apoyo durante mi formación profesional.

A mis jurados, los docentes Jullbrinner Salas Benavides y Vilma Yolanda Gómez Nieves, por su apoyo, asistencia y contribución en el desarrollo profesional.

A Piedad Mejía, Oscar Mejía y Luis Alfonso Solarte Portilla, por su esencial colaboración para la aprobación de este trabajo.

DEDICATORIA

En memoria de mi gran ejemplo de vida, mi padre Jesús Eduardo Erazo.

A mi madre Carmen María Acosta quienes con sus bendiciones y sabiduría me inculcaron los valores necesarios para afrontar cada situación de la vida.

CHRISTIAN FERNANDO ERAZO ACOSTA

RESUMEN

El molusco gasterópodo conocido en Colombia como Cigua o Burgao, *Cittarium pica*, es uno de los recursos con mayor importancia comercial para las comunidades que habitan en la Costa Caribe, cuyas poblaciones están catalogadas en estado vulnerable según la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN). Dentro de las medidas que se están adoptando para su conservación está su reproducción controlada en laboratorio con fines de repoblación. No obstante, al ser una especie sin dimorfismo sexual externo se complica la obtención de desoves de forma controlada y masiva. Este proyecto de investigación se desarrolló con el objeto de evaluar el frotis de biopsia gonadal como una técnica rápida no destructiva que permita monitorear el sexo y la condición reproductiva de adultos de *C. pica*. Para ello, se llevaron a cabo dos experimentos usando ejemplares adultos de esta especie. En el primero, se comparó la determinación del sexo y estadio de madurez sexual de 60 animales usando la técnica histológica y la de frotis gonadal simultáneamente, analizando en ésta última el diámetro y densidad de los oocitos, así como el tiempo de viabilidad de los espermatozoides. En el segundo experimento se determinó el efecto de la perforación de la concha, la extracción de biopsia gonádica y del cerramiento de la perforación (con plastilina y resina) sobre la tasa de ingestión y supervivencia de 3 grupos experimentales de 30 animales en cada tratamiento y un control sin manipulación alguna, los cuales fueron mantenidos en condiciones de cultivo suspendido en el mar. Se pudo establecer que las determinaciones del sexo y estadio de madurez de machos y hembras de *C. pica* por las técnicas de frotis de biopsia gonadal e histológica fueron similares. De otro lado, la perforación de la concha, extracción de una biopsia gonadal y/o el cierre de la perforación de la concha disminuyeron la supervivencia de *C. pica*, mientras que su tasa de ingestión solo disminuyó cuando se hizo la biopsia y no se cerró la perforación de la concha, o cuando ésta fue cerrada con plastilina. Estos resultados sugieren que la técnica de perforación de la concha, extracción de una biopsia gonadal y el cierre de la perforación de la concha es viable para determinar el sexo y estado de madurez de *C. pica*, pero requiere ser optimizada para garantizar la supervivencia de los organismos y que sea viable su utilización durante el monitoreo de los stocks de reproductores con fines de reproducción artificial. Para todas las decisiones de significancia se empleó un alfa de 0.05.

Palabras Claves: *Cittarium pica*; macroscopía, frotis, histología, supervivencia.

ABSTRACT

The gastropod mollusk known in Colombia as Cigua or Burgao, *Cittarium pica*, is one of the resources more commercial importance for communities living on the Caribbean coast, whose populations are listed in a vulnerable state according to the International Union for Conservation of Nature (IUCN). Among the measures being taken to preserve them is its controlled laboratory for restocking reproduction. However, being a species without external sexual dimorphism obtaining a controlled and spawning mass is complicated. This research project was developed in order to evaluate gonadal biopsy smear as a quick nondestructive technique to monitor sex and reproductive status of adults of *C. pica*. To do this, they conducted two experiments using adult specimens of this species. In the first, sexing and stage of sexual maturity of 60 animals using histological technique and gonadal simultaneously smear was compared by analyzing in the latter the diameter and density of oocytes and time sperm viability. In the second experiment the effect of piercing the shell was determined, extraction gonadal biopsy and closing of the perforation (with clay and resin) on the ingestion rate and survival of 3 experimental groups of 30 animals in each treatment and control without manipulation, which were kept in suspended culture at sea. It was established that sex and stage of maturity of males and females of *C. pica* by smear techniques gonadal biopsy and histologic findings were similar. On the other hand, piercing the shell, removing a gonadal biopsy and / or closure of piercing the shell decreased survival of *C. pica*, while its ingestion rate decreased only when the biopsy was done and not he closed piercing the shell, or when it was closed with clay. These results suggest that the technique of piercing the shell, removing a gonadal biopsy and the closure of the perforation of the shell is feasible to determine the sex and maturity stage of *C. pica*, but needs to be optimized to ensure the survival of agencies and viable use for the monitoring of broodstock purposes of artificial reproduction. For all decisions of significance an alpha of 0.05 was used.

Keywords: *Cittarium pica*; microscopy, smears, histology, survival.

CONTENIDO

_Toc449269166	
1. INTRODUCCIÓN	12
2. OBJETIVOS.....	14
2.1 OBJETIVO GENERAL	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3. MARCO REFERENCIAL.....	15
3.1 GENERALIDADES Y DISTRIBUCIÓN GEOGRAFICA DE <i>Cittarium pica</i> ...	15
4. METODOLOGÍA	23
4.1 ÁREA DE ESTUDIO.....	23
4.2 OBTENCIÓN DE ESPECÍMENES	23
4.3 EVALUACIÓN DEL ANÁLISIS DE LOS FOTIS DE BIOPSIAS GONADALES COMO TÉCNICA DE DETERMINACIÓN DEL SEXO Y ESTADÍO DE MADUREZ.....	25
4.4 DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE LA PERFORACIÓN DE LA CONCHA, TOMA DE BIOPSIA GONÁDICA Y DEL CERRAMIENTO DE LA CONCHA	28
4.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	31
5. RESULTADOS.....	32
5.1 USO DE LA OBSERVACIÓN MACROSCÓPICA COLORIMÉTRICA Y FROTIS DE BIOPSIA GONÁDICA EN LA IDENTIFICACIÓN DEL SEXO DE <i>C.</i> <i>pica</i>	32
5.2 USO DEL FROTIS DE BIOPSIA GONÁDICA EN LA IDENTIFICACIÓN DEL ESTADÍO DE MADUREZ DE LAS HEMBRAS DE <i>C. pica</i>	34
5.3 USO DEL FROTIS DE BIOPSIA GONÁDICA EN LA IDENTIFICACIÓN DEL ESTADÍO DE MADUREZ DE LOS MACHOS DE <i>C. pica</i>	37
5.4 EFECTO DE LA PERFORACIÓN DE LA CONCHA, DE LA BIOPSIA GONÁDICA Y DEL CERRAMIENTO DE LA PERFORACIÓN.....	38
6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	41
6.1 USO DE LA OBSERVACIÓN MACROSCÓPICA CROMÁTICA DE LA GÓNADA Y EL FROTIS DE BIOPSIA GONÁDICA EN LA IDENTIFICACIÓN DEL SEXO DE <i>C. pica</i>	41
6.2 USO DEL FROTIS DE BIOPSIA GONÁDICA EN LA IDENTIFICACIÓN DEL ESTADÍO DE MADUREZ DE LAS HEMBRAS DE <i>C. PICA</i>	42
6.3 USO DEL FROTIS DE BIOPSIA GONÁDICA EN LA IDENTIFICACIÓN DEL ESTADÍO DE MADUREZ DE LOS MACHOS DE <i>C. PICA</i>	43
6.4 EFECTO DE LA PERFORACIÓN DE LA CONCHA, DE LA BIOPSIA GONÁDICA Y DEL CERRAMIENTO DE LA PERFORACIÓN.....	44

7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	46
7.1 CONCLUSIONES.....	46
7.2 RECOMENDACIONES	47
8. BIBLIOGRAFÍA.....	48

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ejemplar adulto de <i>Cittarium pica</i> adherido al sustrato.....	166
Figura 2. Bahía de Taganga, Santa Marta, Magdalena.	233
Figura 3. Diámetro de la concha en <i>C. pica</i>	244
Figura 4. Vista ventral de <i>Cittarium pica</i> , área de marcaje.	255
Figura 5. Área de perforación de la concha en <i>C. pica</i>	255
Figura 6. Gónada femenina, masculina y macroscópicamente no identificada de <i>C. pica</i>	26
Figura 7. Diagrama esquemático del diseño experimental.	288
Figura 8. Red tipo linterna.	29
Figura 9. Sistema de línea larga flotante o long line.	299
Figura 10. Proporción sexual de <i>C. pica</i> estudiada mediante las técnicas de macroscopía colorimétrica, análisis de frotis de biopsia e histología gonadal.....	322
Figura 11. Relación entre el estadio de madurez de las hembras de <i>C. pica</i> determinado mediante análisis histológico y el diámetro (A) y densidad de sus oocitos establecidos a partir del análisis de frotis de biopsia gonadal (B).	344
Figura 12. Comparación de la estimación del diámetro de los oocitos de <i>C. pica</i> usando las técnicas de análisis de frotis e histología gonadal.....	366
Figura 13. Relación entre el estadio de madurez de los machos de <i>C. pica</i> determinado mediante análisis histológico y la viabilidad de los espermatozoides establecido a partir del análisis de frotis de biopsia gonadal.	377
Figura 14. Efecto de La perforación, toma de biopsia gonádica y cerramiento temporal de la concha sobre la supervivencia y consumo de alimento en adultos de <i>C. pica</i>	39

1. INTRODUCCIÓN

Cittarium pica, es uno de los gasterópodos marinos de mayor importancia comercial y ecológica del Caribe Colombiano. Además de ser un importante regulador del crecimiento de las macroalgas en los ecosistemas rocosos y arrecifales, es ampliamente utilizado por el hombre como alimento y en la elaboración de artesanías¹. Esta especie ha tenido tradicionalmente una intensidad pesquera indiscriminada, llevando a este caracol a ser organismo vulnerable, incluido en las listas rojas de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN)².

La obtención de juveniles en laboratorio y su liberación en el medio natural con fines de repoblamiento es una de las medidas más eficaces para garantizar la conservación de moluscos³. Ensayos de reproducción artificial de *Cittarium pica* han demostrado que es posible la obtención de juveniles de esta especie en laboratorio⁴. No obstante, los desoves han sido espontáneos y no controlados, debido en buena parte a que este gasterópodo no presenta dimorfismo sexual externo, lo que hace imposible conocer y/o monitorear el sexo y condición reproductiva de los animales sin causar su muerte. Los estudios de la condición reproductiva en esta especie se realizan mediante cortes histológicos y análisis de frotis bajo un microscopio de luz⁵, como es el caso de los bivalvos *Pinctada margaritifera*⁶ y *Quadrula quadrula*⁷ y los gasterópodos *Trochus niloticus*⁸ y *Patella ferruginea*⁹. El desarrollo de los frotis ha permitido hacer monitoreos de la condición reproductiva de los animales sin ocasionarles un estrés importante y

¹ DÍAZ y PUYANA. Moluscos del Caribe Colombiano, catalogo ilustrado, Colciencias, Fundación Natura e Invemar, Bogotá, 1994, p. 291.

² AGENCIA UN. Caracol Cigua en peligro de extinción en San Andrés. En: Unimedio, agencia de noticias UN, Medioambiente. No. 403. Bogotá. D. C. 03, diciembre, 2014.

³ LOVATELLI and SARKIS. A regional shellfish hatchery for the Wider Caribbean: Assessing its feasibility and sustainability. FAO Regional Technical Workshop. 2010, Kingston, Jamaica. FAO Fisheries and Aquaculture Proceedings. No. 19. Rome, FAO. 2011. p. 125.

⁴ BELL. Reproduction and larval development of the West Indian topshell, *Cittarium pica* (Trochidae) in the Bahamas. Bull. Mar. Science. Vol. 51(2), 1992. p. 250; VELASCO, *et al.* State of shellfish aquaculture on the Caribbean coast of Colombia and potential site for a regional hatchery facility. In A. Lovatelli and S. Sarkis (eds). A regional shellfish hatchery for the Wider Caribbean: Assessing its feasibility and sustainability. FAO Regional Technical Workshop. 2010, Kingston, Jamaica. FAO Fisheries and Aquaculture Proceedings. No. 19. Rome, FAO. 2011. p. 119–132; PABÓN. Producción de juveniles del gasterópodo *Cittarium pica* (Linnaeus, 1758) en condiciones de laboratorio. Universidad del Magdalena, Santa marta, p.49.

⁵ OSORNO, *et al.* Plan de investigación para la conservación de *Cittarium pica* (Linnaeus, 1758), Invemar, Santa marta, Colombia, 2009. p. 11.

⁶ ACOSTA-SALMÓN and SOUTHGATE. Use of a biopsy technique to obtain gonad tissue from the blacklip pearl oyster *Pinctada margaritifera* (L.). 2004. Vol. 35(1), p. 93.

⁷ BERG, *et al.* Mantle biopsy: a technique for nondestructive tissue-sampling of freshwater mussels. J. N. Amb. Benthol. 1995. Soc. Vol. 14. p. 579.

⁸ BRALEY. The Giant Clam: a Hatchery and Nursery Culture Manual ACIAR Monograph No. 15, ACIAR, Canberra, 1992. p.144; DOBSON and LEE. Improved method of determining the sex of the marine topshell, *Trochus niloticus* (Mollusca: Gastropoda) for spawning. Aquaculture, 1996. 139. pp. 329.

⁹ RIVERA-INGRAHAM, *et al.* New Records regarding sex change in *Patella ferruginea* (Gastropoda: Patellidae) Laboratorio de Biología Marina. Facultad de Biología. Universidad de Sevilla. 2009.

evitando el sacrificio de los mismos, facilitando el control de sus desoves en laboratorio con fines de reproducción¹⁰.

En consideración a lo anterior, el presente estudio tiene como propósito establecer una técnica no destructiva que permita monitorear el sexo y el estado de madurez de *Cittarium pica* sin recurrir al sacrificio los animales.

¹⁰ BRALEY. Op.cit., p. 102; DOBSON y LEE. Op. cit., p. 315. GIMIN and LEE. The Reproductive cycle of *Trochus niloticus* in King Sound, Western Australia. In: C.L. Lee and P.W. Lynch, (Eds.). *Trochus: status, hatchery practice, and nutrition*. Australian Centre for International Agricultural Research. ACIAR Proceedings. 1997. Vol. 70: p.54.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el uso del frotis de biopsia gonádica como técnica no invasiva para la determinación del sexo y estadio gonadal del caracol Burgao *Cittarium pica* (Archeogastropoda: trochidae).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar los resultados de las identificaciones de sexo y estadio de madurez de machos y hembras de *C. pica* usando las técnicas: histológica, macroscópica colorimétrica y análisis de frotis de biopsias gonadal.
- Determinar el efecto de la perforación de la concha, la extracción de una biopsia gonádica y del cerramiento de la perforación de la concha usando una tapa dura (resina) y otra blanda (plastilina), sobre la tasa de ingestión y supervivencia de los adultos de *C. pica*.

3. MARCO REFERENCIAL

3.1 GENERALIDADES Y DISTRIBUCIÓN GEOGRAFICA DE *Cittarium pica*

Cittarium pica especie descrita por Linnaeus en 1758, es un gasterópodo de la familia Turbinidae¹¹, conocido como cigua o burgao en Colombia¹². Esta especie alcanza diámetros de concha de hasta 180mm¹³. Presenta manchas irregulares de color negro y blanco¹⁴, la superficie externa de la concha ondulada, con protuberancias pequeñas e irregulares¹⁵.

La ubicación taxonómica de *C. pica*, de acuerdo a la recopilación más reciente realizada por Rosenberg y colaboradores, es:

Reino: Animalia
Phylum: Mollusca
Clase: Gastrópoda
Subclase: Vetigastropoda
Orden: Archaeogastropoda
Suborden: Troquinados (Vitigastropoda)
Superfamilia: Trochoidae
Familia: Turbinidae
Subfamilia (Tribu): Tegulinae
Género: *Cittarium*
Especie: *Cittarium pica*¹⁶

Cittarium pica se distribuye en aguas con temperaturas que oscilan entre los 26 y 34°C¹⁷, en la región centro-septentrional del gran Caribe, desde los Cayos de Florida y las Antillas Mayores hasta la costa norte de Sur América¹⁸. En Colombia ha sido reportada en ecorregiones como Darién, Magdalena, Tayrona, Guajira y Archipiélago de San Andrés y Providencia¹⁹, siendo más abundante en Santa Marta, Parque Nacional Natural Tayrona (19,2 ind/m²),

¹¹ ROSENBERG, *et al.* Gastropoda (Mollusca) del Golfo de México, p. 581, en Felder, D.L. y D.K. Camp (eds.), Golfo de México-Orígenes, aguas y biota. La Biodiversidad. Texas A & M Press, College Station, Texas. 2009. p. 1115.

¹² OSORNO, *et al.* Op. cit., p. 119.

¹³ GRAHAM, A. Observations on the anatomy of some trochacean gastropods. Bull. Mar. Science. 1965. Vol. 15(1), p. 204; ROBERTSON. The edible West Indian Whelk *Cittarium pica* (Gastropoda: Trochidae): natural history with new observations. Proc. Acad. Nat. Sci. Philad. 2003. p. 46.

¹⁴ RANDALL. A study of the growth and other aspects of the biology of the West Indian Top Shell *Cittarium pica* (Linnaeus). Bull. Mar. Sci. 1964. p. 432.

¹⁵ POUTIERS y CIPRIANI. Gastrópodos y Bivalvos. En: Cervigón, F., R. Cipriani, W. Fischer, L. Garibaldi, M. Hendrinckx, A. J. Lemus, R. Márquez, J.M. Poutiers, G. Robaina y B. Rodríguez (eds.), 1992. p. 29.

¹⁶ ROSENBERG, *et al.* p. 584.

¹⁷ FLORES y CÁCERES. *Cittarium pica* (Linnaeus, 1758) (Achaegastropoda: Trochidae) en las aguas costeras de Venezuela. Bol. Inst. Oceanogr. Venezuela, 1984. p. 59.

¹⁸ ROBERTSON, Op cit., p. 34.

¹⁹ OSORNO *et al.* Op. cit., p. 14.

Urabá chocoano (7,8 ind/m²) y la Guajira (6,4 ind/m²) y Cartagena, Parque Nacional Natural Islas del Rosario (5,4 ind/m²)²⁰.

Figura1. Ejemplar adulto de *Cittarium pica* adherido al sustrato.



Fuente: Peggy Williams, www.shelltrips.com²¹.

Este caracol habita el intermareal rocoso²², en la zona litoral y supralitoral²³, desde la zona de mareas hasta 2 m de profundidad²⁴.

Presenta un gradiente de distribución de talla de la concha que disminuye en dirección a la costa²⁵. Generalmente los ejemplares jóvenes (2 a 8 mm largo concha) se ubican en la parte más alta del intermareal, y los más viejos (> 80 mm largo concha), dentro de grietas o bajo rocas de tipo sedimentarias bioclásticas²⁶. La densidad de los individuos de *C. pica* suele ser mayor en lugares expuestos al oleaje con respecto a los resguardados²⁷. En las bahías protegidas se observan altas densidades dominadas por ejemplares pequeños de *C. pica*, mientras que en sitios desprotegidos la especie presenta un notable predominio de animales adultos²⁸.

²⁰ OSORNO. Bioecología de la cigua o burgao *Cittarium pica* (Linnaeus, 1758) (Mollusca: Gastropoda: Trochidae) en la costa continental del Caribe colombiano. Tesis de pregrado en Biología Marina, Universidad Jorge Tadeo Lozano, Santa Marta, Colombia. 2005. p. 59.

²¹ WILLIAMS. Los depositos de Bimini, Bahamas. Disponible en internet: <<http://www.shelltrips.com/Bimini/pics.html>>. (Consultado en: marzo 2014).

²² OSORNO *et al.* Op. cit., p. 16; DIAZ y PUYANA. Op. cit., p. 217.

²³ BAKUS. Zonation in marine gastropods of Costa Rica and species diversity. *Veliger*, 1968. 10, 210.

²⁴ DE JONG and COOMANS. Marine gastropods from Curacao, Aruba and Bonaire. E.J. Brill, Leiden. 1988. p. 222.

²⁵ VERMEIJ. Intraspecific shore-level size gradients in intertidal mollusks. *Ecology*. 1972. p. 693.

²⁶ OSORNO. Op. cit., p. 2.

²⁷ DEBROT. Survival, growth and fecundity of the west Indian topshell, *Cittarium pica* (Linnaeus), in various rocky intertidal habitats of the Exuma Cays, Bahamas. *The Veliger* 1992. pp. 369.

²⁸ TOLLER and GORDON. Population survey of the West Indian topshell or whelk (*Cittarium pica*) in the U.S. Virgin Islands. Department of Planning and Natural Resources Division of Fish and Wildlife. St. Thomas. 2005. Virgin Islands in internet: <<http://bcrc.bio.umass.edu/vifishandwildlife>>.

Cittarium pica se alimenta de las algas del mesolitoral, siendo uno de los organismos herbívoro-detritívoros más importantes y uno de los mayores consumidores de biomasa de macroalgas²⁹. Se alimenta principalmente durante la noche y en las primeras horas de la mañana³⁰. Tales hábitos nocturnos se han atribuido a la disminución del estrés por la desecación solar y la presión ejercida por depredadores durante la noche³¹. Su dieta se compone primordialmente de algas macroscópicas y microscópicas de las especies: *Laurencia obtusa*, *Padina* sp, *Gelidiella acerosa*, *Lyngbya majuscula*, *Dyctiota divaricata*³², *Anadyomone stellata*³³, *Jania capillacea* y *Navicula* sp³⁴.

Las tasas de crecimiento de *C. pica* pueden variar entre 1,0 y 3,6 mm por mes³⁵. Presentándose los mayores crecimientos en organismos juveniles en su medio natural, en comparación con organismos adultos y/o mantenidos en condiciones de laboratorio. De otro lado, la supervivencia reportada oscila entre 32 y 97% bajo condiciones de laboratorio y naturales, respectivamente³⁶.

C. pica es una especie dioica y de fecundación externa, los machos no poseen órgano para la cópula³⁷. No presenta dimorfismo sexual externo, por lo cual el sexo se determina observando su desove o sacrificando al animal. La gónada femenina y su puesta son de color verde, mientras que los machos presentan una gónada de color crema³⁸. En las poblaciones colombianas se ha determinado una proporción sexual 1:1³⁹.

Aparentemente, *C. pica* es una especie iterópara, es decir que tiene varios eventos reproductivos a lo largo de su vida adulta⁴⁰. Esto quiere decir que el proceso de gametogénesis, o formación de los gametos dentro de las gónadas, se repite sucesivamente, pasando por diferentes estadios. Basándose en la presencia, cantidad y características de los gametos sexuales, pueden

²⁹ MCLEAN. Measurements of beachrock erosion by some tropical marine gastropods. Bull. Mar. Sci. 1967. p. 555.

³⁰ OSORNO *et al.* Op. cit., p. 17.

³¹ *Ibid.*, p. 20.

³² RANDALL. Op. cit., p. 428.

³³ OSORNO. Op. cit., p. 66.

³⁴ HAWKINS. Crecimiento y supervivencia de juveniles del "burgao" *Cittarium pica* (Linné 1758), (gastropoda: trochidae) bajo condiciones controladas. Tesis Biol., Univ. del Magdalena, Santa Marta. 2007. p. 56.

³⁵ RANDALL. Op. cit., p. 441; BELL. Op. cit., p. 257; MANOTAS y MARIANO. Parámetros decrecimiento, supervivencia y tamaño de población de *Cittarium pica* (Mollusca: Gastrópoda) en la ensenada de Gayraca, PNNT, Santa Marta. Tesis Biol., Univ. Atlántico. Barranquilla. 2000. pp. 85; HAWKINS. Op. cit., p. 33.

³⁶ SCHMIDT *et al.* Population ecology and fishery of *Cittarium pica* (Gastropoda: Trochidae) on the Caribbean coast of Costa Rica. Rev. Biol. Trop. 2002. pp. 1088; HAWKINS. Op. cit., pp. 47.

³⁷ POINTIER y LAMY. Guía de moluscos y caracolas de Mar del Caribe. Editorial M & G difusión. México. 1998. p. 225.

³⁸ RANDALL. Op. cit., p. 437; BELL. Op. cit., p. 267.

³⁹ OSORNO. Op. cit., p. 102.

⁴⁰ RANDALL. Op. cit., pp. 436; CASTELL. Algunos aspectos de la biología y ecología de *Cittarium pica* (L.), "Quigua" (Prosobranchia, Trochidae), en el Parque Nacional Archipiélago de los Roques. Trabajo de grado, Facultad de Biología, Universidad Central de Venezuela, Caracas. 1987. p. 135; MANOTAS Y MARIANO. Op. cit., p. 49; OSORNO. Op. cit., p. 108.

diferenciarse etapas o estadios de maduración gonadal que varían según la especie⁴¹. De acuerdo a Bell (1992), Osorno (2005), Osorno et al., (2009)⁴², en *C. pica*, se han establecido cinco estadios sucesivos de desarrollo gonádico: 1) Inactivo: citológicamente los folículos son pequeños y túbulos seminíferos escasos. 2) Gametogénesis: folículos llenos de células germinales en desarrollo y tejido conectivo adiposo visible. 3) Madurez: gametos morfológicamente maduros, espermatozoides a la luz de cada túbulo seminífero y ausencia de tejido adiposo. 4) Desove: ovocitos separados sin la unión de tejido conectivo y túbulos seminíferos vacíos por la expulsión de los espermias. 5) Postdesove: lisis celular, invasión gradual de tejido conectivo y adiposo y presencia de amebocitos que fagocitan ovocitos y espermias residuales.

De acuerdo a la abundancia relativa de animales en estadios de madurez y desove a lo largo de una escala temporal, es posible determinar el ciclo reproductivo de una población⁴³. Los estudios de análisis microscópico histológico de *C. pica* han demostrado que sus poblaciones presentan un ciclo reproductivo continuo, es decir que tienen desoves a lo largo de todo el año⁴⁴; con una época de mayor frecuencia de desoves influenciados por las altas temperaturas (29,5°C), entre agosto y octubre⁴⁵.

La talla media de madurez sexual, o talla a la cual el 50% de la población se encuentra sexualmente madura⁴⁶, de *C. pica* varía dependiendo el lugar. En Bahamas, se encontró que la talla mínima de madurez sexual es de 32mm de diámetro de concha en machos y 34mm en hembras⁴⁷, mientras que en Colombia, la talla media de madurez sexual es de 58 mm en las hembras de 59 mm en los machos⁴⁸.

Entre las principales metodologías para la determinación del estadio gonadal de gasterópodos se encuentran la inspección macroscópica, el uso de índices de condición o gonadales y la inspección microscópica en fresco haciendo una biopsia o cortes para análisis histológicos.

La técnica de inspección macroscópica, consiste en realizar una inspección visual de los ejemplares para identificar el grado de madurez gonádica a través de escalas basadas en el color y nivel de abultamiento de la gónada. A mayor

⁴¹ GEORGE-ZAMORA, *et al.* Ciclo gonádico del ostión americano *Crassostrea virginica* (Lamellibranchia: Ostreidae) en Michoacán, Tabasco, México. *Rev. Biol. Trop.* 2003. p 116.

⁴² BELL. *Op. cit.*, p. 252; OSORNO. *Op. cit.*, p. 79; OSORNO, *et al.* *Op. cit.*, p. 56.

⁴³ HAHN. Gonad Reproductive Cycles. In *The Culture of Abalone and other marine Gastropods.*, (ed. K.O. Hahn), CRC Press, Boca Raton, FL. 1989a. p. 37.

⁴⁴ RANDALL. *Op. cit.*, p. 434; CASTELL. *Op. cit.*, p. 112; DEBROT. *Op. cit.*, p. 439; BELL. *Op. cit.*, p. 253; MANOTAS Y MARIANO. *Op. cit.*, pp. 45.

⁴⁵ OSORNO. *Op. cit.*, p. 82.

⁴⁶ SPARRE, *et al.* Introduction to tropical fish stock assessment. Part 1. Manual FAO. Fisheries Technical Papers, No. 306.1. Roma. 1989. p. 224.

⁴⁷ RANDALL. *Op. cit.*, p. 434; ROBERTSON. *Op. Cit.*, p. 36.

⁴⁸ OSORNO, *et al.* *Op. cit.*, p. 57.

abultamiento y coloración, se considera mayor el nivel de desarrollo de la gónada hasta cuando ocurre el desove, tras lo cual la gónada se vuelve flácida. La ventaja al usar ésta técnica es su economía y facilidad de implementación en organismos cuya gónada es observable por inspección externa, pero es un método de baja resolución y puede conducir a estimaciones subjetivas ya que distintas fases del ciclo pueden ser muy similares en apariencia (llenándose-vaciándose) por lo que no es de fácil aplicación a no ser que los animales muestren un alto grado de sincronización⁴⁹. Esta técnica es utilizada en arqueogastropodos haliótidos exitosamente para el monitoreo del progreso gonadal durante el acondicionamiento reproductivo (llenado de la gónada bajo condiciones controladas) ya que la gónada está ubicada ventralmente sobre el pie, siendo totalmente visible al mover el mismo, sin tener que sacrificar a los animales⁵⁰.

El factor de condición, consiste en relacionar el peso de las partes blandas (en seco o en húmedo) con el peso, volumen interno y/o longitud de la concha del animal⁵¹. Este índice aumenta con el nivel de madurez y desciende luego del desove. Tiene como ventaja el permitir hacer un seguimiento del ciclo reproductivo de la especie cuando es imposible separar la gónada del resto de la masa visceral, pero posee la desventaja de tener que sacrificar a los animales y que puede arrojar resultados erróneos del nivel de desarrollo gonadal, ya que en algunas especies se presenta la acumulación de reservas antes de la maduración⁵². Esta técnica ha sido aplicada a gasterópodos como *Haliotis discus hannai*⁵³, *Melongena corona*⁵⁴ y *Strombus costatus*⁵⁵.

El índice gonadal, consiste en relacionar el volumen o peso de la gónada con el volumen o peso total del animal, respectivamente. El valor de este índice es mayor a medida que aumenta el estadio de madurez gonádica y disminuye cuando ocurre la liberación de gametos. Es una técnica que resulta fácil y útil para realizar el seguimiento del ciclo reproductivo de especies cuya gónada es fácil de separar del resto de los tejidos, pero posee la desventaja de tener que sacrificar al

⁴⁹ ROMÁN, *et al.* Reproducción. p. 41. En: Maeda-Martínez, A. N. (Ed). Los moluscos pectínidos de Iberoamérica: Ciencia y acuicultura. Editorial Limusa, México D. F. 2001. p. 501.

⁵⁰ HAHN. Biotic and abiotic factors affecting the culture of abalone. In: Hahn, K. (ed), Handbook of culture of abalone and other marine gastropods. Florida. 1989b. p.127.

⁵¹ PÉREZ y ROMAN. La reproducción en los moluscos bivalvos. En: J. Espinosa de los Monteros & U. Labarta (Eds.). Reproducción en acuicultura. Madrid, España.1987. p. 309.

⁵² VELASCO. Biología y cultivo de los pectínidos de interés comercial de Colombia. Fondo de publicaciones Universidad del Magdalena, Santa Marta. 2008. p. 252; PEREZ y ROMAN. Op. cit., p. 289.

⁵³ MUGIYA, *et al.* Gonadal maturation in the abalone, *Haliotis discus hannai* at Taisei, Hokkaido. Bull. Fac. Fish. Hokkaido. Univ. 1980. p. 311.

⁵⁴ ZETINA, *et al.* Ciclo reproductor e índices de condición usados en *Melongena corona* (Mollusca gastropoda). Biol. Trop. 2000. p. 83.

⁵⁵ RODRIGUEZ-GIL. Distribución de Frecuencia, Relaciones Morfométricas y índices de Componentes del Cuerpo en una Población Adulta del Caracol Blanco, *Strombus costatus* Gmelin, en la Costa de Yucatán, México. In: 46 Proceedings of the Forty-Sixth Annual Gulf and Caribbean Fisheries Institute. Fort Pierce, Florida USA. 2005. p. 112.

animal⁵⁶. En gasterópodos, esta técnica se ha usado en especies como *Haliotis cracherodii*⁵⁷, *Haliotis rufescens*⁵⁸, *Patella kermadecensis*⁵⁹, *Astraea undosa*⁶⁰, *Patella granularis*⁶¹ y *Haliotis varia*⁶².

La inspección microscópica a partir del examen de placas histológicas, es una técnica que consiste en observar bajo el microscopio placas con cortes muy finos de gónadas debidamente fijadas, deshidratadas y coloreadas⁶³. Esta técnica tiene la ventaja de ser muy confiable y permitir observar de manera detallada y real el tamaño, densidad y características de los gametos y folículos; presencia de la pared gonadal, su respectivo espesor, así como la abundancia y distribución del tejido conectivo, estado de desarrollo⁶⁴. El aplicar ésta técnica presenta desventajas como ser destructiva (requiere sacrificar a los animales), es muy dispendiosa, tiene un alto costo económico y tarda demasiado tiempo para su realización y entrega de resultados. Esa técnica es una de las más usadas en gasterópodos, habiéndose practicado en especies como *Planaxis sulcatus*⁶⁵, *Strombus gigas*⁶⁶, *Turbinella angulata*⁶⁷, *Sinum cymba*⁶⁸, *Tegula eiseni*⁶⁹, *Tegula*

⁵⁶ PEREZ Y ROMAN. Op. cit., p. 317; VELASCO. Op. cit., p. 232; VILLALEJO-FUERTE, y OCHOA-BAEZ. El ciclo reproductivo de la almeja Catarina, *Argopecten circularis* (Sowerby, 1835), en relación con la temperatura y el fotoperiodo, en la Bahía Concepción, B.C.S., México. Ciencias Marinas. 1993. p. 196.

⁵⁷ WEBBER and GIESE. Reproductive cycle and gametogenesis in the black abalone *Haliotis cracherodii* (Gastropoda: Prosobranchiata). Marine Biology. 1969. p. 156.

⁵⁸ YOUNG and DEMARTINI. The reproductive cycle, gonadal histology and gametogenesis of the red abalone, *Haliotis rufescens* (Swainson). Calif. Fish & Game. 1970. p. 307; AULT, J. S. Some quantitative aspects of reproduction and growth of the red abalone, *Haliotis rufescens* Swainson. *Journal of Mariculture Society* 16.1985. p. 421.

⁵⁹ CREESE, et al. Sex change in a giant endemic limpet, *Patella kermadecensis*, from the Kermadec Islands. Leigh Marine Laboratory, University of Auckland, Private Bag, Auckland, New Zealand. *Marine Biology*. 1990. pp. 424.

⁶⁰ BELMAR-PÉREZ, et al. Madurez gonádica y ciclo reproductor del caracol panocha (*Astraea undosa* Wood, 1828; Gasterópodo: Turbinidae) en Bahía Tortugas, Baja California Sur. An. Inst. Cienc. Del Mar y Limnol. Univ. Nal. Autón. México, 1991. p.185.

⁶¹ VAT. The growth and reproduction of *Patella granularis* (Mollusca: Patellogastropoda) on the Southeast Coast of South Africa. Ph.D. Thesis Rhodes University. 2000. p. 251.

⁶² NAJMUDEEN. Variation in biochemical composition during gonad maturation of the tropical abalone *Haliotis varia*, Linnaeus 1758 (Vetigastropoda: Haliotidae). *Marine Biology Research*. 2007. p. 459.

⁶³ ESTRADA-FLOREZ, et al. Manual de Técnicas histológicas. AGT. (ed). México.1982; GABE. M. Techniques Histologiques. Massan and Cie. Paris. 1968. pp. 115; DEBROT. Op. cit., p. 438.

⁶⁴ CUÉNOT. Études anatomiques et morphologiques sur les ophiures. Arch. Zool. Exp. Gén.1888. p. 62; SELVAKUMARASWAMY, P. and BYRNE, M. Reproductive cycle of two populations of *Ophioneis schayeri* (Ophiuroidea). In New South Wales. Mar Biol. 1995. p. 93; STEWART and MLADENOV. Reproductive periodicity in the eury alinid snake star *Astrobrachion constrict tumina* New Zealand fiord. Mar Biol. 1995. p. 549; TOMINAGA, et al. Reproduction and development of the conspicuously dimorphic brittle star *Ophiodaphne formata* (Ophiuroidea). Biol. Bull. 2004. p. 32.

⁶⁵ MUZAMMIL and GHAZALA. Histology of gonads and cephalic brood pouch of the marine gastropod *Planaxis sulcatus* of Karachi Coast (Pakistan). *Hydrobiologia*. Vol. 350. 1997. p 129.

⁶⁶ AVILA-POVEDA. Ciclo reproductivo del caracol Pala *Strombus gigas* Linnaeus 1758 (Gastropoda: Caenogastropoda: Strombidae) del Archipiélago de San Andrés, Providencia y Santa Catalina, Caribe insular colombiano. MSc. tesis, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Mérida Bakus, G.J. 1968a. Zonation in marine gastropods of Costa Rica and species diversity. *Veliger*. 2004. p. 54; AVILA-POVEDA and BAQUEIRO-CARDENAS. Reproductive cycle of *Strombus gigas* Linnaeus 1758 (Caenogastropoda: Strombidae) from Archipelago of San Andres, Providencia and Santa Catalina, Colombia. *Journal of Invertebrate Reproduction and Development*, 2009. p. 2.

eiseni, *T. funebris*, *T. aureotincta*, *T. gallina* y *T. Regina*, *Busycon perversum*⁷⁰ y *Tegula aureotincta*⁷¹.

La inspección microscópica de una biopsia gonádica, es un procedimiento que consiste en la punción directa a la gónada con una aguja hipodérmica, con el fin de obtener una muestra de tejido gonádico que posteriormente se examina bajo un microscopio⁷². Microscópicamente es posible determinar el tamaño y densidad de los gametos a través de una escala basada en estas características, siendo posible establecer el estadio gonadal de los animales. Tiene la ventaja de ser una alternativa no destructiva (permite mantener vivos a los organismos) y ser relativamente confiable⁷³. Ha sido utilizada exitosamente en moluscos como *Fissurella crassa*⁷⁴, *Patella ferruginea*⁷⁵, *Pinctada margaritifera*⁷⁶ y *Quadrula quadrula*⁷⁷. La desventaja de esta técnica es que cuando los animales son manipulados mucho tiempo⁷⁸ y/o de una forma inapropiada, pueden morir luego del procedimiento⁷⁹.

Una de las limitantes para usar esta última técnica en gasterópodos es el hecho de que la gónada en muchos de ellos se encuentra situada en el ápice de la concha, siendo inaccesible por la apertura de la concha, como es el caso de *C. pica*⁸⁰. Para estos casos, se ha utilizado una técnica que consiste en abrir un orificio en la concha justo al nivel de la gónada, de forma que es posible obtener biopsias gonádicas y determinar la condición reproductiva de los animales. Este procedimiento se ha realizado en gasterópodos como *Trochus niloticus*⁸¹, *Tegula funebris*⁸², *Trochus pyramis*⁸³ y *Patella ferruginea*⁸⁴. De esta forma, ha sido

⁶⁷ SANTOS-VALENCIA, *et al.* Ciclo reproductor de *Turbinella angulata* (Mollusca: Gastropoda) en Campeche, Golfo de México. Gulf and Caribbean Fisheries Institute. 2009 p. 411.

⁶⁸ COVARRUBIAS y ROMERO. Anatomía del sistema reproductor femenino y masculino de *Sinum cymba* (Menke, 1828) (Gastropoda: Naticidae). Rev. biol.mar. oceanogr. 2009. p. 678.

⁶⁹ VÉLEZ-ARELLANO, *et al.* Ciclo gonádico de *Tegula aureotincta* (Mollusca: Gastropoda) en Bahía Asunción, Baja California Sur, México. Hidrobiológica. 2011. p. 181.

⁷⁰ SANTOS-VALENCIA, *et al.* Op. Cit., p.113.

⁷¹ VÉLEZ-ARELLANO, *et al.* Op. cit., p. 178.

⁷² HUAQUÍN, *et al.* Identificación del sexo y morfología de gametos de la Lapa *Fissurella crassa* Lamarck, 1822 (Mollusca: Archaeogastropoda). Revista de Biología marina y Oceanografía. 1998. p. 237.

⁷³ WRIGHT and LINDBERG. A non-fatal method of sex determination for *patellacean gastropods*. J. Mar. Biol. Assoc. 1979. p. 797.

⁷⁴ HUAQUÍN, *et al.* Op. cit., p. 221.

⁷⁵ RIVERA-INGRAHAM, *et al.* Op. cit., p. 101.

⁷⁶ ACOSTA-SALMON, *et al.* Op. cit., p. 94.

⁷⁷ BERG, *et al.* p. 576.

⁷⁸ LINDBERG and WRIGHT. Op.cit., p. 257; WRIGHT. Densidad media intraespecíficas de cambio de sexo en el territorial patellacean lapa *Lottia gigantea*. Biol. Mar.1989. p. 361; RIVERA-INGRAHAM, *et al.*Op., cit., p. 102.

⁷⁹ FRANK. Shell growth in a natural population of the turban snail, *Tegula funebris*. Growth.1965a. p. 395-403.

⁸⁰ GRAHAM. Observations on the anatomy of some trochacean gastropods. Bull. Mar. Science.1965. p. 208.

⁸¹ BRALEY. Op.cit., p. 209; DOBSON and LEE. Op. cit., p. 327.

⁸² FRANK, Op. cit., p. 393.

⁸³ FRANK. The biodemography of an intertidal snail population. Ecology 1965b. p. 837.

posible hacer un seguimiento del desarrollo gonadal de organismos con fines de acondicionamiento reproductivo para posteriormente obtener su desove controlado en condiciones de laboratorio⁸⁵.

⁸⁴ RIVERA-INGRAHAM, *et al.* Op. cit., p. 102; LINDBERG and WRIGHT. Op.cit., p. 263; WRIGHT. Op. cit., p. 344.

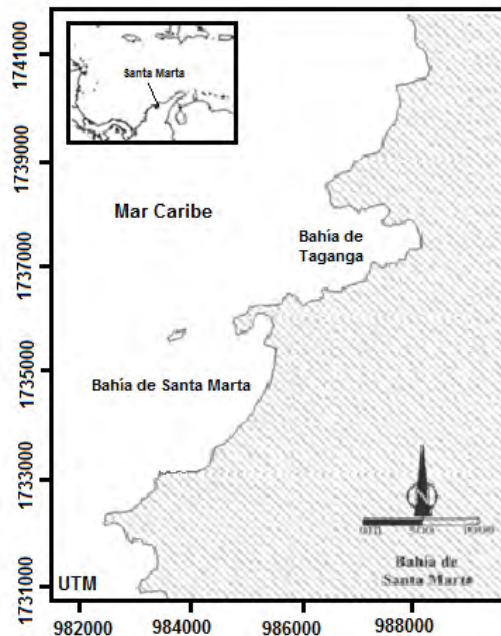
⁸⁵ TOMPA, *et al.* The mollusca. Volume 7: reproduction. Academic Press, Orlando, Fla. 1984. p 480; BASTO. Identificación del sexo y Desarrollo gonadal en Abulón rojo en cautiverio. 2009. Trabajo de tesis Maestría en Ciencias. Programa de posgrado en Ciencias con orientación en Acuicultura CICESE. Ensenada, Baja California México. 2009. p. 42

4. METODOLOGÍA

4.1 ÁREA DE ESTUDIO

Los experimentos se realizaron en el laboratorio de Moluscos y Microalgas ubicado en la Planta Piloto Pesquera de Taganga (PPPT) en el Corregimiento de Taganga ($11^{\circ} 16' N$, $74^{\circ} 11' W$) y en la concesión marina ($11^{\circ}15'48,4''N$ - $74^{\circ}11'53,2''O$) pertenecientes a la Universidad del Magdalena, los cuales se encuentran situados en el corregimiento de Taganga, Santa Marta, Magdalena. (Figura 1).

Figura 1. Bahía de Taganga, Santa Marta, Magdalena.



Fuente: Modificado de: GARCIA, et al⁸⁶.

4.2 OBTENCIÓN DE ESPECÍMENES

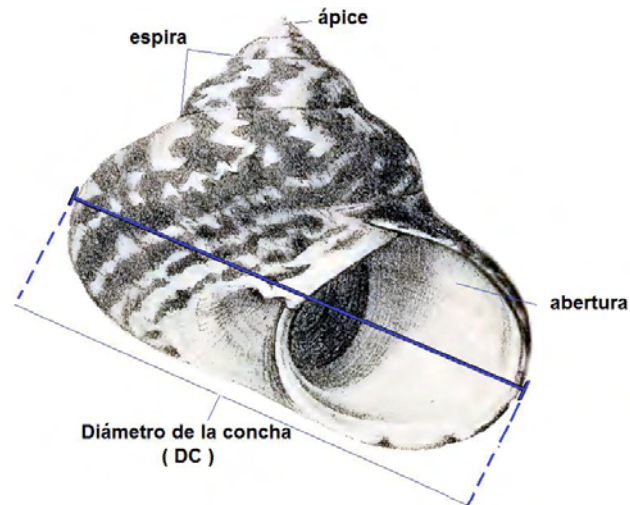
En ésta investigación se colectaron a través de pescadores artesanales 510 ejemplares de *C. pica* con rangos de talla entre 50 y 90 mm de diámetro de la concha (DC). (Figura 2). Según Robertson (2003)⁸⁷, caracoles burgao con tallas superiores a 50 mm de DC y por tanto son considerados viables

⁸⁶ GARCIA. et al. Calibración y validación de un modelo 3D para el área costera de Santa Marta (Colombia). Rev. Fac. Ing. Univ. Antioquia. p. 183.

⁸⁷ ROBERTSON. Op. cit., p. 36.

reproductivamente. Los caracoles fueron comprados a pescadores que los colectan en la región de Santa Marta, Departamento del Magdalena.

FIGURA 2. Diámetro de la concha en *C. pica*.

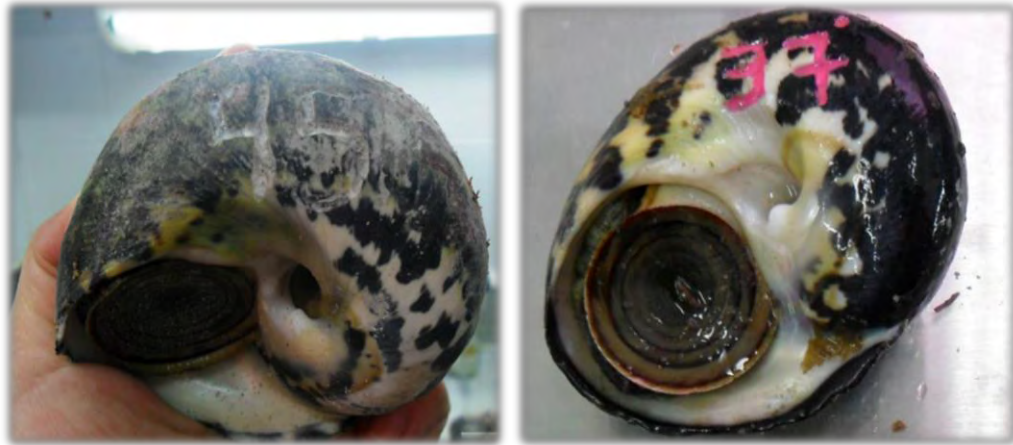


Fuente: Modificado de: WASHINTONG-TRYON, G⁸⁸.

Posteriormente se transportaron en cajas isotérmicas a las instalaciones del Laboratorio de Moluscos y Microalgas (LMM), donde los caracoles fueron limpiados de epibiontes y macroalgas adheridos a su concha, con ayuda de un cuchillo metálico y un cepillo, tras lo cual se lavaron con agua de mar microfiltrada. Seguidamente, cada caracol fue marcado en la parte ventral de la concha, cerca a la zona del ombligo, tallándolo con un micro-taladro (Figura 3). Luego, cada animal se pesó en una balanza analítica con precisión de ± 0.001 g, y el diámetro de la concha (DC) se midió con un calibrador (± 0.1 mm).

⁸⁸ WASHINTONG-TRYON. For a manual of the mollusca treatise on recent and fossil shells. World Heritage Encyclopedia. On line: <community.worldheritage.or>. 2014.

Figura 3. Vista ventral de *Cittarium pica*, área de marcaje.

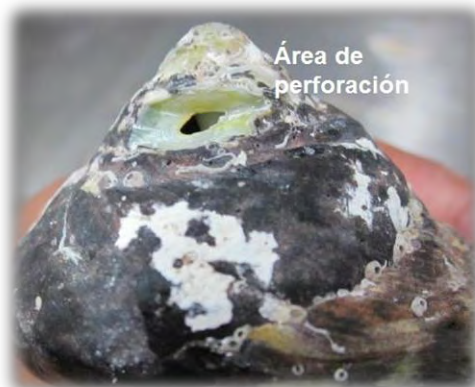


4.3 EVALUACIÓN DEL ANÁLISIS DE LOS FROTIS DE BIOPSIAS GONADALES COMO TÉCNICA DE DETERMINACIÓN DEL SEXO Y ESTADÍO DE MADUREZ

Con el fin de establecer la viabilidad de la determinación del sexo y del estadio de madurez de *C. pica* a partir del examen de biopsias gonádicas, se tomó una muestra de 15 animales de los siguientes rangos de diámetro de la concha: de 50-60mm, 60-70mm, 70-80mm, 80-90mm.

A cada uno de los animales se les realizó una perforación aproximada de 3mm entre el tercer y cuarto espiral después del ápice de la concha mediante un microtaladro (Figura 4) provisto de una broca de disco de corte diamante cuidando de no afectar ningún tejido blando.

Figura 4. Área de perforación de la concha en *C. pica*.



Se estableció el sexo del animal por observación directa del color de la gónada expuesta (hembra color verde, macho color balnquecino, sexo no identificado macroscópicamente color café) (Figura 5). Después se efectuó la biopsia gonadal mediante punción con una aguja de una jeringa de insulina con 0.30 mm de diámetro, a una profundidad de 2 mm, en un ángulo de 30° respecto a la base de la tercera espira de la concha, el grado de inclinación permite obtener una muestra de aprox. 0,3 ml de contenido gonadal previniendo una lesión a la glándula digestiva, ya que ésta se encuentra fusionada longitudinalmente hasta la parte terminal de la gónada. Con la biopsia obtenida se llevó a cabo un frotis sobre un portaobjetos provisto de una gota de agua de mar isotónica (35ppt) y microfiltrada (1 μ m), la cual fue analizada bajo un microscopio de luz Nikon Eclipse E200 provisto de una cámara digital Optika visión pro. Para el caso de las muestras de gónada femenina, se midió la densidad de oocitos en el campo visual del microscopio, así como el diámetro y las características morfológicas de 30 oocitos por muestra. En las muestras de gónada masculina, se cuantificó el tiempo de vida y la motilidad, haciendo un monitoreo de los mismos cada 15 minutos.

FIGURA 5. Gónada femenina, masculina y macroscópicamente no identificada de *C. pica*



Consecutivamente, cada animal fue extraído totalmente de su concha y se colocó en frascos de vidrio rotulados con los cuatro rangos de talla descritos anteriormente, cada frasco contuvo formol salino al 70% con el fin de fijar las muestras en inmersión durante un periodo de 18 días. Transcurrido este tiempo, se realizó un corte de 1cm³ en la parte media de la masa visceral (gónada y glándula digestiva) el cual quedó inmerso en alcohol comercial al 70% y 0,1% de glicerina por 2 semanas. Posteriormente, estas muestras fueron trasladadas a un fijador de solución Bouin (postfijación) durante siete días para posteriormente ser procesadas con la metodología histológica estándar, según el protocolo de Ávila-Poveda⁸⁹.

La madurez gonadal registrada histológicamente se interpretó según la siguiente escala determinada por Osorno⁹⁰ y Osorno et al⁹¹.

ESTADIOS	HEMBRAS ♀	MACHOS ♂
I) Inactivo	Elevada presencia de tejido conectivo en la gónada. Lumen folicular ausente de oogonias, oocitos y ovocitos. Se observan amebocitos.	Mínima cantidad de túbulos seminíferos, y los que existen son pequeños, vacíos y reducidos. La mayoría del área gonadal está compuesta por tejido adiposo y conectivo. Espermatogonias y espermatocitos casi ausentes y ausencia de espermatozoides. Se observan amebocitos.
II) Gametogénesis	Lumen folicular con presencia de células germinales y gametos en desarrollo. Células en desarrollo previtelogénico creciendo hacia la pared del folículo.	Tejido adiposo y conectivo en reducida cantidad. Espermatogonias formando gruesas capas dentro de los túbulos, presentando pared con mayor tinción respecto a los espermatocitos y espermatozoides. Presencia de espermatocitos y espermatozoides hacia el lumen de cada túbulo.
III) Madurez	Presencia muy reducida de tejido conectivo sustituido por folículos llenos de gametos en su mayoría maduros. Cada gameto presenta más vitelo que el estadio anterior. En el centro de los folículos existe presencia de algunos ovocitos libres.	Ausencia casi total de tejido adiposo y conectivo. Reducido espacio entre los túbulos seminíferos tanto que sus paredes no se distinguen. Mínima presencia de espermatogonias. Se distinguen bandas algo desordenadas de espermatozoides. Los espermatozoides se ubican hacia el lumen de cada túbulo.
IV) Desove	Reducción considerable de tejido conectivo como unión entre ovocitos y en la mayoría del área gonadal. Pared Folicular rota a causa de la expulsión de gametos. Folículos desocupados, vacíos e incoloros.	Túbulos con paredes rotas y vacíos por la expulsión de gametos. En los folículos capas de espermatozoides no muy densas, desordenadas y espacios vacíos.
V) Post-desove	Dentro de los folículos; presencia de amebocitos fagocitando ovocitos residuales. Presencia de lisis celular e invasión de tejido adiposo y conectivo.	Amebocitos fagocitando espermatozoides residuales dentro de los túbulos seminíferos. Gradual invasión de tejido conectivo con presencia de paredes rotas, deprendidas y espacios vacíos.

⁸⁹ ÁVILA-POVEDA. Op. cit., p. 38.

⁹⁰ OSORNO. Op. cit., p. 79.

⁹¹ OSORNO, *et al.* Op. cit., p. 56.

4.4 DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE LA PERFORACIÓN DE LA CONCHA, TOMA DE BIOPSIA GONÁDICA Y DEL CERRAMIENTO DE LA CONCHA

Se conformaron cinco grupos experimentales de 90 animales cada uno, distribuidos al azar. Los grupos experimentales conformados fueron expuestos a los siguientes tratamientos: T₁) Perforación de concha, toma de biopsia y cerramiento temporal de hueco con una fibra plástica y como material sellante se utilizó masilla comercial (sintesolda®). T₂) perforación de concha, toma de biopsia y cerramiento temporal de hueco con plastilina comercial (Kores®). T₃) Perforación de concha, toma de biopsia y hueco sin cerrar, T₄) perforación de concha sin toma de biopsia y hueco sin cerrar. El grupo control (T₀) consistió en animales no intervenidos (Figura 6). Cada tratamiento se dividió en 3 subgrupos réplica que fueron distribuidos en redes tipo linterna conformadas por diez pisos, fabricadas en malla anudada de polietileno puro de alta densidad con un ojo de malla de 35mm y una abertura lateral cuyo cierre es de tipo nylon (Figura 7). En cada nivel se colocaron un total de 3 animales, un refugio consistente en un trozo de 30 cm de tubo de PVC sanitario de 4 pulgadas y macroalgas de las especies *Padina sp.* ó *Laurencia obtusa*, en una cantidad de 30% del peso húmedo de los animales vivos.

Figura 6. Diagrama esquemático del diseño experimental.

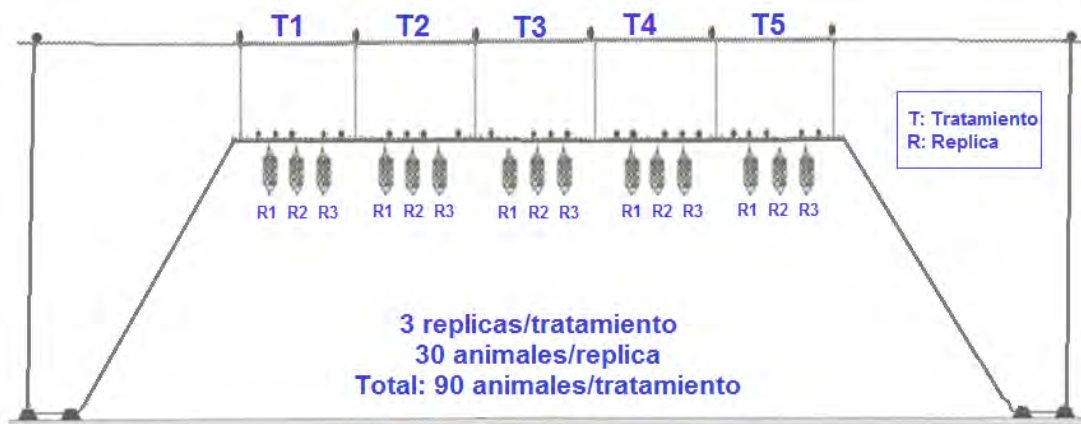
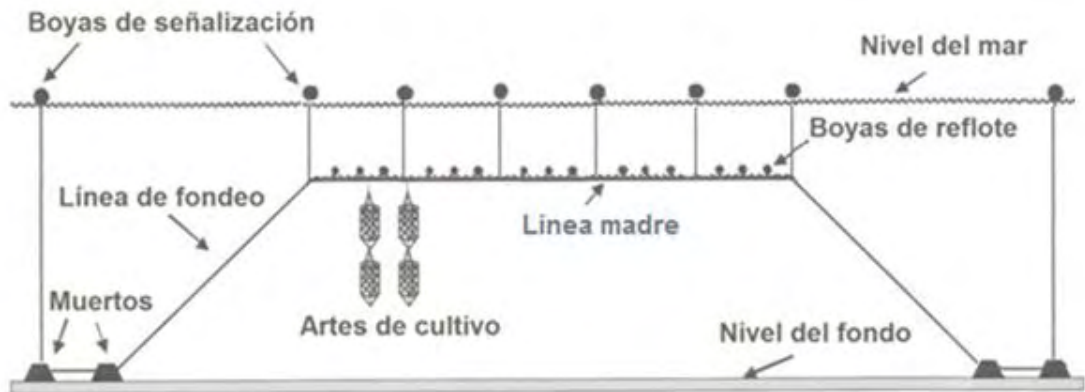


FIGURA 7. Red tipo Linterna.



Posteriormente las redes linterna fueron trasladadas al mar con el apoyo de un buzo y se ubicaron en suspensión a una profundidad de 6m. Con una línea flotante horizontal de 100 m provista de boyas y fondeos (Figura 8).

Figura 8. Sistema de línea larga flotante o long line.



Fuente: Modificado Velasco, 2008.

Las macroalgas usadas como alimento fueron colectadas en la zona del intermareal rocoso de los alrededores de Taganga, transportadas en recipientes

con agua al laboratorio, en donde se lavaron con agua dulce, para eliminar sedimento y epibiontes.

Las biopsias tomadas a los animales de los diferentes grupos experimentales fueron colocadas sobre portaobjetos marcados y se analizaron bajo un microscopio de luz de la misma forma como se explicó anteriormente. El estadio de madurez, se estableció de acuerdo a las escalas desarrolladas en el primer experimento para machos y hembras.

Semanalmente, con el apoyo de una lancha y de un buzo, cada red linterna se sacó del mar y trasladó a Playa Genemaca donde se extrajo el alimento no ingerido y los animales muertos de cada piso, los cuales se guardaron en bolsas rotuladas y se llevaron al laboratorio en una nevera portátil provista de paquetes de hielo. Una nueva ración de alimento de las características antes descritas se dejó en cada piso con animales. Las redes fueron cerradas y se colocaron nuevamente en el mar en su posición original. Una vez en el laboratorio, se pesó el alimento no ingerido y se contaron los animales muertos en cada piso con el propósito de cuantificar la tasa de ingestión y la supervivencia de *C. pica* así:

- Tasa de Ingestión: $(AO - PL) - ANI/T$

Donde:

AO= Alimento ofrecido (gramos).

PL= Perdida por lixiviación (gramos).

ANI= Alimento no Ingerido (gramos).

T= Periodo de evaluación (días).

- Pérdida por Lixiviación: (PL)

Teniendo en cuenta que la cantidad de alimento a ofrecer a los animales es del 30% de su peso húmedo, se depositó una cantidad similar por piso (peso inicial), en una linterna que sirvió de réplica de alimento; ésta se mantuvo sin animales y en iguales condiciones junto a las demás linternas. Transcurridos ocho días se extrajo la cantidad de alimento existente por nivel, y se registró como (peso final). La diferencia entre el peso inicial de alimento y el peso final encontrado en cada uno de los pisos, transcurridos ocho días, se definió como PL.

PL: AI-AF

Donde:

AI: Alimento inicial depositado en cada piso de la linterna sin animales (g)

AF: Alimento final encontrado en cada piso de la linterna sin animales (g)

- Supervivencia: $(Af/Ai)*100$

Donde:

Ai= Número de animales inicialmente colocados en el experimento.

Af= Número de animales al final del periodo de observación.

Semanalmente, se registraron parámetros fisicoquímicos de temperatura del agua, empleando un termómetro de máximos y mínimos (SperScientific 736690 escala de -50/50°C, precisión $\pm 1,0^\circ\text{C}$). Se registró, el pH con un medidor YSI®, precisión con $\pm 0,02$, la salinidad se determinó utilizando un refractómetro portátil (escala 0-100), el oxígeno disuelto (mg/l), con el método de Winkler modificado por Carritt y Carpenter⁹², y el Amonio (mg/l) por el protocolo colorimétrico de Solorzano⁹³.

4.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se hicieron análisis de regresión entre los estadios de madurez determinados por la técnica histológica y cada una de las variables medidas por la técnica de frotis gonadal (tiempo de vida de los espermatozoides, diámetro y densidad de los oocitos). De otro lado, para determinar el efecto de la perforación de la concha, la toma de una biopsia gonádica y del cerramiento de la perforación de la concha sobre la supervivencia y tasa de ingestión de *C. pica* intervenidos, se efectuaron análisis de varianza a una vía (ANOVA). Previo a estos análisis se verificaron los supuestos de homocedasticidad, normalidad e independencia de todas las variables respuesta. Todos estos análisis se llevaron a cabo usando el programa estadístico STATGRAPHICS CENTURION XVI.I. Para todas las decisiones de significancia se empleó un alfa de 0.05.

⁹² STRICKLAND and PARSONS. A practical handbook of seawater analysis, 2nd.ed. Bulletin of the Fisheries Research Board of Canada, 1972. p. 263.

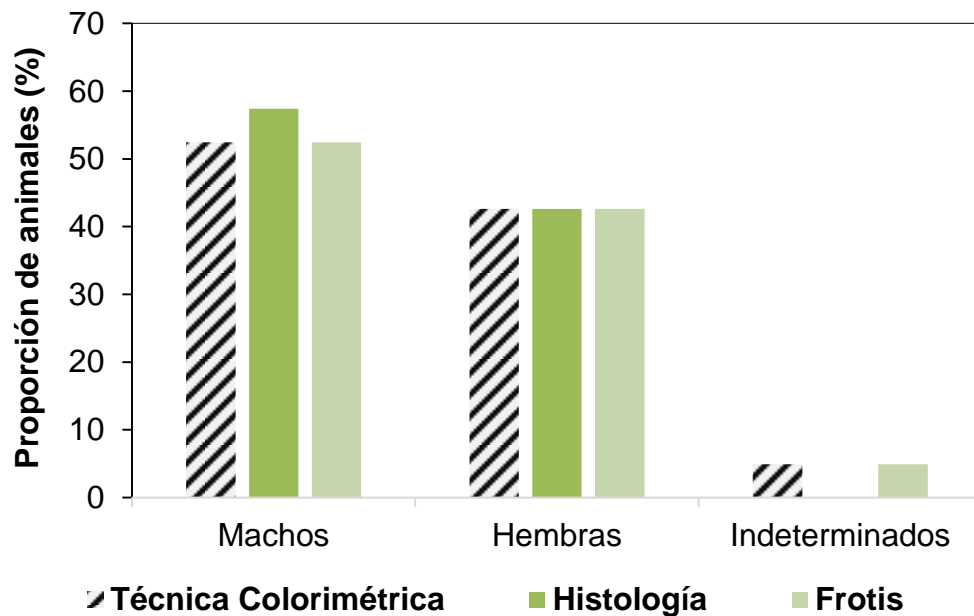
⁹³ SOLORZANO. Determination of ammonia in natural waters by the phenol-hypochlorite method. Limnol. Oceanogr. 1969. p. 799.

5. RESULTADOS

5.1 USO DE LA OBSERVACIÓN MACROSCÓPICA COLORIMÉTRICA Y FROTIS DE BIOPSIA GONÁDICA EN LA IDENTIFICACIÓN DEL SEXO DE *C. pica*

Las proporciones de hembras de *C. pica* hallada por las técnicas de observación macroscópica colorimétrica y frotis de biopsia gonadal fueron exactamente las mismas que las estimada por la técnica histológica: 26 animales equivalentes al 43% de la muestra (Figura 1). Por la técnica de observación macroscópica colorimétrica y frotis de biopsia gonadal fue imposible diferenciar el sexo de una pequeña proporción de individuos (3 animales), los cuales fueron catalogados como indeterminados (animales que por colorimetría gonadal no posibilitaron la identificación sexual). Finalmente, la técnica histológica permitió establecer que ésta fracción de animales correspondía a ejemplares machos, arrojando una proporción de machos del 57% es decir 35 animales en la población muestreada (Figura 1).

FIGURA 1. Proporción sexual de *C. pica* estudiada mediante las técnicas macroscopía colorimétrica, análisis de frotis de biopsia e histología gonadal.



Los análisis estadísticos de chi cuadrado demostraron que no existieron diferencias significativas en las proporciones de organismos machos, hembras e indeterminados identificados por las tres técnicas (Tabla 1).

Tabla 1. Prueba de chi cuadrado para establecer diferencias significativas en la proporción sexual de *C. pica* estudiada mediante las técnicas de macroscopía colorimétrica, análisis de frotis de biopsia e histología gonadal.

TABLA DE FRECUENCIA PARA ANIMALES MACHOS

Clase	Valor	Frecuencia	Frecuencia Relativa	Frecuencia acumulada	Frecuencia Rel. Acum.
1	Machos Macroscopía	32	0,3232	32	0,3232
2	Machos Frotis	32	0,3232	64	0,6465
3	Machos Histología	35	0,3535	99	1,0000

PRUEBA DE BONDAD DE AJUSTE PARA ANIMALES MACHOS

Clase	Valor	Frecuencia Observada	Frecuencia Esperada	Proporción Observada	Proporción Esperada	Contribución a la prueba estadística
1	Machos Macroscopía	32	33,0	0,323232	0,333333	0,030303
2	Machos Frotis	32	33,0	0,323232	0,333333	0,030303
3	Machos Histología	35	33,0	0,353535	0,333333	0,121212

Chi-Cuadrado = 0,181818 con 2 g.l. Valor-P = 0,9131

TABLA DE FRECUENCIAS PARA ANIMALES HEMBRAS

Clase	Valor	Frecuencia	Frecuencia Relativa	Frecuencia acumulada	Frecuencia Rel. Acum.
1	Hembras Macroscopía	26	0,3333	26	0,3333
2	Hembras Frotis	26	0,3333	52	0,6667
3	Hembras Histología	26	0,3333	78	1,0000

PRUEBA DE BONDAD DE AJUSTE PARA ANIMALES HEMBRAS

Clase	Valor	Frecuencia Observada	Frecuencia Esperada	Proporción Observada	Proporción Esperada	Contribución a la prueba estadística
1	Hembras Macroscopía	26	26,0	0,333333	0,333333	0
2	Hembras Frotis	26	26,0	0,333333	0,333333	0
3	Hembras Histología	26	26,0	0,333333	0,333333	0

Chi-Cuadrado = 0 con 2 g.l. Valor-P = 1,0000

TABLA DE FRECUENCIAS PARA ANIMALES INDETERMINADOS

Clase	Valor	Frecuencia	Frecuencia Relativa	Frecuencia acumulada	Frecuencia Rel. Acum.
1	Indeterminados Macroscopía	3	0,5000	3	0,5000
2	Indeterminados Frotis	3	0,5000	6	1,0000
3	Indeterminados Histología	0	0,0000	6	1,0000

PRUEBA DE BONDAD DE AJUSTE PARA ANIMALES INDETERMINADOS

Clase	Valor	Frecuencia Observada	Frecuencia Esperada	Proporción Observada	Proporción Esperada	Contribución a la prueba estadística
1	Indeterminados Macroscopía	3	2,0	0,5	0,333333	0,5
2	Indeterminados Frotis	3	2,0	0,5	0,333333	0,5
3	Indeterminados Histología	0	2,0	0	0,333333	2,0

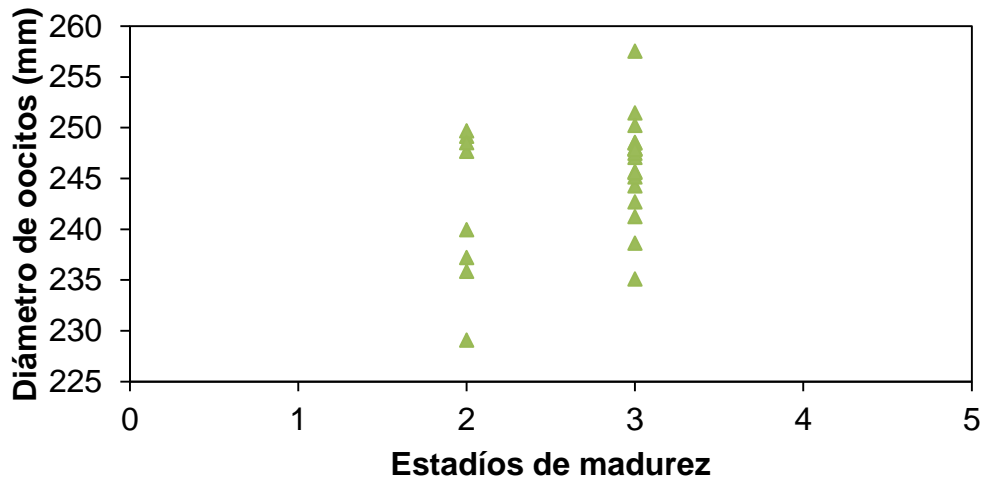
Chi-Cuadrado = 3,0 con 2 g.l. Valor-P = 0,2231

5.2 USO DEL FROTIS DE BIOPSIA GONÁDICA EN LA IDENTIFICACIÓN DEL ESTADÍO DE MADUREZ DE LAS HEMBRAS DE *C. pica*

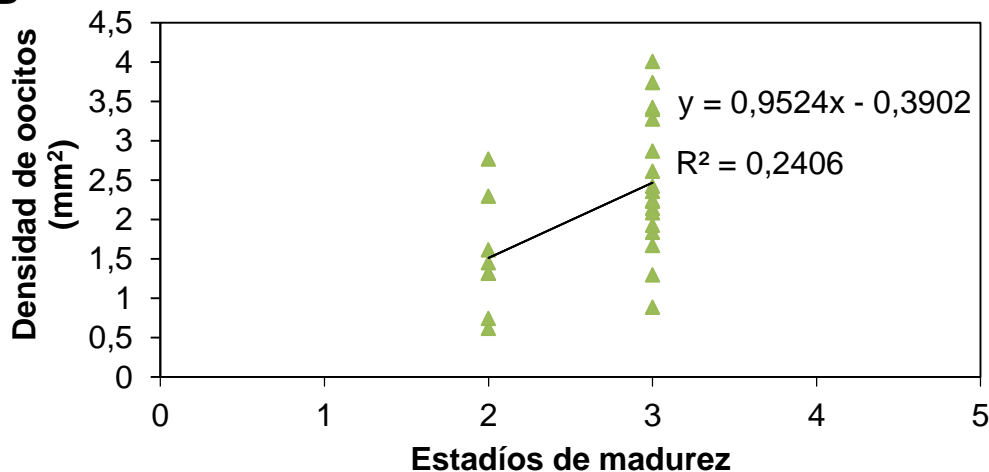
Solo se encontraron hembras en estadios de madurez 2 y 3, siendo ausentes los estadios 1 y 4, de acuerdo a la escala histológica descrita en la metodología. Se observa que los organismos de mayor madurez gonadal (3) estimada por los análisis histológicos presentaron también oocitos con mayores diámetros (245,32 μm) y densidades (2,46 oocitos/ mm^2) estimados mediante la técnica de frotis gonadal (Figura 2).

FIGURA 2. Relación entre el estadio de madurez de las hembras de *C. pica* determinado mediante análisis histológico y el diámetro (A) y densidad de sus oocitos establecidos a partir del análisis de frotis de biopsia gonadal (B).

A



B



El análisis de regresión lineal entre el estadio de madurez de las hembras de *C. pica* determinado mediante análisis histológico y el diámetro de sus oocitos establecido a partir de frotis gonadal indicó que no existe una relación significativa entre estas variables (Tabla 2).

Tabla 2. Análisis de regresión lineal entre el estadio de madurez de las hembras de *C. pica* determinado mediante análisis histológico y el diámetro de sus oocitos establecido a partir del análisis de frotis gonadal.

Parámetros	Estimación por Mínimos cuadrados	Error Estándar	Estadístico T	Valor-P
Intercepto	233,877	6,84253	34,1799	0,0000
Pendiente	4,12944	2,50497	1,6485	0,1123

Análisis de Varianza					
Fuente	Suma de cuadrados	Df	Media de cuadrados	Proporción - F	Valor-P
Modelo	94,4436	1	94,4436	2,72	0,1123
Residual	834,077	24	34,7532		
Total (Corr.)	928,52	25			

Contrariamente, el análisis de regresión entre el estadio de madurez de las hembras de *C. pica* determinado mediante análisis histológico y la densidad de sus oocitos establecido a partir de frotis gonadal demostró una relación positiva significativa en donde los organismos con mayor grado de madurez sexual presentan una mayor densidad de oocitos (Tabla 3).

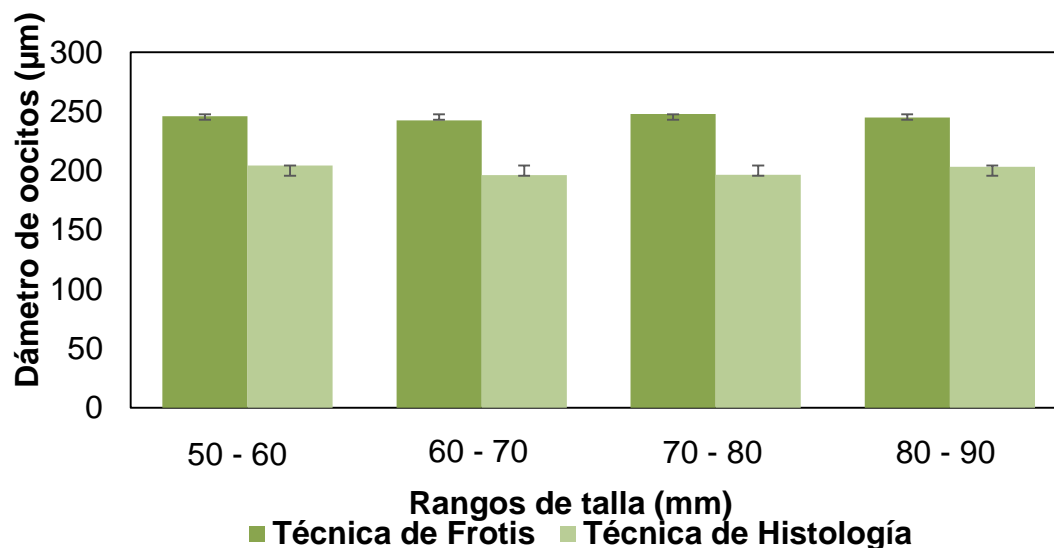
Tabla 3. Análisis de regresión lineal entre el estadio de madurez de las hembras de *C. pica* determinado mediante análisis histológico y la densidad de los oocitos determinada por frotis gonadal.

Parámetros	Estimación por mínimos cuadrados	Error estándar	Estadístico T	Valor-P
Intercepto	-0,390216	0,943334	-0,413656	0,6828
Pendiente	0,952406	0,345343	2,75785	0,0109

Análisis de Varianza					
Fuente	Suma de cuadrados	Df	Media de cuadrados	Proporción - F	Valor-P
Modelo	5,02381	1	5,02381	7,61	0,0109
Residual	15,8527	24	0,660528		
Total (Corr.)	20,8765	25			

El diámetro de los oocitos estimado por la técnica de frotis gonadal osciló entre 229 y 258 μm mientras que el determinado por la técnica histológica estuvo entre 176 y 236 μm para hembras de *C. pica* con diámetros de concha entre 60 y 90 mm (Figura 3).

FIGURA 3. Comparación de la estimación del diámetro de los oocitos de *C. pica* usando las técnicas de análisis de frotis e histología gonadal.



El análisis estadístico a dos vías permitió establecer que la estimación del diámetro de los gametos femeninos no fue afectado significativamente por la talla de las hembras, pero si por la técnica usada, siendo mayores las estimaciones cuando se usó la técnica de frotis que la histológica (Tabla 4).

Tabla 4. ANOVA a 2 vías para establecer el efecto de la talla y la técnica sobre la estimación del diámetro de los oocitos de *C. pica*.

Análisis de Varianza para Diámetro de oocitos - Tipo III Suma de cuadrados

Fuente	Suma de cuadrados	Df	Media de cuadrados	Proporción - F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Talla (mm)	284,505	3	94,8349	0,64	0,5937
B:Técnica (H: histología)(F: frotis)	25696,4	1	25696,4	173,26	0,0000
INTERACCIONES AB	180,059	3	60,0196	0,40	0,7504
RESIDUAL	6525,69	44	148,311		
TOTAL (CORREGIDO)	33127,4	51			

5.3 USO DEL FROTIS DE BIOPSIA GONÁDICA EN LA IDENTIFICACIÓN DEL ESTADÍO DE MADUREZ DE LOS MACHOS DE *C. pica*

La viabilidad de los espermatozoides de machos en estadios de madurez histológica de 0 a 3 y pesos entre 42 y 225 g, osciló entre 0 y 5,5 h (Figura 4). Los machos de *C. pica* con un mayor grado de madurez sexual presentaron mayores tiempos de viabilidad de sus gametos sexuales, verificándose una relación estadísticamente positiva y significativa entre estas dos variables (Tabla 8).

FIGURA 4. Relación entre el estadio de madurez de los machos de *C. pica* determinado mediante análisis histológico y la viabilidad de los espermatozoides establecido a partir del análisis de frotis de biopsia gonadal.

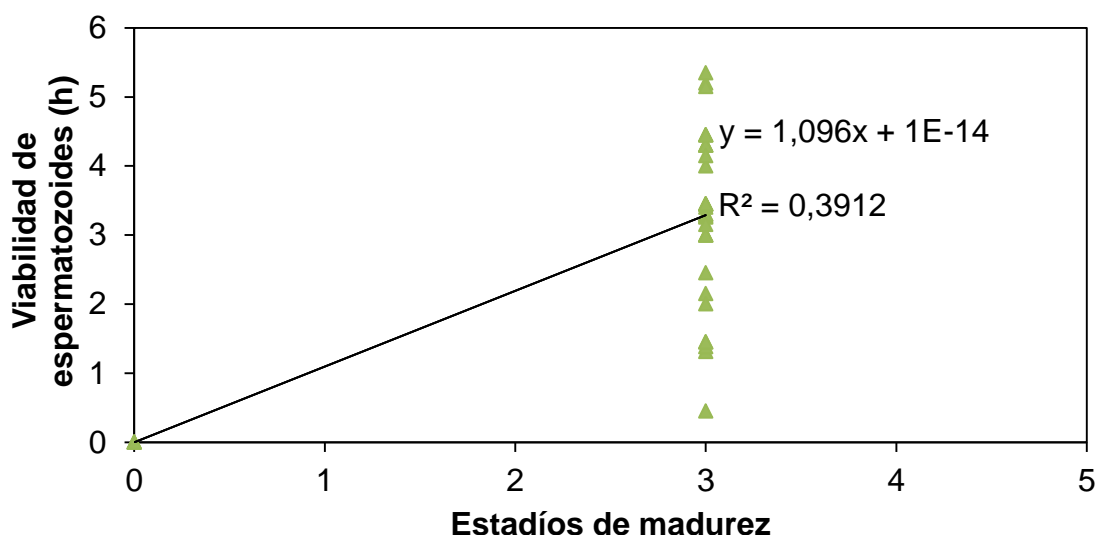


Tabla 8. Regresión Simple entre la viabilidad de espermatozoides y el estadio de Madurez en machos de *C. pica* determinados por histología.

Parámetro	Estimación de mínimos cuadrados	Error estándar	Estadístico T	Valor -P
Intercepto	0	0,68285	0	1,0000
Pendiente	1,10521	0,238047	4,64281	0,0001

Análisis de Varianza					
Fuente	Suma de cuadrados	Df	Media de cuadrados	Proporción - F	Valor -P
Modelo	30,1532	1	30,1532	21,56	0,0001
Residual	46,1622	33	1,39885		
Total (Corr.)	76,3154	34			

5.4 EFECTO DE LA PERFORACIÓN DE LA CONCHA, DE LA BIOPSIA GONÁDICA Y DEL CERRAMIENTO DE LA PERFORACIÓN

La tasa de ingestión de los adultos de *C. pica* osciló entre 1,9 g*dia⁻¹ animal⁻¹ y 4,0 g*dia⁻¹animal⁻¹ (Figura 5A). El análisis de varianza a una vía permitió establecer un efecto significativo del tratamiento sobre la tasa de ingestión de los animales (Tabla 11). Valores significativamente mayores se presentaron en el grupo control y en el grupo de los que se les perforó la concha, se extrajo biopsia y posteriormente su perforación fue cerrada con resina, mientras que valores significativamente menores ocurrieron en los grupos a los que se les perforó la concha, se les extrajo una biopsia, y se cerró la concha posteriormente con plastilina o dejándolos sin cerrar (Tabla 11).

La supervivencia de los animales de *C. pica* osciló entre 3 y 100% (Figura 5B). El análisis de varianza a una vía permitió establecer un efecto significativo del tratamiento sobre la supervivencia de los animales (Tabla 12). Valores significativamente mayores se presentaron en el grupo control, siguiéndole aquellos a los que solamente se les perforó la concha, mientras que los valores más bajos ocurrieron en los grupos a los que se les aplicó biopsia, independientemente de que se les cerrara o no la perforación de la concha (Tabla 12).

FIGURA 5. Efecto de La perforación, toma de biopsia gonádica y cerramiento temporal de la concha sobre la supervivencia y consumo de alimento en adultos de *C. pica*.

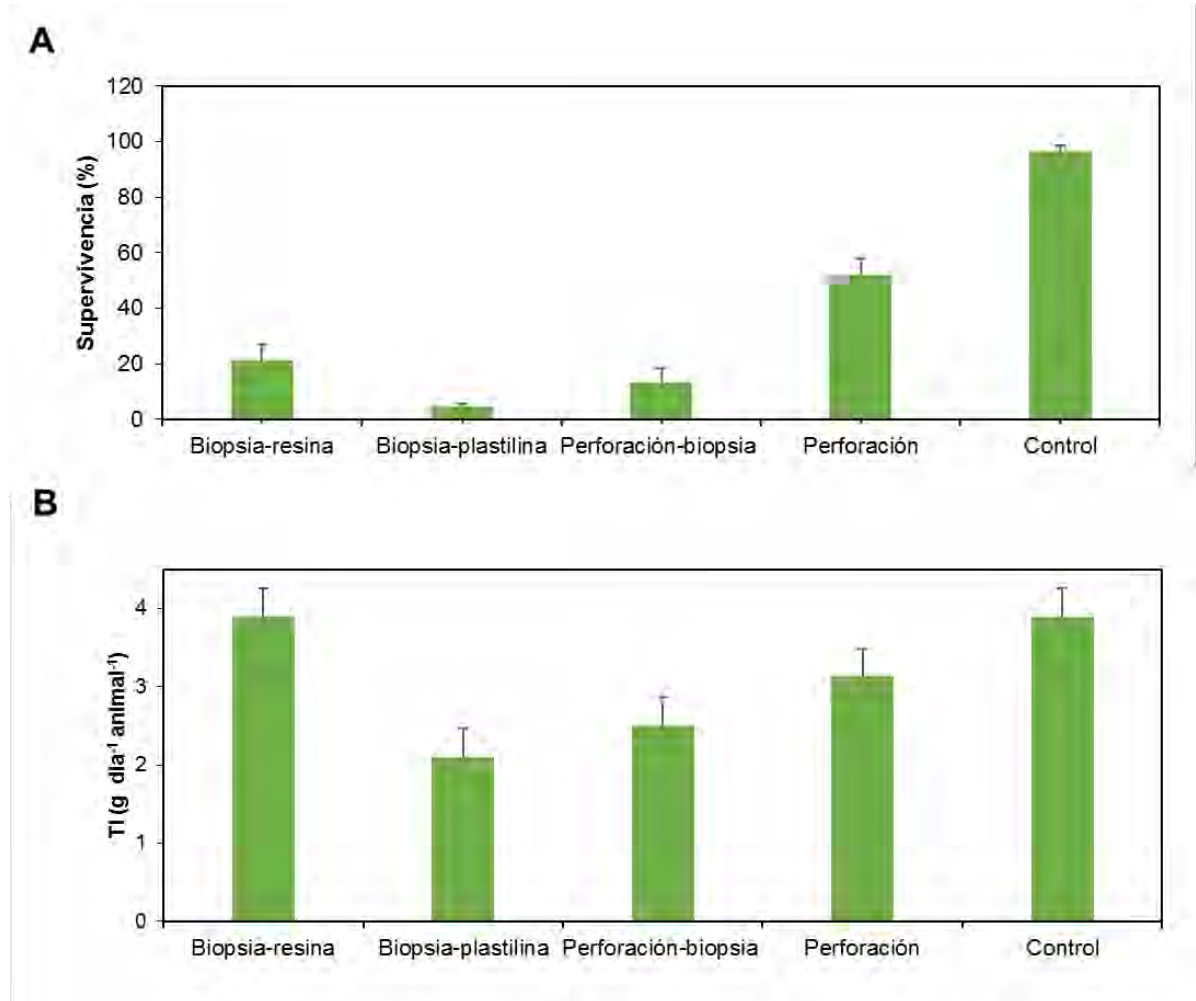


Tabla 11. Análisis de varianza (ANOVA) a una vía para establecer el efecto de los tratamientos de biopsia sobre la Tasa de ingestión de *C. pica*.

TABLA DE ANOVA PARA TASA DE INGESTIÓN POR TRATAMIENTOS

Fuente	Suma de cuadrados	Df	Media de cuadrados	Proporción - F	Valor -P
Entre los grupos	7,65429	4	1,91357	7,04	0,0058
Dentro de los grupos	2,71802	10	0,271802		
Total (Corr.)	10,3723	14			

PRUEBAS DE RANGOS MÚLTIPLE PARA TASA DE INGESTIÓN POR TRATAMIENTO

<i>Tratamiento</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Biopsia-plastilina	3	2,10639	X
Perforación -biopsia	3	2,51172	XX
Perforación	3	3,13051	XX
Biopsia-resina	3	3,86682	X
Control	3	3,8932	X

Tabla 12. Análisis de varianza (ANOVA) a una vía para establecer el efecto de los tratamientos de biopsia sobre la supervivencia de *C. pica*.

TABLA DE ANOVA PARA SUPERVIVENCIA POR TRATAMIENTOS

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	1528,93	4	382,233	73,51	0,0000
Intra grupos	52,0	10	5,2		
Total (Corr.)	1580,93	14			

PRUEBAS DE RANGOS MÚLTIPLE PARA SUPERVIVENCIA POR TRATAMIENTO

<i>TRATAMIENTO</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Biopsia – plastilina	3	1,33333	X
Perforación – biopsia	3	4,0	XX
Biopsia – resina	3	6,33333	X
Perforación	3	15,6667	X
Control	3	29,0	X

6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

6.1 USO DE LA OBSERVACIÓN MACROSCÓPICA CROMÁTICA DE LA GÓNADA Y EL FROTIS DE BIOPSIA GONÁDICA EN LA IDENTIFICACIÓN DEL SEXO DE *C. pica*

La similitud en la proporción de hembras y machos de *C. pica* hallada por las técnicas de observación macroscópica cromática de la gónada, frotis de biopsia gonadal y la histológica sugiere que las dos primeras son viables y confiables para ser usadas en la determinación del sexo de esta especie. Estos resultados coinciden con lo encontrado en otros moluscos como *Acmaea digitalis*⁹⁴, *Gibbula cineraria*⁹⁵, *Haliotis cracheroidii*⁹⁶, *Haliotis rufences*⁹⁷, *Oxystele variegata*⁹⁸, *Pinctada margaritifera*⁹⁹, *Patella kermadecensis*¹⁰⁰ y *Patella vulgata*¹⁰¹.

Las técnicas de observación macroscópica cromática de la gónada y frotis de biopsia gonádica no permitieron diferenciar claramente el sexo de una pequeña fracción de los organismos machos. Esto también ha sido observado previamente en *Acanthina monodon* y *Nassarius coppingeri*¹⁰², *Siliqua patula*¹⁰³, *Trochus niloticus*¹⁰⁴, *Trochus niloticus*¹⁰⁵. En muchos gasterópodos se ha reportado que entran en un periodo de inactividad gametogénica después del desove¹⁰⁶. En este periodo es posible que no aparezcan espermatozoides en el frotis gonadal de los machos, por lo que su identificación solo sea posible mediante la observación de espermatogonias remanentes en los vasos deferentes y espermatozoides de primer orden a través de histología. Dado que esta situación aparentemente sólo la presentan los machos, sería posible establecer que todos aquellos que sean catalogados como indeterminados por las técnicas de observación macroscópica

⁹⁴ FRITCHMAN. A study of the reproductive cycle in the California. Acmaidae (Gastropoda). II. Veliger. 1961. p. 98.

⁹⁵ UNDERWOOD. The Ecology of intertidal Gastropods. Adv. Mar. Bio. 1979. p.175.

⁹⁶ WEBBER and GIESE. Op. cit., p. 153.

⁹⁷ BASTO. Op. cit., p. 117.

⁹⁸ JOSKA and BRANCH. The reproductive cycle of the trochid gastropod *Oxystele variegata* (Antonn, 1939). The Veliger. 1983. p. 42.

⁹⁹ ACOSTA-SALMÓN and SOUTHGATE. Op. cit., p. 90.

¹⁰⁰ CREESE, *et al.* Sex change in a giant endemic limpet, *Patella kermadecensis*, from the Kermadec Islands. Leigh Marine Laboratory, University of Auckland, Private Bag, Auckland, New Zealand. Marine Biology. 1990. p. 424.

¹⁰¹ ORTON, *et al.* Studies on the biology of limpets. Part II. The breeding of *Patella vulgata* L. in Britain. J.mar.biolo. Ass.U.K. 1956. p. 166.

¹⁰² COLLADO y RETAMAL. Impossex en los caracoles marinos *Acanthina monodon* (Pallas, 1774) y *Nassarius coppingeri*. A. Smith, 1881 en el sur de Chile. Cienc. Tecnol. Mar.2010. p. 73.

¹⁰³ BREESE and ROBINSON. Razor clams, *Siliqua patula* (Dixon): gonadal development, induced spawning and larval rearing. Aquaculture. 1981. p. 30.

¹⁰⁴ HOFFSCHIR. Methode devaluation du sexe des trocas vivant en vue d'aquaculture. (A method to determine the sex of live trochus and its application to aquaculture). South Pacific Commission Workshop on Pacific Inshore Fishery Resources, Noumea, New Caledonia. 1988. p. 7.

¹⁰⁵ GIMIN AND LEE. Op. cit., p. 54.

¹⁰⁶ WEBBER Y GIESE. Op. cit., p. 154; WEBBER. Op. cit., p. 57.

cromática de la gónada y frotis de biopsia gonádica podrían ser considerados machos en estado de reposo gametogénico.

6.2 Uso del frotis de biopsia gonádica en la identificación del estadio de madurez de las hembras de *C. pica*

Las mayores estimaciones del diámetro de los oocitos de *C. pica* usando la técnica de frotis de biopsia gonadal en comparación con las obtenidas mediante histología pueden atribuirse a la deshidratación a la que fueron expuestas las muestras de gónadas durante la fijación histológica. Este mismo fenómeno ha sido sugerido para esta misma especie previamente¹⁰⁷ y en *Callista chione*¹⁰⁸. Considerando que las muestras de frotis gonadal fueron colocadas en agua de mar isotónica para ser observadas al microscopio, es poco probable que haya ocurrido un aumento en el diámetro de los oocitos atribuible a la hidratación de los mismos. Luego podría considerarse una medición más confiable del diámetro real de los oocitos, la que se hace mediante frotis gonadal, en lugar de la estimada en las muestras histológicas concordando con lo expuesto por Remacha-Triviño, (2005)¹⁰⁹, quien afirma que la técnica macroscópica es un procedimiento que facilita tener una aproximación del ciclo gametogénico con las ventajas de no necesitar tratamientos químicos (inclusión) además de ser un procedimiento rápido.

La falta de relación entre el diámetro de los oocitos establecido a partir del frotis de biopsia gonadal y el estadio de madurez de las hembras de *C. pica* determinado mediante análisis histológico indica que ésta variable no es confiable para determinar el nivel de madurez de las hembras de esta especie. Esto contradice lo encontrado para *Arca zebra*¹¹⁰, pero coincide con lo reportado previamente para *C. pica*¹¹¹ y *Fissurella crassa*¹¹². El diámetro de los oocitos es un carácter que es afectado no solo por la gametogénesis, la energía que éstos pueden incorporar a los mismos como la proveniente del alimento y de las reservas trasferidas de tejidos como el músculo o la glándula digestiva, juegan un papel fundamental en el tamaño de los oocitos¹¹³. Así mismo, otros factores endógenos y exógenos como

¹⁰⁷ CASTELL. Op. cit., p. 110; BELL. Op. cit., p. 260; OSORNO. Op. cit., p. 104.

¹⁰⁸ METAXATOS. Population dynamics of the venerid bivalve *Callista chione* (L.) in a coastal area of the eastern Mediterranean. J. Sea Res. 2004. p. 301; PÉREZ, et al. Larval growth and development of the smooth clam *Callista chione* (Mollusca: Bivalvia) under laboratory conditions. Ciencias Marinas. 2011. p. 275.

¹⁰⁹ REMACHA-TRIVIÑO. Ciclo reproductivo de *Solen marginatus* (Pulteney, 1799) (Mollusca: Bivalvia) en la ría del Eo (noroeste de España). Bol. Inst. Esp. Oceanogr. 2005. p. 381.

¹¹⁰ ACOSTA, et al. Descripción y variación mensual de las etapas reproductivas de la pepitona *Arca zebra* (Swainson, 1833) en el banco de Chacopata, península de Araya, estado Sucre, Venezuela. Zootecnia Trop. 2011. p. 98.

¹¹¹ DEBROT. Op. cit., p. 457.

¹¹² HUAQUÍN, et al. Op. cit., p. 236.

¹¹³ BARBER and BLAKE. Op. cit., p. 127; MCDONALD and THOMPSON. Influence of temperature and food availability on the ecological energetics of the giant scallop *Placopecten magellanicus*. II. Reproductive output and total production. Marine Ecology Progress Series. 1985. 297; MCDONALD and BOURNE. Growth,

el estrés y las temperaturas extremas pueden hacer que el animal pierda energía y no pueda acumularla en sus oocitos¹¹⁴.

La relación positiva hallada entre la densidad de oocitos de *C. pica* medida en frotis gonadal y su estadio de madurez determinado histológicamente, sugiere que es factible el uso de la densidad de oocitos para la determinación de la madurez sexual de las hembras de esta especie. Este mismo fenómeno ha sido descrito tanto usando histología en: *Haliotis rufescens*¹¹⁵, *Ruditapes philippinarum*¹¹⁶, *Solen marginatus*¹¹⁷, *Tapes philippinarum*¹¹⁸, *Trochus niloticus*¹¹⁹ y *Cittarium pica*¹²⁰; como analizando frotis gonadales en *Pinctada mazatlanica*¹²¹, *Polymesoda solida*¹²² y *Venus verrucosa*¹²³. Luego la mayor densidad de oocitos propia de organismos con gónadas en un mayor estado de madurez se ve bien representada tanto en los análisis histológicos como en los de frotis de biopsias, haciendo viable la utilización de esta última técnica para la estimación de la madurez sexual de las hembras de *C. pica*.

6.3 Uso del frotis de biopsia gonádica en la identificación del estadio de madurez de los machos de *C. pica*

La relación positiva entre el grado de madurez sexual de los machos de *C. pica* y el tiempo de viabilidad de sus gametos sexuales, sugiere que la evaluación del tiempo de viabilidad de los espermatozoides es un buen indicador de su madurez sexual en esta especie. Este indicador de madurez ha sido usado exitosamente en *Trochus niloticus*, junto con la densidad de espermatozoides, reportándose que los

reproductive output, and energy partitioning in weathervane scallops, *Patinopecten caurinus*, from British Columbia. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. 1987. p. 157.

¹¹⁴ TAYLOR and VENN. Seasonal variation in weight and biochemical compositions of the tissues of the queen scallop *Chlamys opercularis*, from the Clyde Sea area. J. Mar. Biol. Assoc. U.K., 1979. p. 619; BARBER and BLAKE. Op. cit., p. 132; VELASCO. Effect of microalgal concentration and water temperature on the physiology of the Caribbean scallops *Argopecten nucleus* and *Nodipecten nodosus*. Journal of Shellfish Research. 2006. p. 829.

¹¹⁵ LEE. Gonadal Development and reproductive cycle of the Top Shell, *Omphalius rusticus* (Gastropoda: Trochidae). Korean Journal of Biological Sciences. 2001. p. 41.

¹¹⁶ DELGADO y PÉREZ-CAMACHO. Comparative study of gonadal development of *Ruditapes philippinarum* (Adams and Reeve) and *Ruditapes decussatus* (L.) (Mollusca: Bivalvia): Influence of temperature. Scientia marina. 2007. p. 480.

¹¹⁷ REMACHA-TRIVIÑO. Op. cit., p. 383.

¹¹⁸ MENEGHETTI, et al. Gametogenic cycle and variations in oocyte size of *Tapes philippinarum* from the Lagoon of Venice. Aquaculture. 2004. p. 472.

¹¹⁹ BRALEY. Op. cit., p. 226; DOBSON and LEE. Op. cit., p. 331; GIMIN and LEE. Op. cit., p. 57.

¹²⁰ OSORNO. Op. cit., p. 103.

¹²¹ SOLANO, et al. Madurez sexual, índice de condición y rendimiento de *Pinctada mazatlanica* (Pterioida: Pteriidae), Golfo de Nicoya, Costa Rica. 1997. p. 1051.

¹²² DE LA HOZ. Somatic condition of the clam *Polymesoda solida* (Veneroidea: Corbiculidae) in the rainy season of the Salamanca Island Natural Park, Colombian Caribbean. Rev. Biol. Trop. 2010. p. 141.

¹²³ ROYO y GÓMEZ. Primeros datos sobre el cultivo de *Venus verrucosa* Linnaeus, 1758 (Mollusca: Bivalvia) en estanque. Bol. Inst. Esp. Oceanogr. 2002. p. 345.

espermatozoides de organismos más maduros logran estimular el desove de las hembras¹²⁴. La motilidad de los espermatozoides está dada por la energía que proveen las reservas de nutrientes de los espermatozoides y las mitocondrias que se encuentran en la base del flagelo¹²⁵. Aparentemente entre mayor es el estado de madurez de los espermatozoides, estos pueden tener mayores reservas de nutrientes que puedan ser catabolizados para que las mitocondrias generen la energía necesaria para moverse por un mayor tiempo y aumentar las probabilidades de fertilizar un oocito.

El tiempo de motilidad de los espermatozoides de *C. pica* en organismos completamente maduros en el presente estudio fue de 5,4 h siendo mayor que los valores reportados para otros gasterópodos como *Haliotis asinina* (2 h)¹²⁶, *Haliotis tuberculata* (2,5 h)¹²⁷, *Haliotis iris* (4h 20 min)¹²⁸.

6.4 Efecto de la perforación de la concha, de la biopsia gonádica y del cerramiento de la perforación

La disminución de la tasa de ingestión obtenida en los animales de *C. pica* a los cuales se les hizo la biopsia y no se les cerró la perforación de la concha, o en aquellos a los que se les cerró la concha con plastilina, sugiere que la exposición de la gónada al medio ambiente luego de la extracción de la biopsia gonadal influye negativamente sobre la condición fisiológica de los ejemplares, evidenciando una situación de estrés. Similares resultados se han reportado en ejemplares de *Trochus niloticus* cuando por equivocación se lacera la gónada mientras se perfora la concha, como técnica para la determinación sexual¹²⁹.

Los menores valores de supervivencia de los ejemplares de *C. pica* a los cuales se les perforó la concha y/o se les extrajo una biopsia, independiente de si la concha era dejada abierta o se cerrada, sugiere que ésta especie es muy sensible a cualquier manipulación de la integridad de su concha y tejidos blandos, generando en ella un fuerte estrés energético o inmunitario que aumenta su

¹²⁴ RAO. On the habitat and habits of *Trochus niloticus* Linn, in the Andaman seas. Rec. Indian Mus. 1937. pp.76; HESLINGA. Growth and maturity of *Trochus niloticus* in the laboratory. Proc. Fourth Int. Coral Reef Symp. 1981. pp. 44. HOFFSCHIR. Op. cit., p. 5.

¹²⁵ FRAZÉN. Comparative morphological investigations into spermiogenesis among Mollusca. Zool. Bidr. Upps. 1955. pp. 443; FRAZÉN. Ultrastructural studies of spermatozoa in three bivalves species with notes on evolution of elongated sperm nucleus in primitive spermatozoa. Gamete Res. 1983. p. 207; SAKKER. Sperm morphology, spermatogenesis and spermiogenesis of three species of chitons (Mollusca, Polyplacophora). Zoomorphology. 104. 1984. p.117; HARPER, et al. The Evolutionary Biology of the Bivalvia. Geological Society. London. Special publications. 2000. p. 173.

¹²⁶ ENCENA et al. Optimal sperm concentration and time for fertilization of the tropical abalone, *Haliotis asinina* Linné 1758. Aquaculture. 1998. p. 349.

¹²⁷ CLAVIER. Fecundity and optimal sperm density for fertilisation in the ormer *Haliotis tuberculata*. In: Abalone of the World. Mexico: Fishing News Books. 1989. p. 91.

¹²⁸ MOSS. Comparing two simple methods to induce spawning in the New Zealand abalone (paua), *Haliotis iris*. New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research. 1995. p. 332.

¹²⁹ DOBSON and LEE. Op. cit., p. 330.

mortalidad. Aunque la perforación de la concha sola o acompañada de la extracción de biopsia y cierre de la concha con resina no ocasionaron una reducción en la tasa de ingestión de *C. pica*, aparentemente si causaron un incremento en el gasto de energía a fin de reparar la concha y/o sus tejidos, a tal nivel, que la energía adquirida del alimento no fue suficiente para que el organismo cumpliera con todos sus requerimientos y se mantuvieran vivos. Estos resultados contradicen las altas supervivencias reportadas para otras especies de moluscos sometidos a la perforación de su concha y/o biopsia gonadal, tales como *Trochus niloticus*¹³⁰, *Tridacna gigas*¹³¹, *Tridacna gigas* y *T. derasa*¹³², *Hippopus hippopus*, *Tridacna gigas*, *T. squamosa* y *T. maxima*¹³³.

Los resultados indican que la técnica de perforación de la concha reduce la supervivencia de los animales en un 50%, mientras que la biopsia la reduce en hasta un 40% adicional, pero si se cierra la perforación de la concha con resina, se logra elevar la supervivencia de los operados en un 10%. Luego, aunque esta técnica ocasiona reducciones importantes en la supervivencia; la optimización de la misma puede hacer viable esta técnica para monitorear el sexo y la madurez gonadal de éstos organismos a fines de implementar un programa de reproducción controlada en laboratorio con fines de repoblación y/o cultivo. Entre las medidas que podrían incrementar la supervivencia están: 1) La utilización de instrumentos quirúrgicos más precisos como agujas hipodérmicas de diferentes calibres y variados ángulos de succión¹³⁴; 2) Mayores medidas asépticas con el instrumental y herida mediante la aplicación de antibióticos y/o desinfectantes como estreptomina o penicilina, los cuales incrementaron la supervivencia de *Fisurella crassa*¹³⁵. 3) Uso de anestésicos como frío o benzocaína que en *Pinctada margaritifera* y *Pinctada fucata* aminoran el estrés durante la intervención¹³⁶. 4) Implementación de un tiempo de recuperación post-intervención en condiciones asépticas de laboratorio a bajas temperaturas¹³⁷. 5) Uso de mejores sistemas de cultivo como tanques en tierra con flujo de agua continuo y presencia de refugios¹³⁸. 6) Suministro de un alimento más nutritivo como biopelículas de microalgas bentónicas, macroalgas y microalgas secas (Imamura, com. Pers)¹³⁹.

¹³⁰ CHAN and LYNCH. *Trochus*: Status, Hatchery Practice and Nutrition Proceed ings of a workshop held at Northern Territory University. 1998. p. 46; DOBSON and LEE. Op. cit., p. 331.

¹³¹ CRAWFORD, *et al.* Spawning induction, and larval and juvenile rearing of the giant clam, *Tridacna gigas*. Aquaculture. 1986. p. 294.

¹³² BRALEY. Op. cit., p. 101.

¹³³ SHELEY. Growth, sclerochronology and development of the Tridacnidae, with particular reference to *Hippopus hippopus*. PhD thesis, James Cook University of North Queensland. 1989. p. 255.

¹³⁴ BRALEY. Reproduction in the giant clams *Tridacna gigas* and *T. derasa* in situ on the north-central Great Barrier Reef, Australia, and Papua New Guinea. Coral Reefs. 1984. p. 225.

¹³⁵ HUAQUÍN, *et al.* Op. cit., p. 221.

¹³⁶ ACOSTA- SALMÓN. Use of a biopsy technique to obtain gonad tissue from the blacklip pearl oyster *Pinctada margaritifera*. 2004. p. 94.

¹³⁷ DOBSON. Preliminary studies of the Induced spawning of *Trochus niloticus* (Linnaeus) using artificial stimuli. Australian Centre for International Agricultural Research. 1997. p. 62.

¹³⁸ ROYO y GÓMEZ. Op. cit., p. 343

¹³⁹ LAMBRINIDIS, *et al.* The food preference of the tropical topshell, *Trochus niloticus* fed on algae from Darwin Harbour. In: *Trochus*: Status, Hatchery Practice and Nutrition Workshop. 1997. p. 106.

7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

7.1 CONCLUSIONES

Las técnicas de observación macroscópica cromática de la gónada y la de frotis de biopsia gonadal brindaron resultados similares a los de los análisis histológicos, por lo que resulta viable y confiable su uso en la determinación del sexo de *C. pica*.

Las estimaciones del diámetro de los oocitos de *C. pica* usando la técnica de frotis de biopsia gonadal fueron mayores y aparentemente más cercanas a la realidad en comparación con las obtenidas mediante histología.

Las determinaciones de estadio de madurez de las hembras de *C. pica* a partir del frotis de biopsia gonadal brindó similares resultados a los hallados por histología cuando se examinó la densidad de oocitos, mas no cuando se utiliza el diámetro de los mismos.

Los estadios de madurez de los machos de *C. pica* hallados a partir de la evaluación del tiempo de viabilidad de los espermatozoides tomados del frotis de biopsia gonadal son similares a los establecidos por la técnica histológica.

La perforación de la concha, extracción de una biopsia gonadal y/o el cierre de la perforación de la concha disminuyen la supervivencia de *C. pica*, mientras que su tasa de ingestión solo disminuye cuando se hace la biopsia y no se cierra la perforación de la concha, o cuando ésta es cerrada con plastilina. Se sugiere entonces cerrar la perforación con resina.

La perforación de la concha, extracción de una biopsia gonadal y el cierre de la perforación de la concha es una técnica que debe ser optimizada para que sea viable para monitorear el sexo o madurez gonadal en organismos vivos.

7.2 RECOMENDACIONES

Al poseer un recurso promisorio como *Cittarium pica* y con mayor razón cuando es objeto de explotación o uso extractivo, se sugiere continuar con estudios sobre la biología reproductiva de la especie con el fin de tener las bases científicas necesarias para promover su cultivo y sostenibilidad a futuro.

Se recomienda el uso de antibióticos como un factor influyente en la disminución del riesgo de infección en animales a los cuales se les perfora su concha y/o se les extrae una biopsia gonadal.

Se sugiere la aclimatación de animales antes de realizar la intervención de su concha o gónada a fin de que se encuentren con bajos niveles de estrés que permitan aumentar su posterior supervivencia.

Es deseable brindar a los animales intervenidos un tiempo de recuperación en condiciones asépticas de laboratorio y baja temperatura para minimizar los riesgos de infección.

Implementar sistemas de cultivo en el mar o en tierra como canaletas con refugios podrían brindar a los animales unas condiciones más apropiadas para sus necesidades de hábitos de vida.

Establecer dietas variadas con micro y macroalgas entregadas dentro de biopelículas con un elevado aporte nutritivo y energético especialmente en ácidos grasos ofrecerían un óptimo desarrollo en condiciones de cautiverio.

Evaluar diferentes clases y dosis de antisépticos para uso durante procedimientos que involucren exposición de tejidos blandos (Biopsia) podría minimizar la posibilidad de infección en animales lacerados, elevando así su supervivencia.

8. BIBLIOGRAFÍA

ACOSTA-SALMÓN, Hector and SOUTHGATE, Paul. Use of a biopsy technique to obtain gonad tissue from the blacklip pearl oyster *Pinctada margaritifera* (L.). 2004. Vol. 35(1), p. 93-96.

AGENCIA UN, Agencia de noticias Universidad Nacional. Caracol cigua en peligro de extinción en San Andrés. Medio ambiente. No. 403. Bogotá D. C. 03, diciembre 2014.

ALDANA ARANDA, Dalila; BAQUEIRO, Erick; MARTÍNEZ, Imelda; ZETINA, Adriana and BRULÉ, Thierry. A Review of the reproductive patterns of gastropod mollusks from Mexico. Bulletin of marine Science. 2003. Vol. 73(3). p. 629-641.

AULT, Jerald. Some quantitative aspects of reproduction and growth of the red abalone, *Haliotis rufescens* Swainson. Journal of Mariculture Society. 1985. Vol.16. p. 398-425.

AVILA DE TABARES, G.; MARTINEZ-RAMIREZ, O. y FRANCO-HERRERA, A. Larvas planctónicas de Lofoforados en la bahía de Gaira, Magdalena, Caribe Colombiano. bol. Invemar, vol.36, n.1, p. 327-332.

AVILA-POVEDA, Omar and BAQUEIRO-CARDENAS, Erick. Reproductive cycle of *Strombus gigas* Linnaeus 1758 (Caenogastropoda: Strombidae) from Archipiélago of San Andres, Providencia and Santa Catalina, Colombia. Journal of Invertebrate Reproduction and Development. 2009. Vol. 53. P- 1-12.

AVILA-POVEDA, Omar. Ciclo reproductivo del caracol Pala *Strombus gigas* Linnaeus 1758 (Gastropoda: Caenogastropoda: Strombidae) del Archipiélago de San Andrés, Providencia y Santa Catalina, Caribe insular colombiano. MSc. tesis, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Mérida. 2004. p. 95.

BAKUS, Gerald. Zonation in marine gastropods of Costa Rica and species diversity. Veliger. 1968. Vol.10. p. 207-211.

BANDEL, Klaus and WEDLER, Eberhard. Hydroid, Amphineuran and gastropod zonation in the littoral of the Caribbean Sea, Colombia. Senck en bergiana Maritima. 1987. Vol.19. p. 1-129.

BAQUEIRO-CÁRDENAS, Erick and ALDANA-ARANDA, Dalila. A review of reproductive patterns of bivalve mollusks from México. Bulletin of Marine Science. 2000. Vol. 66(1). p.13-27.

BAQUEIRO-CÁRDENAS Erick; ALDANA, Dalila and MARTÍNEZ, Gisela. Gonad development and reproductive pattern of fighting conch *Strombus pugilis* (Linee, 1758) (Gastropoda, Prosobranchia) from Campeche, Mexico. Journal of Shellfish Research. 2005. Vol. 24(4) p. 1127-1133.

BARBER, Bruce and BLAKE, Norman. Energy storage and utilization in relation to gametogenesis in *Argopecten irradians concentricus* (Say). Journal Experimental of Marine Biology. 1981. Vol. 52. p.124-133.

----- . Reproductive physiology. En: Shumway, S. E. (ed.), Scallops: Biology, ecology and aquaculture. 1st edition, Elsevier. Netherlands. 1991. p. 378-428.

BASTO, Ana Maria. Identificación del sexo y Desarrollo gonadal en Abulón rojo en cautiverio. Trabajo de tesis Maestría en Ciencias. Programa de posgrado en Ciencias con orientación en Acuicultura CICESE. Ensenada, Baja California Mexico. 2009. 55p.

BELL, Lori. Reproduction and larval development of the West Indian topshell, *Cittarium pica* (Trochidae) in the Bahamas. Bull. Mar. Science. 1992. Vol. 51(2). p. 250-266.

BELMAR-PÉREZ, J.; GUZMÁN DEL PRÓO, S. y MARTÍNEZ-MORALES, I. Madurez gonádica y ciclo reproductor del caracol panocha (*Astraea undosa* Wood, 1828; Gasterópodo: Turbinidae) en Bahía Tortugas, Baja California Sur. An. Inst. Cienc. Del Mar y Limnol. Univ. Nal. Autón. México. 1991. Vol. 18(2) p.169–187.

BERG, David; HAAG, Wendell; GUTTMAN, Sheldon and SICKEL, James. Mantle biopsy: a technique for nondestructive tissue-sampling of freshwater mussels. J. N. Amb. Benthol. Soc. 1995. Vol. 14. p. 577-581.

BORGES, Michela; YOKOYAMA, Leonardo and AMARAI, Antonia. Gametogenic cycle of *Ophioderma januarii*, a common Ophiodermatidae (Echinodermata: Ophiuroidea) in southeastern Brazil. Zoologia. 2009. Vol. 26. p. 118–126.

BRALEY, Richard. Reproduction in the giant clams *Tridacna gigas* and *T. derasa* in situ on the north-central Great Barrier Reef, Australia, and Papua New Guinea. Coral Reefs. 1968. Vol. 3. p. 221-227.

----- . Reproduction condition and season of the giant clams *Tridacna gigas* and *T. derasa* utilizing a gonad biopsy technique. Pages 98-103 in J.W. Copeland and

J. S. Lucas (eds.), Giant clams in Asia and the Pacific, ACIAR Monograph No.9. ACIAR, Canberra. 1988. 154 p.

----- . The Giant Clam: a Hatchery and Nursery Culture Manual ACIAR Monograph No. 15, ACIAR, Canberra. 1992. 144 p.

BREESE, Wilbur and ROBINSON, Anja. Razor clams, *Siliqua patula* (Dixon): gonadal development, induced spawning and larval rearing. Aquaculture. 1981. Vol. 22. p. 27–33.

CAREFOOT, Thomas; TAYLOR, Barbara and DONOVAN, Deborah. Seasonality and digestive gland size and metabolism in relation to reproduction *Haliotis kamtschatkana*. Journal of shellfish Research. 1998. Vol. 17. p. 713-716.

CASTELL, Laura. Algunos aspectos de la biología y ecología de *Cittarium pica* (L.), “Quigua” (Prosobranchia, Trochidae), en el Parque Nacional Archipiélago de los Roques. Trabajo de grado, Facultad de Biología, Universidad Central de Venezuela, Caracas. 1987. 135p.

CLAVIER, J. Fecundity and optimal sperm density for fertilization in the ormer *Haliotis tuberculata* L. In Shepherd, S. A., M. J. Tegner, and S. A. Guzmán del Próo, editors. Abalone of the world: biology, fisheries and culture. Oxford Fishing News Books. 1992. p. 86–92.

COLLADO, Gonzalo; OSORIO, Cecilia y RETAMAL, Marco. Imposex en los caracoles marinos *Acanthina monodon* (Pallas, 1774) y *Nassarius coppingerie*. A. Smith, 1881 en el sur de Chile. Cienc. Tecnol. Mar. 2010. Vol. 33 (1). p. 67-76.

COVARRUBIAS, Alejandra y ROMERO, María. Anatomía del sistema reproductor femenino y masculino de *Sinum cymba* (Menke, 1828) (Gastropoda: Naticidae). Rev. Biol.Mar. Oceanogr. 2009. Vol.44, n.3. p. 673-683.

CRAWFORD, C. M.; NASH, W. J. and LUCAS, J. S. Spawning induction, and larval and juvenile rearing of the giant clam, *Tridacna gigas*. Aquaculture. 1986. Vol. 58. p. 281-295.

CREESE, R. G. Reproductive cycles and fecundities of four common eastern Australian Archaeogastropod limpets (Mollusca: Gastropoda). Aust. J. Mar. Fresh water Res. 1980. Vol. 31. p. 49-59.

CREESE, R. G.; SEHIEL, D. R. and KINGSFORD, M. J. Sex change in a giant endemic limpet, *Patella kermadecensis*, from the Kermadec Islands. Leigh Marine Laboratory, University of Auckland, Private Bag, Auckland, New Zealand. Marine. Biology. 1990. Vol. 104. p. 419-426.

CUÉNOT, L. Études anatomiques et morphologiques sur les ophiures. Arch. Zool. Exp. Gén. 1888. Vol. 6. p. 33–82.

DE LA HOZ, María. Condición somática de la almeja *Polymesoda solida* (Veneroidea: Corbiculidae) durante el periodo lluvioso, en el Parque Natural Isla de Salamanca, Caribe colombiano. Rev. Biol. Trop. 2010. Vol.58. p. 131-143.

DE JONG, Kornelis and COOMANS, Henry. Marine gastropods from Curacao, Aruba and Bonaire. E.J. Brill, Leiden.1988. 261p.

DEBROT, Adolphe. Survival, growth and fecundity of the west indian topshell, *Cittarium pica* (Linnaeus), in various rocky intertidal habitats of the Exuma Cays, Bahamas. The Veliger. 1990. Vol. 33(4). p. 363-371.

DELGADO, Marina and PÉREZ-CAMACHO, Alejandro. Comparative study of gonadal development of *Ruditapes philippinarum* (Adams and Reeve) and *Ruditapes decussatus* (L.) (Mollusca: Bivalvia): Influence of temperature. Scientia marina. 2007. Vol. 71(3). p. 471-484.

DÍAZ, Juan y PUYANA, Mónica. Moluscos del Caribe Colombiano, catalogo ilustrado, Colciencias, Fundación Natura e Invemar, Bogotá. 1994. 291 p.

DOBSON, G. Preliminary studies of the Induced spawning of *Trochus niloticus* (Linnaeus) using artificial stimuli. Australian Centre for International Agricultural Research. 1997. p. 60-63.

DOBSON, G. and LEE, C. L. Improved method of determining the sex of the marine topshell, *Trochus niloticus* (Mollusca: Gastropoda) for spawning. Aquaculture. 1996. Vol. 139. p. 329-331.

DOUROS, William. Stacking behaviour of an intertidal abalone: an adaptive response or a consequence of space limitation. J. Exp. Mar. Biol. Ecol.1987. Vol. 108. p. 1–14.

DUCROS, C. Induction de l'vacuation des produits sexuels chez gibbules. C. R. Seances Biol. Ses Fil. 1957. Vol. 151. 285 p.

ENCENA, V.; CAPINPIN, E.C. and BAYONA, N.C. Optimal sperm concentration and time for fertilization of the tropical abalone, *Haliotis asinina* Linné 1758. Aquaculture. 1998. Vol. 165. p.347-352.

ESTRADA-FLOREZ, E.; PERALTA, Z. L. y RIVAS. M. P. Manual de Técnicas histológicas. AGT. (ed). México. 1982. 140 p.

ETAIX-BONNIN, R. and FAO, B. Country Statement-New Caledonia, p. 43–46. In: Workshop on Trochus Resource Assessment, Management and Development:

Report and selected papers. (Information Section of the South Pacific Commission Fisheries Programme, Ed.). Noumea, New Caledonia: Food and Agriculture Organization, South Pacific Aquaculture Development Project. 1997. 140 p.

FLORES, G. C. y CÁCERES, R. *Cittarium pica* (Linnaeus, 1758) (Achaegastropoda: Trochidae) en las aguas costeras de Venezuela. Bol. Inst. Oceanogr. Venezuela. 1984. Vol. 20 (1–2). p. 57–62.

FRANK, P. W. Shell growth in a natural population of the turban snail, *Tegula funebris*. Growth. 1965a. Vol. 29. p. 395-403.

------. The biodemography of an intertidal snail population. Ecology 46. 1965b. p. 831 – 844.

FRANZÉN, A. Comparative morphological investigations into spermiogenesis among Mollusca. Zool. Bidr. Upps. 1955. Vol. 30. p. 399-456.

------. Ultrastructural studies of spermatozoa in three bivalves species with notes on evolution of elongated sperm nucleus in primitive spermatozoa. Gamete Res. 1983. Vol. 7. p. 199-214.

FRITCHMAN, H. K. A study of the reproductive cycle in the California Acmaidae (Gastropoda). II. Veliger. 1961. Vol. 3. p. 95–101.

GABE. M. Techniques Histologiques. Massan and Cie. Paris. 1968. 239 p.

GARCIA, Francisco; CHANG, Gustavo y PALACIO, Carlos. Calibración y validación de un modelo 3D para el área costera de Santa Marta (Colombia). Rev. Fac. Ing. Univ. Antioquia. 2012. N.º 62. p. 177-188.

GEORGE-ZAMORA, Arturo; SEVILLA-HERNÁNDEZ María y ALDANA-ARANDA Dalila. Ciclo gonádico del ostión americano *Crassostrea virginica* (Lamellibranchia: Ostreidae) en Michoacán, Tabasco, México. Rev. Biol. Trop. 51 Supl. 2003. Vol. 4. p. 109-117.

GERSH, M. Der Genitalapparat und die Sexualbiologie der Nordseetrochiden. Z. Morphol. Oekol. Tiere. 1936. Vol. 31. p. 106 - 150.

GIESE, A. and J. Pearse. Introduction: General principles. En “Reproduction of Invertebrates”. Vol. I. Academic Press, New York. 1974. p. 1-49.

GIESE, A. C. Annual reproductive cycles of marine invertebrates. A. rev. Physiol. 1959. Vol. 21. p. 547–576.

----- . A new approach to the biochemical composition of the molluc's body. Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev. 1969.Vol. 7. p. 175-229.

GIMIN, R. and LEE, C. I. The Reproductive cycle of *Trochus niloticus* in King Sound, Western Australia. In: C.L. Lee and P.W. Lynch, (Eds.). Teochus: status, hatchery practice, and nutrition. Australian Centre for International Agricultural Research. ACIAR Proceedings. 1997. Vol. 70. p. 52-59.

GIORGI, Albert y DEMARTINI, Jhon. A study of the reproductive biology of the red abalone, *Haliotis rufescens* Swainson, near Mendocino, California. Calif. Fish and Game. 1977. Vol. 63(2). p. 80-94.

GRAHAM, Alastair. Observations on the anatomy of some trochacean gastropods. Bull. Mar. Science. 1965. Vol. 15(1). p. 202-210.

GRUBERT, Mark; MUNDY, Craig and RITAR, Arthur. The effects of sperm density and gamete contact time on the fertilisation success of blacklip *Haliotis rubra* and greenlip *Haliotis laevigata* abalone. Journal of Shellfish Research. 2005.Vol. 24. p. 407-413.

HAHN, K. O. Gametogenic cycle of the Japanese abalone (ezoawabai), *Haliotis discus hannai*, during conditioning with effective accumulative temperature. Aquaculture. 1994. Vol. 122. p. 227-236.

----- . Biotic and abiotic factors affecting the culture of abalone. In: Hahn, K. (ed), Handbook of culture of abalone and other marine gastropods. Florida. 1989b. p.113-134.

----- . Gonad Reproductive Cycles. In *The Culture of Abalone and other marine Gastropods.*, (ed. K.O. Hahn). CRC Press, Boca Raton, FL. 1989a. p.13-39.

HARPER, E.; TAYLOR, J. D. and CRAME. A. J. The Evolutionary Biology of the Bivalvia. Geological Society. London. Special publications. 2000. 177 p.

HAWKINS, Martha. Crecimiento y supervivencia de juveniles del "burgao" *Cittarium pica* (Linne 1758), (gastropoda: trochidae) bajo condiciones controladas. Tesis Biol., Univ. del Magdalena, Santa Marta. 2007. p. 56.

HESLINGA, G. A. Growth and maturity of *Trochus niloticus* in the laboratory. Proc. Fourth Int. Coral Reef Symp. 1981. Vol. 1. p. 39-45.

HOFFSCHIR, C. Methode devaluation du sexe des trocas vivant en vue d'aquaculture. (A method to determine the sex of live trochus and its application to aquaculture). South Pacific Commission Workshop on Pacific Inshore Fishery

Resources, Noumea, New Caledonia, March J 4-25. 1988. Information Paper 6,7 pp. Also printed as Note Technique de l'ORSTOM, Noumea. p. 1-8.

HUAQUÍN, Laura; GUERRA, Rosa and BRETOS, Marta. Identificación del sexo y morfología de gametos de la Lapa *Fissurela crassa* Lamarck, 1822 (Mollusca: Archaeogastropoda). Revista de Biología marina y Oceanografía. 1998. Vol. 33(2). p. 223 -239.

JOSKA, Map and BRANCH, Gm. The reproductive cycle of the trochid gastropod *Oxystele variegata* (Antonn, 1939). The Veliger. 1983. Vol. 26(1). p. 47 – 51.

LAMBRINIDIS, G.; LUONG-VAN, J. T. and RENAUD, S. M. The food preference of the tropical topshell, *Trochus niloticus* fed on algae from Darwin Harbour. In: Trochus: Status, Hatchery Practice and Nutrition Workshop. 1997. p. 104-108.

LARGEN, M. J. The influence water Temperature upon the Life of the dog-whelk *Thais lapillus* (Gastropoda: Prosobranchia). J. Anim. Ecol. 1967. Vol. 36. p. 207–214.

LEE, Chan and LYNCH, Peter. Trochus: Status, Hatchery Practice and Nutrition. Proceedings of a workshop held at Northern Territory University. 1998. 185 p.

LEE, Ju Ha. Gonadal Development and reproductive cycle of the Top Shell, *Omphalius rusticus* (Gastropoda: Trochidae). Korean Journal of Biological Sciences. 2001. Vol. 5. p. 37-44.

LEE, Taek Yuil. Histological study of gametogenesis and reproductive cycle in abalones of the Korean coasts. Bull. Pusan fish. Col. 1974. Vol. 14. p. 59-67.

LINDBERG, Dr. and WRIGHT, William. Patterns of sex change of the protandric patellacean limpet *Lottia gigantea* (Mollusca: Gastropoda). Veliger. 1985. Vol. 27. p. 261-265.

LISTA, María; PRIETO, Antulio; VELÁSQUEZ, Carlos; LODEIROS, César; ACOSTA, Vanessa; LONGART, Yelipsa y HERNÁNDEZ, Gilma. Descripción y variación mensual de las etapas reproductivas de la pepitona *Arca zebra* (Swainson, 1833) en el banco de Chacopata, península de Araya, estado Sucre, Venezuela. Zootecnia. Trop. 2011. Vol. 29(1). p. 89-102.

LOVATELLI, A. and Sarkis, S. A regional shellfish hatchery for the Wider Caribbean: Assessing its feasibility and sustainability. FAO Regional Technical Workshop. 18–21 October 2010, Kingston, Jamaica. FAO Fisheries and Aquaculture Proceedings. No. 19. Rome, FAO. 2011. 246 p.

- LUBET, P. Reproduction des mollusques. p. 167-203 in: G. Manotas, V.H. y Mariano, C.P. 2000. Parámetros decrecimiento, supervivencia y tamaño de población de *Cittarium pica* (Mollusca: Gastrópoda) en la ensenada de Gayraca, PNNT, Santa Marta. Tesis Biol., Univ. Atlántico. Barranquilla. 85 p.
- MANOTAS, G. Y MARIANO, V.H. Parámetros decrecimiento, supervivencia y tamaño de población de *Cittarium pica* (Mollusca: Gastrópoda) en la ensenada de Gayraca, PNNT, Santa Marta. Tesis Biol., Univ. Atlántico. Barranquilla. 2000. 85 p.
- MCDONALD, B. A. y THOMPSON, R. J. Influence of temperature and food availability on the ecological energetics of the giant scallop *Placopecten magellanicus*. II. Reproductive output and total production. Marine Ecology Progress Series. 1985. Vol. 25. p. 295-303.
- MCDONALD, B. A. y BOURNE, N. F. Growth, reproductive output, and energy partitioning in weathervane scallops, *Patinopecten caurinus*, from British Columbia. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. 1987. Vol. 44. p. 152-160.
- MCLEAN, Roger. Measurements of beachrock erosion by some tropical marine gastropods. Bull. Mar. Sci. 1967. Vol. 17(3). p. 551-556.
- MENEGHETTI, F., MOSCHINO, V. and DA-ROS, L. Gametogenic cycle and variations in oocyte size of *Tapes philippinarum* form the Lagoon of Venice. Aquaculture. 2004. Vol. 240. p. 473-488.
- METAXATOS, Angelina. Population dynamics of the venerid bivalve *Callista chione* (L.) in a coastal area of the eastern Mediterranean. J. Sea Res. 2004. Vol. 52. p. 293–305.
- MORA, Huaquín. Análisis histológico del ovario de *Concholepas concholepas* (Bruguiere, 1789)(Gastropoda: Muricidae). Biología pesquera, Chile. 1979. Vol. 12. p. 71-77.
- MOSS, Graeme; ILLINGWORTH, Jhon and TONG, Lennard. Comparing two simple methods to induce spawning in the New Zealand abalone (paua), *Haliotis iris*. New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research. 1995. Volume 29. p. 329-333.
- MUGIYA, Yasuo; KOBAYASHI, Jiro; NISHIKAWA, Noboyoshi y MOTOYA, Satoshi. Gonadal maturation in the abalone, *Haliotis discus hannai* at Taisei, Hokkaido. Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ. 1980. Vol. 31(4). p. 306-313.
- MUZAMMIL, Ahmed and GHAZALA, Siddiqui. Histology of gonads and cephalic brood pouch of the marine gastropod *Planaxis sulcatus* of Karachi Coast (Pakistan). Hydrobiologia. 1997. Vol. 350. p. 127-130.

NAJMUDEEN, T. M. Variation in biochemical composition during gonad maturation of the tropical abalone *Haliotis varia*, Linnaeus 1758 (Vetigastropoda: Haliotidae). Marine Biology Research. 2007. Vol. 3(6). p. 454 – 461.

OLIVE, P. J. W. Annual breeding cycles in marine invertebrates and environmental temperature: Probing the proximate and ultimate causes of reproductive synchrony. Journal of Thermal Biology. 1995. Volume 20. p. 79-90.

ORTÍZ-ORDOÑEZ, Esperanza; MENDOZA-SANTANA, Elisabeth; BELMAR-PÉREZ, Jorge and PADILLA-BENAVIDES, Teresita del Niño Jesús. Histological Description of the Male and Female Gonads in *Tegula eiseni*, *T. funebris*, *T. aureotincta*, *T. gallina* and *T. regina* from Bahía Tortugas, B.C.S., Mexico. International. Journal of. Morphology. 2009. p. 691-697.

ORTON, J. H.; SOUTHWARE, A. J. and DODD, J. M. Studies on the biology of limpets. Part II. The breeding of *Patella vulgata* L. in Britain. J.mar.biolo. Ass.U.K.. 1956. Vol. 35. p. 149-176.

OSORNO, Adriana y DIAZ, Juan. Explotación, usos y estado actual de la cigua o burgao *Cittarium pica* (Mollusca: Gastropoda: Trochidae) en la costa continental del Caribe colombiano. Bol. Invest. Mar. Cost. 2006. Vol. 35. p. 133-148.

OSORNO, Adriana. Bioecología de la cigua o burgao *Cittarium pica* (Linnaeus, 1758) (Mollusca: Gastropoda: Trochidae) en la costa continental del Caribe colombiano. Tesis de pregrado en Biología Marina, Universidad Jorge Tadeo Lozano, Santa Marta, Colombia. 2005. 119 p. + anexos.

OSORNO, Adriana; GIL, Diego; y GÓMEZ, Luis. Plan de investigación para la conservación de *Cittarium pica* (L. 1758). Invemar, Serie de publicaciones especiales 16. Santa Marta, Colombia. 2009. 71 p.

PABÓN, Leda. Producción de juveniles del gasterópodo *Cittarium pica* (Linnaeus, 1758) en condiciones de laboratorio. Universidad del Magdalena, Santa Marta. 2013. 68 p.

PEREZ, A. y ROMAN, G. La reproducción en los moluscos bivalvos. En: J. Espinosa de los Monteros & U. Labarta (Eds.). Reproducción en acuicultura. Madrid, España. 1987. 321 p.

PÉREZ-LARRUSCAIN, J.; DELGADO, M. e IGNASI-GAIRÍN, J. Larval growth and development of the smooth clam *Callista chione* (Mollusca: Bivalvia) under laboratory conditions. Ciencias Marinas. 2011. Vol. 37(3). p. 271–277.

POINTIER, J. P. y LAMY, D. Guía de moluscos y caracolas de Mar del Caribe. Editorial M & G difusión. México. 1998. 225 p.

POUTIERS, J. M. y Cipriani, R. Gastrópodos y Bivalvos. p. 29-76. En: Cervigón, F., R. Cipriani, W. Fischer, L. Garibaldi, M. Hendrinckx, A.j. Lemus, R. Marquez, J.M. Poutiers, G. Robaina y B. Rodríguez (eds.). 1992. 513 p.

RANDALL, Hellen. A study of the growth and other aspects of the biology of the West Indian Top shell *Cittarium pica* (Linnaeus). Bull. Mar. Sci. 1964. Vol. 14. p. 424-443.

RAO, H. S. On the habitat and habits of *Trochus niloticus* Linn, in the Andaman seas. Rec. Indian Mus. 1937. Vol. 39. p. 47-82.

REMACHA-TRIVIÑO, A. Ciclo reproductivo de *Solen marginatus* (Pulteney, 1799) (Mollusca: Bivalvia) en la ría del Eo (noroeste de España). Bol. Inst. Esp. Oceanogr. 2005. Vol. 21. p. 375-385.

RIVERA-INGRAHAM, Giorgina; ESPINOSA, Free and GARCÍA-GÓMEZ José. New Records regarding sex change in *Patella ferruginea* (Gastropoda: Patellidae). In: XVI Simposio Ibérico de estudios de biología marina. Sevilla. Spain, 2009.

ROBERTSON, Robert. The edible West Indian Whelk *Cittarium pica* (Gastropoda: Trochidae): natural history with new observations. Proc. Acad. Nat. Sci. Philad. 2003. Vol. 153(1). p. 27-47.

RODRÍGUEZ-GIL, Luis. Distribución de Frecuencia, Relaciones Morfométricas y índices de Componentes del Cuerpo en una Población Adulta del Caracol Blanco, *Strombus costatus* Gmelin, en la Costa de Yucatán, México. -In: 46 Proceedings of the Forty-Sixth Annual Gulf and Caribbean Fisheries Institute. Fort Pierce, Florida USA. 2005. p. 96-118.

ROMÁN, G.; MARTÍNEZ, G.; GARCÍA, O. y FREITES, L. Reproducción. 2001. p. 27-59. En: Maeda-Martínez, A. N. (Ed). Los moluscos pectínidos de Iberoamérica: Ciencia y acuicultura. Editorial Limusa, México D. F. 501 p.

ROSENBERG, G., MORETZSOHN, F. and GARCÍA E. F. Gastropoda (Mollusca) del Golfo de México. 2009. p. 579-699. En: Felder, D.L. y D.K. Camp (eds.), Golfo de México-Orígenes, aguas y biota. La Biodiversidad. Texas A & M Press, College Station, Texas. 2009. 1221 p.

ROYO, A. y GÓMEZ, R. C. Primeros datos sobre el cultivo de *Venus verrucosa* Linnaeus, 1758 (Mollusca: Bivalvia) en estanque. Bol. Inst. Esp. Oceanogr. 2002. Vol. 18. p. 342-348.

SAKKER, E. R. Sperm morphology, spermatogenesis and spermiogenesis of three species of chitons (Mollusca, Polyplacophora). *Zoomorphology*. 1984. Vol. 104. p. 111-121.

SANTOS-VALENCIA, Josefina; MARTÍNEZ, Imelda; ENRÍQUEZ, Martha y ALDANA- ARANDA, Dalila. Ciclo reproductor de *Turbinella angulata* (Mollusca: Gastropoda) en Campeche, Golfo de México. Gulf and Caribbean Fisheries Institute. 2009. Vol. 62. p. 408-414.

-----, 2010. Ciclo Reproductor de *Busycon perversum* (Mollusca: Gastropoda) del Golfo de México. Proceedings of the 63rd Gulf and Caribbean Fisheries Institute. Abst. San Juan de Puerto Rico. 2010. 77p.

SASTRY, A. N. Pelecypoda (excluding Ostreidae). 1979. p. 113-292. In A. C. Giese and J. S. Pearse, Eds., reproduction of Marine Invertebrates. Molluscs: Pelecypods and lesser classes. Academic Press, New York. 1979.

SCHMIDT, S.; WOLFF, M. and VARGAS, J. Population ecology and fishery of *Cittarium pica* (Gastropoda: Trochidae) on the Caribbean coast of Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* 2002. Vol. 50. p. 1079-1090.

SEAPY, R. R. Reproduction and growth in the file limpet, *Acmaea limatula* Carpenter, 1864 (Mollusca: Gastropoda). *Veliger*. 1966. Vol. 8. p. 300-310.

SEED, R. A physiological and biochemical approach to the taxonomy of *Mytilus edulis* L. and *M. galloprovinciales*. Lmk. From S. W. England. Cali. *Biol. Mar.* 1971. Vol. 12. p. 291-322.

SELVAKUMARASWAMY, P. and BYRNE, M. Reproductive cycle of two populations of *Ophionereis schayeri* (Ophiuroidea). In New South Wales. *Mar. Biol.* 1995. Vol. 124. p. 85-97.

SHELLEY, Charles. Growth, sclerochronology and development of the Tridacnidae, with particular reference to *Hippopus hippopus*. PhD thesis, James Cook University of North Queensland. 1989. 266 p.

SOLANO, Yonohide; CABRERA, Jorge; PALACIOS, José y CRUZ, Rafaél. Madurez sexual, índice de condición y rendimiento de *Pinctada mazatlanica* (Pterioida: Pteriidae), Golfo de Nicoya, Costa Rica. 1997. p. 1049-1054.

SOLORZANO, Lucia. Determination of ammonia in natural waters by the phenol-hypochlorite method. *Limnol. Oceanogr.* 1969. Vol. 14. p. 799-801.

- SPARRE, Per and VENEMA, Siebren. Introduction to tropical fish stock assessment. Part 1. Manual FAO. Fisheries Technical Papers, No. 306.1. Roma. 1989. 337 p.
- STEWART, B.G. and MLADENOV, P.V. Reproductive periodicity in the eury alinid snake star *Astrobrachion constrict tumina* New Zealand fiord. Mar. Biol. 1995. Vol. 123. p. 543–553.
- STRICKLAND, J.D.H. and PARSONS, T. R. A practical handbook of seawater analysis, 2nd.ed. Bulletin of the Fisheries Research Board of Canada. 1972. Vol. 167. 310 p.
- TAYLOR, A. C. and VENN, T. J. Seasonal variation in weight and biochemical compositions of the tissues of the queen scallop *Chlamys opercularis*, from the Clyde Sea area. J. Mar. Biol. Assoc. U.K. 1979. Vol. 59. p. 605-621.
- THOMPSON, R. J. y MCDONALD, B. A. Physiological integrations and energy partitioning. En: Shumway (ed). Scallops: Biology, ecology and Aquaculture. Elsevier, Amsterdam. 1991. p. 346-376.
- THORSON, G. Reproductive and larval ecology of marine bottom invertebrates. Biol. Rev. 1950. Vol. 25. p. 1-45.
- TOLLER, W.; GORDON, S. A population survey of the West Indian topshell or whelk (*Cittarium pica*) in the U.S. Virgin Islands. Department of Planning and Natural Resources Division of Fish and Wildlife. St. Thomas, Virgin Islands in internet: <<http://bcrc.bio.umass.edu/vifishandwildlife>>. 2005.
- TOMINAGA, H., NAKAMURA and S., KOMATSU, M. Reproduction and development of the conspicuously dimorphic brittle star *Ophiodaphne formata* (Ophiuroidea). Biol. Bull. 2004. Vol. 206. p. 25–34.
- TOMPA, A. S.; VERDONK, H. and VAN DEN BIGGELAAR, J. A. M. The mollusca. Volume 7: reproduction. Academic Press, Orlando, Fla. 1984. 488 p.
- UNDERWOOD, A. J. The Ecology of intertidal Gastropods. Adv. Mar. Bio. 1979. Vol. 16. p. 110 – 210.
- VAT, L. S. The growth and reproduction of *Patella granularis* (Mollusca: Patellogastropoda) on the Southeast Coast of South Africa. Ph.D. Thesis Rhodes University. 2000. 262 p.
- VELASCO, Luz Adriana. Effect of microalgal concentration and water temperature on the physiology of the Caribbean scallops *Argopecten nucleus* and *Nodipecten nodosus*. Journal of Shellfish Research. 2006. Vol. 25(3). p. 823-831.

----- . 2008. Biología y cultivo de los pectínidos de interés comercial de Colombia. Fondo de publicaciones Universidad del Magdalena, Santa Marta, 258p.

VELASCO, Luz; BARROS, Judith; TRUJILLO, Carlos, GÓMEZ, Javier; ARIAS, Luz; HERNÁNDEZ, Ruth and ROJAS, Jaime. State of shellfish aquaculture on the Caribbean coast of Colombia and potential site for a regional hatchery facility. In A. Lovatelli and S. Sarkis (eds). A regional shellfish hatchery for the Wider Caribbean: Assessing its feasibility and sustainability. FAO Regional Technical Workshop. 2011, Kingston, Jamaica. FAO Fisheries and Aquaculture Proceedings. No. 19. Rome, FAO. 2011. p. 119–132.

VÉLEZ, A. Ciclo anual de reproducción del ostión *Crassostrea rhizophorae* (Guilding) de Bahía de Mochima. Bol. Inst. Oceanogr. Univ. Oriente, 16: 87-98.
Vélez, A., A. Elizabeth y L. Freitas. 1993. Inducción de la reproducción en la viera *Euvola* (Pecten) *ziczac* (Mollusca: Bivalvia) maduración y desove. Caribb. J. Sci. 1977. Vol. 29. p. 209-213.

VÉLEZ-ARELLANO, Nurenskaya; MENDOZA-SANTANA, Laura; ORTIZ-ORDOÑEZ, Esperanza y GUZMÁN DEL PROÓ, Sergio. Ciclo gonádico de *Tegula aureotincta* (Mollusca: Gastropoda) en Bahía Asunción, Baja California Sur, México. Hidrobiológica. 2011. Vol. 21(2). p. 178-184.

VERMEIJ, Geerat. Intraspecific shore-level size gradients in intertidal mollusks. Ecology. 1972. Vol. 53(4). p. 693-700.

VILLALEJO-FUERTE, Marcial y OCHOA-BAEZ, Rosa. El ciclo reproductivo de la almeja Catarina, *Argopecten circularis* (Sowerby, 1835), en relación con la temperatura y el fotoperiodo, en la Bahía Concepción, B.C.S., México. Ciencias Marinas. 1993. Vol. 19(2). p. 181-202.

WASHINTONG-TRYON. For a manual of the mollusca treatise on recent and fossil shells. World Heritage Enciclopedia. On line: <community.worldheritage.or>. 2014.

WEBBER, H. H. Gastropoda: Prosobranchia. In: reproduction of Marine Invertebrates. (Eds. Giese, A. and Pearse, J) Academic Press. 1977. 5(4). p. 1-77.

WEBBER, H. H. and GIESE, A. C. Reproductive cycle and gametogénesis in the black abalone *Haliotis cracherodii* (Gastropoda: Prosobranchiata). Marine Biology. 1969. Vol. 4. p.152-159.

WILLIAMS, P. Los depositos de Bimini, Bahamas. Disponible en internet:<<http://www.shelltrips.com/Bimini/pics.html>>. (Consultado en: Marzo 2014).

WRIGHT, W. G. Densidad media intraespecíficas de cambio de sexo en el territorial patellacean lapa *Lottia gigantea*. Biol. Mar. 1989. Vol. 100. p. 353 -364.

WRIGHT, W. G. and LINDBERG, D. R. A non-fatal method of sex determination for *patellacean gastropods*. J. Mar. Biol. Assoc., UK. 1979. Vol. 59. 803 p.

YOUNG, J. S. and DEMARTINI, J. D. The reproductive cycle, gonadal histology and gametogenesis of the red abalone, *Haliotis rufescens* (Swainson). Calif. Fish & Game. 1970. Vol. 56(4). p. 298-309.

ZETINA, Z. A. I.; ALDANA, A. D.; BRULE, T. y BAQUEIRO-CÁRDENAS, E. Ciclo reproductor e índices de condición usados en *Melongena corona* (Mollusca gastropoda). Biol. Trop. 2000. Vol. 48(1). p. 77-86.