

Tesis Doctoral

# Biología reproductiva y crecimiento de *Brachidontes rodriguezii* (d'Orbigny, 1846) en sustratos duros artificiales en playas arenosas de la provincia de Buenos Aires

Torroglosa, María Eugenia

2015-03-26

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Torroglosa, María Eugenia. (2015-03-26). Biología reproductiva y crecimiento de *Brachidontes rodriguezii* (d'Orbigny, 1846) en sustratos duros artificiales en playas arenosas de la provincia de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Torroglosa, María Eugenia. "Biología reproductiva y crecimiento de *Brachidontes rodriguezii* (d'Orbigny, 1846) en sustratos duros artificiales en playas arenosas de la provincia de Buenos Aires". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2015-03-26.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental

**Biología reproductiva y crecimiento de *Brachidontes rodriguezii*  
(d'Orbigny, 1846) en sustratos duros artificiales en playas arenosas de  
la provincia de Buenos Aires**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos  
Aires en el área: **CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**María Eugenia Torroglosa**

Director de Tesis: Dra. Juliana Giménez

Consejero de Estudios: Dra. Graciela Esnal

Lugar de trabajo: Laboratorio de Biología de Invertebrados Marinos. Instituto de Biodiversidad y Biología Experimental y Aplicada IBBEA, CONICET-UBA.

Buenos Aires, 26 de marzo de 2015.

## Resumen

En las playas arenosas de la provincia de Buenos Aires, la presencia de estructuras como escolleras y muelles ha constituido un sustrato duro alternativo, para el desarrollo de la comunidad bentónica del intermareal rocoso. En la costa bonaerense el mitílido *Brachidontes rodriguezii*, es la especie dominante de esta comunidad denominada mejillinar. En sustratos artificiales de la localidad de Villa Gesell, se ha observado el desarrollo de una población de *B. rodriguezii* característica de las costas rocosas. En este estudio se describió el ciclo reproductivo, la talla de primera madurez sexual y la caracterización morfológica gonadal mediante técnicas histológicas. Se registró actividad gametogénica a lo largo del año en machos y hembras. Se evidenció un período de desove comprendido en los meses de febrero y mayo. Se estudió la espermatogénesis y la morfología del espermatozoide mediante microscopía óptica, electrónica de transmisión y de barrido. El espermatozoide resultó ser de tipo primitivo, como se ha descrito para otras especies del género. Así mismo, como resultado de un estudio comparado en el puero de Mar del Plata, se observaron alteraciones en las células espermatogénicas como resultado a la exposición a factores antropogénicos. El crecimiento, se estudió *in situ*, mediante un método de marcado y recuperación. Se utilizó calceína como marcador y se determinó el incremento de la valva mediante microscopía óptica de fluorescencia. Se observó un crecimiento diferencial en relación con la temperatura, la talla de los ejemplares y su distribución vertical en relación a la exposición al agua.

Palabras clave: *Brachidontes rodriguezii*, biología reproductiva, crecimiento sustrato artificial.

## Abstract

The rocky shore of Buenos Aires province has a dominance of mussel beds *B. rodriguezii*. At sandy beaches, the presence of structures such as docks and piers is an alternative hard substrate for the development of the benthic community of rocky shores. In Villa Gesell town, the development of a population of *B. rodriguezii* proper of rocky shores has been observed in artificial substrates in the dock.

The reproductive cycle and size at first sexual maturity were studied through the histological characterization of the gonad. Males and females with an advanced gonadal development were found throughout both years of study. There was a main spawning event during summer. Size at first sexual maturity was determined during two reproductive periods. Ultrastructure of spermatogenesis and sperm morphology was studied. The sperm morphology is a taxonomic character and can be used in subsequent phylogenetic studies. Our results show that spermatogenesis in *B. rodriguezii* is very similar to that reported in other mytilids. The spermatozoon was of the primitive or ect-aquasperm type. Also alterations in spermatogenic cells as a result of exposure to anthropogenic factors at Mar del Plata harbour were detected and described.

Growth determination was made through a marked and recuperation experiment. For the marking the fluorochrome calcein was used. Growth increment was observed by fluorescence microscopy. There was a relationship between growth, temperature and water exposure and shell length.

**Key words:** *Brachidontes rodriguezii*, reproduction, growth, artificial hard substrate.

Este trabajo fue posible GRACIAS a

Mi directora, Juliana Giménez que me enseñó a confiar y a creer que esto era posible.

Mis compañeros del laboratorio, que son mi familia del laboratorio, Mari, Henry, Vicky, Celes, Juli, Paulas, Vane... Nora, gracias por las sugerencias!

La Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, el Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental y el Instituto de Biodiversidad y Biología Experimental y Aplicada.

El Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas.

El laboratorio de Ecosistemas Costeros del Museo Argentino de Ciencias Naturales

“Bernardino Rivadavia” y su director, el profesor Pablo Penchaszadeh y al Dr. Guido Pastorino.

Mis amigos consejeros y reflexólogos.

Mis viejos y mis hermanos, que me acompañan desde siempre y para siempre, abuelos, tíos, primos y a mi sobrino, mucho de lo que soy tiene que ver con todos ustedes.

Diego... Amor 😊

*Según vamos adquiriendo conocimiento, las cosas no se hacen más comprensibles sino más misteriosas.*

*Albert Schweitzer*

# Índice

1. Introducción .....	7
1.1 Introducción general.....	8
1.2 Objetivos.....	10
2. Área de estudio.....	11
2.1 Área de estudio .....	12
2.2 Toma de muestras de los individuos de <i>B. rodriguezii</i> .....	13
3. Morfología gonadal y gametogénesis .....	17
3.1 Introducción .....	18
3.2 Materiales y métodos .....	20
3.3 Resultados .....	21
3.4 Discusión .....	37
4. Caracterización ultraestructural de la espermatogénesis y del espermatozoide. Alteraciones morfológicas.....	40
4.1. Introducción.....	41
4.2. Materiales y métodos.....	43
4.3. Resultados.....	44
4.4. Discusión.....	55
5. Ciclo reproductivo.....	59
5.1. Introducción.....	60
5.2. Materiales y métodos.....	61
5.3. Resultados.....	64
5.4. Discusión.....	79
6. Talla de primera madurez.....	82
6.1. Introducción.....	83
6.2. Materiales y métodos.....	84
6.3. Resultados.....	86
6.4. Discusión.....	95
7. Crecimiento.....	98
7.1. Introducción.....	99

7.2. Materiales y métodos.....	102
7.3. Resultados.....	108
7.4. Discusión.....	114
8. Conclusiones generales.....	118
9. Bibliografía.....	120
10. Apéndice.....	140
11. Trabajos relacionados con esta tesis.....	142

1- Introducción.

## 1.1 Introducción general

Los moluscos constituyen uno de los grupos de invertebrados marinos más diversos conocido hasta la actualidad. Dentro de los moluscos, los bivalvos (con nueve mil especies conocidas aproximadamente) son el segundo grupo más diversificado después de los gasterópodos (Appeltans *et al.*, 2012).

*Brachidontes rodriguezii* d'Orbigni 1846, es un bivalvo del orden Mytiloidea que pertenece a la familia Mytilidae Rafinesque, 1815 y al género *Brachidontes* Swainson, 1840. Las características morfológicas de la valva de *B. rodriguezii* se corresponden con las descritas para una valva de tipo mitiliforme. Es delgada, de tamaño pequeño a mediano y alcanza aproximadamente 40 milímetros de longitud. El umbo es subterminal redondeado, con denticulos marginales posteriores al ligamento y la charnela presenta entre 5 y 6 denticulos pequeños. La ornamentación externa consiste en cordones radiales muy delgados que pueden bifurcarse y ser interrumpidos por algunas líneas de crecimiento. La superficie externa de la valva se encuentra revestida por una capa de material orgánico que se denomina periostraco (Checa, 2000), en *B. rodriguezii* es por lo general de color marrón claro en la mitad inferior de la valva y más oscuro en la mitad superior, el revestimiento interior de la valva es de color rojizo iridiscente (Adami *et al.*, 2013). Es una especie dioica y la fecundación ocurre en el agua, del huevo se origina una larva velígera libre, nadadora y planctotrófica. Son animales filtradores, se alimentan de partículas que se encuentran suspendidas en el agua como diatomeas y detritos orgánicos. Es una especie que se encuentra fuertemente adherida al sustrato duro, tanto rocas como superficies artificiales, por medio de los filamentos del biso. Estos filamentos, de naturaleza proteica, son secretados por la glándula del biso, que está ubicada en la base del pie. Los filamentos del biso permiten que los individuos soporten los embates de las olas (Penchaszadeh, 1973).

*B. rodriguezii* se encuentra desde la costa sur de Brasil hasta Punta Ninfas (42°46'S; 65° 02'O) en la provincia de Chubut, Argentina (Adami *et al.*, 2007; Ríos, 2009) dentro del área biogeográfica denominada Provincia Argentina (30°-32° S; 41°-44° S) (Balech y Ehrlich, 2008). La Provincia Argentina presenta una predominancia

alternada de masas de agua de la Deriva Cálida Costera y de la corriente cálida de Brasil (Piola y Rivas, 1997).

*B. rodriguezii* es la especie dominante en las costas rocosas del intermareal de la provincia de Buenos Aires (López Gappa *et al.*, 1990; Vallarino *et al.*, 2002; Adami *et al.*, 2008) alcanzando densidades de aproximadamente 170.000 individuos por metro cuadrado (Penchaszadeh, 1973). Monopoliza el sustrato rocoso y puede desplazar a otras especies de organismos sésiles (Adami, 2005). Inclusive, en las playas arenosas de la provincia de Buenos Aires, la presencia de estructuras como escolleras y muelles constituye un sustrato alternativo para el desarrollo de la comunidad bentónica de costas rocosas (Scelzo *et al.*, 1996).

*B. rodriguezii* es comúnmente denominado mejillín y forma extensas agrupaciones con altas densidades de individuos denominadas mejillinar. Estas agrupaciones constituyen matrices complejas con numerosas capas o estratos de individuos de diferentes edades y tamaños que se mantienen adheridos unos a otros mediante los filamentos del biso (Alvarado y Castilla, 1996; Guiñez y Castilla, 1999; Commito y Rusignuolo, 2000). Estas matrices generan microambientes con propiedades físicas ligeramente diferentes del ambiente que rodea la matriz, por ejemplo, en su interior, la intensidad de la luz y acción de las olas es reducida y la retención de sedimento propicia un aumento de la humedad (Seed y Suchanek, 1992). A medida que aumenta la complejidad de las matrices se observa un incremento en la diversidad y riqueza de especies (Günther, 1996). La comunidad constituida por los mejillines, las algas y los macroinvertebrados (nemertinos, poliquetos, crustáceos) muestra fluctuaciones temporales en abundancia y diversidad. Existen numerosas publicaciones que contribuyen al conocimiento de la dinámica de esta comunidad (Penchaszadeh, 1973; Nugent, 1989; Vallarino *et al.*, 2002; Penchaszadeh *et al.*, 2007; Adami *et al.*, 2008; Calcagno *et al.*, 2012; Arribas *et al.*, 2013). La diversidad de especies de la comunidad varía con la disposición espacial (plano horizontal y plano vertical) donde se observa que en el plano vertical hay mayores fluctuaciones durante el año que en el plano horizontal. Así como también se registran cambios en la estructura de la comunidad como consecuencia del aumento de la materia orgánica disuelta y la disminución de la salinidad (Adami *et al.*, 2004; Adami, 2005; Elías *et al.*, 2006;). Se han realizado estudios acerca de los cambios de la

dinámica poblacional de *B. rodriguezii* frente a disturbios antropogénicos (López Gappa *et al.*, 1990; Vallarino *et al.*, 2002; Elías *et al.*, 2009), así como, estudios relacionados con aspectos morfológicos y taxonómicos de *B. rodriguezii* (Van der Molen *et al.*, 2012; Adami *et al.*, 2013; Trovant *et al.*, 2013). Sin embargo, el conocimiento acerca de aspectos de la biología reproductiva (ciclo reproductivo, la talla de primera madurez sexual, la caracterización morfológica gonadal) y del crecimiento es escaso. Este conocimiento es fundamental para el entendimiento de la biología de *B. rodriguezii* que, además, resulta ser la especie dominante de la comunidad del intermareal rocoso en la provincia de Buenos Aires y norte de la Patagonia.

## 1.2 Objetivos

El objetivo general de este trabajo fue estudiar aspectos de la biología reproductiva relacionados con la talla y la variación estacional, así como el crecimiento de *Brachidontes rodriguezii*.

### Objetivos específicos

- 1) Describir la morfología gonadal de machos y hembras en base a la caracterización histológica.
- 2) Describir la espermatogénesis y la morfología del espermatozoide mediante microscopía electrónica.
- 3) Estudiar el ciclo reproductivo. Determinar la temporada de reproducción, relacionar con cambios morfológicos a nivel gonadal y variables como la temperatura superficial del agua y el fotoperíodo.
- 4) Determinar la talla de primera madurez sexual a través de estudios histológicos.
- 5) Estudiar la variación del crecimiento en un sustrato artificial en relación con la temperatura, la exposición a condiciones de inmersión y la talla de los individuos.

2- Área de estudio.

## 2.1 Área de estudio

El área de estudio y muestreo incluyó la localidad de Villa Gesell en el partido homónimo ( $56^{\circ} 53' O$ ;  $37^{\circ} 16' S$ ) y la ciudad de Mar del Plata ( $57^{\circ} 33' O$ ;  $38^{\circ} 00' S$ ) en el partido de General Pueyrredón (Figura 2. 1) ambas en la costa este y sureste de la provincia de Buenos Aires.



**Figura 2. 1.** Áreas de estudio y distribución de *Brachidontes rodriguezii* (sombreado en amarillo) para la costa argentina.

La localidad de Villa Gesell se encuentra sobre una planicie costera constituida durante el holoceno (Violante, 1990). La costa presenta playas constituidas por arena

mediana a fina (Marcomini y López, 1997). Las playas están expuestas a la acción del oleaje que incide del sur y del sureste, dando origen a una corriente de deriva litoral con dirección noreste. Las mareas son de tipo semidiurnas, es decir, hay 2 pleamares y 2 bajamares en un día (Perillo, 1979). La amplitud de marea máxima es de 1,30 m y la promedio es de 0,69 m (Servicio Hidrografía Naval 2012). El nivel del mar también puede ser modificado por las tormentas produciendo una movilización de arena desde la porción más alta de la playa emergida hacia la playa sumergida (Komar, 1976). De la combinación de un sistema de alta presión, ubicado sobre el océano Atlántico que transporta aire frío desde la Patagonia hacia el este de la provincia de Buenos Aires, y un sistema de baja presión que se encuentra en el centro y sur de la región mesopotámica que aporta aire caliente y húmedo. Surge un fenómeno meteorológico denominado sudestada, caracterizado por vientos fuertes del sudeste, que pueden estar acompañados por lluvia o no (Servicio Meteorológico Nacional, 2003). La incidencia de sudestadas en la costa de la provincia de Buenos Aires, puede elevar el nivel del mar hasta 2 metros. Ocurren todo el año, pero son más frecuentes a fines del invierno y principio de la primavera y el verano. La localidad de Villa Gesell cuenta con un muelle de pescadores cuya construcción comenzó en 1971. El mismo mide 150 metros de largo y tiene una altura de 8 metros. Ha constituido un sustrato artificial que permitió el desarrollo de la comunidad del mejillinar.

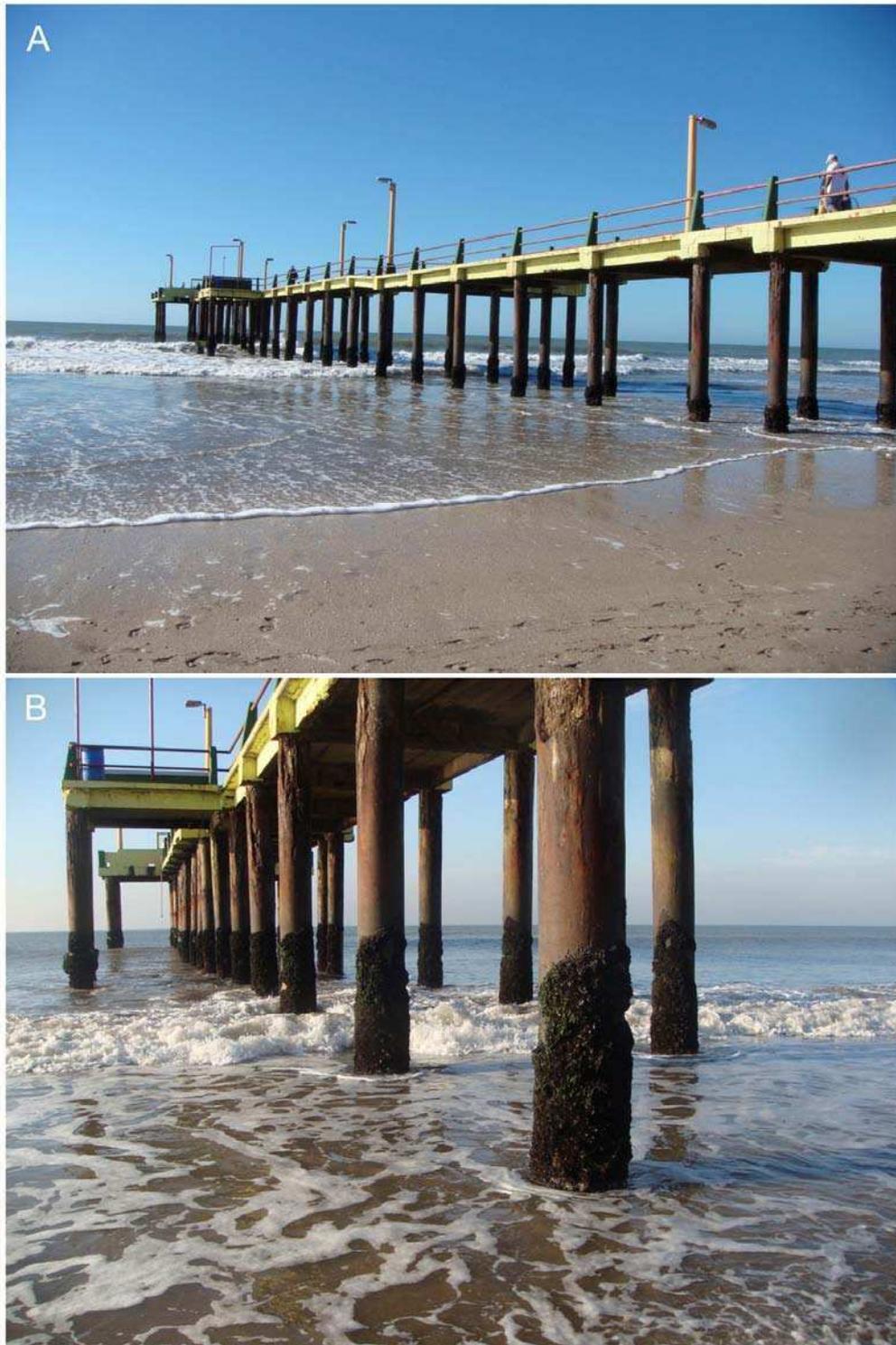
Dentro de la ciudad de Mar del Plata se realizaron muestreos en el puerto ( $57^{\circ} 31'O$ ;  $38^{\circ} 01'S$ ). El mismo es un puerto artificial encerrado por dos importantes escolleras (norte y sur). Es un puerto marítimo de ultramar, su actividad principal es la pesca. Como actividades secundarias, el transporte de cereales, de petróleo y el turismo.

## 2.2 Toma de muestras de individuos de *Brachidontes rodriguezii*

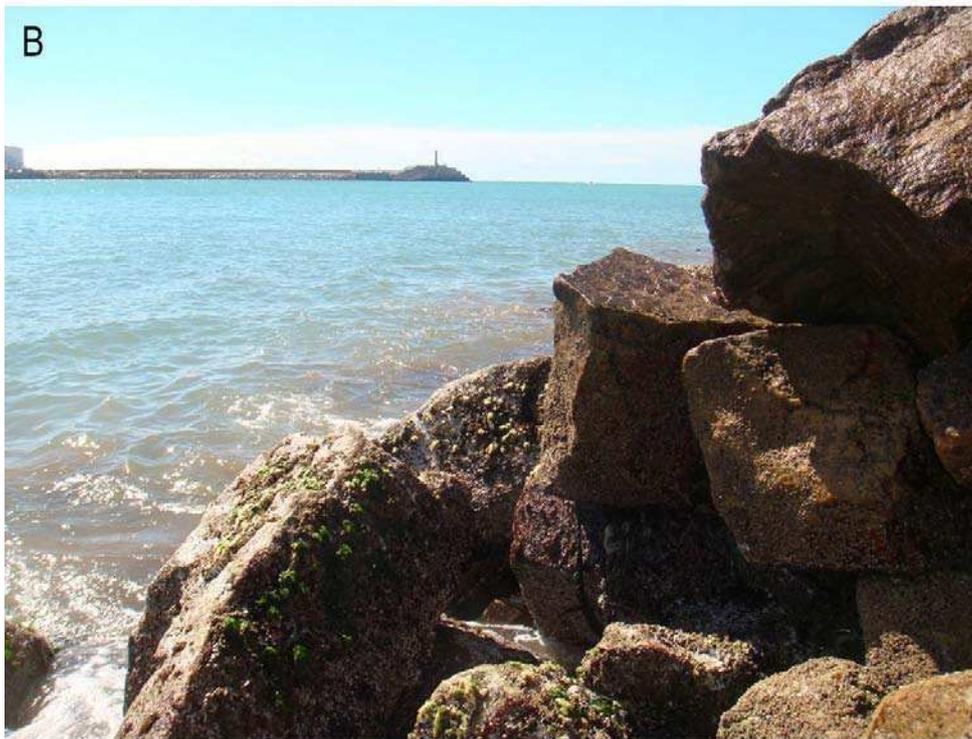
Se realizaron 24 muestreos mensuales y consecutivos durante el período mayo 2011- mayo 2013 en el muelle de Villa Gesell. En cada muestreo se registraron parámetros físicos ambientales: temperatura del agua con termómetro de precisión  $0,5^{\circ} C$  y salinidad con salinómetro. Durante la marea baja se removieron con espátula

porciones de la matriz (parches) que constituye *B. rodriguezii* (Figura 2. 2A) de la parte inferior (en adelante estrato inferior) de las columnas del muelle ubicado en la playa frontal (Figura 2. 2B). De esas muestras se separaron individuos de *B. rodriguezii* que posteriormente fueron fijados en solución de Bouin.

En el puerto de Mar del Plata se realizaron dos muestreos mensuales durante los meses de junio y julio de 2013 (Figura 2. 3A y B). Los individuos recolectados fueron medidos con calibre de precisión de 0,01 mm, se retiraron las valvas y se fijaron porciones de la gónada en glutaraldehído 2,5% durante 4 horas.



**Figura 2. 2.** Área de estudio en la localidad de Villa Gesell. **A.** Muelle de pescadores. **B.** Detalle de la disposición de *B. rodriguezii* en las columnas del muelle.



**Figura 2. 3.** Área de estudio en el puerto de Mar del Plata. **A.** Fotografía del puerto tomada desde la escolera sur. **B.** Fotografía de la cara interna de la escolera sur, donde se disponen los parches de *B. rodriguezii*.

### 3- Morfología gonadal y gametogénesis.

### 3.1 Introducción

En los bivalvos, la gónada es de origen mesodérmico y se origina en la porción posterior del cuerpo, próxima al ganglio visceral y por debajo de la cavidad pericárdica. Siendo en su origen una estructura par y simétrica, a medida que se desarrolla conforma una estructura constituida por numerosos túbulos y acinos (Sastry, 1979), va penetrando en la masa visceral, rodeando al estómago, la glándula digestiva, desplaza al tejido conectivo de los pliegues del manto hasta alcanzar su volumen máximo previo a la reproducción (Barber *et al.*, 2005; Franco *et al.*, 2008). En los bivalvos el tejido conectivo del manto posee importantes funciones fisiológicas, se encuentra altamente irrigado y almacena sustancias (lípidos, glucógeno y proteínas) en células especializadas llamadas vesiculares y adipogranulares (Lubet, 1959; Lowe *et al.*, 1982; Mathieu y Lubet, 1993; Villalva, 1995). Ambos tipos celulares almacenarían nutrientes necesarios para el desarrollo de las gametas (Pipe, 1987a; Gimeno *et al.*, 1991; Mathieu y Lubet, 1993).

Existe una relación entre el desarrollo del tejido conectivo y el tejido gonadal. Durante la gametogénesis, las sustancias de reserva energética (en particular, el glucógeno) almacenados en el tejido conectivo serían direccionadas hacia los acinos gonadales. Sumado a los cambios en la gónada, ocurre en simultáneo el ciclo de acumulación de sustancias de reserva en el tejido conectivo (Gabbott, 1975; Bayne *et al.*, 1982; Lowe *et al.*, 1982). Además, existen evidencias de que la glándula digestiva también estaría involucrada en el suministro de energía durante el desarrollo gonadal (Pérez *et al.*, 2013).

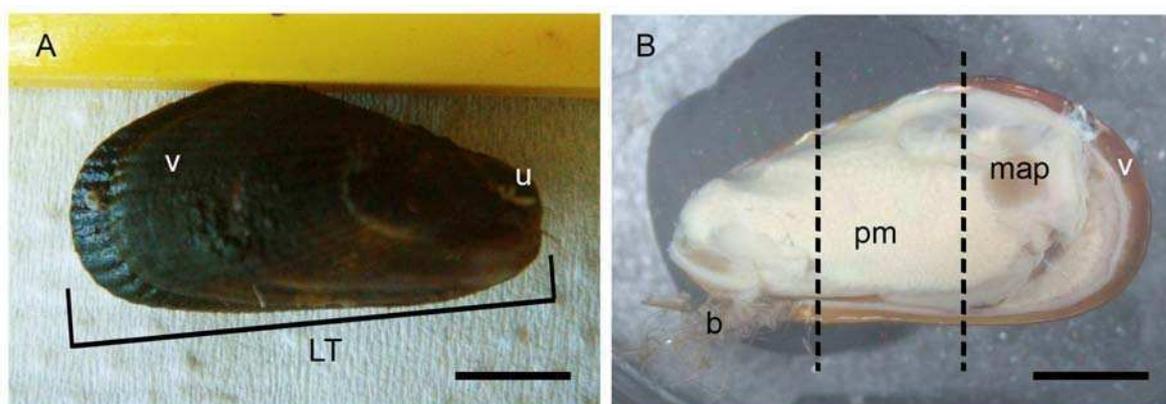
La espermatogénesis y la oogénesis constituyen aspectos fundamentales dentro de la biología reproductiva y han sido estudiados en numerosas especies de moluscos, en particular en especies de importancia económica (Pipe, 1987b; Bernard *et al.*, 1988; Dorange y Le pennec, 1989a, b; De Gaulejac *et al.*, 1995; Eckelbarguer y Davies, 1996; Erkan y Sousa, 2002; Franco *et al.*, 2011). La oogénesis puede ser folicular o solitaria. Se considera oogénesis folicular cuando hay un epitelio de células somáticas que rodea al oocito por completo durante su maduración (Jong-Brink *et al.*, 1983; Ituarte, 2009). Estas células somáticas son comúnmente llamadas foliculares y mantienen aislado al oocito del medio intracinar. Dentro de los moluscos, la oogénesis

de tipo folicular se encuentra en poliplacóforos y cefalópodos (Ituarte *et al.*, 2010; Laptikhovsky y Arkhipkin, 2001; Vélez-Arellano *et al.*, 2014), mientras que en bivalvos, la oogénesis suele ser de tipo solitaria (Raven, 1958; Sastry, 1979). En este caso, hay escasas células somáticas rodeando al oocito. Algunos autores sugieren que estas células migrarían desde la pared hacia el interior del acino (Dorange y Le pennec, 1989a). Estas células rodean por completo al oocito durante la diferenciación, al comienzo de la vitelogénesis y conforme el oocito madura, se desplazan dejando al oocito libre en el lumen del acino (Pipe, 1987b; Erkan, 2009; De Gaulejac *et al.*, 1989; Bernard *et al.*, 1988). Cuando culmina la vitelogénesis los oocitos maduros son liberados. Puede ocurrir que la evacuación de gametas no sea completa, dando lugar a fenómenos de degradación y atresia como se han observado para *Mytilus edulis* (Pipe, 1987b) y *Mytilus galloprovincialis* (Suárez Alonso *et al.*, 2007). Pérez *et al.* (2013) menciona eventos de atresia únicamente para hembras de *Aulacomya atra*, durante la primavera coincidiendo con la temporada reproductiva. Mientras que Suarez *et al.* (2007) sugieren que la dificultad de detectar degradación y atresia en machos es una consecuencia del tamaño reducido de las gametas masculinas. Luego de la evacuación puede ocurrir una disminución de la actividad gametogénica (Vinuesa, 1981; Darriba *et al.*, 2004; Barber *et al.*, 2005; Ángel-Pérez *et al.*, 2007).

En la gónada masculina, el epitelio espermatogénico es de tipo estratificado. Las células espermatogénicas se clasifican en: espermatogonias, espermatocitos, espermatidas y espermatozoides. La maduración celular es de tipo centrípeta, los diferentes estadios se distribuyen en capas (en algunos casos pueden encontrarse agrupadas) las espermatogonias se encuentran próximas a las células de la pared del acino, seguidas por los espermatocitos y las espermatidas, mientras que, los espermatozoides suelen estar agrupados en numerosos sitios en el lumen del túbulo. Junto con las células gametogénicas, se encuentran células somáticas denominadas accesorias. Este tipo celular suele encontrarse cerca de los espermatozoides, por lo que se cree que participarían de la espermatogénesis (Eckelbarguer y Davies, 1996). Los objetivos de este capítulo fueron caracterizar la morfología gonadal de hembras y machos de *B. rodriguezii* así como, los estadios celulares que comprenden la oogénesis en las hembras de *B. rodriguezii*.

### 3.2 Materiales y métodos

Se tomaron muestras de 826 individuos de Villa Gesell previamente fijados en solución de Bouin. Se registró la medida del largo total (LT) con calibre de precisión de 0,01 mm (Figura 3. 1A). Se removieron las valvas y se realizaron cortes transversales en dos zonas de la porción media del individuo (Figura 3.1B). Estas porciones transversales de individuos completos fueron deshidratadas en una serie de alcohol etílico de gradación creciente (80°, 90° y 96°) y fueron embebidas en historesin. Se realizaron cortes histológicos de 5  $\mu$ m y semifinos de 1  $\mu$ m. Se utilizó hematoxilina de Carazzi y Eosina alcohólica para colorear los cortes histológicos y azul de toluidina para los corte semi finos (Ver Apéndice). Mediante la observación de cortes histológicos se corroboró el sexo de los individuos y se consideraron para éste capítulo 50 individuos entre machos y hembras de un rango de tallas de entre 15 y 22 mm, que presentaban acinos gonadales en los pliegues del manto.



**Figura 3. 1. A.** Vista externa derecha de un individuo completo de *B. rodriguezii*. **B.** Vista lateral izquierda de un individuo sin valva, nótese los filamentos el biso, el pliegue del manto, el músculo aductor posterior y el borde de la valva derecha. Detalle de la sección transversal (entre líneas discontinuas) utilizada para realizar los cortes histológicos. Referencias: (b) filamentos del biso; (LT) largo total del individuo; (map) músculo aductor posterior; (pm) pliegue del manto; (v) valva; (u) umbo. Escalas A y B: 5 mm.

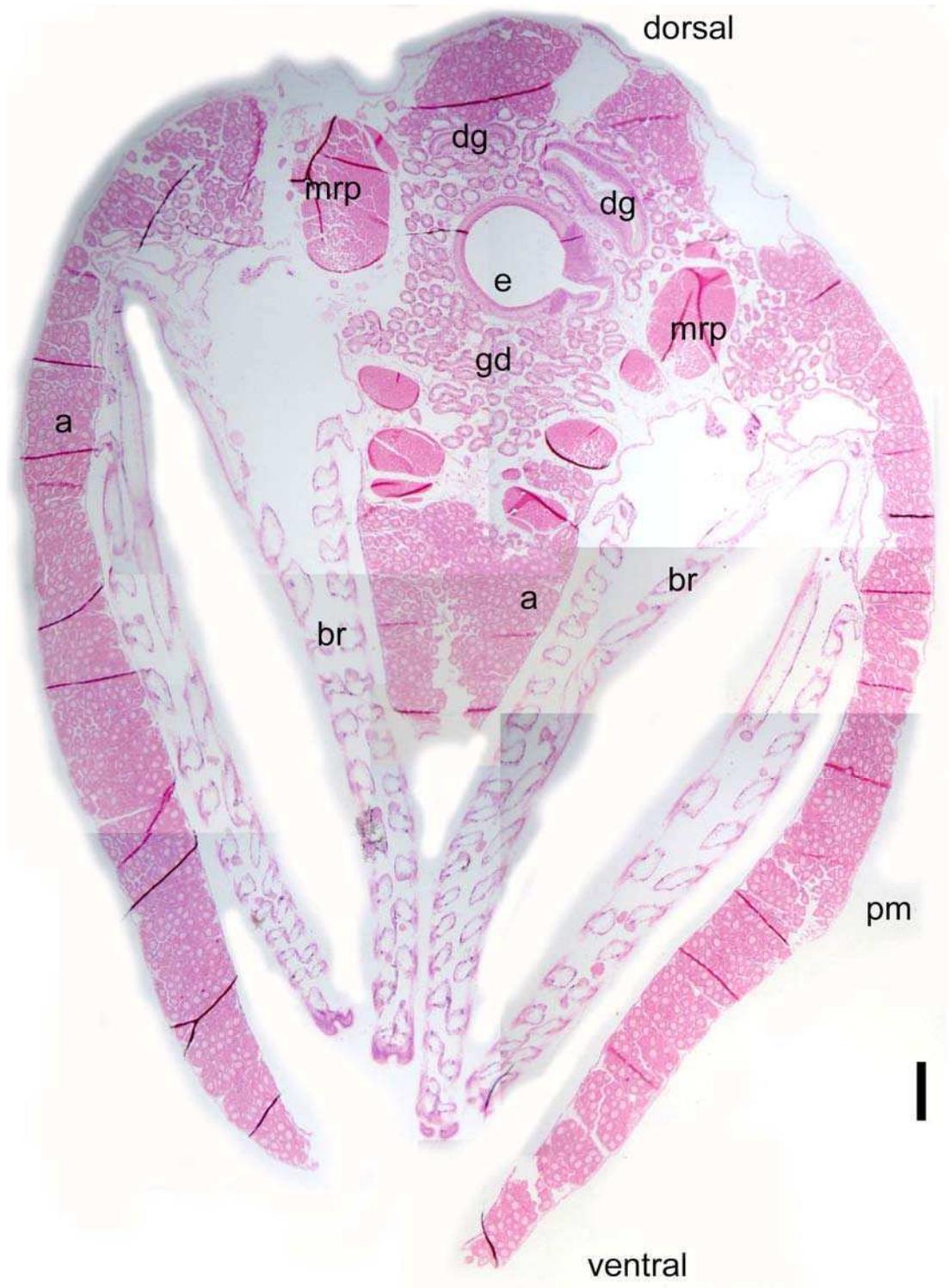
### 3.3 Resultados

El sexo de los individuos fue determinado a partir de la presencia de espermatozoides y oocitos en el interior de los acinos gonadales, o bien de estadios tempranos de la gametogénesis. Se observaron acinos gonadales en la masa visceral, ambos pliegues del manto y en la región dorsal.

#### Hembras

##### Morfología de ovario

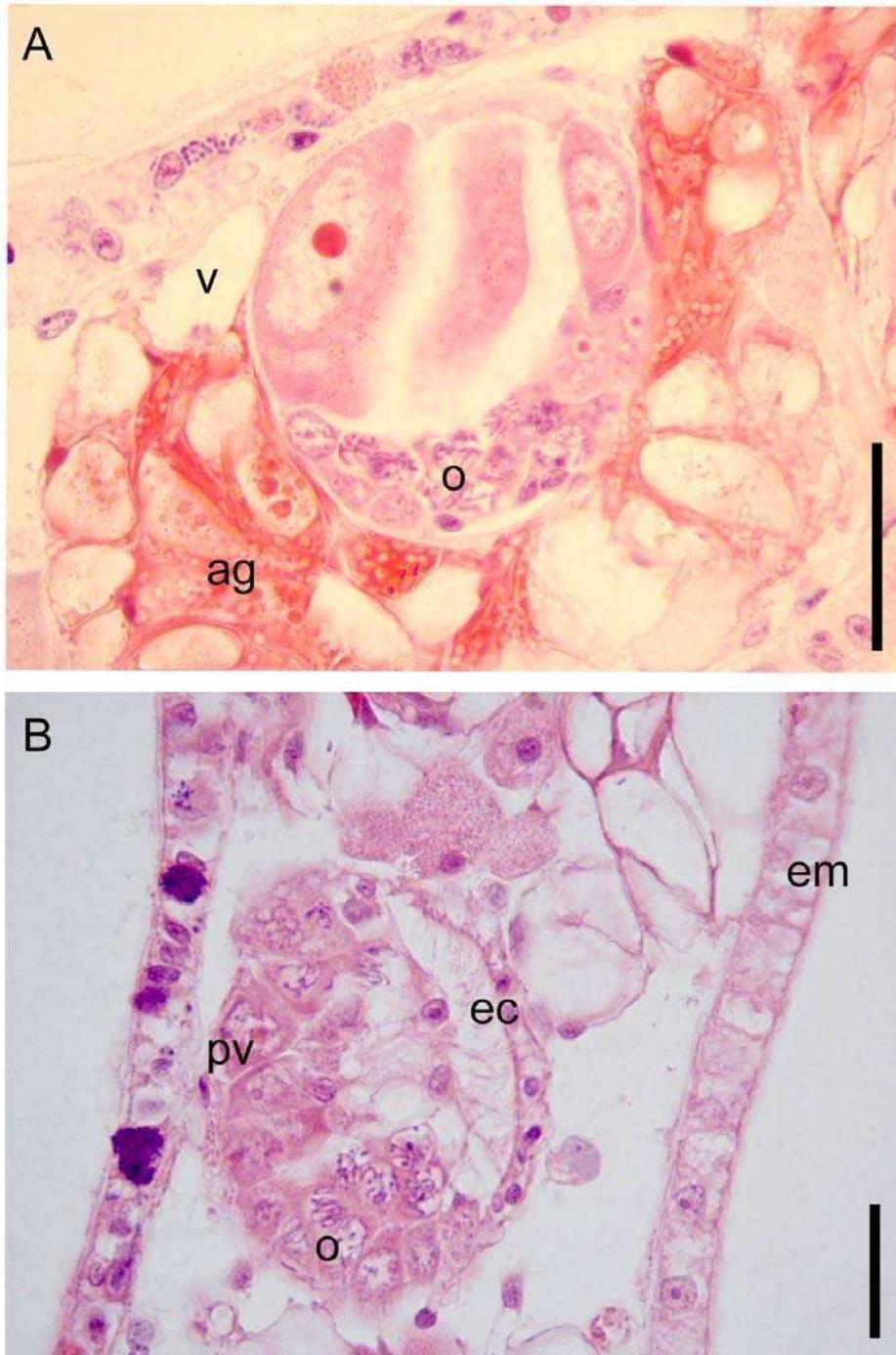
En los cortes histológicos, se observó que los acinos gonadales de las hembras se encontraban en la región dorsal por encima del digestivo. Rodeando la glándula digestiva, en ambos pliegues del manto y en la masa visceral debajo de la glándula digestiva (Figura 3. 2).



**Figura 3. 2.** Composición fotográfica de corte transversal de una hembra de *B. rodriguezii* del mes de enero (LT 15,99mm). Se puede reconocer la disposición de acinos gonadales en la región dorsal, por encima de los divertículos gástricos y del estómago. Debajo de la glándula digestiva y los pliegues del manto. Referencias: (a) acinos gonadales; (br) branquias; (dg) divertículos gástricos; (e) estómago; (gd) glándula digestiva; (mrp) músculos retractores pedales; (pm) pliegue del manto. Escala: 500  $\mu$ m.

Los acinos gonadales se encontraban rodeados por tejido conectivo constituido por células vesiculares y células adipogranulares (Figura 3. 3A). Las células vesiculares presentaban morfología poligonal con núcleo acéntrico y contenían en su citoplasma una gran vacuola. El fijador y la coloración utilizada no permitieron observar el contenido, por eso en los cortes histológicos se evidenció un gran espacio vacío. Las células adipogranulares, también presentaron morfología poligonal y en su interior se observaron numerosas vesículas (Figura 3. 3A).

La pared de los acinos gonadales presentó un epitelio simple de células planas denominadas comúnmente células de la pared del acino. En el interior del acino, se observó el epitelio germinal junto con células somáticas. El epitelio germinal se ubicó sobre la superficie interna del acino próxima a la masa visceral, mientras que la superficie interna del acino próxima a la valva presentó un epitelio ciliado (Figura 3. 3B). Dentro de los acinos se observaron diferentes estadios de desarrollo de los oocitos.



**Figura 3. 3.** Acino gonadal de una hembra de *B. rodriguezii* en pliegue del manto. **A.** Elementos del tejido conectivo, células vesiculares y adipogranulares y acino con oogonias agrupadas. **B.** Epitelio ciliado sobre la pared del acino del lado del epitelio del manto. Dentro del acino se observan oogonias agrupadas y oocitos previtelogénicos recientemente diferenciados. Coloración utilizada: H y E. Referencias: (ag) células adipogranulares; (ec) epitelio ciliado; (em) epitelio del manto; (o) oogonias; (pv) oocitos previtelogénicos; (v) células vesiculares. Escalas A y B: 20  $\mu$ m.

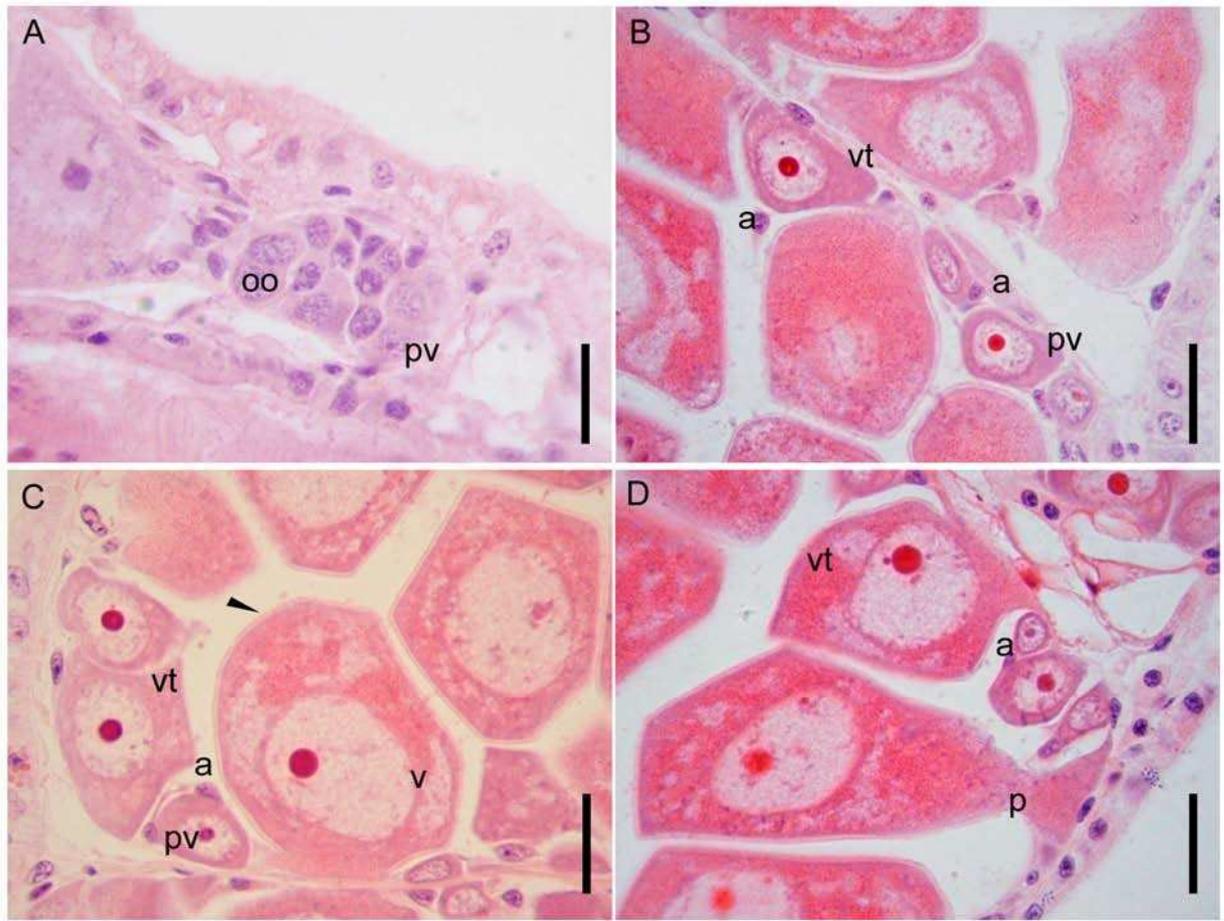
## Oogénesis

Durante los primeros estadios de la oogénesis dentro de los acinos se observaron oogonias (Figura 3. 4A). El área de las oogonias fue  $38,01 \pm 7,60 \mu\text{m}^2$ . La diferenciación de las oogonias para dar lugar a los oocitos no era sincrónica. Es por ello que, dentro de un mismo acino se encontraban en simultáneo los diferentes estadios de desarrollo oocitario: oocitos previtelogénicos, vitelogénicos tempranos y vitelogénicos.

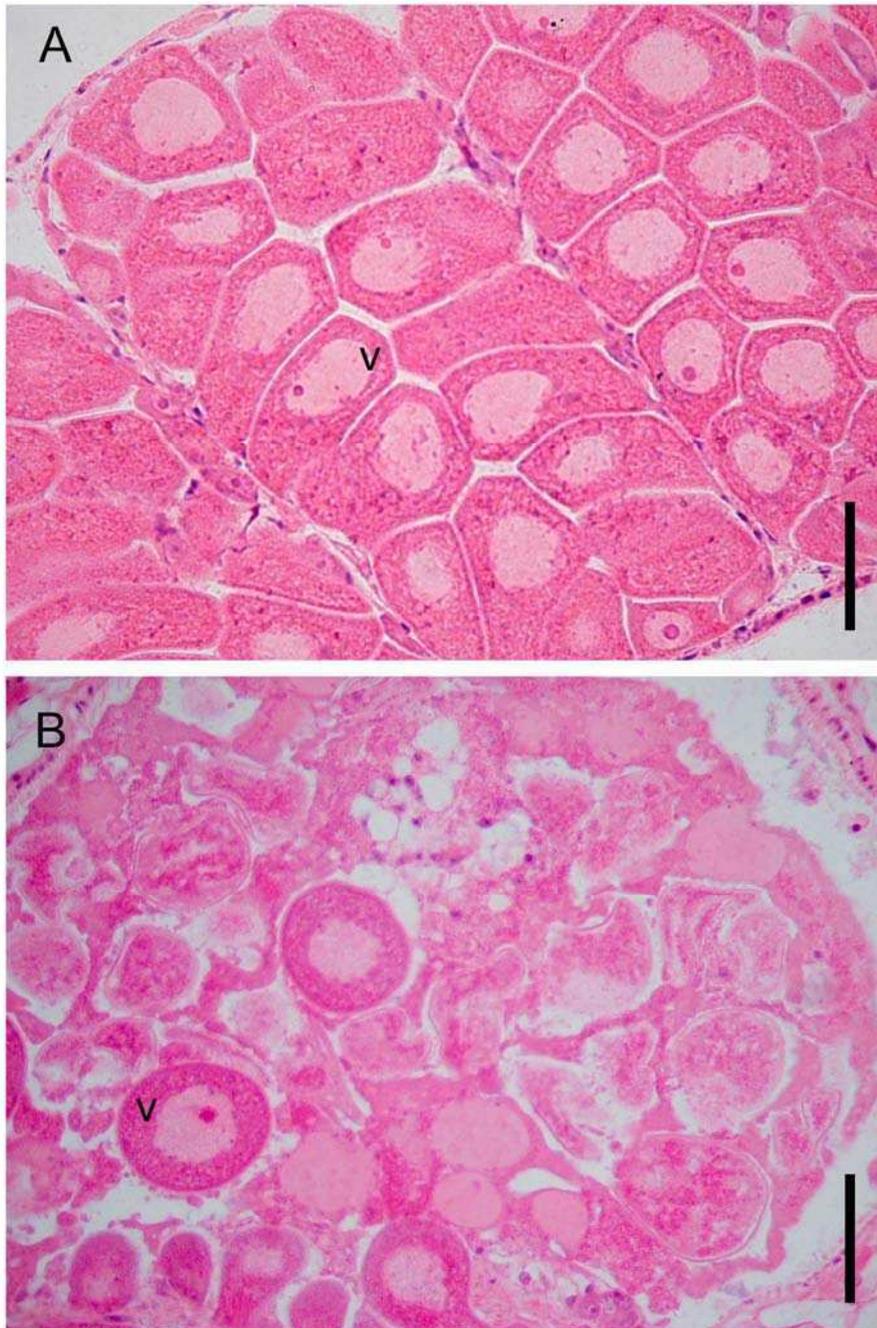
En los oocitos previtelogénicos se observaron dos o tres células que rodeaban por completo al oocito. La morfología de este tipo celular, denominado auxiliar fue diversa (Figura 3. 4B). Los oocitos previtelogénicos se encontraron cerca de la pared del acino, de forma alargada, con su eje mayor paralelo a la pared del acino y presentaron entre  $30$  y  $400 \mu\text{m}^2$  de superficie (Figura 3. 4B-C).

Durante el desarrollo de la vitelogénesis, el oocito adoptó una forma alargada y en algunas ocasiones se observó un pedúnculo mediante el cual permaneció asociado a las células de la pared del acino. Las células auxiliares se restringieron a la zona basal del oocito asociadas al pedúnculo y en contacto con las células de la pared del acino (Figura 3. 4D). Conforme la vitelogénesis progresó, la coloración utilizada en los cortes histológicos permitió observar un proceso de diferenciación del contenido citoplasmático. Los oocitos con vitelogénesis temprana presentaban una superficie entre  $350$  y  $800 \mu\text{m}^2$  y contenían gotas de vitelo en la región basal. En este estadio se constituía la membrana gelatinosa. La distribución de las gotas de vitelo continuó hasta que el contenido citoplasmático adquirió un aspecto uniforme. Los oocitos vitelogénicos, listos para ser evacuados, medían entre  $800$  y  $2700 \mu\text{m}^2$  y carecían de pedúnculo. Estos se encontraron libres en el lumen del acino con el citoplasma totalmente ocupado por gotas de vitelo (Figura 3. 5A).

Luego de la evacuación, en el interior de los acinos gonadales se observaron estructuras membranosas desorganizadas, cuerpos amarillentos residuales y hemocitos (Figura 3. 5B).



**Figura 3. 4.** Oogénesis en *B. rodriguezii*. **A.** Detalle de un acino con oogonias y un oocito previtelogénico recientemente diferenciado. **B.** Acino de mayor tamaño con oocitos previtelogénicos con células accesorias. **C.** Acino con oocitos con diferente grado de avance de la vitelogénesis: previtelogénicos, vitelogénicos tempranos y vitelogénicos. Obsérvese la heterogeneidad citoplasmática y la membrana gelatinosa (punta de flecha). **D.** Acino con oocito con vitelogénesis más avanzada, con saco vitelogénico y oocito con pedúnculo asociado a la pared del acino. Coloración utilizada: H y E. Referencias: (a) células accesorias; (oo) oogonias; (p) pedúnculo; (pv) oocitos previtelogénicos; (v) oocitos vitelogénicos; (vt) oocitos vitelogénicos tempranos. Escalas A-D: 20 µm.



**Figura 3. 5.** Ovario de hembras de *B. rodriguezii*. **A.** Acinos con oocitos vitelogénicos previo a la evacuación. **B.** Acinos con oocitos vitelogénicos y oocitos en proceso de degradación luego de la evacuación. Coloración utilizada: H y E. Referencias: (v) oocitos vitelogénicos. Escalas A y B: 50  $\mu$ m.

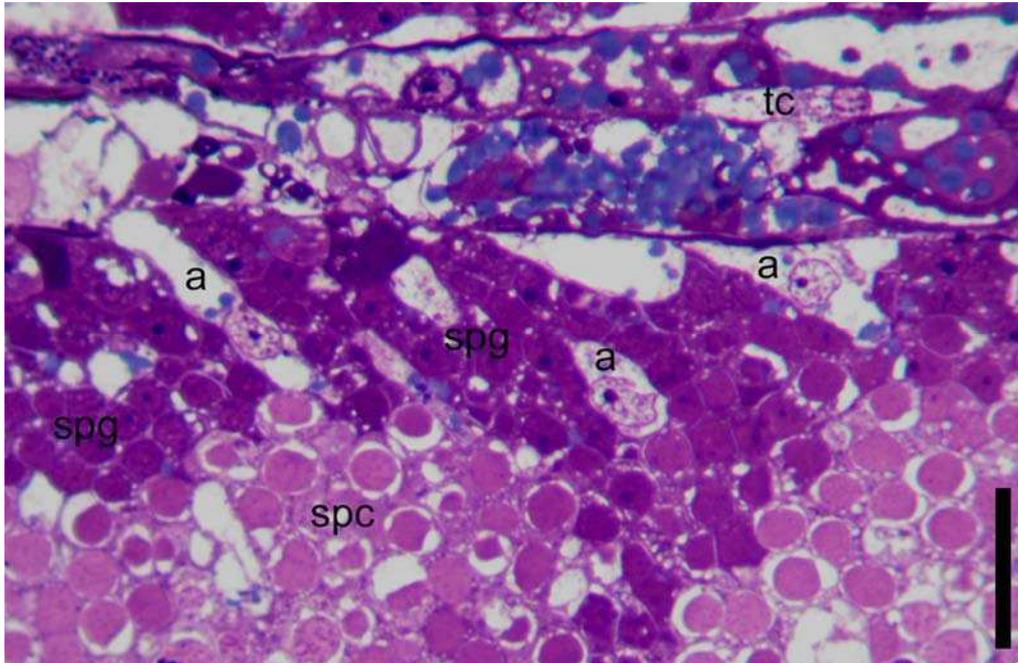
## Machos

### Morfología del testículo

En individuos sexualmente maduros se observaron acinos gonadales en pliegues del manto, masa visceral y rodeando a la glándula digestiva (Figura 3. 6). La pared del acino estaba formada por un epitelio simple de células planas. Dentro de cada acino se encontraron células somáticas y células espermatogénicas. Las células somáticas presentaron un núcleo irregular, un nucléolo conspicuo y bien definido y el citoplasma de forma irregular al M.O. se observó claro (Figura 3. 7).



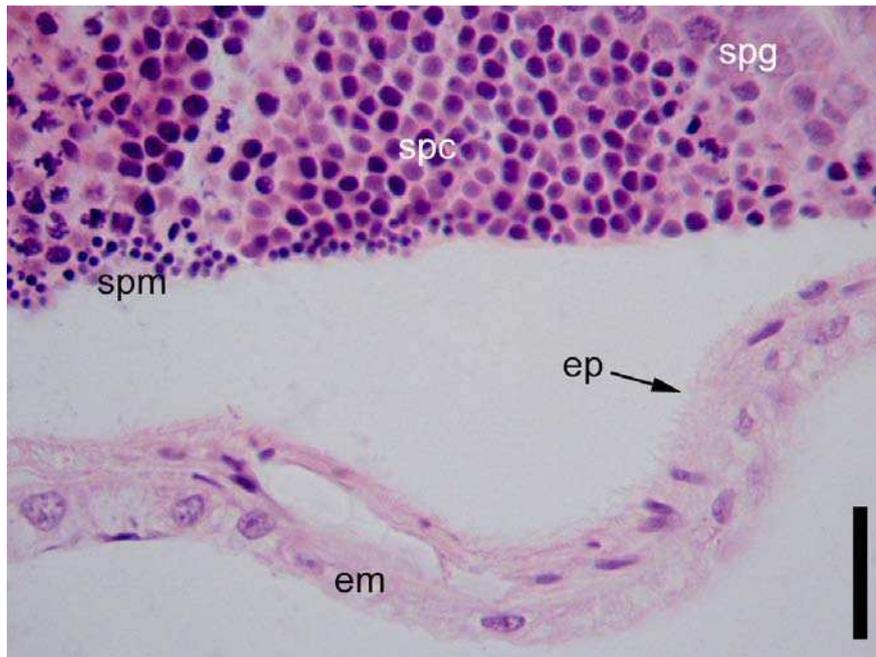
**Figura 3. 6.** Distribución de la gónada masculina en un individuo maduro *B. rodriguezii* del mes de enero (LT 20,05 mm). Se puede reconocer la disposición de acinos gonadales en la región dorsal, por encima de los divertículos gástricos y del estómago. Debajo de la glándula digestiva y en los pliegues del manto. Coloración utilizada: H y E. Referencias: (a) acinos gonadales; (br) branquias; (dg) divertículos gástricos; (e) estómago; (gd) glándula digestiva; (mrp) músculos retractores pedales; (pm) pliegue del manto. Escala: 500  $\mu$ m.



**Figura 3. 7.** Fotografía de corte semifino de gónada masculina de *B. rodriguezii*. Detalle de células accesorias, espermatogonias y espermatocitos dentro del acino gonadal. En la periferia del acino se reconocen células del tejido conectivo. Coloración utilizada: Azul de toluidina. Referencias: (a) células accesorias; (spc) espermatocito; (spg) espermatogonia, (tc) tejido conectivo. Escala: 20  $\mu$ m.

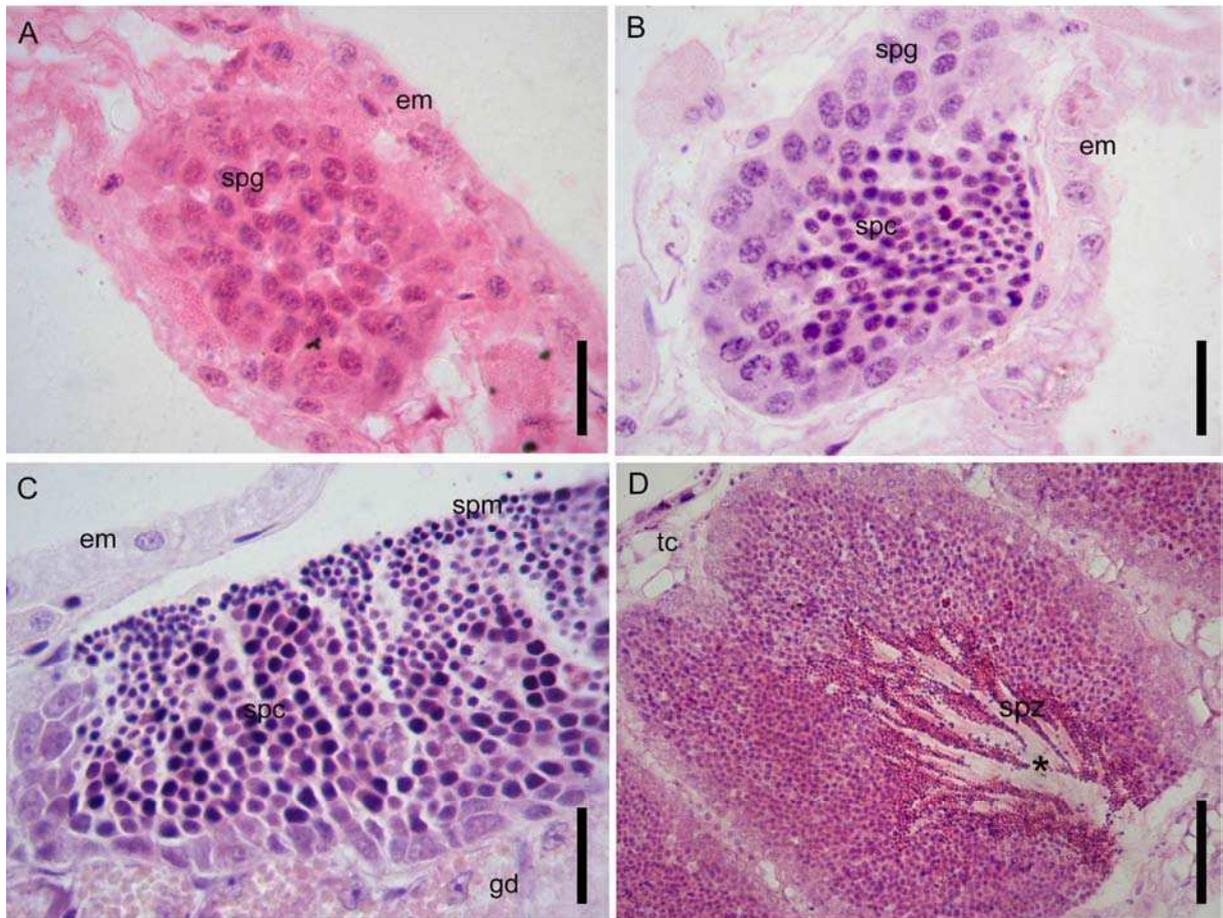
### Espermatogénesis

En los machos se observó que dentro del acino, el epitelio germinal se ubicó sobre la superficie interna del acino próximo a la masa visceral. Mientras que la superficie interna del acino próxima a la valva presentaba un epitelio ciliado (Figura 3. 8).



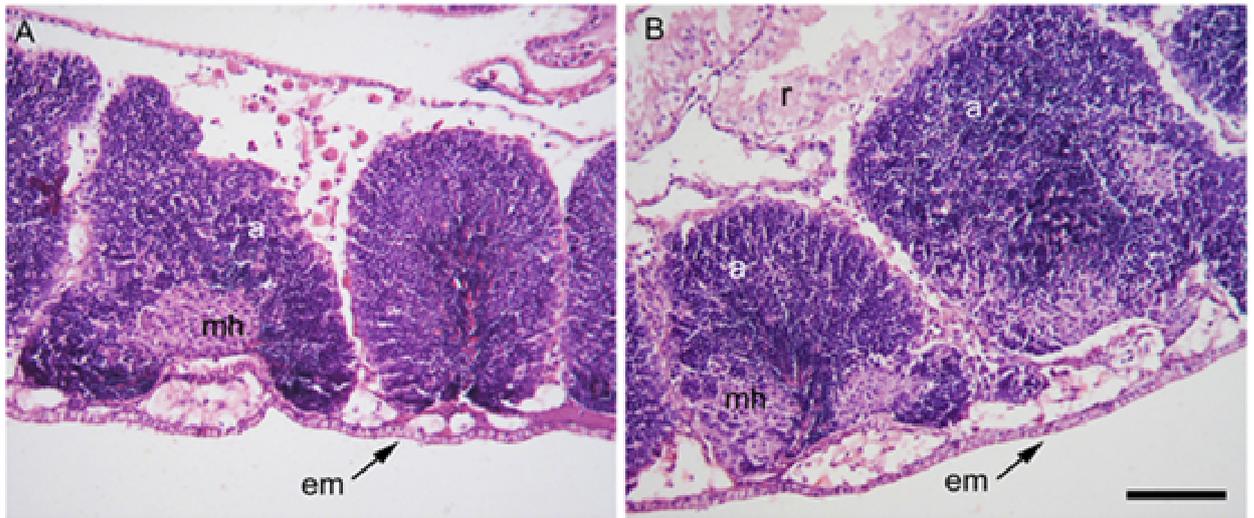
**Figura 3. 8.** Acino gonadal de un macho de *B. rodriguezii* donde se observa la disposición del epitelio espermatogénico dentro del acino. Espermatogonias, espermatocitos y espermatídas. El epitelio de la pared del acino próximo al epitelio del manto presenta cilias (flecha). Coloración utilizada: H y E. Referencias: (em) epitelio del manto; (ep) epitelio de la pared del acino; (spc) espermatocitos; (spg) espermatogonias; (spm) espermatídas. Escala: 20  $\mu\text{m}$ .

El epitelio germinal se observó constituido por espermatogonias, espermatocitos, espermatídas y espermatozoides. Las espermatogonias presentaron una superficie de  $9,01 \pm 3,77 \mu\text{m}^2$ , su núcleo era conspicuo y se ubicaron sobre la pared del acino (Figura 3. 9A, B). Los espermatocitos y las espermatídas se encontraron entre las espermatogonias y el lumen del acino (Figura 3. 9C). Los espermatozoides se observaron agrupados y confinados al lumen del acino (Figura 3. 9D). Estos tipos celulares se observaron durante todo el año aunque su proporción fue variable según la época del año. A medida que progresó la espermatogénesis, los acinos aumentaron de tamaño.



**Figura 3. 9.** Espermatogénesis en *B. rodriguezii*. **A.** Acino del pliegue del manto con espermatogonias. **B.** Estadio avanzado de la espermatogénesis, con espermatogonias y espermatocitos. **C.** Acino gonadal próximo a un túbulo de la glándula digestiva con espermatogénesis más avanzada ya que se pueden observar espermatidas. Nótese el sentido de maduración de las células espermatogénicas. **D.** Acino de un individuo maduro, con espermatozoides en el lumen. Coloración utilizada: H y E. Referencias: (\*) lumen del acino; (gd) glándula digestiva; (spc) espermatocito; (spg) espermatogonia; (spm) espermatidas; (spz) espermatozoide; (tc) tejido conectivo. Escalas A-C: 20  $\mu$ m. Escala D: 50  $\mu$ m.

Dentro los acinos, tanto del pliegue del manto como de la masa visceral, se observaron agrupaciones compactas de hemocitos (Figura 3. 10A y B). Las agrupaciones se focalizaron en el área de contacto con el epitelio del manto.

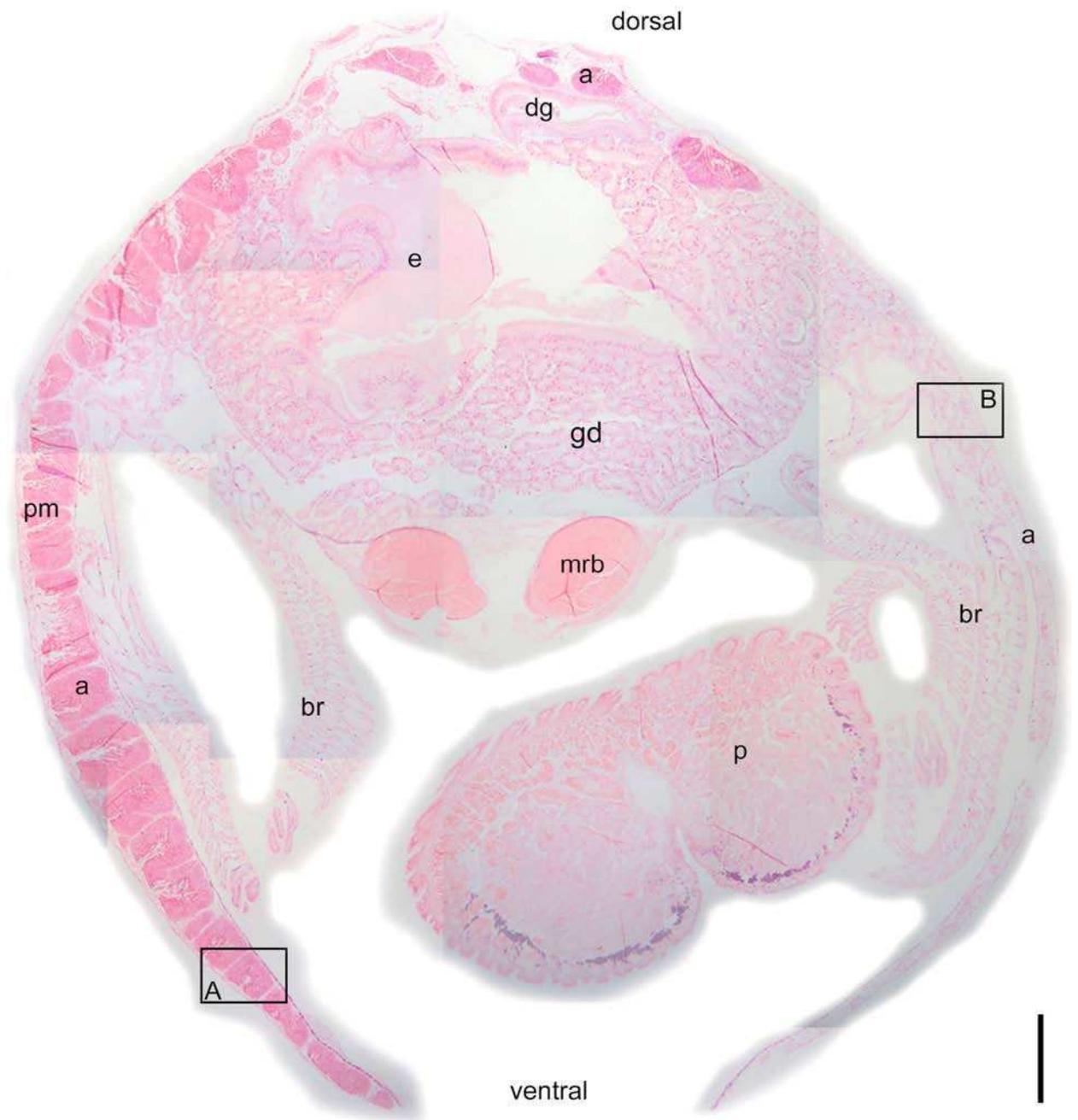


**Figura 3. 10.** Fotografías de gónada de un individuo macho de *B. rodriguezii*. **A.** Pliegue del manto donde se observan masas de hemocitos en el interior de los acinos próximos al epitelio del manto que está en contacto con la valva. **B.** Acinos de región dorsal próximos al riñón. Coloración utilizada H y E. Referencias: (a) acinos gonadales; (em) epitelio del manto; (mh) masas de hemocitos; (r) riñón. Escalas A y B: 100  $\mu$ m.

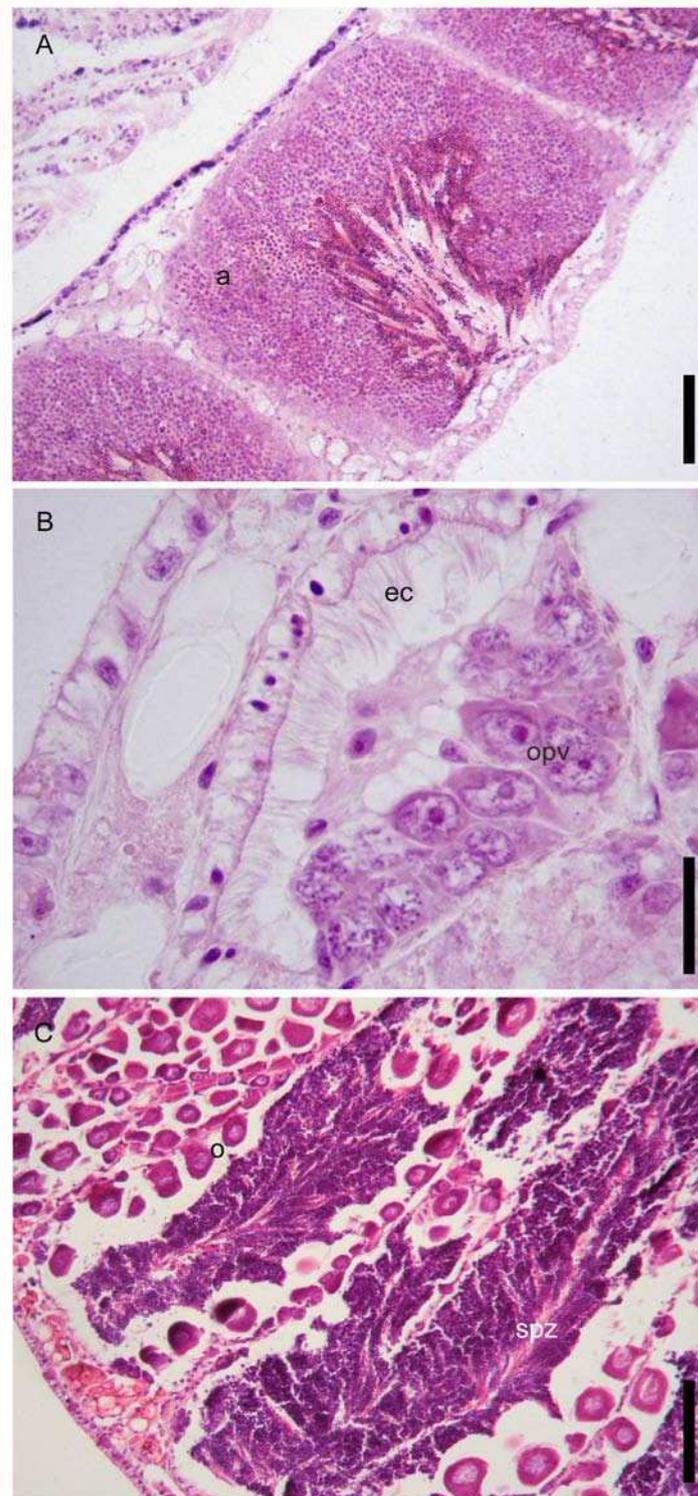
### Hermafroditas

Se registraron 4 individuos hermafroditas de un total de 826 individuos estudiados. Este fenómeno fue registrado en diferentes meses del período estudiado (octubre y diciembre de 2011 y julio y noviembre de 2012). Los individuos presentaron un rango de tallas entre 7,10 y 22,8 mm de largo total. En dos individuos se observó una diferencia en el aspecto externo de los pliegues del manto. En un pliegue del manto se registró la coloración observada previamente en machos, mientras que el otro pliegue presentaba la coloración observada en el pliegue del manto de las hembras (Figura 3. 11). Mediante cortes histológicos fue posible evidenciar dos modalidades de gónada hermafrodita simultánea. En un caso, los individuos

presentaban algunos acinos donde tenía lugar la ovogénesis y otros acinos donde ocurría espermatogénesis (Figura 3. 12A y B). En estos casos el estado de maduración gonadal era más avanzado en los acinos donde ocurría espermatogénesis. Mientras que para la otra modalidad, se observó que dentro de un acino coexistían líneas germinales tanto para oocitos como para espermatozoides. En este caso, la línea germinal masculina se disponía en el centro del acino y la femenina hacia las paredes del acino (Figura 3. 12C).



**Figura 3. 11.** Composición fotográfica de corte transversal de un individuo hermafrodita de *B. rodriguezii* del mes de julio (LT 18,55 mm) con acinos gonadales en pliegues del manto (donde ocurre espermatogénesis y oogénesis por separado) en posición dorsal, sobre divertículos gástricos, estómago y glándula digestiva. Referencias: (a) acinos gonadales; (br) branquias; (dg) divertículo gástrico; (e) estómago; (gd) glándula digestiva; (mrb) músculo retractor del biso; (p) pie; (pm) pliegue del manto. Escala: 500  $\mu$ m.



**Figura 3. 12.** Detalles de acinos gonadales de individuos hermafroditas **A.** Detalle de un acino masculino (recuadro A Figura 3. 11). **B.** Detalle de un acino femenino con oocitos previtelogénicos y el epitelio ciliado (recuadro B Figura 3.11). **C.** Estadios de la espermatogénesis y con espermatozoides y oocitos en un mismo acino. Coloración utilizada H y E. Referencias: (a) acino gonadal; (ec) epitelio ciliado; (o) oocitos; (opv) oocitos previtelogénicos; (spz) espermatozoide. Escalas A y C: 100  $\mu$ m. Escalas B: 10  $\mu$ m.

### 3. 4 Discusión

En los moluscos bivalvos el sistema reproductor es simple, esto es habitual en especies con fecundación externa (Kasyanov, 2001). La gónada está constituida por una red de acinos y túbulos conectados entre sí (Sastry, 1979). Aumenta su superficie y volumen a medida que progresa la gametogénesis (Eckelbarger y Davies, 1996; Franco *et al.*, 2008). Rodeando a los acinos gonadales, se encuentra el tejido conectivo, que sostiene a los acinos y constituye uno de los centros de almacenamiento de sustancias que participan durante la gametogénesis (Pipe, 1987a, b; Berthelin *et al.*, 2000; Gimeno *et al.*, 1991). La pared de los acinos está formada por un epitelio simple que presenta cilias en la región próxima al epitelio del manto que está en contacto con la valva. Estas estructuras favorecerían el transporte de las gametas hacia los gonoductos (Franco *et al.*, 2008).

La morfología gonadal de *Brachidontes rodriguezii* descrita en este estudio resultó ser similar a la mencionada para bivalvos mitílidos (Vinuesa, 1981; Pipe, 1987b; Bernard *et al.*, 1988; Calvo *et al.*, 1998; Kasyanov, 2001). En los acinos gonadales de hembras y machos de *B. rodriguezii* se observó la presencia de cilias en el epitelio que reviste la pared del acino próxima al epitelio del manto secretor de la valva. En las hembras resultó más fácil observar las cilias en una etapa temprana de la oogénesis mientras que en los machos era más fácil reconocer las cilias en acinos evacuados.

En relación al proceso de formación y maduración de gametas, en hembras de *B. rodriguezii* observamos que la oogénesis resultó ser de tipo solitaria. Se observaron células somáticas en el interior de los acinos que estaban en contacto con los oocitos en etapas tempranas del desarrollo, mientras que a medida que la vitelogénesis progresaba, la interacción entre las células somáticas y el oocito disminuía. Estas células somáticas se denominan accesorias (De Gaulejac *et al.*, 1995; Ángel Pérez *et al.*, 2007) aunque, algunos autores las han denominado células foliculares (Pipe, 1987a; Bernard *et al.*, 1988; Eckelbarger y Davies, 1996). Aun así, se considera apropiado denominar con el término folicular a aquellas células somáticas que constituyen un epitelio que rodea por completo (un verdadero folículo) al oocito durante todo el proceso de desarrollo y que participa por ejemplo, de la nutrición del oocito (Laptikhovsky y Arkhipkin, 2001). Pipe (1987a) menciona para *Mytilus edulis* que las

células “foliculares” tendrían la capacidad de incorporar, transformar y sintetizar materiales, así como fagocitar partículas. Pero no encuentra evidencia de que este tipo celular participe de la reabsorción del material que proviene de la degradación de los oocitos no liberados. En especies incubadoras como *Gaimardia trapesina*, las células foliculares además de acompañar al oocito durante el proceso de maduración, participan de la incubación de los embriones (Ituarte, 2009), mientras que según Dorange y Le Pennec (1989a) en *Pecten maximus* estas células darían origen a la envoltura del oocito.

Para *B. rodriguezii*, al igual que se ha descrito para otras especies, la ubicación, morfología y composición del ooplasma varía con la progresión de la vitelogénesis, dado esto, se reconocieron diferentes estadios oocitarios. La maduración de las gametas no es sincrónica, por lo que se observaron diferentes estadios dentro de un mismo acino. Resultados similares se han mencionado para otras especies de mitílidos (Bernard *et al.*, 1988; De Gaulejac *et al.*, 1995; Pipe, 1987a; Eckelbarger y Davies, 1996; Ángel Pérez *et al.*, 2007).

Se observaron células somáticas en el interior de los acinos de los machos de *B. rodriguezii* que se encontraban próximas a la pared del acino y rodeadas por células espermatogénicas. Las células somáticas llamadas accesorias participarían de la espermatogénesis (Eckelbarger y Davies, 1996; Franco *et al.*, 2008). La espermatogénesis en *Brachidontes rodriguezii* es similar a la observada para otras especies de bivalvos mitílidos (Bernard *et al.*, 1988; Calvo *et al.*, 1998; Reunov *et al.*, 1999; Eckelbarger y Young, 1999; Kádar *et al.*, 2006; Yurchenko y Vaschenko, 2010).

La degradación de gametas masculinas, a diferencia de lo que ocurre con los oocitos, no es un fenómeno apreciable debido al escaso citoplasma que tienen los espermatozoides. Las masas de hemocitos en el interior de los acinos, según Suárez Alonso *et al.* (2007) podrían ser una señal de atresia en machos. En este estudio, se registró la presencia de hemocitos agrupados dentro de los acinos de machos de *B. rodriguezii*. Los hemocitos constituyen el tipo celular más importante del sistema inmune de los moluscos (Ottaviani, 2011). Algunos autores inclusive los denominan inmunocitos (De Vico y Carella, 2012). Los hemocitos pueden formar nódulos, que constituyen un tipo de respuesta inflamatoria frente a la necesidad de fagocitosis de pequeñas partículas (De Vico y Carella, 2012).

Se registraron individuos hermafroditas en muy baja frecuencia. Esta condición ha sido mencionada en numerosas especies de bivalvos (Brousseau, 1982; Morton, 1991; Giguère *et al.*, 1994; Ángel Pérez *et al.*, 2007; Romo Piñera *et al.*, 2009). Dentro de la familia Mytilidae se registraron casos de hermafroditismo en especies marinas y de agua dulce (Sunila, 1981; Villalba, 1995; Darrigran *et al.*, 1998; Montenegro Villalobos *et al.*, 2010; Al-Barwani *et al.*, 2013; Kefi *et al.*, 2014). El hermafroditismo en especies gonocóricas es considerado accidental (Coe, 1943) y suele ocurrir en baja frecuencia (Morton, 1991). La determinación del sexo de los individuos ocurre en algunos casos durante o después de la fertilización, mientras que en otros casos puede verse influenciada por las condiciones ambientales a las que están sometidos los juveniles (Morton, 1991). Se desconocen con profundidad las causas del hermafroditismo en especies gonocóricas. Romo Piñera *et al.* (2009) describen para *Megapitaria squalida* una frecuencia de individuos hermafroditas superior a la esperada para una especie gonocórica y para dos poblaciones en Baja California, México, una proporción de hembras mayor a la de machos. Proponen que *M. squalida* podría estar respondiendo a un modelo de baja densidad. Esto es, cuando una población disminuye en número por alguna razón, la selección natural favorece el hermafroditismo (Ghiselin, 1969). *M. squalida* es una especie de importancia económica y su pesquería ha afectado seriamente su densidad poblacional (Romo Piñera *et al.*, 2009). Este incremento en el número de hermafroditas podría ser resultado de la plasticidad fenotípica para maximizar el éxito reproductivo (Morton, 1991). Por otro lado, considerando la regulación endocrina de procesos como la reproducción, el crecimiento y el desarrollo, algunos autores han descrito la presencia de ovotestis (órgano donde ocurre espermatogénesis junto con oogénesis) en bivalvos y relacionan este fenómeno con la presencia de desechos urbanos y descargas industriales de sustancias que podrían actuar como disruptores endocrinos. Aun así, el mecanismo de acción aún no se ha estudiado (Horiguchi *et al.*, 2000; Chesman y Langston, 2006; Langston *et al.*, 2007; Petridis *et al.*, 2009). Dado que la incidencia de individuos de *B. rodriguezii* que manifiestan la condición de hermafrodita es baja en la localidad de Villa Gesell, consideramos que esta estrategia reproductiva es alternativa.

4- Caracterización ultraestructural de la espermatogénesis y del espermatozoide. Alteraciones morfológicas.

## 4.1 Introducción

En el capítulo anterior se mencionaron una serie de procesos que ocurren a medida que progresa la gametogénesis. Dentro de los bivalvos, para la familia Mytilidae, se ha estudiado y caracterizado la oogénesis y la espermatogénesis, en numerosas especies. Inclusive se han realizado estudios ultraestructurales de la espermatogénesis y de la morfología del espermatozoide (Longo y Dornfield, 1967; Lowe *et al.*, 1982; Hodgson y Bernard, 1986). Lo mismo ocurre para la familia Pectinidae (Dorange y Le Pennec, 1989b), mientras que dentro de la familia Ostreidae el número de estudios es reducido (Thielley *et al.*, 1993; Sousa y Oliveira, 1994; Eckelbarger y Davies, 1996). La espermatogénesis es el proceso mediante el que se obtienen las gametas masculinas. Las células espermatogénicas se clasifican en: espermatogonias, espermatocitos y espermátidas. Las espermatogonias proliferan mediante divisiones mitóticas, originando espermatocitos primarios, que se dividen por meiosis, la división celular culmina con la formación de las espermátidas (Walker y MacGregor, 1968). Luego durante la espermiogénesis se producen una serie de cambios en la espermátida, se condensa el material nuclear, se forma el complejo acrosomal, la célula adquiere una forma elongada y se desarrolla el flagelo. El proceso de diferenciación de la espermátida culmina con la formación del espermatozoide (Franzen, 1955). El epitelio germinativo es de tipo estratificado y la maduración celular es de tipo centrípeta, es decir, las espermatogonias se encuentran próximas a las células de la pared del acino, seguidas por los espermatocitos y las espermátidas. Es posible reconocer a los espermatozoides agrupados en numerosos sitios en el lumen del acino (Bernard *et al.*, 1988; De Gaulejac *et al.*, 1995).

El estudio de la espermatogénesis, ya sea la caracterización morfológica como la histoquímica, constituye una herramienta que permite diferenciar células espermáticas y establecer diferencias entre especies (Sousa *et al.*, 1989; Rocha y Azevedo, 1990; Sousa y Oliveira, 1994). El estudio ultraestructural del espermatozoide se desarrolla en forma continua desde hace varios años. Estudios previos en especies del mismo género muestran que la morfología del espermatozoide permanece

altamente conservada, y se observan características morfológicas propias a nivel específico. Por este motivo es considerada una herramienta fundamental en estudios filogenéticos (Popham, 1979; Garrido y Gallardo 1996; Drozdov y Reunov, 1997; Kafanov y Drozdov, 1998; Healy *et al.*, 2000; Gladyshev y Drozdov, 2002; Bieler *et al.*, 2014). Dentro de los bivalvos mitílidos suele observarse un tipo característico de espermatozoide, denominado primitivo o *ect aquaesperma*. El espermatozoide tipo primitivo a menudo se encuentra en invertebrados que liberan sus gametos en el agua y que se reproducen con fecundación externa (Jamieson y Rouse, 1989; Kafanov y Drozdov, 1998; Eckelbarger y Young, 1999; Reunov *et al.*, 1999). El espermatozoide de tipo primitivo presenta un complejo acrosomal cónico, un núcleo de longitud reducida. La pieza media consiste en un anillo de mitocondrias esféricas, que rodean dos centriolos dispuestos de manera ortogonal y un flagelo simple con dos microtúbulos centrales y rodeados por nueve tripletes de microtúbulos (disposición 9+2) (Healy *et al.*, 2001).

Trevisan *et al.* (2014) mencionan una serie de alteraciones en la morfología de células de la branquia de *Crossostrea gigas* como consecuencia de la exposición a zinc. En el mitílido *Modiolus kurilensis* se han descrito alteraciones ultraestructurales en células espermatogénicas y somáticas dentro de la gónada, en ambientes expuestos a elevadas concentraciones de metales pesado y DDT (Yurchenko y Vaschenko, 2010). Es decir, el estudio de la ultraestructura de diferentes tipos celulares permite además, hacer estudios comparados evaluando el impacto que generan las condiciones ambientales en los organismos. Los estudios de biomonitoreo ambiental consideran apropiado el uso de moluscos bivalvos por su amplia distribución geográfica, tipo de alimentación (filtradores), la capacidad de acumular diferentes sustancias, tanto del agua como de los sedimentos y los hábitos sedentarios (Gil *et al.*, 2006; Arias *et al.*, 2009; Bigatii *et al.*, 2009; Duarte *et al.*, 2011; Schmidt *et al.*, 2013).

*B. rodriguezii* es una especie clave en el intermareal costero de la provincia de Buenos Aires (Adami *et al.*, 2004; Carranza *et al.*, 2009). Las características biológicas de *B. rodriguezii* y su amplia distribución la convierten en una especie apropiada para desarrollar estudios de biomonitoreo ambiental en ambientes costeros. El objetivo de este capítulo fue describir la espermatogénesis y la morfología del espermatozoide, así

como describir alteraciones encontradas en la gónada de individuos que habitan en ambientes con elevados niveles de alteración antropogénica.

## 4.2 Materiales y métodos

Se tomaron muestras de 5 individuos de *Brachidontes rodriguezii* de Villa Gesell en octubre de 2011 y 5 individuos de la escollera sur del puerto de Mar del Plata durante los meses de junio y julio de 2013. Para los individuos de Villa Gesell y Mar del Plata se utilizaron los siguientes protocolos:

### Microscopía óptica y electrónica de transmisión (M.E.T.)

Muestras de manto de 4 mm<sup>3</sup> fueron fijadas en glutaraldehído 2,5% en buffer fosfato cacodilato 0,1 M, pH 7,2 y agua de mar durante 4 hs a 4°C. Luego de la fijación se lavó en buffer fosfato. La postfijación se realizó en tetróxido de osmio 1% en buffer durante 1:30 hs a temperatura ambiente. Las muestras fueron deshidratadas en alcoholes de gradación creciente hasta etanol 100°/óxido de propileno (1:1) y luego en óxido de propileno puro. Seguidamente las muestras fueron embebidas en una mezcla de resina araldita. Los cortes semifinos de 1 µm fueron coloreados con azul de toluidina y observados con microscopio óptico para dar orientación previa al material que se observaría en microscopio electrónico de transmisión. Los cortes ultrafinos se realizaron con ultramicrotomo Reichert y fueron contrastados con acetato de uranilo y citrato de plomo. Las secciones fueron examinadas, observadas y fotografiadas con un microscopio electrónico de transmisión Hitachi 300 y Jeol 1010 operado a 75–80 kV.

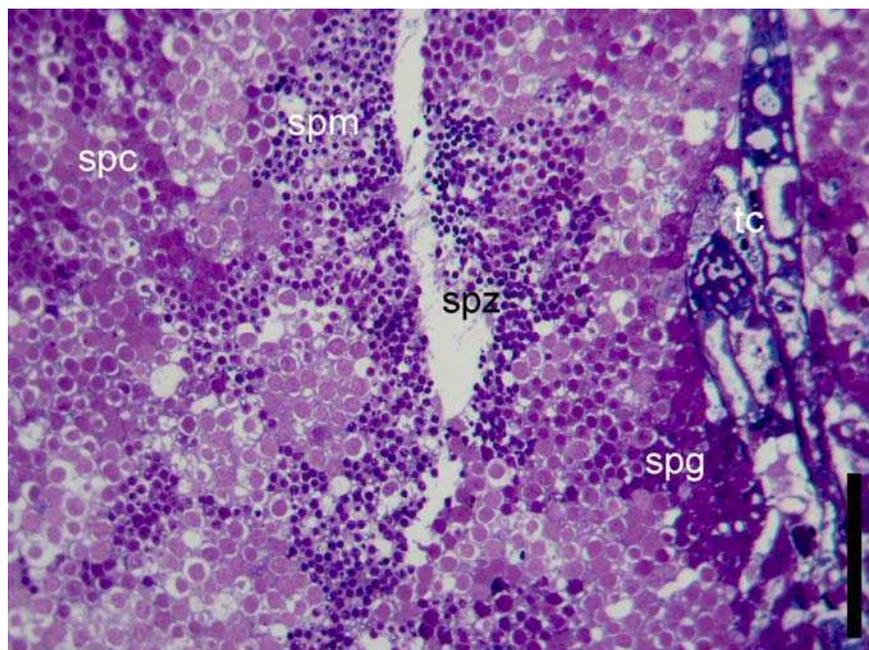
### Microscopía electrónica de barrido (M.E.B)

Se tomaron muestras de porciones del pliegue del manto de los individuos de Villa Gesell para preparar suspensiones de tejido gonadal. Las porciones de tejido gonadal fueron sometidas a agitación y fijadas en glutaraldehído 2,5% en buffer fosfato cacodilato 0,1 M, pH 7,2 y agua de mar durante 4 hs a 4°C. Luego de la fijación se lavó en buffer fosfato y la postfijación se realizó en alcohol absoluto.

Las suspensiones de tejido gonadal fueron examinadas, observadas y fotografiadas con un microscopio electrónico de barrido Philips modelo XL30 TMP y procesadas con el software ANALYSIS.

### 4.3 Resultados

Dentro de los acinos gonadales, las células espermatogénicas se encontraban dispuestas de forma centrípeta (Figura 4. 1). En el lumen del acino se observaban espermatozoides y espermátidas. Hacia la pared del acino, se disponían las espermatogonias y los espermatoцитos.



**Figura 4. 1.** Gónada de un individuo maduro de *B. rodriguezii*. En el interior del acino se disponen los espermatozoides, espermátidas, espermatoцитos y las espermatogonias. Referencias: (spc) espermatoцитo; (spg) espermatogonias; (spm) espermátidas; (spz) espermatozoide. Escala: 40  $\mu$ m.

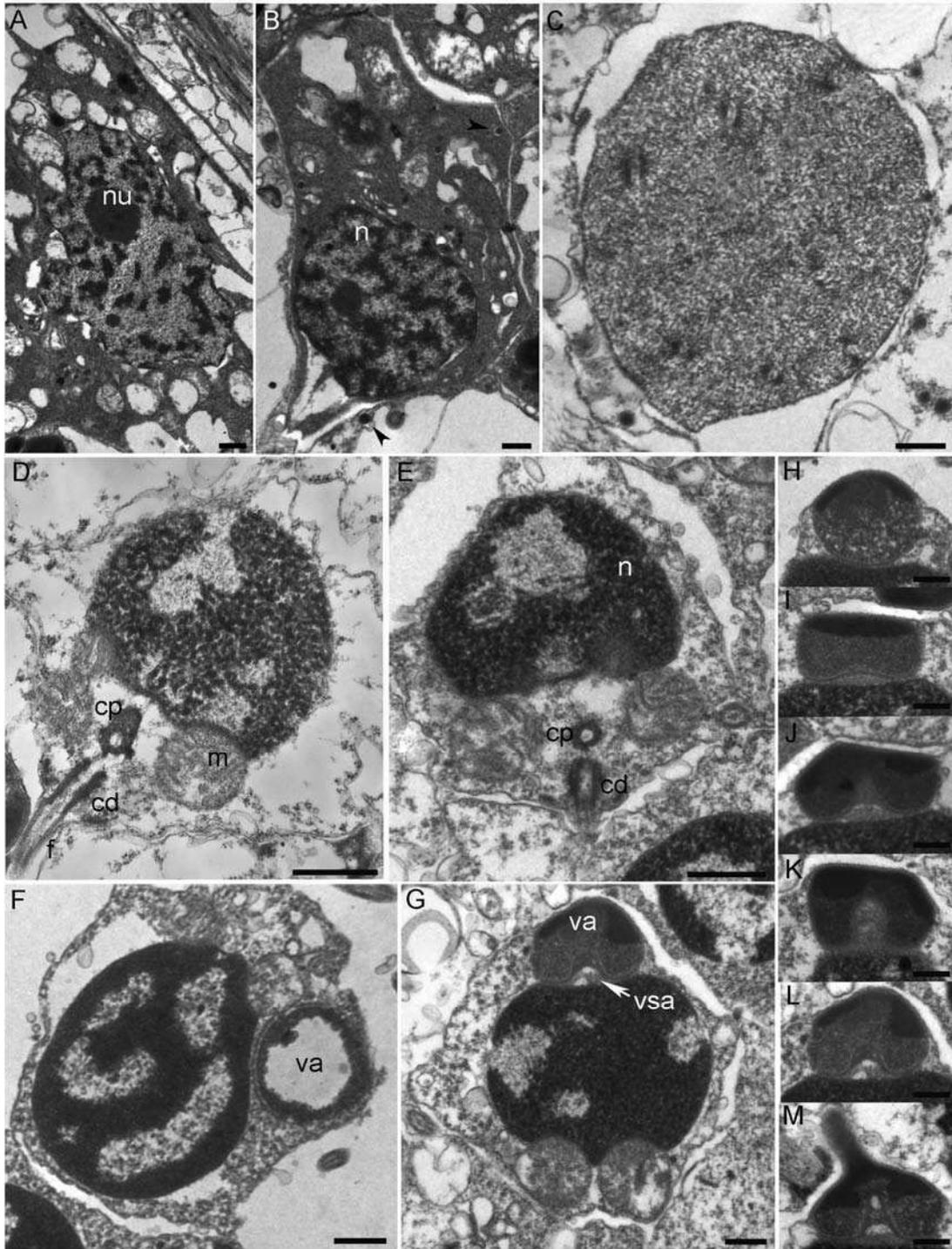
## Ultraestructura de la espermatogénesis

La serie espermatogénica estaba constituida por espermatogonias, espermatocitos, espermatidas y espermatozoides.

Las espermatogonias se ubicaban en la región periférica en contacto con las células de la pared del acino. En el interior de núcleo se encontraba el nucléolo y la cromatina dispersa. El citoplasma presentaba vesículas. La fusión de estas vesículas daría lugar al complejo acrosomal. Se observaron dos tipos de espermatogonias, un tipo celular de morfología alargada y mayor volumen citoplasmático, próximo a la pared del acino (Figura 4. 2A) y un segundo tipo con núcleo esférico y citoplasma reducido que se encontraba distante a la pared (Figura 4. 2B).

Los espermatocitos presentaban un núcleo esférico de mayor tamaño que en las espermatogonias. En el interior del núcleo se observó la cromatina difusa y se reconocieron los complejos sinaptonémicos de la profase meiótica en los espermatocitos I (Figura 4. 1C).

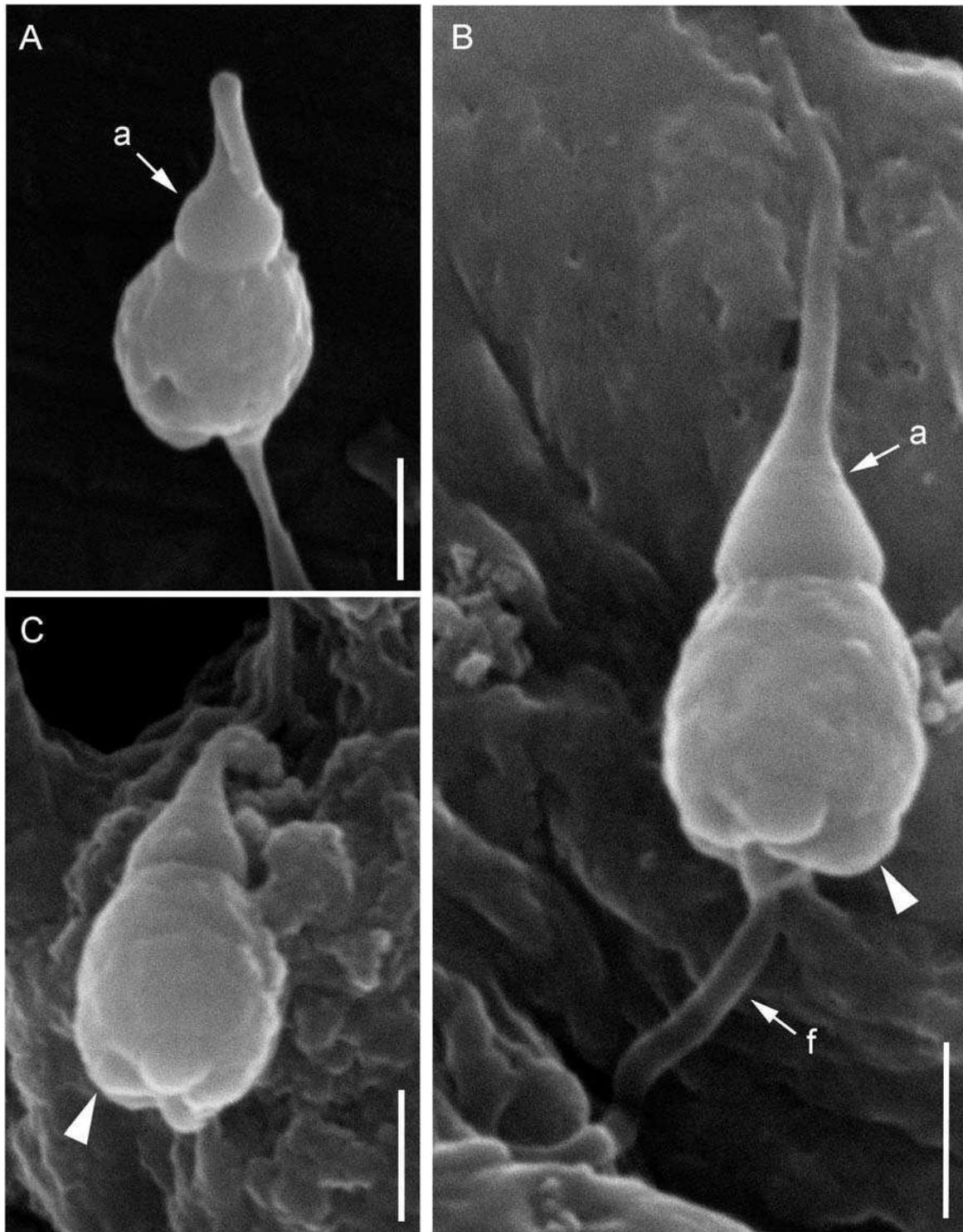
Las espermatidas en su estadio temprano presentaban forma esférica. Conforme avanzó el proceso de maduración, tuvo lugar la condensación de la cromatina y la morfología del núcleo sufrió una ligera modificación, de esférico pasó a ser alargado en el sentido antero-posterior. Durante la espermiogénesis conforme avanzó la condensación del material nuclear, la envoltura nuclear comenzó a invaginarse dando lugar a la formación de lagunas nucleares. Las mitocondrias esféricas se dispusieron en el extremo posterior del núcleo donde se observó una depresión o fosa que alojó dos centriolos (Figura 4 2D, E). En el extremo anterior el complejo acrosomal, que en un principio tenía aspecto de vesícula esférica con material electrodense en su periferia, adquirió forma cónica. En la porción anterior de la vesícula se observó material electrodense y en su porción posterior material con una densidad menor. La zona de la vesícula que estaba en contacto con el núcleo presentaba una invaginación, dando lugar a un espacio entre la vesícula acrosomal y el núcleo. Este espacio subacrosomal presentaba en su interior material fibrilar (Figura 4. 2H-M).



**Figura 4. 2.** Ultraestructura de la espermatogénesis en *B. rodriguezii*. **A-B.** Espermatogonia con vesículas proacrosomales (punta de flecha). **C.** Espermatocito. **D.** Espermátida en desarrollo. **E.** Espermátida avanzada. **F.** Espermátida avanzada comenzando la espermiogénesis. **G.** Vesícula acrosomal y vesícula subacrosomal de la espermátida. **H-M.** Formación de la vesícula acrosomal durante la espermiogénesis. Referencias: (cd) centriolo distal; (cp) centriolo proximal; (m) mitocondrias; (n) núcleo; (nu) nucléolo; (va) vesícula acrosomal; (vsa) vesícula subacrosomal. Escala: 0,5  $\mu$ m.

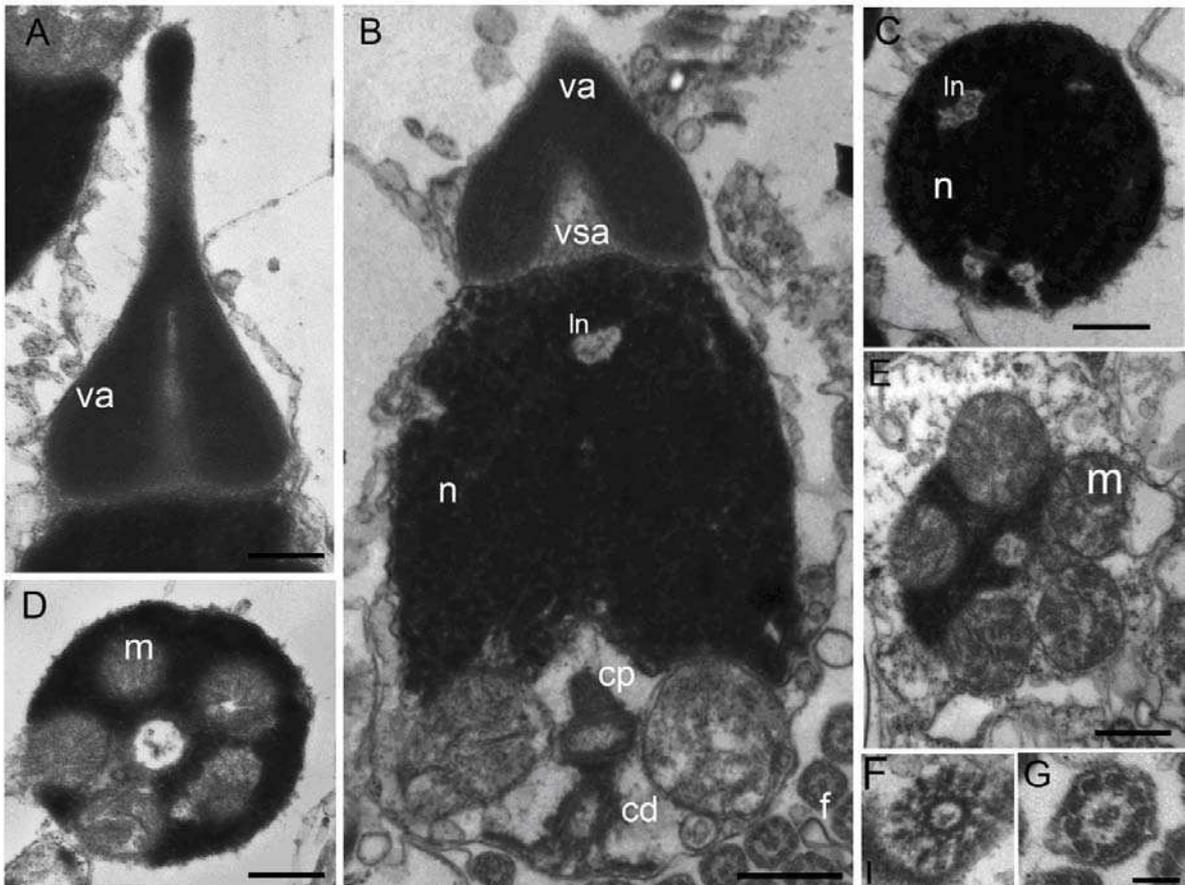
## Morfología del espermatozoide

El espermatozoide era la célula más pequeña de la línea germinal. En la región apical se encontraba el complejo acrosomal, de aspecto cónico y presentaba una prolongación anterior (Figura 4. 3A-B). En el extremo posterior, la pieza media estaba constituida por mitocondrias que se encontraban íntimamente asociadas a la región basal del núcleo (Figura 4. 3C). El núcleo presentaba forma ovalada, ligeramente aplanada en los extremos. La longitud del complejo acrosomal era de  $2,87 \pm 0,27 \mu\text{m}$ , mientras la longitud aproximada del núcleo era de  $1,70 \pm 0,11 \mu\text{m}$ .



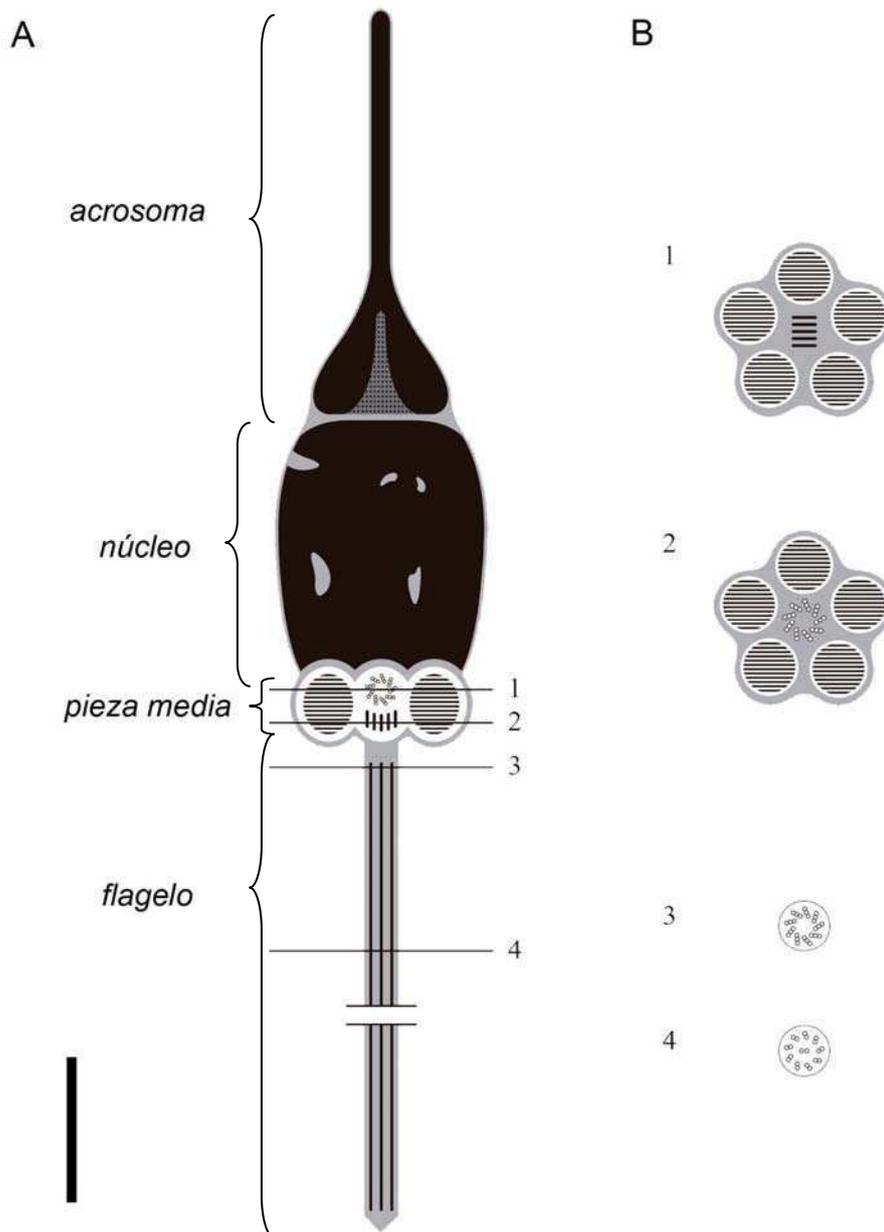
**Figura 4. 3.** Morfología del espermatozoide de *B. rodriguezii* (M.E.B.) **A.** Aspecto general del núcleo y acrosoma. **B.** Espermatozoide completo en vista longitudinal, con acrosoma extendido y flagelo que continúa posteriormente a la pieza media. **C.** Mitocondrias esféricas (punta de flecha) en la región posterior de la pieza media. Referencias: (a) acrosoma; (f) flagelo. Escala: 1000 nm.

En el interior del complejo acrosomal el material se disponía de manera homogénea (Figura 4. 4A). La vesícula subacrosomal presentó un contenido granular (Figura 4. 4B). En el interior del núcleo se observaron lagunas nucleares distribuidas al azar entre la heterocromatina (Figura 4.3 B, C). Hacia el extremo posterior se observó la pieza media formada por cinco mitocondrias esféricas dispuestas en forma contigua formando un anillo (Figura 4. 4 D, E) que a su vez, rodeaban dos centriolos dispuestos de manera ortogonal (Figura 4. 4B, F). La talla de las mitocondrias resultó ser de  $0,76 \pm 0,25 \mu\text{m}$  de diámetro. Desde el centriolo distal y hacia el extremo posterior del espermatozoide se observó un flagelo simple (9+2) (Figura 4. 4G).



**Figura 4. 4.** Morfología del espermatozoide de *B. rodriguezii* (M.E.T). **A.** Corte longitudinal de la vesícula acrosomal. **B.** Corte longitudinal de una espermátida tardía, vesícula subacrosomal, núcleo y pieza media mostrando el centriolo proximal, y el centriolo distal. **C.** Corte transversal del núcleo. **D.** Corte transversal de porción anterior de la pieza media, es posible observar a las mitocondrias en contacto estrecho con el núcleo. **E.** Sección transversal de la pieza media. **F.** Sección transversal del centriolo distal. **G.** Sección transversal del flagelo. Referencias: (cd) centriolo distal; (cp) centriolo proximal; (ln) lagunas nucleares (m) mitocondria; (n) núcleo; (va) vesícula acrosomal; (vsa) vesícula subacrosomal. Escalas A-E: 0,5  $\mu\text{m}$ . Escalas F y G: 0,1  $\mu\text{m}$ .

La información proporcionada por la microscopía electrónica, tanto de transmisión como de barrido, permitió realizar la reconstrucción esquemática de la morfología del espermatozoide de *B. rodriguezii* (Figura 4. 5).

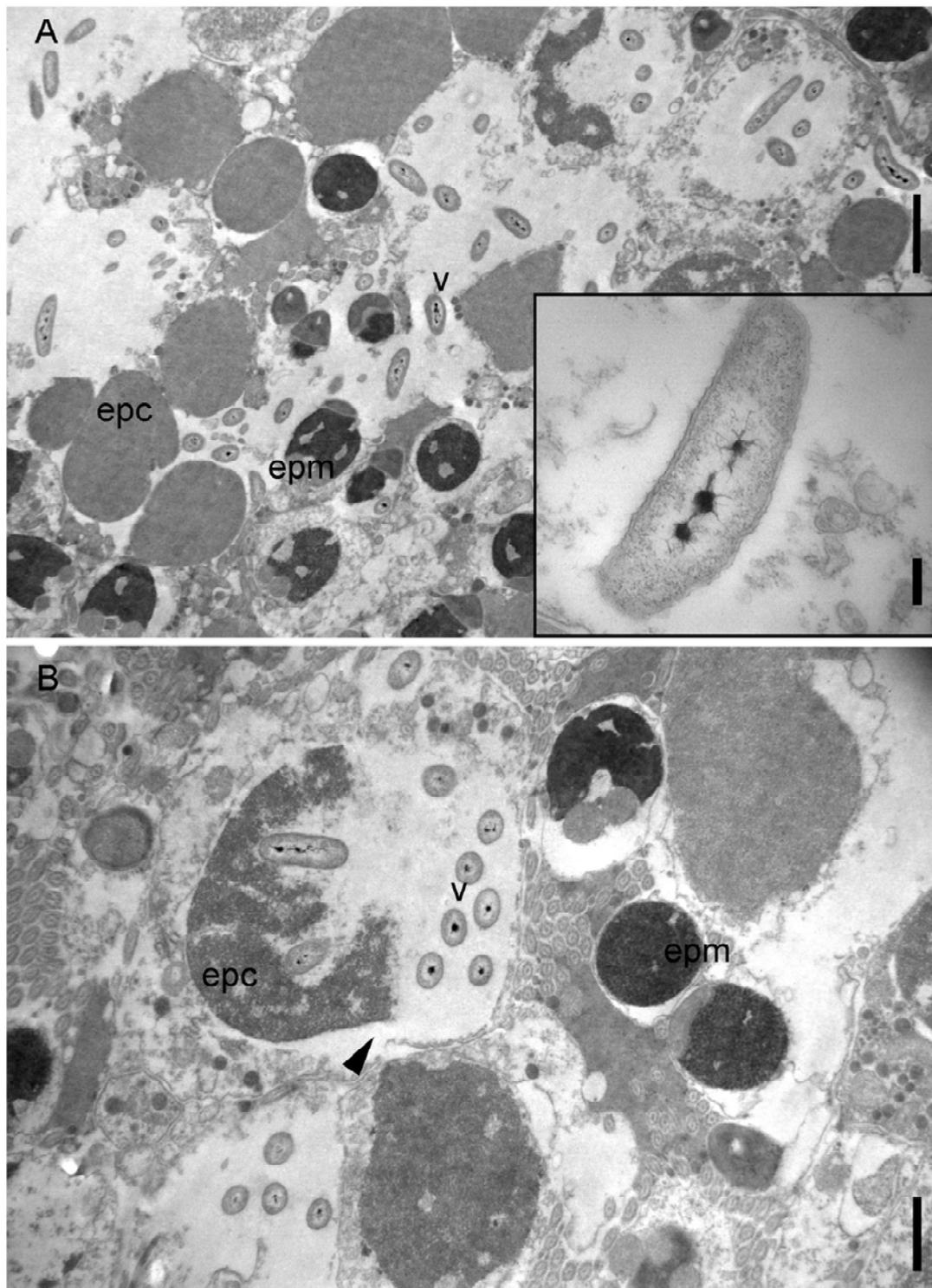


**Figura 4. 5.** Esquema del espermatozoide de *B. rodriguezii*. **A.** Esquema de corte longitudinal del espermatozoide. Las líneas marcadas sobre el esquema en vista longitudinal se corresponden con los esquemas de cortes transversales (CT) de B. **B.** 1: CT de pieza media a nivel de centriolo proximal, 2: CT de pieza media a nivel del centriolo distal, 3: CT de la base del flagelo y 4: CT a nivel del flagelo. Escala: 1  $\mu$ m.

## Alteraciones ultraestructurales en la gónada masculina de *B. rodriguezii*

En todos los individuos tomados del Puerto de Mar del Plata se observaron vesículas con material electrodensito dispersas en el interior en la gónada masculina (Figura 4. 6A). Estas vesículas contenían una serie de estructuras de forma irregular y alta electrodensidad (Figura 4. 6A, Recuadro). Se observaron membranas plasmáticas desorganizadas. Las vesículas se encontraban también dentro de células de la línea espermatogénica (Figura 4. 6B).

En los espermatozoides se observó que el contenido de la vesícula acrosomal era levemente electrodensito (Figura 4. 7A y B). La pieza media estaba constituida por cinco mitocondrias esféricas dispuestas en anillo, rodeando un par de centriolos dispuestos de manera ortogonal. Las crestas mitocondriales se observaban poco contrastadas (difusas) (Figura 4. 7C).



**Figura 4. 6.** Espermatogénesis de individuos de *B. rodriguezii* de Mar del Plata. **A.** Aspecto general donde se reconocen numerosas vesículas entre las células espermatogénicas, espermatocitos y espermatidas. **Recuadro:** Detalle de vesícula. **B.** Espermatocitos con membranas desorganizadas (punta de flecha) y vesículas en su interior. Referencias: (epc) espermatocitos; (epm) espermatidas; (v) vesículas. Escala A: 1  $\mu$ m. Escala B: 2  $\mu$ m. Escala recuadro: 200 nm.



**Figura 4. 7.** Fotografías de espermatozoides de *B. rodriguezii* de Mar del Plata. **A.** Espermatozoide que presenta una vesícula acrosomal con contenido poco electrodensito. **B.** Regiones del acrosoma con marcadas diferencias de electrodensidad del contenido. **C.** Mitocondrias de la pieza media con crestas difusas. Referencias: (a) acrosoma; (m) mitocondrias; (n) núcleo. Escalas A y B: 1  $\mu\text{m}$ . Escala C: 0,5  $\mu\text{m}$ .

#### 4.4 Discusión

La espermatogénesis en *Brachidontes rodriguezii* muestra similitudes con otras especies de bivalvos mitílidos (Bernard *et al.*, 1988; Reunov *et al.*, 1999; Eckelbarger y Young, 1999; Kádár *et al.*, 2006; Yurchenko y Vaschenko, 2010). Al comienzo de la espermatogénesis, en las espermatogonias y los espermatocitos de *B. rodriguezii*, se pueden reconocer las vesículas que se fusionaran para dar lugar al complejo acrosomal. La condensación de la heterocromatina y la elongación del núcleo ocurren a medida que comienza a formarse el complejo acrosomal y la maduración continúa. La gametogénesis culmina con la formación del espermatozoide.

En los moluscos las características del espermatozoide son altamente conservadas a nivel específico y constituyen una herramienta en estudios taxonómicos (Franzén, 1983; Drozdov y Reunov, 1997; Healy *et al.*, 2000; Drozdov *et al.*, 2009; Bieler *et al.*, 2014). Actualmente se realizan estudios filogenéticos integrando herramientas morfológicas de la taxonomía clásica (características de la concha, larva, branquias, pie y músculos, entre otros) con marcadores moleculares. Estos estudios sugieren que la caracterización de los aspectos ultraestructurales del espermatozoide constituye una herramienta fundamental. Junto con los caracteres morfológicos de la concha, la descripción del espermatozoide proporciona casi el 50% de los caracteres informativos (Bieler *et al.*, 2014).

Para la familia Mytilidae, se ha descrito la morfología del espermatozoide en numerosas especies (Kafanov y Drozdov, 1998; Eckelbarger y Young, 1999; Introíni *et al.*, 2004, 2009, 2010; Desouky, 2009). El espermatozoide de los mitílidos es de tipo primitivo, y es característico de especies cuya fecundación ocurre en el agua (Jamieson y Rouse, 1989; Kafanov y Drozdov, 1998; Eckelbarger y Young, 1999; Reunov *et al.*, 1999). El espermatozoide de tipo primitivo presenta un complejo acrosomal cónico, puede ser simple o presentar diferentes grados de complejidad, por ejemplo, especies del género *Bathymodiolus* presentan una vesícula acrosomal simple, mientras que para *Mytilus*, la vesícula acrosomal es compleja, presentado zonas bien diferenciadas (Popham, 1979; Eckelbarger y Young, 1999; Healy *et al.*, 2000). El núcleo es por lo general ovoide, la pieza media usualmente tiene 5 mitocondrias esféricas, pero esto puede variar. Para el género *Modiolus*, dentro de la familia Mytilidae, la pieza media

puede tener entre 12 y 14 mitocondrias (Kafanov y Drozdov, 1998; Healy *et al.*, 2000; Gladyshev y Drozdov, 2002).

El carácter aparentemente más variable, y que proporcionaría la mayor cantidad de información es la morfología del complejo acrosomal. Mientras que los menos informativos son, la estructura del flagelo y la forma de las mitocondrias (Garrido y Gallardo, 1996; Healy *et al.*, 2000; Introíni *et al.*, 2004, 2009). La longitud del núcleo y del complejo acrosomal, están relacionadas con la morfología del oocito. Es decir, el complejo acrosomal es más largo en aquellas especies donde la cubierta gelatinosa del oocito es gruesa. Mientras que para las especies con cubierta más delgada, el complejo acrosomal tiene menor longitud. El medio donde ocurre la fecundación también afectaría las características del acrosoma. Para las especies que tienen fecundación en el agua, el complejo acrosomal sería más largo, y el núcleo redondeado. Cuando la fecundación ocurre por ejemplo en la cavidad del manto, el núcleo es más alargado y el acrosoma es reducido (Franzén, 1983). Para la familia Mytilidae, Kavanov y Drozdov (1998) proponen una división en tres subfamilias en base a la forma del núcleo y del contenido de la vesícula subacrosomal. La subfamilia Mytilinae, (*Mytilus*, *Perna* y *Crenomytilus*) donde el acrosoma es elongado, y en la vesícula subacrosomal hay una estructura de naturaleza proteica con forma alargada denominada raíz axial que se prolonga en la vesícula subacrosomal rodeada por el núcleo. La subfamilia Musculinae (género *Musculus*), donde el acrosoma es cónico y de longitud reducida, mientras que el núcleo es muy alargado y en la vesícula subacrosomal se observa raíz axial. Y la subfamilia Modiolinae (*Modiolus*, *Alaucomya*, *Brachidontes* y *Choromytilus* entre otros) donde el complejo subacrosomal es cónico, de longitud variable, con ausencia de raíz axial y el núcleo es de forma ovalada y de longitud reducida.

La morfología del espermatozoide de *Brachidontes rodriguezii* se asemeja a la morfología observada para otras especies del género, como *Brachidontes solicianus* y *Brachidontes darwinianus* (Introíni *et al.*, 2004). *Brachidontes semistriatus* (Reunov y Hodgson, 1994) y *Brachidontes purpuratus* (Garrido y Gallardo, 1996; Briones *et al.*, 2012; Torroglosa y Giménez, 2015). El espermatozoide es de tipo primitivo, el complejo acrosomal es cónico y ligeramente afinado hacia el extremo apical. La vesícula acrosomal es simple y durante la espermiogénesis se observa una zona con

mayor densidad hacia el extremo y menos densidad hacia la base, próxima al núcleo. Estas diferencias no se observan en el espermatozoide. La región que presenta mayor variabilidad morfológica entre las especies, resultó ser el acrosoma. *B. rodriguezii* posee un acrosoma ligeramente más largo que el de *B. purpuratus* y de longitud comparable a lo reportado para *B. solisianus*. Mientras que *B. darwinianus*, presenta un complejo acrosomal ligeramente más corto que el descrito para *B. rodriguezii*, y la morfología del núcleo también difiere, siendo más ovalado para este último. Vinuesa (1981) menciona para *Brachydontes purpuratus* (Lmk.) en una descripción con microscopía óptica, que la longitud del acrosoma junto con el núcleo es de entre 8 y 9,5 micrones, es decir, un espermatozoide cuya porción anterior duplicaría en longitud al tamaño obtenido para *B. rodriguezii* en este estudio. Bernard *et al.* (1988) describe para *Brachidontes virgiliae*, un espermatozoide de tipo primitivo, al igual que para otras especies de género, sin embargo la longitud del complejo acrosomal es aproximadamente un quinto de la mencionada para *B. rodriguezii*. Y a diferencia de lo que se observa habitualmente en la pieza media, que es la presencia de cinco mitocondrias esféricas, *B. virgiliae* tiene seis. La descripción de la morfología del espermatozoide de *B. rodriguezii* de este estudio, contribuye al conjunto de caracteres taxonómicos que caracterizan a la especie.

#### *Efectos de los disturbios antropogénicos en la ultraestructura de las células espermatogénicas*

Los individuos de *B. rodriguezii* de la población de la escollera sur del puerto de Mar del Plata mostraron modificaciones en la estructura de algunas organelas y presentaron vesículas electrodensas a diferencia de lo registrado para la población de Villa Gesell. Se han mencionado para otras especies de moluscos alteraciones de la línea germinal en ambientes contaminados (Yurchenco y Vaschenko, 2010; Vaschenko *et al.*, 2013). Cambios en la organización de las células germinales y somáticas dentro de los acinos gonadales, alteraciones de la morfología celular, y de la composición bioquímica son los resultados predominantes en los estudios realizados en invertebrados marinos, frente a distintos tipos de disturbios ambientales (Au *et al.*, 2001; Yurchenco y Vaschenko, 2010; Podgurskaya y Kavun, 2012; Schmidt *et al.*, 2013).

Para el puerto de Mar del Plata se ha reportado la presencia de sustancias como tributilestaño (TBT) (Cledón *et al.*, 2006; Bigatti *et al.*, 2009), PCB's y pesticidas organoclorados (Colombo *et al.*, 2005). Los tributilestaños son componentes de pinturas antiincrustantes y para los niveles registrados en Mar del Plata se han citado malformaciones anatómicas en hembras de gasterópodos (Teso y Penchaszadeh, 2009; Cledón *et al.*, 2006; Arrighetti y Penchaszadeh, 2010; Averbuj y Penchaszadeh, 2010) y cápsulas de embriones (Cledón *et al.*, 2006). No se conocen hasta el momento efectos del TBT en poblaciones de moluscos bivalvos para Mar del Plata. Estudios realizados en ostras en sitios contaminados con TBT y DDT revelan que podría verse afectada la tasa de crecimiento (Bayen *et al.*, 2007) y el ciclo reproductivo (Steele y Mulcahy, 1999). Mientras que, las alteraciones observadas en ambientes con alta concentración de metales pesados incluyen: cambios en la morfología gonadal, atresia oocitaria e infiltraciones de hemocitos en tejido gonadal, alteraciones de la actividad gametogénica e inclusive el cese de la gametogénesis (Vaschencko *et al.*, 2013). A nivel ultraestructural: cambios en la morfología del complejo acrosomal, acrosomas múltiples y acrosomas parcialmente degradados (Yurchenco y Vaschenko, 2010). Una respuesta de los tejidos frente a la presencia de metales pesados es capturarlos y aislarlos mediante vesículas membranosas que los acumulan selectivamente (George *et al.*, 1978). La acumulación de cobre y zinc que tiene lugar por ejemplo en los hemocitos, culmina con la migración de las vesículas por diapédesis desde los diferentes órganos hasta el epitelio del manto donde ocurriría la liberación de las vesículas. Esto permitiría que las ostras continúen en un medio contaminado, sin ver significativamente afectada su supervivencia (Abbe y Sanders, 1986). En los individuos que habitan el puerto de Mar del Plata, se observaron vesículas en el interior de los acinos gonadales, así como, membranas plasmáticas y crestas mitocondriales desorganizadas. Esto último podría tener consecuencias funcionales en los espermatozoides de la población del puerto de Mar del Plata. Según Au *et al.* (2001) en erizos expuestos a elevados valores de cadmio se observó que las membranas que constituyen las crestas mitocondriales se encontraban deformadas y sugieren que podría verse comprometida la producción de ATP y la motilidad espermática.

5- Ciclo reproductivo.

## 5.1 Introducción

La permanencia de una especie a lo largo del tiempo y el tamaño que una población puede alcanzar son fenómenos que están vinculados a la reproducción. En muchos casos la actividad reproductiva consiste en un proceso cíclico que involucra a aquellos organismos que han culminado su etapa juvenil (Giese y Pearse, 1974). Estos procesos consisten en una serie de eventos, que incluyen la proliferación de las células germinales, la diferenciación, maduración de gametas y los comportamientos reproductivos asociados a la cópula o a la liberación de gametas según las estrategias reproductivas (Sastry, 1983). Los ciclos reproductivos están sometidos a la regulación mediante componentes endógenos, propios de los organismos y exógenos. Estos últimos representados por factores ambientales (temperatura, salinidad y disponibilidad de alimento entre otros). De la interacción entre ambos factores, surgen las características (periodicidad, extensión en el tiempo) de los ciclos reproductivos (Ebert, 1994). La temperatura resulta ser uno de los parámetros ambientales más importantes relacionado con el ciclo reproductivo, así como la disponibilidad de alimento entre otros (Giese y Pearse, 1974; Lubet, 1981; Suarez *et al.*, 2005; Fearman y Moltschaniwskyj, 2010). En los bivalvos la acumulación de sustancias de reserva ocurre en células especializadas del tejido conectivo, participando de esta manera del desarrollo de la gónada. La gónada manifiesta cambios a medida que transcurre el ciclo reproductivo (Pipe, 1987a; Gimeno *et al.*, 1991; Mathieu y Lubet, 1993). Existe una relación inversamente proporcional en relación al desarrollo del tejido conectivo y el tejido gonadal, ya que este último depende de las sustancias (en particular, del glucógeno) almacenadas en el tejido conectivo (Bayne *et al.*, 1982; Lowe *et al.*, 1982).

Se han descrito los ciclos reproductivos de numerosas especies de bivalvos y en particular de especies de importancia económica (Sunila, 1981; Villalba, 1995; Rodríguez-MoscOSO y Arnaiz, 1998; Darriba *et al.*, 2004; Barber *et al.*, 2005; Suárez *et al.*, 2005; Ángel-Pérez *et al.*, 2007; Herrmann *et al.*, 2009a; Pérez *et al.*, 2013). Aun así, existe un conocimiento parcial acerca de las interacciones entre los factores exógenos que determinan por ejemplo, la iniciación y duración del ciclo y la sincronidad en la formación de las gametas, en particular en las especies dioicas y con fecundación

externa (Rogers *et al.*, 1982). El objetivo de este capítulo fue describir el ciclo reproductivo en hembras y machos de *Brachidontes rodriguezii*.

## 5.2 Materiales y métodos

Se recolectaron 487 individuos fijados en solución de Bouin de los meses comprendidos entre mayo de 2011 y mayo de 2013 de la localidad de Villa Gesell (Tabla 5.1). Mediante un protocolo de inclusión en parafina se obtuvieron cortes histológicos. Se utilizó una coloración de hematoxilina de Carazzi y eosina alcohólica (Apéndice). Se utilizaron individuos de un rango de tallas entre 11,75 y 25,50 mm de largo total. Este rango de tallas comprende individuos maduros sexualmente. Del total de 487 individuos estudiados se determinaron 242 hembras, 230 machos y 15 individuos de talla adulta, sexualmente indeterminados.

### Hembras

Se observaron los cortes histológicos provenientes de 242 hembras (Tabla 5. 1). Para cada hembra se fotografiaron al azar cinco campos del pliegue del manto. Se midió el área de cada oocito con nucléolo visible (Figura 5. 1) y se calculó la frecuencia de tallas oocitarias y además se calculó la frecuencia de los de estadios de desarrollo oocitario (Tabla 5.2). Se utilizó el programa AxioVision (2013) 4.8.2 para procesar las imágenes. Se estableció de manera cualitativa bajo M.O. el grado de desarrollo de la gónada femenina. En función de la proporción de los diferentes estadios oocitarios presentes y el grado de desarrollo del tejido conectivo que rodeaba los acinos, se establecieron estadios de desarrollo gonadal.

Año	Mes	Hembras		Machos	
		N	LT ± DS	N	LT (mm)±DS
2011	mayo	10	19,43 ± 2,87	11	17,76 ± 1,59
	junio	10	17,09 ± 2,11	19	16,95 ± 2,80
	julio	10	14,85 ± 3,05	16	17,01 ± 3,41
	agosto	10	17,77 ± 2,70	13	18,56 ± 4,78
	septiembre	10	18,95 ± 4,27	19	17,78 ± 3,16
	octubre	10	16,17 ± 2,6	14	15,52 ± 2,45
	noviembre	10	14,16 ± 2,49	13	15,68 ± 3,24
	diciembre	10	15,28 ± 2,99	11	15,90 ± 3,71
2012	enero	10	15,43 ± 2,32	8	15,25 ± 2,11
	febrero	10	15,95 ± 4,09	10	14,53 ± 2,41
	marzo	10	15,95 ± 3,7	6	15,38 ± 3,20
	abril	10	16,93 ± 2,92	8	15,18 ± 2,81
	junio	10	15,51 ± 3,42	9	18,06 ± 2,92
	julio	10	18,10 ± 3,01	7	18,98 ± 2,58
	agosto	10	19,15 ± 2,58	7	18,65 ± 3,57
	septiembre	11	17,63 ± 3,77	6	15,33 ± 1,54
	octubre	10	16,37 ± 2,42	6	15,99 ± 1,74
	noviembre	10	17,90 ± 4,76	6	17,75 ± 5,76
	diciembre	10	17,19 ± 3,25	9	15,07 ± 3,42
	2013	enero	11	18,91 ± 3,39	6
febrero		10	16,34 ± 2,34	6	16,76 ± 3,36
marzo		10	18,17 ± 3,62	7	16,17 ± 3,80
abril		10	16,43 ± 2,47	6	14,54 ± 1,37
mayo		10	16,02 ± 2,46	6	16,45 ± 2,14

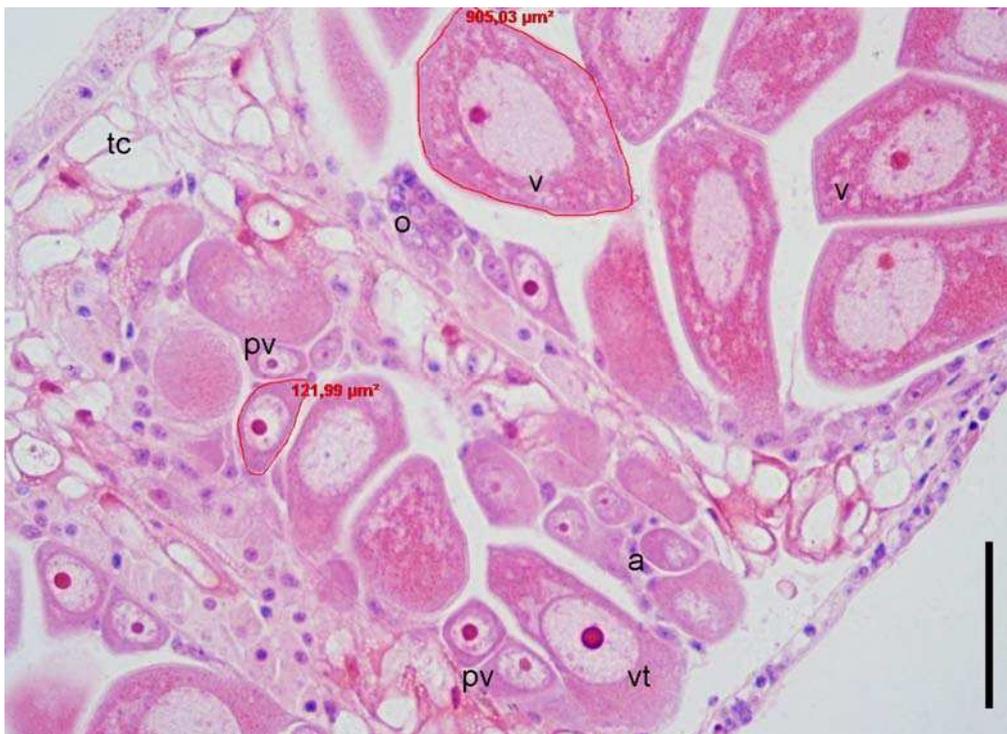
**Tabla 5. 1.** Datos de los individuos de *B. rodriguezii* utilizados en el estudio de ciclo reproductivo. N: número de individuos, LT±DS: largo total promedio y desvío estándar.

#### Machos

Se consideraron entre 6 y 19 individuos por mes durante 24 meses (Tabla 5. 1). Se estableció de manera cualitativa bajo M.O. el grado de desarrollo de la espermatogénesis en el interior de los acinos gonadales. Se estimó la frecuencia de desarrollo de la gónada masculina en función de los meses.

## Análisis de los datos

Mediante ANOVA de un factor se analizó la variación del área oocitaria de los diferentes estadios de maduración (previtelogénicos, vitelogénicos tempranos y vitelogénicos) de un total de 10400 oocitos en relación con las estaciones durante el período de estudio. Se consideró que los meses de abril a junio se correspondían con el otoño, el período julio –septiembre, con el invierno, octubre-diciembre se correspondía con la primavera y el período enero-marzo con el verano. Se comprobaron los supuestos de normalidad y homocedacea y se realizaron comparaciones a posteriori mediante test de Tukey. Mediante ANOVA de un factor se evaluaron las diferencias mensuales de la frecuencia de los oocitos vitelogénicos (Sokal y Rohlf, 1995).



**Figura 5. 1.** Determinación del área de los oocitos en acinos gonadales de hembras de adultas de *B. rodriguezii*. Dentro de los acinos se observan distintos tipos de oocitos, acompañados por células accesorias y tejido conectivo. Referencias: (a) células accesorias; (o) oogonias; (pv) oocitos previtelogénicos; (tc) tejido conectivo; (v) oocitos vitelogénicos. Escala: 50  $\mu\text{m}$ .

Año	Mes	Previtelogénicos	Vitelogénicos tempranos	Vitelogénicos	Total
2011	mayo	75	1	45	122
	junio	159	65	162	367
	julio	146	98	152	397
	agosto	205	66	228	499
	septiembre	212	96	234	543
	octubre	159	173	217	556
	noviembre	182	134	221	537
	diciembre	170	118	272	588
2012	enero	127	95	247	470
	febrero	145	90	310	544
	marzo	194	158	114	466
	abril	46	43	82	171
	junio	151	115	95	361
	julio	89	126	40	255
	agosto	156	163	101	419
	septiembre	126	195	183	504
	octubre	115	228	123	466
	noviembre	111	206	198	515
	diciembre	173	172	145	500
	2013	enero	65	111	338
febrero		94	197	172	463
marzo		57	115	258	430
abril		46	143	200	389
mayo		129	153	79	361

**Tabla 5. 2.** Cuantificación de los estadios oocitarios de hembras maduras *B. rodriguezii* para el período de estudio.

### 5.3 Resultados

#### Registro de temperatura de agua superficial y salinidad

Para el período comprendido entre mayo de 2011 y mayo de 2013 se obtuvo el registro de temperatura de agua de superficie y salinidad. El rango de temperatura fue de entre 10,10 y 17,80 °C para otoño-invierno y de 14,20-21,70 °C para primavera-verano y el de salinidad de 32-37 ‰. La exposición a horas de luz durante el día fue de

9,75 - 11,68 horas durante otoño/invierno y 12,35 - 14,66 horas durante primavera/verano.

Hembras

#### Estudio del área oocitaria

Se encontraron diferencias significativas para la variación del tamaño de los estadios oocitarios entre estaciones para los dos años del estudio, oocitos previtelogénicos ( $F_{(1,3119)}=35,832$ ;  $p=0,001$ ); oocitos vitelogénicos tempranos ( $F_{(1,3052)}=50,051$ ;  $p < 0,001$ ) y para los oocitos vitelogénicos ( $F_{(1,4202)}= 83,316$ ;  $p < 0,001$ ) (Figura 5. 2).

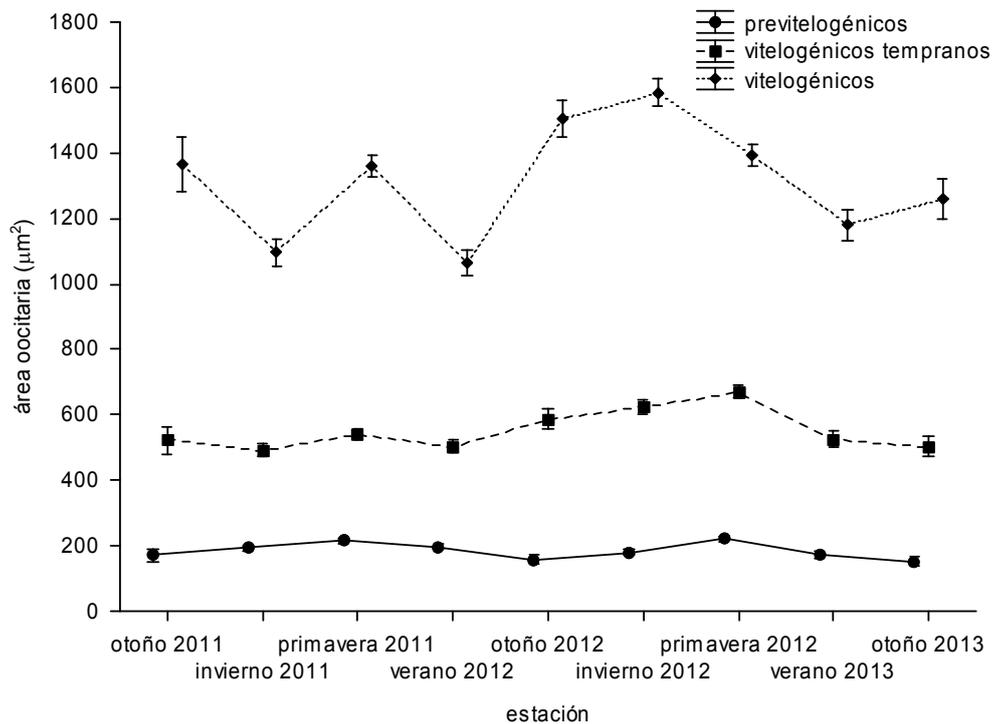


Figura 5.2. Áreas promedio y DS de los diferentes estadios oocitarios para el período de estudio comprendido entre mayo de 2011 – mayo de 2013.

Los oocitos previtelogénicos presentaron entre 30 y 400  $\mu\text{m}^2$  de superficie. Las áreas máximas se alcanzaron en primavera de 2011 y 2012 (Figura 5. 2). Del análisis de la variación del área oocitaria (que resultó del test de Tukey) se observó un aumento significativo en el área a partir de otoño de 2011, así como durante el invierno ( $F_{(1, 3119)}= 197,461$ ;  $p < 0,001$ ). Registrándose en primavera de 2011 las áreas significativamente mayores ( $F_{(1,3119)}= 215,83$ ;  $p < 0,001$ ). Luego, en verano de 2012 se registró una disminución en el área de los oocitos ( $F_{(1,3119)}=200,24$  ;  $p < 0,001$ ) y no se encontraron diferencias en otoño de 2012 respecto del otoño del 2011 ( $F_{(1,3119)}= 156,35$  ;  $p = 0,597$ ). Para el período comprendido entre otoño de 2012 y otoño de 2013, la variación del área de los oocitos previtelogénicos mostró un comportamiento similar al del período anterior. Se registró un aumento del área de los oocitos durante los meses de bajas temperaturas hasta alcanzar el máximo valor en primavera seguido de una disminución hasta alcanzar en otoño de 2013 los valores más bajos del año. De la comparación entre estaciones para los dos años del estudio resultó que no se encontraron diferencias para la primavera de 2011 y 2012 ( $F_{(1, 3119)}= 220,37$  ;  $p = 0,996$ ) y el invierno de 2011-2012 ( $F_{(1, 3119)}=183,26$  ;  $p = 0,198$ ). Para los meses de verano de 2012 y 2013 se registró una disminución significativa en el área promedio de 201,33  $\mu\text{m}^2$  a 171,18  $\mu\text{m}^2$  ( $F_{(1, 3119)}= 171,30$  ;  $p = 0,003$ ). Finalmente para otoño 2012-2013 ( $F_{(1, 3119)}=149,39$ ;  $p = 0,984$ ) no se registraron diferencias en las áreas promedio.

Los oocitos con vitelogénesis temprana presentaron entre 350 y 900  $\mu\text{m}^2$  de superficie. La variación del área promedio durante el período de estudio registró un comportamiento similar al observado para los oocitos previtelogénicos, es decir, hubo un aumento de la superficie en las estaciones de bajas temperaturas hasta alcanzar las mayores superficies en la primavera (Figura 5. 2).

Para el primer año de estudio, de otoño 2011 a otoño 2012, no se registraron variaciones significativas en el tamaño de los oocitos entre otoño e invierno de 2011 ( $F_{(1,3052)}= 543,28$  ;  $p = 0,993$ ). Hubo un aumento ligeramente significativo de 496,38 a 548,02  $\mu\text{m}^2$  hacia la primavera de ese año ( $F_{(1, 3052)}= 543,28$  ;  $p = 0,016$ ). No se registraron cambios significativos sino hasta el otoño de 2012, donde los oocitos alcanzaron un área promedio de 622,38  $\mu\text{m}^2$  ( $F_{(1,3052)}= 607,66$  ;  $p < 0,001$ ). Para el segundo año, no se registraron cambios significativos en el área sino hasta la primavera de 2012, donde el área de los oocitos vitelogénicos tempranos alcanzó el

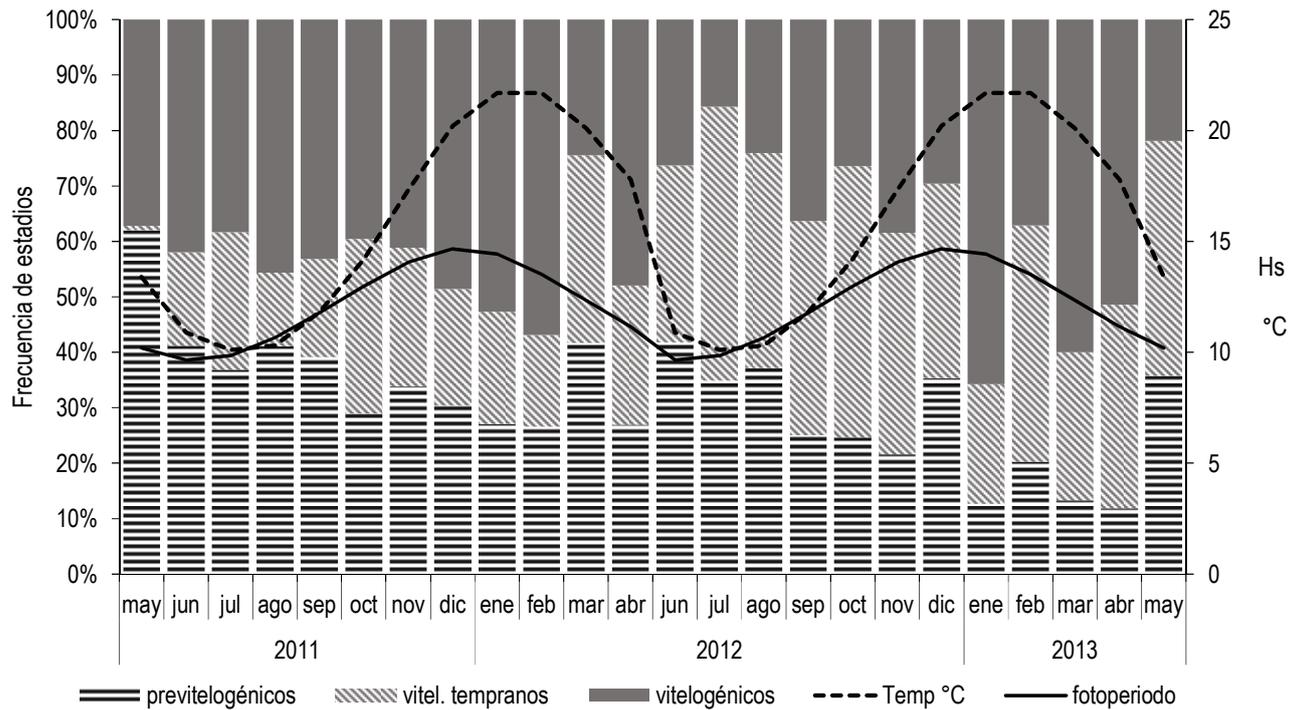
máximo valor promedio ( $760,46 \mu\text{m}^2$ ) ( $F_{(1,3052)}= 666,67$  ;  $p= 0,006$ ). En verano de 2013 se registró una disminución significativa ( $F_{(1,3052)}=512,60$  ;  $p < 0,001$ ), mientras que no se registraron variaciones significativas hacia el otoño de 2013 ( $F_{(1,3052)}= 498,39$  ;  $p = 0,984$ ). A diferencia de lo observado para los oocitos previtelogénicos, la comparación entre estaciones mostró diferencias significativas para otoño 2011 – 2012 ( $F_{(1,3052)}= 607,66$  ;  $p = 0,038$ ) y otoño 2012-2013 ( $F_{(1,3052)}=498,39$  ;  $p < 0,001$ ). Lo mismo ocurrió para invierno 2011-2012 ( $F_{(1,3052)}= 624,36$  ;  $p < 0,001$ ) y primavera 2011-2012 ( $F_{(1,3052)}= 666,07$  ;  $p < 0,001$ ). Mientras que para verano 2012-2013 no se encontraron diferencias ( $F_{(1,3052)}= 512,60$  ;  $p = 0,999$ ).

En el citoplasma de los oocitos vitelogénicos se observaron numerosos gránulos de vitelo. Para este estadio oocitario se observó la mayor variabilidad en cuanto al tamaño ya que presentaron entre  $800$  y  $2700 \mu\text{m}^2$  de área (Figura 5. 2).

Para el primer año del estudio se observó que el área promedio de los oocitos vitelogénicos osciló entre  $1.058,80 \mu\text{m}^2$  en verano de 2012 y  $1.462,53 \mu\text{m}^2$  en otoño de ese mismo año. Las variaciones resultaron ser significativas durante todo el período, de otoño 2011 a invierno 2011 ( $F_{(1, 4202)}= 1134,50$  ;  $p < 0,001$ ), de invierno a primavera de ese mismo año ( $F_{(1, 4202)}= 1372,70$  ;  $p < 0,001$ ) y durante la transición al verano de 2012 ( $F_{(1,4202)}= 1101,5$  ;  $p < 0,001$ ). A partir del verano de 2012 y hasta el invierno de ese año se observó un aumento en el área de los oocitos vitelogénicos. El valor promedio más alto registrado fue de  $1.622,76 \mu\text{m}^2$  y se alcanzó en invierno de 2012. El segundo año del estudio también mostró variaciones significativas para el área de los oocitos vitelogénicos, a excepción del período verano-otoño de 2013 ( $F_{(1,4202)}= 1273,50$  ;  $p = 0,999$ ). El registro de la variación del área promedio de los oocitos vitelogénicos entre estaciones resultó presentar diferencias significativas en la mayoría de los casos. Para otoño 2011-2012 ( $F_{(1, 4202)}= 1443,6$  ;  $p = 0,019$ ), invierno 2011-2012 ( $F_{(1,4202)}= 1574,4$  ;  $p < 0,001$ ), primavera 2011-2012 ( $F_{(1,4202)}= 1406$  ;  $p = 0,803$ ), verano 2012-2013 ( $F_{(1,4202)}= 1264,2$  ;  $p < 0,001$ ) y finalmente otoño 2012-2013 ( $F_{(1,4202)}= 1273,5$  ;  $p < 0,001$ ).

## Frecuencia de los estadios oocitarios

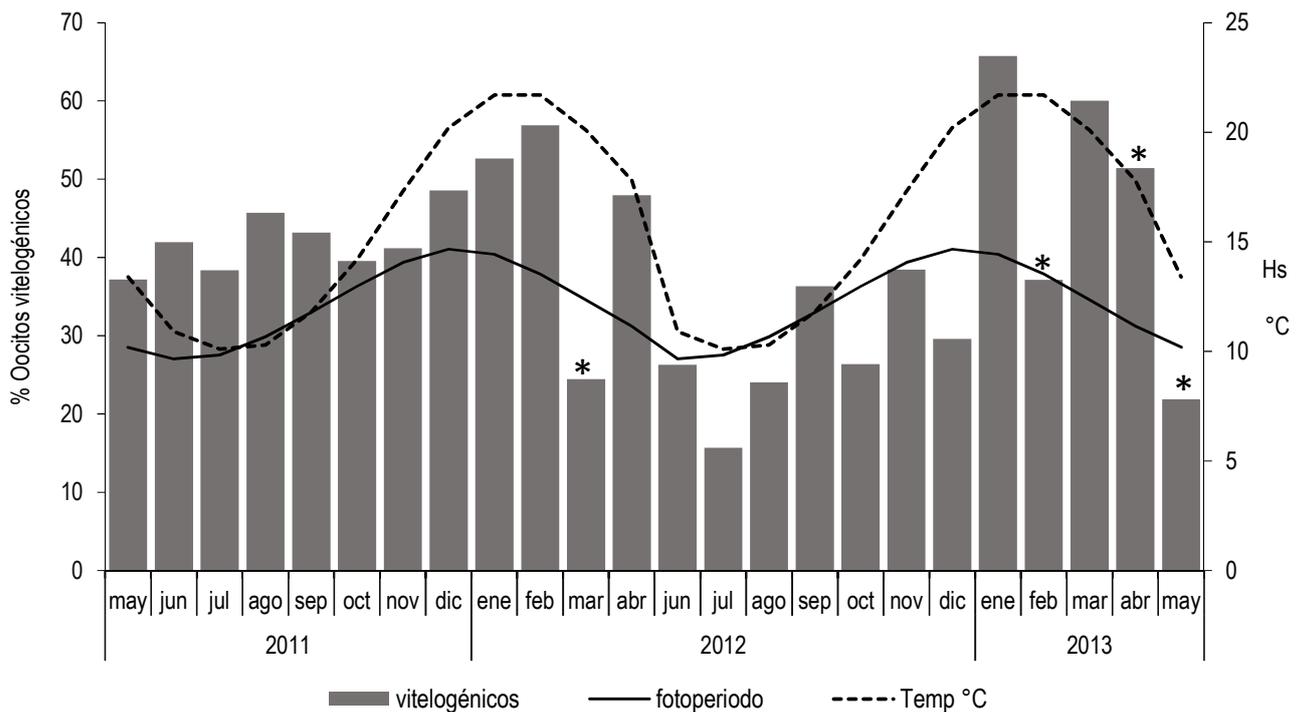
El estudio de la frecuencia de los estadios oocitarios mostró variaciones a lo largo del período comprendido entre los meses de mayo de 2011 y mayo de 2013 (Figura 5. 3).



**Figura 5. 3.** Frecuencias relativas de estadios oocitarios de *B. rodriguezii* para el período de estudio comprendido entre los meses de mayo de 2011 y mayo de 2013. Se pueden reconocer los diferentes tipos de oocitos durante todo el año.

Dentro del primer año de estudio, se observó un aumento significativo del mes de mayo a junio de 2011 ( $F_{(1,18)} = 12,763$ ;  $p = 0,002$ ), al mes siguiente baja y en agosto nuevamente se vió un aumento en la frecuencia ( $F_{(1, 18)} = 6,620$ ;  $p = 0,019$ ). Para los meses de septiembre a noviembre se observaron variaciones no significativas, mientras que en diciembre se observó un aumento significativo en la proporción de oocitos vitelogénicos ( $F_{(1, 18)} = 5,162$ ;  $p = 0,035$ ). Durante el verano, se registraron incrementos en la frecuencia de oocitos vitelogénicos hasta alcanzar el valor máximo

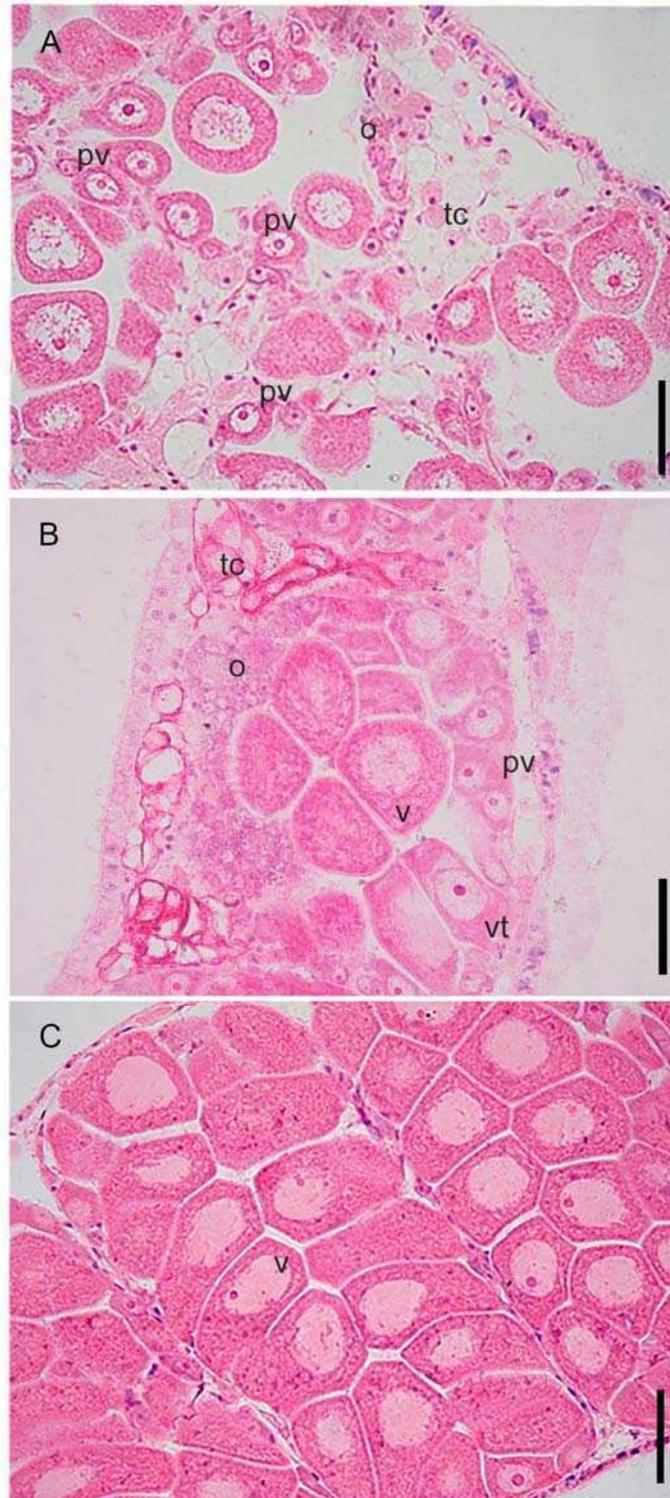
en el mes de febrero. Hacia fines del verano en el mes de marzo se observó una disminución significativa en el número de oocitos maduros ( $F_{(1, 18)} = 42,203$  ;  $p < 0,001$ ). Esta disminución sustancial en el número de oocitos indicó un evento de desove. Comenzando el segundo año del período de estudio, se registró una disminución de la frecuencia de oocitos vitelogénicos de abril a junio de 2012. Continuaron las fluctuaciones no significativas hasta el mes de enero, donde se observó un aumento significativo ( $F_{(1, 19)} = 53,628$  ;  $p < 0,001$ ). En febrero de 2013 se registró nuevamente un evento de desove. Al mes siguiente se registró un aumento significativo en la frecuencia de oocitos vitelogénicos, mientras que, para el mes de abril se observó una disminución ligeramente significativa ( $F_{(1, 18)} = 4,215$  ;  $p = 0,031$ ). Finalmente en mayo de 2013 ( $F_{(1, 18)} = 24,451$  ;  $p < 0,001$ ) se registró nuevamente un desove.



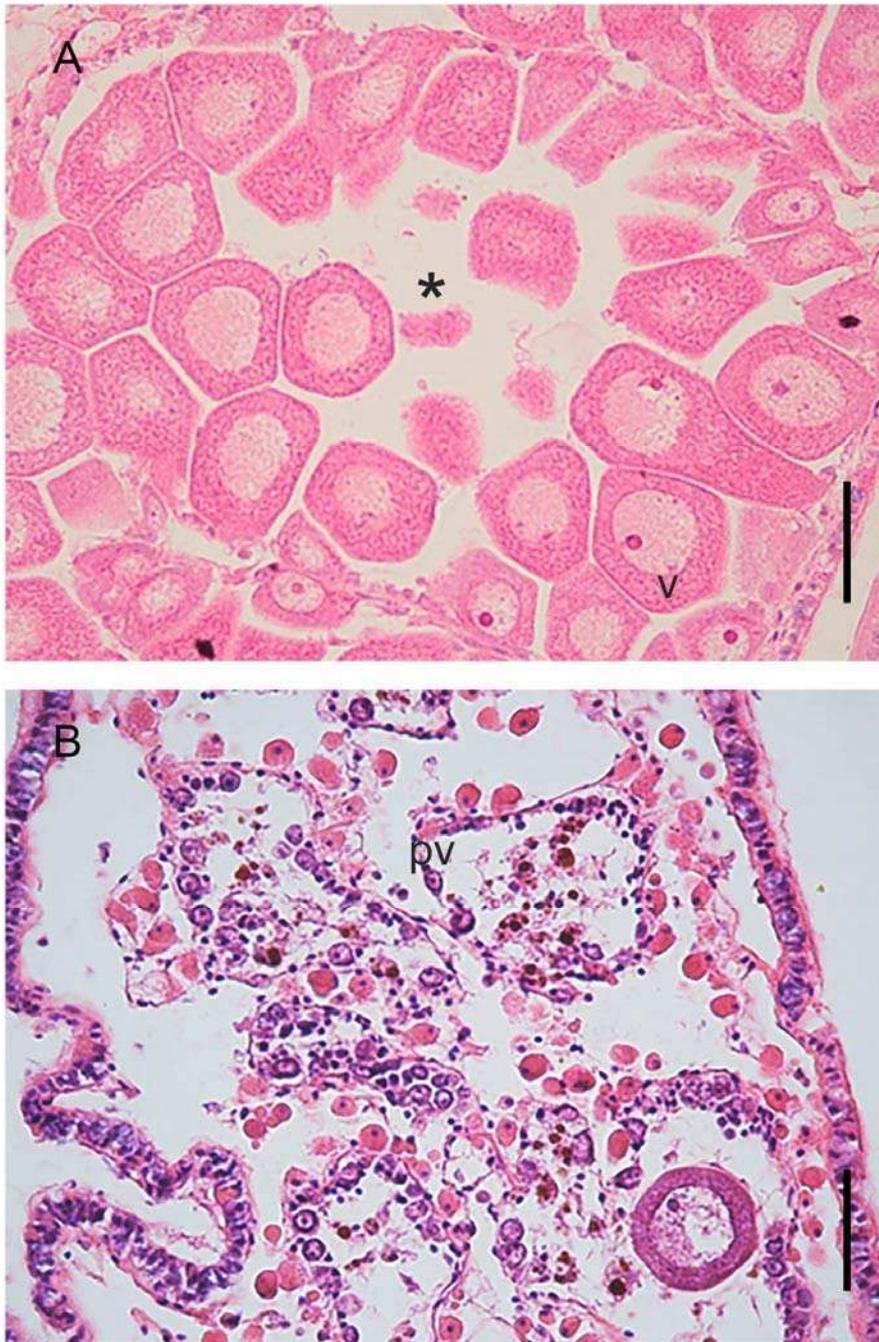
**Figura 5. 4.** Frecuencia de oocitos vitelogénicos de hembras adultas de *B. rodriguezii* para el período comprendido entre mayo de 2011 y mayo de 2013. Se observa que existe una relación entre la variación de la temperatura y el fotoperíodo con la frecuencia de oocitos vitelogénicos. Los asteriscos (\*) indican los meses donde se registraron variaciones significativas en la proporción de oocitos vitelogénicos.

## Caracterización cualitativa de la gónada femenina

Se determinaron diferentes estadios de desarrollo gonadal (Figura 5. 4). En el estadio I se observaron acinos gonadales de tamaño reducido rodeados por tejido conectivo. Dentro del acino predominaban los oocitos previtelogénicos y los vitelogénicos tempranos. En algunos casos se observaron escasos oocitos previtelogénicos y cuerpos residuales de color amarillento (Figura 5. 5A). El estadio II reflejaba un desarrollo más avanzado, los acinos presentaban un tamaño mayor dado que se extendían a expensas del tejido conectivo. Dentro de los acinos se observaban los diferentes estadios de desarrollo oocitario (Figura 5. 5B). En el estadio III la gónada presentó acinos completamente expandidos. Ocupando todo el tejido del manto, en la región dorsal y ventral al tubo digestivo y el pie. Los oocitos dentro del acino eran principalmente vitelogénicos y de forma poligonal como consecuencia de la compresión dentro del acino (Figura 5. 5C). Posterior a la evacuación de oocitos vitelogénicos se evidenciaron dos estadios. El estadio IV con indicios de desove reciente, se observaron acinos expandidos pero con menor densidad de oocitos. Dentro del acino se observó zonas vacías que se correspondían con los sitios que previamente ocupados por oocitos maduros (Figura 5. 6A). Finalmente, el estadio de desove tardío representado por el estadio V (Figura 5. 6B) presentó acinos con cuerpos residuales, escasos oocitos vitelogénicos y tejido conectivo que comenzaba a regenerarse.



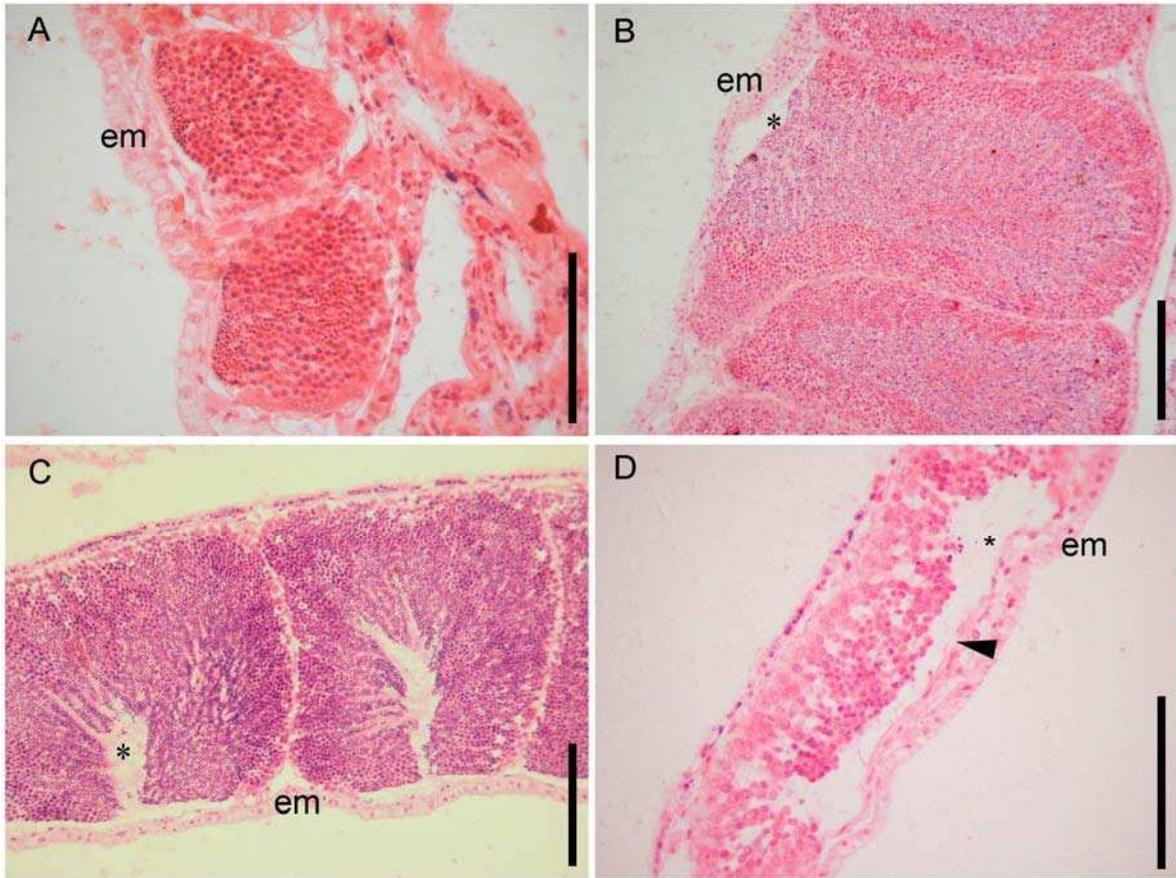
**Figura 5. 5.** Fotografías de hembras de *B. rodriguezii* con diferentes estadios gonadales. **A.** Estadio I (marzo), acinos con oocitos previtelogénicos y tejido conectivo rodeando los acinos. **B.** Estadio II (julio), oogonias agrupadas, junto con los distintos estadios oocitarios. Tejido conectivo rodeando los acinos. **C.** Estadio III (enero), acinos completamente ocupados principalmente por oocitos vitelogénicos. Referencias: (o) oogonias; (pv) oocitos previtelogénicos; (tc) tejido conectivo; (v) oocitos vitelogénicos; (vt) oocitos vitelogénicos tempranos. Escalas A-C: 50  $\mu$ m.



**Figura 5. 6.** Fotografías de hembras de *B. rodriguezii* con diferentes estadios gonadales. **A.** Estadio IV (enero), puede reconocerse el lumen del acino. **B.** Hembra en estadio V (abril), con cuerpos amarillentos dentro del acino. Acinos colapsados luego de la evacuación con oocitos previtelogénicos en su interior. Referencias: (\*) lumen del acino; (pv) oocitos previtelogénicos. Escalas A y B: 50  $\mu$ m.

## Machos

Durante todo el año se observaron todos los estadios de la espermatogénesis en los acinos de los pliegues del manto, así como en los acinos de la masa visceral. Para los machos se establecieron cuatro estadios de madurez considerando: tamaño de los acinos, desarrollo del tejido conectivo y proporción de tipos celulares de la espermatogénesis. El estadio I se caracterizaba por presentar una gónada constituida por acinos de tamaño reducido, con células de la serie espermatogénica pero sin espermatozoides. El lumen del acino se encontraba totalmente ocupado por las células espermatogénicas. Era posible reconocer tejido conectivo entre los acinos (Figura 5. 6A). En el estadio II, dentro de la gónada se observaban espermatozoides y un ordenamiento característico de las células espermatogénicas de manera centrípeta. El tejido conectivo era escaso. Es posible que durante ese estadio ocurrieran pequeñas evacuaciones de espermatozoides (Figura 5. 6B). El tamaño de los acinos, incrementaba a medida que la espermatogénesis progresaba. Para la gónada se registró la superficie máxima a partir de este estadio. En el estadio III se observaban acinos con señales de desove parcial dado que se reconocía parcialmente el lumen de los acinos (Figura 5. 6C). El estadio IV se correspondía a un posdesove avanzado. Este estadio se caracterizaba por presentar acinos evacuados prácticamente en su totalidad. Se podían observar algunos espermatozoides que no habían sido liberados y células gametogénicas iniciando un nuevo ciclo. El tejido conectivo se encontraba parcialmente desarrollado (Figura 5. 6D).



**Figura 5. 6.** Fotografías al microscopio óptico de secciones de manto de machos de *B. rodriguezii*. **A.** Acino en estadio I, en su interior pueden reconocerse algunos estadios tempranos de la espermatogénesis (diciembre). **B.** Estadio II, acinos de mayor tamaño, puede reconocerse escaso tejido conectivo (noviembre). **C.** Individuo con acinos en estadio III, con espermatozoides en el lumen del acino (julio). **D.** Individuo en estadio IV, acinos evacuados, y una serie espermatogénica que comienza un ciclo nuevo, la punta de flecha indica epitelio ciliado (septiembre). Referencias: (\*) lumen del acino; (em) epitelio del manto. Escalas A y D: 100  $\mu$ m. Escalas B y C: 50  $\mu$ m.

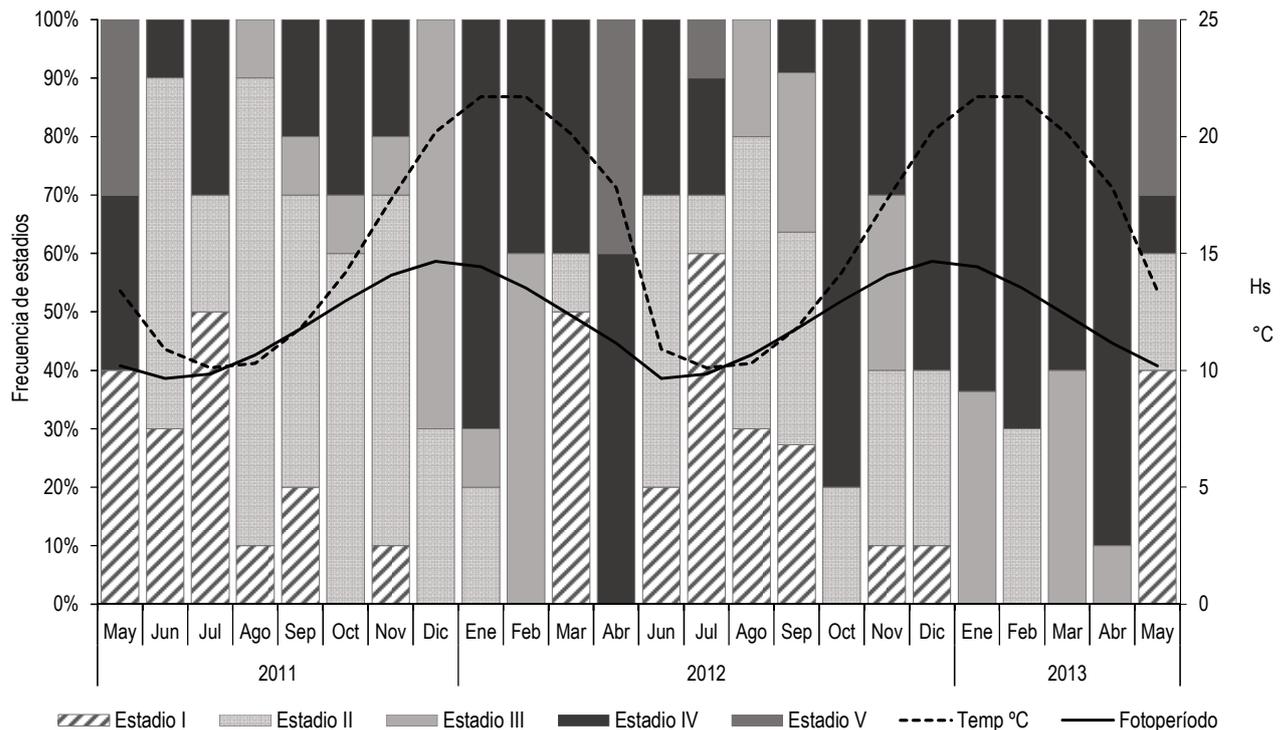
## Ciclo anual y actividad reproductiva

### Hembras

Durante el período de estudio se observó que en los meses de otoño del primer año predominaban los estadios VI y V para el mes de mayo y los estadios I y II en junio (Figura 5. 7). Esto podría indicar que previo al mes de mayo de 2011 ocurrió un desove. Al comienzo del invierno, en el mes de julio predominaban las hembras en estadio I,

sin embargo, se reconocieron hembras en estadio IV (desove parcial). Promediando el invierno y al comienzo de la primavera una pequeña proporción (10%) de las hembras alcanzó el estadio III (previo al desove) mientras que disminuyó la proporción de hembras en estadios I y IV. Durante la primavera de 2011 la mayoría de las hembras se encontraba en estadio II, aunque se observaron algunas hembras en estadio IV con desove reciente. Finalizando la primavera y comenzando el verano se observó una gran proporción de hembras en estadio III. En enero de 2012 se registró la mayor proporción de hembras en estadio IV, en febrero, se observó nuevamente una gran proporción (60 %) de hembras en estadio III. Para el período marzo- abril de 2012, no se observaron hembras en estadio III, predominaron las hembras en estadios I y IV y en menor frecuencia, hembras en estadios II y V. En junio de 2012 se observó una situación similar a la registrada en junio/julio de 2011.

Durante el invierno de 2012, algunas hembras se encontraron en estadio III y al comienzo de la primavera se registraron hembras en estadio IV. Esto indicaría un posible desove aislado. A partir del mes de octubre disminuyó notablemente la proporción de hembras en estadio I mientras que aumentó la frecuencia de hembras en estadio IV. Durante la primavera se mantuvo constante (20%) la proporción de hembras en el estadio II. En diciembre se registró un aumento en la proporción de hembras en estadio IV. Ese registro permaneció con valores similares durante todo el verano de 2013, hasta el mes de abril cuando se elevó a 90 % la proporción de hembras con desove parcial. Finalmente, en mayo de 2013, el 40 % de las hembras de encontraron en estadio I.



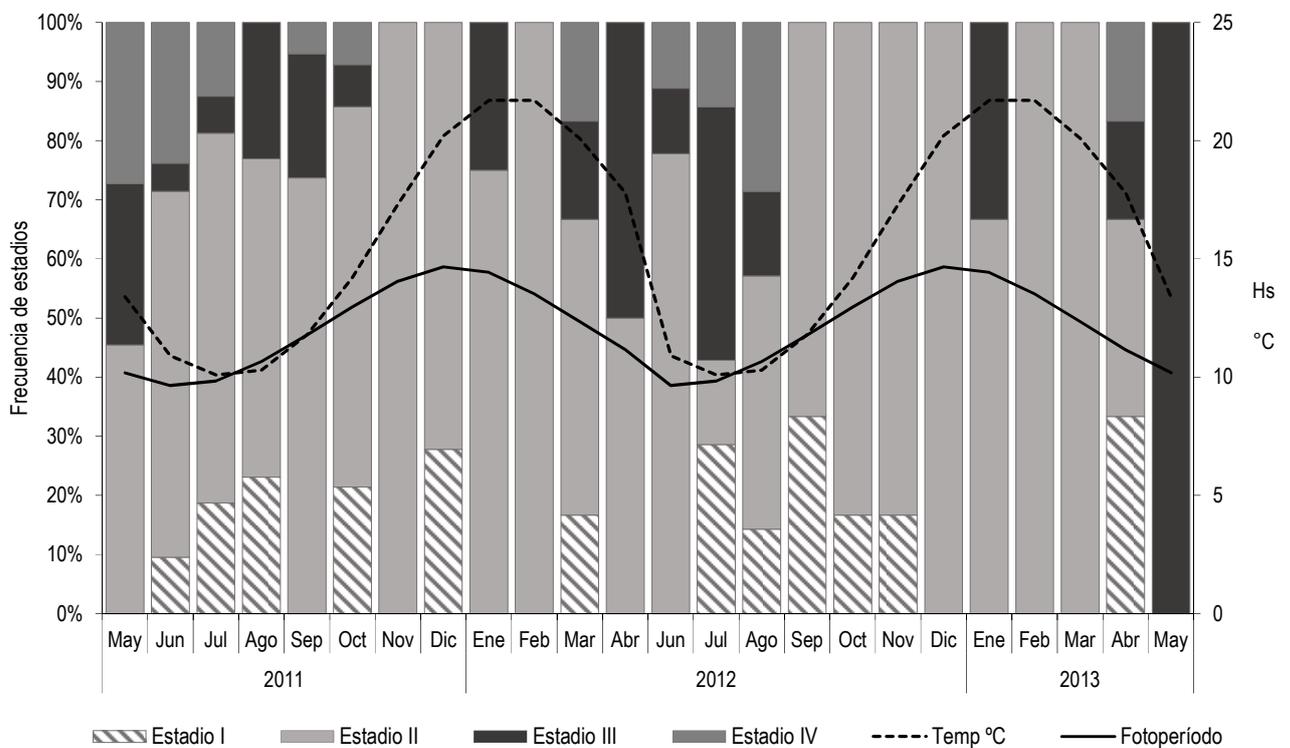
**Figura 5. 7.** Frecuencia de los estadios gonadales de hembras de *B. rodriguezii* en relación con el fotoperíodo y la temperatura de agua superficial. El estadio III corresponde al de predominancia de oocitos vitelogénicos, cuya frecuencia aumenta junto con la temperatura y el fotoperíodo.

### Machos

Para el período comprendido entre los meses de mayo 2011 y mayo de 2013 se registraron machos en los diferentes estadios. Se observó una alta proporción de machos en estadio II durante todo el período de estudio (Figura 5. 8).

En los meses de otoño de 2011, se observaron machos en todos los estadios, siendo los estadios II y IV los más representados. Predominaron aquellos que se encontraron maduros (estadio II) y aquellos machos para los que se evidenció evacuación prácticamente total de gametas (estadio IV). En los meses de julio y agosto incrementó la proporción de individuos en estadio I hasta llegar al 20%. La presencia de machos con desoves parciales o totales continuó durante el invierno. A fines del invierno del primer año de estudio la entre el 60 y el 70 % de los individuos se encontraba en estadio II. La proporción de machos en estadio II se mantuvo alta durante toda la primavera y alcanzó valores máximos en verano.

Durante los meses de marzo y abril de 2012 se observó un aumento de la proporción de machos con evacuaciones parciales (estadio III) y totales (estadio IV). Hacia fines del otoño y comienzo de invierno, se registró un aumento en la proporción de individuos en estadio I. Durante la primavera, se registraron individuos en estadio I, junto con un incremento en la frecuencia de los individuos en estadio II. Mientras que entre septiembre y diciembre de 2012 no se registraron individuos en estadio III y VI. En el verano se registró un aumento en la proporción de machos en estadio II, alcanzando al 100 % de los individuos en diciembre de 2012, febrero y marzo de 2013. Finalizando el período de estudio, en otoño de 2013 se registró nuevamente una alta proporción de machos en estadios III y VI.



**Figura 5. 8.** Frecuencia de estadios gonadales de machos de *B. rodriguezii* en relación con el fotoperíodo y la temperatura de agua superficial.

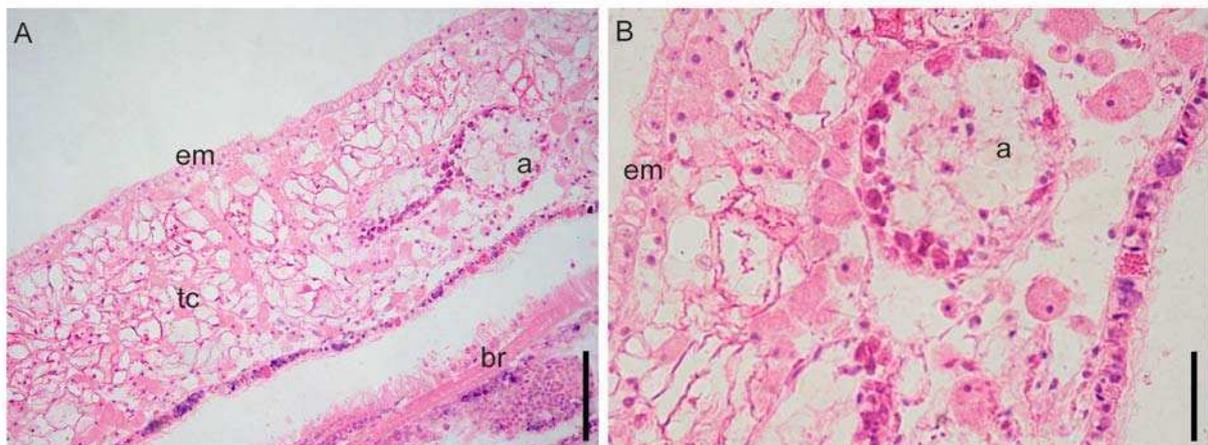
#### Acinos en estadio de posdesove

Se registraron 15 individuos de un total de 487 (3 %) en los que no fue posible determinar el sexo a partir de la observación de los cortes histológicos (Tabla 5. 4).

Estos individuos presentaban acinos en región dorsal y pliegues del manto, pero en su interior se encontraban completamente vacíos o presentaban células que no pudieron ser identificadas como espermatogonias u oogonias. A su vez en estos individuos el tejido conectivo se encontraba muy desarrollado (Figura 5. 9).

Año	Mes	N	LT (mm)
2011	julio	3	10,00 -15,55
	septiembre	1	14,46
2012	marzo	3	10,45-14,10
	junio	2	13,70-15,20
	julio	3	14,25-16,30
	agosto	2	14,15-18,10
	septiembre	1	12,55

**Tabla 5. 4.** Registro de individuos con acinos indeterminados en *B. rodriguezii* para los años 2011 y 2012. N: número de individuos, LT: rango de talla en mm.



**Figura 5. 9.** Pliegue del manto de un individuo de sexo indeterminado de *B. rodriguezii*. **A.** Se observa pliegue del manto con tejido conectivo desarrollado, acinos gonadales con escasa células en su interior. **B.** Detalle del acino con células indiferenciadas sobre la pared del acino. Referencias: (a) acino; (br) branquia; (em) epitelio del manto; (tc) tejido conectivo. Escala A: 100  $\mu$ m. Escala B: 50  $\mu$ m.

## 5.4 Discusión

En este estudio, se analizó la actividad gametogénica en machos y hembras de *Brachidontes rodriguezii* durante dos años consecutivos. Se registraron diferentes eventos de evacuación de gametas durante el período de estudio y estos fueron relacionados con la temperatura y el fotoperíodo. Según Giese y Pearse (1974) la temperatura influye en la gametogénesis y en las regiones templadas donde los organismos están sometidos a cambios cíclicos de temperatura y disponibilidad de alimento, la reproducción es un proceso estacional. Según Fearman y Moltschaniwskyj (2010) la velocidad con que se desarrolla la gametogénesis depende de la temperatura, a bajas temperaturas ocurre a alta velocidad, mientras que a altas temperaturas cesa. Esto podría deberse a que habría una mayor demanda de energía destinada a procesos metabólicos, limitando los recursos destinados a la reproducción en condiciones de altas temperaturas. La dinámica de los procesos gametogénicos, ha sido estudiada en numerosas especies de mitílidos (Morton, 1995; Villalva, 1995; Toro *et al.*, 2002; Barber *et al.*, 2005; Suárez *et al.*, 2005; Oyarzún Cabañas *et al.*, 2010). En este estudio, en los meses de bajas temperaturas se registró una proporción mayor de oocitos previtelogénicos y vitelogénico tempranos. Con un incremento significativo en el tamaño, como consecuencia de la acumulación de nutrientes. Estas observaciones sugieren que en la temporada de bajas temperaturas, las hembras destinarían recursos a la producción de gametas.

Durante la primavera incrementó la proporción de oocitos vitelogénicos, en detrimento de lo que ocurrió para los estadios previos y se registraron los oocitos vitelogénicos de tamaños máximos. Esto coincidió con el aumento de la temperatura. Durante el verano el aumento de la frecuencia de oocitos vitelogénicos se sostuvo, sin embargo las tallas disminuyeron. Finalizado el verano se registró la menor frecuencia de oocitos vitelogénicos, esto indicó un desove y a su vez, se observaron los oocitos vitelogénicos de menor tamaño encontrados hasta ese momento.

Durante el período de otoño/invierno de 2012 el aumento de la frecuencia de oocitos vitelogénicos se retrasó respecto del año anterior, sin embargo, se alcanzaron las tallas más grandes registradas para este estudio. En octubre de 2012, la disminución (no significativa) en la frecuencia de los oocitos vitelogénicos sugiere un

desove parcial, aunque no se habían alcanzado las temperaturas máximas. Estos resultados sugieren que podría haber una relación entre el tamaño de los oocitos vitelogénicos y el momento de desove.

La frecuencia de oocitos vitelogénicos, alcanzó los valores más elevados en verano y los más bajos en otoño. Esto se observó para los dos años de estudio. Para marzo de 2012, febrero, abril y mayo de 2013 se registraron las disminuciones más significativas de la frecuencia de oocitos vitelogénicos, sugiriendo un período de desove hacia los fines de verano y principios del otoño. Aun así, los acinos gonadales de las hembras evidenciaban la evacuación de gametas durante gran parte del año. Algunos autores consideran a estos desoves parciales, como semi ciclos de reproducción dentro un ciclo completo y que los desoves parciales podrían corresponderse a individuos jóvenes que están ingresando al segmento reproductivo de la población (Gorrostieta, 1997; Prado, 1998).

En numerosas especies de mitílidos (Vinuesa, 1981; Villalba, 1995; Rodríguez-Moscoso y Arnaiz, 1998; Barber *et al.*, 2005) se menciona la estrecha relación que hay entre el tejido gonadal y el tejido conectivo. En las células adipogranulares y vesiculares del tejido conectivo de *Mytilus edulis*, se almacena glicógeno, la disminución del tejido conectivo a expensas de la gametogénesis se debe al suministro de nutrientes que se destinan a la gónada. Entonces conforme progresa la gametogénesis, aumenta el volumen de tejido gonadal y disminuye el volumen el tejido de reserva (Vinuesa, 1981; Bayne *et al.*, 1982). Para las hembras de *B. rodriguezii*, fue posible reconocer una relación entre el desarrollo del tejido gonadal y del tejido conectivo presente en el manto. El estadio con la mayor frecuencia de oocitos previtelogénicos, presentó el mayor grado de desarrollo del tejido conectivo. Los estadios gonadales previos al desove, se registraron en mayor frecuencia durante otoño y primavera. Mientras que, cuando se registró la predominancia de oocitos vitelogénicos, el tejido conectivo se encontraba poco desarrollado. El estadio que presentaba la mayor frecuencia de oocitos vitelogénicos y la menor proporción de tejido conectivo, se registró con mayor frecuencia durante los meses de verano. En los meses posteriores a los desoves, se registraron las mayores frecuencias de estadios gonadales con indicios de evacuación.

Para un número reducido de individuos de *B. rodriguezii* se encontraron acinos gonadales con características que podrían corresponderse con un estadio de posdesove. Donde se pueden observar acinos sin presencia de células gametogénicas. Algunos autores hacen referencia a estadios de inactividad, en época invernal luego del período reproductivo (Barber *et al.*, 2005; Suárez *et al.*, 2005; Ángel- Pérez *et al.*, 2007).

La actividad gametogénica registrada para machos de *B. rodriguezii*, sugiere que ocurre espermatogénesis todo el año. Se observaron machos maduros todo el año y con acinos evacuados parcialmente durante la mayor parte del año. En otoño, se registraron acinos prácticamente vacíos. Estas observaciones sugieren que los machos realizan una serie de evacuaciones parciales durante todo el año. De estos eventos se recuperarían pronto. Mientras que durante el período reproductivo principal que ocurre en verano, la evacuación prácticamente completa impediría que la gónada se recupere rápidamente.

6- Talla de primera madurez.

## 6.1 Introducción

La energía con la que cuenta un individuo participa de dos procesos, el crecimiento somático y la demanda metabólica. Alcanzada la madurez sexual, la reproducción pasa a formar parte de los procesos que requieren energía. De acuerdo con la redistribución de los recursos energéticos, los individuos pueden continuar creciendo o no luego de alcanzar la madurez (Hartnoll, 1983). El crecimiento, el reclutamiento, la mortalidad y la migración, son parámetros que determinan la dinámica de una población (Orenzans, 1986). El reclutamiento en invertebrados bentónicos que habitan el intermareal es afectado numerosos factores: la intensidad del oleaje, los cambios de humedad, temperatura y salinidad (Brown y McLachlan, 1990). Por otra parte, Delgado y Defeo (2007) proponen que frente a los cambios en las condiciones ambientales, habría una respuesta demográfica por parte de las especies en términos de estrategias reproductivas. El tamaño al que una especie alcanza la madurez, es un parámetro muy importante dentro de los aspectos reproductivos de la especie. Junto con el ciclo reproductivo, forma parte del conjunto de estrategias que intentan maximizar el éxito reproductivo de una especie en un ambiente determinado (Todd, 1985; Gage, 1995).

Roa *et al.* (1999) propone el concepto de talla de primera madurez poblacional. Este concepto hace referencia a la longitud para la cual el 50 % de los individuos alcanza la madurez. Se propone el modelo logístico como descripción matemática de la relación entre la longitud de los individuos y la madurez sexual. Es decir, habría un incremento en la proporción de individuos maduros, conforme aumenta el tamaño de los individuos.

El parámetro poblacional, talla de primera madurez sexual, permite establecer medidas de explotación comercial y pautas de control, como las tallas mínimas de captura, en especies de interés pesquero (Chung, 2007; 2008). Provee herramientas de monitoreo espacial (Camacho *et al.*, 2012). Y permite evaluar cambios temporales asociados a la explotación comercial (Torroglosa y Giménez, 2010).

El estudio de aspectos de la biología reproductiva de una especie, como el desarrollo gonadal, el ciclo reproductivo y la talla de primera madurez sexual no solo

amplía el conocimiento sobre esa especie, sino que también, genera un conjunto de herramientas que permiten evaluar cambios espaciales y temporales.

El objetivo de este capítulo fue establecer la talla de primera madurez sexual poblacional de *Brachidontes rodriguezii*. Para ello, la talla de madurez fue estudiada a través del análisis del tejido gonadal mediante histología.

## 6.2 Materiales y métodos

Se recolectaron individuos del estrato inferior de las columnas del muelle de Villa Gesell durante dos temporadas reproductivas. La primera desde diciembre de 2011 hasta febrero de 2012 y la segunda de diciembre de 2012 hasta febrero de 2013. Los individuos recolectados fueron medidos con calibre de precisión de 0,01 mm y con lupa según corresponda y fijados en solución de Bouin durante 12 h. Los individuos de tallas menores a 8 mm fueron tratados con solución de Jenkins, para descalcificar las valvas y removerlas con mayor facilidad sin dañar los tejidos. Se estudiaron 335 individuos de un rango de talla de 3,00 a 25,50 mm de longitud total (Tabla IV. 1). Mediante la observación de los cortes histológicos se establecieron dos estadios de condición: inmaduros y maduros.

### Criterio histológico

Los individuos que carecían de acinos gonadales se consideraron inmaduros. Aquellos individuos con acinos gonadales y gametogénesis en su interior fueron considerados como individuos en desarrollo. El criterio utilizado para establecer la madurez en hembras fue la presencia de acinos expandidos, ocupando todo el espacio disponible en la región dorsal, ambos pliegues del manto y masa visceral. Así como presentar oocitos vitelogénicos dentro de los acinos y escaso desarrollo del tejido conectivo. Para establecer la madurez en los machos se consideró la presencia de espermatozoides en el interior de los acinos.

### Talla de madurez

Se establecieron intervalos de tallas de 1 mm cada uno. A partir de los 18 mm, se agrupó a todos los individuos en un solo intervalo de tallas dado que presentaban la

misma condición de madurez. Se obtuvo el porcentaje de individuos maduros para cada intervalo de talla. Los datos de frecuencia de madurez se relacionaron con la longitud de los individuos según un modelo no lineal mediante la ecuación logística:

$$P_m = a / (1 + (L_T / L_{T_0})^b)$$

Donde  $P_m$  es la proporción de machos o hembras maduros,  $L_T$  es la longitud total del individuo, y  $L_{T_0}$ ,  $a$  y  $b$  son constantes. La longitud a la que el 50 % de los individuos se encuentran maduros se establece como talla de primera madurez sexual ( $L_{T_{50}}$ ).

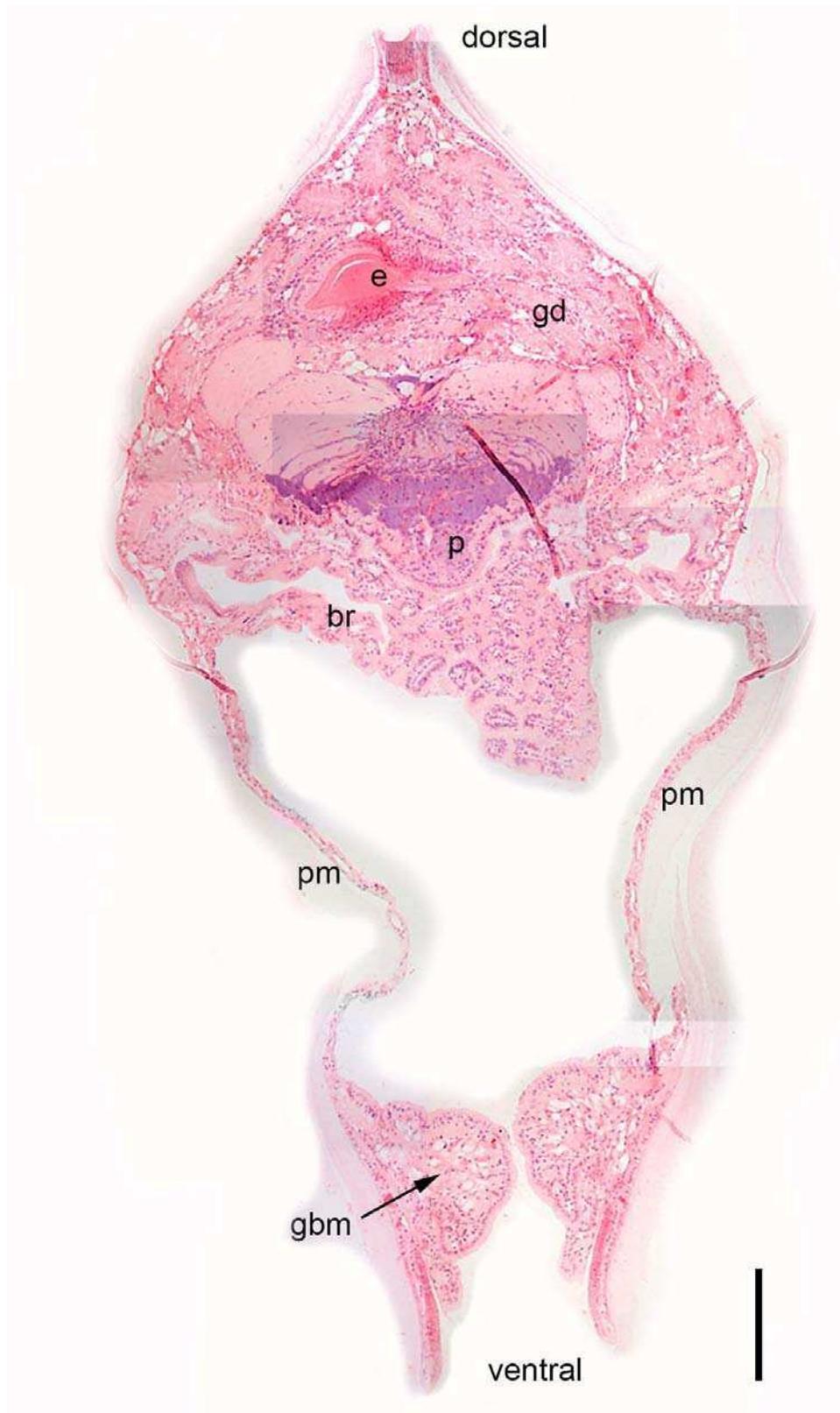
Rango de talla	verano 2012	verano 2013
3-3,99	3	10
4-4,99	6	12
5-5,99	5	18
6-6,99	6	11
7-7,99	9	9
8-8,99	11	10
9-9,99	13	9
10-10,99	11	10
11-11,99	13	8
12-12,99	10	11
13-13,99	12	10
14-14,99	13	8
15-15,99	9	11
16-16,99	10	10
17-17,99	10	14
18-25,5	13	15

**Tabla 6. 1.** Rango de tallas y número de individuos de *B. rodriguezii* considerados para la determinación de la talla de primera madurez sexual durante los dos períodos reproductivos. N: número total de individuos por intervalo de longitud.

## 6.3 Resultados

### Individuos inmaduros

Para todos los individuos de tallas comprendidas entre 3,00 y 3,99 mm no se observaron acinos gonadales (Figura 6. 1). A estos individuos se los consideró inmaduros sexualmente e indeterminados ya que no fue posible establecer el sexo. Se observó que los pliegues del manto presentaban células del tejido conectivo. En la región dorsal y rodeando al estómago sólo se reconocieron túbulos de la glándula digestiva. Esta condición de inmadurez caracterizada por la ausencia de acinos fue observada inclusive en un individuo que tenía una longitud de 7,28 mm.



**Figura 6. 1.** Composición fotográfica de un individuo inmaduro de *B. rodriguezii* (LT 3,55 mm). No se pueden reconocer acinos gonadales. Referencias: (br) branquia; (e) estómago; (gbm) glándulas del borde del manto; (gd) glándula digestiva; (p) pie; (pm) pliegues del manto. Escala: 200  $\mu$ m.

## Individuos inmaduros con desarrollo gonadal temprano

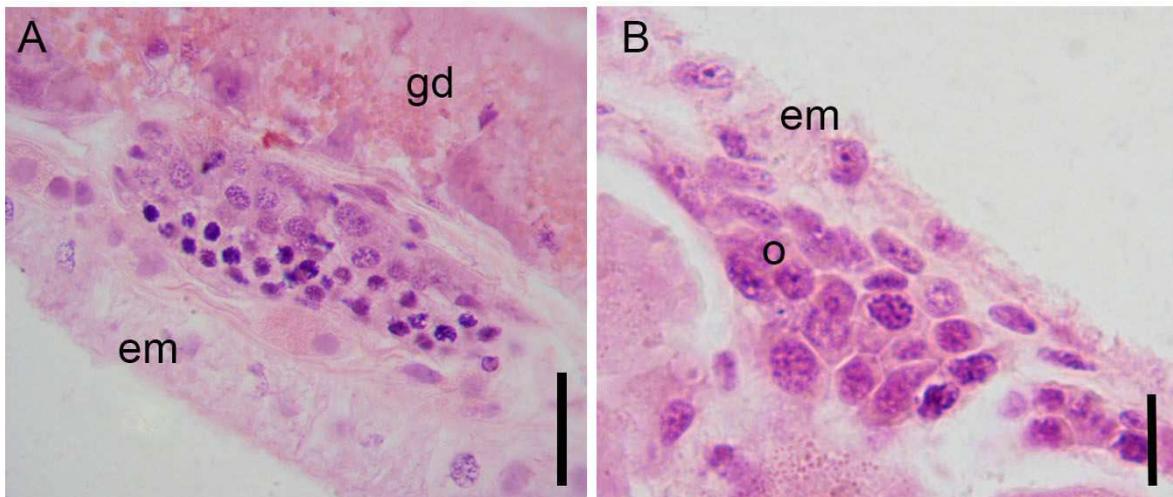
A medida que la longitud de los individuos aumentaba, se registraron en la región dorsal pequeñas agrupaciones de células con actividad mitótica (células en metafase). Estas agrupaciones celulares se encontraban entre el epitelio del manto y los túbulos de la glándula digestiva (Figura 6. 2). En esos individuos no era posible reconocer el sexo aún. Esas células con actividad mitótica, mostraban marcadas diferencias respecto de las células de los túbulos de la glándula digestiva y podrían corresponderse con estadios muy tempranos de la gametogénesis. Se registraron individuos de *B. rodriguezii*, con acinos de esas características para tallas entre 4,45 mm, y 4,75 mm.

## Registro de actividad gametogénica

En las tallas comprendidas entre los 4,00 mm y 4,97 mm de LT se observaron individuos con acinos que en su interior contenían estadios celulares tempranos de la espermatogénesis (Figura 6. 3A) y la oogénesis respectivamente (Figura 6. 3B). En la medida que se diferenciaban estadios de la espermatogénesis y de la oogénesis fue posible establecer el sexo de los individuos inmaduros.



**Figura 6. 2.** Fotografía de un individuo sexualmente inmaduro de *B. rodriguezii* (LT 4,45 mm) con estadios tempranos de la gametogénesis. Se pueden observar acinos entre túbulos de la glándula digestiva y el epitelio del manto con células con núcleos en metafase (punta de flecha). Referencias: (em) epitelio del manto; (gd) glándula digestiva; (pa) células de la pared del acino. Escala: 20  $\mu$ m.

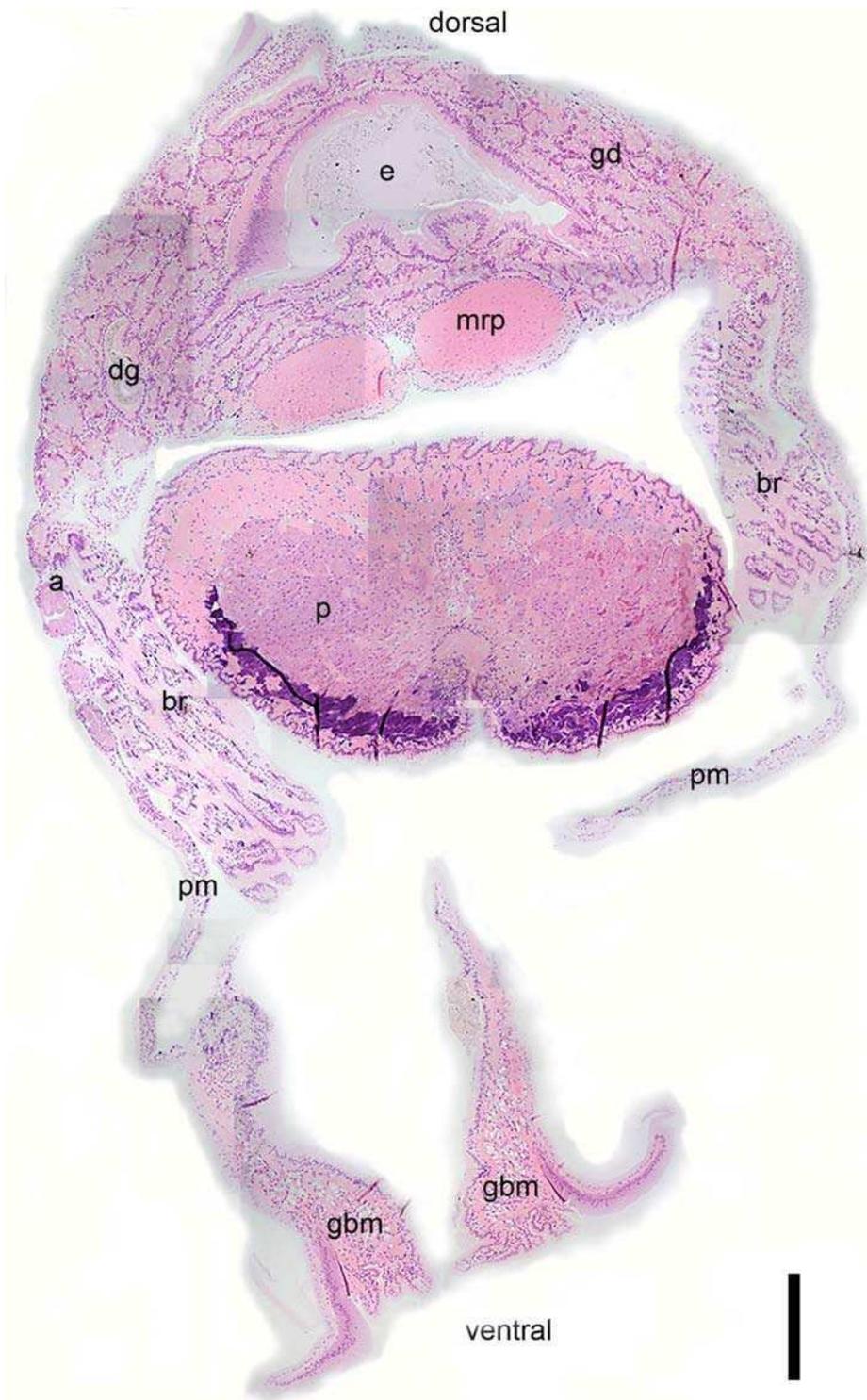


**Figura 6. 3.** Estadios tempranos de la gametogénesis en individuos de *B. rodriguezii* inmaduros. **A.** Macho (LT 4,60 mm) de enero de 2012. **B.** Hembra (LT 4,97 mm) de diciembre de 2011. Referencias: (ep) epitelio del manto; (gd) glándula digestiva; (o) oögonias. Escalas A y B: 20  $\mu$ m.

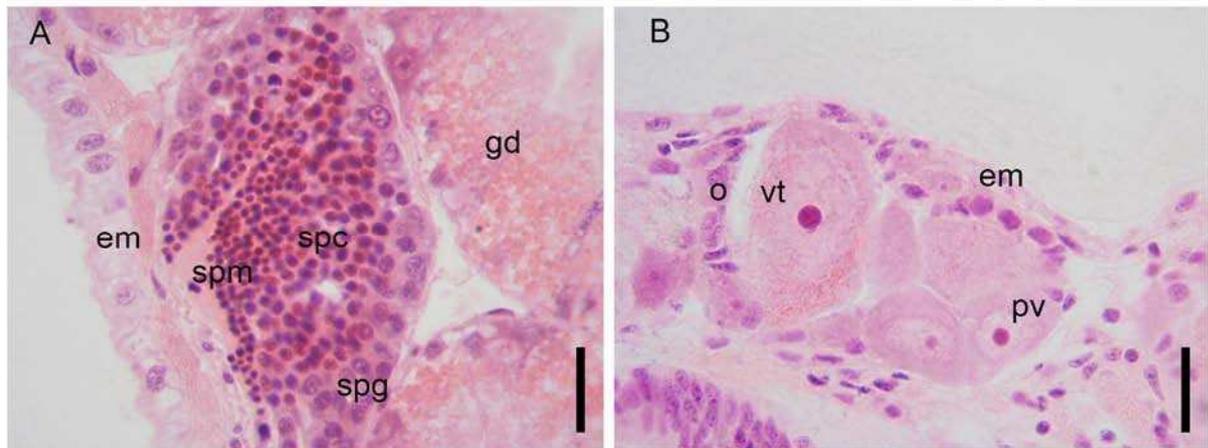
Dentro de los individuos inmaduros a los que se determinó el sexo, se observaron machos con estadios tempranos de la espermatogénesis pero sin espermatozoides hasta los 5,99 mm. En las hembras a partir de los 5,75 mm, se observaron oocitos vitelogénicos y acinos de tamaño reducido en pliegues del manto y región dorsal. Los acinos gonadales de machos (Figura 6. 4) y hembras (Figura 6. 5) inmaduros se encontraban principalmente en la región dorsal y lateral. Los acinos eran escasos y de tamaño reducido (Figura 6. 6A y B). A medida que la longitud del individuo aumentaba, la distribución de los acinos se modificaba (Figura 6. 7). En individuos maduros, se reconocían acinos con gametas en ambos pliegues del manto como se mencionó previamente en el capítulo I. Se observaron hembras maduras a partir de los 6,99 mm, mientras que en los machos el estado de madurez se registró a partir de los 6mm.



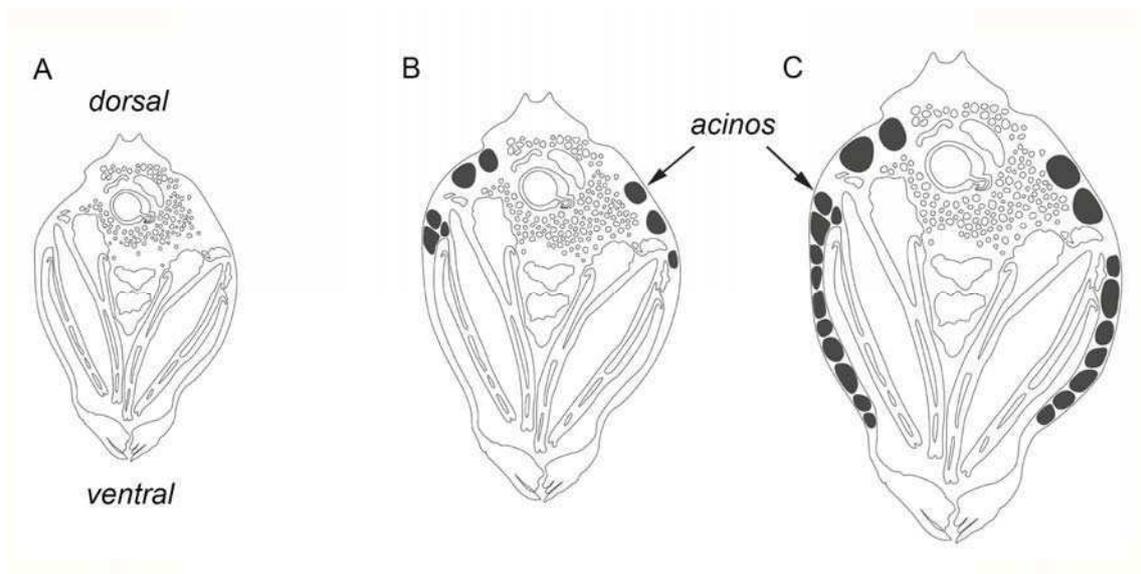
**Figura 6. 4.** Composición fotográfica de un individuo macho de *B. rodriguezii* en desarrollo (LT 7,30 mm). Se pueden reconocer acinos gonadales en posición dorsal al estómago y divertículos gástricos y en ambos pliegues del manto (pm), no así entre los órganos de la masa visceral. Referencias: (a) acinos gonadales; (br) branquia; (dg) divertículo gástrico; (e) estómago; (gbm) glándula del borde del manto; (gd) glándula digestiva; (p) pie; (pm) pliegue del manto. Escala: 200  $\mu$ m.



**Figura 6. 5.** Hembra de *B. rodriguezii* en desarrollo (LT 8,00 mm). Se pueden reconocer pequeños acinos gonadales en uno de los pliegues del manto. En la masa visceral se pueden observar divertículos gástricos, el estómago, túbulos de la glándula digestiva. Referencias: (a) acinos gonadales; (br) branquia; (dg) divertículo gástrico; (gd) glándula digestiva; (gbm) glándula del borde del manto; (e) estómago; (mrp) músculos retractores pedales; (p) pie; (pm) pliegue del manto. Escala: 200  $\mu$ m.



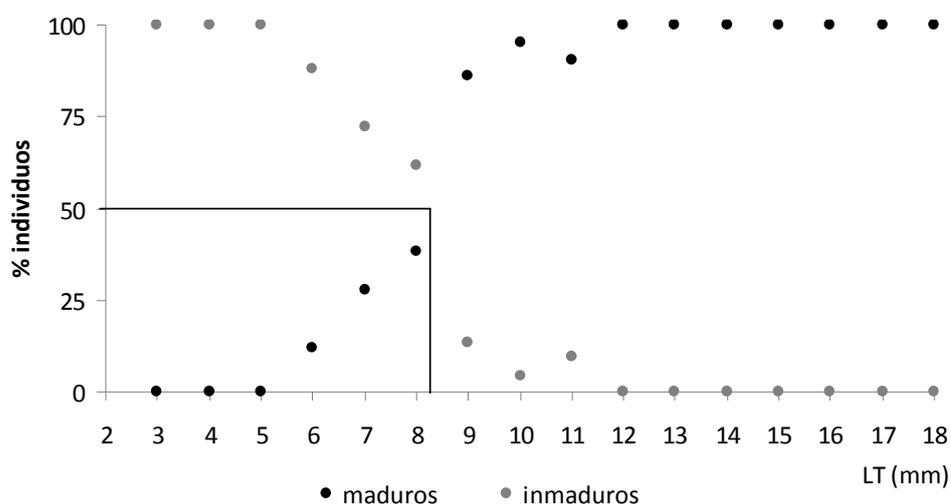
**Figura 6. 6.** Detalles de acinos gonadales de individuos inmaduros de *B. rodriguezii* en desarrollo temprano. **A.** Macho (LT 7,60 mm) de enero de 2012, acino gonadal, ubicado junto a un túbulo de la glándula digestiva con espermatogonias, espermatocitos y espermatidas. **B.** Hembra (LT 8,00 mm) de diciembre de 2012 se reconocen dentro del acino, oogonias, oocitos previtelogénicos y vitelogénicos temprano. Referencias: (em) epitelio del manto; (gd) glándula digestiva; (spc) espermatocito; (spg) espermatogonia; (spm) espermatida; (o) oogonias; (pv) oocitos previtelogénicos; (vt) oocitos vitelogénicos tempranos. Escalas A y B: 20  $\mu$ m.



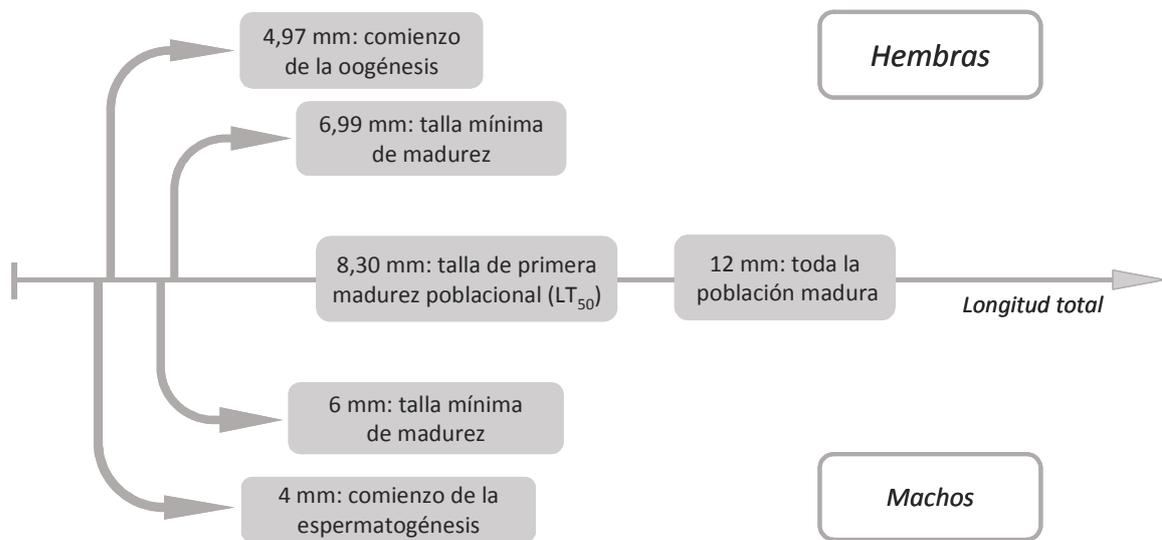
**Figura 6. 7.** Disposición esquemática de los acinos gonadales (sombreado) conforme aumenta la longitud total en individuos inmaduros (A y B) y maduros (C).

## Talla de primera madurez poblacional de *B. rodriguezii*

Para los intervalos de talla comprendidos entre 3,00 y 3,99 mm todos los individuos estudiados resultaron ser inmaduros (Figura 6. 8). La frecuencia de individuos inmaduros sin acinos (indeterminados) disminuyó hasta los 7 mm donde la frecuencia de individuos en esas condiciones fue reducida (sólo un caso). A partir de los 4 mm se observaron individuos con acinos gonadales. Estos se disponían en la región dorsal y/o lateral. En su interior se encontraban escasas células gametogénicas. En el intervalo de tallas de 5 mm se observaron gametas en el interior de los acinos. La presencia de gametas no era condición suficiente para alcanzar la madurez, como se estableció en el criterio histológico, es por ello que se consideraron inmaduros. Los primeros registros de individuos maduros se obtuvieron a partir de los 6 mm. La talla de primera madurez sexual estimada como la mediana de los individuos maduros sexualmente resultó ser 8,30 mm. A partir de los 12 mm de longitud el 100 % de los individuos estudiados se encontraban maduros (Figura 6.9).



**Figura 6. 8.** Talla de madurez gonadal en *B. rodriguezii*. Proporción de individuos inmaduros y maduros respecto de la longitud total LT (mm). La intersección entre las dos líneas indica la talla para la que el 50 % de los individuos se encontraba maduro.



**Figura 6. 9.** Resumen de los eventos de maduración para *B. rodriguezii* conforme aumenta la talla de los individuos.

## 6.4 Discusión

Los resultados de este estudio muestran que a medida que los individuos de *B. rodriguezii* incrementan su longitud, la gónada se desarrolla, modificando su disposición y morfología. La gónada de los bivalvos mitílidos se origina a partir de la diferenciación de células mesodérmicas que se encuentran debajo de la cavidad pericárdica (Sastry, 1979). Es una estructura que penetra tejidos a medida que crece, y conforme se aproxima la madurez incrementa su volumen (Barber *et al.*, 2005; Franco *et al.*, 2008). Los primeros acinos se registraron en la región dorsal y lateral. Conforme los individuos crecen en longitud, los acinos incrementan su volumen y alcanzan los pliegues del manto. En individuos maduros como se mencionó en el capítulo I, los acinos gonadales disponen alrededor de los órganos de la masa visceral, desplazan al tejido conectivo de los pliegues del manto ocupando prácticamente todo el espacio disponible.

El desarrollo de los acinos gonadales está relacionado con el comienzo de la gametogénesis. Se observó que el reconocimiento de los acinos gonadales a partir de los cortes histológicos y la diferenciación entre oogénesis y espermatogénesis ocurre en individuos de tallas comprendidas entre 4 y 5 mm. El estudio de Delgado y Defeo (2007) menciona para *Donax hanleyanus* un intervalo (en términos de longitud) entre individuos indiferenciados y aquellos donde es posible establecer el sexo de entre 2 y 3 mm. Este proceso de maduración abrupto podría estar asociado a la disponibilidad de energía. En ambientes donde los organismos pueden disponer de más energía para crecer hasta alcanzar un tamaño mayor, la madurez se retrasa y el aumento en la proporción de individuos maduros ocurriría de forma más gradual.

En especies con fecundación externa, según Stearns (1992) las hembras tienden a retrasar la madurez. Esto se debe a que en las hembras la fecundidad aumenta junto con el tamaño a una tasa mayor de lo que ocurre en los machos. En este estudio se observó que los machos de *B. rodriguezii* desarrollaban gametas a tallas ligeramente más pequeñas que las hembras. Mientras que para *Dreissena polymorpha* se registró que las hembras presentaban gametas a tallas mayores a los 5 mm y para machos se observaban espermatozoides en individuos mayores a 6 mm (Vailati *et al.*, 2001).

Trabajos previos en mitílidos muestran que la talla de primera madurez así como la actividad gametogénica, varía en relación con la exposición a condiciones de inmersión. Franz (1996) estudió la actividad gametogénica en *Geukensia demissa* en un gradiente de exposición al oleaje y registró que la madurez se alcanzaba a tallas menores en individuos que se encontraban sumergidos durante períodos más prolongados. Sin embargo, cuando comparó el peso de los individuos maduros en relación con el gradiente de exposición al oleaje, observó que los pesos eran similares, es decir, la talla de madurez se encontraba íntimamente relacionada con el crecimiento y la disponibilidad de alimento.

El conocimiento de la talla de primera madurez sexual es fundamental para establecer pautas de manejo en especies de interés comercial (Chung, 2008; 2009; Camacho *et al.*, 2012). La explotación comercial de moluscos bivalvos en nuestro país, involucra a un número reducido de especies. Dentro de la familia Mytilidae se encuentran, la cholga *Aulacomya atra*, y el mejillón *Mytilus platensis*. Actualmente *B.*

*rodriguezii*, no es una especie de importancia económica. Sin embargo, como mencionamos en capítulos anteriores de este trabajo, reúne condiciones que le confieren una gran importancia desde el punto de vista ecológico. En parámetro talla de primera madurez puede proporcionar información acerca de la plasticidad que manifiesta una población frente a cambios ambientales (Torroglosa y Giménez, 2010). Esta información, junto con otras observaciones de aspectos reproductivos permite conocer en profundidad algunos de los procesos que regulan la dinámica poblacional.

7-Crecimiento.

## 7.1 Introducción

El concepto de crecimiento ha sido establecido como el incremento de tamaño o masa de un organismo en relación al tiempo. Para invertebrados bentónicos, así como en otros organismos, se considera que hay un crecimiento en masa límite (máximo) propio para cada especie y que no es un proceso lineal. Es decir, en las etapas tempranas del desarrollo, el crecimiento es acelerado y a medida que se alcanza la adultez se vuelve más lento (Brey, 1999). Esto respondería a la variación entre las tasas de catabolismo y anabolismo respecto del tamaño corporal. La demanda energética en relación al tamaño, aumenta más rápidamente que la incorporación de energía y esto conduce a que los organismos puedan alcanzar un tamaño máximo limitado (Reiss, 1991). Las condiciones ambientales y genéticas derivan en un modelo de crecimiento característico para un individuo. Pero es posible extrapolar este modelo a los individuos de una población en un mismo sitio mediante un conjunto de parámetros y un modelo que describa el crecimiento de un individuo promedio (Brey, 1999).

El crecimiento de un organismo forma parte de un conjunto de conocimientos que brindan información biológica y ecológica de gran importancia para el estudio de la dinámica poblacional de una especie (Kautsky, 1982; Antsulevich *et al.*, 1999; Adami *et al.*, 2008; Herrmann *et al.*, 2009b, 2011; Avendaño y Cantillánéz, 2013). En especies de importancia económica permite estimar stocks de pesca, por lo tanto, constituye información valiosa para la industria pesquera (Mahé *et al.*, 2010; Moura *et al.*, 2013).

En moluscos, las características morfológicas y la composición de las estructuras calcáreas proveen información acerca del crecimiento. Anillos de la superficie externa de la valva, anillos internos y anillos de micro crecimiento son algunos de los elementos que se utilizan para estudiar el crecimiento (Richardson, 2001).

En moluscos bivalvos se ha estudiado el crecimiento mediante distintas metodologías. El análisis de distribuciones de frecuencias de tallas (Maroñas *et al.*, 2003; Herrmann *et al.*, 2009b; Avendaño y Cantillánéz, 2013), la cuantificación de anillos de crecimiento (Brey y Mackensen, 1997; Kautsky, 1982; Richardson *et al.*, 1990; Richardson *et al.*, 1999; Soldati *et al.*, 2008; Moura *et al.*, 2013; Bagur *et al.*,

2013). Y mediante experimentos de marcado y recuperación (Day *et al.*, 1995; Herrmann *et al.*, 2009b; Linard *et al.*, 2011). Esta última metodología consiste en colocar una marca en la valva y una vez transcurrido un período de tiempo, establecer el incremento que ocurrió durante ese tiempo (Kaehler y McQuaid, 1999). Existen diversas sustancias químicas, que permiten establecer marcas en estructuras rígidas de carbonato de calcio y de esa manera, estudiar el crecimiento (Day *et al.*, 1995; Fujikura *et al.*, 2003; Linard *et al.*, 2011). Los organismos expuestos a esas sustancias (marcadores químicos), incorporan el marcador en estructuras de carbonato de calcio en formación. La eficiencia del marcador radica en su fácil detección, implementación, tener duración prolongada y por sobre todo, no dañar al organismo en el cual se aplica (Riascos *et al.*, 2007). Dentro de los marcadores químicos, la calceína ( $C_{30}H_{26}N_2O_{13}$ ) ha sido utilizada en diferentes organismos, peces (Wilson *et al.*, 1987), corales (Holcomb *et al.*, 2013), moluscos (Mahé *et al.*, 2010; Linard *et al.*, 2011; McCoy Loría y Huato-Soberanis, 2014) y ha demostrado ser muy efectiva. Al someter a un individuo a una solución de calceína, ésta es incorporada en estructuras de carbonato de calcio (Wilson *et al.*, 1987). Los moluscos generan su valva a partir de la acumulación periódica de carbonato de calcio ( $CaCO_3$ ), junto con proteínas y azúcares que secretan las células del epitelio del manto (Addadi *et al.*, 2006). Entonces es posible establecer una marca durante la secreción de la valva mientras el organismo es expuesto a calceína (Kaehler y McQuaid, 1999; Moran, 2000). Es posible observar la marca que genera la calceína, exponiendo la valva a luz azul, pudiendo reconocerse una región color verde lima fluorescente (Wilson *et al.*, 1987).

Se han realizado numerosos estudios *in situ* para determinar el crecimiento de especies de moluscos bivalvos del intermareal, mediante la utilización de marcadores químicos (Kaehler y McQuaid, 1999; Hermamm *et al.*, 2009a; Lepore *et al.*, 2009; Mahé *et al.*, 2010; Cáceres-Puig *et al.*, 2011). Inclusive se han desarrollado estudios a grandes profundidades (Tada *et al.*, 2010). Esta metodología intenta minimizar el estrés por la manipulación física, el aislamiento de organismos, el traslado a acuarios y de esta manera, evitar estimaciones poco precisas (Kaehler y McQuaid, 1999).

En condiciones normales, el crecimiento está regulado por factores fisiológicos y ambientales y dentro de los factores ambientales se destacan la temperatura, la marea (Thompson, 1975) y la disponibilidad de alimento (Laing, 2000; Linard *et al.*,

2011; Joubert *et al.*, 2014). Para la ostra *Pinctada margaritifera*, Joubert *et al.* (2014) observa que la tasa de deposición de carbonato de calcio en la valva ventral, se relaciona positivamente con la concentración de alimento y el aumento de la temperatura. A medida que aumenta la temperatura y el alimento disponible se observa un incremento en el espesor de la valva. Sin embargo, a temperaturas altas (~30°C) Pouvreau y Prasil (2001), observan un impacto negativo en el crecimiento, sugiriendo la existencia de un umbral térmico para *P. margaritifera*. Por otra parte, Bustamante y Branch (1996) mencionan que frente a una mayor la disponibilidad de alimento (detritos y algas), mayor es la biomasa de organismos filtradores del intermareal rocoso. Los organismos que habitan el intermareal están expuestos a condiciones marinas cuando están sumergidos y a condiciones terrestres cuando baja el nivel de la marea (Denny y Paine, 1998; Petes *et al.*, 2008). La disponibilidad de alimento está asociada a la exposición a las condiciones marinas, es decir, cuanto más tiempo transcurran sumergidos, más alimento podrán incorporar y eso se vería reflejado en el crecimiento (Petes *et al.*, 2008). Según Connel (1972) los organismos que se encuentran en la región superior del intermareal están expuestos a mayores condiciones de estrés (condiciones aéreas) que aquellos que se encuentran en la región inferior, sugiriendo que el estrés ambiental incrementa a lo largo del gradiente vertical. Considerando que la temperatura y la disponibilidad de alimento influyen directamente sobre el crecimiento. Y que el alimento disponible para los organismos que habitan el intermareal, presenta una relación positiva con la exposición a condiciones acuáticas, se plantean las siguientes hipótesis: H1: El crecimiento de *B. rodriguezii* será menor en los individuos que permanezcan más expuestos a condiciones aéreas. H2: El crecimiento de *B. rodriguezii* será variable a lo largo del año y depende de la estacionalidad. H3: Para esta especie el crecimiento es diferencial en las distintas tallas.

El objetivo del presente capítulo fue estudiar las variaciones del crecimiento de *Brachidontes rodriguezii* en sustratos artificiales en relación a factores ambientales: estación del año y la exposición a condiciones aéreas/sumergidas y a la talla de los individuos en la localidad de Villa Gesell.

## 7.2 Materiales y métodos

### Diseño de muestreo y obtención de los individuos para experimentación

El área de estudio fue el muelle de la localidad de Villa Gesell en la provincia de Buenos Aires. Se seleccionaron 8 columnas del muelle cercanas a la línea de costa, donde la disposición de *B. rodriguezii* era de aspecto homogéneo. Se colectaron manualmente utilizando espátula porciones de la matriz (parches) del estrato inferior y del estrato superior de las columnas del muelle. Esto permitió evaluar si había variación en el crecimiento en relación con el tiempo que los individuos permanecían sumergidos. El estrato inferior correspondía a una zona que permanecía sumergida durante todo el día, inclusive durante la baja marea. Mientras que el superior sólo permanecía sumergido durante 6 horas por día aproximadamente durante la marea alta. Los parches de individuos fueron trasladados a acuarios para su aclimatación durante 6 hs. Para evaluar si existía relación con la estacionalidad este procedimiento se repitió en tres momentos diferentes del año comenzando en: julio de 2012, noviembre de 2012 y julio de 2013.

### Experiencia sobre crecimiento *in situ*

Los organismos recolectados se dividieron en dos grupos. Un conjunto de parches se mantuvo en los acuarios sin ser expuestos a la calceína fueron considerados como control de la manipulación durante el experimento. Mientras que otros parches fueron sumergidos en una solución de calceína (Sigma, CAS 1461-15-0) en agua de mar (140 mg de calceína por litro de agua) durante cuatro horas. Éstos últimos fueron considerados como parches tratados. Durante el marcado con calceína los individuos permanecieron en acuarios con aireadores y en condiciones de oscuridad para evitar la descomposición de la calceína (Figura 7. 1A). Transcurrido el período de marcado se tomaron porciones de los parches de ambos grupos (control y tratados) de 3 x 4 cm y fueron introducidos en dispositivos de 10 x 10 cm confeccionados con tela de malla plástica de 2 mm de tamaño de poro unidos con hilo de nylon de 0,6 mm de diámetro. Cada dispositivo se encontraba dividido a la mitad de manera que contenía un parche

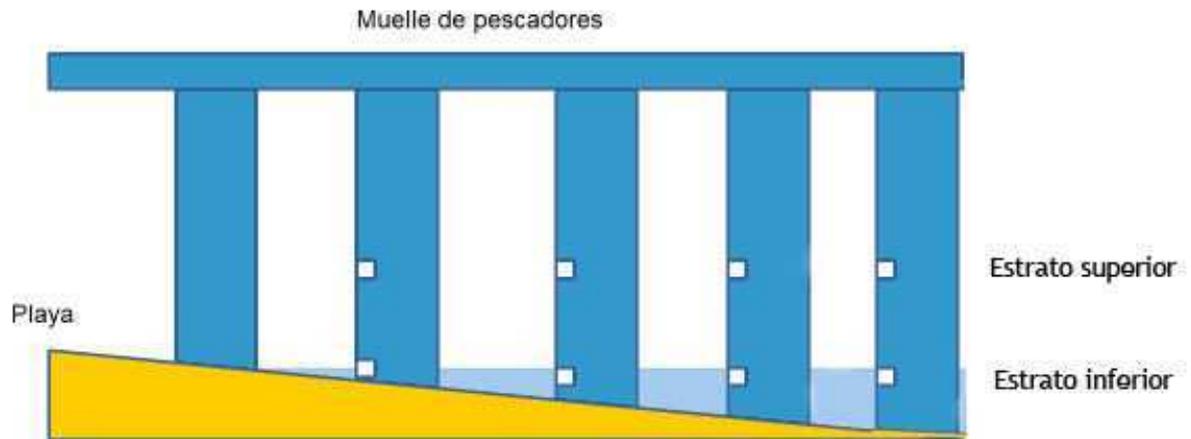
control y otro tratado en su interior (Figura 7. 1B). No se realizaron controles del crecimiento con un tratamiento físico (medición con calibre) para no desarmar el parche. En el campo los dispositivos fueron colocados en los estratos superior e inferior (rotulados diferencialmente) asegurados con hilo de nylon de 1 mm de diámetro (Figura 7. 1C).



**Figura 7.1.** Metodología del experimento de marcado con calceína. **A.** Individuos de *B. rodriguezii* sumergidos en la solución de calceína. **B.** Dispositivo utilizado para la reintroducción en el mar. **C.** Disposición de los dispositivos en el estrato inferior y superior de una columna del muelle de Villa Gesell. Escala C: 10 cm.

Se colocaron 8, 18 y 10 dispositivos en los meses de julio y noviembre de 2012 y julio de 2013, respectivamente. El número de dispositivos colocados en el segundo experimento (noviembre-diciembre) fue mayor que en julio-agosto. Se colocaron más dispositivos debido a que en julio-agosto solo se recuperó el 40 % de los dispositivos. En el último experimento el número de dispositivos colocados fue menor, esto se

debió a que las condiciones del oleaje impidieron la colocación de los mismos (Figura 7. 2).

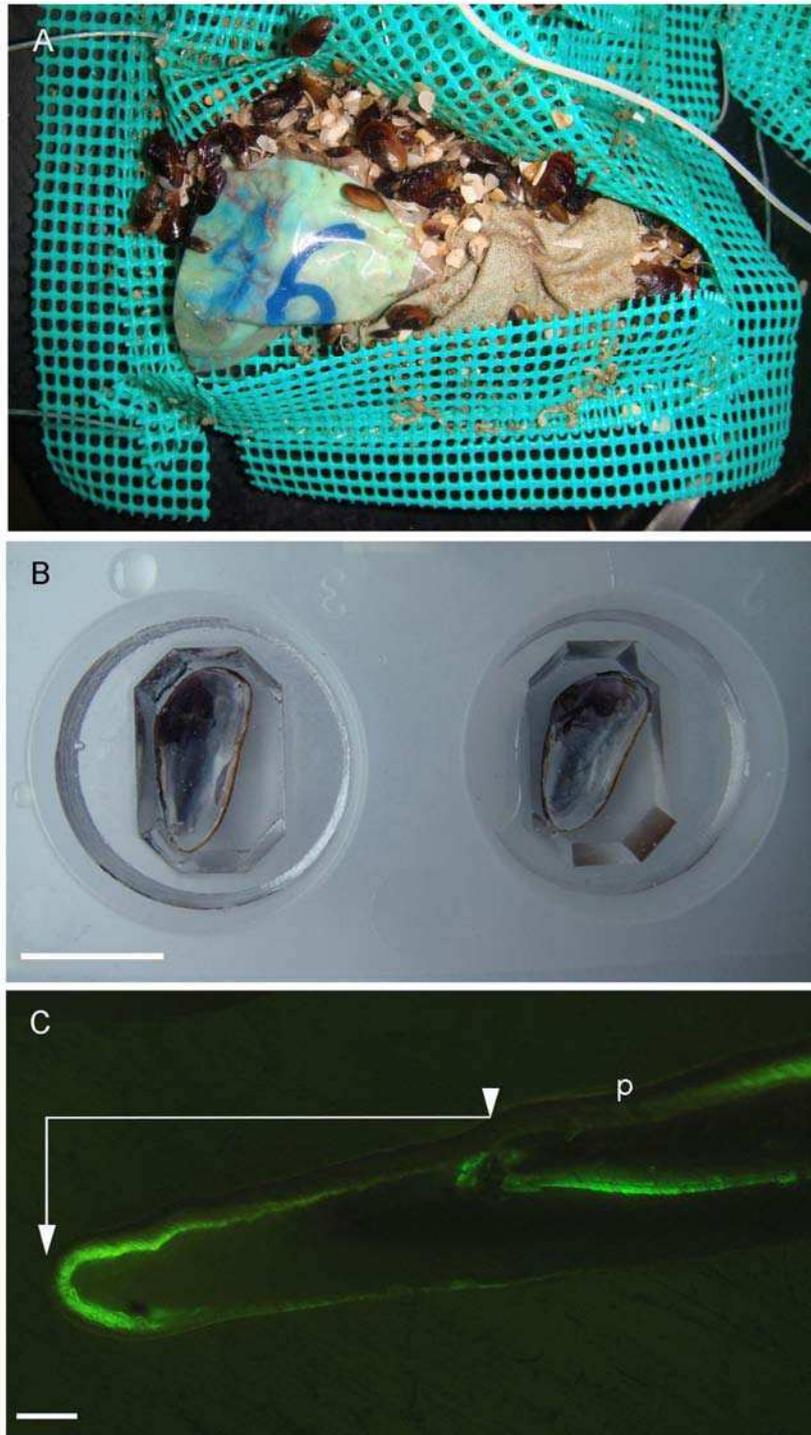


**Figura 7. 2.** Esquema de la ubicación de los dispositivos en los diferentes estratos (superior: 130 cm/ inferior: 20 cm) durante el experimento en el muelle de Villa Gesell, provincia de Buenos Aires.

Los dispositivos colocados en julio de 2012 permanecieron en el muelle durante 26 días y luego se recuperaron 3 dispositivos del estrato inferior. Del estrato superior no fue posible recuperar dispositivos dado que no se encontraron en la playa. Los dispositivos colocados en el mes de noviembre se dejaron en el campo y luego de 26 días se recuperaron 4 dispositivos (2 del superior y 2 del inferior). Por último, en julio de 2013, luego de 89 días se recuperaron dos dispositivos del estrato superior. La experiencia de julio de 2013 se descartó del análisis. Durante el experimento no se pudieron retirar los dispositivos en dos ocasiones porque se encontraban enterrados en la arena. Al momento de retirarlos, los individuos se encontraban vivos pero como no fue posible establecer cuanto tiempo habían permanecido enterrados y frente a la posibilidad de que los experimentos no sean comparables, se optó por no considerar esos resultados. Todos los dispositivos recuperados fueron trasladados al laboratorio.

## Preparación de las valvas y detección de marcas de calceína.

En el laboratorio se retiraron los individuos del interior de los dispositivos recuperados. Las valvas vacías y aquellos individuos cuyas valvas estaban abiertas fueron descartados. Se removieron las valvas de los individuos que se encontraban cerrados (de esta manera se garantizó que las mediciones se realizaran en individuos que sobrevivieron al período de experimentación) (Figura 7. 3A). Las valvas vacías se limpiaron y secaron a temperatura ambiente durante 72 horas. Las valvas derechas fueron medidas con calibre de precisión de 0,01 mm e incluidas en resina epoxi (Figura 7. 3B). Posteriormente, los tacos de resina fueron pulidos a mano con planchas de gránulos de carburo de silicio (SiC) de 300, 150, 80 y 45 micrones de diámetro (Escala ANSI). Las marcas de calceína se detectaron bajo un microscopio de fluorescencia Zeiss® Axio Imager Z1, irradiado con luz azul (450-490 nm) mediante fotografías (Figura 7. 3C) y se utilizó el programa AxioVision (2013) 4.8.2 para procesar las imágenes. Se midió la distancia entre la marca de calceína y el extremo posterior de la valva. Esa distancia se consideró como el incremento en longitud de la valva durante el tiempo que el individuo estuvo expuesto a las condiciones de experimentación.



**Figura 7. 3.** Recuperación de los individuos de *B. rodriguezii*, inclusión y observación de marcas de calceína. **A.** Dispositivo recuperado con individuos en su interior. **B.** Tacos de resina con valvas en su interior. **C.** Extremo posterior de una valva derecha de *B. rodriguezii* al M.O. de fluorescencia. Se observa la marca generada por la calceína. La línea entre las puntas de flecha indica la longitud registrada como incremento de la valva. Abreviaturas: (p) periostraco. Escala B: 10 mm. Escala C: 100  $\mu$ m.

## Análisis de los datos

Se compararon mediante ANOVA de un factor (Sokal y Rohlf, 1995), los registros de incrementos en las valvas de los individuos colocados en las columnas del muelle con distinta distancia a la costa, para cada temporada y para cada tiempo de experimentación. Los incrementos no difirieron entre distancias a la costa. (Experimento de julio de 2012:  $F_{(1,20)} = 0,369$ ;  $p = 0,55$ . Experimento de noviembre:  $F_{(1,166)} = 0,123$ ;  $p = 0,72$ ). A partir de estos resultados, los registros fueron tomados como homogéneos en cuanto a esa variable

Para analizar el efecto del estrés en relación al grado de exposición al agua de mar, se realizó una prueba  $t$  para comparar el incremento en dos estratos del gradiente vertical en las columnas del muelle (superior/inferior) (Sokal y Rohlf, 1995).

Con el objetivo de estudiar la relación entre el incremento de la valva de los individuos de esta especie y la estacionalidad se compararon las medias del incremento para meses fríos y meses cálidos mediante una prueba  $t$  (Sokal y Rohlf, 1995). El período de meses fríos correspondió al período julio- agosto de 2012 mientras que el de meses cálidos correspondió a noviembre- diciembre de 2012.

Se estudió la relación entre el incremento y la talla al inicio del experimento de los individuos para ambos estratos estudiando ajustes a distinto tipos de funciones. La longitud de los individuos al inicio del experimento se obtuvo a partir de la diferencia entre la talla al momento de finalizar el experimento y el incremento registrado mediante M.O. Esa longitud se corresponde con la talla al momento de sumergir a los individuos en calceína. Dado que para los meses de julio y agosto de 2012 no se contó con registros de ambos estratos, este análisis se llevó a cabo con los registros de noviembre y diciembre.

### 7.3 Resultados

El marcador fluorescente emitió una luz verde clara brillante que describía una banda que se pudo observar desde el umbo hacia el extremo posterior de la valva. Esta marca se presentó conspicua en los extremos de la valva. La efectividad del marcado con calceína en los diferentes experimentos fue del 70 %. Los individuos del grupo control así como algunos del grupo tratados no presentaron marca de calceína. Es posible que durante la inmersión en la solución de calceína algunos ejemplares hayan permanecido con las valvas cerradas evitando así la incorporación de calceína.

#### Incremento de la valva

Se obtuvieron individuos marcados en los experimentos tanto de invierno como de primavera, así como para el estrato superior y el inferior (Tabla 7. 1).

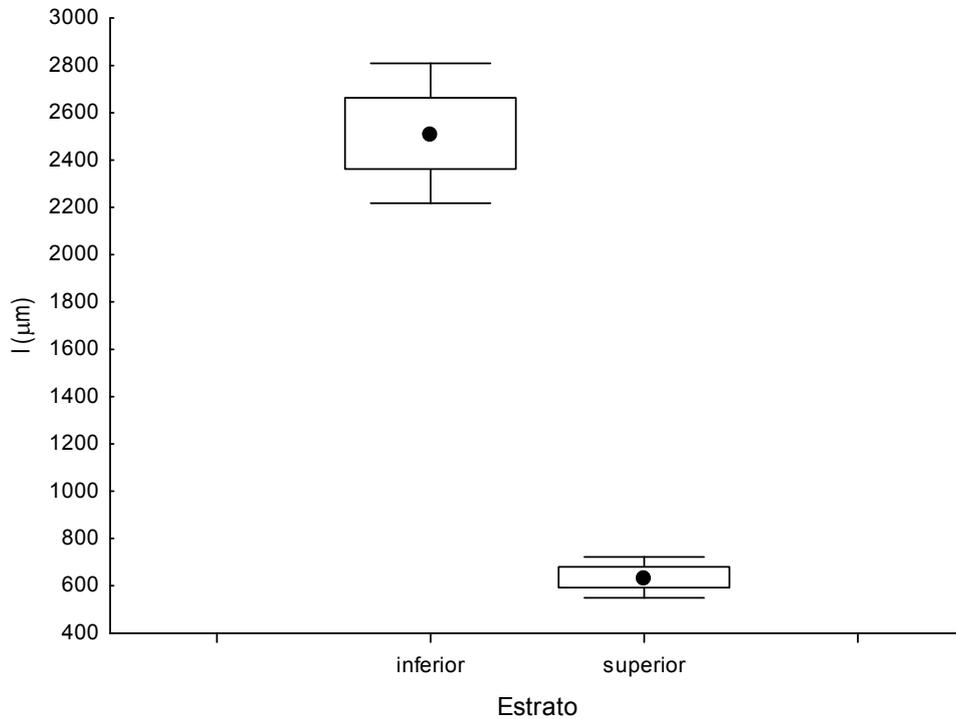
	Fecha	Estrato	N	T(días)	LT min (mm)	LT máx (mm)	LT (mm)±DS
2012	Jul/ago	inferior	21	26	4,91	26,3	16,52 ± 4,98
	Nov/dic	inferior	56	26	2,79	23,82	9,52 ± 4,75
	Nov/dic	superior	67	26	4,24	19,89	12,4 ± 4,21

**Tabla 7. 1.** Valores de largos totales (LT) de los individuos que presentaban marcas en los dos estratos estudiados y días de duración del experimento en el muelle de Villa Gesell. N: número de individuos con marcas de calceína, T: duración de cada experimento en días, LT ± DS: longitud total promedio y desvío estándar.

#### *Incremento en la longitud de la valva en relación con la disposición vertical en el intermareal*

Se observó una variación significativa estadísticamente en el incremento de la valva en relación con la disposición vertical en el intermareal sobre las columnas del muelle. Los individuos del estrato superior presentaron un incremento de 689,47µm. Mientras que los individuos del estrato inferior presentaron un incremento promedio

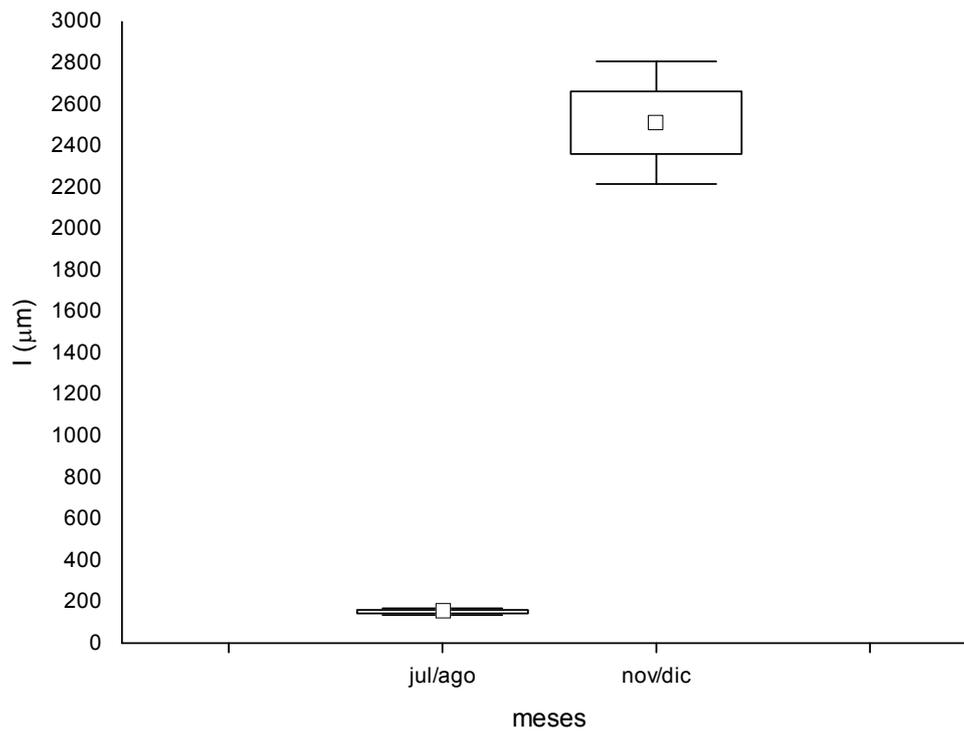
de 2.530,40  $\mu\text{m}$  durante el período noviembre – diciembre (Figura 7. 4)  $t_{(54)}=9,5993$ ;  $p<0,0001$ .



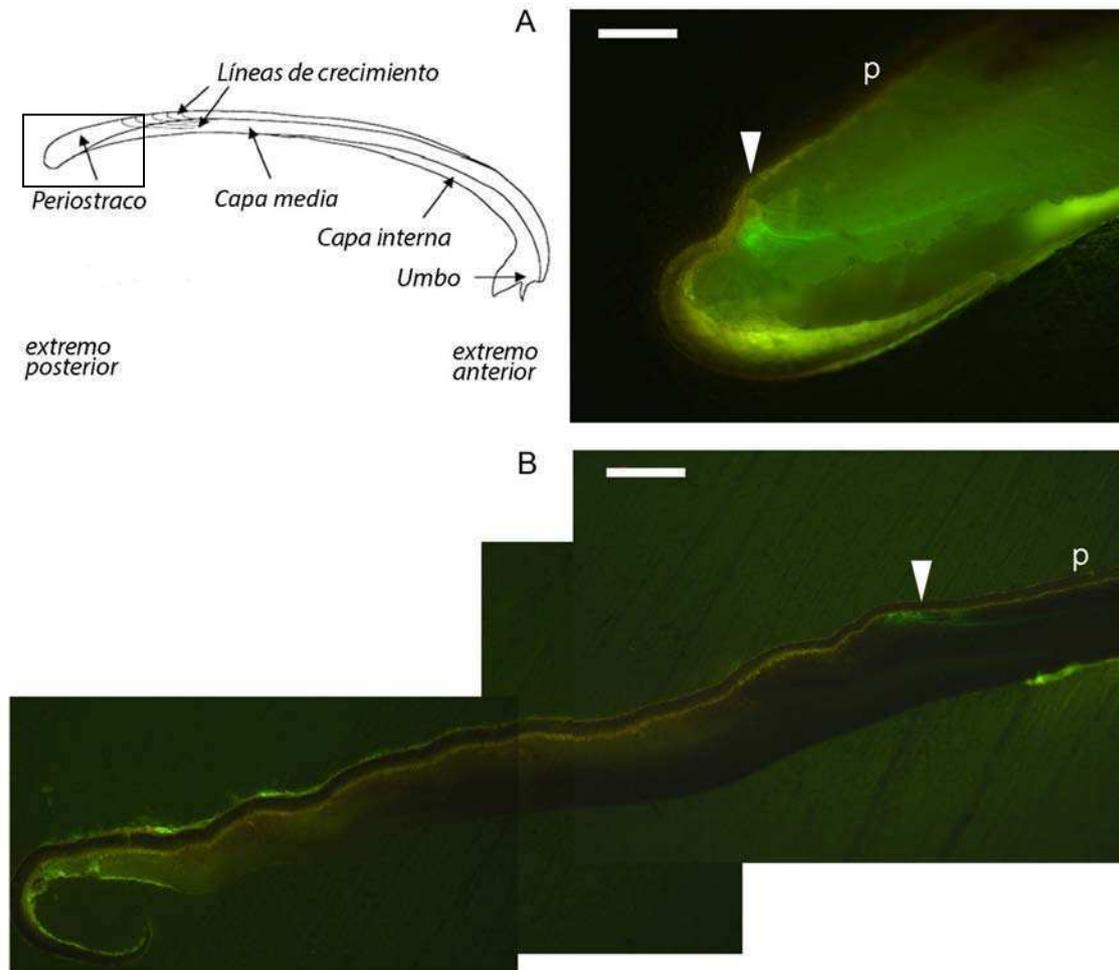
**Figura 7. 4.** Incremento (I) de talla de individuos de *B. rodriguezii* de ambos estratos (inferior/superior) del muelle durante el período noviembre - diciembre de 2012.

#### *Incremento de la longitud de la valva y el período estacional*

Para los individuos del estrato inferior se registró durante el período comprendido entre julio y agosto un incremento promedio de 152,45  $\mu\text{m}$ . Este valor resultó ser significativamente menor que el registrado para los meses de noviembre y diciembre que fue de 2.512,57  $\mu\text{m}$  ( $t_{(75)} = -9,555$ ;  $p < 0,001$ ) (Figuras 7. 5 y 7.6).



**Figura 7. 5.** Incremento (l) en longitud de la valva de individuos de *B. rodriguezii* del estrato inferior durante los períodos: julio-agosto y noviembre-diciembre de 2012.

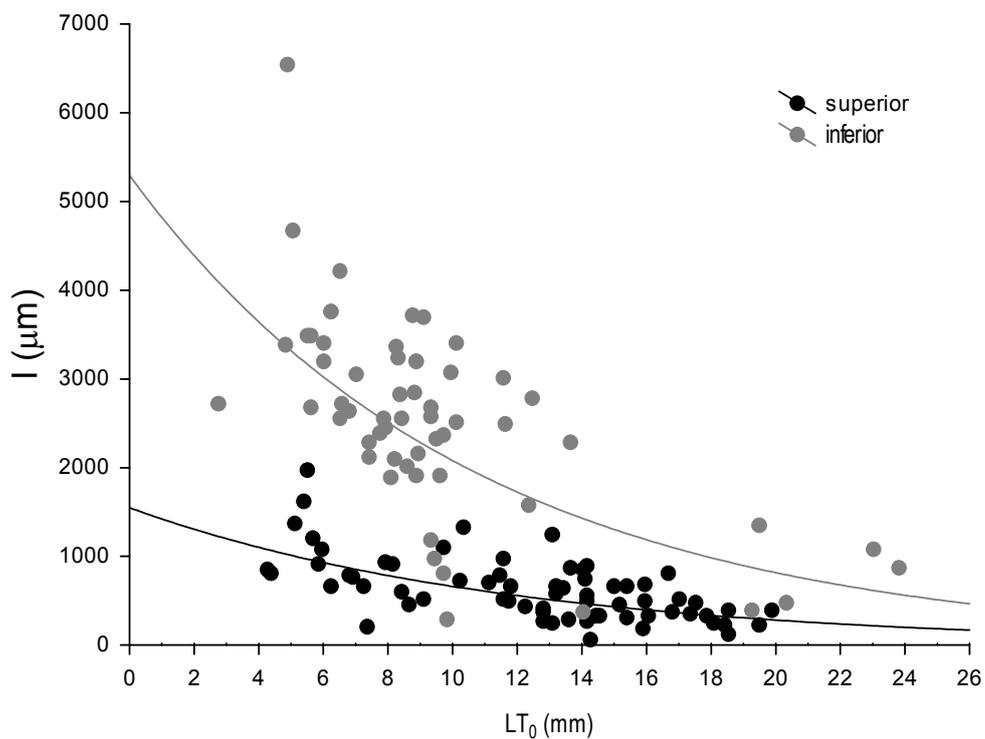


**Figura 7. 6.** Esquema de corte transversal de una valva (modificado de Masu *et al.*, 2008) el recuadro indica la zona que se observa en detalle. Fotografía al M.O. de fluorescencia de valvas de *B. rodriguezii*. **A.** Incremento de 164, 16  $\mu\text{m}$  de un individuo de invierno (LT 14,23 mm). **B.** Incremento de 2.398,97  $\mu\text{m}$  de un individuo de verano (LT 13,66 mm). Las puntas de flecha indican la posición de la marca de calceína próxima al extremo posterior de la valva. Referencias: (p) periostraco. Escala A: 100  $\mu\text{m}$ . Escala B: 200  $\mu\text{m}$ .

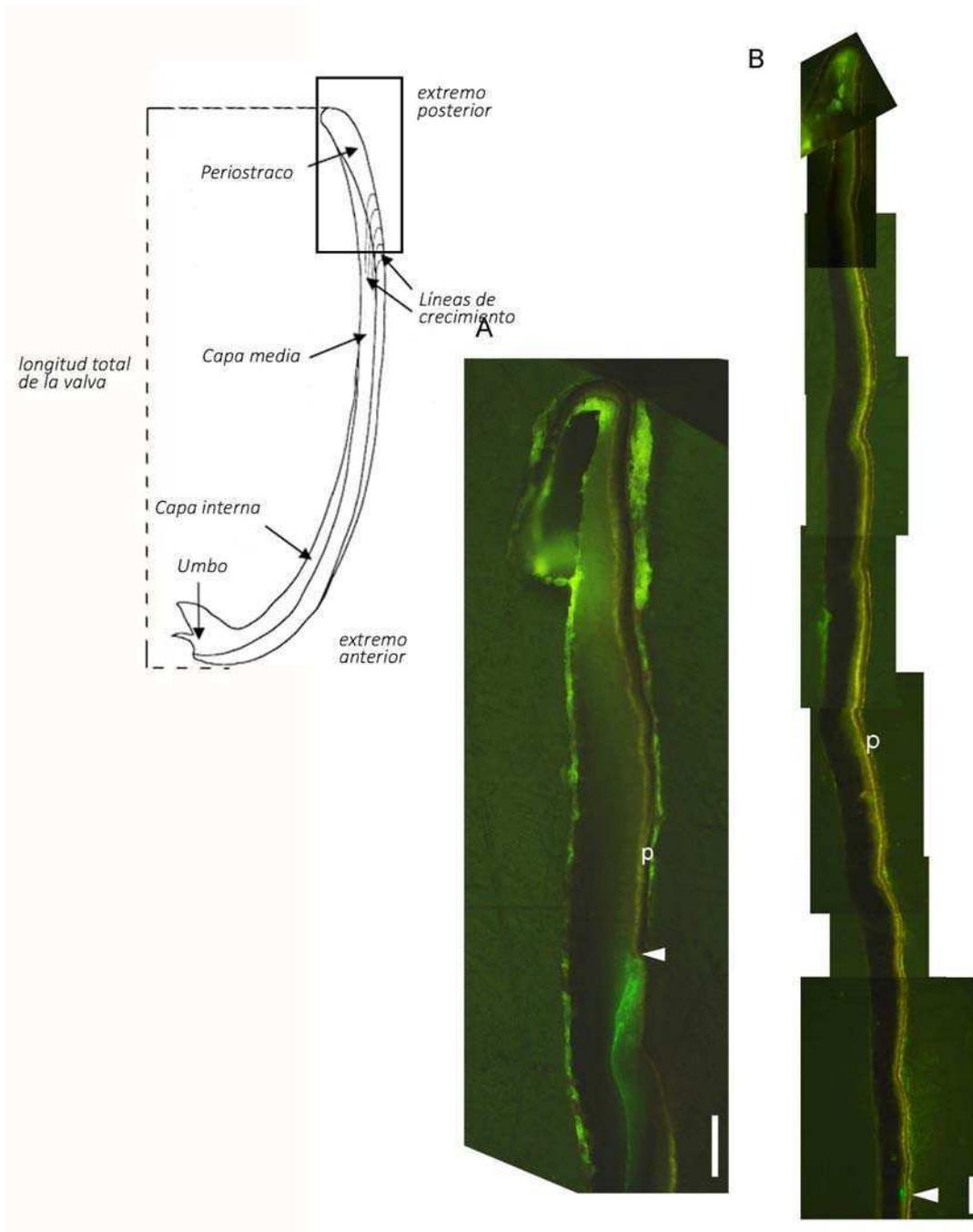
#### *Incremento de la longitud de la valva en relación con la talla*

Los incrementos obtenidos durante el verano para los estratos inferior y superior, sugieren que hay una relación de tipo exponencial entre el incremento de la valva y la talla de los individuos al inicio del experimento (Figuras 7. 7 y 7. 8). Se observó que el incremento de la valva disminuyó a medida que los individuos alcanzaron tallas superiores.

La relación entre el incremento en la longitud de la valva y la talla inicial para los registros del estrato inferior y del superior del período noviembre-diciembre ajustaron a curvas exponenciales negativas (Estrato superior:  $LT_0 = 1549,2764 * \exp(-0,085 * x)$ ; Estrato inferior:  $LT_0 = 5294,699 * \exp(-0.093 * x)$ ). Sin embargo, la curva del estrato superior se mostró más deprimida que la del inferior. Se registró un comportamiento similar entre los estratos para los individuos de tallas mayores, mientras que para las tallas pequeñas, se registraron diferencias más marcadas.



**Figura 7. 7.** Incremento de la valva para individuos de ambos estratos (inferior/ superior) en la experiencia de verano. LT<sub>0</sub>: largo total al inicio del experimento.



**Figura 7. 8.** Esquema de corte transversal de una valva, (modificado de Masu *et al.*, 2008) el recuadro indica la zona que se observa en detalle. Valvas de *B. rodriguezii* con marca de calceína al M.O. de fluorescencia provenientes del estrato inferior de la experiencia de verano. **A.** Detalle del incremento en un individuo de LT 20,31 mm. **B.** Detalle del incremento en un individuo de LT 4,08 mm. Las puntas de flecha indican la posición de la marca de calceína próxima al extremo posterior de la valva. Abreviaturas: (p) periostraco. Escala A: 50  $\mu$ m. Escala B: 100  $\mu$ m.

## 7.4 Discusión

El experimento desarrollado *in situ* permitió registrar el incremento en las valvas de individuos de *Brachidontes rodriguezii*. La metodología de marcado con calceína y registro del incremento mediante observación con microscopía de fluorescencia permitió analizar la relación entre el incremento de la talla, y factores como el tiempo de exposición a condiciones de inmersión, la variación estacional y la longitud inicial de los individuos. Los análisis realizados corroboraron las hipótesis planteadas.

### *Efecto de la disposición vertical en el incremento de la talla*

Los resultados obtenidos para el incremento de la talla de *B. rodriguezii* en relación a la ubicación en el eje vertical de las columnas del muelle apoyaron la primera hipótesis planteada.

En el gradiente vertical las variables ambientales (temperatura, salinidad, mareas, etc.) experimentan cambios, y estos cambios en ocasiones pueden dar lugar a zonas con características diferentes (McQuaid y Mostert, 2010). Esto implica que los individuos de la zona superior están expuestos a una temperatura mayor (e.g. Petes *et al.*, 2008), humedad, disponibilidad de alimento y de oxígeno menor que la zona inferior (Helmuth *et al.*, 2011). Dentro de la zona donde se distribuye una especie intermareal, como ocurre con algunos bivalvos mitílidos, Petes *et al.* (2008) observó que durante la exposición aérea, en el límite superior de su distribución vertical, *Mytilus californianus* adquiere una temperatura corporal que duplica a la que alcanzan individuos en el estrato inferior.

Dado que la amplitud de marea en Villa Gesell es de 1,30 m (SHN, 2014), los individuos del estrato superior permanecen sumergidos solo durante la marea alta. Entonces, el menor incremento registrado en el estrato superior, podría deberse a que los individuos en este estrato están expuestos a condiciones de mayor estrés (mayor temperatura, menor humedad, menor alimento disponible) que los del inferior.

Este crecimiento diferencial en la disposición vertical también ha sido observado para otras especies de bivalvos mitílidos, como *M. californianus* (Petes *et al.*, 2008), *Mytilus edulis* (Anstulevich *et al.*, 1999) y *Geukensia demissa* (Franz, 1996).

Como consecuencia del estrés, no solo se vería afectado el crecimiento sino también algunos aspectos reproductivos, como sugiere Petes *et al.* (2007) quien observó una reducción en las reservas energéticas destinadas a la reproducción y un aumento en la frecuencia de evacuación de gametas para mitílidos.

Dado esto, nuestros resultados sugieren que el estrés ambiental al que están sometidos los individuos del estrato superior afectaría la tasa de crecimiento de *B. rodriguezii*, e incluso podrían verse afectados también aspectos reproductivos. Futuros estudios podrían corroborar este último aspecto.

#### *Variación estacional del crecimiento*

En aguas templadas, los bivalvos marinos muestran un menor crecimiento durante el otoño-invierno, como consecuencia de la disminución de la temperatura del agua y del alimento disponible (Richardson *et al.*, 1993). Nuestros resultados mostraron un mayor incremento en la longitud de la valva de *B. rodriguezii* para los meses de noviembre y diciembre que en los meses de julio y agosto, corroborando así la hipótesis planteada. Para otros moluscos de la región (Giménez *et al.*, 2004; Herrmann *et al.*, 2009b, 2011), se han reportado también menores incrementos en estaciones del año con bajas temperatura (otoño/invierno) que en estaciones de mayor temperatura. Las fluctuaciones estacionales de la temperatura así como del fotoperíodo afectan a la producción primaria (fitoplancton) en el mar (Carreto *et al.*, 1995; Sar *et al.*, 2010). A su vez, la abundancia del fitoplancton, fuente de alimento de *B. rodriguezii*, estaría determinando el crecimiento de esta especie. Así, los valores máximos de abundancia del fitoplancton en verano determinarían un mayor crecimiento en *B. rodriguezii*.

### *Relación entre el crecimiento y la talla de los individuos*

Los menores incrementos registrados en individuos con las tallas más altas de *B. rodriguezii* en este estudio concuerdan con resultados observados en *Ceratoderma edule* (Mahé *et al.*, 2010) y *Perna perna* (Kaehler y McQuaid, 1999). Para poblaciones de *Mesodesma mactroides* (Lepore *et al.*, 2009) y *Donax hanleyanus* (Hermann *et al.*, 2009b) de la costa de la provincia de Buenos Aires, se observa que la relación entre la tasa de crecimiento diaria y la longitud de los individuos es de tipo exponencial. Del mismo modo, los resultados de este estudio también registraron curvas de tipo exponencial negativa para el incremento en relación con la longitud de la valva. Esta observación estaría relacionada con los cambios en el crecimiento que manifiesta un organismo en las distintas etapas de la vida, acelerado en etapas tempranas del desarrollo y desacelerado al alcanzar la madurez (Brey, 1999). En tallas donde los individuos no alcanzan la madurez sexual, el crecimiento es mayor y en tallas donde el individuo se encuentra maduro sexualmente, el crecimiento se ve desacelerado. Esto podría deberse a un cambio en la utilización de los recursos energéticos ligado a la madurez sexual (Giménez *et al.*, 2004). Se ha observado para otros moluscos que los individuos inmaduros destinan la mayor parte de la energía disponible al crecimiento hasta que es alcanzada la madurez (Herrmann *et al.*, 2009b; Hutchings y Haedrich, 1984). Es posible que esto también suceda con *B. rodriguezii*. Sumado a los cambios fisiológicos que experimentan los individuos conforme crecen y se desarrollan, el crecimiento de *B. rodriguezii* al igual que en otros mitílidos es densodependiente.

Las agrupaciones de *B. rodriguezii* constituyen matrices complejas que consisten numerosas capas o estratos de individuos de diferentes edades y tamaños donde se mantienen adheridos unos a otros mediante los filamentos del biso (Alvarado y Castilla, 1996; Guiñez y Castilla, 1999; Commito y Rusignuolo, 2000). El crecimiento varía en relación con la densidad de individuos y con la ubicación dentro de la matriz. Debido a esto, en una porción de la matriz es posible encontrar individuos de diferentes tallas que podrían tener la misma edad, o individuos de tallas similares con edades diferentes (Kautski, 1982). Los factores que estarían regulando el crecimiento son numerosos, sin embargo, un aspecto interesante de este trabajo es que a lo largo de la disposición en el plano vertical, las curvas que describen el

incremento de la talla en relación con la longitud de los individuos, son de forma similar. Para los individuos que se encontraban en el estrato inferior del muelle, la curva presentó valores de incrementos mayores, y esto podría deberse a que estos individuos disponen de más alimento y permanecen más tiempo sumergidos.

## 8. Conclusiones generales.

Los individuos presentan sexos separados, aunque, se registraron en baja proporción individuos hermafroditas. Éstos presentaron en algunos casos acinos femeninos y masculinos, y en otros casos, se observaron acinos mixtos donde células espermatogénicas y células oogénicas compartían un mismo acino.

La oogénesis resultó ser de tipo solitaria. Conforme tiene lugar la oogénesis y progresa la vitelogénesis, se observó una reducción en el tejido conectivo que rodeaba a la gónada.

Se describió la ultraestructura del espermatozoide. Este resultó ser de tipo primitivo. Posee acrosoma de forma cónica, con una prolongación anterior elongada. Núcleo ligeramente ovalado y la pieza media compuesta por cinco mitocondrias que rodean un par de centriolos dispuestos de forma ortogonal.

Se describieron los principales estadios de la espermatogénesis y se reconocieron estructuras correspondientes a alteraciones histopatológicas en la gónada masculina en zonas afectadas antropogénicamente.

La producción de gametas ocurre durante todo el año. El ciclo reproductivo de *Brachidontes rodriguezii* varía estacionalmente.

El ciclo reproductivo presentó un evento de evacuación entre los meses de febrero y mayo.

Se determinó la talla de primera madurez sexual gonadal. La talla mínima de madurez sexual gonadal para machos fue de 6 mm y para las hembras fue de 6,99 mm. La madurez estimada para el 50% de la población ocurre a 8,3 mm de longitud en ambos sexos. Conforme incrementaba el tamaño de los individuos la gónada se desarrollaba y proliferaba ocupando el espacio que previamente ocupaban otros tejidos. A partir de los 12 mm el 100% de los individuos estudiados resultaron estar maduros sexualmente.

El crecimiento resultó estar relacionado con la estacionalidad. Registrándose un mayor incremento en la longitud de la valva en primavera respecto de lo que ocurre en invierno.

El crecimiento varía con respecto a la exposición a condiciones aéreas y acuáticas. Los individuos que permanecen sumergidos durante más tiempo, presentaron un mayor crecimiento respecto de aquellos que permanecen más tiempo expuestos a condiciones aéreas.

Tallas correspondientes a individuos inmaduros sexualmente poseen mayor incremento de longitud de valva. Mientras que las tallas en las que se observa un menor incremento corresponden a individuos maduros sexualmente. Estas observaciones sugieren que podría haber cambios fisiológicos conforme *B. rodriguezii* crece y que estos cambios podrían estar acompañados por condicionamientos energéticos. Los juveniles destinarían sus recursos al crecimiento y mantenimiento, mientras que en los adultos destinarían la energía, al crecimiento, mantenimiento y a la reproducción.

## 9. Bibliografía

Abbe, G. R. y Sanders, J.G. 1986. Condenser replacement in a coastal power plant: copper uptake and incorporation in the American oyster, *Crassostrea virginica*. Marine environmental research, 19:93–113.

Adami, M.L. 2005. Estructura y dinámica de una comunidad dominada por el mitílido *Brachidontes rodriguezii* (d'Orbigny, 1846) en la zona intermareal de Quequén y Necochea (Provincia de Buenos Aires). Tesis doctoral, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

Adami, M, Pastorino, G. y Orenzans, J.M. 2013. Phenotypic differentiation of ecologically significant *Brachidontes* species co-occurring in intertidal mussel beds from the southwestern Atlantic. Malacologia, 56: 59–68.

Adami, M.L., Tablado, A. y López Gappa J.J. 2004. Spatial and temporal variability in intertidal assemblages dominated by the mussel *Brachidontes rodriguezii* (d'Orbigny, 1846). Hydrobiologia, 520: 49-59.

Adami, M.L., Tablado, A. y Sodor, M.A. 2008. Population dynamics of the intertidal mytilid *Brachidontes rodriguezii* (Bivalvia) on a rocky shore. Thalassas, 24: 21-27.

Adami, M. L.; Schwindt, E.V., Tablado, A. y Orensanz, J.M. 2007. Variación latitudinal en la abundancia de mitílidos intermareales a lo largo de un gradiente entre 38° y 54° S en el Atlántico Sudoccidental. III Reunión binacional de ecología, La Serena, Chile.

Addadi, L., Joester, D., Nudelman, F. y Weiner, S. 2006. Mollusc shell formation: a source of new concepts for understanding biomineralization processes. Chemical European journal, 12: 980–987.

Al-Barwani, S. M., Arshad, A., Amin, S. M. N. y Bujang, J. S. 2013. Incidence of hermaphrodite in green mussel *Perna viridis* along the West Coast of Peninsular Malaysia. Asian journal of animal & veterinary advances, 8: 376-382.

Alvarado, J.L. y Castilla, J.C. 1996. Tridimensional matrices of mussels *Perumytilus purpuratus* on intertidal platforms with varying wave forces in central Chile. Marine ecology progress series, 133: 135-141.

Ángel- Pérez, C., Serrano -Guzmán, S.J. y Ahumada-Sempoal, M.A. 2007. Ciclo reproductivo del molusco *Atrina maura* (Pterioidea: Pinnidae) en un sistema lacunar costero, al sur del Pacífico tropical mexicano. Revista de biología tropical, 55: 839-852.

Antsulevich, A.E., Maximivich, V.N. y Vuorinen, I. 1999. Population structure, growth and reproduction of the common mussel (*Mytilus edulis* L.) off the island of Seili (SW Finland). *Boreal environmental research*, 4: 367- 375.

Appeltans, W., Ahyong, S.T., Anderson, G., Angel, M.V., Artois, T., Bailly, N., Bamber, R., Barber, A., Bartsch, I., Berta, A., Błazewicz-Paszkowycz, M., Bock, P., Boxshall, G., Boyko, C.B., Nunes Brandão, S., Bray, R.A., Bruce, N.L., Cairns, S.D., Chan, T.-Y., Cheng, L., Collins, A.G., Cribb, T., Curini-Galletti, M., Dahdouh-Guebas, F., Davie, P.J.F., Dawson, M.N., De Clerck, O., Decock, W., De Grave, S., de Voogd, N.J., Domning, D.P., Emig, C.C., Erséus, C., Eschmeyer, W., Kristian Fauchald, K., Fautin, D.G., W. Feist, S.W., Fransen, C.H.J.M., Furuya, H., Garcia-Alvarez, O., Gerken S., Gibson, D., Gittenberger, A., Gofas, S., Gómez-Daglio, L., Gordon, D. P., Guiry, M.G., Hernandez, F., Hoeksema, B.W., Hopcroft, R.R., Jaume, D., Kirk, P., Koedam, N., Koenemann, S., Kolb, J.B., Kristensen, R.M., Kroh, A., Lambert, G., Lazarus, D.B., Lemaitre, R., Longshaw, M., Lowry, J., Macpherson, E., Madin, L.P., Mah, C., Mapstone, G., McLaughlin, P.A., Mees, J., Meland, K., Messing, C.G., Mills, C.E., Molodtsova, T.N., Mooi, R., Neuhaus, B., Ng, P.K.L., Nielsen, C., Norenburg, J., Opresko, D.M., Osawa, M., Paulay, G., Perrin, W., Pilger, J.F., Poore, G.C.B., Pugh, P., Read, G.R., Reimer, J.D., Rius, M., Rocha, R.M., Saiz-Salinas, J.I., Scarabino, V., Schierwater, B., Schmidt-Rhaesa, A., Schnabel, K.E., Schotte, M., Schuchert, P., Schwabe, E., Segers, H., Self-Sullivan, C., Noa Shenkar, N., Siegel, V., Sterrer, W., Stöhr, S., Swalla, B., Tasker, M.L., Thuesen, E.V., Timm, T., Todaro, M.A., Turon, X., Tyler, S., Uetz, P., van der Land, J., Vanhoorne, B., van Ofwegen, L.P., van Soest, R.W.M., Vanaverbeke, J., Walker-Smith, G., Walter, C., Warren, A., Williams, G.C., Wilson, S.P. y Costello, M.J. 2012. The magnitude of global marine species diversity. *Current biology*, 22: 1- 14.

Arias, A.H., Spetter, C.V., Freije, R.H. y Marcovecchio, J.E. 2009. Polycyclic aromatic hydrocarbons in water, mussels (*Brachidontes sp.*, *Tagelus sp.*) and fish (*Odontesthes sp.*) from Bahía Blanca Estuary, Argentina. *Estuarine, coastal and shelf science*, 85: 67–81.

Arribas, L.P., Bagur, M., Klein, E., Penchaszadeh, P.E. y Palomo M.G. 2013. Geographic distribution of two mussel species and associated assemblages along the northern Argentinean coast. *Aquatic biology*, 18: 91–103.

Arrighetti, F. y Penchaszadeh, P.E. 2010. Gametogenesis, seasonal reproduction and imposex of *Adelomelon beckii* (Neogastropoda: Volutidae) in Mar del Plata, Argentina. *Aquatic biology*, 9: 63–75.

Au, D.W.T., Reunov, A.A. y Wu, R.S.S. 2001. Reproductive impairment of sea urchin upon chronic exposure to cadmium. Part II: Effects on sperm development. *Environmental pollution*, 111: 11-20.

Avendaño, M. y Cantilláñez, M. 2013. Reproductive cycle, collection and early growth of *Aulacomya ater*, Molina 1782 (Bivalvia: Mytilidae) in northern Chile. *Aquaculture research*, 44: 1327–1338.

Averbuj, A. y Penchaszadeh, P.E. 2010. On the reproductive biology and impact of imposex in a population of *Buccinanops monilifer* from Mar del Plata, Argentina. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 90: 729-734.

Bagur, M., Richardson, C.A., Gutiérrez, J.L., Arribas, L.P., Doldan, M.S. y Palomo, M.G. 2013. Age, growth and mortality in four populations of the boring bivalve *Lithophaga patagonica* from Argentina. *Journal of sea research*, 81: 49–56.

Balech, E. y Erlich, M.D. 2008. Esquema biogeográfico del Mar Argentino. *Revista de investigación y desarrollo pesquero*, 19: 45–75.

Barber, B.J., Fajans, J.S., Baker, S.M. y Baker, P. 2005. Gametogenesis in the non-native green mussel, *Perna viridis*, and the native scorched mussel, *Brachidontes exustus*, in Tampa bay, Florida. *Journal of Shellfish Research*, 24: 1087-1095.

Bayen, S., Lee, H.K. y Obbard, J.P. 2007. Exposure and response of aquacultured oysters, *Crassostrea gigas*, to marine contaminants. *Environmental research*, 103:375–382.

Bayne, B.L., Bubal, A., Gabbott, P.A., Livingstone, D.R., Lowe, D.M. y Moore, M.N., 1982. Glycogen utilisation and gametogenesis in *Mytilus edulis* L. *Marine biology letters*, 3: 89-105.

Bernard, R.T.F., Davies, B.R. y Hodgson, A.N. 1988. Reproduction in a brackish-water mytilid: gametogenesis and embryonic development. *The veliger*, 30:278-290.

Berthelin, C., Kellner, K. y Mathieu, M. 2000. Histological Characterization and glucose incorporation into glycogen of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* storage cells. *Marine biotechnology*, 2: 136–145.

Bieler, R., Mikkelsen, P.M., Collins, T.M., Glover, E.A., González, V.L., Graf, D.L., Harper, E.M., Healy, J., Kawachi, G.Y., Sharma, P.P., Staubach, S., Strong, E.E., Taylor, J.D., Tëmkin, I., Zardus, J.D., Clark, S., Guzmán, A., McIntyre, E., Sharp, P. y Giribet G. 2014.

Investigating the Bivalve Tree of Life – an exemplar-based approach combining molecular and novel morphological characters. *Invertebrate systematics*, 28: 32–115.

Bigatti, G.I., Primost, M.A., Cledón, M., Averbuj, A., Theobald, N., Gerwinski, W., Arntz, W., Morriconi, E. y Penchaszadeh, P.E. 2009. Contamination by TBT and imposex biomonitoring along 4700 km of Argentinean shoreline (SW Atlantic: from 38° S to 54° S). *Marine pollution bulletin*, 58: 695–701.

Brey, T. 1999. Growth, performance and mortality in aquatic macrobenthic invertebrates. *Advances in marine biology*, 35: 153–223.

Brey, T. y Mackensen, A. 1997. Stable isotopes prove shell growth bands in the Antarctic bivalve *Laternula elliptica* to be formed annually. *Polar biology*, 17: 465–468.

Briones, C., Guiñez, R., Garrido, O., Oyarzún, P.A., Toro, J.E. y Pérez, M. 2012. Sperm polymorphism and genetic divergence in the mussel *Perumytilus purpuratus*. *Marine biology*, 159: 1865–1870.

Brousseau, D. J. 1982. Gametogenesis and spawning in a population of *Geukensia demissa* (Pelecypoda, Mytilidae) from Westport, Connecticut. *Veliger*, 24: 247-251.

Brown, A. C., y McLachlan, A. 1990. Ecology of sandy shores.

Bustamante, R.H. y Branch, G.M. 1996. The dependence of intertidal consumers on kelp-derived organic matter on the west coast of South Africa. *Journal of experimental marine biology and ecology*, 196: 1–28.

Cáceres-Puig, J.I., Huato-Soberanis, L., Neri Melo-Barrera, F. y Saucedo, P.E. 2011. Use of calcein to estimate and validate age in juveniles of the winged pearl oyster *Pteria sterna*. *Aquatic living resources*, 24: 329–335.

Calcagno, J.A., Curelovich, J.N., Fernández, V.M., Thatje, S. y Lovrich, G.A. 2012. Effects of physical disturbance on a sub-Antarctic middle intertidal bivalve assemblage. *Marine biology research*, 8: 937-953.

Calvo, J., Morriconi, E., y Orler, P. 1998. Estrategias reproductivas de moluscos bivalvos y equinoideos. *El mar argentino y sus recursos pesqueros*, 2: 195–213.

Camacho-Mondragón, M.A., Arellano-Martínez, M. y Ceballos-Vázquez, B.P. 2012. Particular features of gonadal maturation and size at first maturity in *Atrina maura* (Bivalvia: Pinnidae). *Scientia Marina*, 76: 539-548.

Carranza, A., Defeo, O., Beck, M. y Castilla, J.C. 2009. Linking fisheries management and conservation in bioengineering species: the case of South American mussels (Mytilidae). *Reviews in fish biology and fisheries*, 19:349–366.

Carreto, J.I., Lutz, V.A., Carignan, M.O., Cucchi Colleoni, A.D. y de Marcos S.G. 1995. Hydrography and chlorophyll *a* in a transect from the coast to the shelf-break in the Argentinian Sea. *Continental shelf research*, 15: 315– 336.

Checa, A. 2000. A new model for periostracum and shell formation in Unionidae (Bivalvia, Mollusca). *Tissue & cell*, 32: 405– 416.

Chesman, B.S. y Langston, W.J. 2006. Intersex in the clam *Scorbicularia plana*: a sign of endocrine disruption in estuaries? *Biology letters*, 2: 420–422.

Chung, E.Y. 2007. Oogenesis and sexual maturation in *Meretrix lusoria* (Röding 1798) (Bivalvia: Veneridae) in western Korea. *Journal of Shellfish Research*, 26: 71–80.

Chung, E.Y. 2008. Ultrastructural studies of oogenesis and sexual maturation in female *Chlamys (azumapekten) farreri farreri* (Jones & Preston, 1904) (Pteriomorpha: Pectinidae) on the western coast of Korea. *Malacologia*, 50:279-292.

Cledón, M., Gerwinski, M., Theobald, N. y Penchaszadeh, P.E. 2006. Organotin compounds (OTs) in sediments and commercial gastropods of Mar del Plata, Argentina. *Journal of marine biology association of the United Kingdom*, 86: 751–755.

Coe, W. R. 1943. Sexual differentiation in molluscs. I. Pelecypods. *The quarterly review of biology*, 18: 154–164.

Colombo, J.C., Barreda, A., Cappelletti, N., Migoya, C. y Skorupka, C. 2005. Organic pollutants in waters and sediments of littoral afluent in Argentina. Final report. Transnational Diagnostic Analysis of the Rio de la Plata and its Oceanic Front. ADT 24 pp.

Commito, J.A. y Rusignuolo, B.R. 2000. Structural complexity in mussel beds: the fractal geometry of surface topography. *Journal of experimental marine biology and ecology*, 255: 133–152.

Connell, J. H. 1972. Community interactions on marine rocky intertidal shores. *Annual review of ecology and systematics*, 3: 169–172.

- Darriba, S., San Juan, F. y Guerra, A. 2004. Reproductive cycle of the razor clam *Ensis arcuatus* (Jeffreys, 1865) in northwest Spain and its relation to environmental conditions. *Journal of experimental marine biology and ecology*, 311: 101–115.
- Darrigran, G. A., Damborenea, M. C. y Penchaszadeh, P.E. 1998. A case of hermaphroditism in the freshwater invading bivalve *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (Mytilidae) from Río de la Plata, Argentina. *Iberus*, 16: 99–104.
- Day, R.W., Williams, M.C. y Hawkes, G.P. 1995. A comparison of fluorochromes for marking abalone shells. *Marine freshwater research*, 46: 599–605.
- De Gaulejac, B., Henry, M. y Vicente, N. 1995. An ultrastructural study of gametogenesis of the marine bivalve *Pinna nobilis* (Linnaeus 1758) I. Oogenesis. *Journal of molluscan studies*, 61: 375–392.
- Denny, M. W. y Paine, R.T. 1998. Celestial mechanics, sealevel changes, and intertidal ecology. *Biological bulletin* 194: 108–115.
- Delgado, E. y Defeo, O. 2007. Tisular and population level responses to habitat harshness in sandy beaches: the reproductive strategy of *Donax hanleyanus*. *Marine biology*, 154:919-927.
- De Vico, G. y Carella, F. 2012. Morphological features of the inflammatory response in molluscs. *Research in Veterinary Science*, 93: 1109–1115.
- Desouky, M.M.A. 2009. Pathological effects of environmental pollution on the ultrastructure of spermatogenic stages and the mature sperm of *Brachydontes variabilis* (Krauss, 1848) (Bivalvia-Mytilidae). *Australian journal of basic and applied science*, 3: 2627–2636.
- Dorange, G. y Le pennec, M. 1989a. Ultrastructural study of oogenesis and oocytic degeneration in *Pecten maximus* from the Bay of St. Brieuc. *Marine biology*, 103: 339–348.
- Dorange, G. y Le Pennec, M. 1989b. Ultrastructural characteristics of spermatogenesis in *Pecten maximus* (Mollusca, Bivalvia). *Invertebrate reproduction and development*, 15:109–117.
- Drozдов, A.L. y Reunov, A.A. 1997. Sperm morphology in mytilid bivalves. *Russian journal of marine biology*, 23: 136–142.

Drozdov, A.L., Sharina, S.N. y Tyurin, S.A. 2009. Sperm ultrastructure in representatives of six bivalve families from Peter the Great Bay, Sea of Japan. *Russian journal of marine biology*, 35: 236–241.

Duarte, C. A., Giarratano, E., Amin, O. A. y Comoglio, L. I. 2011. Heavy metal concentrations and biomarkers of oxidative stress in native mussels (*Mytilus edulis chilensis*) from Beagle Channel coast (Tierra del Fuego, Argentina). *Marine pollution bulletin*, 62: 1895-1904.

Ebert, D. 1994. A maturation size threshold and phenotypic plasticity of age and size at maturity in *Daphnia magna*. *Oikos*, 69: 309–317.

Eckelbarger, K. J. y Davis, C.V. 1996. Ultrastructure of the gonad and gametogenesis in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. II. Testis and spermatogenesis. *Marine biology*, 127: 89–96.

Eckelbarger, K.J. y Young, C.M. 1999. Ultrastructure of gametogenesis in a chemosynthetic mytilid bivalve (*Bathymodiolus childressi*) from a bathyal, methane seep environment (northern Gulf of Mexico). *Marine biology*, 135: 635–646.

Elías, R., Rivero, M.R., Palacios, J.R y Vallarino, E.A. 2006. Sewage-induced disturbance on polychaetes inhabiting intertidal mussel beds of *Brachidontes rodriguezii* off Mar del Plata (SW Atlantic, Argentina). *Scientia Marina*, 70: 187–196.

Elías, R., Rivero, M.S., Sanchez, M.A., Jaubet, L. y Vallarino, E.A. 2009. Do treatments of sewage plants really work? The intertidal mussels' community of the southwestern Atlantic shore (38°S, 57°W) as a case study. *Revista de biología marina y oceanografía*, 44: 357–368.

Erkan, M. 2009. Ultrastructure of ovary and oogenesis in *Chamelea gallina* (Linné, 1758) (Bivalvia, Veneridae). *Invertebrate reproduction and development*, 53: 201–209.

Erkan, M. y Sousa, M. 2002. Fine structural study of the spermatogenic cycle in *Pitar rudis* and *Chamelea gallina* (Mollusca, Bivalvia, Veneridae). *Tissue and cell*, 34: 262–272.

Franco, A., Heude Berthelin, C., Goux, D., Sourdain, P. y Mathieu, M. 2008. Fine structure of the early stages of spermatogenesis in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Mollusca, Bivalvia). *Tissue and cell*, 40: 251–260.

Franz, D.R. 1996. Size and age at first reproduction of the ribbed mussel *Geukensia demissa* (Dillwyn) in relation to shore level in a New York salt marsh. *Journal of Experimental marine Biology and Ecology*, 205: 1–13.

Franzén, Å. 1983. Ultrastructural studies of spermatozoa in three bivalve species with notes on evolution of elongated sperm nucleus in primitive spermatozoa. *Gamete research*, 7: 199–214.

Fearman, J.A. y Moltschaniwskyj, N.A. 2010. Warmer temperatures reduce rates of gametogenesis in temperate mussels, *Mytilus galloprovincialis*. *Aquaculture*, 305: 20–25.

Fujikura, K., Okoshi, K. y Naganuma, T. 2003. Strontium as a marker for estimation of microscopic growth rates in a bivalve. *Marine ecology progress series*, 257: 295–301.

Gabbott, P.A. 1975. Storage cycles in marine bivalves molluscs: a hypothesis concerning the relationship between glycogen metabolism and gametogenesis. In: *Proc 9<sup>th</sup> Eur mar biol sym.*

Gage, M.J. 1995. Continuous variation in reproductive strategy as an adaptive response to population density in the moth *Plodia interpunctella*. *Proceedings of the Royal Society of London*, 261: 25–30.

Garrido, O. y Gallardo, C.S. 1996. Ultrastructure of sperms in bivalve molluscs of the Mytilidae family. *Invertebrate reproduction and development*, 29: 95–102.

George, S. G., Pirie, B.J.S., Cheyne, A.R., Coombs, T.L. y Grant, P.T. 1978. Detoxication of metals by marine bivalves: an ultrastructural and biochemical study of the compartmentation of copper and zinc in the oyster *Ostrea edulis*. *Marine biology*, 45: 147–156.

Ghiselin, M. T. 1969. The evolution of hermaphroditism among animals. *The quarterly review of biology*, 44: 189–208.

Giese, A. C. y Pearse, J.S. 1974. Introduction: General principles. En: *Reproduction of marine invertebrates*. Giese, A.C. y Piearse J.S. (Edits), 1:1–49. Academic press, New York.

Giguère, M., Cliché, G. y Brulotte, S. 1994. Reproductive cycle of the sea scallop, *Placopecten magellanicus* (Gmelin), and the Iceland scallop, *Chlamys islandica* (O. F. Müller), in Îles-de-la-Madeleine, Canada. *Journal of shellfish research*, 13:31–36.

Gil, M.N., Torres, A., Harvey, M. y Esteves, J.L. 2006. Metales pesados en organismos marinos de la zona costera de la Patagonia argentina continental. *Revista de biología marina y oceanografía*, 41: 167 – 176.

Giménez, J., Brey, T., Mackensen, A. y Penchaszadeh, P.E. 2004. Age, growth and mortality of the prosobranch *Zidona dufresnei* (Donovan, 1823) in the Mar del Plata area, south-western Atlantic Ocean. *Marine biology*, 145, 707–712.

Gimeno, S., Sarasquete, C. y González de Canales, M.L. 1991. El glucógeno de las células de almacenamiento del mejillón, *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819. Demostración histoquímica. *Scientia marina*, 55: 453- 457.

Gladyshev, E.A. y Drozdov, A.L. 2002. Sperm ultrastructure of two mollusk species *Geukensia demissa* and *Modiolus modiolus* (Mytilidae, Bivalvia). *Russian journal of marine biology*, 28: 422–426.

Gorrostieta, H.E. 1997. Ciclo gonádico de *Arca pacifica* (Sowerby, 1833) y de *Cardita affinis*, 1833 (Mollusca: Bivalvia) en Punta Arena, Bahía Concepción. Tesis de Maestría. CICIMAR. La Paz, Baja California Sur, México.

Guiñez, R. y Castilla, J.C. 1999. A tridimensional self-thinning model for multilayered intertidal mussels. *The American naturalist*, 154: 341–357.

Günther, C. P. 1996. Development of small *Mytilus* beds and its effects on resident intertidal macrofauna. *P.S.Z.N.I. Marine ecology*, 17: 117–130.

Hartnoll, R.G. 1983. Strategies of crustacean growth. *Memoirs of the Australian museum*, 18: 121-131.

Healy, J.H., Keys, J.L. y Daddon, L.Y.M. 2000. Comparative sperm ultrastructure in pterimorphian bivalves with special reference to phylogenetic and taxonomic implications. En: Harper, E.M., Taylor, J.D. y Crame, J.A. (Ed), *The evolutionary biology of the Bivalvia* Geological Society, London, special publications, London, pp. 167–190.

Healy, J.M., Buckland-Nicks, J.A. y Jamieson, B.G.M. 2001. Spermatozoal ultrastructure of spiny oysters (Spondylidae, Bivalvia) including a comparison with other bivalves. *Invertebrate reproduction and development*, 40: 27–37.

Helmuth, B., Yamane, L., Lalwani, S., Matzelle, A., Tockstein, A. y Gao, N. 2011. Hidden signals of climate change in intertidal ecosystems: What (not) to expect when you are expecting. *Journal of experimental marine biology and ecology*, 400: 191–199.

Herrmann, M., Alfaya, J.E.F., Lepore, M.L., Penchaszadeh, P.E. y Arntz, W.E. 2011. Population structure, growth and production of the yellow clam *Mesodesma mactroides* (Bivalvia: Mesodesmatidae) from a high-energy, temperate beach in northern Argentina. *Helgoland marine research*, 65: 285–297.

Herrmann, M., Alfaya, J.E.F., Lepore, M.L., Penchaszadeh, P.E. y Laudien, J. 2009a. Reproductive cycle and gonad development of the Northern Argentinean *Mesodesma mactroides* (Bivalvia: Mesodesmatidae). *Helgoland marine research*, 63: 207–218.

Herrmann, M., Lepore, M.L., Laudien, J., Arntz, W.E. y Penchaszadeh, P.E. 2009b. Growth estimations of the Argentinean wedge clam *Donax hanleyanus*: A comparison between length-frequency distribution and size-increment analysis. *Journal of experimental marine biology and ecology*, 379: 8–15.

Hodgson, A.N. y Bernard, R.T.F. 1986. Ultrastructure of the sperm and spermatogenesis of three species of Mytilidae (Mollusca, Bivalvia). *Gamete research*, 15: 123–135.

Holcomb, M., Cohen, A.L. y McCorkle, D.C. 2013. An evaluation of staining techniques for marking daily growth in scleractinian corals. *Journal of experimental marine biology and ecology*, 440: 126–131.

Horiguchi, T., Takiguchi, N., Cho, S.H., Kojima, M., Kaya, M., Shiraishi, H. Morita, M., Hirose, H y Shimizu M. 2000. Ovo-testis and disturbed reproductive cycle in the giant abalone, *Haliotis madaka*: possible linkage with organotin contamination in a site of population decline. *Marine environment research*, 50: 223–229.

Hutchings, J.A. y Haedrich, R.L. 1984. Growth and population structure in two species of bivalves (Nuculanidae) from the deep sea. *Marine ecology progress series*, 17: 35–142.

Introíni, G.O., Magalhães, C.A., Aguiar-Jr, O., Quaresma, A.J.C., Lino- Neto, J. y Recco-Pimentel, S.M. 2004. Spermatozoan morphology of *Brachidontes darwinianus* and *Brachidontes solisianus* (Bivalvia, Mytilidae) from the southern Brazilian coast. *Invertebrate reproduction and development*, 46: 149–158.

Introíni, G.O., Magalhães, C.A., Fortunato, H. y Recco-Pimentel, S.M. 2009. Comparison of the spermatozoan morphology of *Isognomon bicolor* and *Isognomon alatus* (Mollusca, Bivalvia, Isognomonidae). *Tissue and cell*, 41: 67–74.

Introíni, G.O., Martins Maester, F., Pereira Leite, F.P. y Recco-Pimentel, S.M. 2010. Sperm ultrastructure of *Mytella* (Bivalvia) populations from distinct habitats along the northern coast of São Paulo State, Brazil. *Biocell*, 34: 103–111.

Ituarte, C. 2009. Unusual modes of oogenesis and brooding in bivalves: the case of *Gaimardia trapesina* (Mollusca: Gaimardiidae). *Invertebrate biology*, 128: 243–251.

Ituarte, C., Liuzzi, M.G. y Centurión, R. 2010. Egg hull morphology in two chitons (Polyplacophora) from the Southwestern Atlantic Ocean. *Malacologia*, 53:167–174.

Jamieson, B.G.M. y Rouse, G.W. 1989. The spermatozoa of the Polichaeta (Annelida): an ultrastructural review. *Biological reviews of the Cambridge philosophical society*, 64. 93–157.

Jong-Brink, M., Boer, H.H. y Joose, J. 1983. Mollusca. En *Reproductive biology of invertebrates*. Adiyodi, K.G. y Adiyodi, R.G. (Edits) pp 297–355. Chichester, New York.

Joubert, C., Linard, C., Le Moullac, G., Soyez, C. y Saulnier, D. 2014. Temperature and food influence shell growth and mantle gene expression of shell matrix proteins in the pearl oyster *Pinctada margaritifera*. *PLoS ONE*, 9: e103944. doi:10.1371/journal.pone.0103944

Kádar, E., Lobo da Cunha, A., Santos, R, y Dando, P. 2006. Spermatogenesis of *Bathymodiolus azoricus* in captivity matching reproductive behaviour at deep-sea hydrothermal vents. *Journal of experimental marine biology and ecology*, 335: 19–26.

Kaehler, S. y McQuaid, C.D. 1999. Use of the fluorochrome calcein as an in situ growth marker in the Brown mussel *Perna perna*. *Marine biology*, 133: 455–460.

Kafanov, A.I. y Drozdov, A.L. 1998. Comparative sperm morphology and phylogenetic classification of recent Mytiloidea (Bivalvia). *Malacologia*, 39: 129–139.

Kasyanov, V.L. 2001. Reproductive strategy of marine bivalves an echinoderms. Science publisher's Inc. pp 229

Kautsky, N.1982. Growth and size structure in a Baltic *Mytilus edulis* population. *Marine biology*, 68: 17–133.

Kefi, F.J., Boubaker, S. y Menif, N.T.E. 2014. Relative growth and reproductive cycle of the date mussel *Lithophaga lithophaga* (Linnaeus, 1758) sampled from the Bizerte Bay (Northern Tunisia). *Helgoland marine research*, 68: 439–450

Komar, P.D. 1976. Beach processes and sedimentation. Englewood cliffs, Prentice Hall, N.J.

Laing, I. 2000. Effect of temperature and ration on growth and condition of king scallop (*Pecten maximus*) spat. *Aquaculture*, 183: 325–334.

Langston, W. J., Burt, G.R. y Chesman, B.S. 2007. Feminization of male clam *Scorbicularia plana* from estuaries in Southwester UK and its induction by endocrine-disruption chemicals. *Marine ecology progress series*, 33: 173–184.

Laptikhovsky, V.V. y Arkhipkin, A.I. 2001. Oogenesis and gonad development in the cold water loliginid squid *Loligo gahi* (Cephalopoda: Myopsida) on the Falkland shelf. *Journal of molluscan studies*, 67: 475–482.

Lepore, M.L., Penchaszadeh, P.E., Alfaya, J.E.F. y Herrmann, M. 2009. Aplicación de calceína para la estimación del crecimiento de la almeja amarilla *Mesodesma mactroides* Reeve, 1854. *Revista de biología marina y oceanografía*, 44: 767–774.

Linard, C., Gueguen, Y., Moriceau, J., Soyeux, C., Hui, B., Raoux, A., Cuif, J.P., Cochard, J.C, Le Pennec, M. y Le Moullac, G. 2011. Calcein staining of calcified structures in pearl oyster *Pinctada margaritifera* and the effect of food resource level on shell growth. *Aquaculture*, 313: 149–155.

Longo, F.G. y Dornfield, E.J. 1967. The fine structure of spermatid differentiation in the mussel, *Mytilus edulis*. *Journal of ultrastructure research*, 20: 462–480.

López Gappa, J.J, Tablado, A. y Magaldi, N.H. 1990. Influence of sewage pollution on a rocky intertidal community dominated by the mytilid *Brachydontes rodriguezi*. *Marine ecology progress series*, 63: 163–175.

Lowe, D. M., Moore, M.N. y Bayne, B.L. 1982. Aspects of gametogenesis in the marine mussel *Mytilus edulis* L. *Journal of the marine biological association of the United Kingdom*, 62: 133–145.

Lubet, P. 1959. Recherches sur le cycle sexual et l'émission des gametes chez les Mytilides et les Pectinides. *Revue des travaux. Institut des peches maritimes*, 23: 387–548.

Lubet, P., Gimázane, J.P., y Prunus, G. 1981. Etude du cycle de reproduction de *Mytilus galloprovincialis* (Lmk) (Moll. Lamelibranche) à la limite meridionale de son aire de repartition. *Comparaison avec les autres secteurs de cette aire. Haliotis*, 11: 157–170.

Mahé, K., Bellamy, E., Lartaud, F. y de Rafélis, M. 2010. Calcein and manganese experiments for marking the shell of the common cockle (*Cerastoderma edule*): tidal rhythm validation of increments formation. *Aquatic living resources*, 23: 239–245.

Marcomini, S. C. y López, R. A. 1997. Influencia de la urbanización en la dinámica costera, Villa Gesell, provincia de Buenos Aires, Argentina. *Revista de la asociación Argentina de sedimentología*, 4:79–96.

Maroñas, M.E., Darrigran, G.A., Sendra, E.D. y Breckon, G. 2003. Shell growth of the golden mussel, *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (Mytilidae), in the Río de la Plata, Argentina. *Hydrobiologia*, 495: 41–45.

Mathieu, M. y Lubet, P. 1993. Storage tissue metabolism and reproduction in marine bivalves - a brief review. *Invertebrate reproduction and development*, 23: 123–129.

McCoy Loría, P.L. y Huato-Soberanis, L. 2014. Efficacy of calcein and Coomassie Blue dyeing of shell growing-edges and micro growth-bands: Ageing juvenile of *Pinctada mazatlanica* (Pterioidea: Pteriidae). *Revista de biología tropical*, 62: 957–968.

McQuaid, C.D. y Mostert, B.P. 2010. The effects of within-shore water movement on growth of the intertidal mussel *Perna perna*: An experimental field test of bottom-up control at centimetre scales. *Journal of experimental marine biology and ecology*, 384: 119–123.

Montenegro Villalobos, D., Olivares Paz, A. y González, M.T. 2010. Hermaphroditism in marine mussel *Perumytilus purpuratus* (Lamarck, 1819), (Mollusca: Mytilidae). *Int. Journal of Morphology*, 28: 569–573.

Moran, A.L. 2000. Calcein as a marker in experimental studies newly-hatched gastropods. *Marine biology*, 137: 893–898.

Morton, B. 1991. Do the Bivalvia demonstrate environment-specific sexual strategies? A Hong Kong model. *Journal of zoology*, 223: 131–142.

Morton, B. 1995. The population dynamics and reproductive cycle of *Septifer virgatus* (Bivalvia: Mytilidae) on an exposed rocky shore in Hong Kong. *Journal of zoology*, 235: 485–500.

Moura, P., Vasconcelos, P. y Gaspar, M.B. 2013. Age and growth in three populations of *Dosinia exoleta* (Bivalvia: Veneridae) from the Portuguese coast. *Helgoland marine research*, 67: 639–652.

Nugent, P.L. 1989. Ecología y biología de los mejillinares de *Brachydontes rodriguezii* (D'Orbigny, 1846). Lamy 1936 en el litoral bonaerense. Tesis doctoral, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

Orenzans, J.M. 1986. Size environment, and density: the regulation of a scallop stock and its management implications. En: Jamieson, G.S. y Bourne, N. (Eds.). North Pacific Workshop on stock assessment and management of invertebrates. Canadian special publication of fisheries and aquatic science, 92: 195-227.

Ottaviani, E., 2011. Immunocyte: the invertebrate counterpart of the vertebrate macrophage. Invertebrate survival journal, 8: 1-4.

Oyarzún Cabañas, P., Toro, J.E., Jaramillo, R., Guiñez, R., Briones, C. y Astorga, M. 2010. Análisis comparativo del ciclo gametogénico de *Perumytilus purpuratus* (Bivalvia: Mytilidae), en las localidades de Taltal y Huasco, norte de Chile. Revista de biología marina y oceanografía, 45: 43-58.

Penchaszadeh, P.E. 1973. Ecología de la comunidad del mejillín (*Brachydontes rodriguezii* d'Orb.) en el mediolitoral rocoso de Mar del Plata (Argentina): el proceso de recolonización. Physis, 32: 51-64.

Penchaszadeh, P.E., Scelzo, M., Palomo, G., Cuevas, M., y Cledon, M. 2007. A review of the intertidal rocky shore community at Mar del Plata (Argentina) characterized by the mussel *Brachidontes rodriguezii* (d'Orbigny, 1846). The NaGISA world congress, Japan vol 1:115-123.

Perez, A.F., Boy, C.C, Curelovich, J., Pérez-Barros, P. y Calcagno, J. A. 2013. Relationship between energy allocation and gametogenesis in *Aulacomya atra* (Bivalvia: Mytilidae) in a sub-Antarctic environment. Revista de biología marina y oceanografía, 48: 459-469.

Perillo, G. M. 1979. Calculo del volumen de sedimentos de la playa frontal en el área de Punta Médanos, provincia de Buenos Aires. Acta oceanográfica Argentina, 2:31-55.

Petes, L.E., Menge, B.A. y Harris, A.L. 2008. Intertidal mussel's exhibit energetic trade-offs between reproduction and stress resistance. Ecological monographs, 78: 387-402.

Petes, L.E., Menge, B.A. y Murphy, G.D. 2007. Environmental stress decreases survival, growth, and reproduction in New Zealand mussels. Journal of experimental marine biology and ecology, 351: 83-91.

Petridis, P., Jha, A.N. y Langston, W.J. 2009. Measurements of the genotoxic potential of (xeno-) oestrogens in the bivalve mollusc *Scorbicularia plana*, using the Comet assay. *Aquatic toxicology*, 94: 8–15.

Piola, A.R. y Rivas, A.L. 1997. Corrientes en la plataforma continental. En: *El mar argentino y sus recursos pesqueros*, I: 119–132.

Pipe, R.K. 1987a. Ultrastructural and cytochemical study on interactions between nutrient storage cells and gametogenesis in the mussel *Mytilus edulis*. *Marine biology*, 96: 519–528.

Pipe, R. K. 1987b. Oogenesis in the marine mussel *Mytilus edulis*: an ultrastructural study. *Marine biology*, 95: 405–414.

Podgurskaya, O. V., y Kavun, V. Y. 2012. Assessment of the adaptation capabilities of the bivalves *Modiolus modiolus* (Linnaeus, 1758) and *Crenomytilus grayanus* (Dunker, 1853) under increased levels of heavy metals in the environment. *Russian journal of marine biology*, 38: 188-196.

Popham, J.D. 1979. Comparative spermatozoon morphology and bivalve phylogeny. *Malacological review*, 12: 1–20.

Pouvreau, S. y Prasil, V. 2001. Growth of the black-lip pearl oyster, *Pinctada margaritifera*, at nine culture sites of French Polynesia: synthesis of several sampling designs conducted between 1994 and 1999. *Aquatic living resources*, 14: 155–163.

Prado, A.D. 1998. Ciclo Reproductivo de tres poblaciones de *Chione californiensis* Broderip, 1835 (Bivalvia: Veneridae) B.C.S., México. Tesis de Maestría, CICIMAR, La Paz, Baja California Sur, México.

Raven, C.P. 1958. *Morphogenesis: The Analysis of Molluscan Development*. Pergamon Press, Oxford, UK. 311 pp.

Reiss, M. J. 1991. The allometry of growth and reproduction. Cambridge University Press. En Brey, T. 1999. Growth, performance and mortality in aquatic macrobenthic invertebrates. *Advances in marine biology*, 35:153–223.

Reunov, A.A. y Hodgson, A.N. 1994. Ultrastructure of the spermatozoa of five species of South Africa bivalves (Mollusca), and an examination of early spermatogenesis. *Journal of morphology*, 219: 275–283.

Reunov, A.A., Au, D.T. y Wu, R.S.S. 1999. Spermatogenesis of the green-lipped *Perna viridis* with dual patterns of acrosome and tail development in spermatids. Helgoland marine research, 53: 62–69.

Riascos, J., Guzman, N., Laudien, J., Heilmayer, O., y Oliva, M. 2007. Suitability of three stains to mark shells of *Concholepas concholepas* (Gastropoda) and *Mesodesma donacium* (Bivalvia). Journal of shellfish research, 20: 43–49.

Richardson, C.A. 2001. Molluscs as archives of environmental change. Oceanography and marine biology: an annual review, 39: 103–164.

Richardson, C.A., Collins, S.A., Ekaratne, K., Dare, P. y Key, D. 1993. The age determination and growth rate of the European flat oyster, *Ostrea edulis*, in British waters determined from acetate peels of umbo growth lines. ICES Journal of marine science, 50: 493–500.

Richardson, C.A., Kennedy, H., Duarte, C.M., Kennedy, D.P. y Proud, S.V. 1999. Age and growth of the fan mussel *Pinna nobilis* from south-east Spanish Mediterranean seagrass (*Posidonia oceanica*) meadows. Marine biology, 133: 205–212.

Richardson, C.A., Seed, R. y Naylor, E. 1990. Use of internal growth bands for measuring individual and population growth rates in *Mytilus edulis* from offshore production platforms. Marine ecology progress series, 66: 259– 265.

Ríos, E.C. 2009. Compendium of Brazilian sea shells. Evangraf, Rio Grande, RS 676 pp.

Roa, R., Ernst, B., y tapia, F. 1999. Estimation of size at sexula maturity: an evaluation of analytical and resampling procedures. Fishery bulletin, 97: 570– 580.

Rocha, E. y Azevedo, C. 1990. Ultrastructural study of the spermatogenesis of *Anodonta cygnea* L. (Bivalvia, Unionidae). Invertebrate reproduction and development, 18: 169–176.

Rodríguez- Moscoso, E. y Arnaiz, R. 1998. Gametogenesis and energy storage in a population of the grooved carpet-shell clam, *Tapes decussatus* (Linné, 1787), in northwest Spain. Aquaculture, 162: 125–139.

Romo Piñera, A. K., Ceballos-Vázquez, B.P., García-Domínguez, F. y Arellano-Martínez, M. 2009. Unusual high frequency of hermaphroditism in the gonochoric bivalve

*Megapitaria squalida* (Sowerby, 1835) (Veneridae). Journal of shellfish research, 28: 785–789.

Sar, E.A., Sunesen, I., Lavigne, A.S. y Goya, A. B. 2010. Dinophysis spp. asociadas a detección de toxinas diarreicas (DSTs) en moluscos y a intoxicación diarreica en humanos (Provincia de Buenos Aires, Argentina). Revista de biología marina y oceanografía, 45: 451–460.

Sastry, A.N. 1979. Pelecypoda (excluding Ostreidae). In: Reproduction of Marine Invertebrates, Vol. 5. Mollusks: Pelecypods and Lesser Classes. Giese AC & Pearse JS, eds., pp. 113–292. Academic Press, New York, NY, USA.

Sastry, A.N. 1983. Ecological aspects of reproduction. En: Bliss, D. (Ed). The biology of crustacean. Academic press, New York, 8: 179–269.

Scelzo, M.A., Elías, R., Vallarino, E.A., Charrier, M., Lucero, N. y Alvarez, F. 1996. Variación estacional de la estructura comunitaria del bivalvo intermareal *Brachidontes rodriguezii* (D'Orbigny, 1846) en sustratos artificiales (Mar del Plata, Argentina). Neritica, 10: 87–102.

Schmidt, W., Power, E. y Quinn, B. 2013. Seasonal variations of biomarker responses in the marine blue mussel (*Mytilus spp.*). Marine pollution bulletin, 74: 50–55.

Seed, R. y Suchanek, T.H. 1992. Population and community ecology of *Mytilus*. In Gosling, E. (ed.), The Mussel *Mytilus*: Ecology, Physiology, Genetics and Culture. Developments in aquaculture and fisheries science, 25: 87–170.

Servicio de Hidrografía Naval (tablas de mareas años 2011- 2013)  
[http://www.hidro.gov.ar/oceanografia/Tmareas/Form\\_Tmareas.asp](http://www.hidro.gov.ar/oceanografia/Tmareas/Form_Tmareas.asp)

Servicio Meteorológico Nacional, 2003. Estadísticas Climatológicas 91-00. Serie B, N°6, Fuerzas Armadas Argentinas, 148 pp.

Sokal, R.R y Rohlf, F.J. 1995. Biometry. The principles and practices of statistics in biological research. State University of New York, New York.

Soldati, A.L., Jacob, D.E., Schöne, B.R., Bianchi, M. M. y Hajduk, A. 2008. Seasonal periodicity of growth and composition. In valves of *Diplodon chilensis patagonicus* (D'Orbigny, 1835). Journal of molluscan studies, 75: 75–85.

Sousa, M. y Oliveira, E. 1994. An ultrastructural study of *Crassostrea angulata* (Mollusca, Bivalvia) spermatogenesis. *Marine biology*, 120: 545–551.

Sousa, M., Corral, L. y Azevedo, C. 1989. Ultrastructural and cytochemical study of spermatogenesis in *Scrobicularia plana* (Mollusca, Bivalvia). *Gamete research*, 24: 393–401.

Stearns, S. 1992. *The evolution of life histories*. Oxford University Press, New York.

Steele, S. y Mulcahy, M. F. 1999. Gametogenesis of the oyster *Crassostrea gigas* in southern Ireland. *Journal of the marine biological association of the United Kingdom*, 79: 673–686.

Suárez, M.P., Alvarez, C., Molist, P. y San Juan, F. 2005. Particular aspects of gonadal cycle and seasonal distribution of gametogenic stages of *Mytilus galloprovincialis* cultured in the estuary of Vigo. *Journal of shellfish research*, 26: 531–540.

Suárez Alonso, P., Álvarez González, C., Molist García, P. y San Juan, F. 2007. Atresia gonadal durante el ciclo gametogénico de *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819 cultivado en la ría de Vigo (noroeste de la península Ibérica). *Boletín, Instituto Español de oceanografía*, 23: 3–10.

Sunila, I. 1981. Reproduction of *Mytilus edulis* L. (Bivalvia) in a brakish water area, the Gulf of Finland. *Annales zoologici fennici*, 18: 121–128.

Tada, Y., Fujikura, K., Oguri, K., Kitazato, H. y Tanabe, K. 2010. In situ fluorochrome calcein marking of deep-sea molluscs using a new growth chamber. *Aquatic ecology*, 44: 217–222.

Teso, S.V. y Penchaszadeh, P.E. 2009. Beach filling and imposex in *Olivancillaria deshayesiana* (Mollusca: Gastropoda: Olividae) from the coast of Mar del Plata, Argentina. *Journal of the marine biological association of the United Kingdom*, 89: 557–562.

Thielley, M., Weppe, M. y Herbaut, C. 1993. Ultrastructural study of gametogenesis in the French Polynesian black pearl oyster *Pinctada margaritifera* (Mollusca, Bivalvia). *Journal of shellfish research*, 12: 41–47.

Thompson, I. 1975. Biological clocks and shell growth in bivalves. En: *Growth rhythms and the history of the Earth's rotation: interdisciplinary winter conference on biological clocks and changes in the Earth's rotation: geophysical and astronomical*

consequences. Rosenberg, G.D. y Runcorn, S. (Eds) pp. 149–161. John Wiley & Sons, Londres.

Todd, C.D. 1985. Reproductive strategies of north-temperate rocky shore invertebrates. In: The ecology of rocky coasts. Moore P.G. y Seed R. (Eds) pp. 203–219. Hodder and Stoughton, London.

Toro, J.E., Thompson, R.L. e Innes, D.J. 2002. Reproductive isolation and reproductive output in two sympatric mussel species (*Mytilus edulis*, *M. trossulus*) and their hybrids from Newfoundland. *Marine biology*, 141: 897–909.

Torroglosa, M.E. y Giménez, J. 2010. Temporal variation in size at maturity of the snail *Zidona dufresnei* from the Southwestern Atlantic Ocean after ten years of fishery exploitation. *Aquatic biology*, 11: 163–167.

Torroglosa, M.E. y Giménez, J. (En prensa). Sperm ultrastructure in two species of *Brachidontes* (Bivalvia, Mytilidae) from the Southwestern Atlantic Ocean. *Journal of marine biological association of United Kingdom*, 1-8. doi:10.1017/S0025315415000028.

Trevisan, R., Delapiedra, G., Mello, D.F., Arla, M., Schmidt, E.C., Meder, F., Monopoli, M., Cargnin-Ferreirad, E., Bouzon, Z.L., Fishere, A. S., Sheehan, D. y Dafre, A.L. 2014. Gills are an initial target of zinc oxide nanoparticles in oysters *Crassostrea gigas*, leading to mitochondrial disruption and oxidativestress. *Aquatic toxicology*, 153: 27–38.

Trovant, B, Ruzzante, D.E., Basso, N.G., y Orenzans, J.M. 2013. Distincness, phylogenetic relations and biogeography of intertidal mussels (*Brachidontes*, *Mytilidae*) from south-western Atlantic. *Journal of the marine biological association of the United Kingdom*, 93: 1843–1855.

Vallarino, E.A., Rivero, M.S., Gravina, M.C y Elías, R. 2002. The community-level response to sewage impact in intertidal mytilid beds of the Southwestern Atlantic and the use of the Shannon index to assess pollution. *Revista de biología marina y oceanografía*, 37: 25–33.

Van der Molen, S., Márquez, F., Idaszkin, Y.L. y Adami, M. 2012. Use of shell-shape to discriminate between *Brachidontes rodriguezii* and *Brachidontes purpuratus* species (Mytilidae) in the transition zone of their distributions (south-western Atlantic). *Journal of the marine biological association of the United Kingdom*, 93: 803–808.

Vaschenko, M.A., Hsieh, H.L. y Radashevsky, V.I. 2013. Gonadal state of the oyster *Crassostrea angulata* cultivated in Taiwan. *Journal of shellfish research*, 32: 471–482.

Vailati, G., Bacchetta, R. y Mantecca, P. 2001. Sexual maturity in young *Dreissena polymorpha* from Lake Como (N. Italy). *Invertebrate reproduction and development*, 40: 181–192.

Vélez-Arellano, N., Shibayama, M., Ortíz-Ordoñez, E., Silva-Olivares, A., Arellano-Martínez, M. y García-Domínguez, F. 2014. Histological description of oogenesis in *Chiton virgulatus* (Mollusca: Polyplacophora). *International journal of morphology*, 32: 608–613.

Villalba, A. 1995. Gametogenic cycle of cultured mussel, *Mytilus galloprovincialis*, in the bays of Galicia (N.W. Spain). *Aquaculture*, 130: 269–277.

Vinuesa, J.H. 1981. El ciclo sexual del mejillín patagónico *Brachydontes purpuratus* (Lmk.) en Puerto Deseado. *Physis*, 39: 1-10.

Violante, R. A. 1990. El sistema de barrera litoral – llanura costera del Pleistoceno superior en el sector comprendido entre Villa Gesell y la laguna de Mar Chiquita, Pcia de Buenos Aires. Tercera Reunión Argentina de Sedimentología, San Juan, 270–275

Walker, M.H. y MacGregor, H.C. 1968. Spermatogenesis and the structure of the mature sperm in *Nucella lapillus*. *Journal of cell science*, 3: 95–104.

Wilson, C.W., Beckman, D.W. y Dean, J.M. 1987. Calcein as a fluorescent marker of otoliths of larval and juvenile fish. *Transactions of the American fisheries society*, 116: 668– 670.

Yurchenko, O.V. y Vaschenko, M.A. 2010. Morphology of spermatogenic and accessory cells in the mussel *Modiolus kurilensis* under environmental pollution. *Marine environmental research*, 70: 171–180.

## 10. Apéndice

### *Fijador*

Solución de Bouin:

- 70 ml de solución acuosa saturada de ácido pícrico
- 25 ml de formaldehído 40 %
- 5 ml de ácido acético glacial

*Deshidratación del material incluido en parafina.*

Etanol 70° luego de la solución de Bouin.

Etanol 80° durante una noche.

Etanol 96° durante 1 hora

Etanol 96° durante 1 hora

Etanol 100° durante 1 hora.

Aclarado en xilol durante 5 minutos.

Parafina (Histoplast) dos cambios de dos horas cada uno.

*Coloración aplicada a material incluido en parafina.*

### *Hematoxilina-Eosina*

1) Desparafinado en xilol durante 5 minutos sumergido.

- a) Secar al aire.
- b) Alcohol 96%, 1 minuto.
- c) Alcohol 80%, 1 minuto.
- d) Alcohol 70%, 1 minuto.
- e) Alcohol 50%, 1 minuto.
- f) Agua destilada, por 1 minuto.

2) Coloración

- a) Hematoxilina de Carazzi por 8 minutos.
- b) Viraje en agua común hasta que tome color violeta.
- c) Eosina alcohólica 0,25% (en alcohol 70%) durante 3 minutos.

3) Deshidratación y montaje

- a) Alcohol 96%, pasaje rápido.
- b) Alcohol 100%, pasaje rápido.
- c) Xilol durante 3 minutos.
- d) Bálsamo de Canadá sintético.

*Coloración aplicada a material incluido en resina.*

*Hematoxilina-Eosina*

1) Hidratar con agua destilada 10 minutos.

2) Coloración

a) Hematoxilina de Carazzi por 15 minutos.

b) Viraje en agua común hasta que tome color violeta.

c) Eosina alcohólica 0.25% (en alcohol 70%) por 5 minutos.

3) Deshidratar y montar

a) Pasaje rápido por alcohol 70%.

b) Alcohol 96% pasaje rápido.

c) Secar.

e) Bálsamo de Canadá sintético.

Resultados de la coloración: Núcleos: violetas y citoplasma: rojizo. La hematoxilina colorea los núcleos. Las sustancias coloreadas con la hematoxilina se denominan basófilas, dado que la hematoxilina un colorante alcalino. La eosina colorea el citoplasma (coloración de fondo). Las sustancias que toman el color de la eosina se llaman acidófilas por ser éste un colorante ácido.

## 11. Trabajos relacionados con esta tesis

**Torroglosa, M.E.** y Giménez, J. 2015. Spermatogenesis and sperm ultrastructure in *Brachidontes rodriguezii* (d'Orbigny, 1846) and *Brachidontes purpuratus* (Lamarck, 1819) (Mytilidae, Bivalvia). Journal of Marine Biological Association of United Kingdom, 1-8. doi:10.1017/S0025315415000028.

### Congresos

7<sup>th</sup> Congress of the European Malacological Societies. 7-11 de septiembre de 2014, Cambridge, Reino Unido. Reproductive seasonality and histochemical profile in *Brachidontes rodriguezii* (d'Orbigny, 1846) from southwestern Atlantic Ocean  
**Torroglosa, M.E.**, Ojeda, M, Di Stefano, V. y Giménez, J.. Participación: Panel.

Encuentro de las Américas,: Sociedad de Malacología de México, Asociación Latinoamericana de Malacología, American Malacological Society y Western Society of Malacologists. 22-27 de Junio de 2014, México D.F, México. Use of the fluorochrome calcein as an in situ growth marker in *Brachidontes rodriguezii* (d'Orbigny, 1846).  
**Torroglosa, M. E.**, Ojeda, M. y Giménez, J. Participación: Panel

XXIII Encontro Brasileiro de Malacologia, Rio de Janeiro, Brasil. 21-25 de Octubre de 2013. Caracterización de la glándula digestiva en *Brachidontes rodriguezii* y *Siphonaria lessoni* en la costa Bonaerense. Alteraciones por contaminantes. **Torroglosa M. E.**, Arrighetti, F., Knack de Almeida, H. y Giménez, J. Participación: Orador

78<sup>th</sup> American Malacological Society, Cherry hill, New Jersey, USA. 16-21 de Junio de 2012. Spermatozoa morphology of *Brachidontes rodriguezii* (d'Orbigny, 1846) (Bivalvia) from South western Atlantic Ocean. **Torroglosa, M. E.** y Giménez, J. Participación: Panel

78<sup>th</sup> American Malacological Society, Cherry hill, New Jersey, USA. 16-21 de Junio de 2012. Spawn and larval development in *Siphonaria lessoni* (Siphonaridae: Gastropoda) from Buenos Aires, Argentina. Ojeda, M., **Torroglosa, M. E.** y Giménez, J. Participación: Panel