

Identificación del sexo y morfología de gametos de la lapa *Fissurella crassa* Lamarck, 1822 (Mollusca: Archaeogastropoda)

Sex identification and morphology of gametes in the keyhole limpet *Fissurella crassa* Lamarck, 1822 (Mollusca: Archaeogastropoda)

Laura Huaquín¹; Rosa Guerra² y Marta Bretos³

¹ Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, Casilla 2 Correo 15, Santiago, Chile
lhuaquin@abello.dic.uchile.cl

² Departamento de Biología, Universidad de Valparaíso.

³ Facultad de Medicina, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

RESUMEN

Fissurella crassa es un arqueogastropodo que habita en el intermareal de la costa oeste de América del Sur. Es una de las 10 especies que se comercializan y exportan en Chile. Las posibilidades de desarrollo de tecnologías de cultivo de estas especies se incrementarán a futuro en la medida que se maneje el proceso de obtención de gametos en condiciones controladas. *F. crassa* no presenta dimorfismo sexual externo, así, las técnicas para reconocer el sexo son de interés. Se presenta un método para la identificación del sexo y se realiza un análisis morfológico de los gametos por medio de microscopía óptica, electrónica de transmisión y de barrido. Los gametos fueron obtenidos por: 1) succión directa desde las gónadas, estas muestras se observaron al microscopio de luz, lo que permitió una rápida identificación del sexo de los individuos. 2) Por inyección intravisceral de KCl, la evacuación de gametos ocurrió alrededor de 15 minutos después de efectuada la inyección. Los ovocitos de *F. crassa* presentan coloración verde oscura, con un diámetro promedio (n=125) de $317,04 \pm 31,36 \mu\text{m}$. En ellos se destacan la vesícula germinativa grande con un conspicuo nucléolo. La matriz citoplasmática presenta una gran cantidad de gránulos de vitelo y una gruesa cubierta externa de gelatina. Los espermatozoides son del tipo primitivo, su cabeza es cónica, el núcleo de forma cilíndrica y cromatina compacta. El acrosoma formado por una vesícula acrosomal simple se encuentra en el extremo apical de la región cefálica. La pieza intermedia contiene un collar de seis mitocondrias piramidales en la fosa basal del núcleo, lugar desde donde emerge el filamento axial del flagelo. Los rasgos morfológicos generales de los gametos de *F. crassa* son comparables a los de otras especies de arqueogastropodos.

Palabras clave: fisurelas, sexualidad, morfología de gametos, Chile

ABSTRACT

Fissurella crassa is an archaeogastropod that occurs at the intertidal western coast of south America. This is one of the ten exportable fissurellid resources from Chile. Keyhole limpet culture could be improved if viable gametes can be obtained under controlled conditions. *F. crassa* shows no external sexual dimorphism. Therefore, attempts to develop techniques to distinguish the sex are of great interest. We present a method for sexual identification at reproductive season and the morphological analysis of the gametes by using light, scanning and transmission electron microscopy. Gametes were obtained: 1) By direct suction from the gonads, and these samples were observed under a light microscope; this permitted a quick sex determination. 2) By intravisceral injection of KCl, gamete emission occurred 15 minutes after the injection. The deep green pigmented oocytes of *F. crassa* enveloped with the jelly coat measure $317.04 \pm 31.36 \mu\text{m}$ in diameter (n=125). The large germinative vesicle occupies a polar position in the cytoplasm, which is heavily loaded with granules of vitellogenic compounds. A thick gelatinous jelly coat envelopes externally the oocyte. The spermatozoa are of the primitive type with a conical shaped head, the nucleus is cylindrical with compacted chromatin, a small and simple acrosomal vesicle on the apical front of the cephalic region. The midpiece contains a collar of six pyramidal mitochondria in the basal fosa of the nucleus from where the flagellar axial filament emerges. The general gamete morphological traits of *F. crassa* are like other members of the archaeogastropod species.

Key words: keyhole limpet, sex, gamete morphology, Chile.

INTRODUCCION

Se reconoce que los moluscos han formado parte de la dieta de los pueblos costeros del Pacífico Sur desde tiempos prehistóricos (Bretos 1988). Las lapas o chaperines, nombre vernacular que se da a las especies del género *Fissurella* Bruguière 1789, se cuentan entre los gastrópodos de consumo habitual en las áreas costeras. No obstante, en las estadísticas pesqueras del Servicio Nacional de Pesca (SERNAP) de Chile se registra este grupo sólo desde 1978. Las capturas de lapas se han incrementado con el tiempo, alcanzando un máximo de 6.034 toneladas en 1993 (SERNAP 1997). A partir de esta fecha se ha producido un preocupante descenso en los desembarques de esta pesquería artesanal, que involucra a 10 especies (Bretos 1988, Oliva & Castilla 1992). Las lapas han llegado a ocupar un cierto grado de importancia en las exportaciones chilenas, lo cual ha motivado la implantación de un tamaño mínimo de extracción para protegerlas (Resolución 248/1996, Ministerio de Economía, Fomento y Reconstrucción) y ha despertado interés en desarrollar su cultivo.

Con este propósito se ha escogido a *Fissurella crassa*, conocida como "lapa de sol" en el norte de Chile (Bretos 1978) o "lapa ocho" en la zona central y sur del país. Es una especie bentónica intermareal (Bretos 1988, Pino *et al.* 1994) que habita desde Huarmey en Perú (10°6'S) (McLean 1984) hasta Punta de Tralca de la isla de Chiloé, en Chile (42°8'S) (Oliva & Castilla 1992). Los mismos autores describen la concha de *F. crassa* como lisa, de color pardo, con costillas primarias muy suaves y separadas y líneas de crecimiento concéntricas prominentes. Tiene margen angosto, plano e intensamente pigmentado.

Las lapas son especies dioicas, sin dimorfismo sexual externo, provistas de una sola gónada. Los estudios sobre su reproducción en el litoral de Chile han revelado que se encuentran individuos que pueden evacuar

gametos durante casi todo el año, y que sus poblaciones presentan dos desoves importantes en un año¹. Esto se refiere a *Fissurella cumingi*², *F. maxima*³ (Bretos *et al.* 1983) *F. picta* (Bretos *et al.* 1988a), *F. nigra* (Bretos *et al.* 1988b) y *F. pulchra* (Bretos & Chihuailaf 1993). Sin embargo, no hay antecedentes bibliográficos publicados sobre los procesos reproductivos, exceptuando comunicaciones a congresos en especies afines⁴, ni estudios sobre la morfología de los gametos de *F. crassa*. El conocimiento morfofisiológico de los gametos y el control de los procesos reproductivos son condiciones fundamentales entre otras, para el manejo sostenido de las especies, y el desarrollo de procedimientos de cultivo de ellas.

Con la finalidad de sentar bases para el cultivo de *F. crassa*, se presenta en este trabajo un método para sexar los animales, procedimientos de extracción de gametos, morfología de éstos y determinación de épocas de madurez gonadal. Se agregan algunos aspectos que complementan la descripción de la morfología externa de la especie.

¹ Bretos M. 1996. Reproductive biology in fissurellid prosobranch resources. Proceedings of the IV ICMAM J. Med. & Applied Malacol. 8: 56.

² Bretos M. 1979. Aspectos poblacionales y reproductivos de *Fissurella cumingi* en Iquique. Resúmenes de la XXII Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Chile, Arch. Biol. Med. Exp. 12: 499.

³ Osorio C. 1986. Estudios biológicos de *Fissurella maxima* Sowerby 1835 en Chile. Resúmenes del X Congreso Latinoamericano de Zoología, Viña del Mar, Chile, p. 498.

⁴ Brown D., LR Durán, G Collado & C Betancourt. 1997. Ciclo reproductivo de las "lapas" *Fissurella latimarginata* y *F. cumingi* (Mollusca, Archaeogastropoda) en Punta Coloso (II Región) y Los Vilos (IV Región). XVII Jornadas de Ciencias del Mar, Santiago, Chile. Resumen:84-85.

MATERIALES Y METODOS

Se recolectaron mensualmente entre 20 y 38 ejemplares de *Fissurella crassa* (Fig. 1) mayores de 45 mm de longitud de la concha, en la caleta de Montemar, sector Punta Lobos (32° 56'S, 71° 32' W). Los animales obtenidos entre abril de 1994 y septiembre de 1995 se emplearon principalmente para estimar el estado de madurez gonadal a lo largo del año, mediante el cálculo del Índice Gonado somático (IGS). En el laboratorio, se determinó el peso fresco total, de las partes blandas y de

la gónada de cada ejemplar, usando una balanza Chyo MK-500C con precisión de 0,01 g. Se calculó el IGS de cada individuo, que consiste en el valor porcentual de la gónada respecto al peso corporal blando, de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{IGS} = \frac{\text{Peso de la gónada}}{\text{Peso corporal blando}} \times 100$$

Se calculó el IGS mensual para cada sexo separadamente.



Figura 1. *Fissurella crassa* (Lamarck), conocida como "lapa ocho", especie bentónica que habita la zona intermareal, frente a las costas de Perú y Chile. Presenta el manto extendido rodeando el borde de la concha. Sobre ella se observa *Scurria parasitica* como epibionte.

Figure 1. *Fissurella crassa* Lamarck, locally known as "lapa eight", is a benthic species living at the intertidal zone of the coasts of Chile and Peru. The mantle is spread over the borders of the shell. *Scurria parasitica* is a frequent epibiont found over the shell of this species.

Las temperaturas del agua de mar superficial en la zona de muestreo, corresponden a datos proporcionados por el Instituto de Oceanología de la Universidad de Valparaíso.

Ejemplares de *F. crassa* capturados entre diciembre de 1994 y septiembre de 1996 se destinaron principalmente a procesos experimentales y estudio morfológico de los gametos. Fueron transportados en cámaras húmedas al Laboratorio de Recursos Acuáticos del Departamento de Ciencias Biológicas Animales de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Chile en Santiago y colocados en acuarios de 40 l, mantenidos con agua en constante circulación y aireación, a temperatura ambiente durante 24 a 48 horas. La temperatura del agua en el laboratorio fluctuó entre 14°C y 16°C durante los meses de otoño, invierno e inicio de primavera y entre 17°C y 22°C a fines de primavera y verano. La alimentación se efectuó con *Ulva lactuca f. lacinulata* y *Mazzaella laminarioides* traídas desde la misma caleta, teniendo como antecedente que *F. crassa* se

alimenta de *Ulva lactuca* en el litoral del norte de Chile (Bretos 1978).

Con la finalidad de reconocer el sexo de cada ejemplar se ensayó la punción directa a la gónada o biopsia gonadal (Fig.2), con una aguja hipodérmica N° 18 en una jeringa conteniendo 0,2 ml de agua de mar filtrada, adicionada con antibióticos (penicilina sódica: 60 mg/l y estreptomicina: 50 mg/l). Se insertó la aguja en el sector medio del pie, dirigido hacia posterior, de modo de alcanzar la gónada, situada por debajo del resto de las vísceras, directamente bajo la glándula digestiva y sobre el área interna de la masa muscular del pie. Se succionó suavemente un poco de tejido gonádico que fue recogido en el agua de mar de la jeringa. La observación de la muestra *in vivo* se realizó en un microscopio Leitz Ortholux, para reconocer el tipo de gametos. Los gametos se midieron en microscopio óptico Leitz con contraste de fase y ocular micrométrico Leitz 10x para los ovocitos y 100x para los espermatozoides.

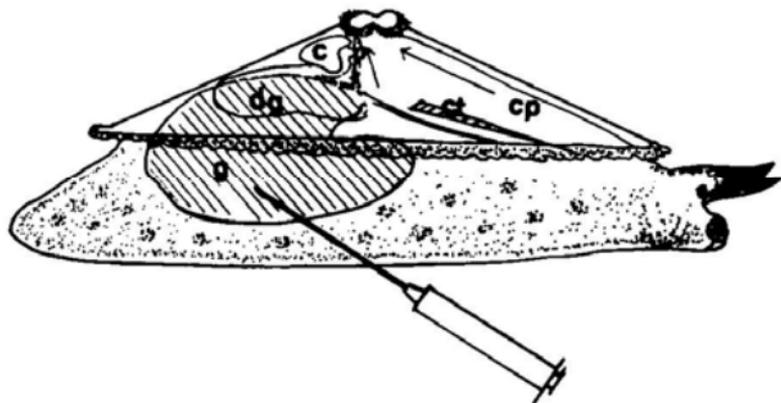


Figura 2. Dibujo esquemático de *F. crassa* señalando el lugar donde se realiza la punción transpedal para alcanzar la gónada (g), y obtener la muestra de tejido que permite reconocer el sexo. c: corazón; cp: cavidad paleal; ct: ctenidio; dg: glándula digestiva.

Figure 2. Schematic representation of *F. crassa* to show how the transpedal puncion is done to reach the gonad (g) and get a tissue sample to identify the sex. c: heart; cp: paleal cavity; ct: ctenidium; dg: digestive gland.

Posteriormente, los animales puncionados se mantuvieron separados en bandejas plásticas (25 x 45 x 20 cm) con dos litros de agua de mar, en posición inclinada, haciéndose un recambio diario del agua. Esta posición imita las condiciones ambientales naturales, lo cual permite a los animales elegir estar dentro del agua o desplazarse hacia la parte superior sin agua.

Para la emisión de gametos, se realizaron ensayos de inyección de cloruro de potasio (KCl) 0,5 M en volúmenes de 0,2; 0,5; 0,8 y 1,0 ml, siguiendo el protocolo propuesto en la experimentación con crizo de mar (*Hörstadius* 1973). Se colocó posteriormente cada ejemplar en posición invertida, sobre un vaso de precipitado que contenía 2 ml de agua de mar filtrada, con antibióticos (pH 7,4 -7,8) para recibir los gametos evacuados a través del orificio apical. Se utilizó KCl, que es un inductor químico de bajo costo, utilizado por muchos investigadores en diferentes especies, (Harvey 1956, Anderson 1968, Horstadius 1973, Breese & Robinson 1981, Bustos *et al.* 1991, Vega *et al.* 1996).

Para el estudio de los gametos con microscopio óptico se utilizó material fresco y fijado con etanol-acético (3:1). En el caso de los espermatozoides, estos fueron teñidos con Giemsa. Para realizar observaciones con microscopía electrónica de barrido (MEB) y de transmisión (MET), se fijó parte del tejido gonádico obtenido por punción, en solución Karnovski (4% - glutaraldehído/ paraformaldehído, pH 7,4 en agua de mar filtrada) por dos horas, a temperatura ambiente, luego del lavado en buffer, se postfijó en tetróxido de Osmio 1%. La deshidratación se realizó en una serie de etanol en concentraciones ascendentes y acetona. El material para MET fue embebido en Epon 812 y los cortes ultrafinos obtenidos en ultramicrotomo Reichert Ultracut®, fueron contrastados con acetato de uranio y citrato de plomo.

La observación y microfotografías fueron realizadas en un microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM 900. Para MEB, luego de la deshidratación, se realizó secado en punto crítico con CO₂, sombreado con oro (200 Å) en un equipo Polaron E 5000 y observados en el microscopio Philips 300 con unidad de scanning y un Autoscan Siemens.

RESULTADOS Y DISCUSION

De los 746 ejemplares recolectados de *F. crassa*, hembras, machos e individuos sexualmente indeterminados, de tamaños que fluctuaron entre 45,0 mm y 96,1 mm de longitud de la concha, se utilizaron 448 para los cálculos de IGS, empleándose la mayor parte del resto de los animales para ensayos de identificación de sexo (Tabla 1).

La observación morfológica de la superficie externa de la concha o de las partes blandas de la especie no ha entregado hasta el momento información que permita diferenciar el sexo. La concha de los ejemplares, tiene un contorno ovalado algo más estrecho hacia adelante y con bordes laterales casi paralelos, es delgada, baja o de mediana altura. La presencia del orificio apical grande, en forma de ocho, es una de las características sobresalientes de *F. crassa*, a la cual debe su nominación vernacular. La superficie dorsal de color castaño a pardo es lisa, con costillas primarias suaves y separadas más notorias hacia la periferia, y mostrando anillos de crecimiento concéntricos. La superficie ventral de la concha revela una franja de color violeta rojizo de intensidad variable, provista de arrugas o surcos radiales irregulares, situada entre el callo apical y la inserción muscular del pie. Esto constituye un rasgo privativo de *F. crassa*. El margen periférico es angosto, del mismo color de la superficie dorsal, y el borde crenulado se refleja hacia arriba.

El pie muscular, de tegumento muy pigmentado, sobresale de la concha especial-

mente en su región posterior y ostenta numerosas formaciones verrucosas (mamelones) de diferentes tamaños con ápices blanquecinos. El borde del manto es ancho, festoneado de grandes papilas dorsales, que presentan bandas alternadas claras y oscuras

(Fig. 1). Las papilas del manto se proyectan también a nivel de ambos extremos del foramen apical. Más del 95% de los individuos de esta especie presentan como epibionte sobre la concha a *Scurria parasitica* (Orbigny 1841).

Tabla 1. Tamaño de la muestra mensual de *Fissurella crassa*, número ejemplares hembras, machos e indeterminados utilizados en determinaciones de IGS, para los ensayos de tipo experimental y estudios morfológicos, entre abril de 1994 y septiembre de 1996.

Table 1. Monthly sample size of *Fissurella crassa*, number of females, males and sexual indeterminate specimens used in gonadosomatic index (IGS) determinations, experimental and morphological studies, between April 1994 and September 1996.

Fecha	Determinación IGS			Experimentación y Morfología			Muestra Total
	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Indeterminados		
20/04/94	19	11	0	0	0	0	30
14/05/94	32	4	0	0	0	0	36
20/06/94	10	18	2	2	0	0	32
18/07/94	13	17	0	0	0	0	30
22/08/94	18	11	0	0	0	0	29
30/09/94	15	9	0	0	0	0	24
22/10/94	11	10	0	0	0	0	21
29/12/94	10	10	3	5	0	0	28
24/01/95	14	12	3	3	0	0	32
28/02/95	12	11	4	6	0	0	33
27/03/95	12	9	6	3	0	0	30
24/04/95	10	10	10	8	0	0	38
17/05/95	8	12	1	3	4	0	28
28/06/95	12	18	1	1	0	0	32
20/07/95	18	10	2	3	1	0	34
22/08/95	19	10	2	0	0	0	31
20/09/95	16	17	1	2	2	0	38
21/11/95	0	0	11	19	0	0	30
19/12/95	0	0	15	21	0	0	36
16/01/96	0	0	13	17	0	0	30
25/03/96	0	0	5	10	5	0	20
24/05/96	0	0	10	15	3	0	28
30/07/96	0	0	14	14	1	0	29
21/08/96	0	0	10	14	0	0	24
03/09/96	0	0	12	9	2	0	23
	249	199	125	155	18	0	746

Entre las especies de lapas de importancia económica, *F. crassa* posee la concha más liviana (Oliva & Castilla 1992), con la excepción de *F. pulchra* (Bretos & Chihuilaf 1990). Del mismo modo, *F. crassa* tiene el pie muscular más pesado, dentro de su rango de tamaño (Oliva & Castilla 1992), resultando ser la especie con mayor rendimiento económico debido a estos caracteres, entre otros.

Al igual que las otras especies de su género, *Fissurella crassa* presenta fecundación

externa, hecho que facilitaría el control de los procesos reproductivos, especialmente aquel relacionado con la unión de los gametos. La mayoría de las especies de moluscos marinos que se cultivan en el mundo, tienen fecundación externa. Esta especie, como muchas otras, no presenta un dimorfismo sexual que permita reconocer externamente el sexo, siendo ésta una de las limitantes iniciales para desarrollar estudios tanto a nivel de investigación básica como aplicada. Los muestreos necesariamente deben realizarse capturando un mayor número

de especímenes si se desea tener una buena muestra de ejemplares de uno de los dos sexos en especial.

A través del análisis de tejido gonadal por punción transpedal o de biopsia gonadal (Fig. 2), se realizó el reconocimiento del sexo de los ejemplares de *F. crassa* por observación directa de la coloración del tejido obtenido y luego su confirmación por observación de los gametos al microscopio óptico. El contenido de la muestra en la jeringa nos puede indicar, por su color, el tipo de gameto que está incluido en la solución. Si es verde se trata de ovocitos, puesto que éstos son intensamente pigmentados, por lo tanto el animal en cuestión es una hembra. Si la muestra es amarilla y opalescente, se trata de un macho. Esta técnica es sencilla y rápida; junto con ello se mantiene la viabilidad de los animales, entre 5 días hasta un mes, en condiciones controladas de temperatura, cambios de agua diaria, número de ejemplares por cámara y alimento entre otras.

Cualquier método experimental para determinar el sexo, puede alterar de algún modo al animal. Sin embargo, es importante destacar que hay un efecto importante de la temperatura en relación con el estado fisiológico de los animales, vale decir que en momentos en que están bien alimentados y en condiciones de bajas temperaturas entre 9 y 15°C, es mayor la sobrevivencia de los ejemplares en los acuarios. El incremento de temperatura del agua por sobre los 18°C y tiempos prolongados, los afecta, produciéndose mayor mortalidad.

Dobson & Lee (1996), señalan que la determinación del sexo de *Trochus niloticus* para inducción del desove, es extremadamente difícil, sin embargo propusieron un sistema que para ellos es simple y que consiste en hacer un corte en la concha, abriendo una pequeña ventana hasta la parte nacarada, de modo de observar a través de ella el color de la gónada. Este sistema aún nos parece de mayor dificultad y un mayor estrés que el de la

obtención de gametos por punción transpedal.

Las variaciones que presentó el IGS promedio mensual en la población de *F. crassa* estudiada, tanto para hembras como para machos se muestran en la figura 3. Los valores menores de IGS se observaron desde enero a mayo, indicando la ocurrencia de un largo período de reposo reproductivo. Se produce a continuación un aumento notable del IGS promedio, el cual adopta valores elevados que se mantienen entre junio y agosto, hecho que señala la presencia de numerosos especímenes maduros en la población. El descenso detectado en el mes de septiembre es indicativo de un desove parcial. Los IGS promedio más altos se registraron en el mes de octubre, cayendo notoriamente en diciembre, antes de que se inicie el período de reposo. Esta caída del IGS es producto de la evacuación de gametos. Las fluctuaciones observadas avalan la presencia de un patrón rítmico en el cual se detectan dos desoves poblacionales en el año: uno en septiembre y otro en diciembre-enero. No obstante, se encontraron individuos sexualmente maduros durante todo el año, coincidente con lo señalado para *F. cumingi* (2 y 4) para *F. maxima* (3) y para *F. latimarginata* (4).

Por otra parte, Bretos (1978) observó en *F. crassa* de la zona de Iquique (20° 15'S, 70° 8'W), que se producía un descenso importante en la tasa de crecimiento durante diciembre de 1975 y en enero de 1977, hecho que la autora interpretó como correspondiente a un período de desove de verano. Este fenómeno podría ser concordante con el desove detectado en *F. crassa* de caleta Montemar. En la muestra de Iquique, la velocidad de crecimiento permaneció en los niveles más bajos entre julio y septiembre de 1976 (Bretos, 1978), lo cual podría estar relacionado con la canalización de las energías hacia la maduración de las gónadas y su evacuación parcial, si lo comparamos con las variaciones del IGS que se producen en *F. crassa* de caleta de Montemar (Fig. 3).

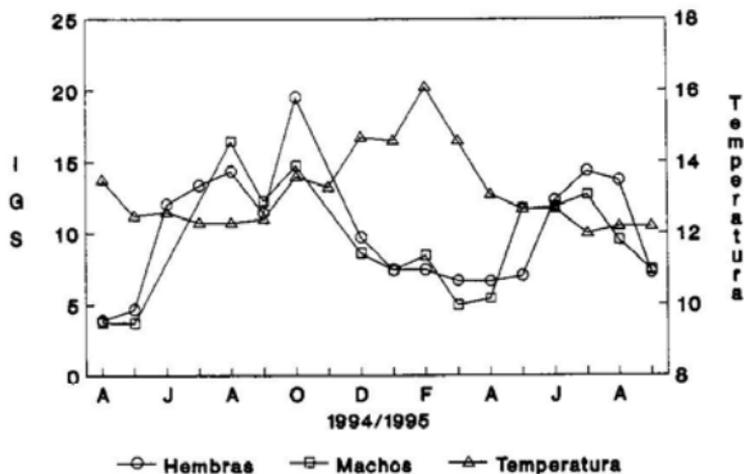


Figura 3. Índice gonadosomático, promedio mensual (IGS) en hembras y machos de *F. crassa* de caleta Montemar, Chile central (32° 56'S, 71° 32'W), relacionados con los promedios mensuales de la temperatura superficial del mar.

Figure 3. Variations in monthly mean gonadosomatic index (IGS) in females and males of *F. crassa* from Montemar cove, Central Chile (32° 56'S, 71° 32'W), and mean monthly sea surface temperature.

En los períodos de mayor desarrollo gonadal poblacional, es posible obtener mejores aciertos identificatorios para *F. crassa*, vale decir cuando los IGS están más altos, y hay mayor cantidad de ejemplares reconocidos como sexualmente maduros. Los animales pequeños, de alrededor de 45 mm de longitud de la concha, muestran en época de reposo gonadal, un IGS que no alcanza al 5%, de modo que es posible que al realizar la inyección transpedal se llegue hasta la glándula digestiva, no acertando adecuadamente a la gónada y por ello dificultándose el reconocimiento del sexo con este método.

La morfología de las gónadas de *F. crassa* tanto en machos como en hembras, es la de un saco con forma acorazonada, desde cuya pared emergen trabéculas de tejido conectivo en dirección a la cavidad o antro gonadal. Sobre ellas se asientan las ovogonias y las espermatogonias, progresando la gametogénesis desde las trabéculas hacia el antro

gonadal⁵, situación que se ha descrito en forma semejante para la estructura del ovario del abalon rojo *Haliotis rufescens* por Martin *et al.* (1983), quienes describieron la presencia de estas trabéculas limitadas por las células del epitelio germinal, que se extienden desde la pared del ovario hacia la pared de la glándula digestiva.

La inyección intravisceral a través del pie, con 0,80 ml de KCl 0,5 M a *F. crassa* promueve la liberación de gametos alrededor de los 15 minutos después de efectuada la

⁵ Bretos, M, J Gutiérrez & A Mauriz. 1988. Organización testicular y espermatogénesis en *Fissurella picta*. XXXI Reunión Anual Soc. Biol. Chile. Arch. Biol. Med. Exptl., 21: R282.

⁶ Bretos, M; P Jara y A Vasconcelos. 1992. Caracterización histológica de la gónada femenina en *Fissurella picta*. XXXV Reunión Anual Soc. Biol. Chile.

inyección y dejados los animales en posición invertida sobre un vaso de precipitado. Hay ejemplares que no liberan gametos con una primera inyección, pero si responden con una segunda dosis. Se recuperan en agua de mar y pueden ser nuevamente inyectados al día siguiente. Los gametos en *F. crassa*, como en la mayoría de los archaeogastropoda descritos en Hyman (1967), fluyen por el nefridioporo derecho hacia la cavidad del manto, emergiendo por el orificio apical o fisura, siendo recogidos en un vaso con agua de mar filtrada, adicionada de antibióticos. A través de la observación microscópica puede confirmarse el sexo gamético, el grado de maduración de los ovocitos y la motilidad espermática. Este método puede ser de utilidad en acuicultura, tanto para identificar el sexo de los ejemplares como un método inductivo para realizar fecundación artificial.

Los ovocitos de *F. crassa*, luego de la emisión en agua de mar, adquieren forma esférica, tienen un diámetro promedio de $228,85 \pm 22,47 \mu\text{m}$ sin envolturas, y de $317,04 \pm 31,36 \mu\text{m}$ con la envoltura gelatinosa ($n = 125$, provenientes de 5 hembras). La vesícula germinativa (núcleo celular) (vg) es visible en algunos ovocitos desplazada hacia un polo como se muestra en la microfotografía tomada de ovocitos *in vivo* y observada con microscopía de contraste de fase (Fig. 4A). Externamente a la membrana plasmática (ovolema), se diferencia una lámina denominada cubierta o membrana vitelina (mv) y alrededor de ella, una gruesa cubierta translúcida de gelatina ("jelly coat") (cg) de $44,08 \pm 11,78 \mu\text{m}$ de grosor. Esta última cubierta observada con mayor aumento revela una gran cantidad de estructuraciones granulares dispuestas a intervalos regulares (Fig. 4B) y dispersos en toda su área, con MET (Fig. 4C) se aprecia un material fibrilar electrodensito. Finalmente se observa un límite

periférico notorio (k) (Fig. 4A). La ultraestructura con MET (Fig. 4D) revela la existencia de una tercera cubierta que constituye el borde o límite periférico del ovocito (k), éste se presenta filamentosos y de notable densidad (flecha), con una interrupción en su estructura "poro". La existencia de esta cubierta conocida como "corion", también ha sido descrita en otros ovocitos de invertebrados marinos (Raven 1961, Arnold 1971, Dupré *et al.* 1992). La presencia de esta cubierta estaría indicando una modalidad de interacción gamética particular, en la cual se diferencia un territorio específico para el reconocimiento celular y una vía única de penetración espermática, a través de un conducto que se ha denominado "micropilo", el cual ha sido descrito en varios grupos de invertebrados, como Gastropoda, Bivalvia, Nemertea y Echinodermata, siendo universal en Insecta y Cephalopoda (Austin 1965, Tumboh-Oeri 1982, Longo 1987, Focarrelli *et al.* 1988, Rosati & Focarrelli 1990, Focarrelli *et al.* 1990, Koch & Lambert 1990). En *F. crassa*, la depresión o "cráter" observada en los ovocitos, permite inferir la existencia de micropilo a nivel de la cubierta gelatinosa (Fig. 4A).

Parte de los ovocitos obtenidos por succión o biopsia gonadal, se deterioran, pueden perder su forma esférica, forma característica de los ovocitos al ser emitidos al agua (Mackie 1984), o incluso puede haber rompimiento de la cubierta de gelatina y de la membrana plasmática. Al microscopio óptico pueden verse ovocitos en los cuales se rompió la capa de gelatina y la membrana, saliendo el contenido del ovocito hacia el exterior. Esto nos indica que esta técnica es efectiva para conocer el sexo de los individuos, pudiendo no ser apta para obtener ovocitos con fines de fecundación.

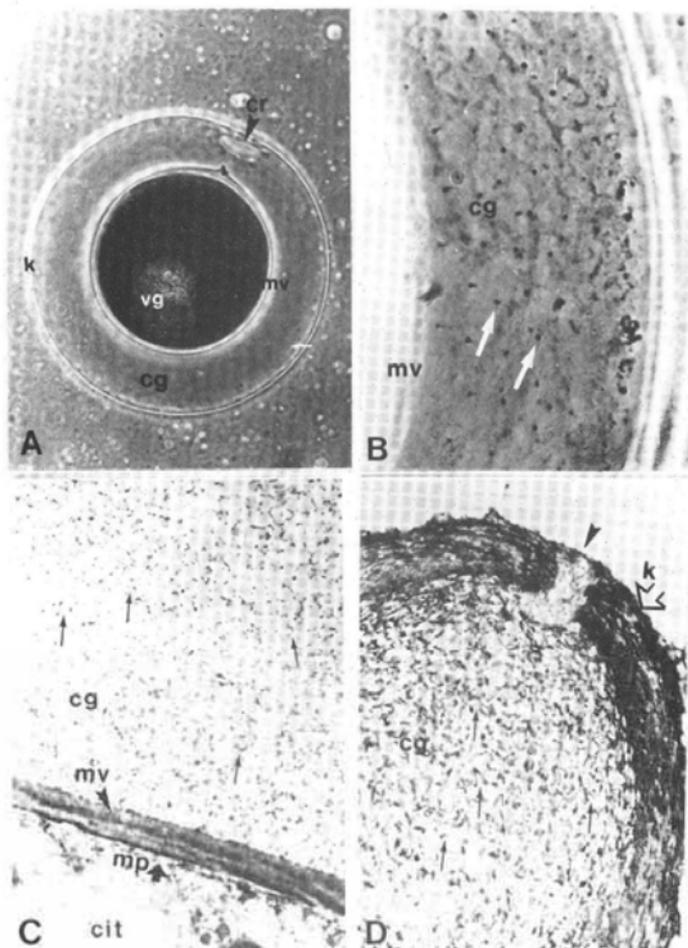


Figura 4. Ovocito de *F. crassa* *in vivo* observados con microscopía de contraste de fase. A) Límite externo corial (k), membrana vitelina (mv) y vesícula germinativa (vg) 40x. B) Detalle de la cubierta gelatinosa (cg), se observan estructuras dispuestas a intervalos regulares (flechas blancas), membrana vitelina (mv). 100x. C) MET: membrana plasmática (mp), membrana vitelina (mv), estructuración (flechas) de la cubierta gelatinosa (cg); citoplasma cortical del ovocito (cit) 12000x. D) Detalle de la organización periférica de la cubierta gelatinosa (cg) y el estrato filamentososo corial (k) con un poro (punta de flecha) 12000x.

Figure 4. Oocyte of *F. crassa*, *in vivo* observed by phase contrast microscopy. A) The external corial surface (k) jelly coat (cg) and a depression or micropile "crater" (cr); the vitelline coat (mv) and the germinative vesicle (vg). 40x. B) Jelly coat detail (cg), with granular structures regularly scattered (white arrows) within the jelly coat (cg), internally placed is the vitelline membrane (mv). 100x. C) MET: plasmatic membrane (mp), the vitelline membrane (mv), fibrous ultrastructure of jelly coat (arrows) and the cortical cytoplasm of the oocyte (cit) 12000x. D) Cortical detail of jelly coat fibrous structure (cg) and chorion in which a "pore" is observed (arrow tip). 12000x.

Los ovocitos de *F. crassa* obtenidos por punción del ovario y observados con microscopía de barrido (Fig. 5A), pueden verse ligeramente piriformes, esbozándose marcas sobre la superficie que podrían tratarse de zonas de unión con otros ovocitos. Los lugares donde se han desprendido los ovocitos (Fig. 5B) se ven lisos. En el ovario del abalón rojo *H. rufescens*, los ovocitos en etapa de síntesis son piriformes y se proyectan al lumen del compartimento ovárico (Martin *et al.* 1983), al igual que los ovocitos previtelogénicos y en vitelogénesis descritos para *Concholepas concholepas* por Huaquín (1979). Así, en este caso, la muestra obtenida podría tratarse de ovocitos en una de estas etapas. Martin *et al.* (1983) describen surcos radiales y una gran cantidad de poros sobre la superficie del ovocito maduro de *H. rufescens*. Zuñiga (1991) señala que los ovocitos premaduros y maduros de *F. limbata*, presentan externamente marcas en forma de surcos con estriaciones perpendiculares, las que se acentúan al engrosarse la cubierta de gelatina. Se desconoce la función de estas marcas.

Los espermatozoides de *F. crassa* obtenidos por punción gonadal y observados "in vivo", muestran una organización espacial en forma de racimos de espigas (Fig. 6A). Las células están unidas en grupos, con sus cabezas dirigidas en torno a un eje central de sustentación y las colas dispuestas en haces longitudinales. La región cefálica es pequeña, mide $3,6 \pm 0,57 \mu\text{m}$ de longitud, su forma es cónica (Fig. 6B y 6C), con un acrosoma de alrededor de $0,9 \pm 0,29 \mu\text{m}$ de longitud y un flagelo de alrededor de $45 \mu\text{m}$. La ultraestructura (MET) revela un núcleo de forma cilíndrica, cromatínicamente compacto, con una razón largo nuclear/base nuclear igual a 2,88. En su región distal contacta con el compartimento acrosomal (Ac), de forma cónica y aspecto homogéneamente denso, revestido de material laminar denso (Ld) en estrecho contacto con la membrana plasmática, posee además una marcada hendidura central o

espacio subacrosomal (Figs. 7A y 7B). En la región basal del núcleo (Fig. 7C), se disponen seis mitocondrias de forma piramidal (Fig. 7D), alrededor del centríolo distal o cuerpo basal (CB), que representan en general la morfología y estructura simple que define la pieza media descrita para los espermatozoides de tipo primitivo (Franzen 1955), y además un flagelo provisto de un filamento axial simple (9+2) (Fig. 7E), que se origina del centríolo distal (CB) (Figs. 7C y 7D). La estructura básica de este espermatozoide es similar a la de otras especies de archaeogastropoda, entre ellas a Pleurotomariidae, Haliotidae y Trochidae, como compara Hodgson *et al.* (1990) en esquemas que representan espermatozoides de cinco familias del orden. Por otra parte, *F. crassa* al igual que otros invertebrados marinos, emite sus espermatozoides directamente al medio acuático donde ocurre la fecundación y posterior desarrollo embrionario, mecanismo que los clasifica además como del tipo "ect-aquasperm" (Jamieson 1987). Por el contrario, especies que presentan fecundación interna, como es el caso del "loco" *Concholepas concholepas* (Bruguère), tienen espermatozoides de tipo modificado, con núcleo elongado y una extensa pieza intermedia con gran cantidad de mitocondrias como fueron descritos por Huaquín & Bustos-Obregón (1981). El hecho de que el espermatozoide de cada especie durante su diferenciación adquiera características únicas, sugiere que la morfología espermática puede ser un carácter taxonómico válido para estudios comparativos y filogenéticos (Bacetti & Afzelius 1976, Afzelius 1977) y como a su vez señalan Hodgson *et al.* (1990) la variación de los espermatozoides de cada especie no está en la estructura de la pieza media o de la cola, sino que en las relaciones de tamaño del núcleo y del acrosoma, junto con aspectos morfológicos diferenciales de estos organelos, que intervienen venciendo las barreras que imponen las envolturas del ovocito durante el proceso de reconcimiento especie específico y penetración.

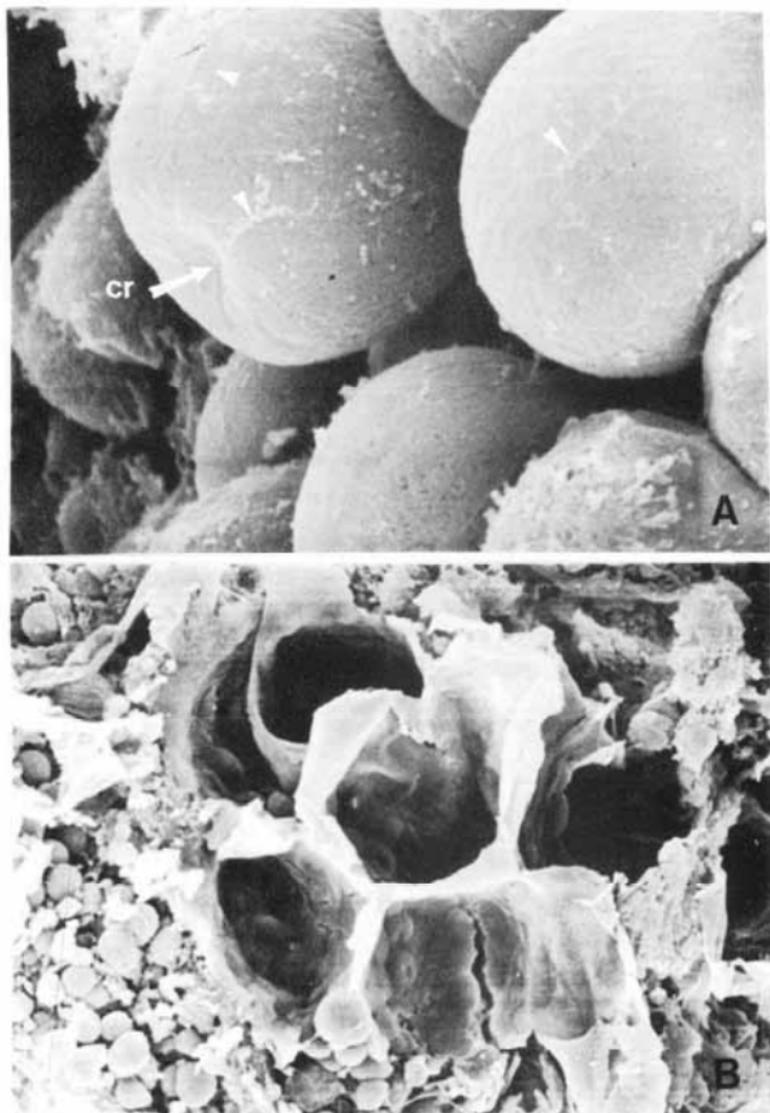


Figura 5. Ovocitos de *F. crassa* obtenidos por punción del ovario observados con MEB. A) Se ven ligeramente piriformes, con marcas tenues en la superficie (puntas de flecha blancas) y una depresión o micrópilo (cr) flecha. 2300x. B) Oquedades lisas luego del desprendimiento de los ovocitos. 1600x.

Figure 5. *F. crassa* oocytes obtained by ovary puncture and observed by MEB. A) They are slightly piriform in shape, with thin superficial marks (white arrow tips) and a depression or micropile (arrow). 2300x. B) Hollowness left after oocytes were detached. 1600x.

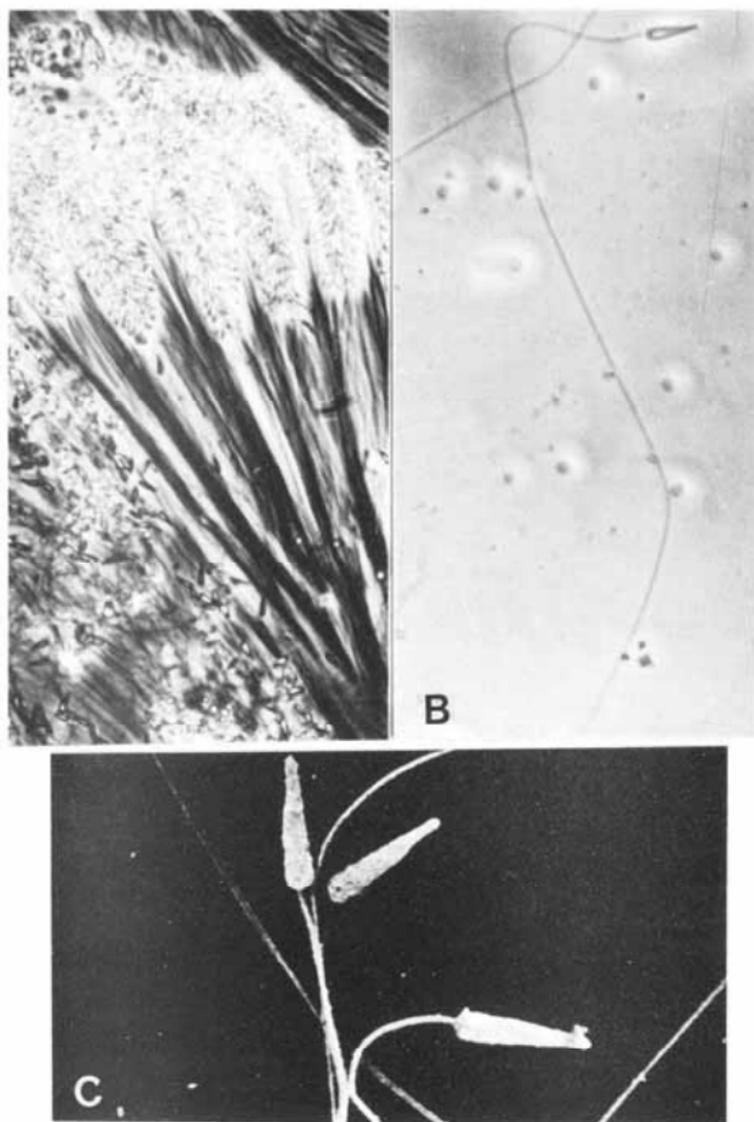


Figura 6 A) Espermatozoides con M.O. de contraste de fase *in vivo*: organización en racimos. 40x. B) Región cefálica y caudal de un espermatozoide aislado. 100x. C) MEB: la región cefálica de forma cónica.

Figure 6. A) Phase contrast (MO) spermatozoa *in vivo*, several cluster groups of cells organized like spikes. 40x. B) Cephalic and caudal region of a free spermatozoon. 100x. C) MEB: the cephalic region with conical form.

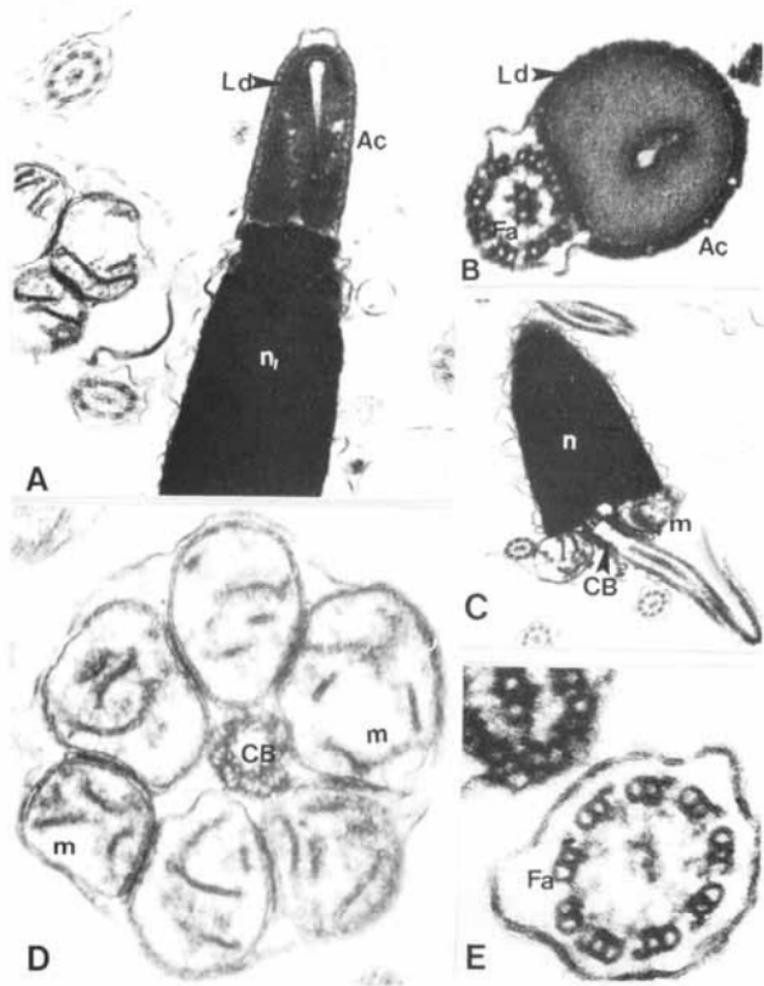


Figura 7. Ultraestructura del espermatozoide de *F. crassa*. A) Corte longitudinal de la región cefálica, núcleo (n), acrosoma (Ac) Lámina densa periacrosomal (Ld). 12000x. B) Corte transversal del acrosoma (Ac) con la lámina densa (Ld), se observa una sección proximal del filamento axial (Fa). 12000x. C) Región basal del núcleo (n), se destacan el centríolo distal (cuerpo basal) (CB) lugar de origen del filamento axial (Fa) y las mitocondrias (m). 7000x. D) Sección transversal del anillo mitocondrial (m) y el cuerpo basal centriolar (CB). 20000x. E) Corte transversal del flagelo (9+2) (Fa) rodeado por la membrana plasmática (mp). 20000x.

Figure 7. Spermatozoon ultrastructure of *F. crassa*. A) Longitudinal section from the cephalic region, nucleus (n), acrosome (Ac) periacrosomal dense lamina (Ld). 12000x. B) Cross section of acrosome (Ac) lines by the electrodense periacrosomal lamina (Ld). An axial filament is seen close to it (Fa) 12000x. C) Basal section of nucleus (n) and midpiece showing the basal body (CB) and their mitochondria (m) 7000x. D) Cross section. Basal body is surrounded by mitochondria (m). 20000x. E) Cross section of a tail (Fa), with 9+2 arrangement of microtubules, surrounded by plasmatic membrane (mp). 20000x.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Programa de Desarrollo en Ciencias del Mar de la Universidad de Chile, al Convenio de Cooperación Universidad de Chile - Universidad de Valparaíso, al Proyecto N-3506 del Departamento de Investigación y Desarrollo (D.I.D.) de la Universidad de Chile y el Proyecto DIUV 08/95 de la Universidad de Valparaíso. A los Profesores Bernardita Campos y Carlos Melo del Instituto de Oceanología de la Universidad de Valparaíso, que nos facilitaron el laboratorio para mantención de ejemplares, la autorización para obtener los animales en el área y nos proporcionaron la información sobre la temperatura del agua de mar en el período de estudio. A la Profesora Gloria Collantes quien identificó las algas que acompañaban las muestras. A la Dra. Soledad Fernandez y a la Srta. M^a Teresa Ramírez por su apoyo técnico. Al Sr. Jaime Solorza, el trabajo fotográfico, al señor Juan Soto por las capturas mensuales de fisurelas. A los señores Víctor Monasterio y Juan Carlos Olavarría por su ayuda en microscopía electrónica de barrido y al señor Fidel Vargas técnico de la Unidad de Microscopía Electrónica, Universidad de Valparaíso.

LITERATURA CITADA

- Afzelius BA. 1977. Spermatozoa and spermatids on the crinoid *Antedon petasus*, with a note on primitive spermatozoa from deuterostome animals. *Journal of Ultrastructure Research* 50: 272-281.
- Anderson WA. 1968. Cytochemistry of sea urchin gametes. *Journal of Ultrastructure Research* 24: 322-333.
- Arnold JM. 1971. Cephalopods. En: Reverberi G.(ed), *Experimental embryology of marine and freshwater invertebrates*: 265-311. North Holland, Amsterdam.
- Austin CR. 1965. *Fertilization*. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, Nueva Jersey, 165 p.
- Baccetti B & BA Afzelius. 1976. The biology of the sperm cell, Monograph in *Developmental Biology* v. 10. Karger, Basel. New York. 253 p.
- Breese W & A Robinson. 1981. Razor clams, *Siliqua patula* (Dixon): gonadal development, induced spawning and larval rearing. *Aquaculture* 22: 27-33.
- Bretos M. 1978. Growth in the Keyhole Limpet *Fissurella crassa* Lamarck (Mollusca: Archaeogastropoda) in Northern Chile. *The Veliger* 21: 268-273.
- Bretos M. 1988. Pesquerías de lapas en Chile. *Medio Ambiente* 9:7-12.
- Bretos M, Tesorieri I & L Alvarez. 1983. The biology of *Fissurella maxima* Sowerby (Mollusca: Archaeogastropoda) in northern Chile. 2 Notes on its reproduction. *Biological Bulletin* 165: 559-568.
- Bretos M, J Gutiérrez & Z Espinoza. 1988a. Estudios biológicos para el manejo de *Fissurella picta*. *Medio Ambiente* 9: 28-34.
- Bretos M, V Quintana & V. Ibarriola. 1988b. Bases biológicas para el manejo de *Fissurella nigra*. *Medio Ambiente* 9 : 55-62.
- Bretos, M. & R. Chihuilaf. 1990. Biometría y otros aspectos biológicos de *Fissurella pulchra* (Mollusca: Prosobranchia). *Revista de Biología Marina, Valparaíso* 25: 1-14.
- Bretos, M. & R. Chihuilaf. 1993. Studies on the reproduction and gonadal parasites of *Fissurella pulchra* (Gastropoda : Prosobranchia). *The Veliger* 36: 245-251.
- Bustos E, C Godoy, S Olave & R. Troncoso. 1991. Desarrollo de técnicas de producción de semillas y repoblación de recursos bentónicos. PNUD (Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo) IFOP, (Instituto de Fomento Pesquero) 66 p. + anexos.
- Dobson G & CL Lee. 1996. Improved method of determining the sex of the marine topshell, *Trochus niloticus* (Mollusca, Gastropoda) for spawning. *Aquaculture* 139: 329-331.
- Dupré E, Bellolio G & K Lohrmann. 1992. Desarrollo embrionario del camarón de roca (*Rhynchocinetes typus*, H. Milne Edwards 1837), en condiciones de laboratorio. *Revista Chilena de Historia Natural* 65: 435-442.

- Franzen A 1955. Comparative morphological investigation into the spermiogenesis among mollusca. *Zoological Bidragfran Uppsala* 30:399-456.
- Focarelli R, T Renieri & F Rosati. 1988. Polarized site of sperm entrance in the egg of a freshwater bivalve, *Unio elongatus*. *Developmental Biology* 127: 443-451.
- Focarelli R, R Domenico & F Rosati.1990. Differentiation of the vitelline coat and the polarized site of sperm entrance in the egg of *Unio elongatus* (Mollusca, Bivalvia). *The Journal of Experimental Zoology* 254: 88-96.
- Harvey EH. 1956. *The American Arbacia* and other sea urchins. Princeton University Press, Princeton, Nueva Jersey, XIV, 298 p. + ilustraciones.
- Hörstadius S. 1973. *Experimental Embryology of Echinoderms*, 192 p. Claredons Press, Oxford.
- Hodgson AN, J Heller & RTF Bernard. 1990. Ultrastructure of the sperm and spermatogenesis in five South African species of the Trochid Genus *Oxystele* (Mollusca, Prosobranchia). *Molecular Reproduction and Development* 25:263-271.
- Huaquín L. 1979. Analisis histológico del ovario de *Concholepas concholepas* (Bruguière, 1789) (Gastropoda: Muricidae). *Biología Pesquera, Chile* 12: 71-77.
- Huaquín L.& E. Bustos-Obrégón. 1981. Ultrastructural analysis of spermatid differentiation in *Concholepas concholepas* (Bruguière, 1789), (Gastropoda:Muricidae). *Archives de Biologie, (Bruxelles)* 92: 259-274.
- Hymann LH. 1967. *The Invertebrates. Volume VI Mollusca I*. McGraw-Hill, Nueva York.
- Jamieson BGM. 1987. A biological classification of sperms types, with a special reference to annelids and molluscs, and an example of specimicladistic :311-332 En: Mohri H. (ed), *New Horizons in Sperm Cell Research*. Japan Science Press.
- Koch RA & CC Lambert. 1990. Ultrastructure of sperm, spermiogenesis and sperm-egg interaction in selected invertebrates and lower vertebrates with use external fertilization. *Journal of Electron Microscopy Technique* 16: 115-154.
- Longo, F. 1987. *Fertilization*. Chapman Hall, Londres 1-27.
- Mackie GL. 1984. Bivalves. En: Tompe, AS (ed.), *The Mollusca reproduction* 7: 351-418. Academic Press, NuevaYork.
- McLean JH. 1984. Systematics of *Fissurella* in the Peruvian and Magellanic faunal Provinces (Gastropoda: Prosobranchia). *Natural History Museum of Los Angeles County. Contribution in Sciencce* 354: 1-70.
- Martin GG, K Romero & C Miller-Walker. 1983. Fine structure of the ovary in the red abalone *Haliotis rufescens* (Mollusca: Gastropoda). *Zoomorphology* 103: 89-102.
- Oliva D & JC Castilla. 1992. Guía para el reconocimiento y morfometría de diez especies del género *Fissurella* Bruguière, 1789 (Mollusca: Gastropoda) comunes en la pesquería y conchales de Chile Central y Sur. *Gayana Zoología* 56: 77-108.
- Pino C, D Oliva & JC Castilla. 1994. Ritmos de actividad en las lapas *Fissurella crassa* Lamarck 1822 y *F. latimarginata* Sowerby 1835: efectos del ciclo de marea y fotoperíodo. *Revista Biología Marina Valparaíso* 29: 89-99.
- Raven CP. 1961. Oogenesis: The storage of developmental information. 2: 14-44. Pergamon Press, Londres.
- Rosati P & R Focarelli. 1990. Sperm-egg interaction in Bivalves. En: Dale B.(ed), *Mechanism of fertilization*. 45: 187-296. Springer-Verlag, Berlin.
- SERNAP. 1997. Anuario estadístico de pesca. Ministerio de Economía Fomento y Reconstrucción. Servicio Nacional de Pesca. Valparaíso. 192 p.
- Tumboh-Oeri, AG. 1982. Mechanism of sperm oocyte interaction during fertilization in the surf-clam *Spisula solidissima*. *Biological Bulletin* 162: 124-134.

- Vega G, C Osorio, J Remonsellez & A Von Mareés. 1996. Avances en el cultivo de *Fissurella cumingi* (Mollusca: Archaeogastropoda). En: . Silva A. & G. Merino (eds). Acuicultura en Latinoamérica. IX Congreso Latinoamericano de Acuicultura. 2º Simposio Avances y Perspectivas de la Acuicultura en Chile. Universidad Católica del Norte. Asociación Latinoamericana de Acuicultura, Coquimbo, Chile. p. 215-219.
- Zúñiga, JC. 1991 Ciclo reproductivo, talla de primera madurez sexual y parasitosis de *Fissurella limbata* Sowerby 1835 en Fray Jorge (Mollusca: Archaeogastropoda: Fissurellidae). Tesis Licenciado en Ciencias del Mar, Universidad Católica del Norte, 74 p.

Recibido en octubre de 1997 y aceptado en abril de 1998