



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

TESIS DOCTORAL

Biología y formación de la concha de *Digitaria digitaria*, Linné 1758
(BIVALVIA: Astartidae)

Pablo Marina Ureña

Dirigida por la Prof^a. Dr^a. Carmen Salas Casanova

Programa de Doctorado en Diversidad Biológica y Medio Ambiente

Departamento de Biología Animal

Facultad de Ciencias

Universidad de Málaga


Málaga, 2016





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTOR: Pablo Marina Ureña

 <http://orcid.org/0000-0001-6629-2366>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Facultad de Ciencias
Departamento Biología Animal

Dña. CARMEN SALAS CASANOVA, Profesor Titular del Departamento Biología Animal de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga

CERTIFICA:

Que la presente memoria titulada: "**Formación de la concha y biología de *Digitaria digitaria* (L., 1758) (Bivalvia, Astartidae)**" presentada por el Licenciado en Ciencias Biológicas D. Pablo Marina Ureña, ha sido realizada bajo mi dirección y la publicación que la avala no ha sido utilizada en Tesis anteriores (*).

Como Directora de la mencionada Tesis, considero que la presente memoria reúne todos los requisitos necesarios para ser sometida a juicio por la Comisión correspondiente, por lo que autorizo su exposición y defensa para la obtención del grado de Doctor en Ciencias Biológicas.

Y para que así conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, firmo la presente acreditación en Málaga a 10 de junio de 2016.

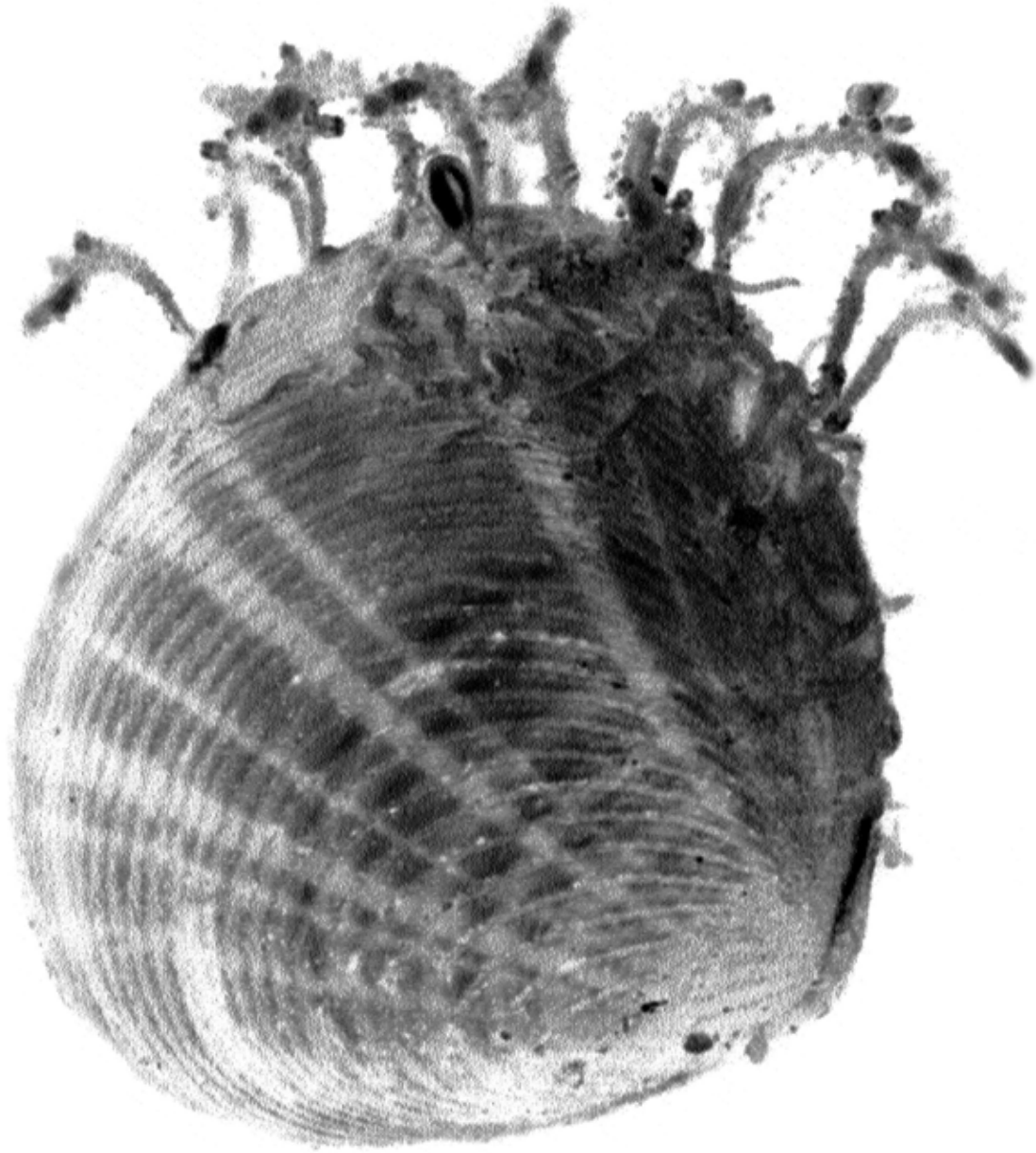
Fdo. Dra. Carmen Salas Casanova

(*) Todos los coautores eran y son doctores





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



A mi familia

“Poco a poco hila la vieja el copo”



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AGRADECIMIENTOS

Mi padre decía alguna vez aquello de *“poco a poco hila la vieja el copo”*. Y esa ha sido la historia de esta tesis, trabajo lento pero constante, con sus picos de puesta y sus fases de reposo, por decirlo en clave reproductora. Pero aquí está, repleta de pequeños logros, alegrías y disgustos calados en el papel página tras página, donde el mayor reto de esta tesis ha sido terminarla y no desfallecer en el intento. Carmen Salas solía decirnos, “Niños, esto es una carrera de fondo”, y que razón tenía.

Ha pasado tanto tiempo que casi no puedo recordarlo, ¿a quién tenía que agradecer su ayuda y apoyo para llegar hasta aquí? Aunque soy altamente despistado, nunca podría olvidar a una serie de personas sin las que hubiera sido imposible llegar a buen puerto en este viaje. A Carmen Salas Casanova, no solo porque sea la directora de esta Tesis, sino porque he sido uno de “sus Niños”, porque no solo me ha dejado una profunda y amplia impronta de conocimiento científico, sino también de cariño y afecto sincero, que me ha demostrado en esas situaciones en las que uno se retrata como la persona que realmente es. Al Grupo de Invertebrados Marinos del Departamento de Biología Animal de la Universidad de Málaga, que me acogieron durante todos estos años. En especial a José Enrique García Raso y Serge Gofas, con quienes he tenido el gusto trabajar y aprender en diferentes proyectos, y porque siempre que ha estado en sus manos me han facilitado la labor. A Antonio Checa del Departamento de Estratigrafía y Paleontología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada, que compartiendo su sabiduría ha sido partícipe en algunos de los capítulos de esta tesis doctoral, y porque siempre nos ha recibido con los brazos abiertos. A Juan de Dios Bueno, de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada por la ayuda técnica en las preparaciones semifinas.

Luego hay una gran marea de gente que ha hilado de una u otra forma alguna fibra para este copo, unos más otros menos, pero todos necesarios, responsables del resultado que tenemos entre las manos. Quiero acordarme del equipo de Microbiología de la universidad de Granada que me enseñó a cultivar mi propio “rebaño” de bacterias; de mis profesores de los cursos de doctorado en la Universidad de Alicante y de todos los amigos que hicimos piña en



aquellos que recuerdo como gloriosos días. No podré olvidar mi vida en el Departamento de Biología Animal (sí, mi vida, porque casi vivíamos allí), donde he pasado unos años que están grabados en mi memoria, ya con tintes de nostalgia. Echo de menos al Alcornocal y al Pinsapar, a “los de cardio” y el buen ambiente, las risas, el compadreo que tuvimos y del que tanto disfruté. Y afortunadamente la amistad que pude forjar con muchos de ellos la seguimos manteniendo hoy, os mando desde estas líneas un abrazo enorme cargado de cariño y agradecimiento.

Pero Javi, Jose y Ángel han sido especialmente importantes a lo largo de esta aventura. Amigos! han pasado muchos años, más de los que nunca imaginé. Los cuatro hicimos buen equipo, compartimos horas de laboratorio, de agua, de dolor de espalda a la lupa y acarreando botellas, pero también alguna que otra Butibamba y camperito, y no pocas experiencias vitales. No todo ha sido sufrir! Con vosotros he pasado muchas alegrías, también algunas penas, y siempre me he sentido comprendido y apoyado. Con Javi he vivido alguna de las mejores experiencias de mi vida (brindo mil veces por Nápoles y por Amberes!), fue compañero de laboratorio, hoy le considero gran amigo. Ángelillo llegó más tarde a nuestro microhábitat, pero pronto descubrí a una buena persona, siempre dispuesto. Desde Alicante Ángel se ha convertido en un imprescindible del equipo, porque allí con un MM en la mano (nuestra poción mágica) creo que cuajó nuestra amistad. Y dejó a Jose para el último de mis tres fantásticos. Si Luke Skywalker tenía a Yoda y Goku a Maestro Tortuga, el Niño Burbuja ha tenido la suerte de contar con el Dr. Zostero, que le ha alentado, guiado, dado apoyo y amistad en el a veces tenebroso y difícil mundo de la ciencia. Gracias por enseñarme bien DZ! Hoy, algunas de las bromas que hacíamos cuatro amigos en el laboratorio entre lupas y vapores de alcohol se han hecho realidad, quien lo iba a pensar. Bromeábamos con que nos iban a salir canas en las sienes (versión formal), que me veía con mujer e hijos y todavía haciendo tesis. Pues bien, hoy tengo canas, menos pelo, más arrugas, (y ahora la parte buena) una maravillosa compañera de vida, Ángela, y ya puedo decir que prácticamente tres hijas, Alicia, Eva y Julia.

Quisiera poder nombrar a cada una de las personas que me han ayudado aunque sea de forma puntual, (cortando algún ejemplar al micrótopo, consiguiéndome alguna muestra, haciendo

algún análisis, haciéndome reír...), pero siempre olvidaría a alguna, así que para no fallar solo os digo: gracias a todas vosotras!

Mi familia es lo más importante de mi vida, y he tenido la suerte de recibir de ella el apoyo, el aliento y la fuerza necesaria para terminar con éxito esta tesis. Angie, te he robado mucho tiempo, y tú me has ofrecido comprensión y sonrisas. Mamá, Papá y Hermano, me habéis dado soporte y empujado en muchas etapas de mi vida. Gracias a todos bonitos!



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

ÍNDICE

1. Introducción general	1
Introducción	3
Clase Bivalvia	3
Clado Archiheterodonta	4
Familia Astartidae	6
Formación de la concha	10
Reproducción	12
Parásitos	16
Objetivos	18
Área de estudio	19
Situación geográfica	19
Geomorfología y aspectos geológicos de la Bahía de Barbate	20
Fisiografía del fondo marino de la Bahía de Barbate	20
Hidrografía	21
Salinidad y temperatura	23
Climatología general de la zona de estudio	23
Material y Método	24
Recolección de las muestras	24
Material examinado	26
Procesamiento de los ejemplares en el laboratorio	27
Procesamiento de las partes blandas para el estudio histológico	27
Inclusión en metacrilato	28
Procesamiento de la muestra para estudio mediante Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM)	29
Procesamiento de la muestra para estudio mediante Microscopia Electrónica de Barrido (SEM) y Microscopía Electrónica de Emisión de Campo (FESEM)	30
Ciclo gametogénico	30
2. El periostraco. Formación y estructura	35

Introducción	37
Material y Método	39
Resultados	39
Origen del periostraco	39
Formación de los alveolos	45
Discusión	47
La célula basal y su relación con el periostraco incipiente	47
Implicación de las funciones del lóbulo externo y medio del manto en la formación del periostraco	48
Morfología de los alveolos y movimiento del periostraco a través del surco periostracal	51
Comparación morfológica con el periostraco de otras especies de Crassatelloidea	55
3. Morfogénesis de las costillas oblicuas	57
Introducción	59
Material y Método	63
Desplazamiento de las costillas oblicuas	64
Análisis morfométrico de la concha	66
Resultados	67
La concha de <i>Digitaria digitaria</i>	67
Borde del manto	70
Discusión	78
4. Anatomía y parásitos	83
Introducción	85
Material y Método	86
Cultivo bacteriano	87
Resultados	88
Organización general de las partes blandas	88
Anatomía descriptiva e histología	91
Parásitos	119
Simbiontes	124

Discusión	127
Anatomía	127
Parásitos y simbioses	131
5. Biología reproductiva y crecimiento	135
Introducción	137
Material y Método	140
Reproducción	140
Crecimiento	144
Resultados	146
Ciclo reproductor	146
Estrategia reproductiva: Fertilización	157
Crecimiento	161
Discusión	168
Reproducción	168
Crecimiento	174
6. Discusión general y conclusiones	179
Resumen	189
Bibliografía	195
Anexos	221
Anexo I: Protocolos de técnicas histológicas y medios de cultivo microbiológicos	223
Anexo II: Lista de caracteres morfológicos	227



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

CAPÍTULO 1



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



INTRODUCCIÓN GENERAL



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

INTRODUCCIÓN

Durante la llamada Explosión Cámbrica, hace unos 530-542 millones de años, surgieron unos cincuenta grandes grupos animales como poríferos, braquiópodos, equinodermos, moluscos o diversas clases de artrópodos (Gould 1989, Wang *et al.* 1999, Lián *et al.* 2009), de los cuales el de los moluscos, transcurridos unos 540 millones de años, constituye uno de los filos del Reino Animal más diverso de nuestro planeta detrás de los artrópodos, con unas 135.000-165.000 especies actuales (Appeltans *et al.* 2012). El Phylum Mollusca abarca desde formas minúsculas, de menos de un milímetro en su talla adulta, como el gasterópodo *Ammonicera minortalis* Roland, 1992 (Bieler & Mikkelsen 1998) hasta gigantescos ejemplares de más de 15 metros, como los calamares gigantes del género *Architeuthis* (Roper 2016). Los moluscos poseen una enorme versatilidad, lo que permite encontrar representantes de este filo instaurados en prácticamente todos los ecosistemas marinos, en las aguas dulces y en el medio terrestre. En la vertiente socio-económica, la importancia de los moluscos es reseñable, tanto es así que según datos de la FAO sobre el estado mundial de la pesca y la acuicultura para el año 2012, en la composición de la producción acuícola mundial los moluscos representaron el 23,6 % (14,2 millones de toneladas) del total y refiriéndonos a especies estrictamente marinas la proporción sube hasta el 75,5 % (13,9 millones de toneladas). Constituyen igualmente un importante recurso en las pesquerías mundiales, después de los peces, y junto con los crustáceos.

Clase Bivalvia

El filo Moluscos está representado clásicamente por 8 clases: Neomeniomorpha (Solenogastros) y Chaetodermomorpha (Caudofoveados), que forman el clado Aplacophora (Scherholz *et al.* 2013), Polyplacophora, Monoplacophora, Gasteropoda, Bivalvia, Cephalopoda y Scaphopoda. Recientes estudios moleculares apuntan a la existencia de un clado Aculifera, en el que estarían incluidos los Aplacóforos y los Poliplacóforos (Kocot *et al.* 2011, Smith *et al.* 2011, Vinther *et al.* 2012). Los moluscos de la clase Bivalvia, con entre 14.000 (Appeltans *et al.* 2012) y 20.000 especies (Bieler *et al.* 2013) y una amplia distribución geográfica y batimétrica, constituyen la segunda clase en diversidad, detrás de los

Gasterópodos, del Phylum Mollusca, los cuales a su vez forman en el medio marino el primer filo por diversidad de especies y hábitats colonizados.

Los Bivalvos se caracterizan por presentar el cuerpo comprimido lateralmente dentro de una concha bivalva de carbonato cálcico, unida dorsalmente por una charnela, un ligamento y uno o dos músculos aductores. Presentan un pie para la locomoción, principalmente para el enterramiento, y sifones para la entrada de agua a las branquias, las cuales son utilizadas para la captación de alimento por la mayoría de ellos (Giribet & Distel 2003). Las especies que pertenecen a esta clase están presentes en masas de aguas dulces, como ríos y lagos, aunque la mayoría son marinas y habitan en todos los mares y océanos del planeta ocupando un rango batimétrico que va desde la zona intermareal hasta más de 3.000 m de profundidad. En general, son bentónicas, formando parte del sistema pelágico únicamente en estadios larvarios y normalmente durante un periodo de tiempo relativamente corto. Aunque están presentes en todo tipo de fondos, adquieren especial relevancia en los de tipo sedimentario, donde es común que aparezcan masivamente formando bancos. Esta tendencia a la acumulación masiva en áreas con determinadas características (fondos blandos y aguas ricas en nutrientes) es de gran importancia desde un punto de vista económico, pues representa uno de los recursos de mayor relevancia para la pesca costera y para la acuicultura (Drumbauld *et al* 2009). Los bivalvos constituyen una importante fracción de la dieta de otras muchas especies (algunas de las cuales son de alto valor comercial, como peces, crustáceos u otros moluscos), desempeñando en todas sus fases de desarrollo un papel básico en la cadena trófica de los ecosistemas marinos (Newell 2004).

Clado Archiheterodonta

Estudios moleculares recientes han puesto de manifiesto la monofilia de los Bivalvos, situándolos como grupo hermano de los Gasterópodos (Kocot *et al.* 2011) o junto con Gasterópodos y Escafópodos (Smith *et al.* 2011), si bien persisten conflictos entre aspectos morfológicos y datos moleculares dentro de los distintos linajes de moluscos, particularmente en los Bivalvos.

Dentro de los Bivalvos, los Heterodonta agrupa a la mayoría de los bivalvos actuales, muchos de los cuáles son considerados los más derivados (Figura 1.1). Diferentes estudios moleculares

han identificado dentro de los Heterodonta dos clados: Euheterodonta y Archiheterodonta (Giribet & Distel 2003, Taylor *et al.* 2007, Wilson *et al.* 2010, Plazzi *et al.* 2011, Sharma *et al.* 2012), los cuales han sido corroborados por estudios morfológicos (Bieler *et al.* 2014). Entre las sinapomorfías de los Archiheterodonta destaca la especial ultraestructura del esperma (Healy 1995) o la presencia de una hemoglobina única de alto peso molecular (Terwilliger & Terwilliger 1985). Los Archiheterodonta contienen algunos de los fósiles más antiguos de bivalvos, los cuales aparecen en el Silúrico y Ordovícico.

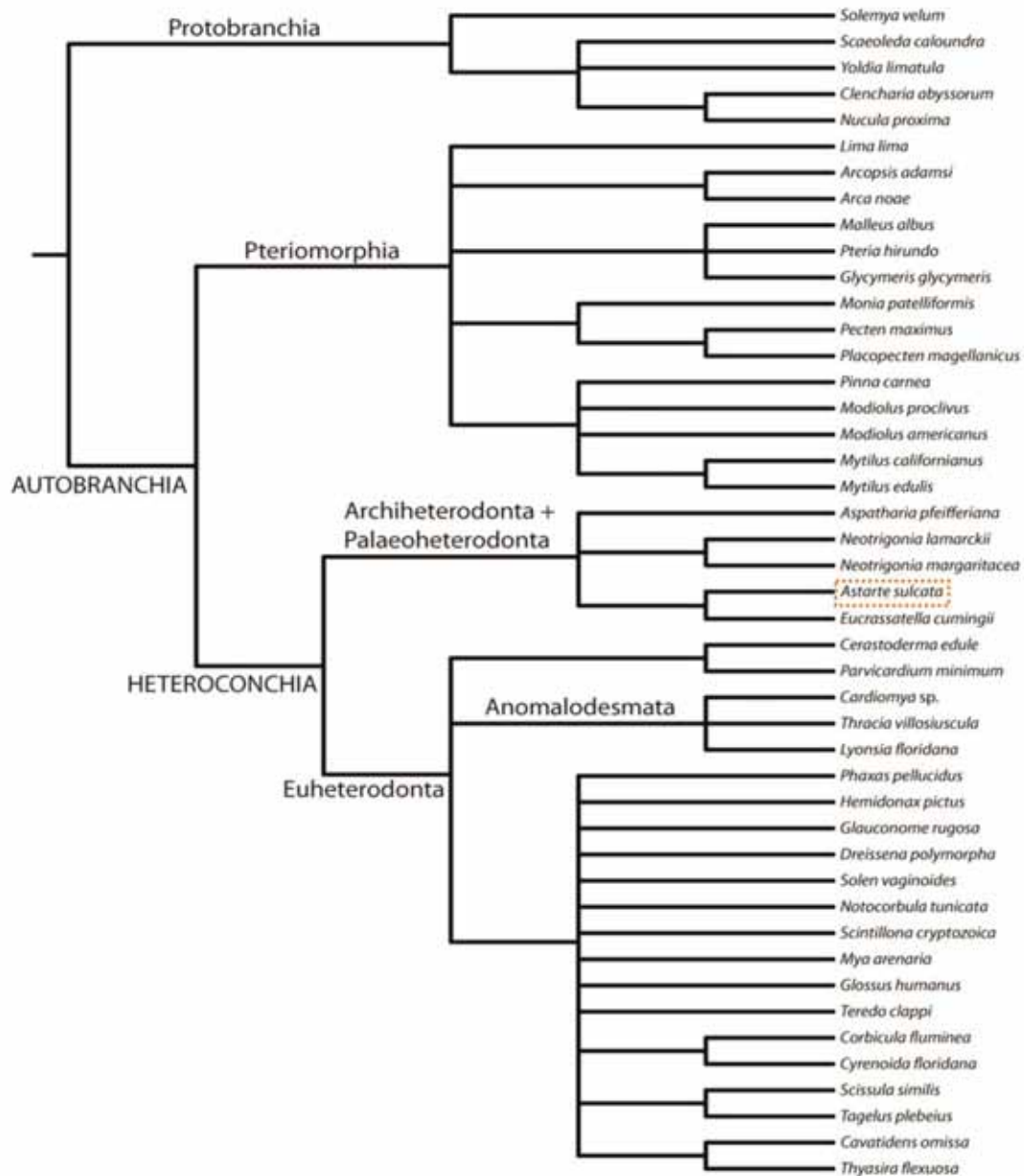


Figura 1.1. Principales clados de moluscos bivalvos, adaptado de Sharma *et al.* 2012. Aparece *Astarte sulcata* como representante de la familia Astartidae, a la que también pertenece *D. digitaria*.

El clado Archiheterodonta comprende cuatro familias: Astartidae, Crassatellidae, Carditidae y Condylorcardiidae. Recientes análisis moleculares indican que las superfamilias Astartoidea y Crassatelloidea deben ser consideradas como una única superfamilia Crassatelloidea (incluyendo las familias Astartidae y Crassatellidae), a la que se añade la superfamilia Carditoidea (incluyendo las familias Carditidae y Condylorcardiidae) (Giribet & Distel 2003, Giribet & Wheeler 2002, Bieler *et al.* 2014, Gonzalez & Giribet 2015).

Un reciente estudio filogenético de los bivalvos a partir de 4 genes nucleares que codifican proteínas ha identificado un nuevo clado formado por Archiheterodonta + Palaeoheterodonta (Sharma *et al.* 2012), el cual se ve confirmado también por análisis morfológicos (Bieler *et al.* 2014). Los Archiheterodonta divergieron del grupo Palaeoheterodonta durante el Cámbrico pero se diversificaron durante el Mesozoico.

Familia Astartidae

A lo largo de décadas pasadas se ha estudiado la estructura y función de numerosas especies de bivalvos, pero las de la familia Astartidae han pasado casi desapercibidas. El modo de vida y la anatomía funcional (Saleuddin 1965), la concha y el hábitat (Forbes & Hanley 1853; Jeffreys 1867), la estructura de las branquias (Ridewood 1903, Atkins 1937, 1938) o el estómago (Purchon 1958) de algunas especies del género *Astarte* han sido descritos dándonos una idea general de la familia, pero aun así la información existente es escasa en lo referente a la anatomía interna y el modo de vida de los componentes de este grupo. Si bien el tamaño de los Astartidos es relativamente pequeño, con especies que pueden ir desde 1,5 mm (*Goodallia triangularis*) hasta 50 mm (*Astarte borealis*), las especies de esta familia juegan un importante papel en el ecosistema marino. Forman parte de la endofauna suspensívora de fondos de cascajo, arena y fango, llegando desde la zona intermareal hasta los 3.000 metros de profundidad (Mikkelsen & Bieler 2008). Son presas de multitud de especies de peces (Selin 2007), formando parte de la dieta de algunos de alto valor comercial como el eglefino (*Melanogrammus aeglefinus*) (Grabowski *et al.* 2006), así como del crustáceo decápodo *Paralithodes camtschaticus* (Sundet & Berenboim 2008), conocido como Cangrejo Real, especie de alto valor comercial, e incluso mamíferos marinos como las morsas se alimentan de ellos (Sheffield & Grebmeier 2009).

Por otro lado, son organismos importantes en las investigaciones paleontológicas y paleobiológicas (Nicol 1955, Marincovich & Gladenkov 1999, Grey *et al.* 2006, entre otros) ya que su gruesa concha deja clara evidencia de su presencia allí donde vivieron a lo largo de la historia.

La familia Astartidae aparece en el Devónico, alcanzando su mayor diversidad en el Mesozoico tardío. En la actualidad está representada por 50 especies vivientes repartidas entre 11 géneros (Mikkelsen & Bieler 2008). Los Astártidos están ampliamente distribuidos en aguas del Atlántico, Pacífico y el Océano Ártico. El género *Astarte* está particularmente bien representado en aguas frías de latitudes altas (Coan *et al.* 2000, Mikkelsen & Bieler 2008), mientras que en latitudes bajas, más meridionales, aparecen también otros géneros con especies de menor tamaño, como *Digitaria digitaria* y *Goodallia triangularis*. La mayor diversidad de especies de esta familia se encuentra en mares de aguas frías (con ocho especies en el mar de Noruega), presentando una distribución principalmente circumboreal, aunque algunas especies que presentan una distribución circunantártica se han encontrado en aguas frías profundas de Sudáfrica y sur de Sudamérica y otras han alcanzado latitudes bajas en las costas este y oeste africanas (Beesley *et al.* 1998). Así, se distribuyen desde Groenlandia y el mar de Barents hasta el sur de Sudáfrica, el mar Báltico y el Mediterráneo (con cinco especies en aguas andaluzas).

La concha de los astártidos es gruesa, comprimida lateralmente, normalmente equilateral, en ocasiones ligeramente inequilateral. Tienen cierto parecido, en su forma general, con los Veneridae pero se distinguen de estos por tener su línea paleal sin seno posterior (ya que no tienen sifones) y por detalles de la charnela (Gofas *et al.* 2011). El contorno puede ser subcircular hasta subtriangular, con el umbo prosogiro más o menos prominente. La microestructura de la concha es aragonítica de dos capas, con una lamelar cruzada externa y otra interna que puede ser lamelar cruzada compleja u homogénea (Mikkelsen & Bieler, 2008). Exteriormente los astártidos están recubiertos por un periostraco grueso, fuerte y adherente, de color marrón amarillento a negro. Su estructura microscópica presenta un patrón reticulado, excavado o en crestas. El periostraco está adherido a la cara externa del lóbulo medio del manto (Mikkelsen & Bieler 2008). Las valvas suelen ser lisas o tener una escultura comarginal. Presentan lúnula y escutelo, de manera que la lúnula de la valva derecha

solapa sobre la izquierda, y el escutelo de la valva izquierda lo hace sobre el de la derecha. Internamente la concha no es nacarada, con la línea paleal entera (no existe seno paleal). Los márgenes internos de la concha pueden ser denticulados o lisos. La charnela es ancha y fuerte, heterodonta, con dos o tres dientes cardinales en cada valva; los dientes laterales son laminares o están ausentes. El ligamento es parivincular y opistodético, y normalmente yace sobre una sólida ninfa. Aparece un ligamento secundario externo que se extiende posteriormente.

A nivel morfológico, las impresiones de los músculos aductores posterior y anterior de los astártidos son iguales, raramente la posterior más pequeña; los músculos retractores del pie están bien desarrollados. No poseen sifones, pero los lóbulos internos del manto se fusionan posteriormente para formar una abertura exhalante postero-dorsal, que posee una extensión cónica en algunas especies; la abertura inhalante no está fusionada ventralmente. La superficie interna del borde del manto posee células glandulares dispersas, y en determinadas especies se han descrito otras estructuras, como la presencia de hemoglobina que da lugar a un borde del manto coloreado en *Astarte undata* Gould, 1841, órganos bioluminiscentes o glandulares en el lóbulo medio del manto de *Astarte sulcata* Da Costa, 1778 (Saleuddin 1965, 1967). El pie es largo, cuadrangular, generalmente comprimido lateralmente, apuntado anteriormente. Poseen surco del biso, aunque solo las formas juveniles poseen esta estructura.

Los astártidos son lamelibranquios, con la hemibranchia externa más pequeña que la interna, o en ocasiones ausente, sobre todo en las especies de pequeño tamaño. Las branquias están insertadas, pero no fusionadas con el surco oral distal de los palpos (Categoría I) (Stasec, 1963). Los palpos labiales de los astártidos son de tamaño pequeño a mediano, y de forma trigonal. Los flujos de agua exhalante e inhalante son posteriores. El estómago es de tipo IV simplificado, sin área de selección pero con un tiflosolis espiral. El intestino medio es poco intrincado, atravesando la cavidad pericárdica y el ventrículo; la parte distal del recto, contornea al músculo aductor posterior y vierte los excrementos por el ano a la corriente exhalante.

Muchas especies de astártidos carecen de la etapa de larva planctónica, lo que se relaciona con especies que poseen huevos de gran tamaño (Ockelmann 1965). Esta característica les confiere un gran potencial de deriva genética en poblaciones locales (Schander 2001).



Digitaria digitaria (L., 1758) (Figura 1.2) es uno de los representantes de pequeño tamaño de la familia Astartidae en el Mediterráneo (junto con *Gonilia calliglypta* y *Goodallia triangularis*), con una longitud media de poco más de 6 mm, lo que la enmarca en ese elenco de bivalvos cuyos tamaños implican patrones reproductores especializados, ya están en el límite de tamaño para que la emisión de gametos al agua sea ventajosa y sin embargo, no presentan incubación de su prole (Sastry 1979). El hábitat de *D. digitaria* son fondos de arenas gruesas y gravas bioclásticas limpias, entre 10 y 50 m de profundidad, aunque en la literatura hay referencias de ejemplares muestreados a 1.107 m de profundidad (Poppe & Goto, 1993), posiblemente se traten de valvas arrastradas por las corrientes hasta el talud.



Figura 1.2. Ejemplar vivo de *Digitaria digitaria* (Linnaeus, 1758) en la posición que toma de forma natural semienterrada en el sedimento. En su extremo posterior se observan las colonias de hidozoos que viven frecuentemente sobre su concha, asociadas a la zona de las aberturas inhalante y exhalante.

Dentro de la familia Astartidae, *D. digitaria* es la especie que alcanza latitudes más bajas, encontrándose de forma habitual desde el Golfo de Vizcaya (norte de España) hasta el sur de

Guinea (oeste de África) y en todo el mar Mediterráneo (Gofas *et al.* 2011). Posee una concha que no sobrepasa en general los diez milímetros de longitud antero – posterior, de contorno orbicular o a veces algo más larga que alta, equilateral y recubierta por un periostraco alveolado, similar al observado en otras especies de la familia. Su escultura es inconfundible y exclusiva de esta especie dentro de los astártidos, ya que está formada por estrías oblicuas muy profundas, que empiezan en el margen postero – dorsal describiendo una trayectoria, curvada, hasta alcanzar el margen ventral y antero-ventral.

D. digitaria constituye pues una especie modelo, de interés tanto por los aspectos relacionados con la formación de su periostraco alveolado y de su peculiar concha de escultura oblicua, como por los relacionados con su biología, en particular la reproducción, teniendo en cuenta su pequeño tamaño y el hecho que el tipo de fondo y profundidad en el que viven suele estar sometido a corrientes de fondo, lo cual supone un reto a la hora del asentamiento larvario.

Formación de la concha

La concha en los bivalvos es una estructura calcificada que recubre las partes blandas del animal. Esta estructura sirve como protección frente a agresiones externas y como soporte anatómico para el anclaje de músculos y órganos.

La biomineralización en la clase Bivalvia incluye el periostraco, de naturaleza orgánica, y las principales capas calcificadas (externa, media, interna), que pueden estar formadas por calcita, aragonito o raramente por ambas. El periostraco es una cubierta externa de naturaleza proteica que recubre toda la superficie de la concha siendo la primera en formarse. Su grosor es muy variable, yendo desde apenas una micra de espesor en ostreidos y pectínidos, hasta 428 micras en el mitílido *Musculus laevigatus* (Harper 1997). El periostraco se genera entre el lóbulo medio y el externo del borde del manto, en el llamado surco periostracal, posteriormente bordea el lóbulo externo del manto cerrando un espacio sin contacto con el medio externo para facilitar la precipitación de cristales de carbonato cálcico, con una forma, tamaño y orientación determinados, sobre una matriz orgánica. Este espacio que se forma entre el borde externo del manto y la concha es el llamado espacio extrapaleal. La parte calcificada de la concha está formada generalmente por cristales de aragonito o calcita

inmersos en una matriz orgánica que se compone de una compleja mezcla de proteínas, glicoproteínas, proteoglicanos, polisacáridos y quitina (Marin & Luquet 2004), organizándose en microestructuras ordenadas (Marin *et al.* 2012, Checa & Salas, en prensa). La formación de la concha en moluscos es pues un elaborado proceso en el que están involucradas de manera activa las células del manto, macromoléculas orgánicas y cristales de carbonato cálcico. Las macromoléculas desempeñan un papel clave, regulando y limitando el tamaño, orientación, polimorfismo y textura de la fase inorgánica (Falini *et al.* 1996, Westbroek & Marin 1998, Checa *et al.* 2009, Marin *et al.* 2007, Yang *et al.* 2010, Checa & Salas, en prensa).

La concha de los bivalvos es extremadamente diversa en cuanto a formas y tamaño y hacen gala de una gran variedad de elementos esculturales (Figura 1.3), entre los que las costillas son los más frecuentes. La mayoría de elementos esculturales de la concha pueden ser clasificados atendiendo a tres categorías (Checa 2002), (1) *radial*, con elementos que radian desde el umbo y perpendicular al borde de la concha. Estas esculturas radiales son el resultado de la secreción continua de carbonato cálcico por grupos de células situadas en lugares determinados del borde del manto.



Figura 1.3. Ilustración del naturalista y filósofo alemán Ernst Haeckel donde podemos tomar idea de la diversidad de formas y ornamentación que pueden presentar los moluscos bivalvos.

Estas estructuras fueron llamadas “*corpora spinosa*” por Stone (1998) (ej. *Cardiidae*); (2) *comarginal*, paralelos al margen de la concha. Esta escultura se compone de una serie de líneas que se ajustan al borde de la concha. Se secretan periódicamente en el borde del manto en áreas especializadas distribuidas de forma discontinua, formándose gracias a la contracción y extensión, y en algunos casos por una dilatación o flexión del mismo, lo que provoca el plegamiento de la concha y la formación de estas estructuras (Ubukata 1997) (ej. *Veneridae*); (3) *oblicua*, con elementos que cruzan la dirección radial y comarginal, de manera que forman un ángulo respecto al borde de la concha y las líneas de crecimiento (ej. *Solecurtus*, *Digitaria*). No hay sin embargo, estudios histológicos en los que se haya puesto de manifiesto el grado de implicación y la forma de actuación de los bordes del manto de bivalvos en la formación de las costillas.

Los procesos de biomineralización relacionados con la formación de la concha en bivalvos han sido ampliamente estudiados, siendo de gran interés en el área de la biomecánica y la biomedicina, con posibles aplicaciones en la regeneración de huesos, implantes o síntesis de materiales biocompatibles (Westbroek & Marin 1998, Balmain *et al.* 1999, Vecchio *et al.* 2007, Checa *et al.* 2009, de Paula *et al.* 2010, Mc Dougall *et al.* 2011). De igual manera, la morfología de la concha y su ornamentación han sido objeto de diversos estudios que los relacionan con la ecología de la especie, de forma que nos permite entender los hábitos de vida y sus adaptaciones al medio (defensa mecánica, camuflaje, capacidad para enterrarse, etc), así como su significado evolutivo (Nicol 1955, Seilacher 1984, Checa & Jiménez-Jiménez 2003a,b, Alyakrinskaya 2005). Además, las características morfológicas de las conchas y sus proporciones pueden aportar una valiosa información y servir de criterio a la hora de diferenciar entre especies (Selin 2007).

Reproducción

La reproducción en bivalvos es un proceso cíclico, que puede ser anual con uno o varios marcados momentos de actividad, o continuo, donde la actividad sexual de la población se distribuye de manera más o menos homogénea a lo largo del año. La reproducción puede dividirse en tres fases principales: a) desarrollo gonadal o gametogénesis; b) emisión de los gametos y fertilización; c) desarrollo y crecimiento. Estas fases, que se coordinan con los

cambios ambientales propios de las estaciones, dan lugar a los modelos reproductivos característicos de cada especie (Sastry 1979). De esta forma, se produce una sincronización de los periodos de puesta y de la duración de la actividad sexual con las condiciones ambientales más favorables para el desarrollo y crecimiento de las larvas.

Los bivalvos son generalmente especies dioicas, donde el dimorfismo sexual no es lo habitual, aunque se puede producir, como en el caso del género *Astarte* o *Montacuta* (Sastry, 1979). Sin embargo existen especies que muestran otro tipo de expresión de la sexualidad, de manera que podemos encontrar una variedad de tipos de hermafroditismo, el funcional o ambisexual (género *Pecten*, *Chlamys*, *Tridacna*, *Cardium*, etc.), el de sexualidad consecutiva (*Montacuta ferruginosa*, *Mercenaria mercenaria*), sexualidad consecutiva rítmica (*Ostrea edulis*, *Ostrea lurida*) y sexualidad alternante (*Crassostrea virginica*, *Cassostrea gigas*) (Coe 1943, 1945; Sastry 1979).

El aparato reproductor de los bivalvos no es complejo, encontrándose formado por un par de gónadas dispuesta de manera simétrica a ambos lados de la masa visceral y encontrándose en ocasiones fusionadas. Las gónadas aumentan su tamaño durante la maduración de los gametos de forma que llega a ocupar un volumen muy considerable dentro de la masa visceral del animal. En los bivalvos la gónada presenta un corto conducto de evacuación de los gametos que generalmente desemboca en la cavidad paleal, a nivel de la corriente exhalante.

Gametogénesis

La gametogénesis de los bivalvos ha sido ampliamente estudiada (Franc 1960, Dohmen 1983, Jong-Brink *et al.* 1983), mostrando una fuerte convergencia en los procesos de formación de gametos en todas las especies. En la gametogénesis se contemplan dos procesos, la ovogénesis que se produce en las hembras y la espermatogénesis en los machos. No obstante, existen casos de hermafroditismo donde aparecen los dos tipos de gónadas (masculina y femenina) en el mismo individuo (hermafroditismo simultáneo) o que se alternan en el tiempo (hermafroditismo secuencial). Algunas especies de bivalvos hermafroditas pertenecen a las familias Ostreidae, Pectinidae o Veneridae (Heller 1993).

Espermatogénesis

La espermatogénesis comienza con la división mitótica de la célula madre espermatogónica, dando lugar a 32 espermatogonias primarias, produciéndose una reducción del volumen citoplasmático. Estas células crecen y se dividen dando lugar a 64 espermatogonias secundarias, que se diferencian en espermatoцитos primarios, los cuales caen libres en el folículo. Subsecuentemente, dos divisiones meióticas dan lugar primero a 128 espermatoцитos secundarios, y posteriormente de manera muy rápida a 256 espermátidas haploides. Posteriormente las espermátidas entran en un proceso de espermiogénesis, que consiste en la diferenciación de éstas en esperma maduro (Dohmen 1983), el cual se concentra en el centro del lumen del folículo. Como la masa de espermatozoides aumenta, se produce un correspondiente descenso del número de células en estados primarios, por lo que los folículos se llenan eventualmente con espermatozoides (Tranter 1958).

Ovogénesis

Las fases iniciales de la ovogénesis son muy similares a las del proceso de espermatogénesis. Las células germinales primordiales dan lugar a ovogonias primarias, que se dividen cuatro veces dando lugar a 16 ovogonias secundarias. Éstas entran en la primera división meiótica pudiéndose formar ovocitos primarios, o pueden diferenciarse en células auxiliares.

La ovogénesis se divide en tres fases: a) fase premeiótica: es la fase temprana de la diferenciación de los ovocitos, durante la profase de la primera división meiótica. Al final de esta fase, la meiosis se detiene temporalmente, y durante el diplotene el ovocito comienza a crecer y a diferenciarse (Raven 1961); b) fase previtelogénica: se caracteriza por el crecimiento de los ovocitos, donde el núcleo y el citoplasma incrementan de volumen. El núcleo se hincha hasta formar una vesícula germinal cuyo volumen final es varias veces el del núcleo original. La elevada densidad de poros nucleares sugiere que existe una intensa actividad de transporte entre la vesícula germinal y el citoplasma (Dohmen 1983); c) Fase vitelogénica: el ovocito crece muy rápido debido a la acumulación de vitelo y otras sustancias nutritivas como glucógeno y lípidos. Durante la vitelogénesis la polaridad de los ovocitos se hace manifiesta por la migración del núcleo a una posición apical (Raven 1961, Selwood 1968). En bivalvos, los ovocitos forman un largo y estrecho pedúnculo que los conecta con la pared folicular

(Beams & Sekhon 1966). Los ovocitos que han completado su crecimiento se recubren de una membrana polisacárida, el corion, y se desprenden de la pared del alveolo tomando forma esférica y ocupando la luz de la gónada.

La anatomía del sistema reproductor así como los procesos y mecanismos reproductivos en bivalvos han sido objeto de extensos y profundos estudios (Lankester 1900, Franc 1960, Morton 1960, Galtsoff 1961, Allen 1963, Fretter & Graham 1962, Purchon 1968, Sastry 1979). No obstante, gran parte de la literatura existente a este respecto se refiere al desarrollo gonadal y a los periodos de puesta de especies que poseen valor comercial, estando encaminados a la gestión pesquera de especies objetivo, lo que permite establecer vedas, tallas mínimas y volumen máximo de captura para hacer un uso sostenible y asegurar la permanencia del recurso (Gosling 2003).

En los bivalvos existen diferentes patrones reproductores en función del tamaño que posee un ejemplar sexualmente maduro. Así, las especies que presentan tamaños superiores a 10 mm suelen emitir los gametos (tanto masculinos como femeninos) al medio externo donde se produce la fecundación. Una abundante emisión de gametos hace aumentar las probabilidades de fecundación y de que el desarrollo de alguno de los huevos llegue a término (r estrategias). Especies con tamaños inferiores a los 3 mm presentan generalmente un patrón incubador, debido a que son capaces de emitir un número mucho menor de huevos que sus parientes de mayor tamaño. Aquí el óvulo es fecundado en la cavidad paleal o en el espacio interbranquial de forma que los huevos eclosionan en estas cavidades para luego ser expulsados al medio externo a través de los sifones ya en forma larvaria, asegurando que toda la prole supere el estadio de huevo para llegar al de larva, aumentando las probabilidades de supervivencia (k estrategias). Incubación y pequeño tamaño suelen estar asociados, no solo en bivalvos sino también en diversos invertebrados marinos (Strathmann & Strathmann 1982), y la explicación a este fenómeno es que los individuos de mayor tamaño producen una cantidad de descendencia superior a la que serían capaces de incubar (Strathmann *et al.* 1984, Beekey & Hornbach 2004). Se ha puesto de manifiesto que ejemplares adultos de la familia Veneridae con un tamaño menor a 10 mm pueden incubar entre 50 y 250 huevos (Kabat 1985), mientras que otros con un tamaño menor de 6 mm solo son capaces de incubar entre 6 y 40 huevos (Kilgour & Mackie 1990).

En especies de tamaños intermedios, es decir entre tres y diez milímetros encontramos una serie de grupos donde el patrón reproductor a seguir no está claro, como es el caso de *Digitaria digitaria*. Quizá demasiado pequeñas para producir y afrontar el gasto energético que supone emitir miles de gametos, o demasiado grandes para adoptar una estrategia incubadora.

Parásitos

El estudio de los parásitos presentes en bivalvos y sus mecanismos de defensa es relativamente reciente, particularmente en relación con su incidencia en la reproducción o con mortandades en especies cultivadas. La investigación en este campo ha mostrado que cada grupo de moluscos es parasitado por conjuntos de organismos similares, desde virus hasta copépodos, pero solo alguno de ellos es capaz de producir enfermedades en sus hospedadores (Bower *et al.* 1994).

Una gran diversidad de protozoos y trematodos han sido descritos como parásitos de bivalvos, alojándose en diversos tejidos y órganos como la gónada, músculo, glándula digestiva, intestino, manto, branquias e incluso en la concha. Los parásitos y las enfermedades que provocan en los bivalvos han sido estudiados en profundidad, aunque normalmente de manera más intensa para aquellas especies que poseen valor comercial, ya que pueden llegar a ocasionar elevadas pérdidas en la industria acuícola (Burreson *et al.* 2000, Bower *et al.* 1994, Villalba 1995) y representar un problema de salud pública grave. Como ejemplo cabe citar que según datos de la página web <http://www.eurl-mollusc.eu/Main-activities/NRLs-network> del “European Union Reference Laboratory for Molluscs Diseases” las poblaciones de ostra plana (*Ostrea edulis*) de las Rías Gallegas se encuentran frecuentemente parasitadas por los protozoos *Bonamia ostreae* y *Bonamia exitosa*, que causan la muerte de las ostras cuando adquieren un tamaño suficiente para su comercialización. También pueden afectar a *Mytilus edulis* y *M. galloprovincialis*. Los protozoos *Marteilia refringens* y *M. maurini* se instalan en el epitelio de los palpos labiales, el estómago y la glándula digestiva de los bivalvos. Otro ejemplo de parásito en especies comerciales es el OsHV-1 (Oyster Herpesvirus tipo 1) cuya infección causa mortalidad en larvas y juveniles de *Crassostrea gigas*, *Ostrea edulis*, *Ruditapes decussatus*, *R. philippinarum* y *Pecten maximus* entre otros. *Nocardia crassostreae* (Actinomycete) infecta a

Crassostrea gigas y *Ostrea edulis*; *Perkinsus marinus*, (dinoflagelado) causa enfermedades con repercusiones económicas en *Crassostrea virginica*, mientras que *Perkinsus olseni* induce la formación de nódulos en branquias, intestino, glándula digestiva, riñones, gónada y el manto de diferentes especies de bivalvos, como *Ruditapes decussatus* y *R. philippinarum*.

En la familia Astartidae se han descrito diversos parásitos, como trematodos de la familia Bucephalidae, que parasitan principalmente el tejido gonadal; *Chlamydia* y *Rickettsia* aparecen en el epitelio del tracto digestivo como cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos o protozoos intracelulares en las células epiteliales del divertículo digestivo (Rudell 1977).

OBJETIVOS

La presente tesis doctoral está centrada en el estudio del astártido *Digitaria digitaria* (Linnaeus, 1758), para lo cual se han planteado los siguientes objetivos:

A) Con relación a la formación de la concha

1. Estudiar el origen y los procesos de formación del periostraco, su estructura y morfología, y esclarecer qué papel desempeñan los lóbulos medio y externo del borde del manto en su formación. Estudiar el mecanismo de formación de los alveolos del periostraco y su posible función.
2. Estudiar los procesos de formación de las costillas oblicuas y determinar la implicación del borde del manto en dicho proceso.

B) Con relación a morfología de las partes blandas

3. Realizar la descripción morfológica y anatómica de *D. digitaria*, identificando estructuras anatómicas que sean características de la familia y que puedan apoyar a la filogenia molecular.
4. Determinar diversidad, abundancia y frecuencia de los organismos que parasitan a *D. digitaria*, tanto en la concha como en las partes blandas del animal y evaluar en la medida de lo posible la afectación que estos tienen sobre el desarrollo del bivalvo.

C) Con relación a la biología

5. Esclarecer el patrón reproductor de *Digitaria digitaria*, una de las que podríamos llamar “especie frontera”, donde el tamaño compromete la emisión de los gametos. Establecer el sex-ratio y estudiar el ciclo reproductor de la especie haciendo énfasis en la gametogénesis y el mecanismo de fertilización.
6. Evaluar el crecimiento de la especie mediante el seguimiento de las cohortes a lo largo del periodo de tiempo estudiado y análisis de láminas delgadas. Determinar la longevidad de la especie.

ÁREA DE ESTUDIO

Situación Geográfica

La bahía de Barbate se localiza en la costa atlántica de la provincia de Cádiz, en las proximidades del Estrecho de Gibraltar ($36^{\circ} 10' N$ y $5^{\circ} 56' E$) (Figura 1.4). Dicha bahía se encuentra delimitada en su parte occidental por el Cabo de Trafalgar y en la oriental por la Punta Camarinal. Dentro de ella se halla el Parque Natural de la Breña y Marismas de Barbate (Ley 2/89 de 18 de julio; BOJA nº 60, de 27 de julio de 1989) el cual comprende una amplia zona marítimo-costera (5.077 ha.) de carácter rocoso entre Barbate y Cabo de Trafalgar. En la parte oriental de Barbate queda el pueblo de Zahara de los Atunes, situándose entre ambas zonas una extensa playa arenosa. La ciudad de Barbate se sitúa próxima a la zona de acantilados del Parque Natural, y a poca distancia de ella se encuentra una extensa marisma en la cual desemboca el río Barbate.

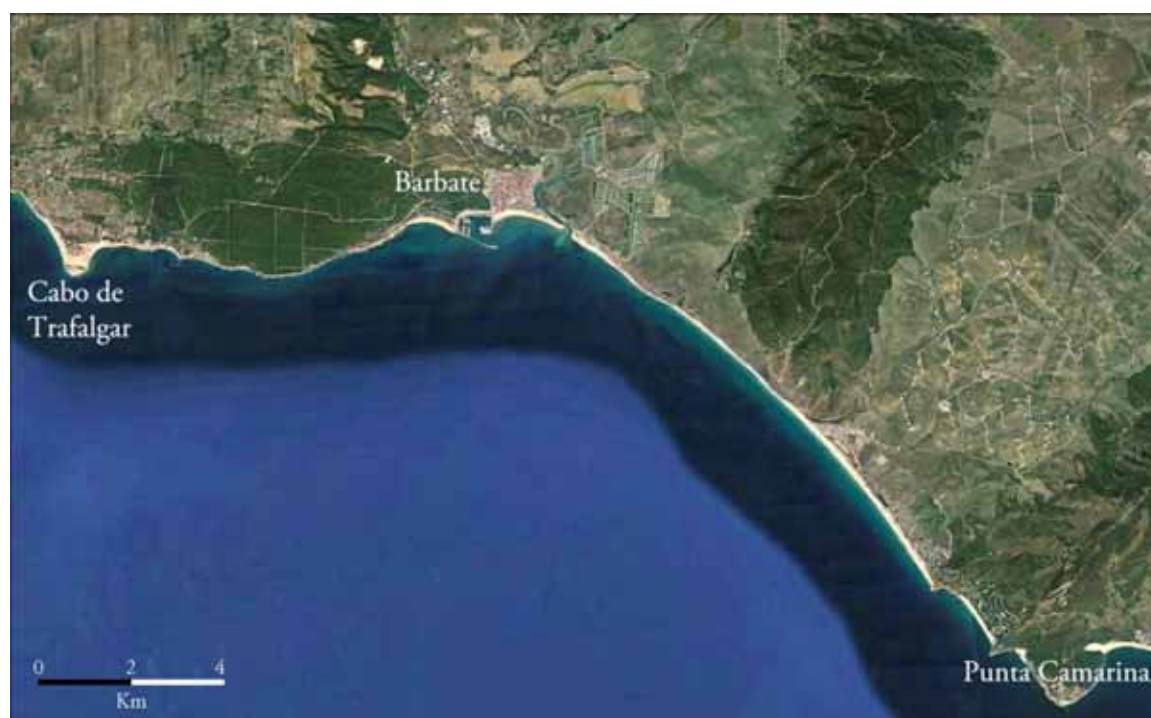


Figura 1.4. Área de estudio. Bahía de Barbate delimitada por el Cabo de Trafalgar y la Punta Camarinal.

Geomorfología y aspectos geológicos de la Bahía de Barbate

Desde un punto de vista geológico la Bahía de Barbate se encuentra incluida en la zona estructural Arco de Gibraltar, región geológica que corresponde a la cordillera que rodea el mar de Alborán, formada por la Cordillera Bética, el Estrecho de Gibraltar y el Rif. Bordeando a la bahía se encuentra un conjunto de sierras, encuadradas en el complejo tectónico-sedimentario Mioceno (Terciario), donde predominan los materiales de tipo arcilloso y calizo. En la zona costera del acantilado predominan los materiales provenientes de terrenos post-orogénicos, y cuya composición varía entre las biocalcarenitas correspondientes al Messiniense, dentro del Terciario, y las arenas cementadas, provenientes de dunas fósiles, encuadradas dentro del Plioceno Superior. Los terrenos post-orogénicos, que datan del Holoceno, son muy abundantes en la amplia playa que se extiende en gran parte de la bahía, encontrándose éstos en forma de arenas y conchas fósiles. Todos estos materiales procedentes de áreas próximas a la bahía tienen influencia en la composición del sedimento que se encuentra en sus fondos. La desembocadura del río Barbate atraviesa una amplia zona estuárica de tipo intermareal que conforma las marismas, en las cuales se han depositado principalmente limos y arenas correspondientes al Holoceno (Rueda 1998).

Fisiografía del fondo marino de la Bahía de Barbate

La plataforma costera, limitada por la isobata de 100 m. es amplia (entre 30 y 35 km) desde la desembocadura del río Guadalquivir y Chipiona hasta el Cabo de Trafalgar. No obstante se producen algunos estrechamientos a la altura de Barbate (14 km de anchura), frente a Punta Paloma (8 km de anchura) y en el tramo comprendido desde Tarifa hasta Punta Carnero (2 km de anchura). El rango de profundidades de la bahía de Barbate no suele sobrepasar los 35-40 metros (Rueda 1998), aunque la gran cercanía al Estrecho de Gibraltar propicia en algunas zonas costeras, como en Punta Camarinal, que se alcancen profundidades de 200 metros a sólo 4 millas de la costa. También es interesante resaltar la presencia de algunos bajos, tanto de componente rocoso como arenoso presentes en los fondos de la bahía.

En la bahía de Barbate aparecen fondos de diferente conformación, los cuales condicionan la fauna malacológica. El fondo de la bahía está compuesto en su mayoría por sustratos blandos, siendo abundantes los cúmulos de arenas erosionadas con presencia de componentes

detríticos costeros, así como restos de organismos o bioclastos de origen animal. Las muestras con los ejemplares de *Digitaria digitaria* que se han estudiado se colectaron en fondos de arena con valores de granulometría entre 0,19 y 1,3 mm (arena fina a gruesa). Este tipo de fondos suelen desarrollarse en la boca de bahías abiertas (Pèrés 1982), ya que en ellas suele haber una alternancia de periodos de corrientes en remolino, generadas principalmente por el viento, con periodos de sedimentación en condiciones de mar en calma. En la bahía, este tipo de fondos suelen ocupar zonas comprendidas entre los 15 y 30 metros de profundidad.

En la zona paralela a la playa de Pajares y de Barbate es interesante resaltar la presencia de una formación rocosa a una profundidad entre 10 y 15 metros, la cual posee forma de laja y separa una franja arenosa de playa de los fondos detríticos donde se obtuvieron las muestras para el presente estudio. En zonas cercanas a las marismas y a la desembocadura del río Barbate, entre 5–10 m, son abundantes los fondos de arena fina con alto contenido en fango, debido a los aportes terrígenos de dicho río y a la cercanía del puerto pesquero. Los fondos de tipo rocoso son abundantes en la zona de acantilados de Barbate, la cual se extiende desde el pueblo de Barbate hasta la zona del cabo de Trafalgar, conformando una extensa formación arrecifal de tipo rocosa con poca profundidad la cual origina un pedrero de gran interés faunístico. En las zonas de mayores profundidades, en torno a 100 metros, son numerosos los fondos compuestos por rellenos detríticos, siendo las zonas de profundidades superiores a 150 – 200 metros las ocupadas por fondos rocosos, situándose en áreas cercanas al Estrecho de Gibraltar.

Hidrografía

Hidrográficamente, la bahía de Barbate se encuentra en la confluencia de masas de agua atlántica y mediterránea, diferentes en cuanto a temperatura y salinidad. Los estudios hidrográficos de la zona se han centrado principalmente en el área del Estrecho de Gibraltar (Bernard 1956; Lacombe 1971; Fraga & Estabelier 1974; Minas *et al.*, 1984; Parrilla *et al.* 1986; Parrilla & Kinder 1987; Perkins *et al.* 1990; Millot 1999, 2009) y siempre en zonas de mar abierto, con lo que los datos a nivel costero son escasos.

En el Estrecho se establece una corriente constante superficial y otra profunda de direcciones opuestas, en un esquema de intercambio "bicapa" entre el mar Mediterráneo y el Océano

Atlántico. En superficie se registra un flujo hacia el Mediterráneo de agua atlántica, y a niveles profundos, una exportación hacia el Atlántico de agua mediterránea, más salina y más densa (Figura 1.5). La interfase que separa ambas capas se corresponde aproximadamente con la isohalina de 37,5 psu (‰), y se sitúa por regla general a profundidades de entre 100 y 150 m. El agua atlántica que ingresa por Gibraltar compensa el déficit hídrico del Mediterráneo. Por otra parte, el exceso de salinidad en la cuenca mediterránea es compensado por la exportación de Agua Levantina Intermedia y Mediterránea Profunda hacia el Atlántico (García *et al.* 1995). La compensación del déficit hidráulico mediterráneo supone un caudal medio circulante a través del Estrecho de aproximadamente 1 “Sverdrup” (10^6 m³/s), lo que equivale a un flujo permanente con velocidades máximas del orden de 50 cm/s (Lacombe & Richez 1982). Los regímenes de marea a ambos lados del Estrecho son sustancialmente distintos. En el Atlántico, las amplitudes características son superiores a 1 m y en el Mediterráneo, inferiores a 0,50 m. Las corrientes superficiales de agua atlántica (C.A.S.) se dirigen hacia el Este o Sudeste a lo largo de la costa española del Golfo de Cádiz, de una forma más o menos permanente, y va aumentando su velocidad según se va aproximando al Estrecho (Seoane–Camba 1965; Stevenson 1977).

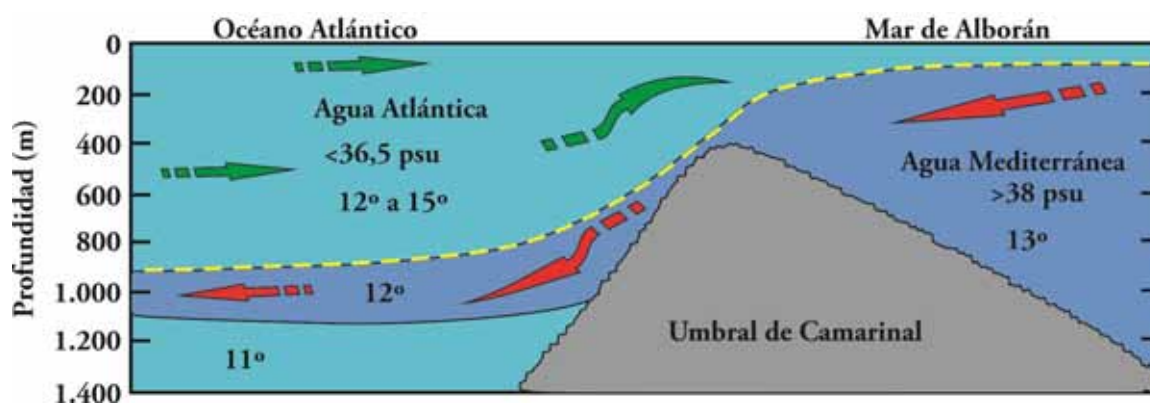


Figura 1.5. Esquema del intercambio de masas de agua Mediterránea y Atlántica a nivel del Estrecho de Gibraltar. La línea discontinua amarilla indica la interfase entre ambas masas de agua. Los datos de salinidad (psu) y de temperatura ($^\circ\text{C}$) son orientativos.

Esta corriente superficial se suele hacer más patente en verano, no obstante, el viento puede producir corrientes a favor y en contra, incluso crear nuevas corrientes, sobre todo con los temporales del Sudeste, los cuales originan corrientes Norte y Noroeste. La corriente

predominante en la zona de la bahía suele estar influenciada por los fuertes vientos de levante, los cuales suelen predominar frente al resto en las estaciones de otoño e invierno. Esto produce, en toda la bahía, importantes fenómenos de erosión costera, siendo la zona entre cabo de Trafalgar y Conil de la Frontera la única de acreción costera. La fuerte erosión influye en la composición granulométrica de los sedimentos en algunos puntos de la bahía. Las corrientes locales debidas a las mareas unida a la configuración geográfica de la bahía favorecen la formación de de remolinos en el seno de la misma.

Salinidad y Temperatura

En la zona costera de Barbate la salinidad varía a lo largo del año, aunque su media (34,27 psu) siempre se sitúa en valores inferiores a los de las zonas próximas como Tarifa o incluso Cádiz. Además, ésta presenta fluctuaciones estacionales intensas, probablemente debidas al aporte del río Barbate y sus crecidas invernales (Octubre a Diciembre) (34,68 psu) (Establier & Margalef 1964) y a la existencia de manantiales de agua dulce que recorren todo el acantilado al oeste del puerto (Seoane–Camba 1965). La temperatura superficial del mar (SST) es máxima en la estación estival, alcanzando sus máximos en julio y agosto con valores en torno a los 21 °C, y los mínimos en Febrero y Marzo alrededor de los 14 °C. Por su parte, las temperaturas registradas en las capas de agua cercanas al lecho marino (SBT) siguen esa misma tendencia, aunque sin superar los 20 °C durante el verano y con temperaturas similares a la SST durante el invierno, época de mezcla de la columna de agua.

Climatología general de la zona de estudio

La climatología de la zona es de tipo regular o moderado, caracterizándose por tener una temperatura ambiental con una media anual entre 17 y 18 °C, siendo los veranos no muy calurosos en torno a 24 °C de media, e inviernos no muy fríos con una media de 12 °C. Las lluvias son abundantes en otoño y en primavera, siendo más frecuentes que en las demás zonas de clima mediterráneo debido a la orografía del terreno. Los máximos anuales se alcanzan en los meses de noviembre y marzo con valores que rondan los 200 y 500 mm anuales respectivamente. Por ello la nubosidad, así como la humedad atmosférica, no suelen ser bajas. Con todo ello se podría incluir esta costa dentro del grupo de climas mediterráneos con veranos cálidos y secos e inviernos suaves, siendo las lluvias algo más abundantes, lo cual

confiere cierta similitud con el clima de tipo oceánico. Por otro lado, Seoane-Camba (1965) lo incluyen dentro de los climas regulares o moderados, en atención a la temperatura media anual, así como las bajas fluctuaciones temporales.

En relación a los vientos que soplan en la zona, estos suelen hacerlo mayoritariamente de componente Este o vientos de levante, con velocidades medias mensuales de 28 km/h, aunque en algunos días se pueden apreciar máximas de 61 km/h. Este hecho puede provocar variaciones en el sentido de la corriente general de las masas de aguas en esta zona del litoral gaditano y en el propio Estrecho de Gibraltar.

MATERIAL Y MÉTODO

Recolección de las muestras

El muestreo fue diseñado en el marco de un proyecto para el estudio de los invertebrados de fondos blandos de la bahía de Barbate (Proyecto DGICYT PB 92-0415) con el fin de analizar la influencia de la corriente Mediterránea sobre la fauna próxima al Estrecho del lado Atlántico. Se establecieron cuatro puntos de muestreo, repartidos entre dos zonas de la bahía separadas por una gran laja paralela a la costa, denominada Bajos de Zahara (Figura 1.6), que influye en la naturaleza de los fondos blandos, en cuanto a composición y granulometría.

Dos de los puntos de muestreo fueron situados frente a la playa de Zahara (zona denominada “Retín”), y los otros dos al otro lado de la laja, frente a la playa de Barbate (zona denominada “Barra”). A continuación se detalla la situación y se describen las características granulométricas de los cuatro puntos de muestreo:

Retín 12B: localizado a una distancia de 1,8 km de la costa, frente a la playa de Zahara ($36^{\circ} 8' 73''$ N – $5^{\circ} 53' 59''$ W). La profundidad registrada en este punto es de 22 metros aproximadamente. El sedimento presenta un contenido en materia orgánica del 0,35 % al 0,40 %. En este fondo predominan los bioclastos y la arena gruesa.

Retín 16B: también situado frente a la playa de Zahara a una distancia de costa cercana a los 3 km ($36^{\circ} 9' 02''$ N – $5^{\circ} 54' 08''$ W). La profundidad en este punto es de aproximadamente 29 metros. El contenido en materia orgánica esta entre el 0,40 % y 0,60 %. El sedimento está

compuesto por arenas mixtas, encontrando un alto contenido de grava, arena fina y algo de arena gruesa.

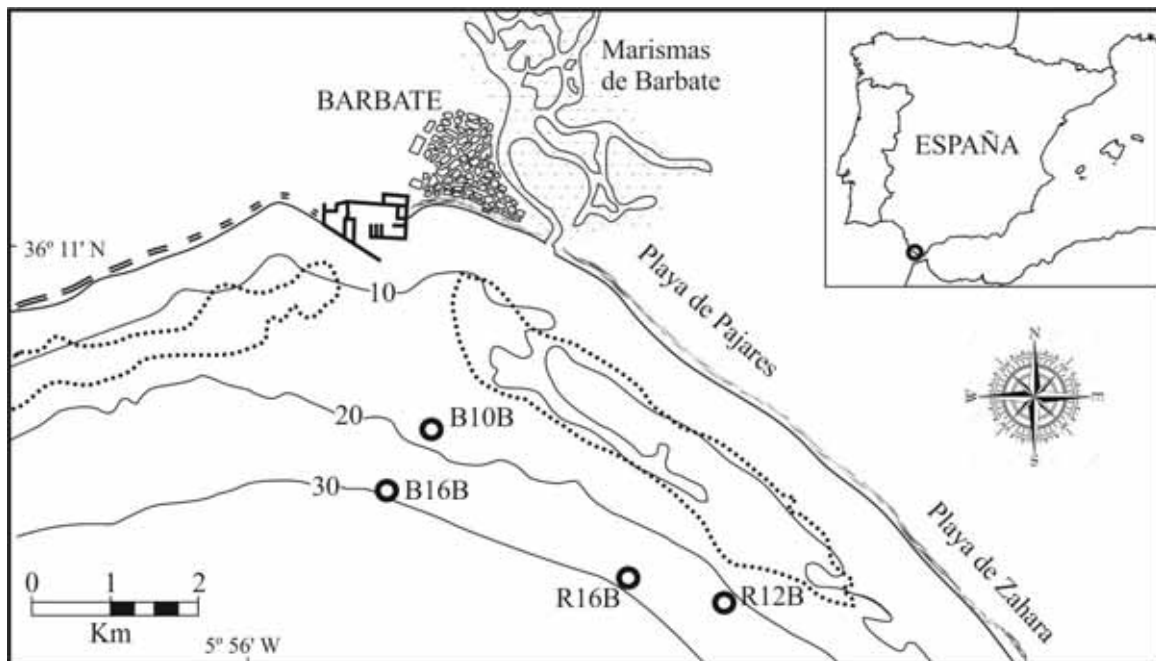


Figura 1.6. Mapa batimétrico del área de estudio, redibujado de Rueda 1998. Los anillos representan la localización de los puntos de muestreo y la línea discontinua la situación de las rocas en el fondo.

Barra 10B: se localiza frente a la playa de Barbate y a una distancia de costa de unos 2,5 km ($36^{\circ} 9' 71''$ N – $5^{\circ} 55' 04''$ W). Es el punto más cercano al puerto de Barbate y a las marismas. La profundidad es de unos 18 metros, y el contenido en materia orgánica oscila entre 0,80 % y 1,10 %. El sedimento está compuesto por arenas finas con algunos restos de origen zoógeno y cierta presencia de limos y arcillas por su proximidad al puerto y las marismas.

Barra 16B: el segundo punto situado frente a la playa de Barbate, a una distancia de costa de unos 3,5 km ($36^{\circ} 9' 24''$ N – $5^{\circ} 55' 19''$ W). La profundidad es de unos 28 metros y el contenido en materia orgánica en el sedimento está entre 0,70% y 0,80%. Posee un sedimento de características granulométricas parecidas al Retín 16, aunque con un contenido más alto en arenas finas y componentes bioclásticos de origen animal. Así encontramos un tipo de sedimento compuesto por arenas mixtas con una alta proporción de grava y arenas finas.

La mayor parte de los ejemplares de *D. digitaria* analizados en el presente estudio procede pues del material recolectado durante los muestreos efectuados en un estudio sobre la malacofauna asociada a los fondos blandos infralitorales de la bahía de Barbate (Cádiz) (Rueda 1998).

En su estudio, Rueda, tomó 95 muestras entre los 15 y los 30 metros de profundidad en los cuatro puntos de muestreo descritos anteriormente en el apartado “Puntos de muestreo” (Figura). Los muestreos se llevaron a cabo mensualmente, durante un periodo de 24 meses, desde octubre de 1993, hasta septiembre de 1995. La recogida de las muestras se realizó a bordo de un barco pesquero (6,6 metros de eslora) mediante una draga de roca de dimensiones 42 cm de ancho y 22,5 cm de alto, dispuesta con una doble red, siendo de 1,5 cm de luz de maya la externa y 0,45 cm de luz de maya la interna. Cada muestra se recogió arrastrando durante 15 minutos a una velocidad constante de 1 nudo. Las muestras recolectadas fueron fijadas en formaldehído en una concentración del 4 %.

Para el estudio de ciertos aspectos relacionados con la formación de la concha, fecundación y puesta de *D. digitaria*, fue necesaria la obtención de material adicional, que fue recolectado en el ZEC de Calahonda (Mijas), en fondos de bioclastos, a una profundidad de 15 metros (36° 29' 40" N – 4° 39' 46" W), mediante una draga de roca similar a la que se usó en Barbate.

Material examinado

A lo largo del estudio se procesaron un total de 3.919 ejemplares de *D. digitaria*, que se destinaron a diferentes objetivos y a los que se les aplicaron diferentes métodos de análisis (Tabla 1.1).

Algunos de los métodos de análisis han sido comunes a diferentes objetivos del estudio, como por ejemplo la histología, y otros sin embargo, han sido específicos para un objetivo concreto, como es el caso de la utilización de software especializado en el estudio del crecimiento. En este capítulo de Material y Métodos se describen los métodos de análisis comunes, no obstante, cada uno de los capítulos posteriores posee un breve resumen de la metodología general aplicada así como una descripción detallada del método de análisis específico empleado en cada caso.



Tabla 1.1. Número de ejemplares empleados en los diferentes estudios realizados por cada método de análisis aplicado.

Estudio	Método de análisis							Total
	Histología	Biomasa	TEM	SEM	Disección	Concha	FISAT	
Ciclo reproductor	701	1.589	4	4	10	-	-	2.308
Formación periostraco	7		5	5	-	-	-	17
Formación de costillas	40	-	-	10	-	768	-	818
Parásitos y epibiontes	732	-	-	-	-	1.571	-	2.303
Anatomía descriptiva	30	-	-	4	4	741	-	779
Crecimiento	-	-	-	-	-	-	3.861	3.861

Procesamiento de los ejemplares en el laboratorio

Una vez en el laboratorio, los ejemplares fueron anestesiados con $MgCl_2$, con el objetivo de producir la relajación de los músculos abductores y por tanto, la ligera apertura de las valvas, permitiendo así una mejor fijación del tejido al introducirlo en el fijador correspondiente. La naturaleza del fijador dependió de la técnica de estudio, se utilizó formaldehído al 4% para los ejemplares incluidos en parafina y glutaraldehído al 2,5% en tampón cacodilato (o PBS en algunas ocasiones) para ejemplares destinados a microscopía electrónica de transmisión.

Procesamiento de las partes blandas para el estudio histológico

En los ejemplares destinados al estudio histológico se separó las partes blandas de la concha, numerándose cada par de valvas. Posteriormente se midió la longitud (antero – posterior) y la altura (dorso–ventral) de la valva derecha de cada ejemplar. La parte blanda de los ejemplares previamente fijadas en formaldehído al 4% en agua de mar y deshidratadas en una batería de alcoholes de graduación creciente, se sometieron a un protocolo de inclusión en parafina con el fin de conseguir la consistencia adecuada del tejido. El protocolo de inclusión fue modificado para adaptarlo a la naturaleza de nuestra muestra (Anexo I, Tabla A1.1). Una vez hechos y tallados los bloques de parafina, se procedió a realizar cortes de 10 μm de grosor mediante un microtomo Leitz 1512.

En el caso del estudio del ciclo gonadal se seleccionaron aproximadamente 40 cortes seriados de la gónada de cada ejemplar, que se montaron en porta objetos para realizar las dos tinciones de base utilizadas en el estudio, hematoxilina de Carazzi–eosina y hematoxilina–tricrómico de V.O.F (Gutiérrez 1967) (Anexo I, Tablas A1.2 y A1.3). La hematoxilina–eosina es una tinción de rutina que permite distinguir detalles morfológicos de células y tejidos.

La hematoxilina tiñe estructuras ácidas (basófilas), como los núcleos celulares, en tonos azul y púrpura y la eosina, que se usa como contraste, tiñe componentes básicos (acidófilos), como las estructuras citoplasmáticas, en color rosa. El V.O.F. es una tinción de contraste formada por tres colorantes de carácter ácido, que tiñe componentes básicos de los tejidos. El citoplasma se tiñe de azul pálido por la presencia de proteínas básicas, los gránulos de yema de los ovocitos vitelogénicos y los eritrocitos se tiñen de amarillo (por afinidad con el colorante Orange-G, debido al alto contenido de proteínas básicas y hemoglobina respectivamente), la cromatina de verde azulado (por afinidad con el colorante Light Green), el nucleolo en rojo-anaranjado (por afinidad con la Fucsina Ácida y el Orange-G) (Gutiérrez 1967).

Inclusión en metacrilato

Un ejemplar se mandó incluir en metacrilato en el Centro Andaluz de Nanomedicina y Biotecnología (BIONAND). Para la inclusión en metacrilato las muestras fueron deshidratadas en pasos crecientes de alcohol y embebidas en Technovit 7200 VLC en 5 pasos, los tres primeros son mezclas con concentraciones crecientes de resina (30 Technovit (T) : 70 Etanol (EtOH) 100º; 50T : EtOH 50º; 70T : EtOH 30º) y los dos últimos con Technovit 7200 VLC puros.

En este punto los bloques fueron polimerizados, cortados con una sierra de banda recubierta de diamante (EXAKT 300 CP) y finalmente pulidos (EXAKT 400) con diferentes papeles abrasivos hasta obtener un grosor de corte de 50 µm. Los cortes se tiñeron con Azul de Toluidina (1%).

Aunque las tinciones PAS – Azul Alcian (Anexo I, Tabla A1.4) y Rojo de Alizarina (Anexo I, Tabla A1.5) han sido utilizadas de forma menos frecuente y, se ha recurrido a ellas de forma

puntual para determinar la composición de ciertas mucosustancias y la presencia de depósitos de calcio en las células, respectivamente.

La tinción PAS se utiliza frecuentemente para la detección de polisacáridos, mientras que el Azul Alcian demuestra la existencia de mucosustancias, de forma que la combinación de ambas se utiliza para la visualización selectiva de mucopolisacáridos ácidos. Con esta tinción los núcleos se ven de color azul, los polisacáridos y mucopolisacáridos neutros de púrpura, mientras que las mucosustancias ácidas se tiñen de un azul claro brillante.

Para la tinción de Rojo de Alizarina es necesaria la preparación previa de dos soluciones (A y B) y una tinción de contraste Light Green Sf Yellowish (Anexo 1, Tabla A1.6). En la preparación de la solución A se utilizará la cantidad necesaria de hidróxido de amonio (NH_4OH) para ajustar el PH de la solución a un valor de 6.

Procesamiento de la muestra para estudio mediante Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM).

Se seleccionaron ejemplares de pequeño tamaño, a los cuales se les diseccionó la parte del cuerpo que se quería estudiar: borde del manto, branquia o gónada, de la que se procesó una muestra de una superficie menor de $0,5 \text{ mm}^2$.

Los ejemplares se fijaron mediante una mezcla de 2% glutaraldehido y 4% paraformaldehido (1:1), tamponado con cacodilato (0,1 M, pH 7,4) durante al menos 4 horas a 48°C y post-fijado en OsO_4 (2%) durante 2 horas a 48°C . Algunas muestras que tenían que estar días en fijador (durante campañas oceanográficas) se fijaron en 2,5% glutaraldehido tamponado con PBS (0,1 M, pH 7,4). Posteriormente fueron embebidas en resina Anamed Epon 812 (EMS) para realizar cortes semifinos ($1 \mu\text{m}$) con ultramicrotomo (Leica Ultracut R) y cuchilla de vidrio, que se tiñeron con azul de toluidina al 1% en Bórax 1 % durante 15-20 segundos. En el caso de las secciones ultrafinas ($0,5 \mu\text{m}$) los cortes se realizaron con cuchillas de diamante DIATOME y fueron teñidas con acetato de uranilo (1%) durante un minuto seguido de citrato de plomo durante cinco minutos. Parte de las muestras se observaron en los Servicios Centrales de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada en un TEM ZEISS EM 10C y otras se observaron en los Servicios Centrales de Investigación de la Universidad de Málaga (SCAI) en un TEM JEOL JEM1400.

Procesamiento de la muestra para estudio mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) y Microscopía Electrónica de Emisión de Campo (FESEM).

Las muestras para SEM y FESEM fueron fijadas en formaldehído al 4%. Fueron previamente lavadas en agua destilada y deshidratadas en alcoholes de graduación creciente (70°/ 80°/ 96°/ 100°) permaneciendo las muestras unos 20 minutos en cada uno. Posteriormente las muestras fueron secadas a punto crítico en CO₂ y recubiertas con oro mediante pulverización catódica (SEM) o carbono (para FESEM). Para la observación y análisis de las muestras se utilizaron un SEM JEOL JSM-840 y un FESEM ZEISS GEMINI-1530. Algunas muestras histológicas, parcialmente seccionadas, también se prepararon para la observación de estructuras internas mediante SEM. Para ello se sumergieron en xilol (al menos 3 baños de 60 minutos cada uno) con el fin de eliminar la parafina del tejido, posteriormente se pasaron a alcohol absoluto (100°) antes de ser pasados por el punto crítico.

Ciclo gametogénico

Para el estudio del ciclo gametogénico de *D. digitaria* se procesaron un total de 2.308 ejemplares (Tablas 1.1 y 1.2). En la determinación histológica del ciclo gonadal se examinaron 30 ejemplares para cada mes (siempre que fue posible) durante un periodo de dos años (701 ejemplares) (Tabla 1.2). En cuatro casos el número de ejemplares mensual estudiados fue menor debido a la falta de material: octubre de 1993 (24 ejemplares), marzo de 1994 (24 ejemplares), marzo y septiembre de 1995 (24 y 29 ejemplares respectivamente). Los ejemplares estudiados oscilaron en un rango de tamaño entre los 1,5 mm y los 9 mm de longitud. Mediante el examen microscópico de la gónada de cada uno de los ejemplares se determinó el sexo y fase de desarrollo gonadal. Son numerosas las escalas de desarrollo gonadal propuestas por distintos autores tras la observación histológica de distintos bivalvos (Chipperfield 1953; Lubet 1959; Seed 1969; Boyden 1971; Wolowicz 1987). En el presente estudio se han encuadrado los distintos estados de desarrollo gonadal de los bivalvos de acuerdo con la escala propuesta por De Villiers (1975) para *Donax serra* Röding 1798, por ofrecer descripciones muy detalladas. El mencionado autor reconoce cuatro estados principales, alguno de ellos con más de una categoría. En la Tabla 1.3 se indica la

equivalencia con los estados de desarrollo gonadal propuestos por Seed (1969), Boyden (1971) y Wolowicz (1987).

Tabla 1.2. Número de ejemplares procesados para el estudio del ciclo gametogénico de *D. digitaria* para cada mes durante el periodo de estudio. CG, ciclo gonadal; PS, peso seco.

Mes	1993		1994		1995	
	CG	PS	CG	PS	CG	PS
Enero	-	-	30	100	30	100
Febrero	-	-	30	100	30	30
Marzo	-	-	24	0	23	0
Abril	-	-	30	100	30	100
Mayo	-	-	30	100	30	100
Junio	-	-	30	100	30	100
Julio	-	-	30	0	30	100
Agosto	-	-	30	100	30	100
Septiembre	-	-	30	100	30	0
Octubre	24	0	30	59	-	-
Noviembre	30	0	30	0	-	-
Diciembre	30	100	30	100	-	-
Total	84	100	354	859	263	630

Tabla 1.3. Relación entre la escala de desarrollo gonadal establecida por De Villiers y las propuestas por otros investigadores. G. Gónada; E. Emisión

Autores	Escala de desarrollo gonadal				
	Citolítico	Preactivo	Activo	Emisión	Postactivo
De Villiers (1975)					
Seed (1969)	G. descanso (0)	G. desarrollo (1,2,3)	G. madura (5)	G. emisión (4,3)	(2,1)
Boyden (1971)	G. Indiferenciada	Desarrollo	Gónada	E. reproductiva	G. reposo
Wolowicz (1987)	I	II	desarrollada III	IV	V

En el presente estudio hemos podido diferenciar cinco estados de desarrollo gonadal a lo largo del ciclo reproductor de *D. digitaria*:

Citolítico (C). El material reproductor es escaso o inexistente. Los folículos son muy pequeños y separados entre sí, apareciendo células fagocíticas dentro y fuera de los mismos. La gónada puede aparecer como un espacio vacío proveniente de la total regresión de los folículos. En los machos, las células germinales son escasas o ausentes y si las hay están en

proceso degenerativo. En hembras pueden aparecer restos de óvulos y lúmenes amplios vacíos.

Pre-activo (Pr). Los folículos son relativamente pequeños y separados entre sí por gruesas paredes foliculares, pero están bien formados. Las células germinales son abundantes pudiendo llenar completamente los folículos. En machos, las células germinales no son abundantes, predominando las espermatogonias, sin esperma maduro que no sea residual. En hembras, no suelen observarse ovocitos residuales, apareciendo periféricamente un número limitado de ovogonias de forma triangular y pequeños ovocitos que no llenan los folículos.

Activo (A). Los folículos son grandes, generalmente contiguos y con paredes bastante finas pero completas. Poseen por regla general gran cantidad de material reproductor en diferentes fases de madurez. En los machos, aparece una gran cantidad de esperma maduro, así como de otras células germinales en diferentes estados de desarrollo. De esta forma los lúmenes centrales de los folículos son pequeños o no existen. En hembras, predominan los ovocitos maduros ocupando la zona central de los folículos, y en la periferia pegados a las paredes foliculares ovogonias con diferente grado de madurez.

Emisión (E). Los folículos se encuentran aplanados, orientados hacia el centro de la gónada, con sus paredes rotas y abundante material reproductivo. En machos, en el interior de los folículos, se observa el esperma cayendo por el lumen central, mientras que otro situado en hileras radiales, se encuentra listo para ser liberado. En hembras, los folículos aparecen alargados y las paredes de muchos de ellos están rotas en su porción distal. Abundan los ovocitos maduros libres entre los folículos, aunque también se pueden ver ovocitos inmaduros pegados al fondo de los folículos.

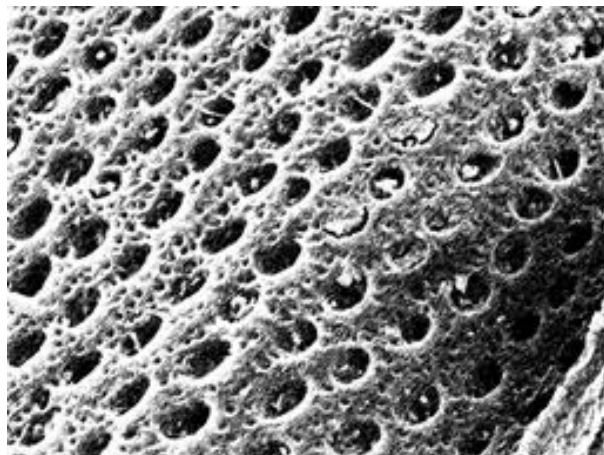
Post-activo (Ps). La cantidad de material reproductor en los folículos varía dependiendo de la intensidad de la puesta y del tiempo transcurrido desde que ésta tuvo lugar. De igual manera las paredes foliculares pueden aparecer enteras o parcialmente rotas. Aparecen células fagocíticas y es común encontrar signos de la formación de fascículos musculares transversos como reserva de glucógeno. En machos, aunque hay un número considerable de células germinales, no parece que los folículos estén llenos. Existe poca variedad de espermatogonias en diferentes estados de desarrollo y se pierde la disposición radial de éstas, desapareciendo el

lumen central. En hembras, el patrón folicular muestra un aspecto alterado y, aunque se encuentran células en prácticamente todas las etapas de desarrollo, son escasas. Predominan las ovogonias frente a los óvulos maduros.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

CAPÍTULO 2



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



EL PERIOSTRACO FORMACIÓN Y ESTRUCTURA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

INTRODUCCIÓN

El periostraco es la capa más externa de la concha de los moluscos, es fina y flexible, de carácter fibroso e impermeable. Tiene una composición orgánica compleja formada principalmente por escleroproteínas, mucopolisacáridos y lípidos. Actúa como matriz para la deposición de los cristales de carbonato cálcico que formarán las distintas capas de la concha, además evita su disolución en ambientes ácidos. Su grosor varía en cada familia de bivalvos, y parece estar relacionado con la escultura que presenta la concha (Harper 1997). Según Yonge (1957), el borde del manto en los bivalvos está compuesto por tres pliegues o lóbulos (externo, medio e interno), aunque en algunos de ellos, como los pertenecientes a la familia Veneridae, se pueden observar cuatro (Ansell 1961; Neff 1972) o cinco pliegues (García-Gasca & García-Domínguez 1995). En todos los bivalvos la formación del periostraco comienza en la base del surco periostracal, en la fila de células más interna del lóbulo externo del manto (Kawakami & Yasuzumi 1964, Saleuddin 1974), llamada “célula(s) basal(es)” por Kawaguti (1962), término utilizado también por otros autores (Bevelander & Nakahara 1967, Bubel 197, Richardson, Runham & Crisp 1981). Hay, sin embargo, controversia en cuanto al papel que desempeñan los lóbulos externo y medio del manto en la formación del periostraco. Algunos autores han postulado que el periostraco se origina a partir la superficie exterior del lóbulo medio (Field 1922, Tsujii 1960, Saleuddin & Petit 1983), pero otros (Kessel 1943, Yonge 1957, Beedham 1958, Bevelander & Nakahara 1967, Wada 1968, Neff 1972, Richardson *et al.* 1981) han considerado que es la superficie interna del lóbulo externo del manto la responsable de la secreción del periostraco, incluso en especies en las que éste se adhiere a la superficie exterior del lóbulo medio.

Las conchas de los astártidos se caracterizan por la presencia de un periostraco alveolado, descrito por primera vez por Ockelmann (1958), que lo utilizó para discriminar entre especies. Saleuddin (1965, 1974) estudió el periostraco de varias especies del género *Astarte*, aunque no indicó cómo se formaban los alveolos en el surco periostracal. Saleuddin (1965) llegó a la conclusión de que el periostraco de las especies del género *Astarte* era secretado por el lóbulo medio del manto, si bien en un estudio posterior (Saleuddin 1974) sugiere que la formación del periostraco es iniciada por las células basales, y posteriormente se va

engrosando principalmente por las secreciones celulares de la superficie interna del lóbulo externo del manto. Más recientemente, Taylor et al. (2005) sugieren que en *Eucrassatella donacina* (emparentada con los astártidos, ya que pertenecen a la misma superfamilia Crassatelloidea) el epitelio externo del lóbulo medio del manto podría ser responsable de engrosamiento y curtido del periostraco, concluyendo que el papel del lóbulo medio en la formación del periostraco necesita ser estudiado en mayor profundidad.

La familia Astartidae está particularmente bien representada en latitudes altas y de aguas frías gracias al elevado número de especies que aporta el género *Astarte* (Coan et al. 2000, Mikkelsen & Bieler 2008), mientras que en latitudes templadas son más frecuentes otras especies de pequeño tamaño, como *Digitaria digitaria* y *Goodallia triangularis*. *Digitaria digitaria* (Linnaeus, 1758) es un pequeño astártido con una distribución restringida al Atlántico oriental (de aguas más templadas) y mar Mediterráneo. Es abundante en fondos bioclásticos en el sur de España (Rueda & Salas 2003). Las conchas se caracterizan por una periostraco alveolado (Figura 2.1), similar a la observada en otros Astartidae, así como por la presencia de costillas oblicuas.

Los objetivos de este estudio fueron: (1) realizar una descripción morfológica general de la concha de *D. digitaria* así como de su microestructura; (2) abordar el origen del periostraco, su estructura y morfología, con el fin de dilucidar el papel del lóbulo medio y externo del manto en su formación; y (3) comprender el mecanismo de la formación de los alveolos presentes en el periostraco así como su posible función.

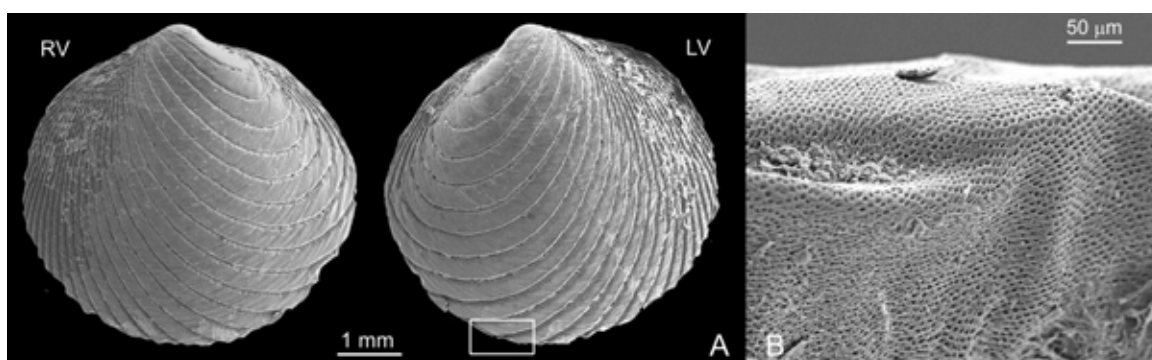


Figura 2.1. Concha de *Digitaria digitaria*. A, Imagen de SEM de la superficie externa de ambas valvas de la concha. B, recuadro de A, imagen de SEM del periostraco alveolado cubriendo el borde de la valva. Abreviaturas: LV, valva izquierda; RV, valva derecha.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se obtuvieron especímenes vivos de *D. digitaria* en el litoral de Mijas, (Málaga), sur de España (36°29.1'N–04°41.5'W) a 15 m de profundidad y en fondos de arenas finas con bioclastos. Se examinaron 23 ejemplares (Tabla 2.1) que se procesaron para cada método de análisis según los protocolos indicados en el apartado de Material y Métodos del capítulo primero del presente trabajo.

Tabla 2.1. Número de ejemplares de *D. digitaria* examinados para el estudio sobre la formación del periostraco, por tipo de análisis.

Estudio	Método de análisis			Total
	Histología	TEM	SEM	
Formación del periostraco	7	5	5	17

A fin de alterar lo menos posible la relación estructural natural entre el borde del manto y la concha debido al estrés, los ejemplares permanecieron en reposo con agua de mar durante una hora, después de la cual fueron anestesiados añadiendo al agua una solución isotónica de cloruro de magnesio (71 g de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ / litro de agua) antes de ser fijados.

Los ejemplares destinados a análisis histológicos se fijaron en formaldehído al 4% y se incluyeron tanto en parafina como en resina epoxi Anamed Epon 812 (EMS). De los ejemplares en parafina se realizaron secciones de 7 y 10 μm , y se tiñeron con hematoxilina-eosina y hematoxilina-tricrómico de V.O.F. De los ejemplares incluidos en resina se realizaron cortes semifinos (1 μm) que se tiñeron con azul de toluidina al 1%. En ambos casos los cortes se observaron con un microscopio óptico Nikon Eclipse E800. Algunas secciones de parafina se observaron con un microscopio confocal Leica MSF II.

RESULTADOS

Origen del periostraco

El periostraco en *D. digitaria* se origina en la base del surco periostracal (Figura 2.2). Una fina membrana, denominada “película” por Bevelander & Nakahara (1967), es secretada inicialmente en el espacio intercelular existente entre la fila de células basales del surco periostracal y la primera fila de células de los lóbulos externo y medio del borde del manto

(Figura 2.3). Las células basales carecen de microvellosidades, aunque en la membrana apical presentan abundantes invaginaciones. En su citoplasma, aparecen numerosas vesículas, que observadas mediante TEM, aparecen unas densas y otras claras y algunos pequeños canales que secreción.

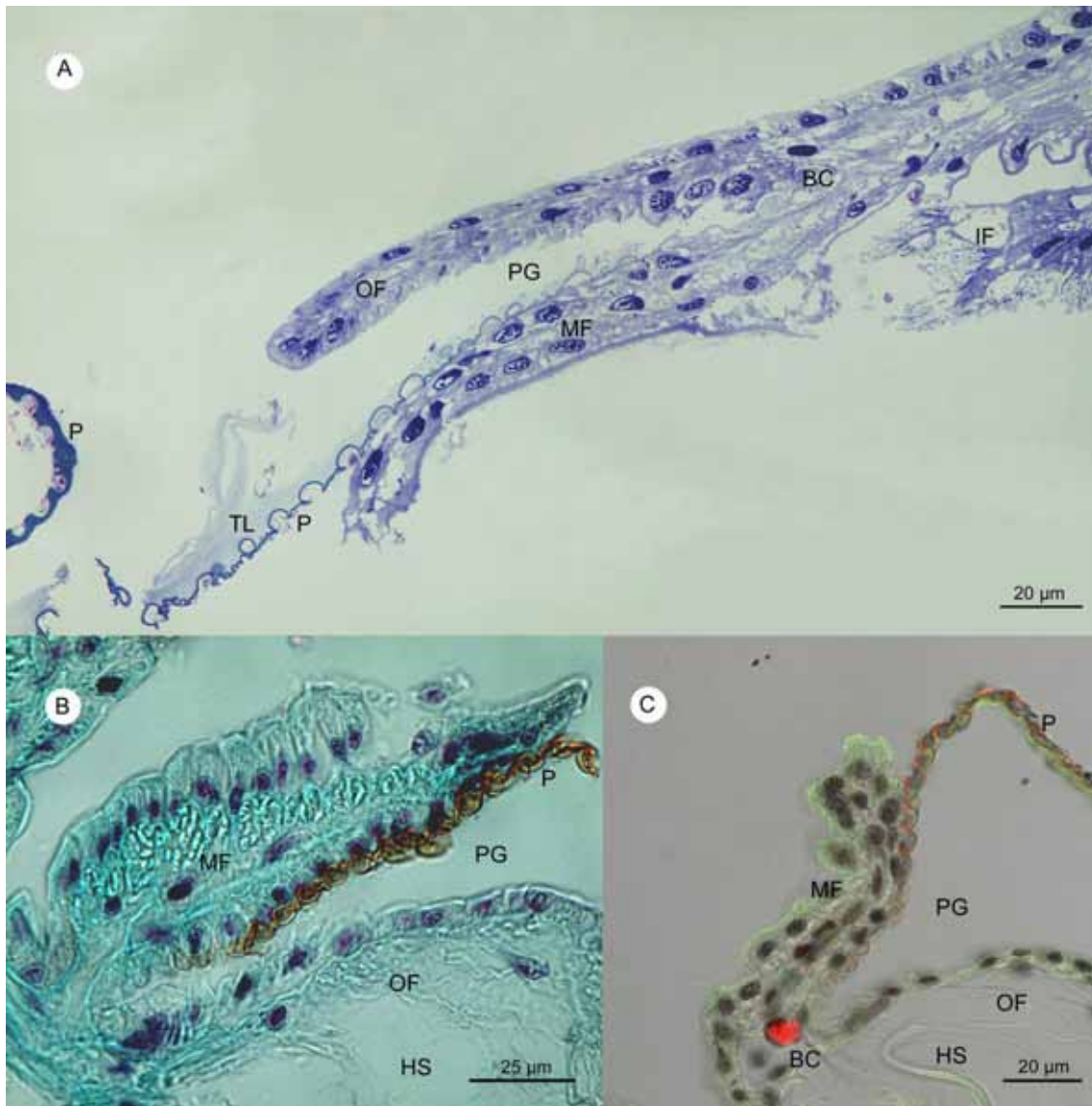


Figura 2.2. Sección transversal del borde del manto de *D. digitaria*. A, Sección semifina (1 μm) teñida con azul de toluidina donde se aprecia el surco periostracal con el periostraco adherido a la superficie externa del lóbulo medio del manto. B, Sección de parafina del surco periostracal teñida con tricrómico de V.O.F. donde se puede apreciar el periostraco curtido y ondulado, adherido a la superficie externa del lóbulo medio. C, Imagen de microscopio confocal de una sección transversal del surco periostracal teñida con tricrómico de V.O.F. donde se pueden observar las inclusiones de las células basales (rojo λ 570–700 nm; verde λ 500–550 nm). Abreviaturas: BC, célula basal; HS, espacio hemocélico; IF, lóbulo interno; MF, lóbulo medio; OF, lóbulo externo; P, periostraco; PG, surco periostracal; TL, capa translúcida.

Las tres primeras filas más internas de células epiteliales de la superficie interna del lóbulo externo del manto, son singulares, siendo de tipo columnar, más altas que el resto (Figura 2.2A). Las dos primeras muestran extensos procesos citoplasmáticos que se dirigen hacia atrás, en dirección a la célula basal (Figura 2.3A). Estas células poseen microvellosidades (a diferencia de las células basales), gránulos y diferentes tipos de inclusiones así como vesículas pinocíticas entre las microvellosidades. Estas características indican una función secretora muy activa. Las otras células epiteliales de la superficie interna del lóbulo externo del manto son de tipo cuboidal y también poseen microvellosidades, inclusiones, gránulos y vesículas pinocíticas (Figuras 2.2, 2.3A).

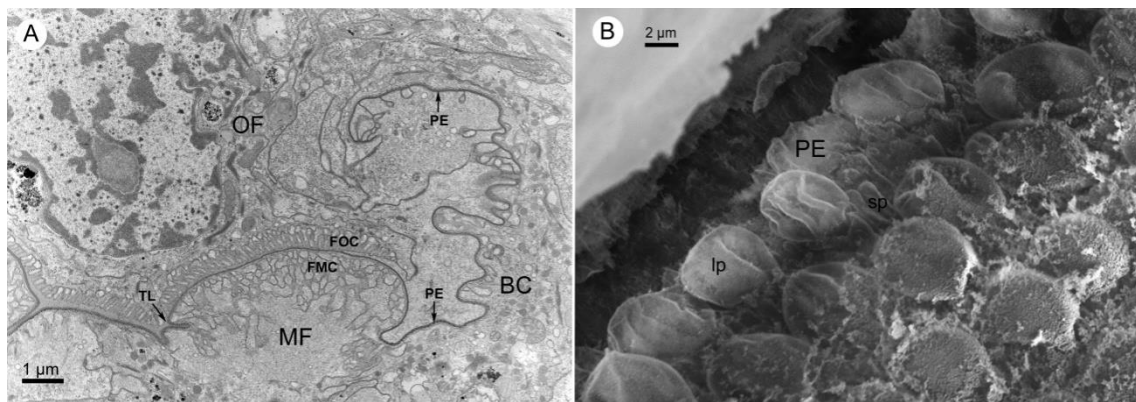


Figura 2.3. Periostraco incipiente en el fondo del surco periostracal de *D. digitaria*. A, Imagen de TEM de la célula basal secretando el periostraco incipiente (película) entre las dos primeras células del lóbulo externo e interno del manto. B, Imagen de SEM del fondo del surco periostracal donde se aprecia la formación de unas protuberancias que corresponden con los alveolos mayores y menores de la capa externa del periostraco. Abreviaturas: BC, célula basal; FMC, primera célula del lóbulo medio; FOC, primera célula del lóbulo externo; MF, lóbulo medio; OF, lóbulo externo; PE, película; TL, capa translúcida; lp, protuberancia de alveolo mayor; sp, protuberancia de alveolo menor.

Las células epiteliales de la superficie externa del lóbulo medio del manto son de tipo cuboidal y más bajas que las de la superficie interna del lóbulo externo del manto. En la mitad más profunda del surco periostracal poseen microvellosidades más cortas y en menor número (Figura 2.4), no obstante la mitad distal presenta densas y largas microvellosidades que conforman una superficie ondulada (Figura 2.5). Además, estas células presentan abundantes inclusiones y pueden apreciarse muchos microtúbulos (Figura 2.6). Observaciones mediante SEM revelan la presencia de penachos de cilios que se proyectan desde el borde distal del lóbulo medio del manto.

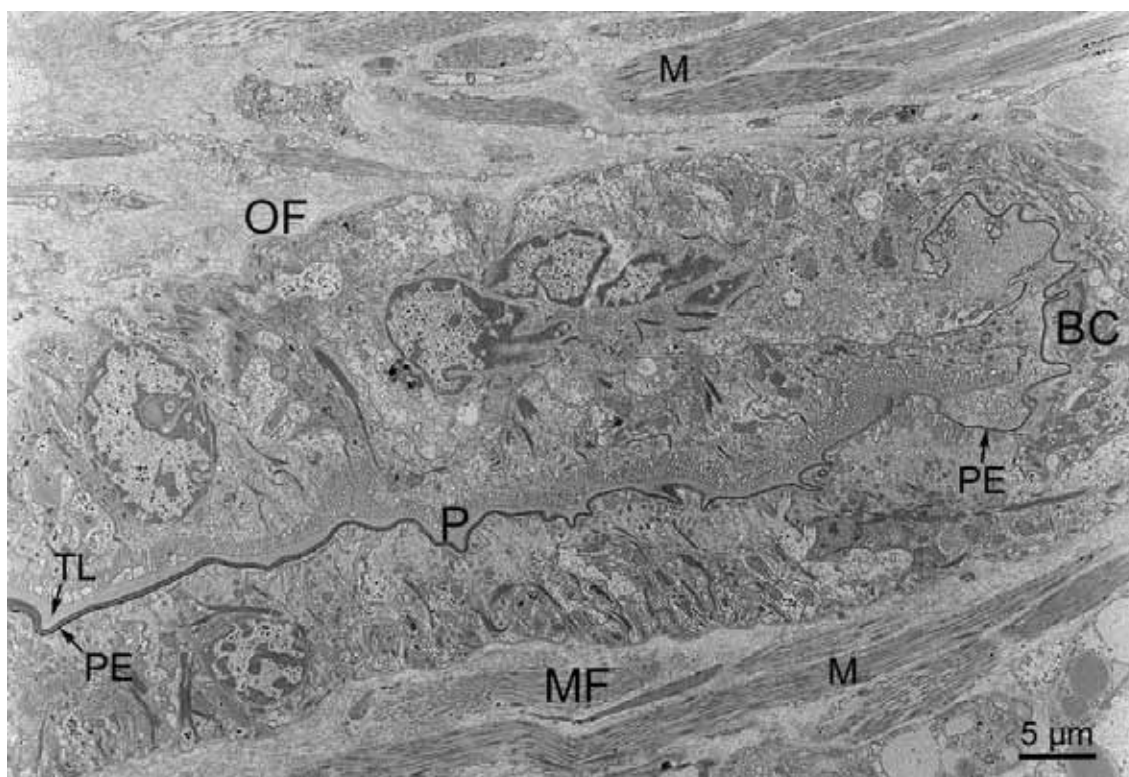


Figura 2.4. Imagen de TEM del periostraco discurriendo a lo largo de la zona profunda del surco periostracal de *D. digitaria*, mostrando su formación. Abreviaturas: BC, célula basal; M, fibras musculares; MF, lóbulo medio; OF, Lóbulo externo; P, periostraco; PE, película; TL, capa translúcida.

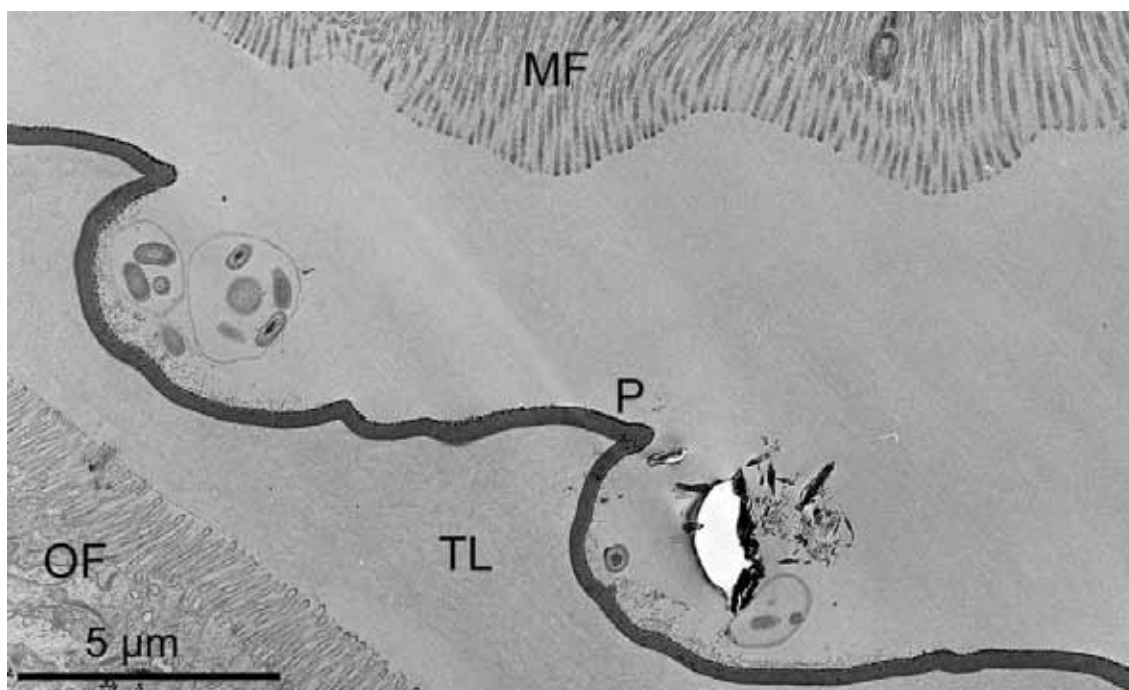


Figura 2.5. Imagen de TEM de la parte distal del surco periostracal de *D. digitaria* donde se aprecian los epitelios del lóbulo externo e interno densamente poblado de microvellosidades. El epitelio del lóbulo medio posee un perfil ondulado, mientras que el del lóbulo externo es plano. Abreviaturas: MF, lóbulo medio; OF, Lóbulo externo; P, periostraco; TL, capa translúcida.

Cada penacho ciliar está asociado a otra estructura formada esta vez por un largo cilio solitario (Figura 2.7A, B), pudiéndose observar unas depresiones circulares en las proximidades de estos órganos ciliados.

En el comienzo de su formación en las células basales, el periostraco parece estar estructurado en dos capas: *granular* y *homogénea oscura* (Figuras 2.3A, 2.6).

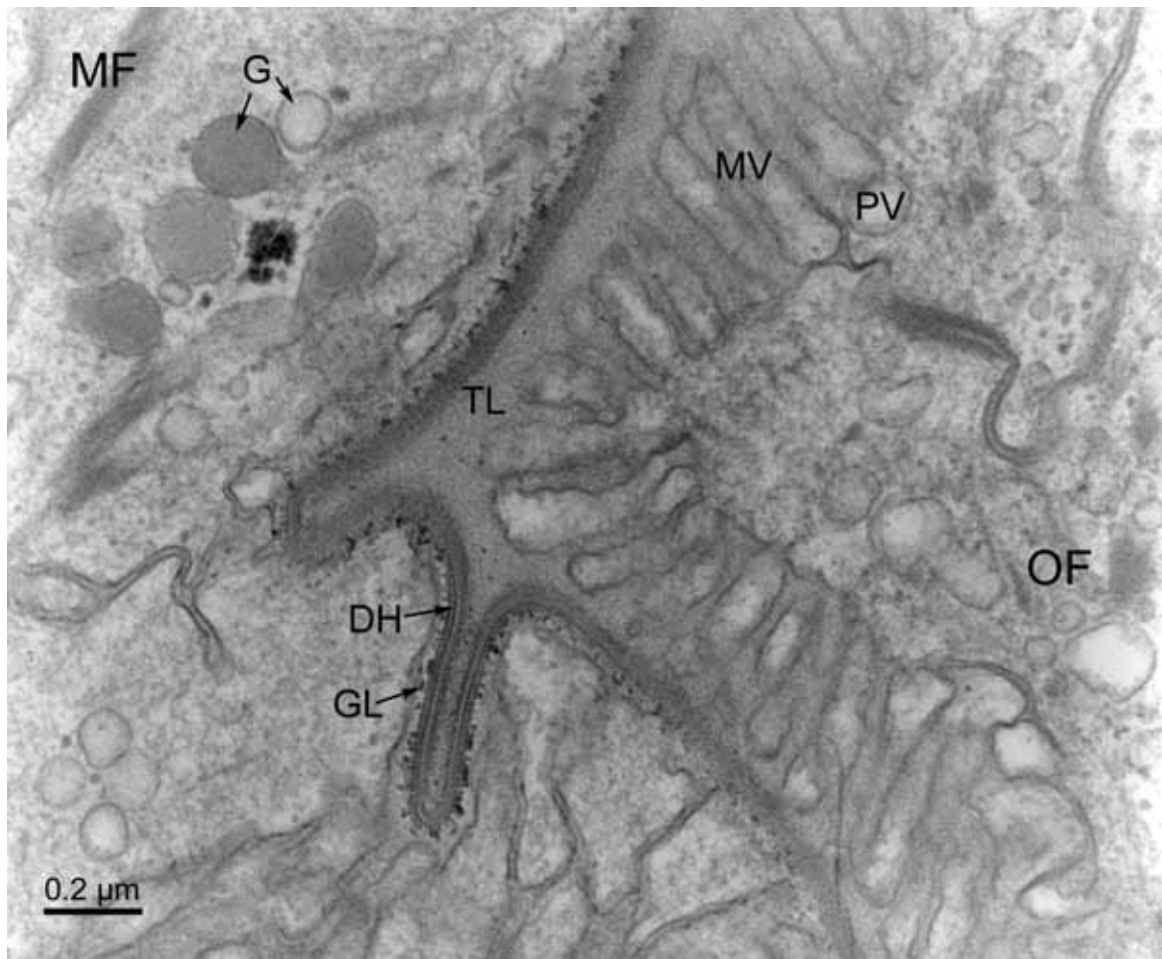


Figura 2.6. Imagen de TEM de la formación de la capa translúcida del periostraco en *D. digitaria*. El lóbulo externo del manto presenta numerosas microvellosidades conteniendo vesículas pinocíticas. En el lóbulo medio del manto aparecen abundantes vesículas con inclusiones, algunas de las cuales parecen ser glándulas secretoras dobles. Abreviaturas: DH, capa homogénea oscura; G, glándula secretora; GL, capa granular; MF, lóbulo medio; MV, microvellosidades; OF, lóbulo externo; PV, vesícula pinocítica; TL, capa translúcida.

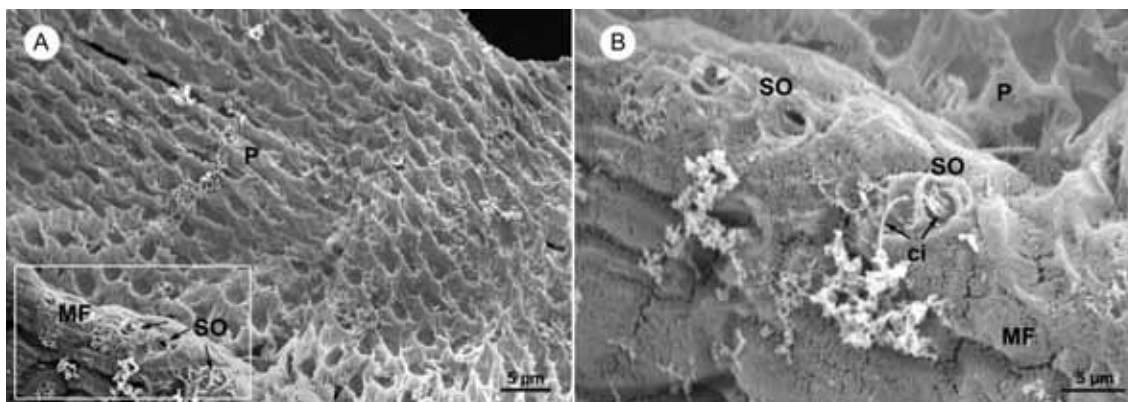


Figura 2.7. A, Imagen de SEM de la abertura de los órganos sensoriales presentes en la superficie externa del lóbulo medio del manto de *D. digitaria*. B, Detalle del recuadro de A. Imagen de SEM de las aberturas del órgano sensorial doble (penacho de cilios y cilio largo solitario). Abreviaturas: ci, cilio; MF, lóbulo medio; P, periostraco; SO, órganos sensoriales.

Posteriormente, en la parte más profunda del surco periostracal, la superficie interna del lóbulo externo del manto secreta una tercera capa translúcida que se añade a las dos anteriores. Esta capa compuesta por un material filamentoso laxo, se va engrosando a lo largo del surco periostracal (Figura 2.4). El grosor del periostraco incipiente (con dos capas), justo tras la síntesis de la célula basal es de unos 0,05 μm . Cuando la capa translúcida comienza a ser secretada el grosor del periostraco (incluyendo las capas granular, homogénea oscura y translúcida) aumenta hasta los 0,16 μm (Figura 2.6), llegando a alcanzar los 5 – 6 μm en la parte más distal del surco periostracal (Figura 2.5), donde la capa translúcida alcanza su máximo espesor. El espesor del periostraco se reduce posteriormente hasta los 2,5 μm en la parte libre de la periostraco, inmediatamente antes del inicio del proceso de calcificación (Figuras 2.2, 2.8).

El proceso de adelgazamiento del periostraco se debe aparentemente al curtido (o esclerotización) y compactado de la capa translúcida, la cual se va transformando progresivamente en capa *oscura*. El engrosamiento de la capa oscura a expensas del curtido de la capa translúcida parece ocurrir dentro del surco periostracal (Figura 2.4).

No está claro si las secreciones de las células epiteliales de la superficie externa del lóbulo medio del manto contribuyen al engrosamiento, o si este se produce exclusivamente debido al curtido de la capa translúcida, como se observa en la parte distal del surco periostracal y en la porción de periostraco libre fuera del surco periostracal (Figuras 2.2B, 2.9). La persistencia de

los alveolos del periostraco durante todo el proceso de engrosamiento parece apoyar la segunda posibilidad. La película membranosa original (periostraco incipiente) secretada por la fila de células basales (Figura 2.3B) y formada por una bicapa fibrosa se corresponde con la capa externa alveolada del periostraco (Figura 2.10).

Formación de los alveolos

El periostraco se caracteriza por presentar una superficie alveolada, donde se pueden diferenciar alveolos de mayor tamaño (5 – 6 μm) distribuidos de manera uniforme por todo el periostraco, entre los cuales aparecen otros más pequeños (< 1 μm) y abundantes aunque distribuidos de forma más irregular (Figuras 2.3B, 2.10). Los primeros coinciden exactamente con la forma de las protuberancias existentes en las células de la primera fila de la superficie externa del lóbulo medio del manto (Figuras 2.2A, 2.3), que se encuentran perfectamente alineadas a lo largo del surco periostracal.

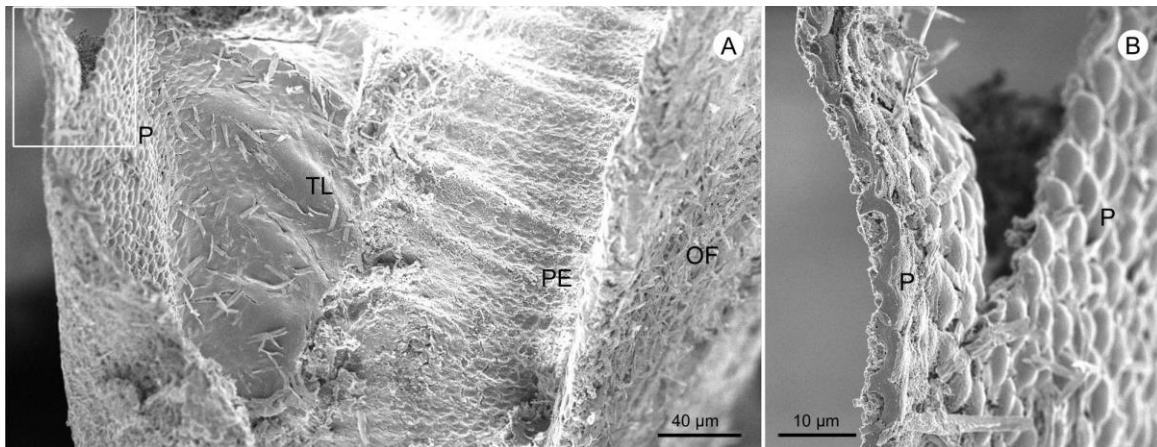


Figura 2.8. Imagen de SEM del periostraco de *D. digitaria* en el surco periostracal, adherido a la superficie externa del lóbulo medio del manto. A. Vista del periostraco incipiente (película) y comienzo de la secreción de la capa translúcida. B. Detalle del recuadro de A. Periostraco libre de la zona distal del surco periostracal. Abreviaturas: OF, lóbulo externo; P, periostraco; PE, película; TL, capa translúcida.

Posteriormente, los alveolos se rellenan con un material mucoso producido por las células de la superficie externa del lóbulo medio del manto, y que incorpora microorganismos de tipo bacteriano que quedan confinados en estas cavidades (Figura 2.9B). Las microvellosidades presentes en la superficie externa del lóbulo medio del manto forman ondulaciones que también se ajustan a la forma de los grandes alveolos del periostraco, aunque en este caso lo

hacen de una forma menos estricta que la observada en las células de la primera fila del surco periostracal (Figura 2.5).

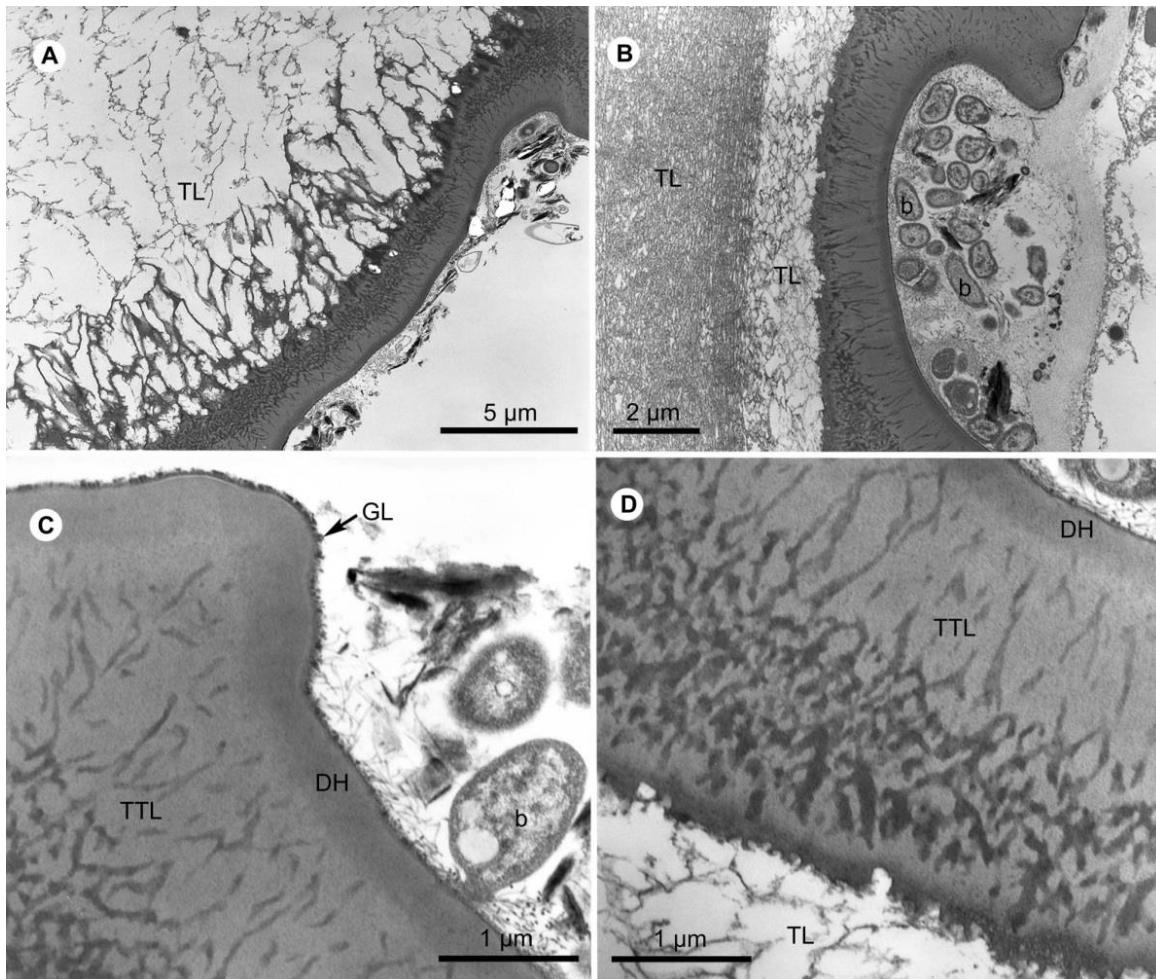


Figura 2.9. Imagen de TEM de una sección transversal ultrafina del periostraco libre de *D. digitaria*, donde se observa el proceso de curtido de la capa translúcida sobre la cara interna de la capa homogénea oscura. A, Vista general. B, Detalle del alveolo periostracal mostrando en su interior microorganismos de tipo bacteriano; la capa translúcida muestra diferentes grados de curtido que responden a sucesivos procesos. C, Magnificación de la capa granular cubriendo la capa homogénea oscura. La capa translúcida muestra un reticulado de fibrillas. D, Adición de material para formar la capa translúcida, que será finalmente incorporado a la zona curtida de la capa translúcida. Abreviaturas: b, bacteria; DH, capa homogénea oscura; GL, capa granular; TL, capa translúcida; TTL, capa translúcida curtida.

Cuando se produce la separación del periostraco de la superficie externa del lóbulo medio del manto, los alveolos de mayor tamaño retienen el contenido mucoso con el que fueron rellenos.

Los alveolos más pequeños, que rodean a los grandes, también surgen en el inicio de la formación del periostraco (Figura 2.3B). Las microvellosidades de las células epiteliales presentes en la zona interna del lóbulo externo del manto presentan una superficie plana, sin ondulaciones (Figura 2.5), y sus secreciones forman la capa translúcida, que nivela la superficie interna del periostraco (Figura 2.11A).

DISCUSIÓN

La célula basal y su relación con el periostraco incipiente

La formación del periostraco en *D. digitaria* comienza en el fondo del surco periostracal gracias a las secreciones de una fila de células basales (siguiendo la nomenclatura de Kawaguti (1962), que forman una capa densa, y que se ha llamado “película” por Bevelander & Nakahara (1967). La película persiste entre la primera fila de células epiteliales externa del lóbulo medio e interna del lóbulo externo del manto. Algunos autores, como Kawakami & Yasuzumi (1964), consideran que el periostraco incipiente de *Pinctada imbricata* (= *P. martensii*) se origina a partir de un pliegue basal del lóbulo externo del manto, sin llegar a contactar con el lóbulo medio. Sin embargo, una (Bevelander & Nakahara 1967, Bubel 1973, Jabbour-Zahab *et al.* 1992) o dos (Bubel 1973) filas de células basales han sido observadas en diferentes especies de bivalvos. La célula basal ha sido considerada como la primera célula del lóbulo externo del manto por Saleuddin (1974, 1979) y Paillard & Le Pennec (1993).

La célula basal en *D. digitaria* se sitúa en el fondo del surco periostracal entre la primera fila de células de los lóbulos medio y externo del manto (Figuras 2.2C, 2.3), de esta forma resulta difícil asignar su pertenencia a uno u otro lóbulo. En ese punto el periostraco se encuentra formado por dos capas (Figuras 2.3, 2.6) como observó Saleuddin (1974) para el género *Astarte* y Bevelander & Nakahara (1967) para *Macrocallista*. En imágenes de TEM se observa la disposición de gránulos sobre la película de *D. digitaria*, por lo que la hemos llamado “capa granular”, que se corresponde con la capa más externa del periostraco (Figuras 2.6, 2.9) y es similar a los gránulos observados por Neff (1972) en *M. mercenaria*. Saleuddin (1974) no da constancia de esta capa granular en *Astarte*, pero sí observó una capa “membranosa” y otra “homogénea oscura”. Consideramos que el periostraco incipiente ya posee la capa granular,



que se adhiere a la superficie externa del lóbulo medio del manto, y a una segunda capa más interna, la homogénea oscura (Figuras 2.6, 2.9). La tercera capa, la translúcida (Figuras 2.2A, 2.4, 2.6, 2.9), aparece, como describe Saleuddin (1974) para algunas especies de *Astarte*, en las proximidades de la tercera fila de células de la superficie interna del lóbulo externo del manto (Saleuddin 1979).

Implicación de las funciones del lóbulo externo y medio del manto en la formación del periostraco

Ha habido mucha controversia sobre cuál es el responsable de la formación del periostraco, si el lóbulo externo del manto o el lóbulo medio. En el presente estudio, se observó que el periostraco de *D. digitaria* se adhiere a la superficie externa del lóbulo medio del manto en su paso a través del surco periostracal, y se engrosa por la adición de secreciones producidas por las células epiteliales de la superficie interna del lóbulo externo del manto (Figuras 2.2A, 2.4). Esta característica había sido observada previamente en otros bivalvos de los géneros *Astarte* (Saleuddin 1965, 1974), *Mercenaria* (Neff 1972) y *Macrocallista* (Bevelander & Nakahara 1967). De acuerdo con Neff (1972), las células epiteliales del segundo (medio) lóbulo del manto son las que proporcionan soporte al periostraco y le ayudan en su desplazamiento a través del surco periostracal.

Saleuddin (1965) hizo hincapié en la participación del lóbulo medio del manto en la formación del periostraco, pero más tarde (Saleuddin 1974) consideró que las células epiteliales del lóbulo medio del manto secretaban una sustancia adhesiva o lubricante que permitía el control del movimiento del periostraco a lo largo del surco periostracal, en lugar de contribuir a su engrosamiento. De acuerdo con su observación revisada, la unión temporal del periostraco a las células de la superficie externa del lóbulo medio del manto, permitiría la deposición de la capa translúcida por las células epiteliales de la superficie interna del lóbulo externo del manto, pudiendo ser contralada con precisión. Bevelander & Nakahara (1967) observaron la secreción de una sustancia amorfa por las células epiteliales de la superficie externa del lóbulo medio del manto en *Macrocallista*; y consideraron que esa sustancia ayudaba a mantener el periostraco a cierta distancia de las microvellosidades y además facilitar así su movimiento.

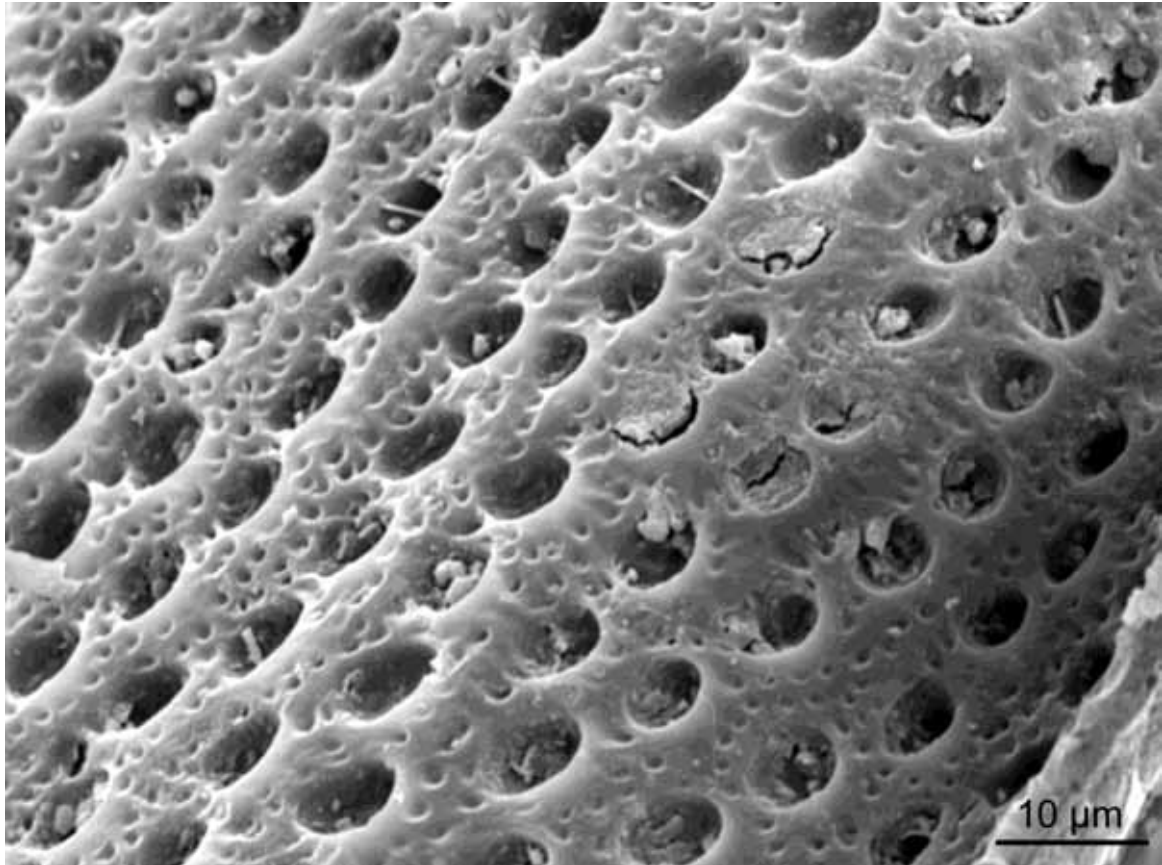


Figura 2.10. Imagen de SEM de la capa externa alveolada del periostraco de *D. digitaria*.

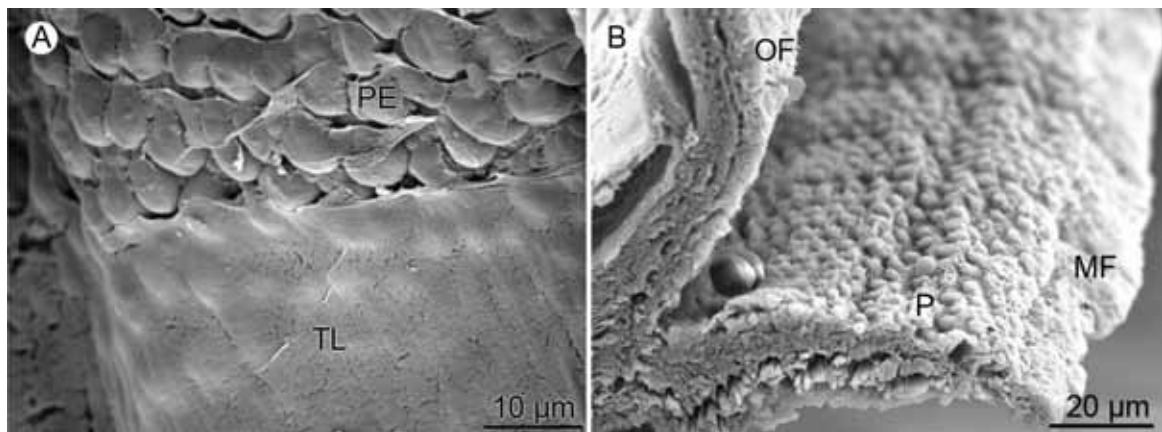


Figura 2.11. A, Imagen de SEM del periostraco de *D. digitaria* donde se aprecia la capa translúcida enrasando la superficie interna de la capa homogénea oscura. B, Imagen de SEM del surco periostracal de *D. digitaria* mostrando la cara interna “pavimentada” del periostraco adherido a la superficie externa del lóbulo medio del manto. Abreviaturas: MF, lóbulo medio; OF, lóbulo externo; P, periostraco; PE, película; TL, capa translúcida.

Richardson *et al.* (1981) además sugirieron que el periostraco incipiente en *Cerastoderma edule* (a nivel de las células basales) se adhería a las microvellosidades del lóbulo medio del manto mediante las secreciones producidas por las células del mismo lóbulo que revisten el surco periostracal, pero que el engrosamiento del periostraco era debido a las secreciones del epitelio interno del lóbulo externo del manto.

García-Gasca & García-Domínguez (1995) atribuyeron la reacción positiva de la tinción de PAS sobre el lóbulo medio del manto de *Megapitaria squalida* y *M. aurantiaca* a secreciones mucosas. En *Eucrassatella donacina*, Taylor *et al.* (2005) observaron que la fina y externa capa del periostraco se adhería estrechamente con la superficie externa del lóbulo medio del manto. El periostraco de estas especies presenta un aspecto dentado, con largas extensiones ortogonales que se ajustan estrechamente a invaginaciones o hendiduras presentes en la superficie epitelial externa del lóbulo medio del manto (Taylor *et al.* 2005: figuras 2.9, 2.10). Estos autores señalan que desde el momento en el que la capa externa del periostraco dobla su grosor a lo largo del surco periostracal, el epitelio externo del lóbulo medio del manto es el responsable del engrosamiento adicional así como del curtido de la capa. En *E. donacina* el periostraco sufre además un engrosamiento debido a la secreción de sucesivas capas fibrosas por las células epiteliales de la superficie interna del lóbulo externo del manto (Taylor *et al.* 2005).

El periostraco es secretado en forma de un precursor soluble, la periostracina (Waite *et al.* 1979), que debe unirse con difenoles y ser catalizado por la tirosinasa (o fenoloxidasa) para formar el periostraco insoluble (Saleuddin & Petit 1983, Waite 1983, Jabbour-Zahab *et al.* 1992). En la Figura 2.2 C se observa un corte transversal de *D. digitaria*, teñido con hematoxilina y VOF (verde luz + orange G + Fucsina A) visto en el microscopio confocal en el que se observa fluorescencia roja en las células basales con luz verde (546 nm). Se sabe que la fucsina se une al colágeno y a otras proteínas que contengan aminoácidos básicos (Nielsen *et al.* 1998) y que la fucsina muestra fluorescencia de color rojo a 546 nm (Varea *et al.* 1998), lo que apunta a que en la célula basal se debe secretar proteínas con aminoácidos básicos. Puesto que la periostracina es una proteína básica, insoluble en agua (Waite *et al.* 1979), probablemente sea esta proteína lo que da la fluorescencia roja en la célula basal.

Beedham (1958) indicó que había detectado la actividad de la fosfatasa alcalina en el epitelio interno del lóbulo externo del manto, y Hillman (1961) propuso que la sustancia producida por las células secretoras presentes bajo el epitelio interno del lóbulo externo del manto en *Mercenaria mercenaria*, era en realidad un precursor del agente curtidor del periostraco. Sin embargo, Zhang *et al.* (2006) consiguieron clonar una nueva tirosinasa propia de *Pinctada fucata*, denominada OT47, que se expresaba específicamente en las células del epitelio externo del lóbulo medio del manto, lo que sugiere su participación en la formación del periostraco o en su proceso de curtido. A pesar de que en *D. digitaria* se han observado algunas estructuras glandulares en las células epiteliales de la superficie externa del lóbulo medio del manto (Figura 2.6), no se ha observado que se produzca un engrosamiento de la capa granular que se adhiere a dicho epitelio. Es necesario estudiar si las secreciones que producen esas estructuras son capaces de penetrar en la capa homogénea oscura y actuar como un agente de curtido del periostraco.

Morfología de los alveolos y movimiento del periostraco a través del surco periostracal

Los procesos o prolongaciones citoplasmáticas de las dos primeras filas de células de la superficie interna del lóbulo externo del manto son similares a las encontradas en especies del género *Astarte* (Saleuddin, 1979). Este autor propuso que su función era la de guiar al periostraco incipiente desde su salida de la célula basal hasta el surco periostracal y, probablemente, unirlo al epitelio externo del lóbulo medio del manto, lo que le permite al periostraco ser empujado lentamente a lo largo del surco periostracal hacia el exterior. Hemos descrito como la primera fila de células del epitelio externo del lóbulo medio del manto sirve como molde para la formación de los alveolos de mayor tamaño (Figuras 2.2A, 2.3B), que posteriormente retendrá esa forma a lo largo de su camino por el surco periostracal (Figuras 2.11B, 2.12). La parte distal del epitelio exterior del lóbulo medio del manto muestra una superficie con ondulaciones formadas por microvellosidades, que encajan en los alveolos del periostraco, a modo de engranaje, lo que facilita su desplazamiento (Figura 2.5). Los alveolos pequeños se formarían por la acción de protrusiones celulares menores, que deberían ser temporales, dado que su patrón de distribución no se mantiene a lo largo de una dirección radial dada (Figura 2.3B). El tamaño, la forma y la distribución de los alveolos mayores del

periostraco implican que su movimiento a lo largo del surco periostracal se produce por pulsaciones (ver Figura 2.13 para la explicación).

De hecho, el seno del lóbulo medio del manto, entre los epitelios externo e interno, está surcado por numerosas fibras musculares (Figura 2.4), que mediante su contracción y distensión podrían ser las responsables de los movimientos pulsátiles que conducirían al periostraco a través del surco periostracal. Estos pulsos podrían estar controlados por los órganos sensoriales presentes en el borde distal del lóbulo medio del manto, el cual es típicamente sensorial en los bivalvos. Según Owen & Mc Crae (1979) este tipo de órganos sensoriales funcionan como mecanorreceptores sensibles y multidireccionales, así como quimiorreceptores debido a la presencia de aberturas glandulares cercanas.

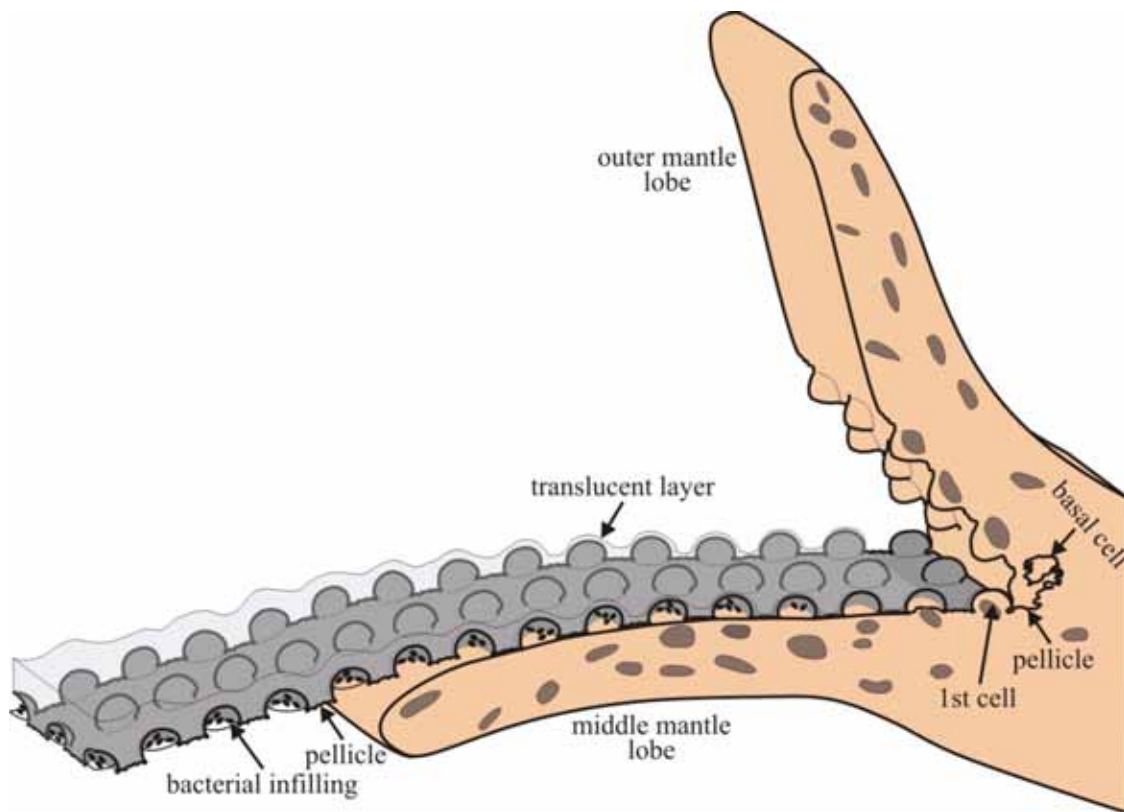


Figura 2.12. Mecanismo de formación del periostraco en *D. digitaria*. La capa granular y la película se forman en la célula basal, siendo moldeadas con alveolos por la primera fila de células (1st cell) de la superficie externa del lóbulo medio del manto. Inmediatamente después, la capa translúcida es secretada por la superficie interna del lóbulo externo del manto sobre la película. Finalmente, cuando el periostraco sale del surco periostracal, la capa translúcida sufre un proceso de curtido que la transforma en una capa más densa (no se muestra). Durante su desplazamiento a lo largo del surco periostracal, los alveolos son rellenos con un material mucoso sembrado de bacterias. El surco periostracal se muestra ampliamente abierto para revelar el inicio de la formación del periostraco.

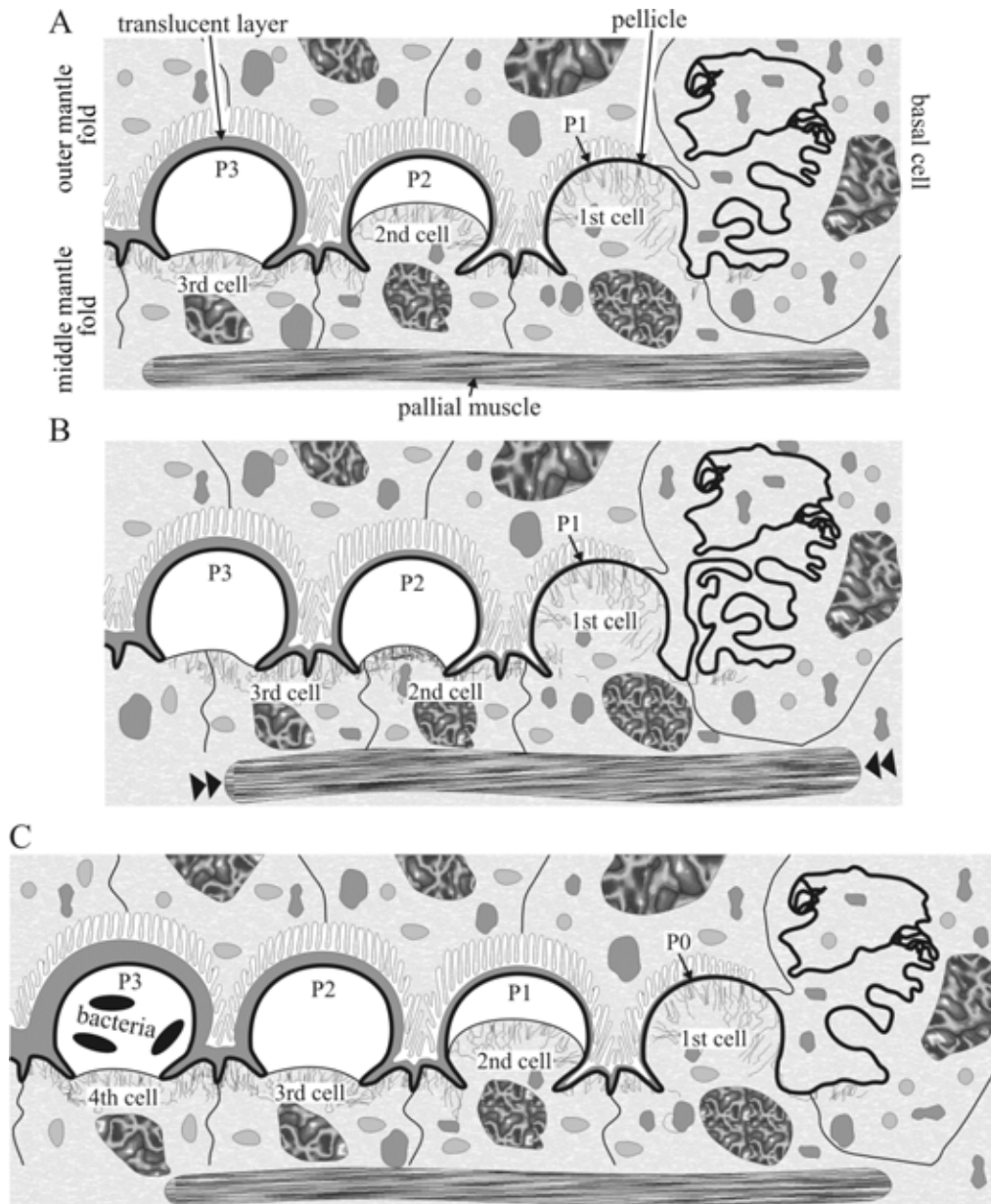


Figura 2.13. Modelo de desplazamiento del periostraco a lo largo del surco periostracal en *D. digitaria*. A. La primera fila de células de la superficie externa del lóbulo medio del manto moldea los alveolos del periostraco incipiente (P1), que está formado principalmente por la película, inmediatamente después de haber salido de la célula basal. La segunda y tercera fila de células no llenan completamente los alveolos a los que se adhieren (P2 y P3 respectivamente). La capa translúcida es secretada por las células de la superficie interna del lóbulo externo del manto, que se engrosa a lo largo de su camino hacia la salida del surco periostracal (hacia la izquierda). B. Debido probablemente a la contracción de los músculos del lóbulo medio del manto (flechas dobles), las células de la superficie externa del mismo se deslizan por el periostraco en dirección al fondo del surco periostracal. En ese momento una buena cantidad de película recién sintetizada está acumulada en la célula basal. C. Los alveolos moldeados en la primera fila de células (P1), se trasladan mediante pulsaciones a la segunda fila de células y una nueva serie de alveolos son moldeados por la primera fila de células (P0), a partir de la película secretada fuera de la célula basal. Los alveolos más antiguos son rellenados por material mucoso sembrado de bacterias (P3).

En otros astártidos estudiados también aparece un periostraco con una capa externa alveolada, como es el caso de las especies europeas *Astarte sulcata* y *A. elliptica* (ver Saleuddin 1965) y especies de Norte América como *A. undata*, *A. castanea* y *A. esquimalti* (ver Saleuddin 1967). La morfología y tamaño de estos alveolos se han utilizado como carácter diagnóstico para la identificación taxonómica de las diferentes especies de *Astarte* (Ockelmann 1958, Saleuddin 1967).

En la diminuta *D. digitaria* el tamaño medio de los alveolos mayores es algo menor (sobre 5 μm) que en las especies del género *Astarte* (entre 11–12 μm). Estos alveolos se rellenan de una sustancia mucosa sembrada de microorganismos de tipo bacteriano, igual que ocurre en los espacios intercostales de la concha. La procedencia de estos microorganismos que son sembrados en cada uno de los alveolos de mayor tamaño aún no está clara, y es necesario profundizar en su estudio para esclarecer su origen, si bien parece ser endógeno, ya que parecen proceder del lóbulo medio (Fig.2.9).

Los alveolos en el género *Astarte* cambian de forma y tamaño desde el umbo hasta el margen de la concha (observaciones personales), hecho que no ocurre en *D. digitaria*, donde los alveolos pueden desaparecer en las zonas más erosionadas, pero mantienen su forma y tamaño en toda la superficie de la concha.

Comparación morfológica con el periostraco de otras especies de Crassatelloidea

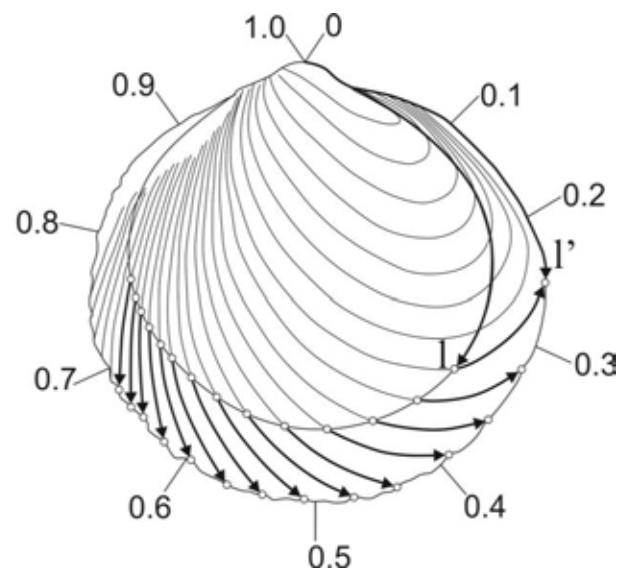
Análisis moleculares (Giribet & Wheeler 2002; Giribet & Distel 2003) han recuperado a las familias Astartidae y Carditidae como un grupo monofilético. El estudio de las secuencias de RNAr 18S y 28S del crassatélido *Eucrassatella donacina* (Taylor *et al.* 2005) y *E. cumingii* (Taylor *et al.* 2007) ha demostrado que la familia Crassatellidae también forma parte de este grupo monofilético. Todo esto implica que no existe justificación para la separación de Astartoidea y Crassatelloidea como dos superfamilias diferentes, como fue sugerido por Bernard (1983) y Coan *et al.* (2000), debiéndose considerar como una única superfamilia, Crassatelloidea. Giribet (2008) dio el nombre de Archiheterodonta al clado formado por Crassatelloidea (Astartidae + Crassatellidae) y Carditoidea; que es considerado como el grupo hermano de los otros heterodontos (Euheterodonta), lo que se ha visto corroborado por estudios recientes (Gonzalez & Giribet 2015). El presente estudio demuestra que el

periostraco puede ser una herramienta útil a la hora de establecer la filogenia dentro de los bivalvos. Este tipo de periostraco alveolado no ha sido descrito en ninguna familia de Euheterodonta, siendo un carácter potencialmente sinapomórfico de Astartidae y posiblemente de otros Crassatelloidea. Por otra parte, la información existente sobre el periostraco apoya la relación entre las familias Astartidae y Crassatellidae, ya que en ambos grupos el periostraco en su formación, se adhiere a la superficie externa del lóbulo medio del manto, mostrando una apariencia similar, si bien más ondulada en astártidos y más serrada en crassatélicos.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

CAPÍTULO 3



MORFOGÉNESIS. DE LAS COSTILLAS OBLICUAS



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

INTRODUCCIÓN

La concha en los bivalvos es una estructura calcificada que recubre las partes blandas del animal. Esta estructura sirve como protección frente a agresiones externas y como soporte anatómico para el anclaje de músculos y órganos. Las conchas de los moluscos están formadas por periostraco, la capa orgánica externa de la concha, y entre 2 y 5 capas policristalinas, que consisten en un agregado de cristalitas de carbonato cálcico embebidos en una matriz orgánica que segrega el propio animal. El periostraco es una cubierta externa de naturaleza proteica que recubre toda la superficie de la concha siendo la primera en formarse. Las capas calcificadas están formadas generalmente por cristales de aragonito o calcita inmersos en una matriz orgánica que se compone de una compleja mezcla de proteínas, glicoproteínas, proteoglicanos, polisacáridos y quitina (Marin & Luquet 2004), organizándose en microestructuras ordenadas (Marin *et al.* 2012, Checa & Salas, en prensa).

La concha de los astártidos es gruesa, comprimida lateralmente, normalmente equilateral, en ocasiones ligeramente inequilateral. La microestructura de la concha es aragonítica de dos capas, con una lamelar cruzada externa y otra interna que puede ser lamelar cruzada compleja u homogénea (Mikkelsen & Bieler 2008).

Dentro de la enorme variedad de ornamentación que pueden presentar los bivalvos en su concha (ver Capítulo 1), podemos encontrar las costillas oblicuas, que son estructuras lineales que cruzan ambas direcciones, la comarginal y la radial (ej. *Solecurtus*, *Digitaria*). Las esculturas oblicuas son muy variables, y han sido clasificadas en distintos tipos en relación a la dirección que presentan los elementos (Checa 2002). Un tipo particular de costillas oblicuas son las llamadas antimarginales (Waller 1986) (ej. *Ostreidae*). Checa (2002) considera la escultura de tipo antimarginal como la cuarta categoría de ornamento de la concha, en la que los elementos divergen desde el centro y se mantienen cercanos a la perpendicularidad respecto del borde de la concha durante su crecimiento. La escultura antimarginal se produce cuando el manto es liso y las costillas surgen debido a la formación de pliegues de su margen (Checa & Crampton 2002, Checa & Jiménez-Jiménez 2003a). Hayami & Okamoto (1986) atribuyen un tipo de microescultura antimarginal encontrada habitualmente en pectínidos a las direcciones de crecimiento de los cristales de calcita que constituyen la concha.

Las costillas oblicuas han sido descritas en 176 especies pertenecientes a diferentes subclases y órdenes, lo que parece indicar que este tipo de escultura surgió varias veces en grupos de bivalvos no relacionados, tanto epibentónicos como endobentónicos (Checa 2002). Los primeros bivalvos fósiles en producir costillas oblicuas, de los que se tiene registro, aparecieron en el Ordovícico Medio. La diversidad de moluscos con este tipo de ornamentación permanece baja durante la época paleozoica, incrementándose después a comienzos del Triásico, hasta alcanzar un pico a principios del Cretácico (Checa & Jiménez-Jiménez 2003b). Durante el límite entre el Mesozoico / Cenozoico, las costillas oblicuas cambiaron su función de protección frente a predadores por la de mejora en el proceso de enterramiento del organismo en el sustrato, como respuesta al incremento de la presión de depredación y a la reestructuración del sedimento durante ese periodo (Stanley 1975, 1981, Vermeij 1977, Thayer 1983). En este escenario, las costillas oblicuas confieren a los bivalvos una elevada movilidad, en el sentido en el que facilitan su enterramiento. No obstante, en los bivalvos epibentónicos que presentan este tipo de costillas (ej. Mytilidae y Chamidae), la función que prevalece es la de reforzar la superficie de la concha y su margen contra posibles predadores (Checa 2002).

En sucesivos estudios y desde diferentes perspectivas, se ha analizado la formación de diferentes elementos esculturales de la concha, entre ellos las costillas oblicuas. De esta manera han surgido diferentes modelos teóricos con el ánimo de darle explicación, mientras tanto, morfólogos teóricos y constructoristas se han preocupado por los mecanismos biológicos que subyacen a dichos modelos (Meinhardt & Klingler 1987, Seilacher 1991, Hammer & Bucher 1999, Savazzi 1998, Hammer 2000, Checa 2002, Ubukata 2005, Boettiger *et al.* 2009). Los principales modelos propuestos son; (1) “*Mecanismos de Reacción-difusión*” en los que reacciones entre activadores – inhibidores y la concentración local de determinadas sustancias químicas (morfogenes) actúan directamente en las células produciendo una respuesta específica relacionada con el patrón de desarrollo. Por tanto, la secreción de una estructura se inicia cuando una molécula activadora alcanza una determinada concentración en una célula o un grupo de ellas. (2) “*Modelos Neurales*”, en los que la actividad de las células secretoras de pigmentos del manto está regulada por impulsos nerviosos. La actividad de esta red neural estaría estimulada por la existencia de un patrón de

secreción de carbonato cálcico y pigmentos en el borde del manto. Boettiger *et al.* (2009) propusieron que la actividad neural es la que controla la cantidad y la dirección en la que se secreta el material que forma la concha. Esta actividad neural también determinaría la tasa de secreción local, y en consecuencia el ángulo y magnitud del vector de crecimiento de la concha. (3) “*Modelos Mecano-químicos*”, proponen que los mecanismos de señalización (entre ellos gradientes de sustancias químicas) hacen que células que poseen cierta movilidad se agrupen, y esta agregación provoque fuerzas de tracción. (4) “*Modelos de Morfología Construccional*”, proponen reconstruir el proceso de fabricación de los elementos esculturales de la concha basándose en comportamientos concretos del manto (ej. secuencia de movimientos del borde del manto durante la secreción y consolidación de la concha y las costillas) (ver revisión en Checa 2002).

Mientras que los mecanismos de reacción – difusión proponen un origen a nivel molecular (celular) en la formación de las costillas, los modelos basados en la morfología construccional (particularmente el llamado “*Modelo de guiado por contacto*”) consideran que el manto es una unidad morfogénica. En el primer caso, sólo las células secretoras de pigmentos o grupos de ellas estarían implicadas, mientras que en el segundo caso lo estaría el conjunto del borde del manto (formado por células secretoras, musculares y sensoriales, así como por tejido conectivo). Estos modelos de morfología construccional no explicarían los patrones de color, ya que las huellas que pueden dejar como alteración de la forma en la concha son imperceptibles. Otra diferencia es que los distintos patrones de color pueden ser reproducidos en su totalidad con un único patrón teórico con solo cambiar el valor de los parámetros (Meinhardt & Klingler 1987, Meinhardt 1995), mientras que diferentes patrones de elementos esculturales de la concha como son las costillas (ej. radiales, oblicuas o comarginales) son producidos por mantos histológicamente diferentes. Por tanto, los modelos de morfología construccional (ej. modelo guiado por contacto) son válidos para explicar la formación de costillas oblicuas, pero no para bandeados o líneas de color, que en este sentido constituiría un proceso sin relación morfogenética. Una variación de este modelo podría ser la teoría de formación de costillas comarginales por *oscilación reguladora* (Hammer 2000), por la cual las costillas son secretadas como resultado de una oscilación en el sistema regulador, involucrando mecanismos puramente mecánicos. Esta hipótesis implica que las costillas

comarginales podrían evolucionar casi inevitablemente en cualquier grupo de moluscos con concha, siempre y cuando no fuera selectivamente desventajosa.

Checa (2002) analizó mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), la morfología del borde del manto en diferentes especies de bivalvos con costillas oblicuas y propuso que durante la construcción de la costilla, el manto se proyecta ligeramente fuera del borde de la concha para luego empujar lateralmente por acción de su musculatura; en este sentido los incrementos de crecimiento de las costillas se desplazarían ligeramente de forma lateral. En este modelo se describen dos estrategias principales en cuanto a la formación de costillas: (a) *guiado por contacto estricto*, en el cual el manto es capaz de proyectarse más allá del borde de la concha, lo suficiente como para sentir el relieve que ya hay formado y alinear el crecimiento de la costilla en la dirección apropiada durante los nuevos incrementos de la concha, y (b) *guiado por contacto reducido*, en el cual la información disponible para el manto sobre la posición de las costillas es limitada, debido a que no es capaz de proyectarse lo suficiente. Sin embargo, algunos aspectos sobre la formación de las costillas oblicuas aún se mantienen sin explicación por este modelo, como el desarrollo espontáneo de costillas en áreas del borde del manto que permanecen lisas, sin proyecciones, o la aceleración lateral de costillas en zonas dañadas del margen de la concha con el fin de ocupar el espacio adyacente y distribuirse de manera más uniforme. Savazzi (1990) señaló que el foco de atención debía ser trasladado de la concha, a las partes blandas involucradas en la formación de la misma. Checa (2002) considera que investigaciones futuras deberían dirigirse a determinar la estructura subyacente del manto, particularmente en especies de bivalvos con presencia de costillas oblicuas, habida cuenta de que el comportamiento del manto tiene una base genética indudable y constituye una etapa intermedia entre el nivel genético-molecular y el fenotípico.

Digitaria digitaria (L., 1758) (Figura 3.1) es una de las 176 especies actuales registradas por Checa (2002) que presentan costillas oblicuas, las cuales varían su orientación en relación a la tasa de crecimiento de la concha. Según Checa (2002) durante periodos de crecimiento lento o en ejemplares ya maduros de conchas grandes, las costillas sufren una rápida desviación lateral, formando ángulos más agudos respecto a las líneas de crecimiento (Figura 3.1). Estas observaciones parecen indicar, según dicho autor, que existe una tasa constante de desplazamiento lateral de las costillas oblicuas en el tiempo. La ausencia de costillas en la

formación de nueva concha en una zona de amplia rotura de su borde, apoyaría la idea de que el mecanismo de guiado por contacto esté implicado en la formación de la costilla.

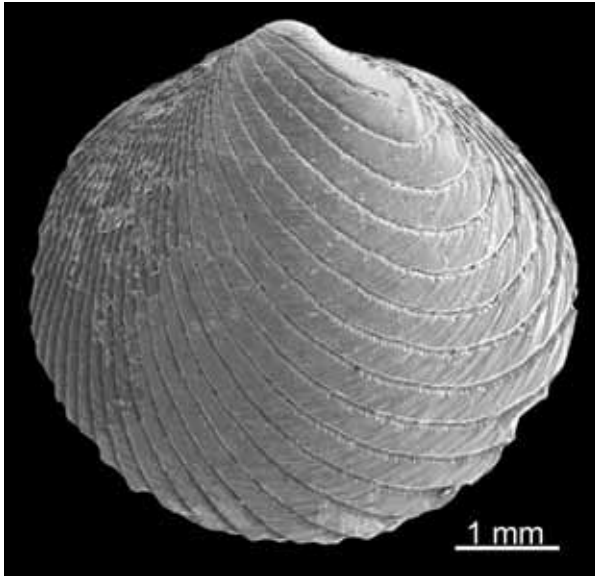


Figura 3.1. Imagen de SEM de la valva derecha de *D. digitaria*. Las costillas oblicuas surcan la concha desde la parte dorsal posterior hacia la parte ventral anterior.

El objetivo de este capítulo es estudiar los procesos de formación de las costillas oblicuas en *D. digitaria* y determinar la implicación del borde del manto en dicho proceso a partir del estudio histológico del borde del manto y análisis de morfometría de la concha. Se trataría de detectar cambios morfológicos en los lóbulos del manto entre las zonas de las costillas y los espacios intercostales (valles), con el fin de testar el modelo de “guiado por contacto” propuesto por Checa (2002).

MATERIAL Y MÉTODOS

Se analizaron 819 ejemplares (entre partes blandas y conchas) de *D. digitaria* para el estudio de la concha y formación de las costillas (Tabla 3.1)

Tabla 3.1. Distribución por objetivo y tipo de análisis de los ejemplares analizados para el estudio de la concha y formación de las costillas oblicuas. Uno de los 10 ejemplares (1*) destinados a SEM para el estudio de la formación de las costillas, sirvió para observar la microestructura de la concha.

Estudio	Método de análisis				Total
	Histología	Lámina delgada	SEM	Concha	
Formación de las costillas	40		10	21	71
Microestructura de la concha		6	1*		7
Morfometría				741	741

Con el fin de conservar la morfología que presentaba en vida el borde del manto en relación con la escultura de la concha, algunos especímenes de *D. digitaria* se fijaron sin anestesia, mientras que otros ejemplares, entre ellos uno de *Acanthocardia tuberculata*, fueron anestesiados con una solución isotónica de cloruro de magnesio (71 g de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ / litro de agua) durante una hora antes de proceder a la fijación. Algunos especímenes fueron sometidos a un proceso de descalcificación con ácido nítrico 3,5% en agua destilada antes de realizar el proceso de inclusión, con el objetivo de eliminar la parte mineral de la concha sin tener que manipular las partes blandas, en particular el borde del manto para alterar su morfología.

Los especímenes destinados a histología, TEM y SEM se procesaron de la manera habitual referida en el capítulo 2, Material y Métodos, del presente estudio. Las tinciones utilizadas en los cortes histológicos fueron hematoxilina de Carazzi – eosina, hematoxilina de Carazzi – tricrómico de V.O.F (Gutierrez 1967) y Azul Alciano – PAS – hematoxilina. La tinción de rojo de Alizarina fue utilizada en ciertas secciones histológicas para comprobar la presencia de calcio en las células del lóbulo externo del manto.

La microestructura de la concha se estudió mediante cortes de lámina delgada de la valva de 6 ejemplares, así como mediante microscopio electrónico de barrido en fractura natural.

Desplazamiento de las costillas oblicuas

La tasa de desplazamiento de las costillas oblicuas a lo largo del margen de la concha de *D. digitaria* se estimó mediante el método de Ubukata (2005), que obtenía las tasas de migración (referidas como “velocidad de desplazamiento” por Ubukata) mediante la medición del desplazamiento de cada costilla a lo largo del margen de la concha durante un intervalo de crecimiento, es decir entre dos líneas consecutivas de crecimiento de la concha. En el citado modelo las posiciones de los elementos esculturales a lo largo del margen de la concha se representaron mediante las distancias acumulativas, a partir de la punta del umbo (Fig. 3.2). Las distancias acumuladas fueron estandarizadas por el perímetro de la concha, y se representaron mediante valores entre cero y uno según Ubukata (2003). Una unidad de intervalo de crecimiento se define como la proporción de ampliación de la curva de generación. En el modelo de Ubukata (2005), la unidad de intervalo de crecimiento se define

como el período durante el cual la línea de crecimiento se incrementó 1,1 veces el perímetro. Para estimar el desplazamiento de las costillas oblicuas se midieron las distancias acumulativas para líneas de crecimiento consecutivas. La "velocidad de desplazamiento", (para nosotros "tasa de desplazamiento") de un elemento escultural de un punto en el margen de la concha se definió por Ubukata (2005) como:

$$s = (l' - l) - \log(1,1) / \log(L'/L)$$

Donde l y l' representa la posición relativa del elemento escultural a lo largo de la línea de crecimiento, y L y L' representa el perímetro de las líneas de crecimiento contiguas (Fig. 2).

Se analizaron tres ejemplares de *D. digitaria* mediante este procedimiento. Las líneas de crecimiento en esta especie son muy difíciles de distinguir debido a que son muy poco patentes, por lo que se tomó la determinación de crear una línea de crecimiento L teórica, construida a partir de 42 radios creados desde la punta del umbo hasta el borde de la concha.

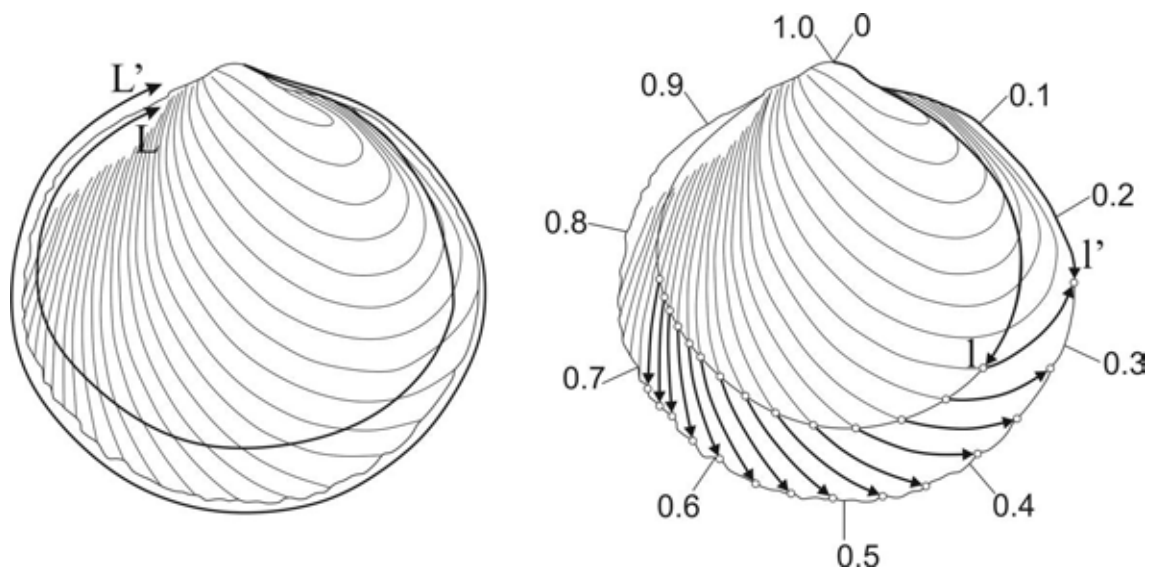


Figura 3.2. Medida del desplazamiento de las costillas oblicuas (adaptado de Ubukata 2005). Abreviaturas: L , perímetro de la línea de crecimiento teórica; L' , perímetro del borde de la concha; l , posición relativa de cada costilla a lo largo de la línea de crecimiento teórica; l' , posición relativa de cada costilla a lo largo del borde de la concha, que está representado por valores entre cero y uno comenzando en el umbo de la valva.

Se aplicó una reducción del 10% de la longitud a cada uno de los radios para obtener un intervalo de crecimiento teórico proporcional a lo largo de todo el margen de crecimiento de la concha (Fig. 2). Todas estas medidas fueron llevadas a cabo sobre una imagen digital de

tres valvas de ejemplares de *D. digitaria* utilizando el programa de análisis de imagen Visilog 6.0. La imagen de alta resolución fue capturada y digitalizada mediante un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-840 ya que el tamaño de esta especie es muy reducido.

Análisis morfométrico de la concha

El análisis morfométrico de la concha de *D. digitaria* se hizo con el fin de comprobar la relación existente con la tasa de desplazamiento de las costillas oblicuas. Se analizaron un total de 21 valvas derechas, con tamaños que oscilaron entre 2,3 mm y 9 mm de largo. Para estandarizar la posición de la concha a la hora de realizar las medidas morfométricas se definió una línea de base entre los puntos de inserción de la línea paleal con ambos músculos aductores. Para realizar el análisis morfométrico se establecieron cinco radios, definiendo así cinco puntos de crecimiento en el margen de la concha (Figura 3.3).

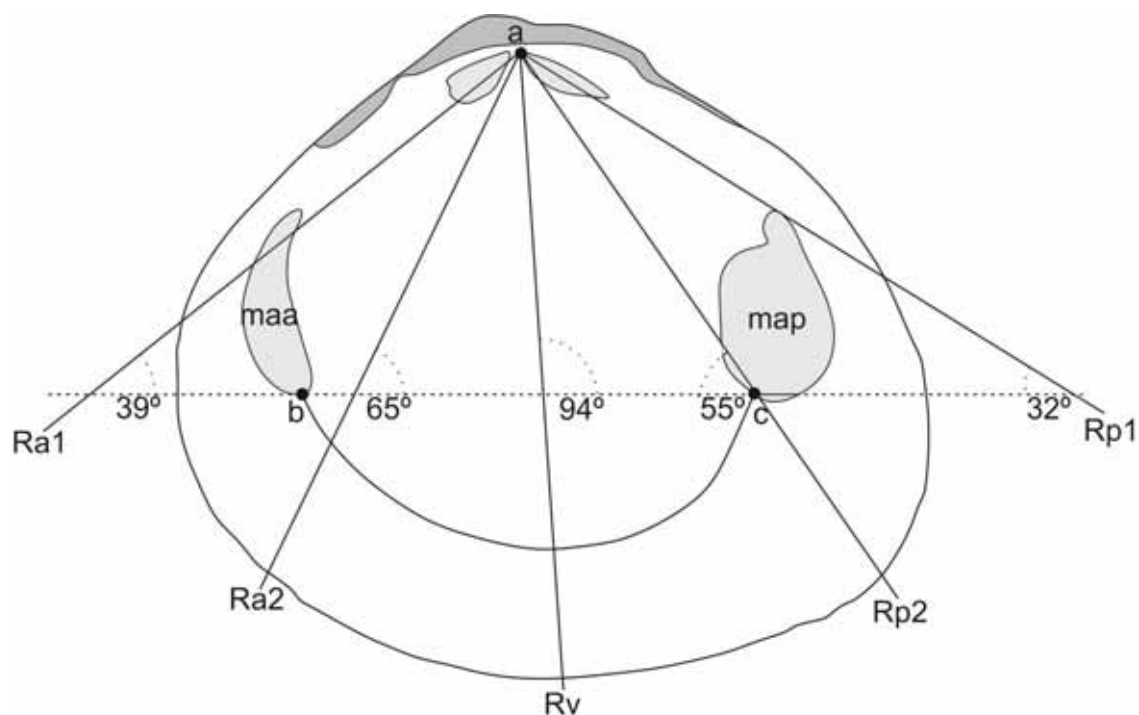


Figura 3.3. Radios establecidos para el análisis del crecimiento alométrico de *D. digitaria*. Abreviaturas: maa, músculo aductor anterior; a, extremo de la fosa del diente posterior de la charnela, que ha sido tomado como punto de inicio de los radios; b – c, distancia entre las marcas de los músculos aductores; map, músculo aductor posterior; Ra1, primer radio anterior; Ra2, segundo radio anterior; Rp2, segundo radio posterior; Rp1, primer radio posterior; Rv, radio ventral.

Para que los puntos de crecimiento fueran análogos en todas las conchas estudiadas, el punto de inicio de los cinco radios se situó en el extremo superior de la foseta del diente posterior de

la charnela, extendiéndose hasta el margen de la concha manteniendo un ángulo dado respecto a la línea de base entre ambos músculos aductores. Los cinco radios definidos fueron (desde la zona anterior a la posterior): Ra1 (primer radio anterior; 39°), Ra2 (segundo radio anterior; 65°), Rv (radio ventral; 94°), Rp2 (segundo radio posterior; 55°) y Rp1 (primer radio posterior; 32°) (Figura 3). Con los datos de las 21 valvas se obtuvieron las líneas de regresión de los cinco radios para comprobar la existencia de crecimiento alométrico en la concha de *D. digitaria*.

RESULTADOS

La concha de *Digitaria digitaria*

D. digitaria presenta una concha equilateral, pudiendo alcanzar los 10 mm de longitud, y aunque el contorno es de aspecto orbicular suele ser algo más larga que alta, existiendo una proporción altura/longitud de 1:1,1. El análisis morfométrico muestra diferencias significativas entre machos y hembras tanto en la longitud como en la altura de la concha (U de Mann Whitney; $p < 0,05$). Si bien, la longitud y anchura media es muy similar en ambos sexos (Tabla 3.2), los machos han resultado ser más grandes que las hembras.

Tabla 3.2. Longitud (L) y altura (A) media y desviación estándar de las conchas de hembras y machos de *D. digitaria* procedentes de los ejemplares analizados histológicamente para el ciclo reproductor (701) más los estudiados para la formación de las costillas (40).

Sexo	L (mm)	A (mm)
H (n = 360)	6,066 ± 0,968	5,480 ± 0,897
M (n = 381)	6,067 ± 1,034	5,479 ± 1,852

El umbo es prosogiro aunque poco aparente, con la prodisoconcha I (PI), de unas 170 μm aproximadamente, no existiendo una prodisoconcha II como transición con la disoconcha, (Figura 3.4 D) lo que indica un desarrollo sin fase planctotrófica.

Posee una escultura muy característica formada por costillas oblicuas patentes, que comienzan en el borde postero–dorsal de la valva hasta alcanzar el borde ventral; no se aprecian anillos de crecimiento. Las costillas no son iguales en toda la concha, de manera que se aprecia un aumento en la longitud, anchura y grado de curvatura desde la zona posterior a la anterior de la misma.

La superficie externa de la concha está recubierta por un periostraco no muy grueso (2 a 3 μm), de color ámbar cuya estructura observada en TEM aparece alveolada (para más detalle véase capítulo 2; Salas *et al.* 2012) (Figura 3.4). El patrón de color externo de la concha es bastante variable entre individuos, pudiendo adquirir tonalidades desde blanco hueso hasta marrón oscuro, siendo habitual encontrar ejemplares que presentan sectores radiales coloreados de marrón rojizo o morado oscuro (Figura 3.5).

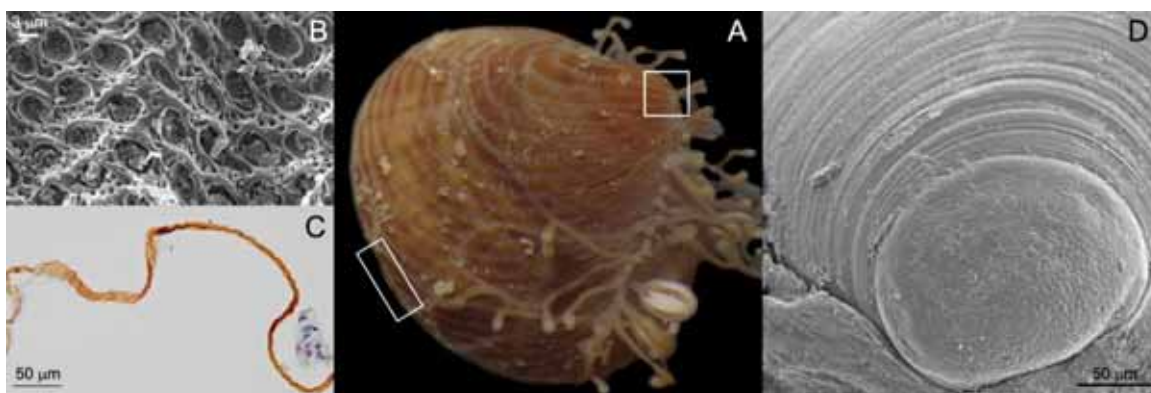


Figura 3.4. A, ejemplar de *D. digitaria* vivo con hidrozoos parásitos en su concha. El rectángulo corresponde a las figuras B y C, y el cuadrado a la figura D. B, imagen de SEM de los alveolos del periostraco. C, imagen de microscopía óptica del periostraco donde puede observarse su característico color ámbar. D, imagen de SEM de la prodisoconcha I.

La charnela es de tipo heterodonto, con dos dientes cardinales y un diente lateral anterior en la valva izquierda y en la derecha un diente cardinal triangular y uno lateral posterior. El ligamento es externo, alargado en el sentido de la articulación (parivincular), extendiéndose desde el umbo hacia la región posterior (opistodético).



Figura 3.5. Muestra de ejemplares frescos de *D. digitaria* donde se puede apreciar la diversidad de patrones de color que presenta esta especie.

El borde interno de la concha se encuentra irregularmente crenulado, reflejando la terminación de las costillas oblicuas de la escultura externa. El interior de la concha es blanco irregularmente teñida de tonos marrón y/o morado. Muestra dos impresiones musculares bien desarrolladas, isomiarias, correspondientes a los músculos aductor anterior (maa) y posterior (map). Aunque de tamaño similar, la del map es ligeramente más grande y redondeada, con una pequeña impresión dorsal que corresponde al músculo retractor posterior del pie, mientras que la del maa es más alargada y se encuentra algo más separada de la impresión del músculo retractor anterior del pie, situada por encima del maa. La impresión del músculo orbicular del manto dibuja la línea paleal que es semicircular, paralela al borde de las valvas y entera (no existe seno paleal) (Figura 3.6).

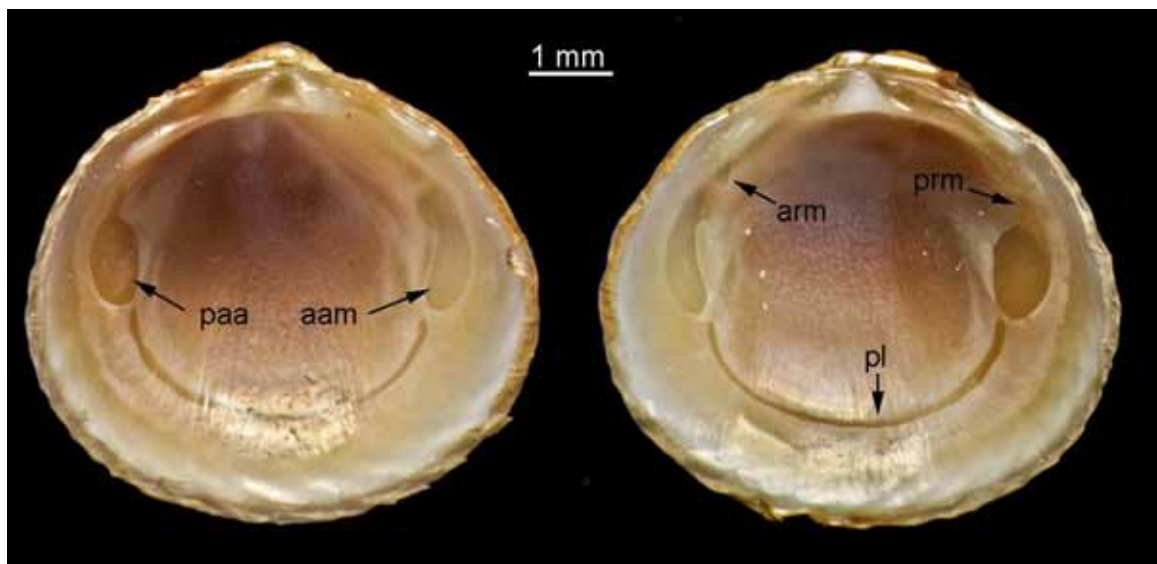


Figura 3.6. Vista interior de la concha de *D. digitaria* donde se pueden apreciar la charnela y las impresiones musculares. Valva derecha a la derecha; valva izquierda a la izquierda. Abreviaturas: aam, impresión del músculo aductor anterior; arm, impresión del músculo anterior retractor del pie; paa, impresión del músculo aductor posterior; pl, impresión del músculo orbicular dibujando la línea paleal; prm, impresión del músculo posterior retractor del pie.

Microestructura de la concha

Las capas calcificadas de la concha en moluscos presentan distintos tipos de microestructuras, en función de cómo se agreguen los cristalitos y la matriz orgánica que forman dichas capas. Existe un amplio número de microestructuras en las conchas de los moluscos, que se repiten de manera recurrente en distintas especies, siendo las microestructuras de tipo lamelar

cruzado las más frecuentes, caracterizándose las mismas por presentar fibras cristalinas de aragonito que se cruzan en, al menos, dos direcciones principales.

En *D. digitaria*, la concha está formada por dos capas lamelares cruzadas de polimorfos aragoníticos, una comarginal externa más gruesa (de unas 340 μm .) y otra antimarginal interna (de unas 150 μm) (Figura 3.7). Las lamelas no se encuentran bien definidas, manteniéndose la composición aragonítica primitiva de la concha, frecuente en la subclase Heteroconchia. La capa interna, que se engruesa hacia la parte dorsal, presenta en su porción basal lamelas bastante gruesas, conformándose un tipo de estructura diferente denominada “*crossed platy*”, formando una capa de aproximadamente unos 25 μm de espesor.

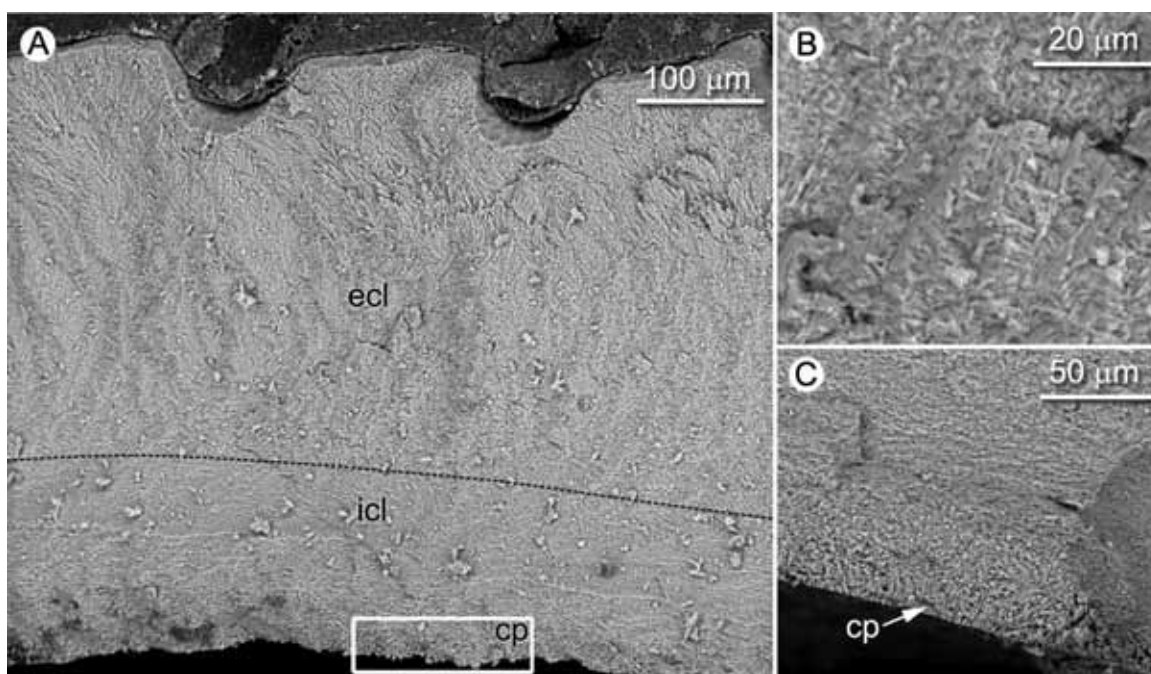


Figura 3.7. Microestructura de la concha de *D. digitaria*. A, sección radial donde se distinguen las capas lamelares cruzadas externa e interna. B, detalle de la estructura de la capa lamelar cruzada. C, recuadro de A, detalle de las lamelas engrosadas formando la estructura *crossed platy*. Abreviaturas: cp, estructura “*crossed platy*”; ecl, capa lamelar cruzada externa; icl, capa lamelar cruzada interna. Imágenes de SEM cedidas por A.G. Checa.

Borde del manto

El estudio de cortes histológicos y observaciones realizadas mediante SEM de los márgenes del manto, revelaron cambios morfológicos del lóbulo interno desde su extremo anterior al posterior, siendo más largo en las porciones anterior y posterior que en el ventral, donde se

reduce su tamaño y adquiere una apariencia de malla (Figura 3.8). En observaciones bajo SEM de uno de los ejemplares no relajados, se descubrió en el borde del manto y desplegado sobre la superficie externa del lóbulo externo, la existencia de un pequeño lóbulo lateral adicional (Figura 3.9), mientras que en especímenes relajados con una solución de cloruro de magnesio, se observaron estos mismos lóbulos adicionales pero plegados. El lóbulo externo del manto se mostró siempre muy desarrollado a lo largo de todo el borde del manto, con el pequeño lóbulo accesorio situado siempre sobre su superficie externa (Figuras 3.9A–B).

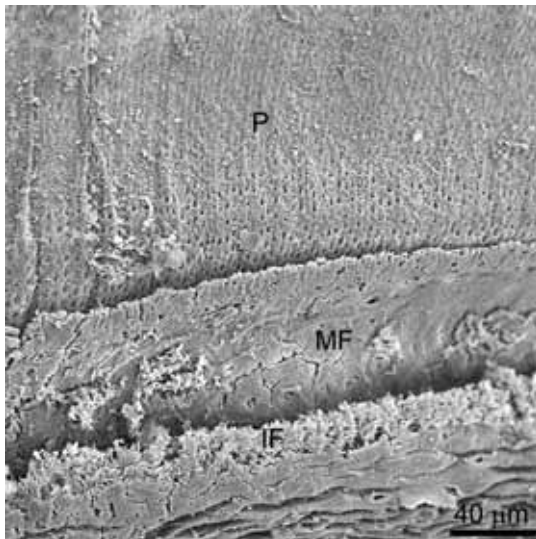


Figura 3.8. Borde ventral del manto mostrando el aspecto reticulado de su lóbulo interno. Abreviaturas: P, periostraco; IF, lóbulo interno; MF, lóbulo medio.

Por otra parte, el estudio de secciones histológicas transversales seriadas y observaciones mediante SEM del borde del manto (Figura 3.9) de especímenes no relajados mostraron la existencia de secuencias cíclicas de cambios morfológicos a lo largo del lóbulo externo del manto (Figura 3.9).

Todas las secuencias comenzaron por la abertura de una pequeña ranura entre la superficie externa del lóbulo externo del manto y el pequeño lóbulo adicional desarrollado en esta superficie (Figura 3.10 A–B). El lóbulo externo, y su pequeño lóbulo accesorio, mostraron cambios morfológicos en cada uno de los ciclos o secuencias (Figura 3.10 A–G). La secuencia cíclica de cambio morfológico transcurre de la siguiente forma: (1) el lóbulo externo se extiende (probablemente por el aumento de la presión del fluido hemocélico) (Figura 3.10 A), (2) al mismo tiempo, la ranura en el lado exterior del lóbulo externo del manto comienza a abrirse, y surge un pequeño lóbulo que se extiende (Figura 3.10 B), (3) el extremo apical del lóbulo externo del manto se ensancha, debido a la inyección creciente de fluido hemocélico,

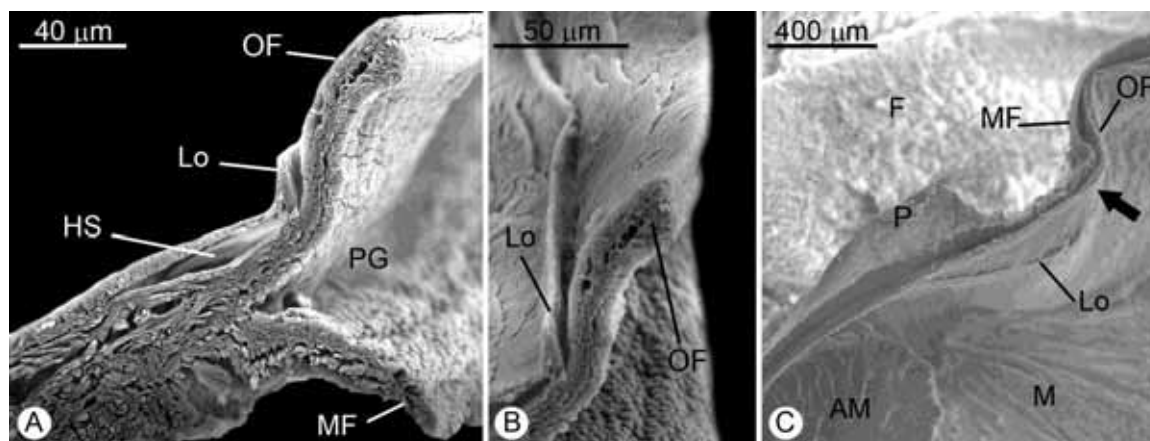


Figura 3.9. A, imagen de SEM de un corte histológico transversal del borde del manto. B, detalle del lóbulo adicional situado en la superficie externa del lóbulo externo del manto. C, imagen de SEM de un pliegue en el borde del manto por desplazamiento o empuje lateral del mismo (flecha). Abreviaturas: AM, músculo aductor; Lo, lóbulo accesorio; M, manto; MF, lóbulo medio del manto; OF, lóbulo externo del manto; P, periostraco; PG, surco periostracal; F, pie; HS, senos hemocélicos.

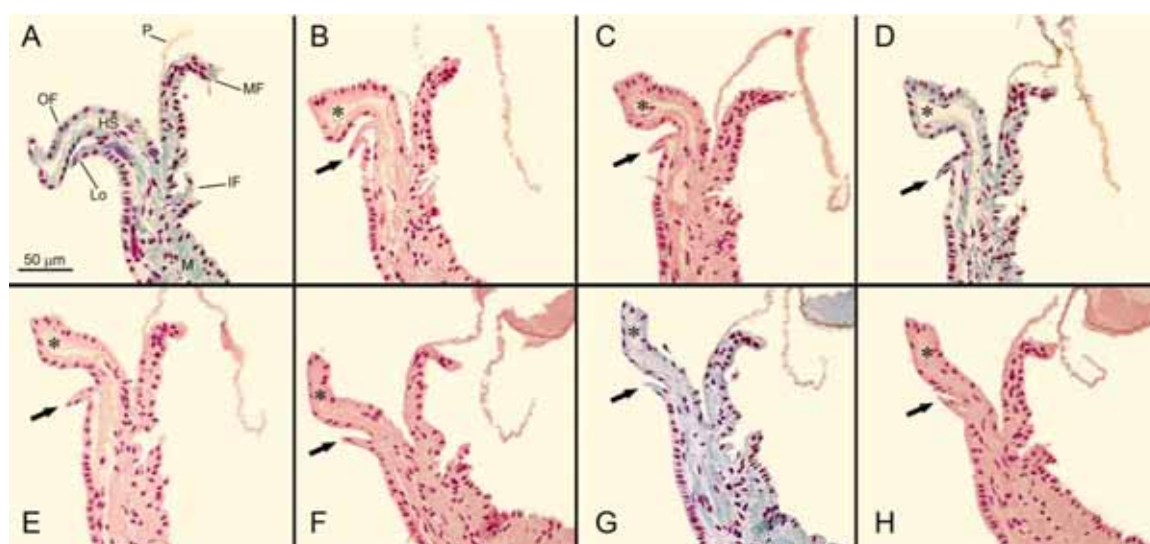


Figura 3.10. Secuencia de cambios morfológicos del lóbulo externo del manto relacionados con la formación de las costillas oblicuas en *D. digitaria*. Las secciones corresponden a un mismo individuo y han sido teñidas de forma alternativa con hematoxilina-eosina y hematoxilina-tricrómico de VOF. De una secuencia cíclica se han ido seleccionando algunas para mostrar dichos cambios. A – D, el lóbulo accesorio se despliega y el lóbulo externo del manto se hincha y se aplana en su parte distal (en contacto con la superficie interna de la costilla); E – H, el lóbulo accesorio se pliega progresivamente sobre la superficie externa del lóbulo externo del manto, que recupera la morfología inicial presentada durante la formación de los valles intercostales. El asterisco (*) identifica el lóbulo externo del manto, y las flechas señalan al lóbulo accesorio. Abreviaturas: Lo, lóbulo; M, manto; MF, lóbulo medio del manto; OF, lóbulo externo del manto; P, periostraco; HS, senos hemocélicos; IF, lóbulo interno del manto.

se curva y se aplana (Figura 3.10 B–C), (4) el lóbulo externo del manto curvado forma junto al su pequeño lóbulo accesorio un surco cuadrangular, donde el borde de la concha podría encajar (Figura 3.10 D–E), (5) posteriormente el lóbulo externo empieza de deshincharse (Figura 3.10 G), (6) la pequeña ranura se cierra y el pequeño lóbulo se pliega sobre la superficie exterior del lóbulo externo del manto (Figura 3.10 H), y (7) el lóbulo externo del manto vuelve al su posición inicial.

En los especímenes examinados cada secuencia de cambio morfológico abarca ca. 600 – 1000 μm del lóbulo externo del manto a lo largo del borde ventral. En algunos cortes histológicos semifinos se pueden observar hemocitos en el interior del lóbulo externo del manto cuando éste se encuentra ensanchado (Figura 3.11). La mayoría de los hemocitos poseen inclusiones granulares que no se tiñen mediante rojo de Alizarina, por lo que no se pudo constatar la presencia de depósitos de calcio.

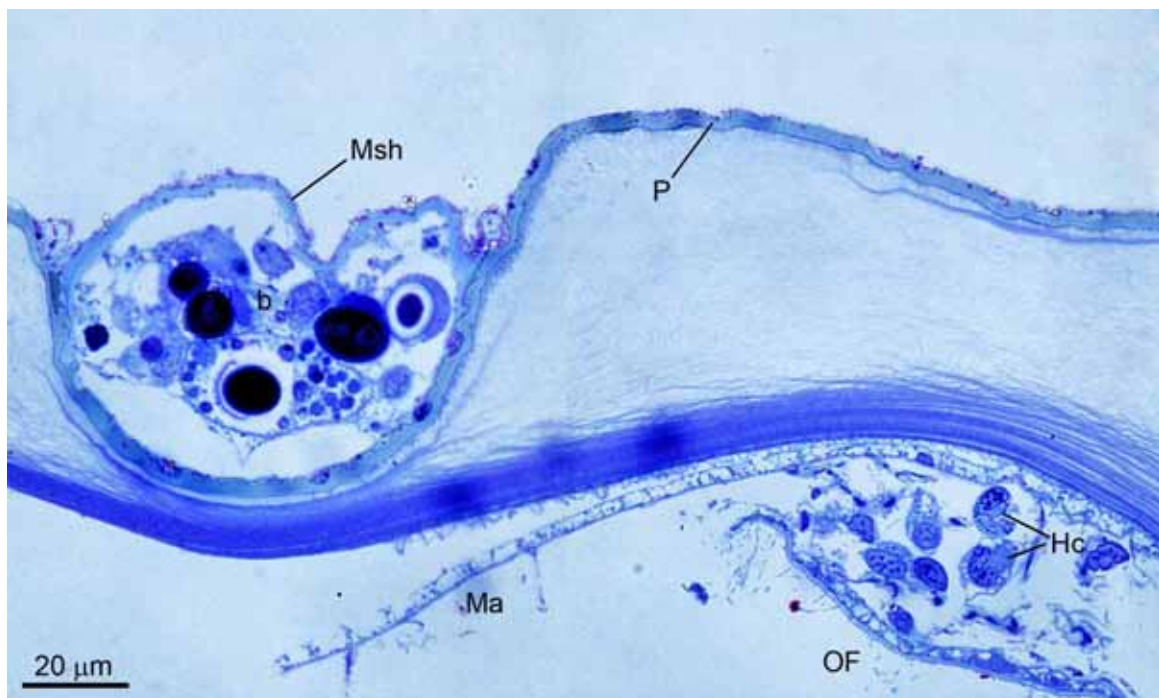


Figura 3.11. Corte semifino transversal, teñido con azul de toluidina, donde se aprecia el periostraco alveolado de *D. digitaria* y la parte distal del lóbulo externo del manto. En éste se aprecia un seno hemocélico hinchado, con algunos hemocitos. Abreviaturas: b, grupo de bacterias; Hc, hemocitos; Ma, zona de mineralización; Msh, capa de mucus; OF, lóbulo externo del manto; P, periostraco.

Para comprobar la relación entre la secuencia de cambios morfológicos del lóbulo externo del manto descritos anteriormente y la formación de las costillas oblicuas, se midió la anchura de

las costillas en el borde ventral de las conchas pertenecientes a los ejemplares utilizados para los cortes histológicos. Se obtuvo un rango de longitud muy similar al obtenido para la secuencia de los cambios morfológicos observados en el lóbulo externo del manto estando comprendido entre los 650–1100 μm . Los valles intercostales (área entre las costillas) en *D. digitaria* son mucho más estrechos (menos de 100 μm en ejemplares de diversos tamaños) que las costillas, apareciendo rellenos de material mucoso de origen exógeno acompañado de diversos organismos, entre ellos bacterias, diatomeas, hidrozoos, etc. (Figuras 3.11 y 3.12). Este mucus podría estar secretado por las propias bacterias y/o diatomeas que aparecen a lo largo de los valles intercostales.

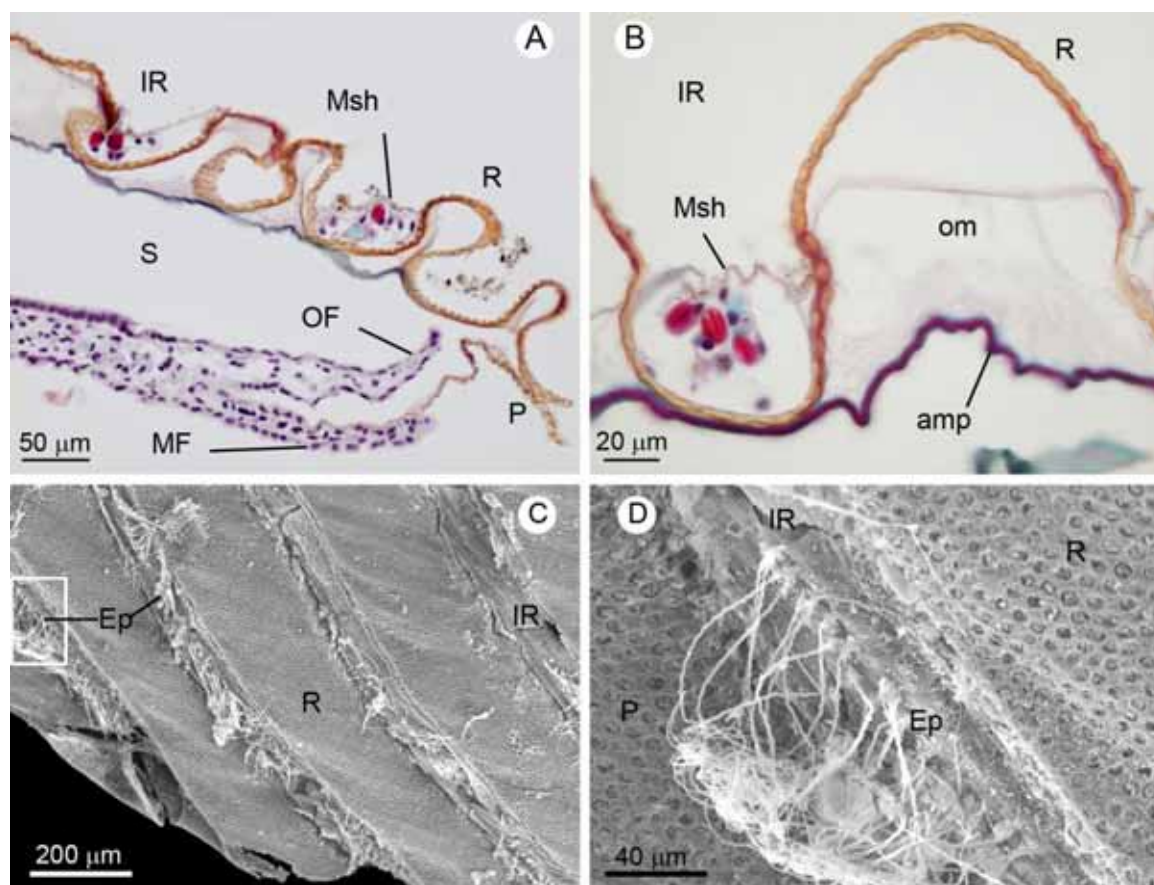


Figura 3.12. A, imagen de microscopía óptica de un corte histológico transversal de un ejemplar descalcificado de *D. digitaria* donde se aprecia como el periostraco mantiene la forma de las costillas y los espacios intercostales. B, detalle de un espacio intercostal con organismos epibiontes incluidos en una matriz mucosa que ellos mismos secretan. C, imagen de SEM del borde de la concha de *D. digitaria* con multitud de epibiontes colonizando las zonas intercostales. D, detalle del recuadro en C, donde se muestra una colonia de epibiontes. Abreviaturas: amp, capa de mucopolisacáridos ácidos; Ep, epibiontes; IR, espacio intercostal; MF, lóbulo medio del manto; Msh, capa de mucus; OF, lóbulo externo del manto; om, matriz orgánica de la capa lamelar cruzada de la concha; P, periostraco; R, costilla; S, espacio ocupado por la concha antes de la descalcificación.

Tasa de desplazamiento de las costillas oblicuas

Las costillas oblicuas muestran un incremento en la anchura desde la parte posterior a la anterior de la concha (Figura 3.1), con valores mínimos de la migración o desplazamiento (s) en la zona dorsal posterior (que corresponde con una posición relativa en el borde de la concha de 0,6 – 0,8) (Figura 3.13).

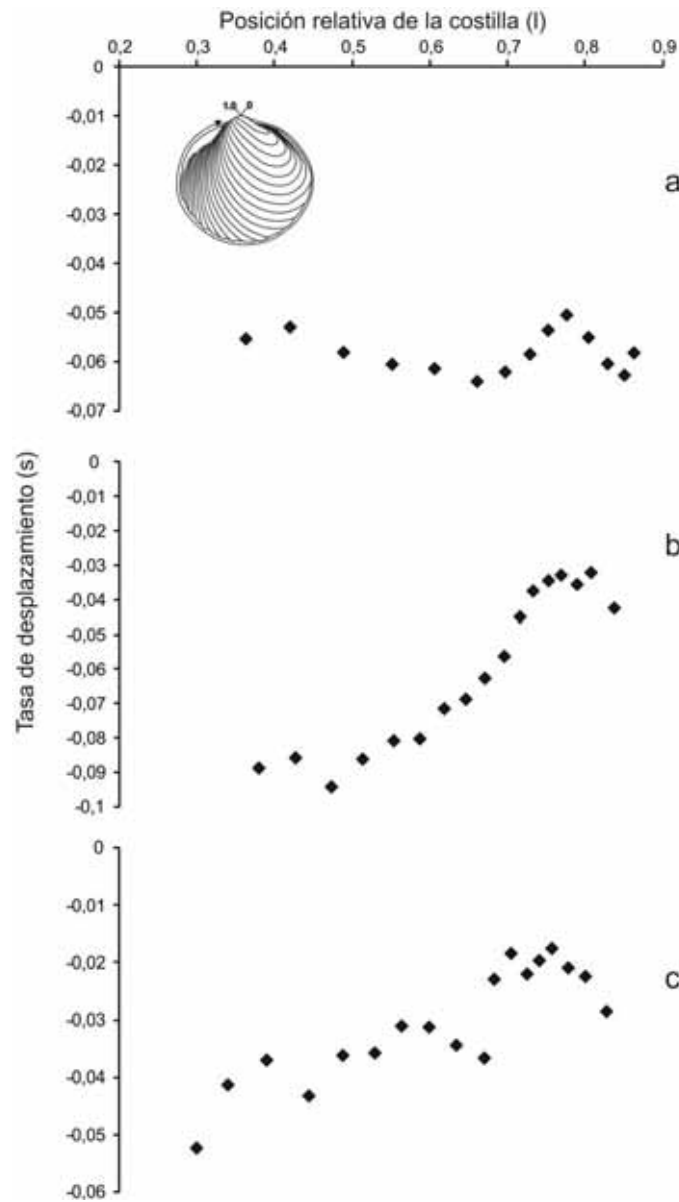


Figura3.13. Representación gráfica del desplazamiento de las costillas oblicuas (s) respecto a su posición relativa (l) a lo largo del borde de la concha (entre 0 y 1) de tres ejemplares (a, b y c) del bivalvo *D. digitaria*.

Los valores de s oscilan entre ca. 0,04 – 0,09 en la zona anterior y ca. 0,02 – 0,06 en la posterior. Por tanto, aparecen diferencias en las tasas de migración a lo largo del borde de la concha, lo que explica los diferentes grados de curvatura de las costillas entre la parte anterior y la posterior de la concha.

Análisis morfométrico de la concha

El análisis morfométrico de las valvas de *D. digitaria* mostró un claro crecimiento alométrico de su concha. La relación entre la longitud del radio (Y) y el tamaño de la concha (X) (tomada como la longitud entre la marca del músculo aductor anterior y el posterior) diferenció dos zonas en relación con la tasa de crecimiento de la concha (Figura 3.14).

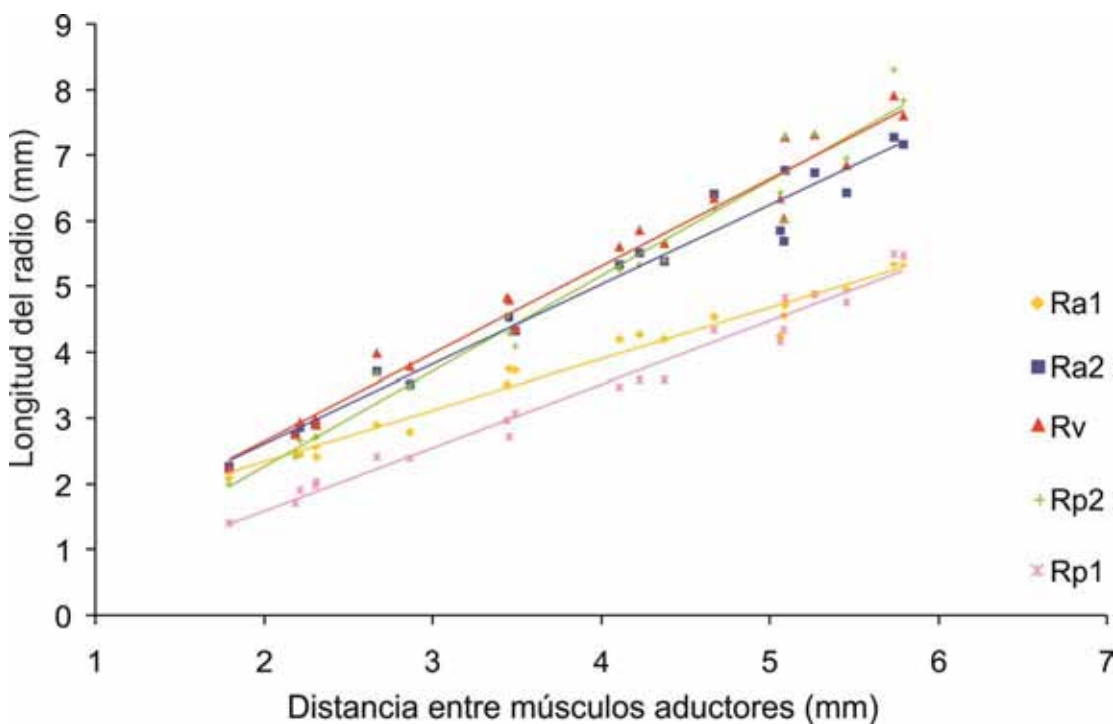


Figura 3.14. Representación gráfica de la relación entre la longitud de los radios y el tamaño del ejemplar y sus líneas de regresión correspondientes. Los cinco radios analizados se indican en la figura 3. Abreviaturas: Ra1, primer radio anterior; Ra2, segundo radio anterior; Rp2, segundo radio posterior; Rp1, primer radio posterior; Rv, radio ventral.

La zona central de la concha, definida por Ra2, Rv y Rp2, mostró tasas de crecimiento radial más altas que las zonas laterales, definidas por Ra1 y Rp1. Tomando la pendiente de la recta de regresión correspondiente (Figura 3.14) como la velocidad de crecimiento para cada radio, observamos que Rp2 presentó el valor más alto, seguido de Rv y Ra2 (Tabla 3.3). De la



misma manera, la pendiente de Rp1 fue mayor que la de Ra1. La relación entre la tasa de crecimiento alométrico ($\Delta Y / \Delta X$) y el tamaño de la concha (X) muestra la misma tendencia (Figura 3.15), donde Rp2 presentó el mayor valor, seguido por Rv y Ra2 (Tabla 3.3). De la misma manera, la pendiente de Rp1 mayor que la de Ra1. Estos resultados indican valores mayores en las tasas de crecimiento del extremo posterior de la concha que en el anterior.

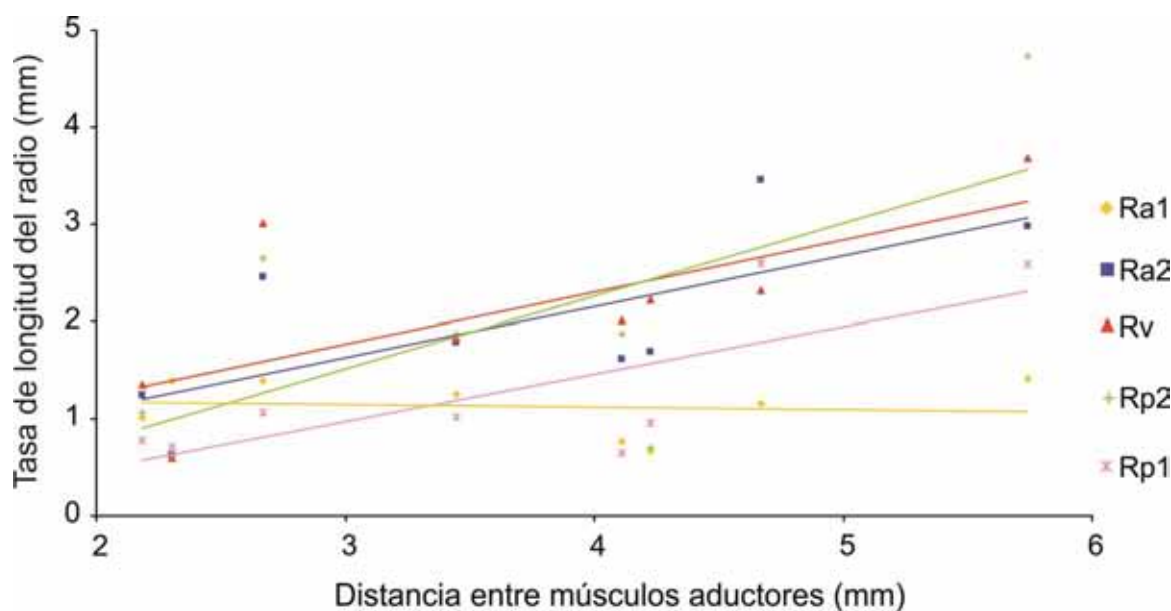


Figura 3.15. Representación gráfica de la relación entre el incremento de la longitud de los radios y el incremento del tamaño del ejemplar y sus líneas de regresión correspondientes. Los cinco radios analizados se indican en la figura 3. Abreviaturas: Ra1, primer radio anterior; Ra2, segundo radio anterior; Rp2, segundo radio posterior; Rp1, primer radio posterior; Rv, radio ventral.

Tabla 3.3. Ecuaciones de las líneas de regresión para las relaciones “longitud del radio / tamaño” e “incremento (Δ) de la longitud del radio / incremento (Δ) de tamaño”.

Radio	Longitud del radio / talla	Δ longitud del radio / Δ talla
Ra1	$y = 0,780x + 0,777$	$y = -0,027x + 1,231$
Ra2	$y = 1,207x + 0,203$	$y = 0,525x + 0,056$
Rv	$y = 1,327x - 0,001$	$y = 0,535x + 0,165$
Rp2	$y = 1,448x - 0,635$	$y = 0,747x - 0,726$
Rp1	$y = 0,962x - 0,331$	$y = 0,490x - 0,410$

DISCUSIÓN

Checa (2002) propuso que el manto era capaz de desarrollar un comportamiento muy elaborado con el fin de desplazar las costillas en una dirección particular durante el crecimiento de la concha. En consecuencia, en este modelo, el manto sería la unidad morfogenética principal. En *Digitaria digitaria*, propuso como estrategia de formación el modelo de guiado por contacto reducido (RCG), según el cual la información sobre la morfología de la costilla a disposición del manto se reduce, debido a que se obtiene solamente de los perfiles interiores de las costillas, por tanto unas costillas radiales con un relieve muy desarrollado sería ventajoso. Durante la formación de la concha, el manto se proyectaría, sobrepasando ligeramente el borde de la valva, y a continuación empujaría lateralmente por acción muscular bajo la costilla en formación. De esta manera, el incremento en el crecimiento de la misma se produciría con un pequeño desplazamiento lateral respecto a la costilla consolidada.

El presente estudio muestra un comportamiento complejo del manto en relación a la formación de las costillas en *D. digitaria*. El lóbulo externo del manto sufriría los cambios morfológicos descritos únicamente en la zona de costillas, de acuerdo con el modelo RCG (Checa, 2002). Los cambios morfológicos sufridos por el lóbulo externo de ejemplares no relajados han sido observados en diversos cortes histológicos transversales (Figura 3.10) a lo largo de la mayor parte del borde del manto, ya que la proporción del margen de la concha ocupada por las costillas es muy superior a las ocupada por los valles intercostales. En especímenes relajados los tres lóbulos del manto fueron muy patentes pero sin que se apreciaran cambios morfológicos y el pequeño lóbulo accesorio apareció siempre plegado sobre la superficie externa del lóbulo externo.

La presencia en el borde del manto de numerosas fibras musculares y de senos hemocélicos, especialmente grandes en el lóbulo externo durante su ensanchamiento en el proceso de construcción de la costilla, parece apuntar a la implicación del lóbulo externo del manto en el proceso de formación de la concha (Figura 3.10). Hay constancia de la participación de los hemocitos en la reparación de la concha mediante el transporte y la liberación de calcio en forma granular (Fleury *et al.* 2008, en *Haliotis tuberculata*; Kadaret *et al.* 2009, en *Bathymodiolus azoricus*) o en forma de cristales (Mount *et al.* 2004, en *Crassostrea virginica*). La producción



de la matriz extracelular por hemocitos durante la reparación de daños en la concha (amebocitos agranulares) ha sido observada en *Pinctada fucata* por Suzuki *et al.* (1991). Blackwelder & Watabe (1977) indicaron que en el caracol de agua dulce *Pomacea paludosa* los hemocitos (amebocitos para algunos autores) son capaces de entrar en el espacio extrapaleal. Según Beedham (1965) la migración de los hemocitos sobre la superficie exterior del epitelio del manto en la etapa temprana de reparación de la concha es muy común. Abolins-Kroigs (1976) indicó que en la formación de la membrana de reparación de la concha en el gasterópodo *Helix pomatia*, los amebocitos liberan gránulos de proteoglicanos, vesículas lipídicas, gránulos del pigmento lipofucsina y calcio, no obstante la mayor parte de las sustancias necesarias para la restauración completa de la porción de concha dañada provino de otras fuentes. Sin embargo, aún no hay noticias de la implicación de los hemocitos en el transporte de calcio durante el proceso de formación normal de la concha. Nuestras observaciones parecen señalar un posible papel de los hemocitos en este sentido, sin embargo, su papel exacto no está claro en *D. digitaria*, ya que la tinción con rojo de Alizarina no mostró la presencia de depósitos de calcio en los hemocitos. La identificación de los tipos celulares implicados en el transporte de calcio y su vía de transporte constituyen objetivos importantes en futuras investigaciones.

El desplazamiento lateral de las costillas oblicuas durante su formación puede ser fruto de la acción muscular, que produciría deformaciones del borde del manto a modo de ondas. La observación del lóbulo externo del manto comprimido, que empuja para producir los movimientos laterales del borde del manto así como la lateralización de los incrementos en el crecimiento de las costillas oblicuas (Figura 3.9 C) sostiene la hipótesis anterior.

El incremento del grado de curvatura y anchura de las costillas desde el extremo anterior al posterior de la concha (Figura 3.1) planteó la cuestión acerca de su tasa de desplazamiento (constante o irregular a lo largo del margen de la concha). Nuestros resultados muestran diferentes tasas de desplazamiento de las costillas oblicuas a lo largo del margen de la concha, siendo mayor en el extremo anterior que en la posterior (ca. 0,04 – 0,09 y ca. 0,02 – 0,06 respectivamente) (Figura 3.13). Estos resultados no apoyan el modelo de desplazamiento constante Guiado por Contacto Estricto (ECG) invocado por Checa (2002), donde proponía tasas de desplazamiento constantes. En los análisis morfométricos de la concha, el extremo

anterior de la valva, definida por el primer radio anterior (Ra1), mostró la tasa de crecimiento de valor más bajo, mientras que la zona posterior ventral, definida por el segundo radio posterior (Rp2), mostró la de valor más elevado. La suma de un movimiento lateral constante o regular del borde del manto en el lado anterior, con un crecimiento alométrico negativo (más lento), se traduce en una mayor curvatura y anchura de las costillas, mientras que el crecimiento alométrico positivo (más rápido) de la concha en la parte posterior, implica una menor curvatura y anchura de las costillas. En esta ocasión, el modelo desplazamiento constante de Guiado por Contacto Reducido (RCG) invocado por Checa (2002) se acomoda a nuestras observaciones, sin embargo, la tasa real de desplazamiento permanece siendo un objetivo para futuros estudios.

El presente estudio valida el modelo propuesto por Checa (2002), según el cual la morfogénesis de los patrones de formación de costillas oblicuas en bivalvos sería el resultado de la interacción de tres factores: (1) el patrón de biomineralización; (2) la estructura del manto y (3) el comportamiento del manto. El borde del manto de *Digitaria digitaria* es homogéneo, sin estructuras especializadas para la formación de las costillas, al contrario de lo que ocurre en *Acanthocardia tuberculata*, que presenta los llamados *corpora spinosa* (Stone 1998) (Figura 3.16) estructura especializada en la formación de costillas radiales (véase también Checa 2002; Figura15).

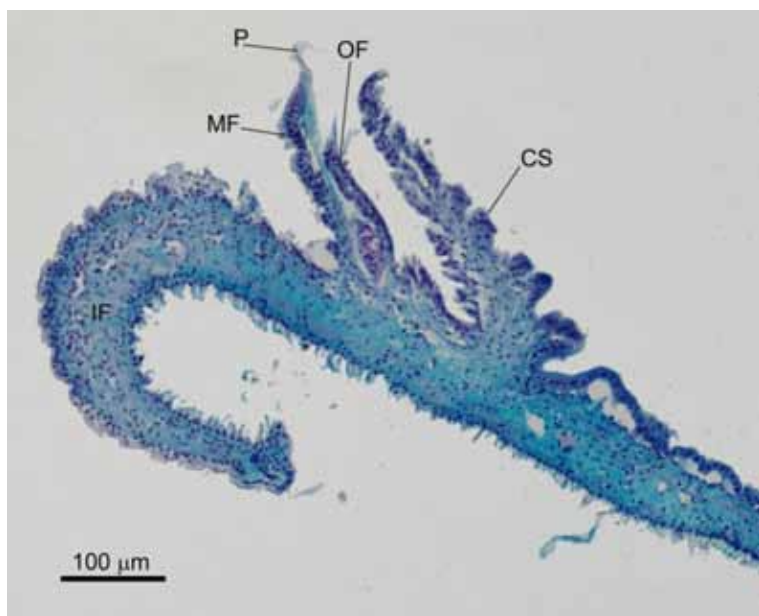


Figura 3.16. Sección transversal (7 μ m) teñida con azul Alciano-PAS-hematoxilina del borde del manto de un espécimen relajado de *Acanthocardia tuberculata*. Se aprecian los tres lóbulos del manto, el periostraco y la “corpora spinosa”, estructura situada en la superficie externa del lóbulo externo. Abreviaturas: CS, corpora spinosa; IF, lóbulo interno; MF, lóbulo medio; OF, lóbulo externo; P, periostraco.

Nuestras observaciones indican que el manto no solo es capaz de desarrollar un elaborado comportamiento de cambios morfológicos con el que desplazar la costilla en una dirección particular, sino también de contribuir a la propia formación de esta. Por lo tanto, teniendo en cuenta los datos anteriores, el borde del manto no sólo sería el órgano secretor de la concha, sino también la unidad morfogénica principal.

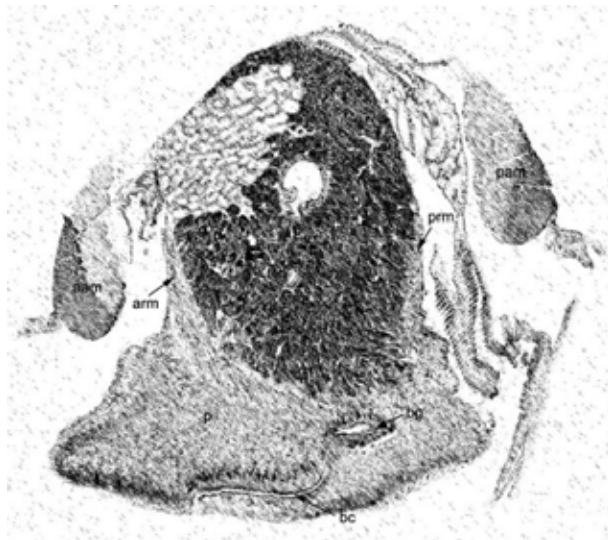
Para la mayoría de las especies actuales la función de las costillas oblicuas parece ser la mejora en la eficiencia de enterramiento en el sustrato, con objeto de escapar de los depredadores (Seilacher 1972a,b, 1973, Checa & Jiménez-Jiménez 2003a,b). Sin embargo, durante el Paleozoico–Mesozoico, muchos bivalvos excavadores desarrollaron costillas oblicuas con perfiles simétricos, que se considera tenían una función importante en el refuerzo de la concha (Checa & Jiménez-Jiménez 2003b).

Seilacher (1972b) consideró cuatro requisitos esenciales para la eficiencia en el proceso de enterramiento: (1) "orientación cruzada", donde la orientación de las costillas es transversal a la dirección del enterramiento, (2) "asimetría de fricción" donde las costillas deben poseer una sección transversal asimétrica, de tal manera que muestren una suave pendiente en la dirección de enterramiento y una pendiente acusada, a veces invertida en la dirección opuesta, (3) correspondencia entre costilla y tamaño de grano, y (4) el perímetro suavizado, sin ornamentos en la zona de sección transversal con área máxima. Tanto las costillas oblicuas como las divaricadas cumplen estos requisitos. Las costillas oblicuas de *Digitaria* podrían considerarse como un diseño extremo de la escultura divaricada, en el que el ángulo (Λ) se sitúa en la zona dorsal posterior de la concha, cerca de los umbos. Tanto en la parte anterior como posterior de la concha de *D. digitaria* se produce una densificación de la escultura, apareciendo en el área posterior costillas casi rectas, que podrían ayudar a estabilizar la concha en el sedimento. La forma mucho más curvada, casi comarginal, de las costillas cercanas a la zona anterior es compatible con la función de "orientación cruzada", que pone como requisito Seilacher (1972b). No obstante, *D. digitaria* es una especie que aunque se entierra, lo hace de manera somera, como ocurre con otros astártidos (Saleuddin 1965, Stanley 1970). Este molusco vive en fondos de bioclastos y arena gruesa, con un componente de fango aproximado del 5% (Urra *et al.* 2011) y bajo la influencia de fuertes corrientes, además no posee sifones, lo que le imposibilitaría un enterramiento profundo. Por otro lado, la simetría

y el grosor de la concha de *Digitaria* indican que las costillas oblicuas desempeñan una función adicional de reforzamiento de su estructura. En consecuencia, las costillas oblicuas de este bivalvo endobentónico somero tendrían una doble función, la defensa frente a intentos de depredación y la eficiencia de enterramiento, pero sobre todo de anclaje al sustrato en las zonas de altas corrientes donde vive.

La existencia de dimorfismo sexual ha sido señalado para otros astártidos (*Astarte borealis*, *Astarte elliptica*, *Astarte sulcata*) (Saleuddin 1964, Ockelmann 1965), pero en ellos son las hembras las que presentan un mayor tamaño. Otro carácter que se había asignado a dimorfismo sexual en los astártidos, la existencia de borde liso para machos y borde crenulado para hembra (Sastry 1979), se ha comprobado que no es consistente, ya que entre los ejemplares de borde liso se han encontrado machos y hembras (Coan *et al.* 2000). El dimorfismo sexual en *D. digitaria* con los machos mayores que las hembras es completamente inusual en bivalvos en general (Sastry, 1979) y en astártidos en particular.

CAPÍTULO 4





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

INTRODUCCIÓN

La importancia de los estudios morfológicos y anatómicos de los organismos radica en que son una llave maestra que nos ayuda a comprender diferentes aspectos de su biología y de su historia. Conocer la forma ayuda a entender la función y refleja cómo los organismos evolucionan y se adaptan a su entorno (Giribet 2015).

Los estudios anatómicos e histológicos en los moluscos bivalvos son abundantes entre aquellos que poseen interés comercial, como algunas especies de los géneros *Pecten*, *Mytilus*, *Donax*, *Mercenaria* u *Ostrea* entre otros (Ansell 1983, Salas & Hergueta 1990, Beninger & Le Pennec 1991, Beninger *et al.* 1995, Kraeuter & Castagna 2001, Grizel 2003). En muchas ocasiones, estos trabajos están relacionados con el estudio y diagnóstico de enfermedades parasitarias que puedan sufrir las especies con valor comercial (Rudel 1977), dirigido a mejorar la gestión de la explotación de las poblaciones naturales o de la acuicultura (Bower *et al.* 1994), ya que los moluscos bivalvos sufren frecuentemente la afección de virus y bacterias, así como de protozoos, trematodos (fases larvarias) o copépodos parásitos (Bozzo 2015). Los órganos diana preferidos por los parásitos de bivalvos son las branquias, el intestino y la glándula digestiva, principalmente, y de forma más ocasional, las gónadas, la musculatura y los ganglios nerviosos. No obstante, también existen muchos trabajos anatómicos sobre especies sin interés comercial (Ansell 196, Barón & Ciocco 1997, 1998; Morse & Zardus 1997, Morton 2000, Ruthensteiner 2010, Tëmkin & Strong 2013).

La familia Astartidae, cuyos representantes entran en ese grupo de especies “sin interés comercial”, ha sido objeto de escasos estudios anatómicos, y los existentes se han centrado en el género *Astarte* (Sowerby 1874, Smith 1881, Saleuddin 1964, 1965, 1967). El clado Archiheterodonta, en el que se encuentran incluidos los astártidos, constituye uno de los grupos en los que la sistemática resulta más compleja, ya que las especies que lo integran poseen unos caracteres morfológicos un tanto ambiguos y variables (Chrpa 2012, Peterson 2001, Schander 2001). Es por ello que la filogenia dentro del grupo Archiheterodonta estaba aún poco estudiada y definida (Giribet 2008). No obstante, el tradicional (aunque en declive) uso de los caracteres anatómicos para establecer las relaciones filogenéticas entre los organismos en general, y en nuestro caso de las familias integrantes de Archiheterodonta

(Saleuddin 1965, Yonge 1969, Healy 1995), se ha visto complementado por recientes estudios moleculares basados en la tipificación multilocus de secuencias génicas de Archiheterodonta (González & Giribet 2015) y análisis genéticos de RNAr (Taylor 2007), arrojando luz a las relaciones de parentesco existentes entre las familias Astartidae, Crassatellidae, Carditidae y Condylodiidae.

En este capítulo se detalla la anatomía e histología de algunos de los principales órganos y sistemas del astártido *Digitaria digitaria* (L., 1758), representante de la familia Astartidae. Con el presente estudio se pretende aumentar el conocimiento anatómico sobre esta especie, y así completar una base de caracteres morfológicos que sirva de herramienta para los futuros estudios filogenéticos. De forma paralela se ha estudiado la ocurrencia de los parásitos más frecuentes en *D. digitaria* alojados en los diferentes “órganos diana”, como pueden ser las branquias, el sistema digestivo y ocasionalmente, las gónadas, así como la de los epibiontes presentes en la concha y la posible simbiosis con bacterias presentes en los alveolos del periostraco.

MATERIAL Y MÉTODOS

En el estudio anatómico fue necesaria la obtención de 14 ejemplares de *D. digitaria* vivos. Estas muestras fueron recogidas en los fondos del ZEC de Calahonda (Mijas), en el litoral de Málaga, de la forma descrita en el capítulo 2, Material y Métodos, del presente estudio.

El estudio morfológico y anatómico de las partes blandas de los ejemplares de *D. digitaria*, así como de sus parásitos, se realizó mediante el análisis al microscopio óptico de cortes histológicos, observaciones de ejemplares en SEM y observaciones en TEM de secciones ultrafinas de algunos órganos, como las gónadas, que se procesaron de la manera habitual referida en el capítulo 2, Material y Métodos, del presente estudio. Las tinciones empleadas en los cortes histológicos fueron hematoxilina de Carazzi – eosina y hematoxilina de Carazzi – tricrómico de V.O.F (Gutierrez, 1967) y PAS – Azul Alcian.

Las descripciones anatómicas macroscópicas se realizaron mediante disecciones bajo lupa estereoscópica (Leica MZ12) de ejemplares frescos así como fijados en formaldehído 10 %.

Cultivo bacteriano

Para aislar los tipos bacterianos presentes en el periostraco de *D. digitaria* se cocinaron dos medios utilizados frecuentemente para el cultivo de microorganismos marinos (Anexo I, Tabla A1.7). El MN es un medio de cultivo estándar utilizado para cepas marinas y posee una base de agua de mar filtrada enriquecida con una solución de metales traza, mientras que el ASN-III es un medio estrictamente sintético, aunque también adecuado para el cultivo de cepas marinas, con base de agua destilada y suplementado con metales traza (Waterbury & Stanier 1978). Ambos se prepararon en forma de medio líquido y sólido.

Para la preparación de los medios líquidos MN y ASN-III se pesaron los componentes de la receta (Anexo I, Tabla A1.7) en una balanza de precisión y se depositaron en un matraz aforado de 2 litros. La solución de metales traza que se encuentra entre los componentes de ambos medios fue preparada con anterioridad según la receta de Waterbury & Stanier (1978) y conservada en frío (-20° C) hasta su utilización (Anexo I, Tabla A1.8). Terminadas las disoluciones se autoclavaron a 121° C durante 15 minutos. Una vez enfriadas a temperatura ambiente, se conservaron en frío (-20° C).

Para los medios sólidos la preparación del agar, que permite la solidificación del medio, y la de la disolución de sales ha de realizarse por separado (Anexo I, Tabla A1.7). Así para el medio MN se mezcló 12 g de agar con 250 ml de agua destilada, mientras que las sales se mezclaron con 750 ml de agua de mar filtrada, añadiendo un imán para agitador magnético. Ambos matraces se esterilizaron en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Posteriormente los matraces se mantuvieron en un baño a 65° C durante 20 minutos, lo que permite que las soluciones se atemperen sin dejar que el agar solidifique. A continuación se vertió el agar sobre el matraz que contenía la solución de sales en campana de flujo laminar (para mantener las condiciones de esterilidad) y se puso en agitación 1 minuto dentro de la misma cámara. Tras esto se procedió a verter el medio en placas de Petri, a razón de unos 16ml por placa, moviéndolas ligeramente para que se cubriera todo el fondo. Se dejaron enfriar una hora hasta que el medio se solidificó completamente y se atemperó. Las placas se conservaron en frío (-20° C) en bolsas herméticas y siempre boca abajo para evitar que el vapor condensado en la tapa cayera sobre el medio, lo que aumentaría la probabilidad de una posible contaminación del medio por hongos.

Para preparar el medio ASN-III sólido se procedió de la misma forma que en el caso del medio MN, exceptuando que en este caso tanto el agar como las sales se mezclaron con 500ml de agua destilada.

El cultivo in vitro de las bacterias se realizó a partir de conchas libre de las partes blandas de ejemplares frescos. Un total de ocho matraces Erlenmeyer con 50 ml de medio líquido MN y otros tantos de medio ASN-III se sembraron con las conchas de ejemplares frescos de *D. digitaria*, que se incubaron durante 6 semanas a temperatura ambiente (20 – 24° C aprox.) y con una intensidad lumínica entre 400 y 600 lux, sin agitación ni aireación. Posteriormente se procedió a la siembra en medio sólido MN y ASN-III (placa de Petri) de una alícuota de los cultivos líquidos.

Siembra de los medios MN y ASN-III

La siembra en placa se realizó siguiendo dos técnicas diferentes: a) en gota, poniendo cuatro gotas de 30µl cada una sobre la superficie de medio sólido (placa de Petri); b) con asa de Digralsky, poniendo una cantidad de 100µl sobre la placa y extendiendo con el asa de manera homogénea sobre la superficie del medio sólido en placa de Petri. De cada uno de los 8 matraces de medio de cultivo líquido se sembraron 4 placas, 2 de sembrado con gota y 2 de sembrado con asa. De cinco matraces se tomaron además 10ml que se centrifugaron para intentar concentrar las posibles bacterias y acelerar así el crecimiento de las colonias. De estos 10 ml centrifugados se tomaba el sedimento, sembrando entre 2 y 3 gotas de 30 µl cada una.

Las placas fueron incubadas en las mismas condiciones de temperatura y luminosidad que los medios líquidos durante una semana. Cada día se revisó la aparición de colonias en las placas, y cuando se observó el crecimiento de colonias de diferente aspecto se procedió a la resiembra hasta obtener cultivos puros de los diferentes tipos observados.

RESULTADOS

Organización general de las partes blandas

Retirada una de las valvas y diseccionando el lóbulo del manto correspondiente, se puso al descubierto la disposición de los órganos de *D. digitaria* (Figura 4.1). En ejemplares vivos se observan las branquias blanquecinas que cubren la gónada por completo, dejando al

descubierto la glándula digestiva, de color pardo – verdoso en la región antero – dorsal, por encima de la gónada. Bajo la glándula digestiva asoman los palpos labiales a modo de abanico, que se abren hacia la cavidad paleal y entre ellos se sitúa la boca. Retirando las branquias se observa una gónada voluminosa, de color amarillo claro en hembras maduras, y blanquecina en los machos y hembras inmaduras. Ocupa la zona central del cuerpo y rodea la glándula digestiva dejando libre únicamente su cara anterior.

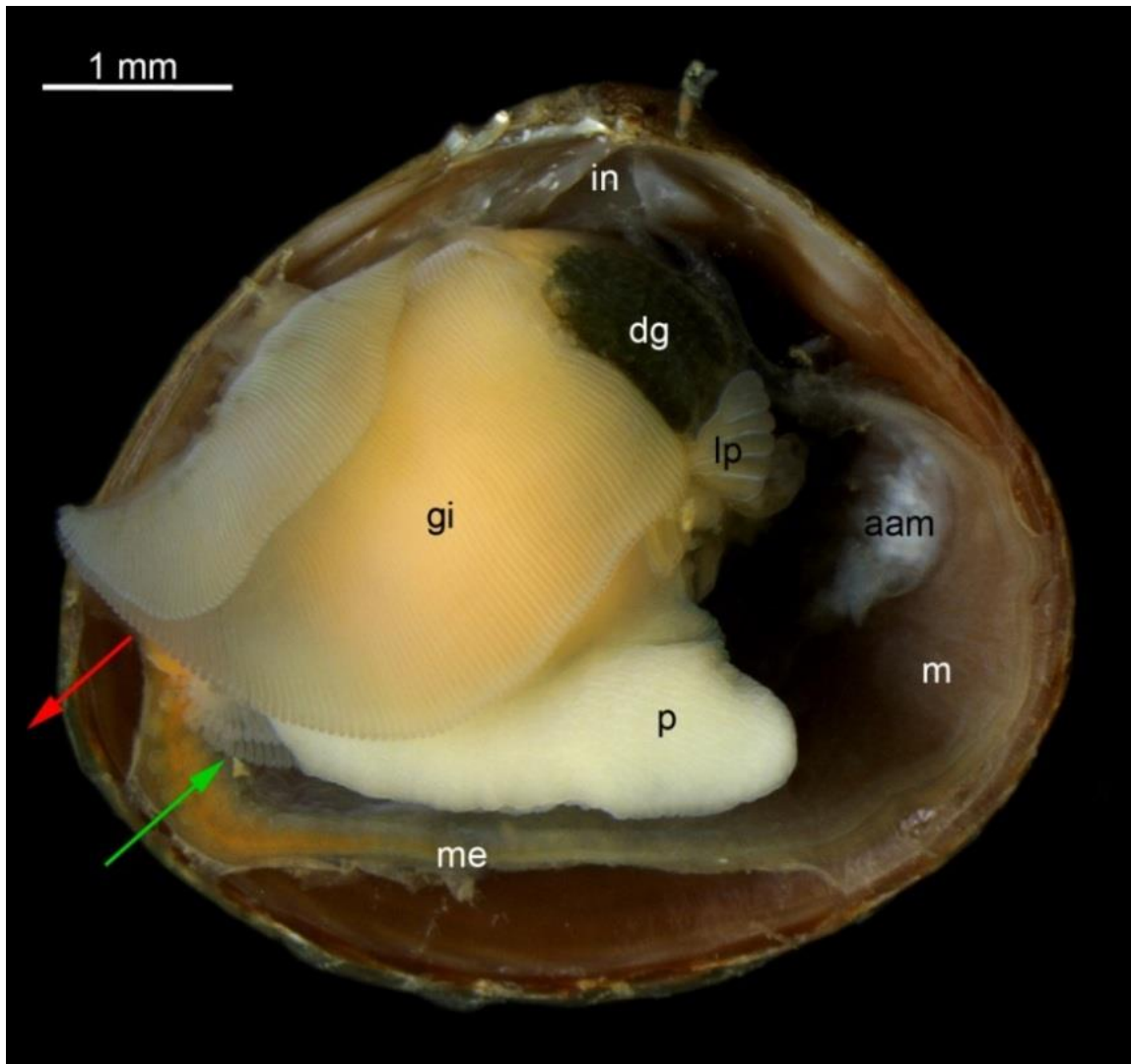


Figura 4.1. Disposición de las partes blandas de *D. digitaria* una vez retirada la valva derecha del ejemplar. Abreviaturas: aam, músculo aductor anterior; dg, glándula digestiva; gi, branquias; in, charnela; lp, palpos labiales; m, manto; me, borde del manto; p, pie. Flechas: verde, abertura inhalante; roja abertura exhalante.

Aparecen dos músculos aductores en la zona medio dorsal, uno anterior arriñonado, situado delante de los palpos labiales y otro posterior, más redondeado de tamaño ligeramente mayor

que se sitúa por encima de la abertura exhalante del manto. Ambos poseen una porción vítrea (aductor fásico) responsable de la apertura de las valvas y otra porción nacarada, blanco brillante (aductor tónico) responsable del cierre de las mismas (Figura 4.2).

El pie es voluminoso, alargado pero poco apuntado, con la parte anterior más ancha que la posterior; se sitúa bajo la gónada ocupando la porción ventral del cuerpo. En el sistema digestivo, el intestino queda inmerso en la gónada, y el estómago en la glándula digestiva, presentando la boca en la región anterior del cuerpo, entre los palpos labiales por detrás del músculo aductor anterior, mientras que el ano desemboca detrás del músculo aductor posterior. El manto es una lámina de aspecto membranoso, delicada y blanquecina, excepto en su borde ventral, donde adquiere un carácter musculoso y se colorea de un tono anaranjado, especialmente en su porción posterior donde se aprecian las aberturas inhalante y exhalante, ya que el manto en *D. digitaria* no llega a formas verdaderos sifones.

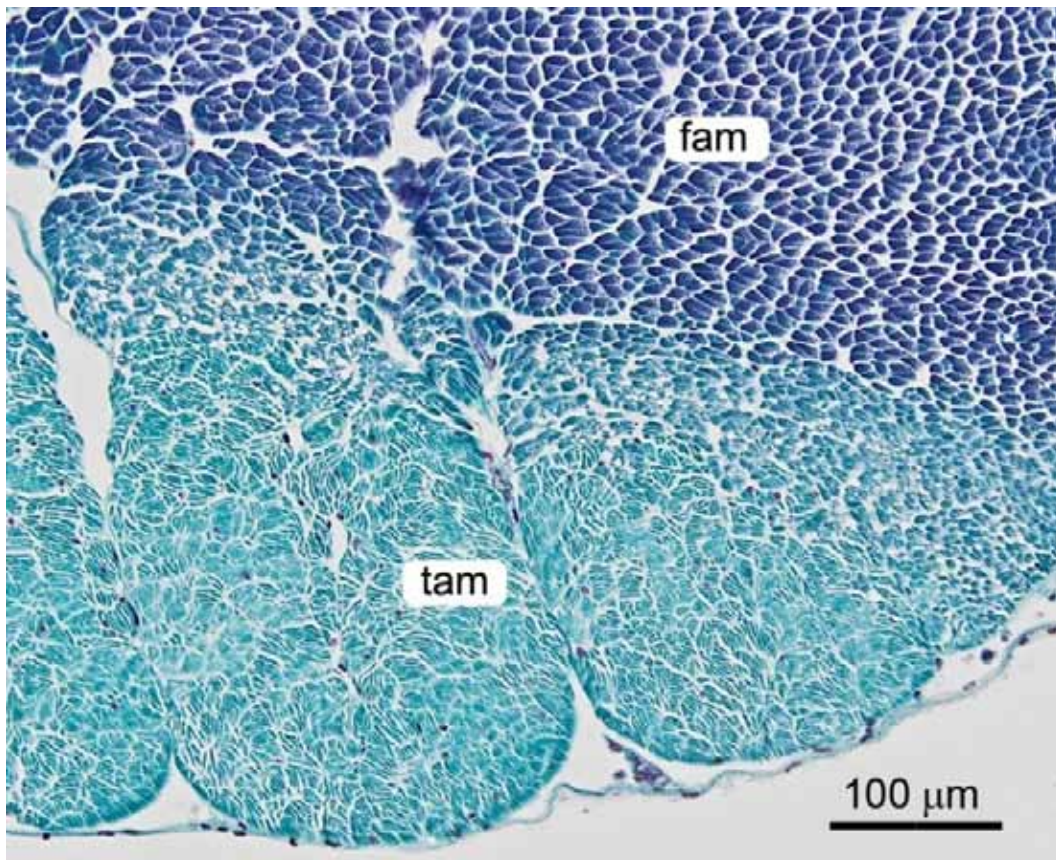


Figura 4.2. Detalle del músculo aductor anterior donde se observan los dos tipos de fibras musculares presentes. Tinción hematoxilina – V.O.F. Abreviaturas: fam, músculo aductor fásico; tam, músculo aductor tónico.

Anatomía descriptiva e histología

Manto

Está formado por dos láminas (lóbulo izquierdo y derecho) lisas, traslúcidas y blanquecinas, que tapizan la superficie interna de las valvas y que cubre toda la masa visceral del animal (Figura 4.1). A su través pueden apreciarse la glándula digestiva, las branquias, el pie y en algunos casos la gónada cuando ésta se encuentra madura. El manto cambia de apariencia en el margen ventral, a partir de la línea paleal, siendo más grueso y musculoso, presentando tenues ondulaciones perpendiculares al borde de la valva y adquiriendo una tonalidad anaranjada

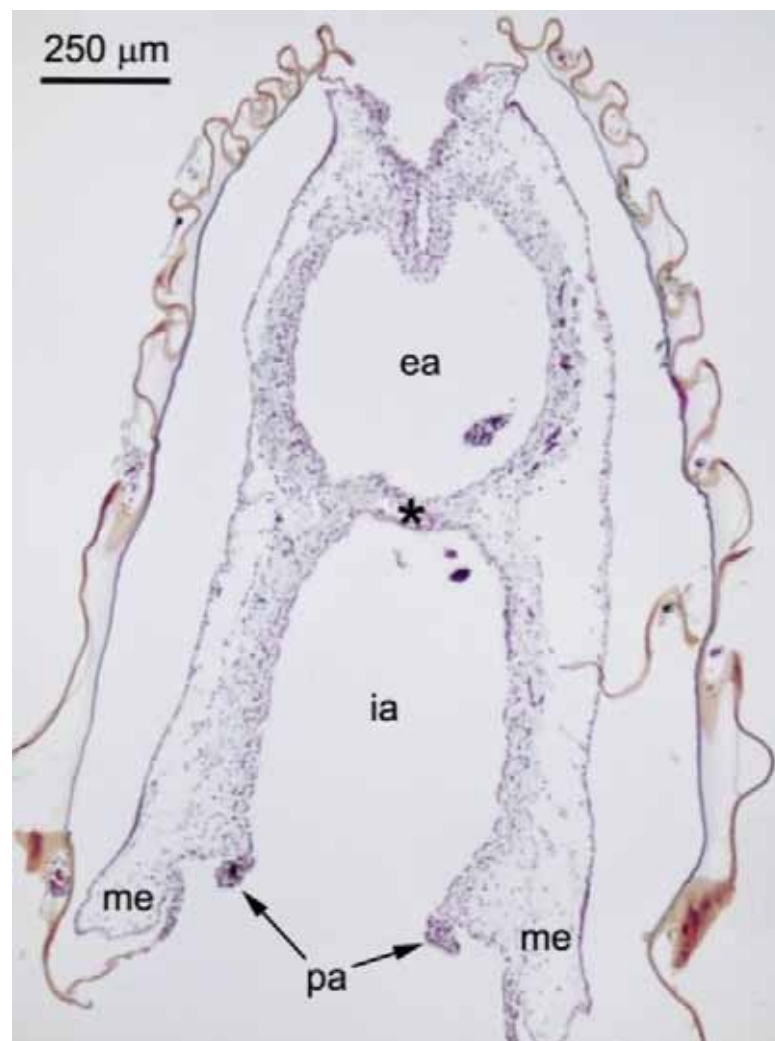


Figura 4.3. Corte transversal del manto a la altura de las aberturas inhalante y exhalante de un ejemplar de *D. digitaria* descalcificado. El asterisco (*) marca el lugar de fusión del manto que da lugar a las aberturas inhalante y exhalante. Abreviaturas: ea, abertura exhalante; ia, abertura inhalante; me, borde del manto; pa, papila, en realidad corresponde al lóbulo interno del borde del manto.

El manto no forma verdaderos sifones, aunque se fusiona posteriormente para dar lugar a dos aberturas, una superior exhalante y otra inferior inhalante que no se encuentra fusionada ventralmente y posee en su borde entre seis y ocho papilas (Figura 4.3, 4.4). Los lóbulos del manto aparecen fusionados a la altura de los músculos aductores, y a lo largo del margen dorsal (istmo), aunque son libres en su margen ventral. Ambos lóbulos, a lo largo de su recorrido dorsal, se encuentran fusionados con la masa visceral.

El epitelio del manto es de tipo plano simple, tanto en su cara interna como en la externa, excepto en el borde ventral libre, donde pasa a ser de tipo cuboidal simple. Se observan células columnares glandulares subepiteliales en la cara externa de la porción distal del manto, pero solo en la región basal del lóbulo externo.

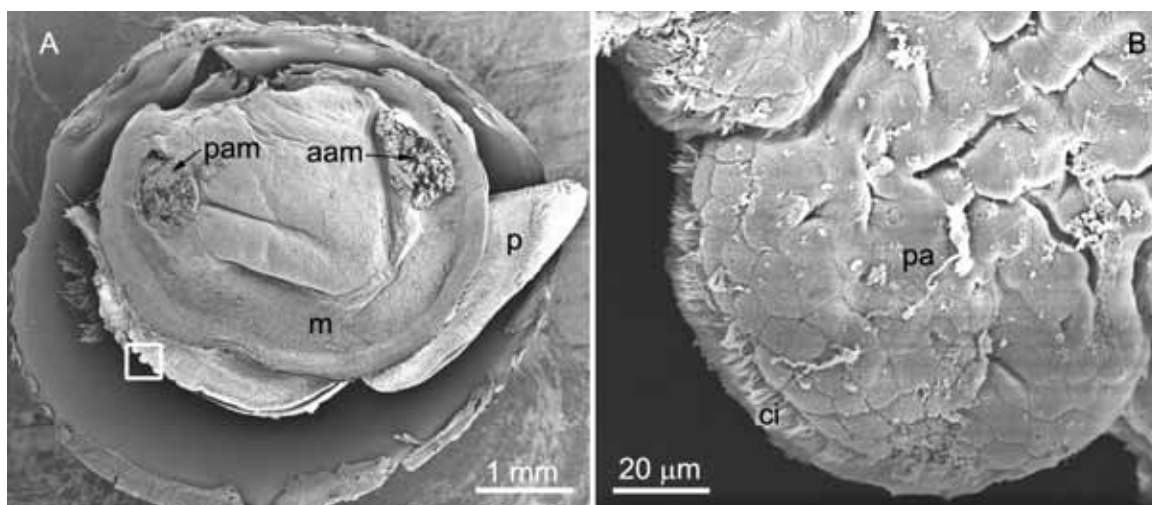


Figura 4.4. A, imagen general de SEM de las partes blandas de un ejemplar de *D. digitaria* donde se aprecia cómo el manto cubre toda la masa visceral. B, detalle del borde del manto en la abertura inhalante (recuadro blanco) donde se puede apreciar la densa ciliatura que presentan las papilas en su borde. Abreviaturas: aam, músculo aductor anterior; ci, cilios; m, manto; p, pie; pam, músculo aductor posterior.

El epitelio de la superficie externa del manto es liso, mientras que en la cara interna se observa una banda de epitelio ciliado de una anchura de 120 a 190 μm situada en su porción distal, en torno a 300 μm del margen del lóbulo interno del manto. Esta banda ciliada recorre el manto desde la parte anterior, donde es poco patente, hasta la posterior, donde se hace más densa. El borde de las papilas de la abertura inhalante también aparece densamente ciliada (Figura 4.4), lo que podría indicar un carácter sensorial de esta estructura. El margen ventral

libre presenta los tres lóbulos habituales del manto en bivalvos, apareciendo el denominado surco periostracal entre el lóbulo externo y el medio, y donde se observa el periostraco adherido a la superficie externa del lóbulo medio del manto. En el lóbulo medio se han observado estructuras con una aparente función sensorial, formadas por un penacho de cilios asociados a un largo cilio solitario. En el manto se observa una musculatura radial (orientación dorso – ventral del manto) presente solo en su tercio distal y cuyo margen dorsal es responsable de la impresión en la cara interna de la concha de la línea paleal. La musculatura se compone de una sola capa de fibrillas bien desarrollada, que nacen pegadas a la cara interna del epitelio externo del manto, a la altura de la línea paleal (Figura 4.5).

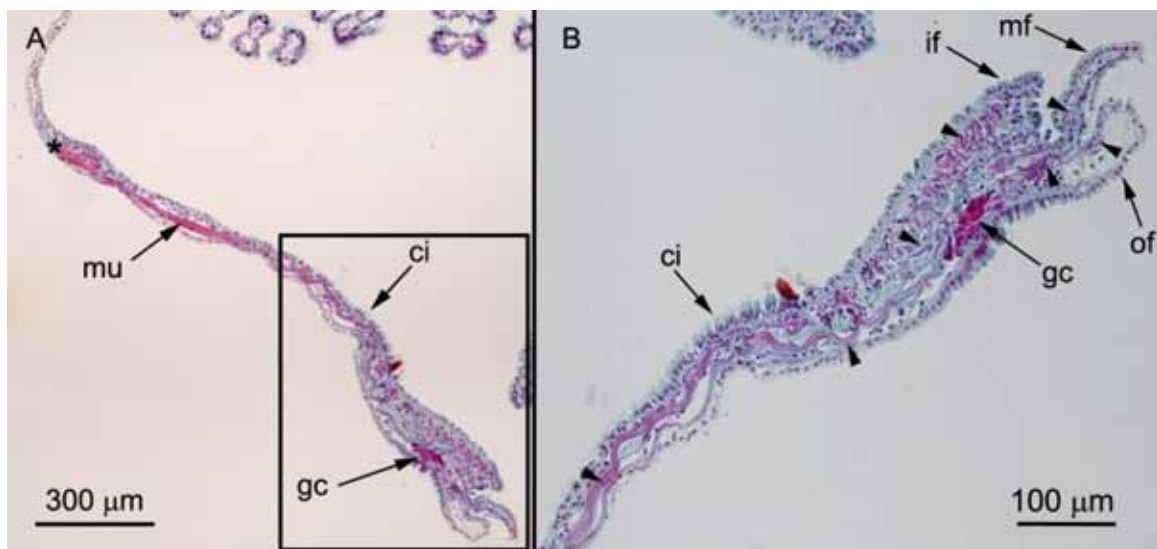


Figura 4.5. Disposición general de la musculatura del manto de *D. digitaria*. A, parte distal del manto donde se aprecia la capa muscular que penetra en los lóbulos. B, detalle del borde del manto (recuadro de A) donde se observa cómo la capa muscular compacta se transforma en una red de fibrillas. Abreviaturas: ci, cilios; gc, células glandulares; if, lóbulo interno; mu, banda muscular; mf, lóbulo medio; of, lóbulo externo. Los triángulos señalan la presencia de haces de fibras musculares que se extiende por todo el borde del manto.

Esta banda muscular avanza cerca del epitelio externo en forma de un único haz hacia el borde del manto, donde se divide formando una red de fibrillas que penetra en los tres lóbulos y se inserta a nivel subepitelial (Figura 4.5). Las fibras musculares se observan especialmente abundantes en el área del lóbulo interno, sobre todo en la porción posterior del borde del manto, lo que seguramente responde a la existencia en esa zona de la abertura inhalante. Esta musculatura sería responsable de controlar la longitud del borde del manto y

junto con los senos hemocélicos de la forma de sus lóbulos, especialmente del lóbulo externo, implicado en la formación de las costillas oblicuas en *D. digitaria*, cuestión a la que se dedica el capítulo 2 del presente trabajo.

Branquias

Los ctenidios son eulamelibranquios, y están formados por dos pares de hemibranquias homorráblicas (filamentos branquiales de igual longitud) situadas a ambos lados del cuerpo, siendo la hemibranquia externa aproximadamente un tercio del tamaño de la hemibranquia interna (Figura 4.1), que es entera. Se componen de filamentos ciliados paralelos, dispuestos en dirección ligeramente oblicua al eje antero – posterior del animal, unidos entre sí por puentes transversales de tejido conjuntivo.

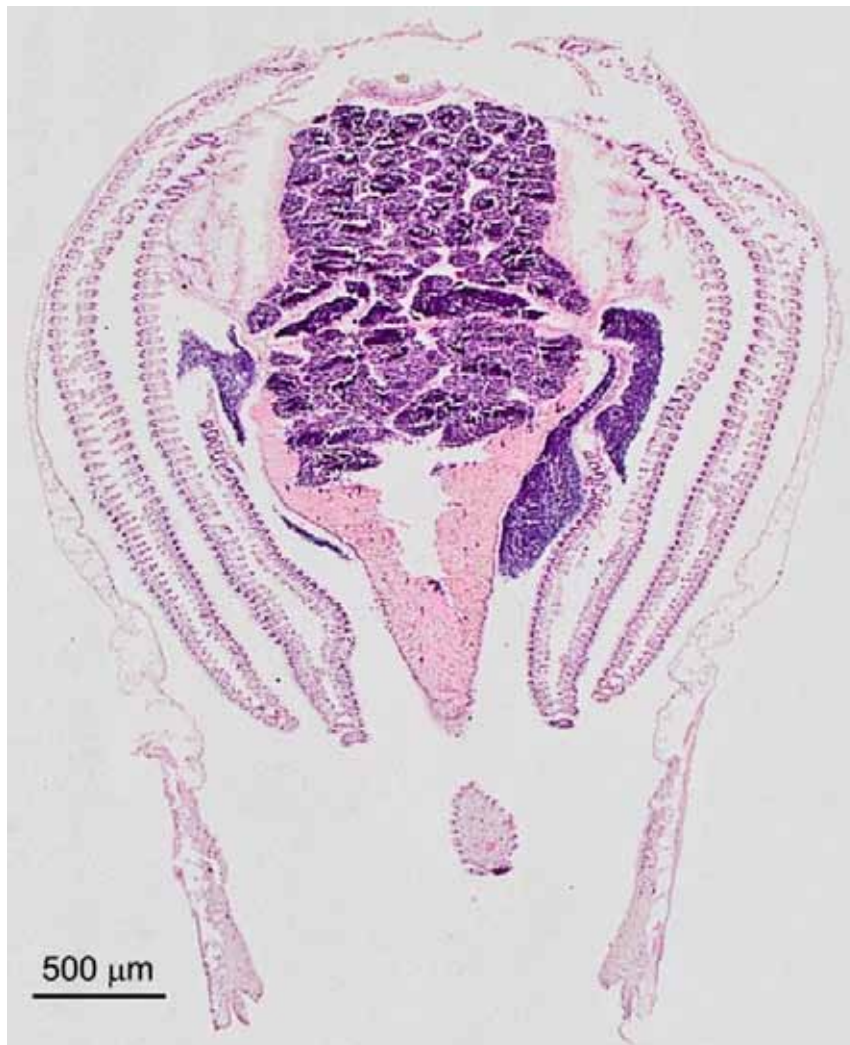


Figura 4.6. Corte transversal en la zona posterior de un ejemplar de *D. digitaria* donde se puede apreciar la estructura general de los ctenidios formados por dos hemibranquias.

Cada hemibranquia está formada por dos lamelas, la ascendente (exterior) y la descendente (interior), sin pliegues, que se fusionan entre sí y con el borde del manto en su extremo posterior dorsal (Figura 4.6), justo entre la abertura inhalante y exhalante, quedando una pequeña zona de branquia libre desde este punto hasta el músculo aductor posterior, donde la branquia vuelve a fusionarse por su borde dorsal, esta vez a la pared del cuerpo la hemibranquia interna y al manto la externa. Esta configuración se mantiene hasta la glándula digestiva, detrás de los palpos labiales, quedando libres en su margen anterior. En su extremo anterior las branquias se insertan, pero no se fusionan, con el surco oral de los palpos labiales, perteneciendo así a la Asociación de Categoría I dada por Stasek (1963). Sólo se observó la presencia de un surco alimenticio en la unión de las lamelas ascendentes y descendentes de la hemibranquia interna. En corte transversal, los filamentos de las branquias muestran una estructura ciliada de tipo eulamelibranquio (Figura 4.7).

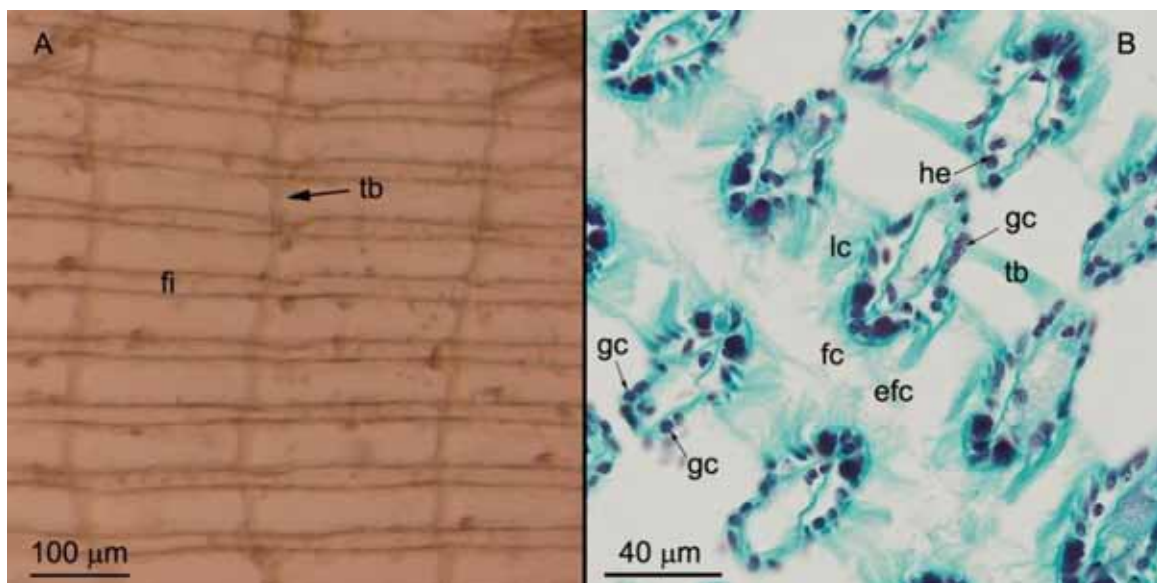


Figura 4.7. Estructura de la branquia de *D. digitaria*. A, imagen de la organización de paralela de los filamentos unidos por los puentes transversales de tejido conectivo. B, corte transversal de los filamentos donde se pueden apreciar la estructura ciliada así como los senos hemocíclicos que los recorren. Abreviaturas: efc, cilios eulatero – frontales; fc, cilios frontales; fi, filamento branquial; gc, células glandulares; he, hemocito; lc, cilios laterales; tb, puentes transversales.

Los cilios laterales (lc) surgen de cuatro células a cada lado del filamento, entrelazándose con los del filamento adyacente. Se aprecian también cilios eulatero – frontales (efc) en dos células muy aparentes que presentan un gran núcleo que se tiñe fuertemente de hematoxilina. Tres

células presentan los cilios frontales (fc) que son algo más cortos que el resto. En la cara abfrontal del filamento, un poco más debajo de las células ciliadas laterales, aparecen dos células glandulares (gc).

Pie

El pie de *D. digitaria* es un órgano bien desarrollado, de color blanquecino y aspecto musculoso (Figura 4.1). Posee una forma alargada y cuadrangular, apuntada en su extremo anterior y truncado en el posterior.

La superficie del pie aparece surcada de acanaladuras más o menos profundas tapizadas por un epitelio de tipo cuboidal simple con abundantes cilios (Figura 4.8), que disminuyen en densidad desde la parte anterior del pie hacia el extremo posterior.

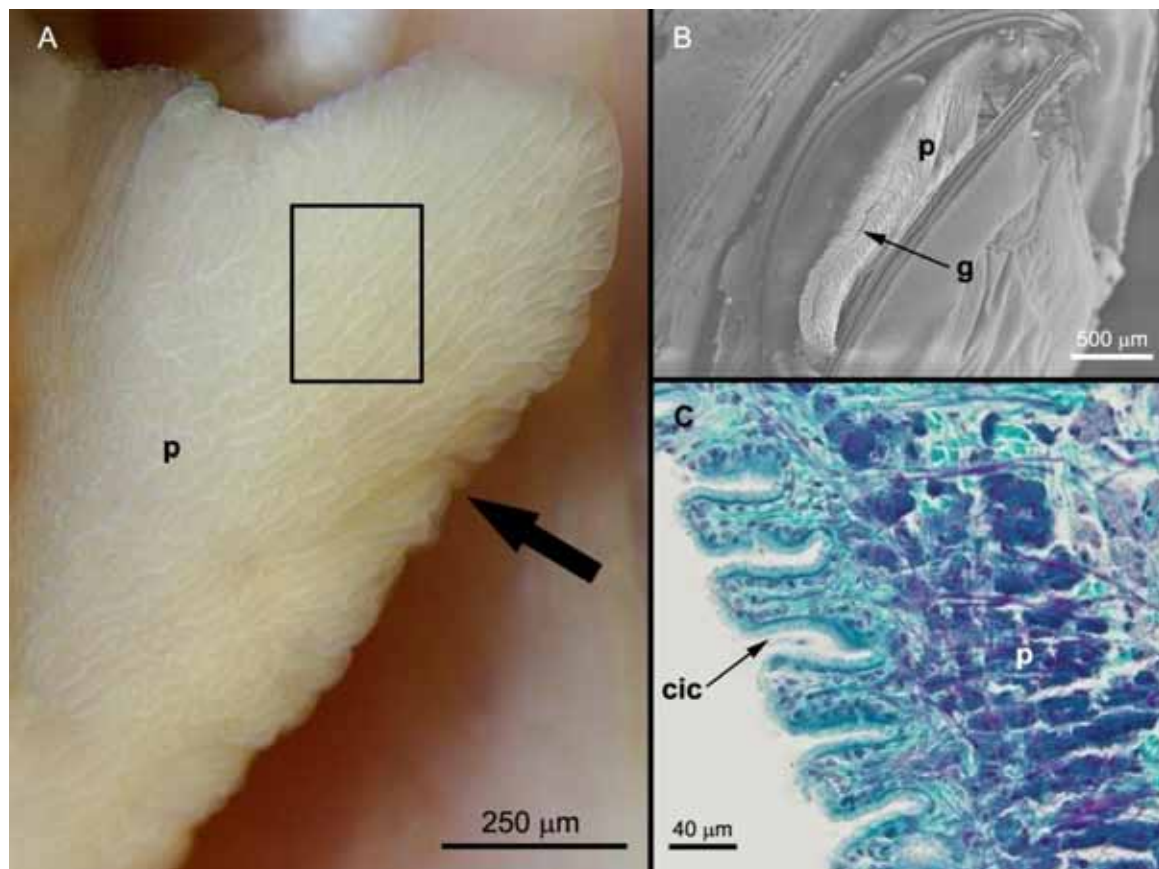


Figura 4.8. Morfología de la superficie del pie de *D. digitaria*. A, epitelio externo del pie donde se aprecian las acanaladuras ciliadas. La flecha indica la posición del surco del pie en posición ventral. B, imagen de SEM de la zona ventral del pie donde se aprecia el surco. C, corte transversal de las acanaladuras ciliadas del epitelio del pie. Se pueden observar el epitelio cuboidal densamente ciliado. Abreviaturas: cic, canales ciliados; g, surco del pie; p, pie.

El pie, comprimido lateralmente, presenta un surco bien definido en el margen ventral, que recorre algo más de su mitad anterior (Figura 4.8). En corte sagital se aprecia una glándula del biso grande y de corte ovalado, situada en la región postero – dorsal, que se abre mediante el conducto del biso en la mitad anterior del surco del pie (Figura 4.8). El epitelio del conducto del biso es de tipo columnar simple, densamente ciliado y con abundantes células de tipo glandular. En ejemplares adultos (machos y hembras entre 6,5 y 7,5 mm de longitud) se ha podido observar las células de la glándula del biso secretando el propio filamento, así como fragmentos del biso a lo largo del conducto y sobresaliendo del mismo (Figura 4.10).



Figura 4.9. Corte sagital del pie de *D. digitaria* donde puede apreciarse su densa musculatura. La línea punteada delimita el pie. Abreviaturas: aam, músculo aductor anterior; arm, músculo retractor anterior del pie; bc, conducto del biso; bg, glándula del biso; dg, glándula digestiva; go, gónada; p, pie; pam, músculo aductor posterior; prm, músculo retractor posterior del pie.

La glándula del biso en corte transversal posee forma redondeada, su interior alberga una cavidad cuyo epitelio presenta marcadas y profundas invaginaciones ciliadas en forma de láminas en el sentido de su eje mayor. En cada uno de estos repliegues aparecen numerosas células glandulares subepiteliales que secretan una sustancia a modo de cintas mucosas al lumen de la glándula, que se tiñen de púrpura con hematoxilina – VOF (Figura 4.10). Es en esta cavidad donde las secreciones filamentosas se trenzan para dar lugar a un cordón o filamento mucho más grueso, el biso, que recorre el canal del biso hasta llegar al surco del pie.

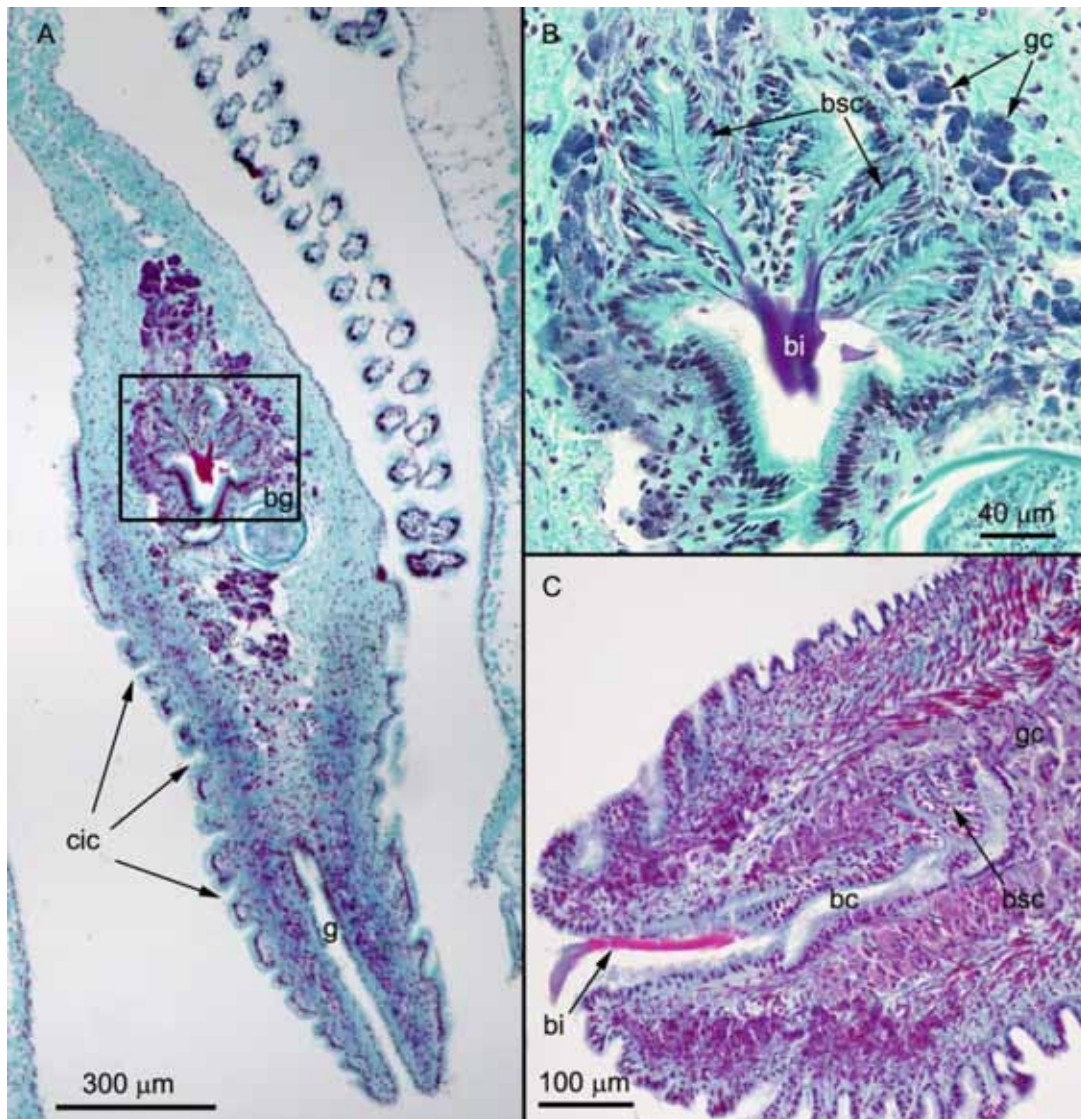


Figura 4.10. Corte transversal del pie de *D. digitaria* a nivel de la glándula del biso de una hembra activa de 6,7 mm de largo (A, B) y un macho de 7,5 mm de largo (C). A, vista general de la estructura de la glándula del biso. B, (recuadro de A) detalle de las invaginaciones ciliadas de la glándula del biso secretando el filamento del biso. C, Fragmento del biso a en la parte distal del conducto del biso, asomando al exterior. Abreviaturas: bc, conducto del biso; bg, glándula del biso; bi, biso; bsc, células secretoras del biso; cic, canales ciliados; g, surco del pie; gc, células glandulares.

En sección transversal del pie, se observaron grandes senos hemocélicos y tejido conectivo surcado de fibras musculares transversales ocupando la porción central del mismo, que está flanqueada por un denso tejido muscular dispuesto a modo de tres capas (Figuras 4.9, 4.11).

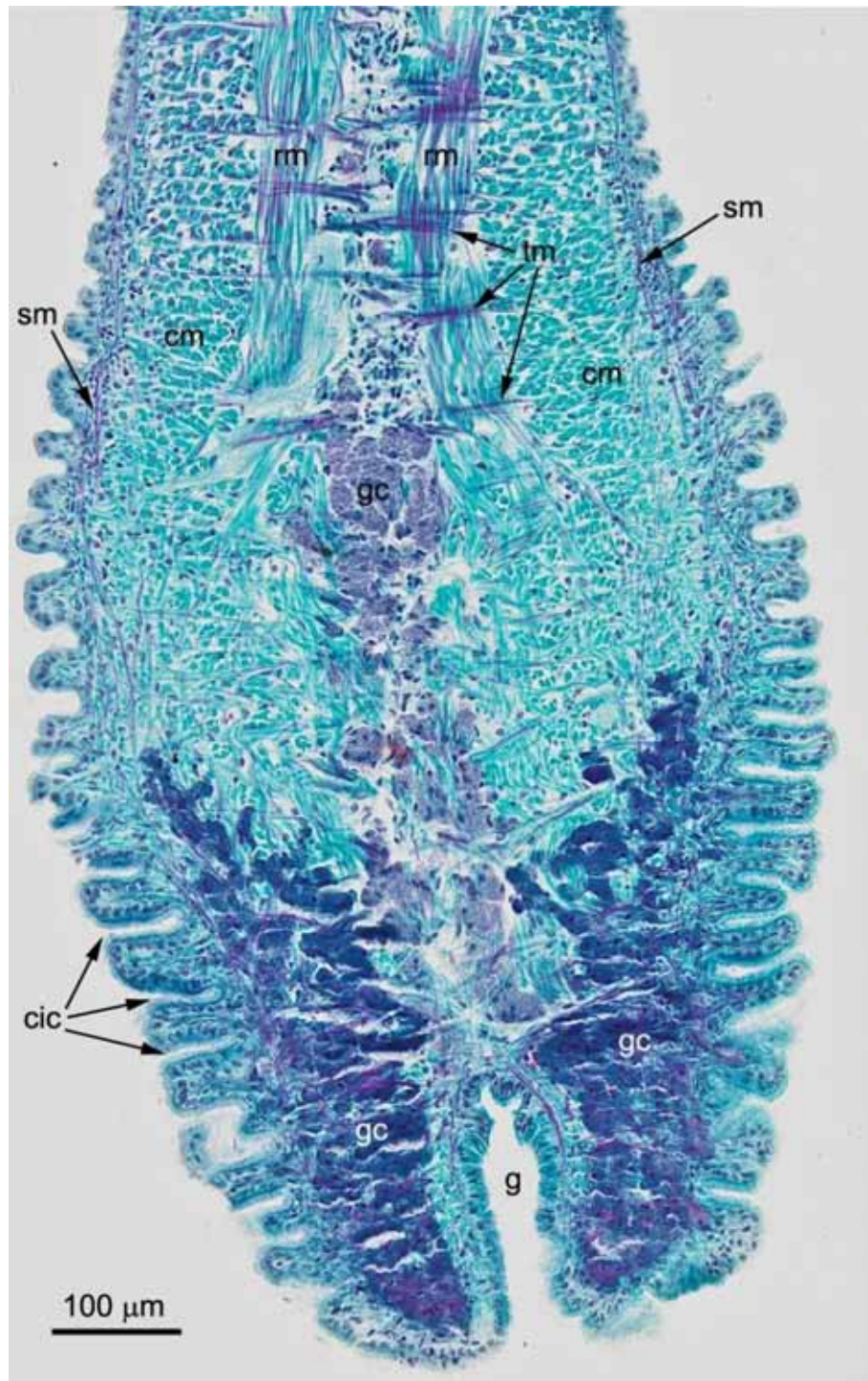


Figura 4.11. Corte transversal del pie donde se observa la disposición de las capas musculares y las células glandulares. Abreviaturas: cic, canales ciliados; cm, musculatura circular; g, surco del pie; gc, células glandulares; rm, musculatura radial; sm, musculatura subepitelial; tm, musculatura transversal.

La más interna de estas capas se observa como dos anchas bandas de musculatura longitudinal, perpendicular al plano ventral del pie que penetran desde la región visceropetal anterior y posterior, correspondiendo a los músculos retractores del pie.

Cada una de estas bandas musculares se divide en dos al llegar a la porción medio – ventral para abrazar a la zona de senos hemocélicos, formando un denso entramado de fibras musculares a lo largo del pie. La segunda es una capa de tejido muscular circular, más externa y gruesa, que presenta las fibras dispuestas transversalmente a las de la primera. La tercera y más externa de las capas musculares observada está compuesta por una fina red subepitelial de fibrillas que se insertan bajo los surcos ciliados del epitelio del pie, relacionada probablemente con movimientos de éste. En la mitad ventral del pie, la primera y segunda capa muscular, junto con las fibras transversales que cruzan los senos hemocélicos forman un compacto tejido muscular. Los senos hemocélicos a modo de esqueleto hidráulico, junto con la musculatura transversal, longitudinal y circular, son los responsables de los movimientos del pie. El pie es un órgano que posee numerosas células glandulares, todas en apariencia del mismo tipo, que se concentran en los dos tercios anteriores de su margen ventral, asociadas a las acanaladuras ciliadas del epitelio externo y al surco del pie (Figura 4.8 C, 4.11). Esto indica una probable función lubricante del epitelio a la hora del enterramiento del animal en el sustrato. En la parte posterior las células secretoras se encuentran asociadas a la glándula y al conducto del biso, donde encontramos dos tipos diferentes, unas situadas en el centro de la propia glándula encargadas de secretar el biso, y las que se encuentran a lo largo el conducto, que igual que las asociadas al epitelio del pie secretan un tipo de mucopolisacárido ácido (se tiñe de azul púrpura con PAS – azul Alcian).

Sistema digestivo

PALPOS LABIALES

Aparecen dos palpos labiales, situados a derecha e izquierda de la boca, cada uno formado por dos lóbulos superpuestos con forma triangular (Figura 4.12 A, B). Los palpos se encuentran fusionados en su base a la pared del cuerpo, a la altura donde el manto se une a la pared de la glándula digestiva, justo en la parte anterior de esta.

Los palpos derecho e izquierdo se unen entre sí mediante el labio, un istmo de tejido conectivo que se encuentra por encima y por debajo de la abertura de la boca. Los lóbulos superiores e inferior de los palpos poseen una cara lisa y la otra con seis o siete profundas acanaladuras paralelas densamente ciliadas con un epitelio de tipo cuboidal simple (Figura 4.12 B, D).

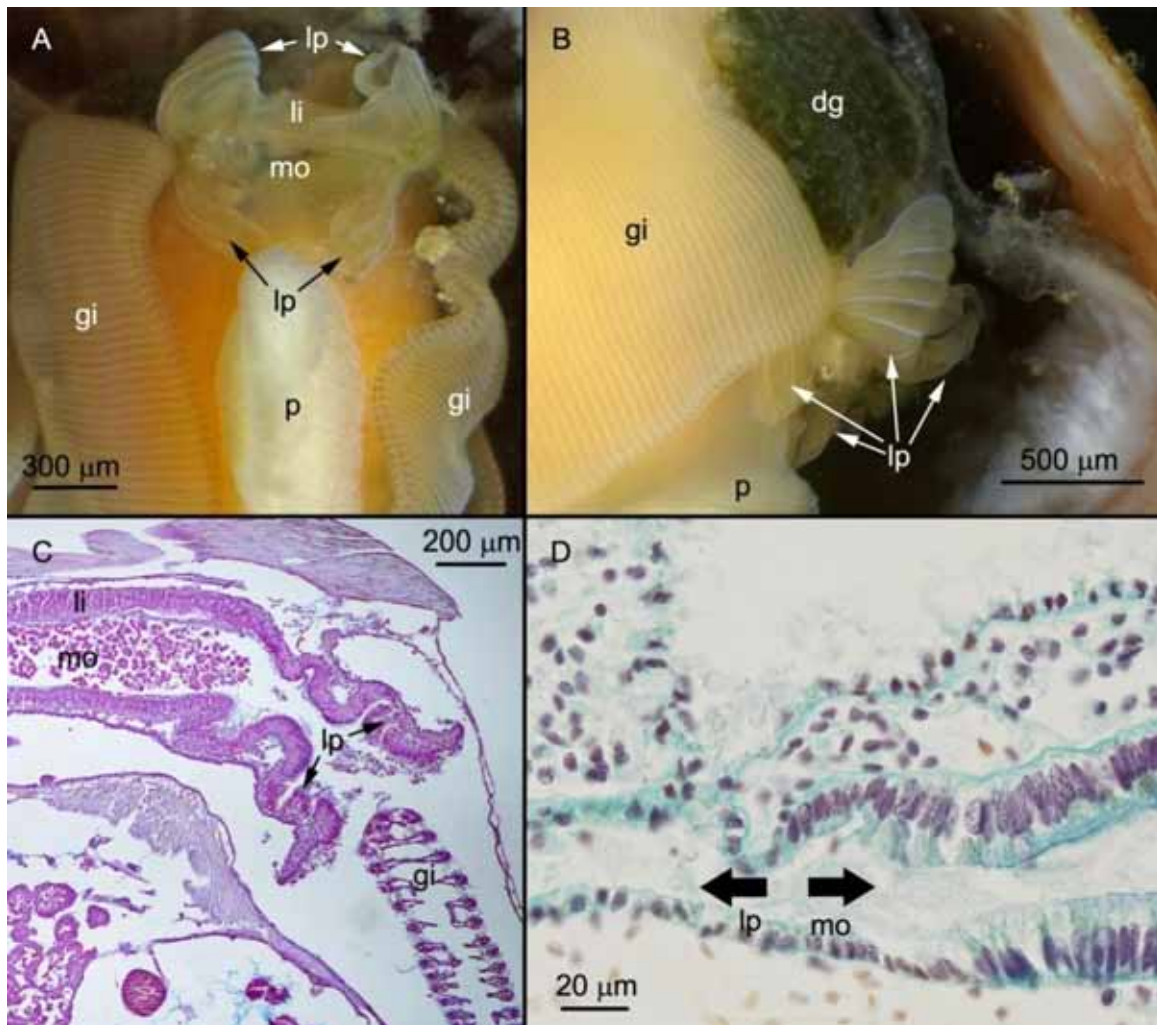


Figura 4.12. Palpos labiales de *D. digitaria*. A, vista ventral de los palpos donde se aprecian los dos pares de lóbulos abiertos, unidos por los labios, y en su centro la boca. B, vista lateral de los palpos, apreciándose uno de los lóbulos desplegado y mostrando la superficie acanalada. C, corte transversal de los palpos donde se aprecia cómo estos abrazan la hemibranchia. D, corte sagital de la zona de transición del epitelio cuboidal simple de los palpos labiales al columnar de la boca. Abreviaturas: dg, glándula digestiva; gi, branquias; li, labio; lp, palpo labial; mo, boca; p, pie.

Aparece un tenue surco situado en la línea de unión de la base del palpo superior e inferior, que se prolonga hasta la boca formando el llamado surco oral. Los palpos se proyectan hacia

delante y hacia abajo, plegándose de tal manera que enfrentan sus caras acanaladas. El margen anterior ventral libre de la hemibranchia interna está abrazado por el par de lóbulos del palpo (Figura 4.12 A, C), de manera que las partículas transportadas por el canal alimenticio presente en el borde ventral de la branchia interna son recogidas por aquellos y transportadas por el surco oral hasta la boca.

BOCA Y ESÓFAGO

La boca se sitúa en la parte antero-dorsal de la línea media, en el istmo de tejido que conecta los palpos labiales derecho e izquierdo, justo tras el músculo aductor anterior. La abertura es de contorno ovalado con los labios, dos delicadas láminas (superior e inferior) de tejido conectivo, ciñéndola (Figura 4.12 A). Esta da paso a un esófago corto (350-500 μm aprox.), ligeramente ascendente y con cierta curvatura, que conecta con la parte antero-dorsal del estómago y que atraviesa la porción anterior de la glándula digestiva (Figura 4.13). La boca y el esófago poseen un epitelio columnar simple, con su superficie cubierta de abundantes cilios (Figura 4.13 B, 4.12 D).

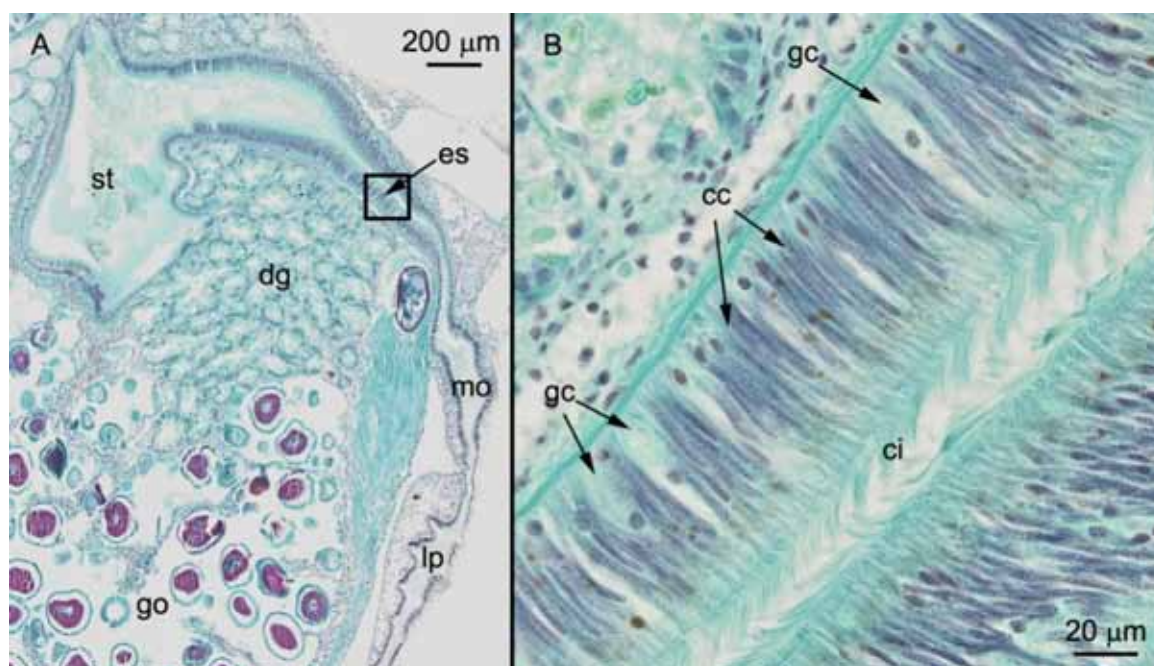


Figura 4.13. Boca y esófago de *D. digitaria*. A, vista general en corte sagital de la anatomía de la boca y el esófago en su conexión con la parte antero – dorsal del estómago. B, (recuadro de A), detalle de la estructura del epitelio columnar del esófago densamente ciliado, donde se diferencian dos tipos de células, las ciliadas y las glandulares. Abreviaturas: cc, células ciliadas; ci, cilios; dg, glándula digestiva; es, esófago; gc, célula glandular; go, gónada; lp, Palpos labiales; mo, boca; st, estómago.

Aparecen dos tipos celulares, uno de células ciliadas y otras glandulares (Figura 4.13 B), que secretan al esófago mucosustancias ácidas que se tiñen de azul brillante con la tinción de PAS – azul Alcian. No se aprecia un desarrollo muscular importante bajo el epitelio del esófago.

ESTÓMAGO

El estómago presenta forma cuadrangular en corte sagital, con una capucha dorsal, y en su parte posterior se estrecha formando una especie de saco. Se sitúa en la zona antero dorsal del cuerpo, inmerso en la glándula digestiva. Se comunica ventralmente por una amplia abertura con el intestino descendente, que alberga el saco del estilete cristalino (Figura 4.14).

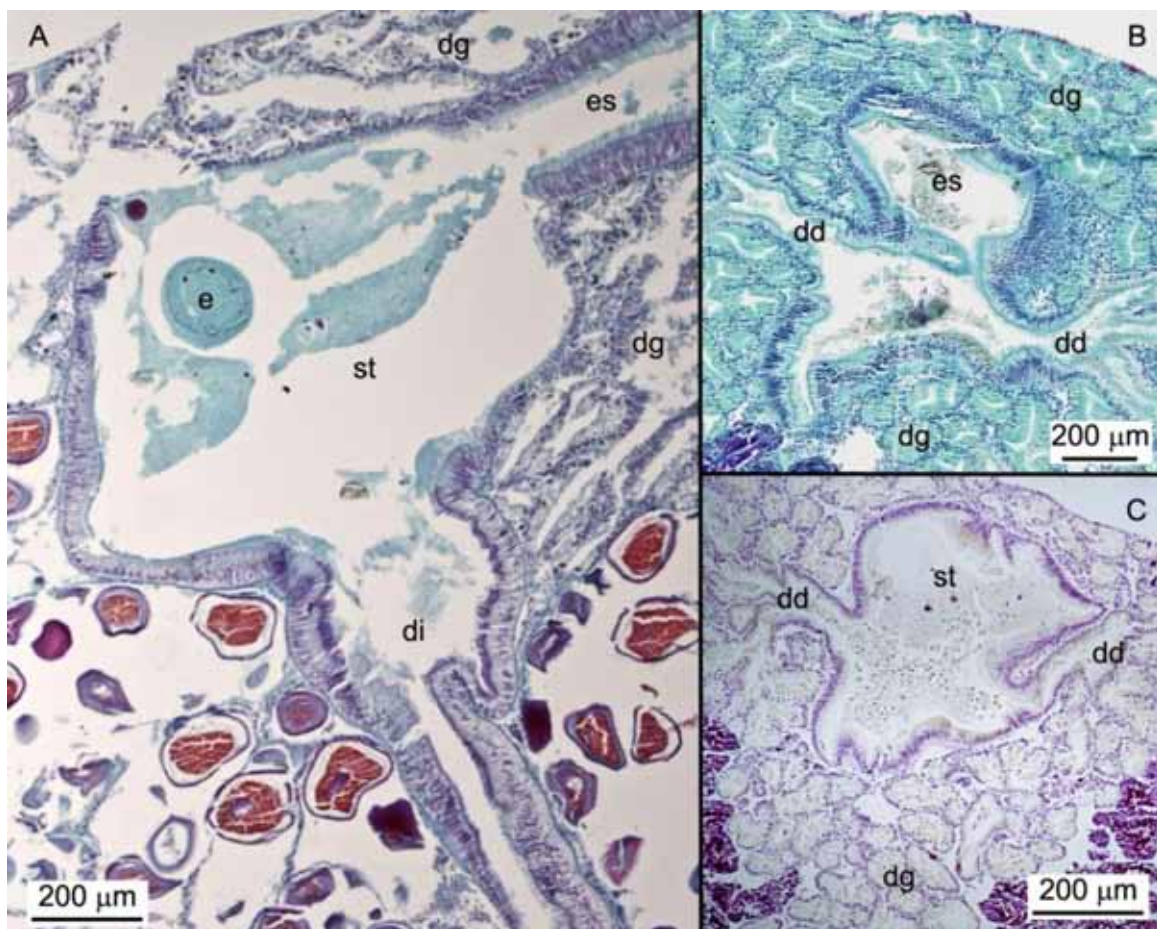


Figura 4.14. Estómago de *D. digitaria*. A, corte sagital del estómago donde se aprecia su forma cuadrangular y puede verse la entrada del esófago en su parte antero dorsal y la conexión ventral con el intestino descendente. B, corte transversal del esófago en el punto de entrada al estómago, debajo del cual se aprecia el vestíbulo y los conductos principales de los divertículos digestivos. C, corte transversal de la parte anterior del estómago donde se aprecia la ramificación de los conductos principales izquierdo y derecho de los divertículos digestivos. Abreviaturas: dd, divertículo digestivo; dg, glándula digestiva; di, intestino descendente; es, esófago; e, estilete cristalino; st, estómago.

En su pared anterior, bajo la entrada del esófago, aparece una abertura amplia, a modo de vestíbulo, que posteriormente se divide en dos conductos que se ramifican a izquierda y derecha penetrando profundamente en la glándula digestiva. Otros dos conductos más se abren hacia los divertículos digestivos, situados en la pared derecha e izquierda del estómago. Un epitelio columnar ciliado recubre las paredes internas del estómago, que son de espesor variable, ya que aunque siempre es un epitelio simple, cambia la altura de las células que lo componen, siendo especialmente altas en la pared posterior y en la salida del estómago al intestino descendente.

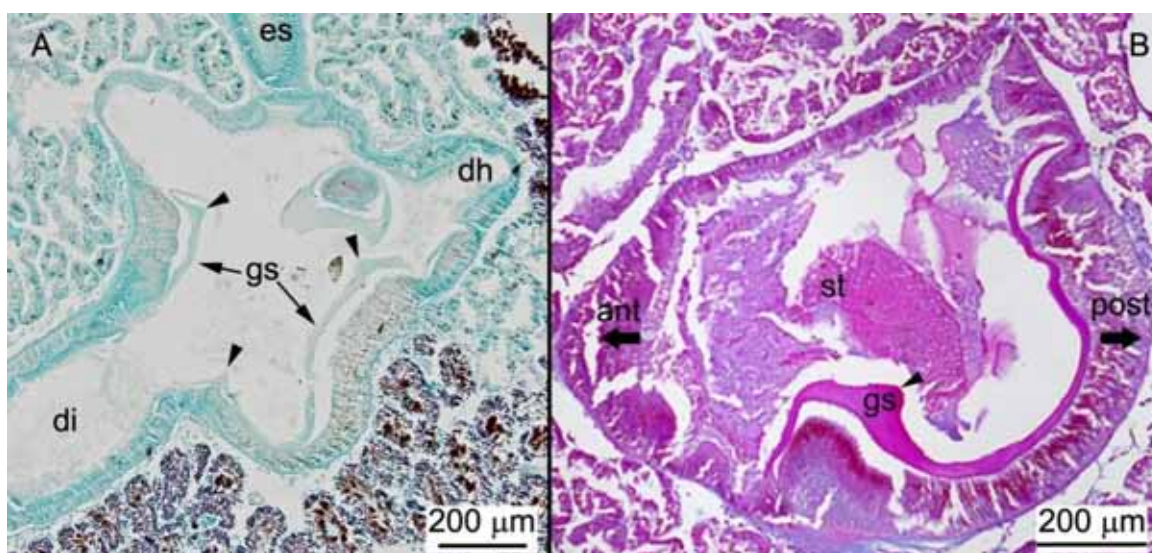


Figura 4.15. Escudo gástrico de *D. digitaria*. A, corte sagital del estómago donde se puede apreciar el escudo gástrico recubriendo sus paredes posterior y ventral, así como tres de sus dientes. En la zona dorsal se aprecia la capucha donde se encuentra una de las áreas de selección del estómago. B, corte frontal del estómago a nivel medio – dorsal donde se aprecia cómo el escudo gástrico también tapiza parte de su pared izquierda, formando el cuarto diente. En A y B Los triángulos indican la posición de los dientes del escudo gástrico. Abreviaturas: ant (flecha), indica la pared anterior del estómago; dh, capucha dorsal; di, intestino descendente; es, esófago; gs, escudo gástrico; post (flecha) indica la pared posterior del estómago; st, estómago.

El escudo gástrico, bien desarrollado, aparece recubriendo gran parte de la pared izquierda, posterior y ventral del estómago, a modo de placa quitinosa, con al menos cuatro dientes formados por engrosamientos de la placa. Se observaron dos áreas de selección, la primera situada en la capucha dorsal, sobre el escudo gástrico, y la segunda en la pared derecha del estómago, enfrente del escudo gástrico y justo antes de la abertura que comunica el estómago

con el intestino descendente. El estilete cristalino de *D. digitaria* es una varilla cilíndrica de aproximadamente 180 μm de diámetro. En sección transversal da la impresión de estar formado por capas concéntricas de mucus, donde su núcleo aparece más denso, observándose en las capas exteriores restos de partículas alimenticias (Figuras 4.14 A, 4.16).

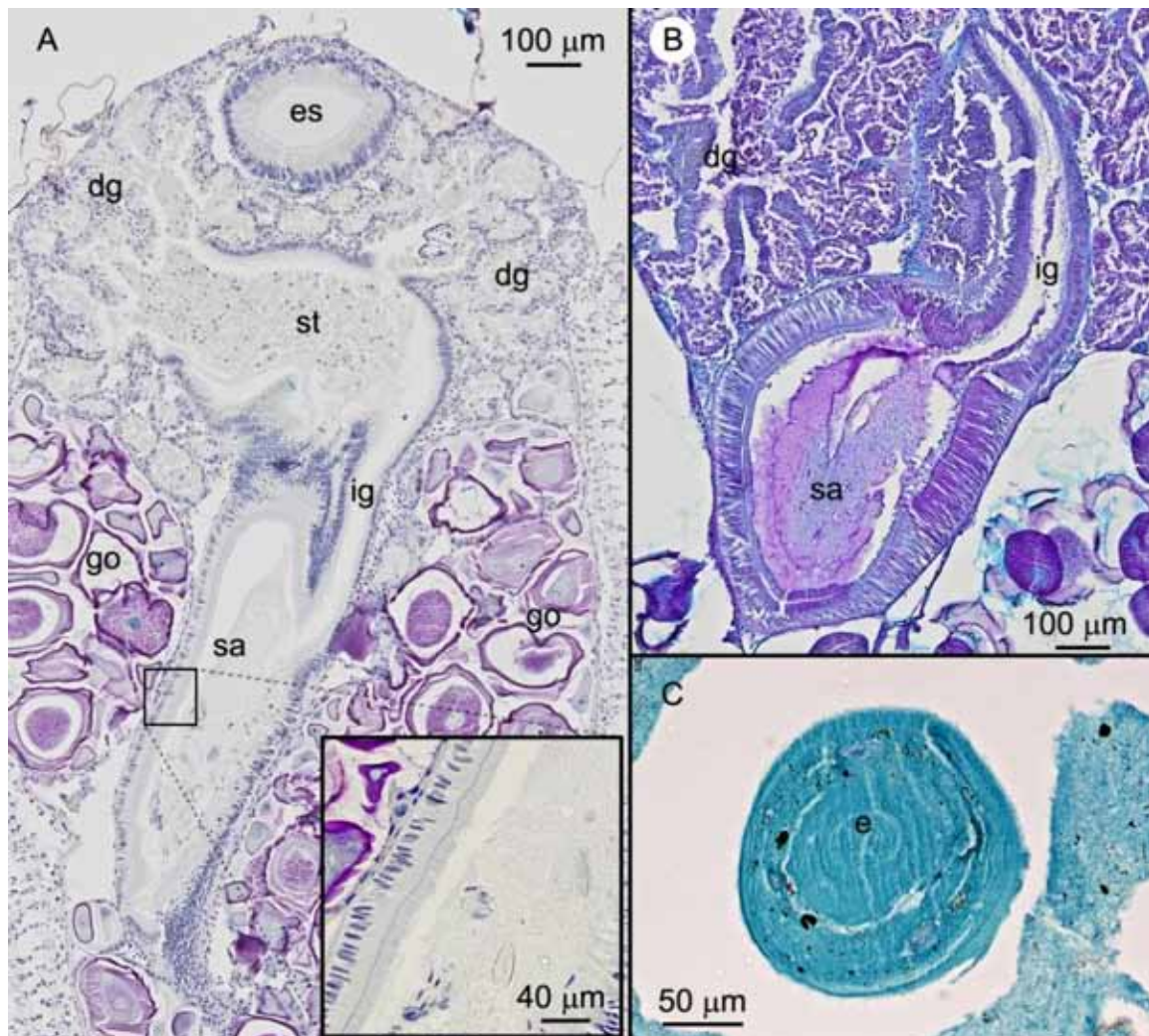


Figura 4.16. Saco del estilete cristalino de *D. digitaria*. A, corte transversal a nivel del intestino descendente. Se observa como un repliegue del intestino descendente forma el saco del estilete. La ampliación de A muestra un detalle del epitelio ciliado del saco del estilete. B, corte frontal del saco del estilete donde se observa la conexión entre éste y el surco del intestino. C, corte transversal del estilete cristalino, donde se aprecia su consistencia mucosa. Abreviaturas: dg, glándula digestiva; e, estilete cristalino; es, esófago; go, gónada; ig, surco intestinal; sa, saco del estilete; st, estómago.

En la mayor parte de los ejemplares estudiados no se pudo observar el estilete cristalino, lo que hace pensar que se trata de una estructura con poca consistencia, sin llegar a formar una barra gelificada, que se disolvería fácilmente durante el procesado de la muestra. El estilete se

halla contenido en un saco del estilete formado por un repliegue a lo largo de la parte posterior del intestino descendente, con el que se encuentra comunicado a lo largo de su borde anterior, de manera que no llega a formarse una cavidad cerrada independiente del tubo digestivo (Figura 4.16). El saco del estilete presenta un epitelio densamente ciliado de células columnares especialmente altas (70 a 100 μm), similar al observado en la parte superior del intestino descendente. Aunque no se ha observado directamente en *D. digitaria*, el estilete presumiblemente realiza un movimiento giratorio y de arriba abajo generado por los cilios del saco del estilete, haciendo que choque su parte distal con el escudo gástrico, por lo que presenta un cierto ángulo de curvatura. Éste es el funcionamiento habitual descrito en aquellos bivalvos que poseen este tipo de estructura.

GLÁNDULA DIGESTIVA

También llamada hepatopáncreas, la glándula digestiva es un órgano voluminoso y aparente situado en la zona anterodorsal del animal, tras los palpos labiales (Figura 4.9). Posee un color pardo o verdoso oscuro en los ejemplares vivos, pudiéndose encontrar parcialmente cubierta por la branquia interna (Figura 4.1). Es una glándula bilateral que se sitúa abrazando el esófago y el estómago. Está formada por un intrincado conjunto de conductos (divertículos digestivos) ramificados que terminan en pequeños ciegos o ácidos (Figura 4.14 B, C). La glándula digestiva se encuentra surcada por algunos paquetes musculares.

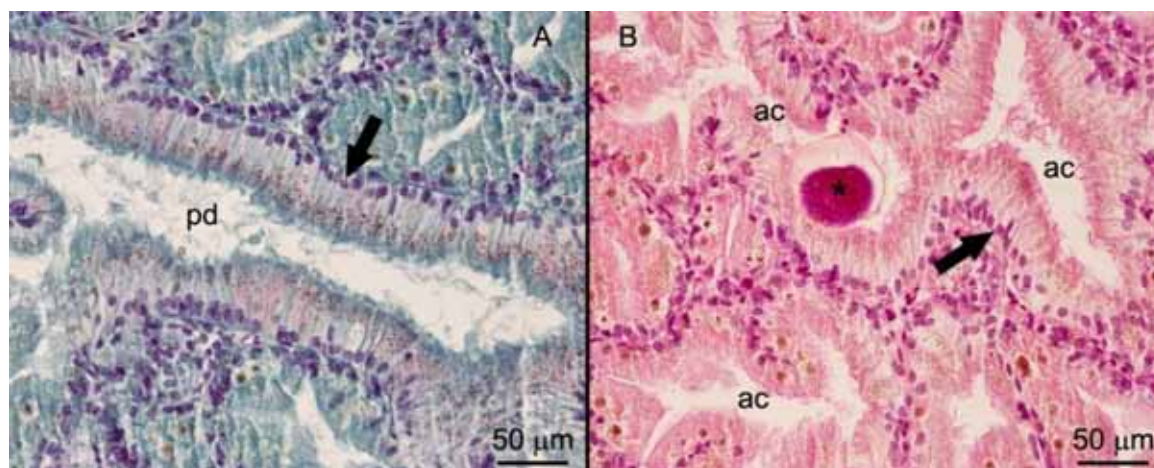


Figura 4.17. Divertículos digestivos de *D. digitaria*. El asterisco (*) señala un esporangio probablemente de *Marteilia* sp. A, detalle del epitelio columnar ciliado que presentan los conductos principales de los divertículos digestivos. B, detalle del epitelio columnar ciliado que presente en los ácidos de la glándula digestiva, muy similar al de los conductos principales. Abreviaturas: ac, ácido; pd, divertículo principal.

Cuando la gónada del animal se encuentra madura, y su volumen aumenta considerablemente, se observa una infiltración de los folículos gonadales en la propia glándula. El conducto principal se abre bajo la entrada del esófago al estómago en forma de surco transversal, que se divide muy pronto en dos conductos izquierdo y derecho que a su vez se ramifican enormemente dando lugar a los divertículos digestivos, terminando en pequeñas cámaras ciegas (Figura 4.14, B, C). El epitelio de estos conductos es de tipo columnar ciliado, donde las células poseen el núcleo en su base y presentan numerosas inclusiones citoplasmáticas. En el epitelio que recubre los ciegos se ha observado también un solo tipo de células ciliadas, altas, con el núcleo en su base y numerosas inclusiones citoplasmáticas (Figura 4.17). No se aprecian otro tipo de células referidas en esta clase de epitelio en Saleuddin 1965, como las llamadas crípticas o las infrecuentes células flageladas.

INTESTINO

El intestino comienza en la parte medio-ventral del estómago, es un conducto poco intrincado dividiéndose en tres porciones: intestino descendente o gástrico, ascendente o intestino medio y posterior o recto (Figura 4.18). Excepto el recto, las otras dos porciones del conducto intestinal se encuentran inmersas en el tejido gonadal.

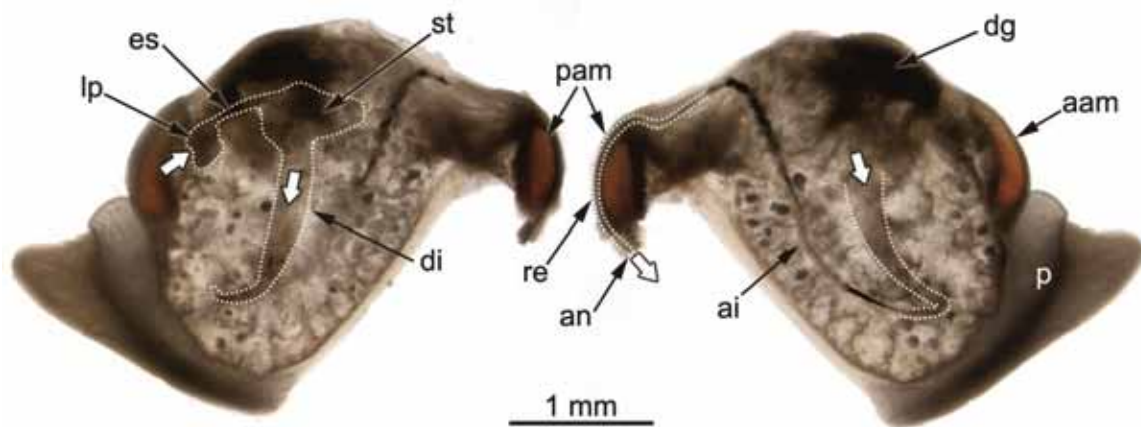


Figura 4.18. Hembra de *D. digitaria* a la que se le ha retirado la mayor parte de los gametos para hacer visible el recorrido del sistema digestivo. Los palpos labiales, el estómago y las partes del intestino que no son claramente diferenciables se han marcado con una línea blanca discontinua. Las flechas blancas indican el sentido de avance del alimento y la salida por el ano de las heces. Abreviaturas: aam, músculo aductor anterior; ai, intestino ascendente; an, ano; dg, glándula digestiva; di, intestino descendente; es, esófago; lp, palpos labiales; p, pie; pam, músculo aductor posterior; re, recto.

El intestino descendente es un conducto ancho en su parte superior que se va estrechando a modo de embudo a medida que baja. Se encuentra situado más próximo a la pared izquierda del animal, de tal manera que en su parte distal se curva hacia delante y describe una arco hacia la derecha para comenzar a subir de forma abrupta (intestino ascendente) hasta la zona dorsal del bivalvo, justo detrás de los riñones, sin describir ningún otro giro o vuelta en su recorrido.

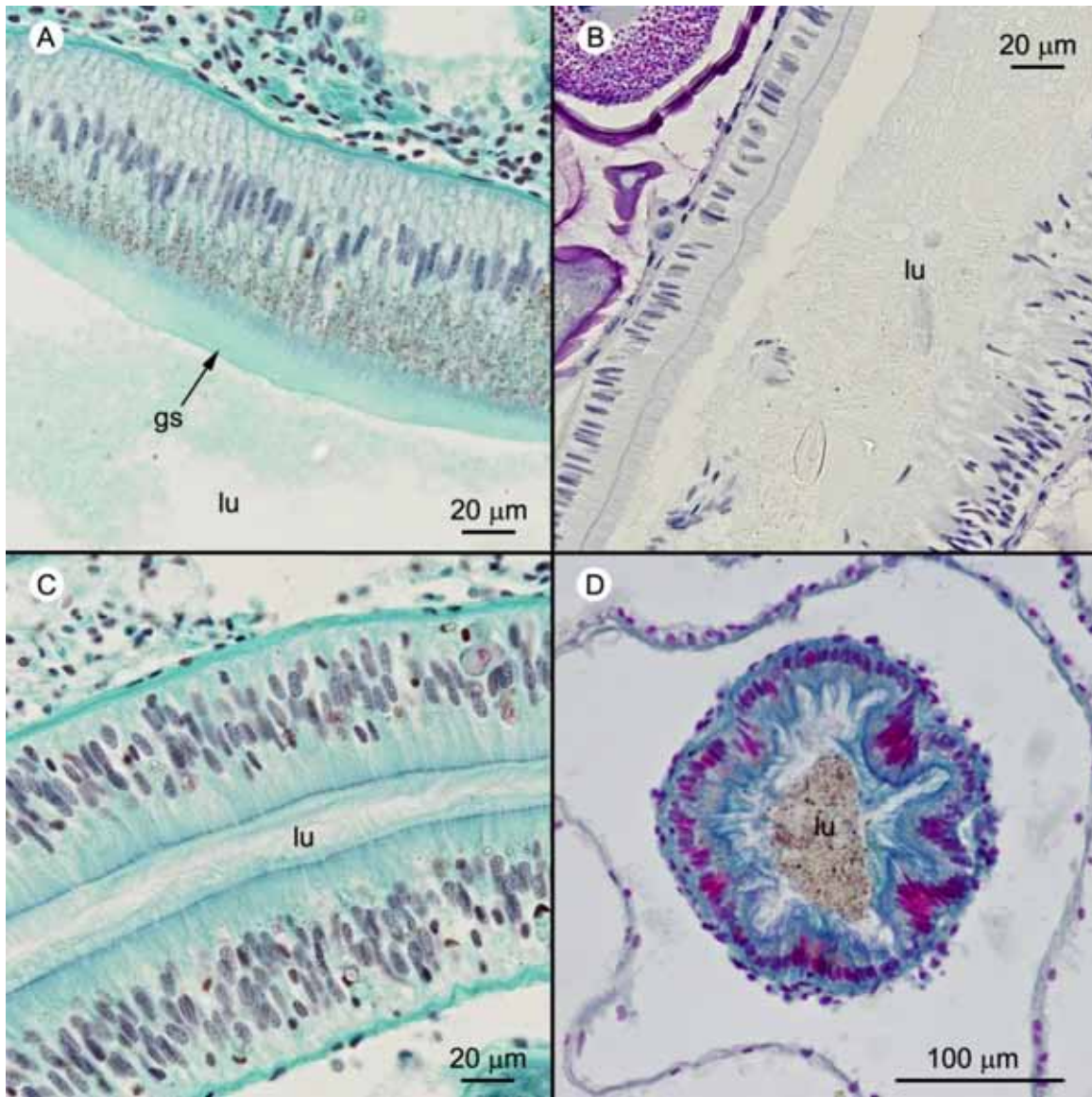


Figura 4.19. Detalle del epitelio de diferentes porciones del sistema digestivo. A, epitelio columnar con numerosas inclusiones presente en la pared del estómago bajo el escudo gástrico. B, epitelio columnar densamente ciliado del intestino descendente de la zona del saco del estilete. C, epitelio columnar ciliado del intestino ascendente. D, corte transversal del recto donde se aprecia el epitelio columnar ciliado con acusados repliegues. Abreviaturas: gs, escudo gástrico; lu, lumen.

Llegado a este punto el intestino (recto) gira hacia la parte posterior, y desciende ligeramente pasando por encima de los riñones y atravesando el pericardio y el corazón a nivel del ventrículo. Llegado al músculo aductor posterior, lo rodea dorsalmente para desembocar bajo él por el ano en la cavidad paleal por encima de la abertura exhalante del borde del manto.

Todo el recorrido intestinal presenta el mismo tipo de epitelio, columnar simple ciliado (Figura 4.19 B, C, D), por lo que la diferenciación de las tres zonas responde en este caso a su posición en la masa visceral. A lo largo del intestino se aprecia un tipo de célula que secreta a su luz una sustancia granular que se tiñe intensamente de morado con hematoxilina – VOF. No se aprecian fibras musculares especialmente desarrolladas asociadas a la membrana basal del epitelio. La región del recto presenta un epitelio con acusados repliegues y cilios más largos que el resto del intestino (Figura 4.19 D), lo que serviría para crear una fuerte corriente en dirección al ano, con el objetivo de expulsar las heces.

Sistema excretor

El sistema excretor en bivalvos está formado por la glándula pericárdica y por los riñones, no obstante las branquias pueden ejercer cierta función excretora, sobre todo si la glándula pericárdica no está presente, como ocurre en algunas especies de bivalvos.

En el caso de *D. digitaria* el riñón se sitúa debajo de la región pericárdica, delante del músculo aductor posterior (Figura 4.20 A) e íntimamente asociado a las branquias, fusionándose con la lamela externa de la branquia interna y la lamela interna de la branquia externa (Figura 4.6, 4.20 C). No se diferencia una glándula pericárdica adosada a esa región o a las aurículas, que pueda diferenciarse del tejido nefridial. El riñón presenta dos lóbulos, izquierdo y derecho, que se unen en su parte posterior bajo el espacio pericárdico por el pasaje inter-nefridial, presentando una forma en corte transversal de silla de montar (Figura 4.20 B). La zona dorsal del riñón aparece adosada a las paredes ventrales de las aurículas, apreciándose cierta infiltración en la zona medio ventral del pericardio (Figura 4.20 B), siendo esta infiltración el único tejido observado que podría identificarse con una posible glándula pericárdica.

El tejido nefridial posee un aspecto esponjoso, formado por numerosos conductos y túbulos renales muy enrollados cuyas células epiteliales presentan grandes vacuolas (Figura 4.20 C).

Ambos lóbulos conectan con el espacio pericárdico mediante el conducto reno – pericárdico y un conducto renal los comunica con el exterior, en la zona inter-branquial denominada vestíbulo reno – gonadal (Figura 4.20 B).

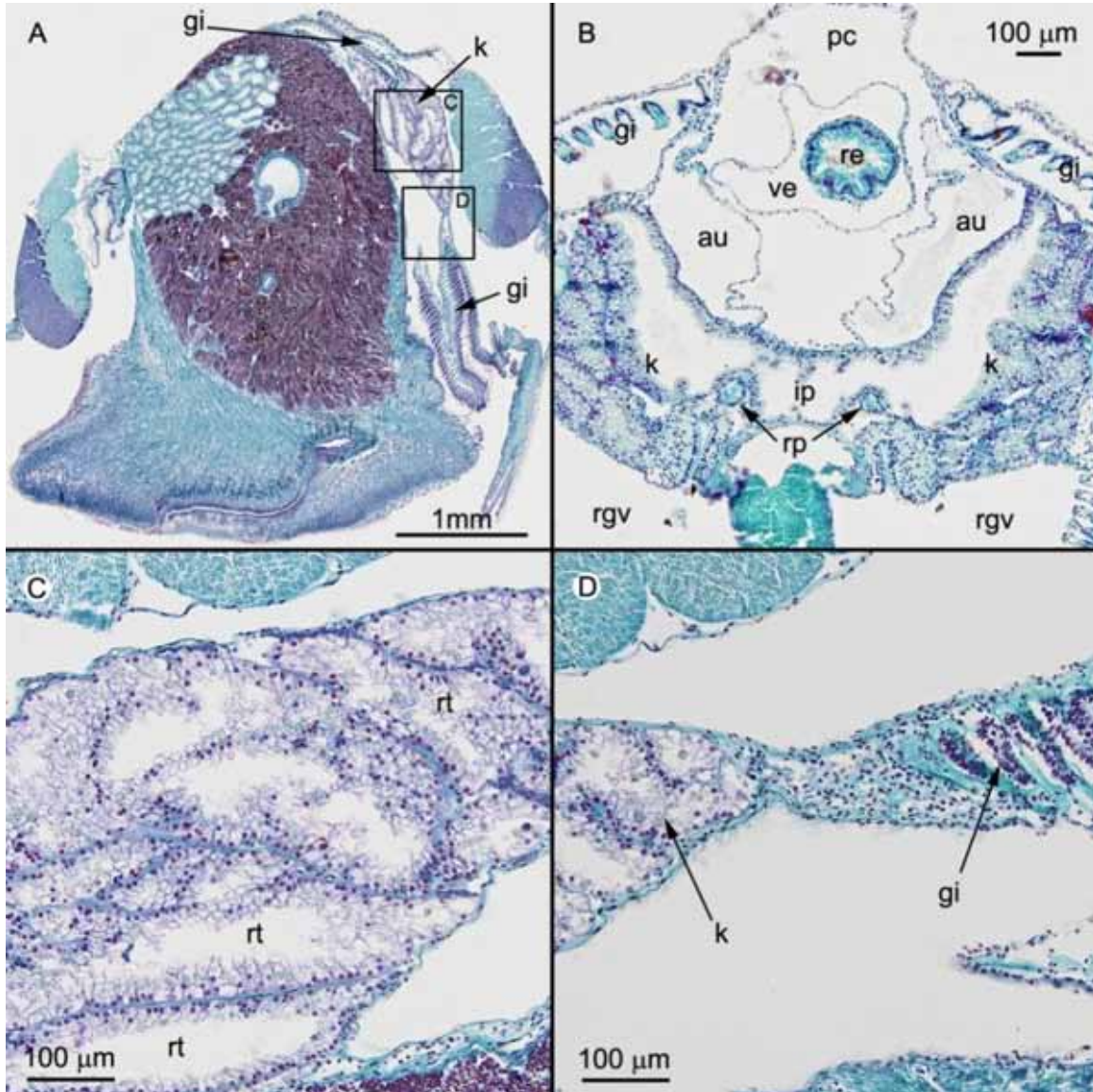


Figura 4.20. Sistema excretor de *D. digitaria*. A, corte sagital donde se observa la posición del riñón en el animal, delante del músculo aductor posterior, bajo la región pericárdica y asociado a la branquia. B, corte transversal del área reno – pericárdica, donde se distinguen los dos lóbulos del riñón unidos bajo el pericardio por el pasaje internefridial. C, (recuadro de A) detalle de la estructura del riñón. D, (recuadro de A) detalle de la asociación íntima entre el tejido renal y la branquia. Abreviaturas: au, aurícula; gi, branquia; ip, pasaje internefridial; k, riñón; pc, pericardio; re, recto; rgv, vestíbulo reno – gonadal; rp, conducto reno – pericárdico; rt, túbulo renal; ve, ventrículo.

Sistema reproductor

El sistema reproductor observado en *D. digitaria* posee una anatomía similar al de la generalidad de bivalvos, en cuanto a que es un sistema extremadamente sencillo, donde existen en principio dos gónadas pareadas pero que están tan íntimamente unidas que no es posible diferenciarlas.

Las gónadas de *D. digitaria* se observan como un único órgano, a modo de saco que se sitúa en la porción media dorsal, ocupando gran parte de la masa visceral (Figura 4.9). A medida que la gónada aumenta de volumen durante el proceso de maduración de sus gametos va ocupando más espacio visceral, hasta infiltrarse entre la glándula digestiva e invadir la zona dorsal del pie. En el sentido antero – posterior llega a ocupar desde la parte anterior de la glándula digestiva hasta el músculo aductor posterior. Externamente las gónadas masculina y femenina sólo son diferenciables cuando han alcanzado cierto grado de madurez, pudiéndose distinguir en las hembras, al retirar el manto, una gónada de color amarillo y unos grandes óvulos dentro del tejido gonadal translúcido. En los machos maduros la gónada es de un color crema claro y de aspecto compacto.

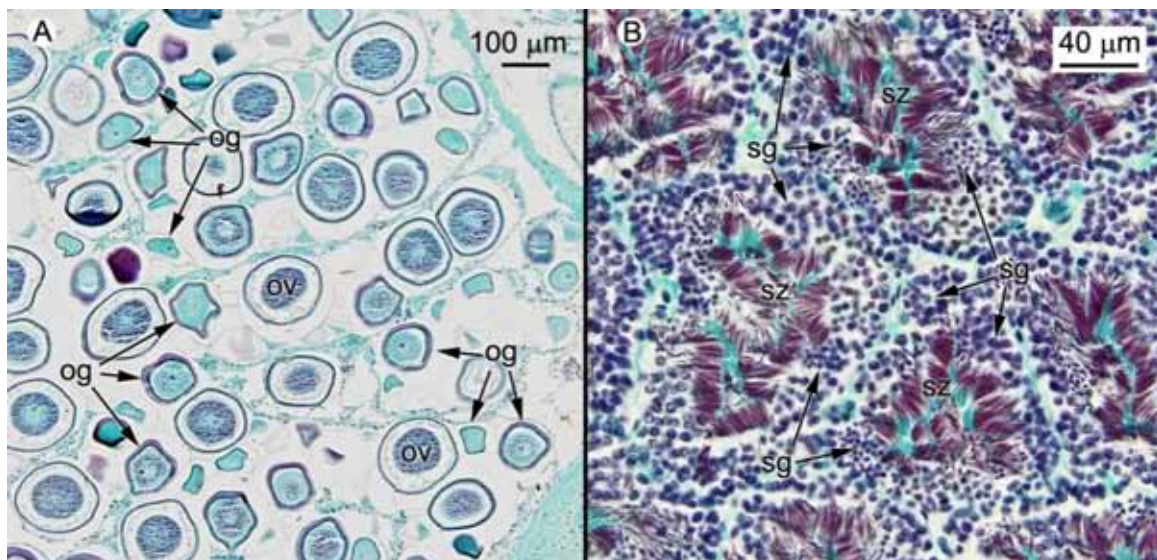


Figura 4.21. Gametos en diferentes estados de desarrollo en los folículos de *D. digitaria*. A, folículos de una gónada femenina donde se observan óvulos maduros y oogonias compartiendo espacio. B, folículos de una gónada masculina donde se aprecian los espermatozoides en el centro rodeados de espermatogonias en diferentes estados de maduración. Abreviaturas: og, oogonia; ov, óvulo maduro; sg, espermatogonia; sz, espermatozoide.

La gónada posee una estructura interna que recuerda a la de una granada, formada por multitud de folículos dentro de los cuales se desarrollan los gametos. Los folículos se separan del resto por unas paredes que varían en grosor en función del estado de desarrollo de la gónada, haciéndose cada vez más estrechas conforme ésta madura, hasta el momento en el que se rompen y se produce la liberación de los gametos.

En ambos sexos se observan adosadas a las paredes foliculares células gametogénicas en diferentes estados de desarrollo o maduración (Figura 4.21). Así se distinguen en hembras y machos respectivamente ovogonias y espermatogonias, ovocitos y espermatozoides, y óvulos y espermatozoides en un mismo folículo. Se disponen a modo de capas concéntricas, con las células gaméticas menos desarrolladas pegadas a las paredes foliculares, y las ya maduras en el centro, preparadas para su liberación en el momento de la puesta.

No se ha observado una red de conductos principales y secundarios que lleven a los gametos a la hora de la emisión hasta el gonoporo, como ocurre de manera frecuente en otras especies de bivalvos, sino que la rotura de las paredes foliculares permite la formación de canales a través de los folículos por los que los gametos discurren hasta que un único conducto en cada gónada los recoge y dirige hacia el exterior.

La gónada posee dos gonoporos situados en la parte posterior del animal que se abren al espacio interlamelar de la hemibranchia interna, justo bajo el riñón (vestíbulo reno – gonadal). En las hembras el conducto que lleva los óvulos al exterior es relativamente corto y parte de la zona dorsal de la gónada femenina, sin embargo este conducto en los machos es mucho más largo, de manera que se interna en la gónada en su porción dorsal con un ángulo ascendente, para luego bajar hasta la porción ventral donde recoge los espermatozoides. En torno al conducto gonadal de los machos se ha observado una desarrollada capa muscular subepitelial, que podría estar relacionada con el transporte de los gametos a través de este largo conducto. La porción inicial del conducto posee un epitelio con abundantes repliegues longitudinales densamente ciliados, así como células secretoras que producen un tipo de mucosustancia que facilita el paso de los gametos a través del conducto y que aglutina a los espermatozoides. En el caso de los machos, los gametos son liberados directamente a la cavidad paleal, en la zona de la abertura exhalante. Sin embargo en las hembras, la parte posterior de las hemibranchias forman un canal a modo de conducto genital por el que los

óvulos maduros discurren hasta la cavidad paleal en un corto trayecto durante el cual pueden ser fecundados, como se explica en el capítulo cuatro del presente trabajo, dedicado a la reproducción y crecimiento de *D. digitaria*.

GAMETOS FEMENINOS

Las paredes foliculares de la gónada femenina de *D. digitaria* disminuyen de espesor a medida que avanza la maduración de los gametos. Los óvulos, que llegan a ser de gran tamaño con valores de hasta 690 μm de perímetro (ca. 220 μm de diámetro), se encuentran unidos a la pared folicular por un estrecho tallo, que llamaremos “*nutricio*”, que surge de la propia pared y atraviesa las capas externas del óvulo para conectarse con su citoplasma. Es habitual observar como a través del tallo *nutricio* pasa material en forma de pequeñas esferas desde la pared folicular hasta el citoplasma, donde a medida que madura el óvulo, se acumulan en forma de vitelo rodeando al núcleo celular (Figura 4.22). Las esferas que componen el vitelo, que se tiñen de diferentes tonalidades púrpura y rojo con hematoxilina – VOF, se forman aparentemente en la porción de pared folicular a la que se encuentra unido el óvulo.

El óvulo de *D. digitaria* presenta una gruesa membrana vitelínica, que está formada por tres capas, una capa intermedia gruesa de unos 8 μm , que se tiñe fuertemente de púrpura con hematoxilina – VOF, flanqueada por una capa externa de color azul – morado, a modo de recubrimiento mucoso de aproximadamente 1 μm , y finalmente una capa interna de 2 μm aproximadamente que adquiere un tomo azul brillante (Figura 4.22).

Así, el conjunto de la membrana vitelina supera los 10 μm de espesor, aunque en ciertos ejemplares donde la gónada está especialmente bien conservada se ha observado lo que podría ser una envuelta extra, a modo de fina película que deja un amplio espacio con la membrana vitelínica, de entre 30 y 50 μm (Figura 4.22 C). No obstante, y aunque una cubierta semejante ha sido descrita para otras especies de astártidos, es difícil de identificar en el material fijado y no tenemos evidencias contundentes de su existencia en *D. digitaria*.

GAMETOS MASCULINOS

Los espermatozoides de *D. digitaria* son alargados y de gran tamaño, con una longitud desde la punta del acrosoma hasta la base de la pieza media que se aproxima a las 20 μm (Figura 4. 23). El acrosoma es muy patente, observándose una vesícula alargada, de 1,3 μm de longitud

aproximadamente, que se estrecha desde su base hacia el ápice, en forma cónica con la punta redondeada e invaginada en toda su longitud.

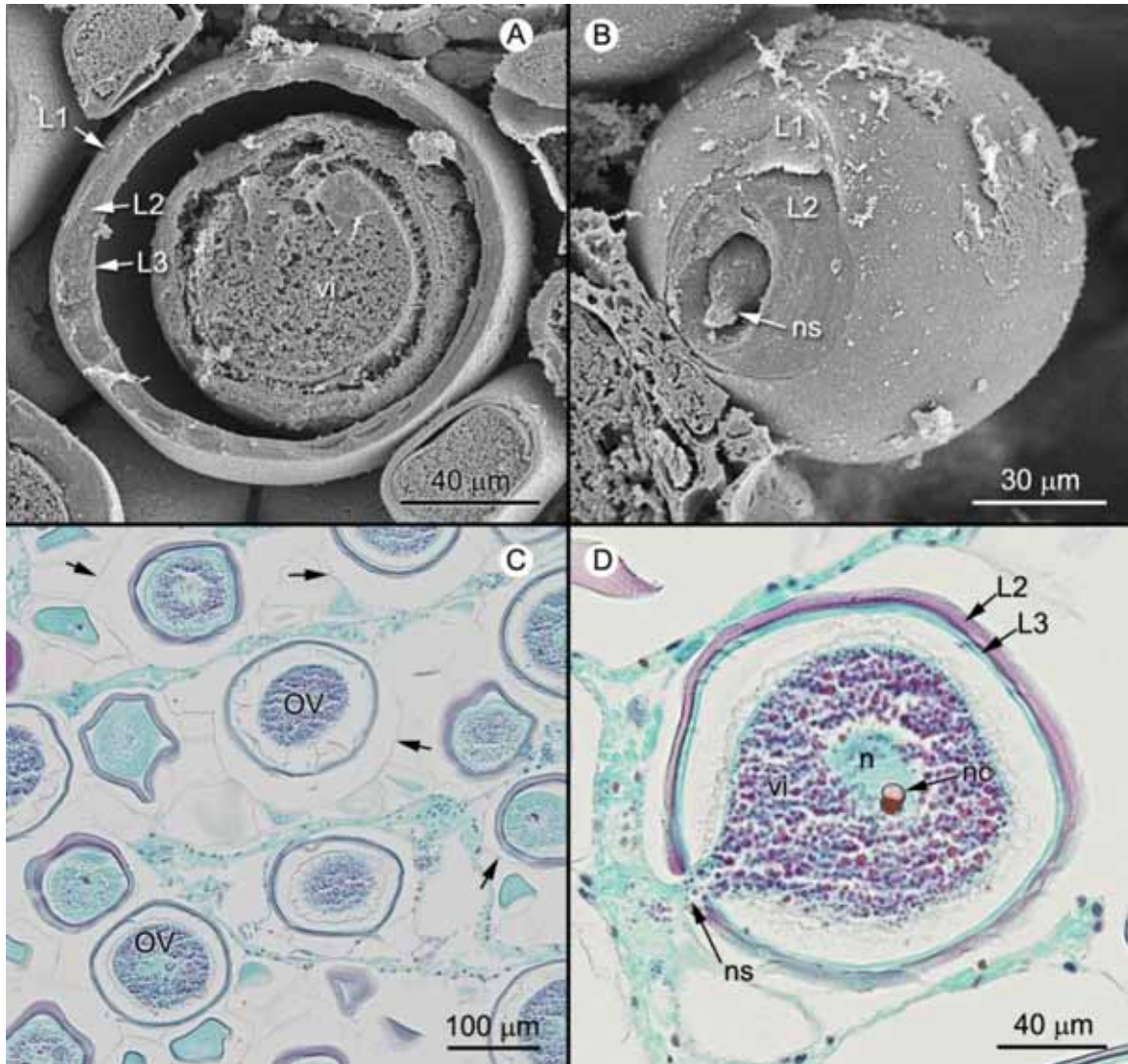


Figura 4.22. Óvulo de *D. digitaria*. A, imagen de SEM de un óvulo seccionado donde se pueden apreciar las tres capas que componen la membrana vitelínica. B, imagen de SEM del exterior de un óvulo donde se aprecia el filamento nutricional y las dos capas más externas de la membrana vitelínica. C, imagen de óvulos en los folículos donde puede verse una membrana adicional que los envuelve (flechas), formando una teórica cuarta capa. D, detalle de la sección de un óvulo llenándose de vitelo desde la pared folicular a través del filamento nutricional. Abreviaturas: L1, capa de recubrimiento mucoso de la membrana vitelínica; L2, capa intermedia de la membrana vitelínica; L3, capa interna de la membrana vitelínica; n, núcleo; nc, nucléolo; ns, tallo nutricional; OV, óvulo; vi, vitelo.

En su base, la vesícula acrosómica presenta un diámetro aproximado de 0,3 μm , y poco más de 0,1 μm en su ápice. El contenido de la vesícula se observa a TEM como un material denso y homogéneo rodeado de una membrana.

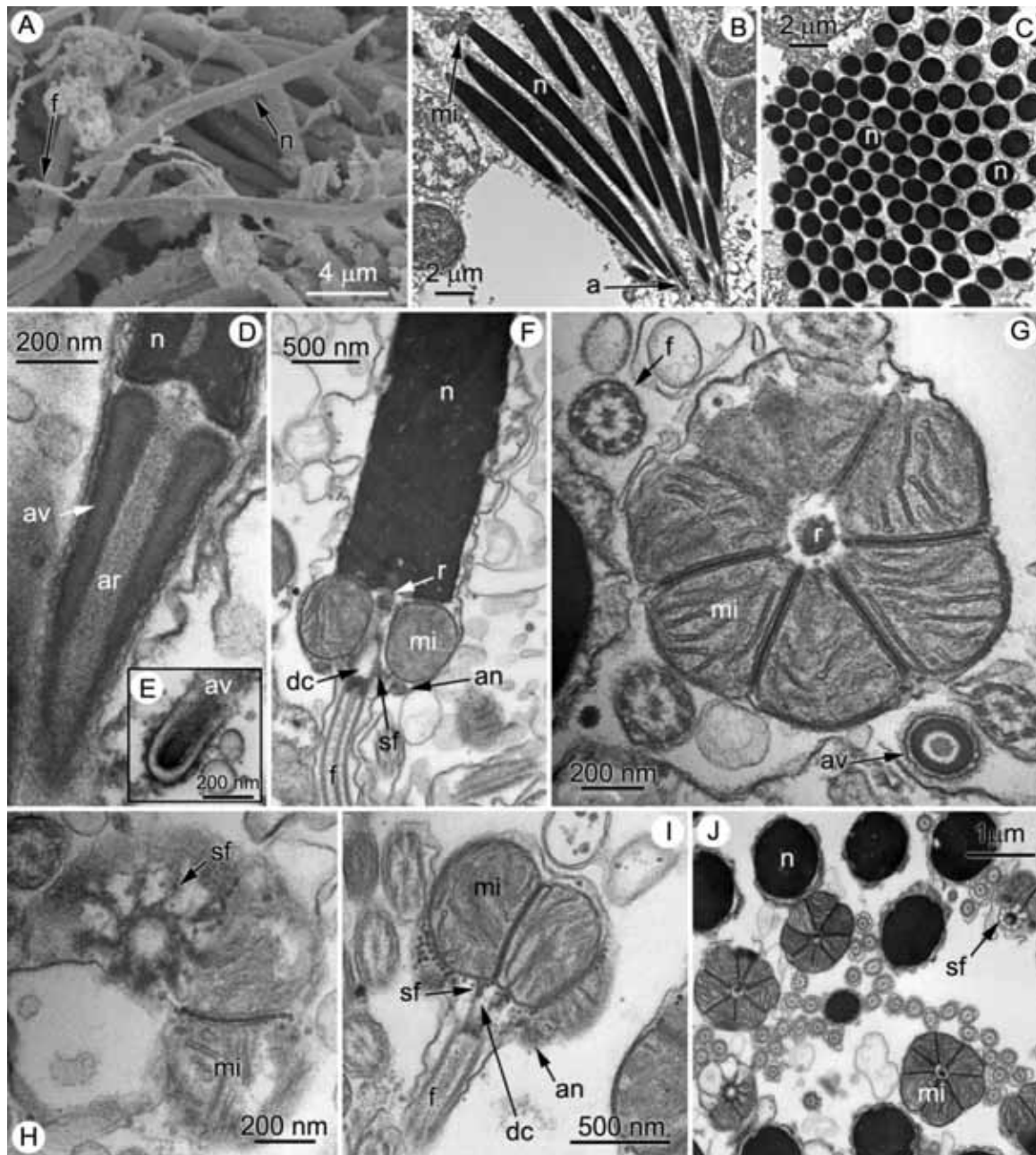


Figura 4.23. Espermatozoide de *D. digitaria*. A, Imagen de SEM de los espermatozoides. B, imagen de TEM de un espermatozoide en corte sagital. C, núcleo de los espermatozoides en corte transversal. D, Detalle del complejo acrosómico y del ápice del núcleo. E, detalle del ápice de la vesícula acrosómica. F, detalle de la pieza media, flagelo y base del núcleo. G, corte transversal del complejo mitocondrial de la pieza media mostrando las siete mitocondrias y la raíz en el centro. También se observa un corte transversal de la vesícula acrosómica con el eje axial y de un flagelo con estructura 9+2. H, fibras satelitales en la base del centriolo distal. J, fibras satelitales uniendo el centriolo distal al annulus. J, corte transversal de las piezas medias a nivel del complejo mitocondrial donde se observa que habitualmente están formados por siete mitocondrias. Abreviaturas: an, annulus; ar, eje axial; av, vesícula acrosómica; dc, centriolo distal; f, flagelo; mi, mitocondria; n, núcleo; r, raíz; sf, fibras satelitales.

La invaginación de la vesícula se encuentra rellena de material subacrosómico, en el que se aprecia un eje axial de 1 μm de longitud, que se inserta en una invaginación poco profunda del ápice del núcleo del espermatozoide. Este eje posee un diámetro máximo de 0,1 μm al nivel de la abertura de la invaginación de la vesícula acrosómica (Figura 4.23 D).

El núcleo, de forma cónica truncada, es alargado y alcanza unos 17 μm de altura. En la base presenta un diámetro de 1,2 μm , que va estrechándose hacia su extremo apical donde mide 0,3 μm . Observado bajo TEM el contenido del núcleo es muy denso y homogéneo, excepto por la presencia de pequeñas lagunas que no reflejan los electrones (Figura 4.23 B, C, F).

En la base del núcleo aparece la pieza media de 1,5 μm de diámetro y 0,6 μm de alto, formada por un complejo de 7 mitocondrias en torno a un eje o raíz longitudinal, denso, que se continúa con el centriolo distal, que a su vez actúa de cuerpo basal para el axonema flagelar (Figura 4.23 F). El centriolo distal se encuentra conectado mediante una formación de nueve fibras satelitales con el *annulus*, que a su vez está unido directamente a la membrana de la zona posterior del complejo mitocondrial (Figura 4.23 H, I). El flagelo, en corte transversal muestra la estructura propia de los flagelos eucariotas, con nueve pares de microtúbulos periféricos y un par central (9+2), y rodeándolos se aprecia la membrana ciliar (Figura 4.23 G).

Sistema circulatorio

Se observa un sistema circulatorio abierto y simple, conforme al patrón general de los bivalvos. La cavidad pericárdica se sitúa en la región postero-dorsal, antes del músculo aductor posterior y sobre el riñón. Con forma de uso, posee un epitelio simple, delgado y translúcido. La cavidad pericárdica contiene el corazón y es atravesada en su eje antero – posterior por el recto. El corazón consta de un ventrículo alargado de sección circular atravesado por el recto, y posee un fino epitelio de tipo simple. A ambos lados del ventrículo encontramos dos aurículas que limitan con el tejido renal (Figura 4.20 B). Del corazón salen dos cortos vasos sanguíneos, uno anterior y otro posterior, siendo la red de vasos sanguíneos muy difusa, componiéndose en realidad por una serie de senos hemocélicos que inundan los diferentes tejidos del animal, que se hacen muy patentes en órganos como el pie y los lóbulos del manto. Este sistema de senos hemocélicos, a modo de esqueleto hidráulico, le confieren a

esos órganos del bivalvo la capacidad de deformación de los tejidos, que le permiten realizar una amplia gama de movimientos.

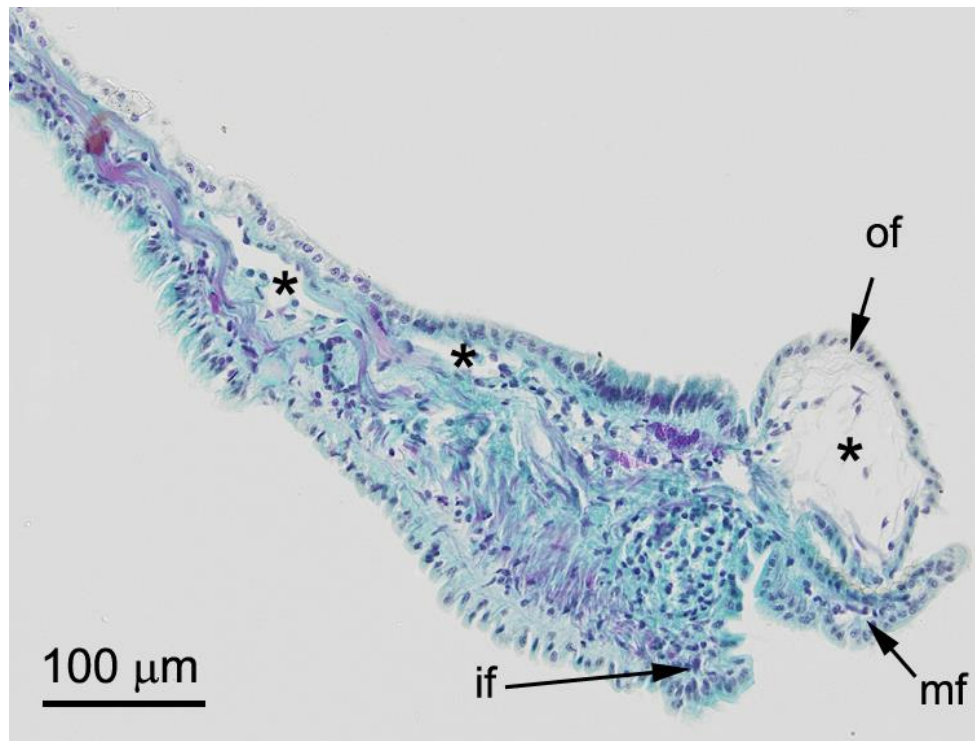


Figura 4.24. Sección transversal del borde del manto donde se puede observar la enorme capacidad de deformación del lóbulo externo como consecuencia de la inyección de hemolinfa en los senos hemocélicos. Los asteriscos (*) marcan algunos de los senos que pueden apreciarse en la sección. Abreviaturas: if, lóbulo interno; mf, lóbulo medio; of, lóbulo externo.

Sistema nervioso

El sistema nervioso de *D. digitaria* es de tipo hiponeuro, formado por pares de ganglios y cordones nerviosos que los interconectan, sin rasgos de metamería que sería una característica de los moluscos más primitivos. Se pueden observar los tres desarrollos ganglionares habituales en moluscos, el ganglio cerebro-pleural, el visceral y el pedal (Figura 4.25). El ganglio cerebro-pleural está formado por dos nódulos situados sobre ambos lóbulos de los palpos labiales, y que se conectan por encima del esófago mediante la comisura dorsal. De este ganglio parte un cordón que inerva el músculo aductor anterior (Figura 4. 25 A – B). Los dos ganglios viscerales se encuentran fusionados y se sitúan debajo del riñón, justo por delante del músculo aductor posterior. Presentan una forma de silla de montar en corte transversal, prolongándose y entrando en contacto con las hemibranquias (Figura 4.25 D).

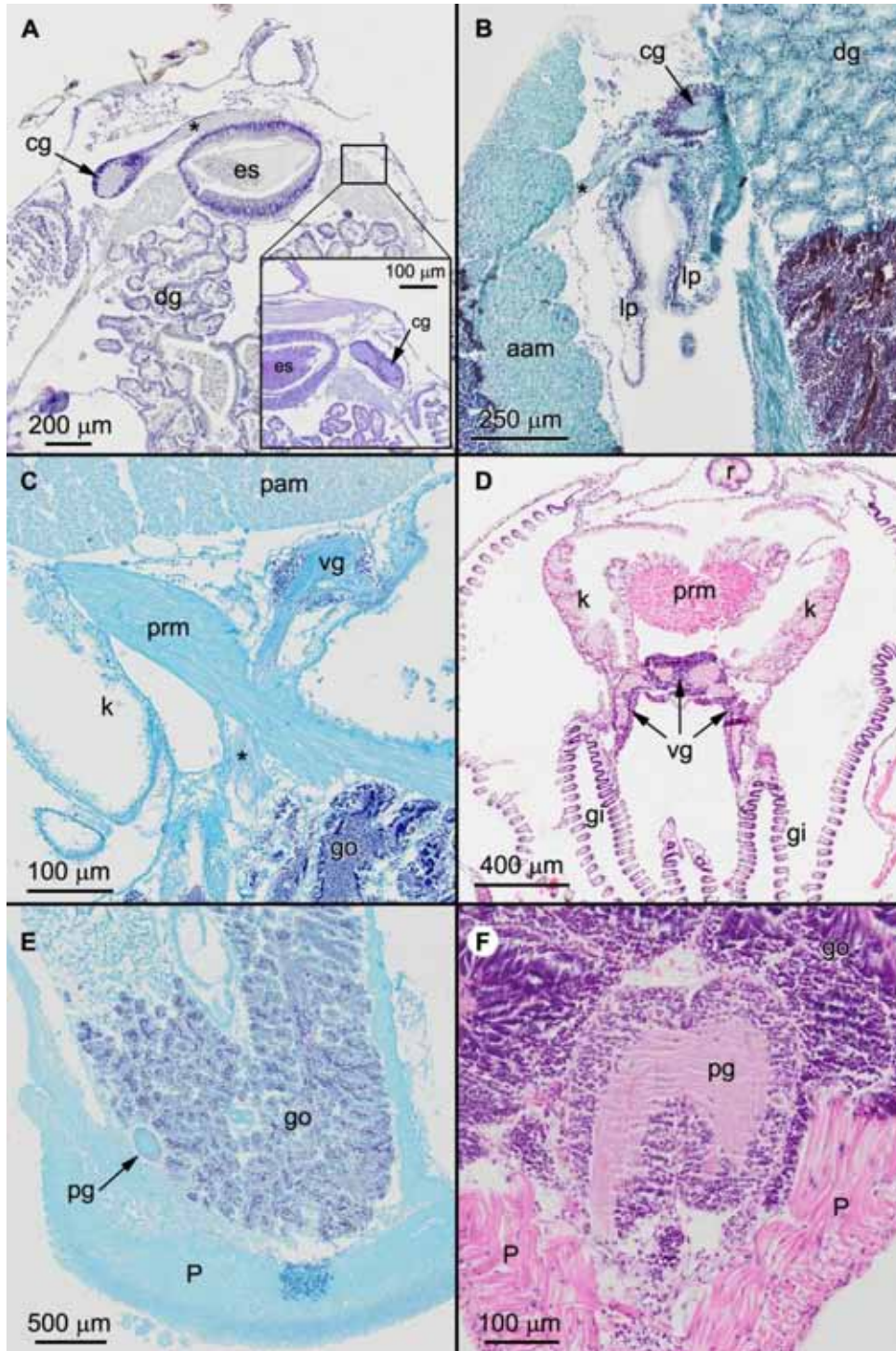


Figura 4.25. Ganglios del sistema nervioso de *D. digitaria*. A, corte frontal del ganglio cerebro pleural. El recuadro indica la situación del segundo nódulo y el asterisco (*) la comisura dorsal. B, corte sagital del ganglio cerebro pleural. El asterisco (*) marca la inervación del músculo aductor anterior. C – D, sección sagital y transversal respectivamente del ganglio visceral. El asterisco (*) en C marca la salida del nervio que conecta con el ganglio cerebro pleural. E – F, sección sagital y transversal respectivamente del ganglio pedal. Abreviaturas: aam, músculo aductor anterior; cg, ganglio cerebro pleural; dg, glándula digestiva; es, esófago; gi, branquias; go, gónada; k, riñón; lp, palpo labial; P, pie; pam; músculo aductor posterior; pg, ganglio pedal; prm, músculo retractor posterior; r, recto; vg, ganglio visceral.

Del ganglio visceral parte un cordón nervioso que conecta con el ganglio cerebro-pleural (Figura 4.25 C). El ganglio pedal formado por dos nódulos fusionados, se sitúa en la región postero-dorsal del pie, entre el tejido muscular del mismo y el tejido gonadal (Figura 4.25 E – F).

Parásitos

Los epibiontes se concentran en la superficie exterior de la concha (Figura 4.26), mientras que los parásitos lo hacen en determinados órganos y tejidos de las partes blandas del animal, como son la glándula digestiva, las branquias, la gónada, los músculos e incluso el riñón. En el área postero-dorsal de la concha, asociados a la zona de las aberturas inhalante y exhalante de *D. digitaria* se observaron colonias del hidrozoo *Monobrachium parasitum*. Este hidrozoo es un epibionte habitual en los ejemplares del bivalvo, presentando una frecuencia del 96,4 % (Figura 4.26 A). También en la concha, mediante microscopía óptica se observó en cortes histológicos de ejemplares descalcificados la presencia de diversos epibiontes alojados entre los valles intercostales, cubiertos por una película de carácter mucoso (Figura 4.26 F). Observaciones con TEM y SEM revelaron la existencia ocasional de colonias de hidrozoos de una especie no identificada en la zona intercostal en el borde de la concha, así como algún ejemplar de protozoo ciliado del Orden Peritricha (Figura 4.26 B –D).

Otro de los parásitos que se observaron con más frecuencia en *D. digitaria* fue un protozoo del género *Marteilia* sp., que estuvo presente en diferentes estados de desarrollo (células iniciales y preesporangios) parasitando masivamente la glándula digestiva, aunque también se detectó en las células epiteliales del estómago, del intestino y del riñón (Figura 4.26). En la glándula digestiva se encontró una frecuencia de parasitación del 100 %, apareciendo esporas con cuerpos refringentes de entre 3 – 10 μm de diámetro y agregados de esporas en el interior de las células epiteliales de los divertículos digestivos.

En la gónada de *D. digitaria* se observaron esporocistos y larvas (cercarias y redias) de un trematodo digeneo perteneciente a la familia Bucephalidae (Figura 4.28). Las larvas cercarias aparecieron en todas las estaciones del año, parasitando tanto las gónadas de las hembras como las de los machos. La parasitación de este trematodo ocasiona daños en el tejido gametogénico del bivalvo, provocando la degeneración de óvulos y espermatozoides, y en

casos donde la parasitación es extrema se ha observado que provoca la castración total de la gónada (Figura 4.28 A). De los 732 ejemplares estudiados, 26 tenían la gónada infectada en mayor o menor grado, lo que supone un 3,6 % de morbilidad en la población.

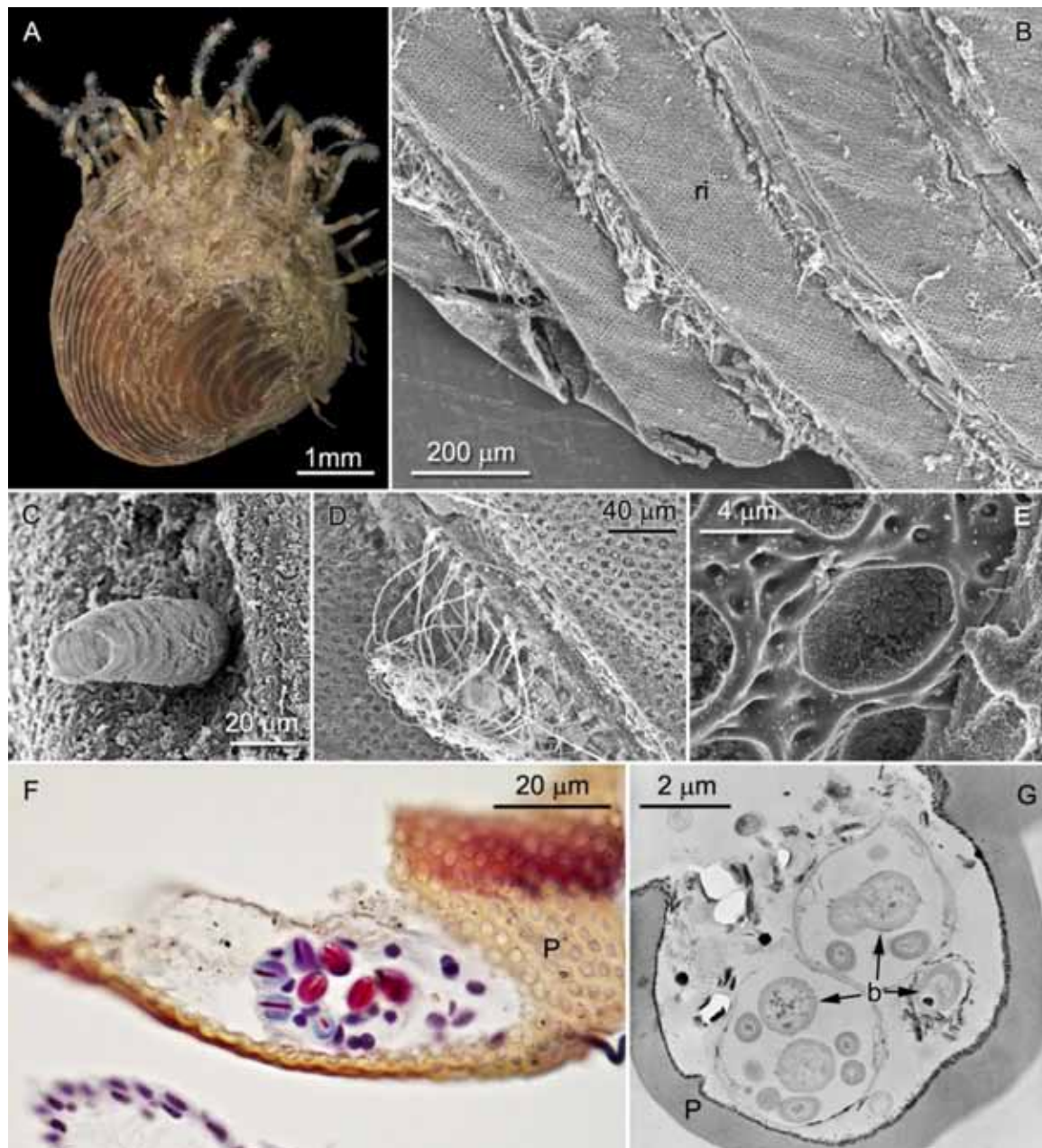


Figura 4.26. Parásitos de la concha en *D. digitaria*. A, colonia del hidrozoo *Monobrachium parasitium* sobre la parte posterior de la concha. B, imagen de SEM de las zonas intercostales colmatadas de material mucoso y llenas de epibiontes. C, Protozoo ciliado del Orden Peritricha en al borde de la valva. D, colonia de hidrozoos creciendo en el espacio intercostal de la concha. E, Imagen de SEM de bacterias llenando un alveolo del periostraco. F, corte transversal de la zona intercostal donde se observan diversos epibiontes inmersos en un material aparentemente mucoso. G, imagen de TEM del corte transversal de un alveolo lleno de bacterias encapsuladas. Abreviaturas: b, bacteria; P, periostraco; ri, costilla.

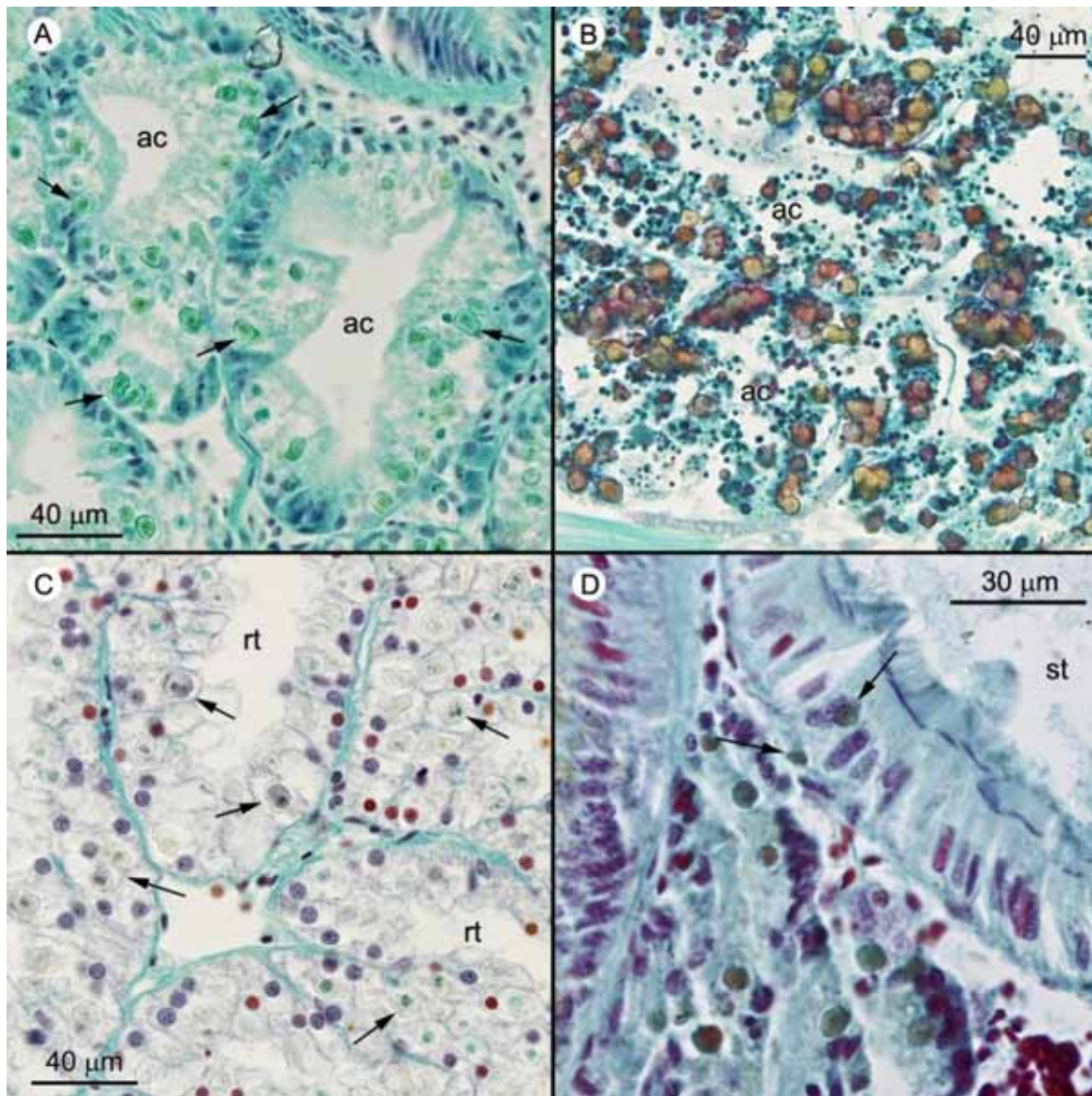


Figura 4.27. Esporas del protozoo *Marteilia sp.* infectando diferentes órganos de *D. digitaria*. A y B, esporas en las células epiteliales de la glándula digestiva, donde pueden provocar grandes alteraciones en las células, llegando a colapsar y destruir los ácinos. C, esporas infectando las células de los túbulos renales. D, esporas infiltrándose en la pared del estómago. Las flechas señalan a las esporas de *Marteilia sp.* Abreviaturas: ac, ácino; rt, túbulo renal; st, estómago.

También se observaron quistes de metacercaria en la musculatura del pie así como del músculo retractor anterior detrás de los ganglios cerebro-pleurales (Figura 4.28 C, D).

El órgano diana que más diversidad de parásitos presentó fue la branquia (figura 4.29), donde se pudieron encontrar protistas ciliados (Phylum Ciliophora), colonias intracelulares de protistas semejantes a las del género *Rickettsia*, que en *D. digitaria* parecen crear desorganización del tejido branquial, y platelmintos de la Clase Rhabditophora, entre ellos

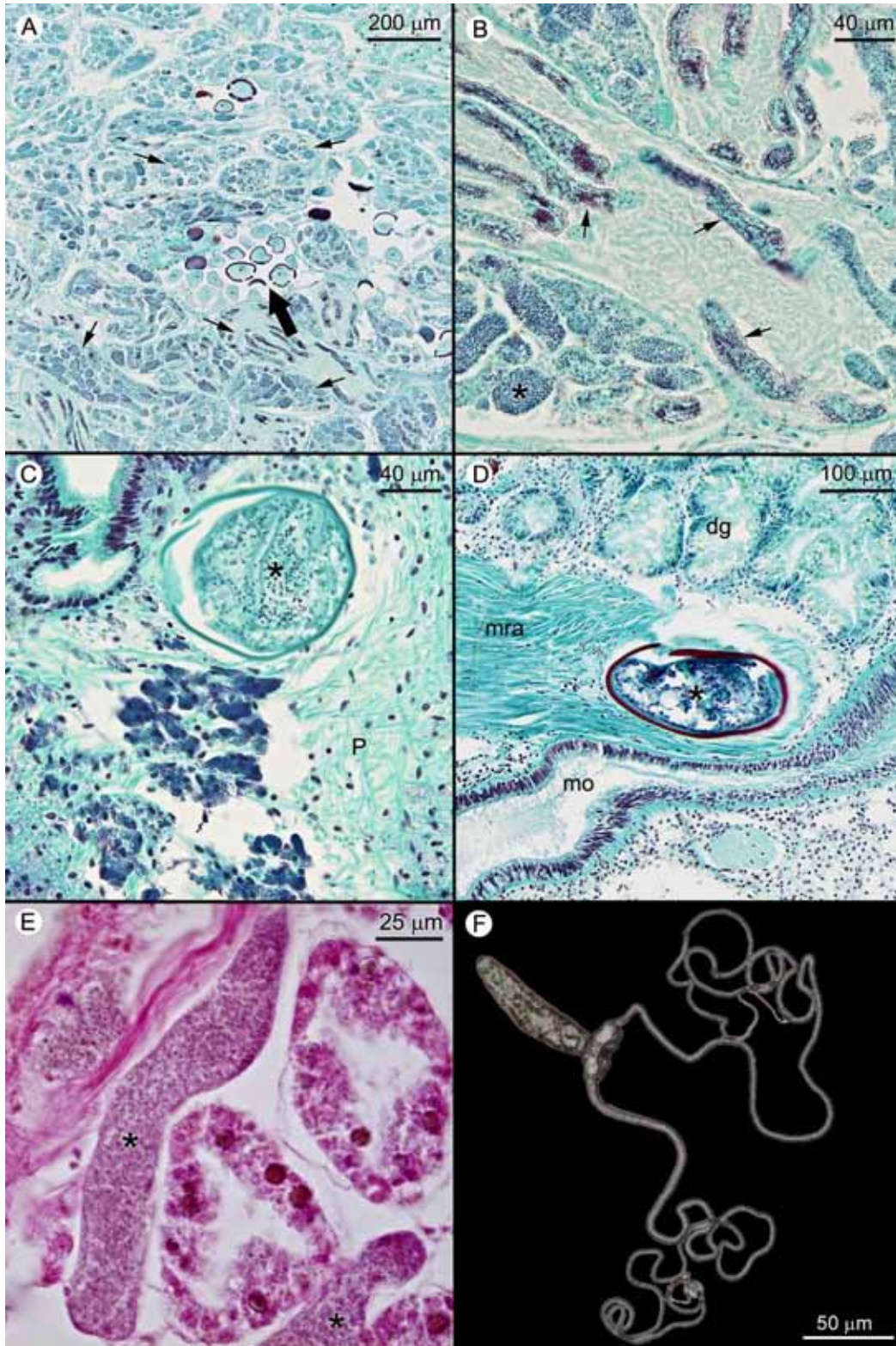


Figura 4.28. Trematodo de la familia Bucephalidae infectando diversos tejidos de *D. digitaria*. A, presencia masiva de esporocistos (flechas pequeñas) en la gónada, causando su práctica castración. La flecha grande señala algunos óvulos. B, detalle de cercarías en la gónada (flechas) y de algunas radias (*). C y D, quiste de metacercaria en el músculo del pie y el retractor anterior, respectivamente. E, larva redia (*) en la glándula digestiva. F, aspecto de una larva cercaria. Abreviaturas: dg, glándula digestiva; mo, boca; mra, músculo retractor anterior; P, pie.

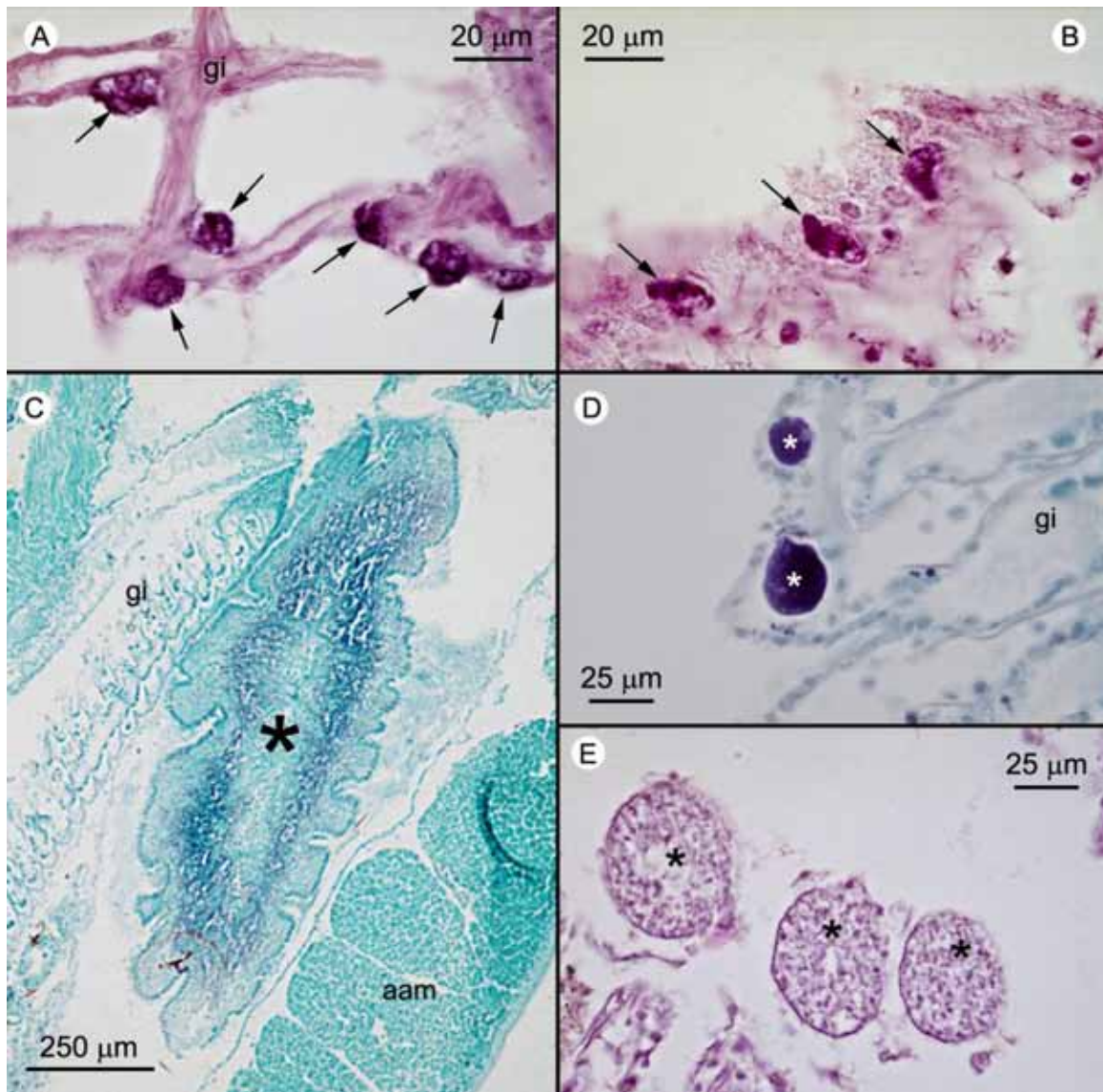


Figura 4.29. Parásitos presentes en las branquias de *D. digitaria*. A, Posibles Rickettsias en branquias. B, protista del Phylum Ciliophora. C, ejemplar adulto de platelminto (*) en la cavidad paleal, alojado entre las branquias y el músculo aductor anterior. D – E, sección transversal de platelmintos (*) entre las branquias del molusco. Abreviaturas: aam, músculo aductor anterior; gi, branquias.

probablemente *Urastoma cyprinae*, que es un parásito habitual de las branquias de multitud de especies de moluscos bivalvos.

Un platelminto adulto sin identificar fue encontrado alojado en la cavidad paleal, entre las branquias y el músculo aductor anterior (Figura 4.29 C).

Simbiontes

Durante el estudio de formación del periostraco, y en particular de los alveolos característicos del mismo, mediante observaciones en TEM y SEM se detectó la presencia de bacterias en los alveolos (Figura 4.26 E, G; 4.30 E), las cuales parecían ser transmitidas desde el lóbulo medio a lo largo del surco periostracal. Bajo lupa llama la atención el color verde refringente que adquiere el lóbulo medio del manto (Figura 4.30 A).

Con el fin de identificar dichas bacterias se realizó un cultivo microbiológico del periostraco del bivalvo en los medios MN y ASN III como se describe en el apartado de Material y Método del presente capítulo. Se aislaron en cultivo puro al menos siete tipos diferentes de colonias bacterianas, de las cuales solamente la denominada T1Bg/9, presentó el mismo tipo de refringencia observada en el borde del manto de *D. digitaria* (Figura 4.30 B – D). Estos cultivos bacterianos se prepararon en tubos inclinados y se enviaron Depto. de Microbiología de la Universidad de Granada con el objetivo de secuenciarlos para intentar identificar de qué especie de bacteria se trataba. Desafortunadamente, una avería del frigorífico que conservaba las muestras pendientes de secuenciar, provocó que todas las muestras disponibles quedaran inservibles.

De forma paralela, en cortes histológicos y de TEM se ha podido identificar la presencia de bacterias en los senos hemocélicos del borde del manto, por lo que es lógico pensar en un posible mecanismo de “siembra” de bacterias por el lóbulo medio en los alveolos del periostraco.

Los análisis preliminares de la proporción d13C/ d18O llevados a cabo en el Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada, en conchas de *D. digitaria* realizados con el fin de comprobar la existencia de una influencia bacteriana en el proceso de calcificación durante la formación de la concha fueron negativos (Tabla 4.3).

Tabla 4.3. Proporción de los isótopos d13C y d18O en las once muestras de *D. digitaria* analizadas para comprobar la influencia bacteriana en la formación de la concha.

Proporción isotópica	Muestra										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
d13C corr	1,241	0,994	0,61	1,703	1,126	1,153	0,795	1,14	-0,282	0,658	1,095
d18O corr	2,037	2,385	2,467	2,497	1,967	2,348	2,209	2,269	2,536	2,18	2,383



Mediante microscopía óptica en cortes semifinos y mediante TEM también se ha detectado la presencia de bacteriocitos en el epitelio folicular de la gónada femenina y en bacteriocitos adyacentes a folículos testiculares (Figura 4.31), pero no dentro de los folículos ni en los espermatozoides.

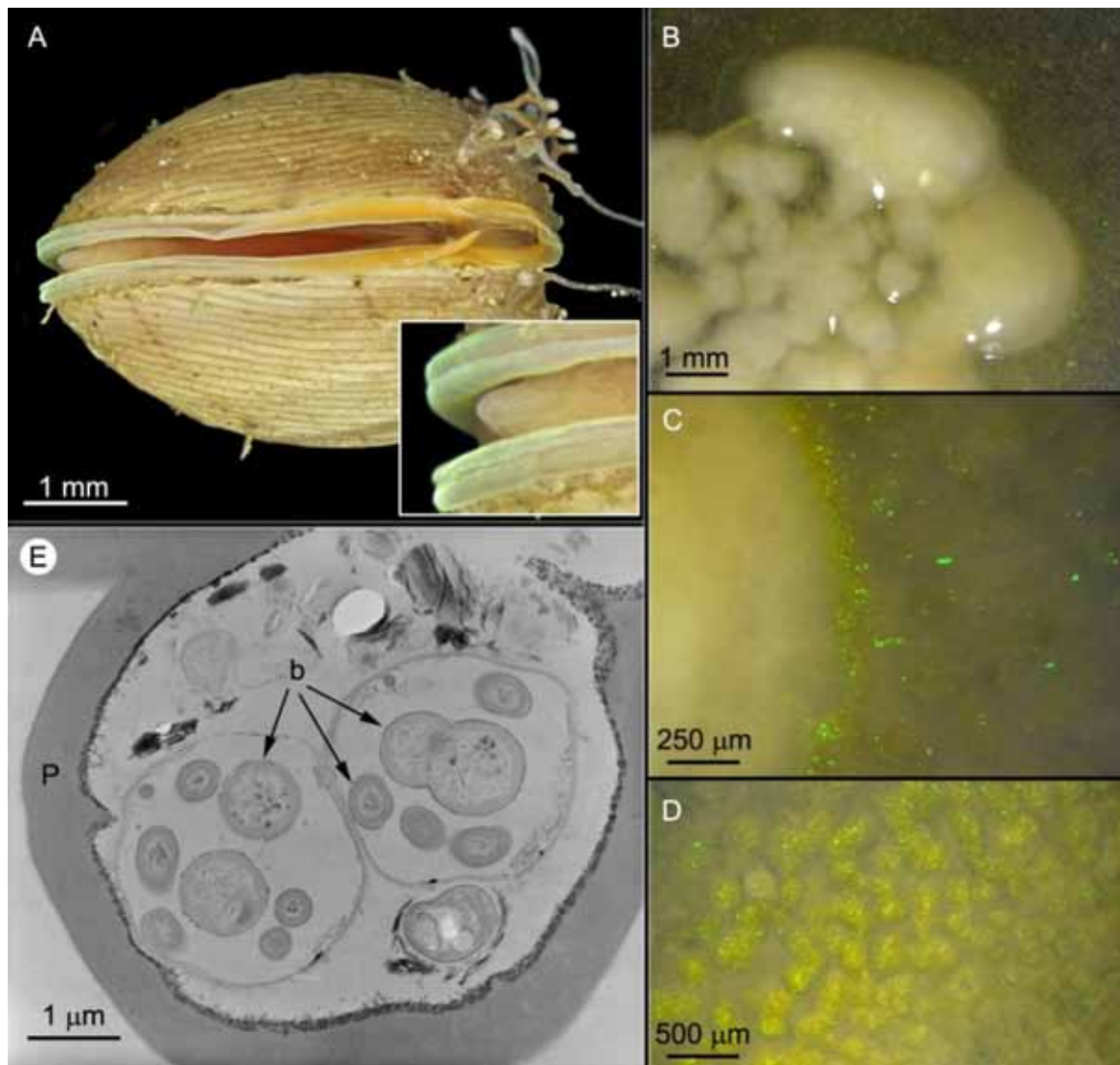


Figura 4.30. Bacteria simbiote de *D. digitaria*. A, ejemplar vivo de *D. digitaria* donde puede observarse la refringencia del manto provocada por las bacterias. El recuadro es una ampliación del borde del manto. B – D colonia de bacterias del tipo T1Bg/9 que presenta el mismo tipo de refringencia que el observado en el borde del manto del bivalvo. E, corte transversal de un alveolo del periostraco repleto de bacterias. Abreviaturas: b, bacteria; P, periostraco.

La presencia de bacterias en la pared folicular de gónadas femeninas en el área donde el filamento nutricio permite pasar el material que formará el vitelo del óvulo apunta a una vía

por la que estas bacterias simbiotas podrían penetrar en los gametos femeninos (Figura 4.31 D). Igualmente se han observado presencia de bacterias en el interior de algunas células branquiales (Figura 4.32).

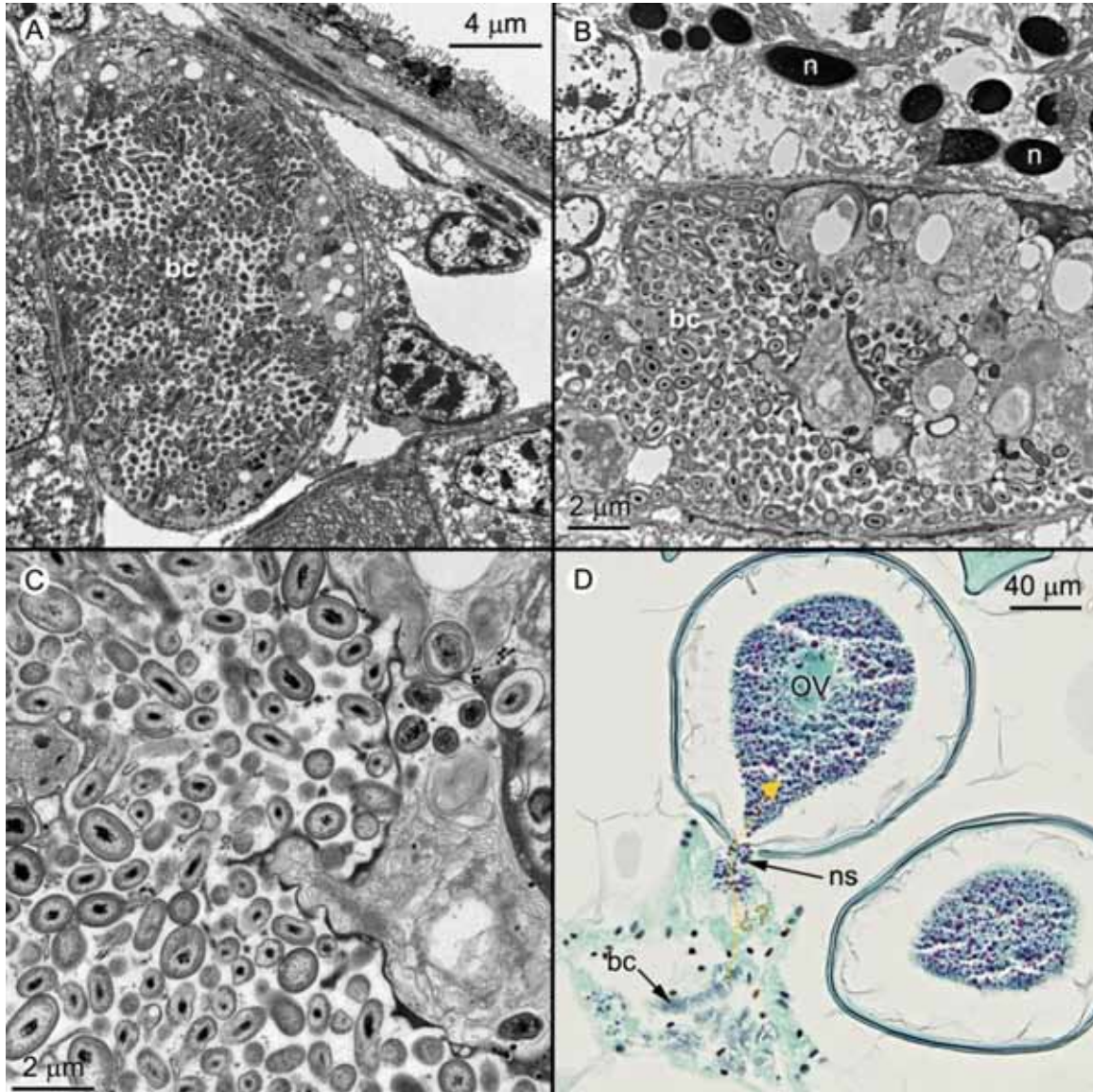


Figura 4.31. Bacterias simbiotas de *D. digitaria* en la gónada. A, bacteriocito en la gónada femenina, en los espacios interfoliculares. B, bacteriocito en la gónada masculina al lado de un folículo con espermatozoides. C, detalle de las bacterias dentro del bacteriocito. D, bacterias en la pared folicular de una gónada femenina en el área del filamento nutricional donde el óvulo adquiere el material con el que forma el vitelo. La flecha indica la posible entrada de las bacterias al óvulo a través del filamento nutricional. Abreviaturas: bc, bacteriocito; n, núcleo; ns, filamento nutricional; OV, óvulo.

En el presente estudio no se ha podido confirmar si la bacteria observada en el borde del manto, el periostraco y la gónada son la misma especie. De ser así, y por el hecho de

encontrarse en las gónadas, se trataría de una transmisión vertical de las bacterias desde la hembra a su descendencia. Esta especie de bacteria se encuentra actualmente en estudio, con el objetivo de ser identificada y comprender la relación simbiótica existente entre bivalvo y bacteria. Actualmente hay muestras de manto, branquias y gónada femenina en la Universidad de Nuevo México (EEUU) a cargo de la Dra. Nishiguchi, que ha realizado estudios sobre la bioluminiscencia del cefalópodo *Euprymna scolopes*. El objetivo es la extracción y secuenciación de las bacterias, con el fin de comprobar si existe alguna relación con la refringencia que presenta el borde del manto.

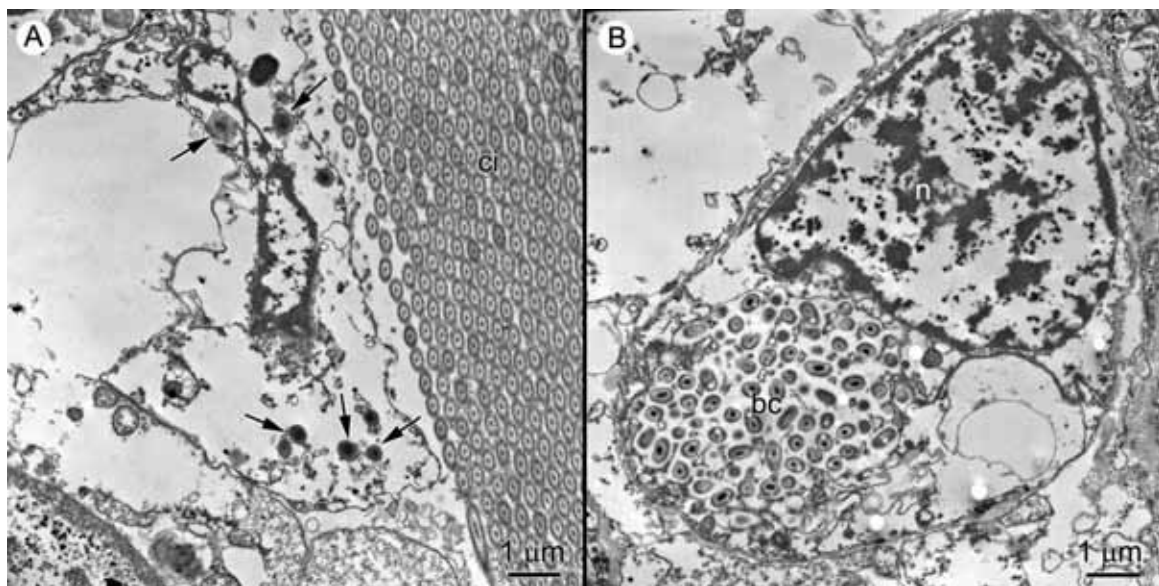


Figura 4.32. Bacteria simbiote de *D. digitaria* en las branquias. A, Bacterias aisladas en el tejido branquial (flechas). B, bacteriocito en el tejido branquial de apariencia similar al encontrado en las gónadas. Abreviaturas: bc, bacteriocito; ci, cilios; n, núcleo.

DISCUSIÓN

Anatomía

Aunque existen pocas referencias a la anatomía de la familia Astartidae, la organización general de los órganos y sistemas en *D. digitaria* coincide con la descripción anatómica funcional dada por Saleuddin (1965) para el género *Astarte*, que por otro lado define a la familia Astartidae y la diferencia de otros grupos de eulamelibranquios. Las diferencias halladas responden a ciertos caracteres morfológicos e histológicos del manto, la estructura de

las branquias o la tipología celular del epitelio de los divertículos digestivos (Saleuddin 1965). El manto en el género *Astarte* posee en su margen ventral libre los tres lóbulos típicos en bivalvos, de los que según Saleuddin (1965) es el lóbulo interno el que presenta una función sensorial, observándose una banda de ciliatura marginal no vibrátil, y aunque el lóbulo medio es el que habitualmente posee una función sensorial en otros bivalvos, en el de *Astarte* no ha sido identificada ninguna estructura a tal efecto. En el caso de *D. digitaria*, como ocurre en *Astarte*, aparece la banda de cilios en el lóbulo interno del manto, no obstante también han sido identificadas estructuras ciliares en el lóbulo medio del manto (típicamente sensorial en bivalvos) con función sensorial, de tipo aparentemente mecanorreceptor.

En lo que se refiere a la estructura ciliada de tipo eulamelibranquio que presentan los ctenidios, se ha encontrado una alta similitud con la descrita por Saleuddin (1965) para *Astarte sulcata*, aunque en el caso de *D. digitaria*, mediante microscopía óptica no se ha apreciado la presencia de cilios prolatero – frontales, y la posición abfrontal de las células glandulares en los filamentos branquiales es diferente. No obstante, no se descarta que un estudio detallado de la ultraestructura que componen los filamentos branquiales pudiera revelar la presencia de cilios prolatero – frontales.

El sistema digestivo posee algunas diferencias respecto al de *Astarte*, como la presencia de un surco menos en los palpos labiales o la existencia de células secretoras en el epitelio del esófago de *D. digitaria*. La musculatura subepitelial poco desarrollada en el esófago así como la asociada a la lámina basal del tubo digestivo es habitual en los eulamelibranquios (Ciocco & Barón 1998), coincidiendo con lo observado en el presente trabajo, no obstante, Saleuddin en su estudio anatómico para el género *Astarte* encuentra una musculatura bien desarrollada asociada al esófago e intestino. El estómago reúne ciertas características que lo enmarcan en la descripción de Purchon (1958) para el estómago tipo IV, que es también el descrito para la familia Crassatellidae. No obstante, la descripción de Purchon (1958) para el estómago de Astartidae, basado en ejemplares de *Astarte sulcata*, difiere de las observaciones realizadas en *D. digitaria* en cuanto al número y posición de los orificios de los divertículos digestivos. En referencia a los tipos celulares que forman el epitelio de los divertículos digestivos, no se pudieron apreciar dos de los tres tipos celulares que describe Saleuddin (1965), pero es muy probable que sea debido al alto grado de parasitación por *Marteilia sp.* que sufre *D. digitaria*

en las células de su glándula digestiva, que provoca alteraciones morfológicas y llega a destruir las células completamente, lo que dificulta discernir si la morfología y la composición celular epitelial responden a la estructura original de la glándula o si por el contrario son debidas a alteraciones provocadas por el parásito. En el estómago de *D. digitaria*, aunque existe un escudo gástrico bien desarrollado, el estilete cristalino que ha podido observarse, muestra una consistencia más mucosa que gelatinosa, de manera que parece acercarse más a un protostilo que a un verdadero estilete cristalino como el que se describe para el género *Astarte* (Saleuddin 1965). El carácter mucoso del estilo junto con el hecho de que el saco del estilo se encuentra unido al intestino descendente, sin formar una cavidad independiente, son caracteres morfológicos propios de bivalvos basales.

De las tres familias con un parentesco más próximo a la de *D. digitaria*, sólo algunas especies de la familia Carditidae, como *Carditamera affinis*, presentan biso (González & Giribet 2012). Para la familia Astartidae, Saleuddin menciona la existencia de una glándula del biso bien desarrollada en *Astarte*, aunque no observó ningún tipo de secreción o filamento en los ejemplares estudiados, ni siquiera en algunos de pequeña talla (4 mm de longitud). Sin embargo, en *D. digitaria*, se ha constatado que además de aparecer una glándula del biso bien desarrollada, el filamento está presente en las formas adultas de esta especie. Aunque la composición del filamento no ha sido estudiada en el presente trabajo, se conoce para otras especies como *Mytilus edulis*, donde está formado a partir de las secreciones de diferentes glándulas del pié, que consisten principalmente en sustancias parecidas al colágeno, que se mezclan con β -proteínas y son curtidadas por quinonas bajo la actividad de la enzima polifenol-oxidasa (Lane & Nott 1975). En determinadas especies, esta estructura está presente a lo largo de toda la vida del animal, como ocurre en los mitílidos, en otras solo se mantiene durante la etapa juvenil para desaparecer cuando el ejemplar es adulto (Caddy 1972, Sigurdsson *et al.* 1976). El biso es una estructura fibrosa que ofrece un firme sistema de sujeción al bivalvo al sustrato en sistemas de alta energía, presentando una fuerza de tracción de aproximadamente $10^8 \text{ N} \cdot \text{m}^{-2}$, lo que permite soportar severas condiciones durante tormentas invernales (Smeathers & Vincent 1979). El hecho de que *D. digitaria* presente biso podría estar relacionado con su hábitat, sustratos bioclásticos sometidos a fuertes corrientes de fondo, y con el hecho de tratarse de una especie surgida por paedomorfosis de otros astártidos

de mayor tamaño. No obstante ningún ejemplar ha sido visto fijado por filamentos del biso a algún tipo de sustrato duro (restos de conchas, pequeñas piedras) que pudiera encontrarse en los fondos de arenas gruesas y gravas bioclásticas donde habitan. Esto hace pensar que el biso en esta especie pudiera secretarse en forma de cordón mucoso, sin haber sufrido un proceso de curtido, actuando a modo de adhesivo, proporcionando cierta sujeción al sustrato pero sin anclarlo. La composición del biso en *D. digitaria* es un aspecto interesante sobre el que se deberá profundizar en futuros estudios, pues los adhesivos naturales extraídos de las fibras del biso de *Mytilus edulis* poseen interés biotecnológico (Deming 1999) y aplicaciones en biomedicina como adhesivo quirúrgico de tejidos, cementos dentales, cultivo de células, implantes de córnea, etc. (Dove & Sheridan 1986; Benedict & Picciano 1989, Silverman & Roberto 2006, 2007).

Las técnicas de microscopía electrónica de transmisión han permitido estudiar la ultraestructura de los espermatozoides de diversas especies de moluscos bivalvos, lo que ha producido una abundante y útil información en los análisis taxonómicos y filogenéticos (Healy *et al.* 2001). La relación filogenética existente entre las familias Crassatellidae y Carditidae se ponen de manifiesto en el estudio de Healy (1995) donde compara la ultraestructura de sus espermatozoides, encontrando similitudes morfológicas que le lleva a agrupar estas dos familias en la misma superfamilia. En el caso de la familia Astartidae no existían estudios de este tipo, únicamente el desarrollado por Franzen (1955), cuyas observaciones de los espermatozoides en *Astarte sulcata*, sin una aparente vesícula acrosómica y sólo cuatro mitocondrias en la pieza media, mostraban marcadas diferencias con Crassatellidae y Carditidae. Sin embargo, en el presente estudio, algunos de los caracteres anatómicos identificados y descritos para los espermatozoides de *D. digitaria*, como la presencia y forma del acrosoma con un eje axial, o la forma del núcleo, muestran una gran similitud con los de las familias Crassatellidae y Carditidae estudiadas por Healy (1995). Si bien uno de los caracteres más importantes para Healy (1995) a la hora de determinar el parentesco entre estas Crassatellidae o Carditidae, como es la presencia habitual de 8 mitocondrias de la pieza media, difiere en *D. digitaria*, en la que el número de mitocondrias de la pieza media en torno a un centriolo distal es de siete. No obstante, recientes estudios moleculares han puesto de manifiesto una relación de parentesco muy cercana entre

Astartidae, Crassatellidae y Carditidae (Giribet & Wheeler 2002, Giribet & Distel 2003, Taylor et al. 2007, Sharma *et al.* 2012, Gonzalez & Giribet, 2015). Por tanto, estos resultados sobre la estructura del espermatozoide en *D. digitaria* corroborarían la existencia del clado Archiheterodonta, en el que se incluye Crassatellidae, Astartidae y Carditidae. Yonge (1969) ya puso de manifiesto la confluencia de caracteres entre estas familias, que él agrupó en una superfamilia Crassatelloidea. Además, otras características morfológicas compartidas entre Astartidae (*D. digitaria*) y Crassatellidae, sería el tipo de estructura branquial, el grado de fusión del manto a nivel de las aberturas inhalantes y exhalantes y la forma de los palpos labiales.

Parásitos y simbioses

En *Digitaria digitaria* se ha descrito la ocurrencia de una serie de parásitos y/o simbioses, ya sea invadiendo sus vísceras o colonizando la concha. Externamente es corriente encontrar al hidrozoo *Monobrachium parasitum* Mereschkowsky, 1877 como epibionte, asociados a la zona posterior donde se produce la entrada y salida de agua del bivalvo por los sifones (Besteiro *et al.* 1990). Según Jarms (1998), los individuos que presentan colonias de *M. parasitum* sobre la concha parecen verse afectados en su crecimiento, siendo de menor tamaño que aquellos que no la poseen. Esta relación simbiótica parece probada, ya que tras la muerte del bivalvo la colonia del hidrozoo no tarda en morir (Jarms, 1998). Además de *D. digitaria* este hidrozoo aparece colonizando otras especies tales como *Cuspidaria tenella*, *Mysella minuscula*, *M. charcoti*, *Thyasira bongraini*, *Yoldiella valettei* y *Thracia meridionali*, todas ellas de pequeño tamaño y asociadas a aguas frías.

Según Combes (2005) la riqueza y abundancia de parásitos que viven en un hospedador está restringida por el tamaño de éste. A pesar de ser uno de los representantes de menor talla de la familia Astartidae, todos los individuos de la población estudiada de *D. digitaria* (6 mm talla media), desde el más pequeño al más grande albergan parásitos, y en algunos casos una gran cantidad y variedad de ellos. La mayoría de los organismos que viven dentro de tejidos u órganos son considerados como parásitos patógenos. Entre ellos podemos encontrar representantes del género *Haplosporidium*, que madura en el tejido conectivo que rodea a la glándula digestiva, pudiendo provocar elevadas tasas de mortalidad como ocurre con *H.*

nelsoni que causa una elevada mortalidad en las especies de bivalvos que parasita (Burreson *et al.* 2000). Algunos de los más frecuentes y abundantes en *D. digitaria* como es *Marteilia* sp. están catalogados como letales para muchas especies de bivalvos que actualmente se cultivan (Bower *et al.* 1994; Villalba 1995). Los protozoos parasitarios pertenecientes al género *Marteilia*, habitualmente infectan el sistema digestivo de los bivalvos e inducen trastornos fisiológicos y finalmente la muerte del animal (Alderman 1979, Grizel *et al.* 1974). Sin embargo este parásito, que aparece en el 100% de la población de *D. digitaria* analizada, da la sensación de ser menos patógeno en esta especie, ya sea porque el bivalvo actúe solo como portador, porque presente una mayor resistencia al parásito o porque la especie de *Marteilia* que lo infecta no posea un carácter tan agresivo como *M. refringens*, causante de elevadas mortalidades en los cultivos de ostras y mejillones. El hecho de que el hábitat de *D. digitaria* (fondos de elevado hidrodinamismo a profundidades mayores de 15 metros) sea totalmente distinto al de las especies intermareales típicamente parasitadas por este protozoo (mejillones, ostras y berberechos), pudiera indicar que la *Marteilia* que infecta a la población de *D. digitaria* fuera una especie distinta a *M. refringens*. A este respecto, Ascenzo–Navarro (2014), estudió las células de *Marteilia* en el sistema digestivo de *D. digitaria* mediante técnicas histológicas y de microscopía electrónica, así como mediante técnicas moleculares de amplificación y secuenciación de las regiones ITS-1 e IGS. El análisis histológico confirmó la presencia del protozoo en los divertículos digestivos, las paredes estomacales y la luz del intestino de *D. digitaria*. Las pruebas moleculares les llevaron a encontrar un porcentaje de identidad bastante bajo al comparar las secuencias de las regiones ITS-1 e IGS amplificadas con las secuencias de estas regiones depositadas en GenBank, lo que abre la posibilidad a que efectivamente, se trate de una nueva especie del género *Marteilia*.

Pero de todos los organismos que se han encontrado parasitando a este astárido, el que parece causarle los mayores daños a escala poblacional es el trematodo de la familia Bucephalidae, que utilizan a los bivalvos como hospedadores intermediarios en sus ciclos de vida, siendo los peces o cangrejos los hospedadores finales. Estos parásitos, al invadir la gónada reducen e incluso anulan la capacidad reproductora de los ejemplares de *D. digitaria*, con las evidentes consecuencias que tiene esto para la supervivencia de la población. Shelley *et al.* (1988) encontraron consecuencias parecidas en su estudio, donde entre el 12 y el 14 % de

la población del bivalvo *Tridacna crocea* se encontró parasitado por el trematodo, produciendo daños en las gónadas, engrosamiento de las paredes musculares e incluso una leve parasitación de la branquia. En *D. digitaria* la frecuencia de parasitación por este trematodo es baja (3,6 %) en comparación con otros estudios donde una frecuencia del 50 % de ejemplares parasitados es habitual (Laukner 1987), o en Pina *et al.* (2009) donde encontraron que el 25 % de la población de berberecho *Cerastoderma edule* en Aveiro (Portugal), se encontraba parasitado por *Bucephalus minimus*. Esta diferencia podría estar relacionada con (a) una escasa presencia del hospedador definitivo en los fondos bioclásticos, (b) una baja accesibilidad de *D. digitaria* para el hospedador definitivo debido a su microhábitat entre los bioclastos o (c) porque *D. digitaria* no sea habitual en la dieta de dichos hospedadores (Combes 2005).

Simbiosis bacteriana

La transmisión de los simbioses a través de generaciones de hospedadores es esencial para la perpetuación de las simbiosis y tiene un papel fundamental en su evolución (Bright & Bulgheresi 2010). Se han reconocido dos formas principales de transmisión: a) transmisión vertical, con la herencia de los simbioses de la línea germinal, por lo general a través del ovocito y b) la transmisión horizontal, cuando el hospedador nace libre de simbioses y debe adquirirlos en el propio entorno o a través de miembros de la generación de los padres que ya los posean. Las bacterias que viven en bacteriocitos se consideran "simbioses primarios", y es por la existencia de estas bacterias cuando se ve una clara evidencia de una coevolución en la relación mutualista con el hospedador (Moran & Baumann 2000). La existencia de bacteriocitos en diferentes tejidos de *D. digitaria*, entre ellos la gónada hace pensar en una posible relación simbiótica en la que la transmisión sea vertical, aunque es común encontrar organismos en los que la adquisición es mixta, existiendo también un aporte ambiental de simbioses (Bright & Bulgheresi 2010). Los estudios filogenéticos moleculares revelan que muchas endosimbiosis entre bacterias e invertebrados son el resultado de infecciones antiguas, seguida de una estricta transmisión vertical dentro de los linajes hospedadores. Los análisis preliminares de la proporción d13C/ d12C realizados en conchas de *D. digitaria* no muestran influencia bacteriana en lo relativo a su formación, lo que descartaría una posible simbiosis relacionada con los procesos de calcificación de las capas minerales del molusco.

En bivalvos que poseen bioluminiscencia, ésta es emitida a partir de estructuras especializadas llamadas órganos luminosos o fotóforos. Estos órganos contienen células fotogénicas a partir de las cuales la luz se genera intracelularmente o por la formación de secreciones luminiscentes que luego el animal descarga (Tsuiji 1983). Habitualmente los fotóforos se sitúan en el borde del manto, como ocurre en *A. sulcata* donde Saleuddin (1965) detecta órganos glandulares en el lóbulo medio del manto, que al ser estimulados mecánicamente exudaron una sustancia, produciendo destellos de luz azul, que pudo ser registrada mediante un osciloscopio. En el caso de *D. digitaria* ninguna estructura similar ha sido detectada en los lóbulos del manto, aunque si se ha observado refringencia verde en el borde del mismo. No obstante la luz emitida por *A. sulcata* tendría según Saleuddin un origen asociado a las propiedades lumínicas de probablemente una fotoproteína, mientras que en *D. digitaria* podría tener un origen bacteriano. Algunas bacterias simbiotes producen luminiscencia en varios géneros de cefalópodos de las familias Sepiolidae y Loliginidae (Haddock *et al* 2010), y ha sido especialmente estudiada la relación entre *Euprymna scolopes* – *Vibrio fischeri* (Ruby 1996, Nishiguchi *et al.* 1998). La bioluminiscencia en los bivalvos se conoce para el género *Pholas*, pero esta no es producida por bacterias, sino que se debe a la presencia de la pholasina, una fotoproteína que reacciona con la enzima luciferasa y oxígeno molecular, produciendo quimioluminiscencia (Haddock *et al* 2010). El análisis de las bacterias encontradas en partes blandas (manto, branquias y gónada) de *D. digitaria* está ahora en curso y aunque todavía no hay datos disponibles, la observación de luminiscencia en el borde del manto de algunos ejemplares, junto con la obtención de cultivos puros de bacterias aisladas a partir de su periostraco, que también presentaban luminiscencia, podría apuntar a algún tipo de bioluminiscencia por simbiosis bacteriana, lo que sería el primer registro de este tipo de asociación entre los moluscos bivalvos.

CAPÍTULO 5



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



BIOLOGÍA REPRODUCTIVA Y CRECIMIENTO



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

INTRODUCCIÓN

Los patrones reproductivos de los organismos desempeñan un papel esencial en la dinámica poblacional, la distribución biogeográfica y en la continuidad de la especie. Multitud de procesos (etológicos, fisiológicos o químicos) están involucrados en la reproducción, todos ellos enfocados a la producción de descendencia. No obstante, y aunque en la producción de gametos femeninos (ovogénesis) y masculinos (espermatogénesis) hay involucrados diversos procesos, los patrones básicos de desarrollo de los gametos en invertebrados son similares, con la proliferación y diferenciación de células germinales que finalmente producirán gametos maduros. La producción de gametos es una actividad cara desde el punto de vista energético, especialmente la de los óvulos, y por lo tanto es muy sensible a la presión selectiva. Un organismo es capaz de tomar y asimilar una cantidad limitada de energía del entorno que le rodea, y las diferentes maneras en las que se asigna dicha energía con el objetivo de maximizar su aptitud en el medio, ya sea creciendo o reproduciéndose, constituye la base de los diferentes patrones vitales que se han desarrollado en los invertebrados marinos (Ramirez Llodra 2002).

El phylum Mollusca es uno de los más grandes, más diversos e importante en el medio marino, donde representan una cuarta parte de la fauna bentónica (Appeltans *et al.* 2012), y entre ellos el comportamiento sexual es extremadamente variado. La fecundación externa en este grupo de invertebrados se asocia frecuentemente con un tipo de comportamiento reproductor simple, donde el control de la reproducción y por ende la liberación de los gametos suele estar controlada por la interacción entre factores exógenos como la temperatura, la disponibilidad de alimento, la salinidad o la luz, con factores endógenos como los ciclos neuro–endocrinos y el genotipo. Las especies con fecundación interna que requieren varias horas de cortejo para coordinar la transferencia de gametos, estaría en el otro extremo (Runham 1992). Entre estas dos modelos hay un amplio abanico de posibilidades, donde caben diferentes tipos de comportamiento sexual (Leonard 2013).

Los moluscos bivalvos con fecundación externa son generalmente de tamaño medio a grande, lo que posibilita una elevada producción de gametos que asegure una alta tasa de fertilización. Por otro lado, especies pequeñas, de tamaño inferior a 3 mm, suelen presentar conductas de

protección de la descendencia (Sellmer 1967, Sastry 1979), aunque también está presente en especies con tamaños más grandes. Y en este sentido, cabe preguntarse qué ocurre con aquellas especies que presentan un rango de tamaño intermedio. Aquellas cuyas poblaciones presentan tallas de ejemplares adultos entre los 3 y los 10 mm, donde el espacio disponible en las gónadas para albergar los ovocitos se reduce, y la capacidad de producir gran cantidad de gametos se merma. ¿Cuál sería el comportamiento sexual en estas especies para mantener una tasa de fertilización suficientemente alta para asegurar la pervivencia de la especie?

La producción de gametos femeninos es una importante y costosa inversión en términos energéticos, más aún para especies de pequeño tamaño, por lo que una opción lógica sería la protección de dicha inversión, maximizando el rendimiento de la puesta, gracias a diferentes estrategias reproductivas. Entre aquellas especies en la que se lleva a cabo un cuidado de la descendencia en diferentes grados (Sastry 1979: Tabla XIV), el hermafroditismo es un patrón frecuente (Pelseneer 1911) aunque no exclusivo. La fecundación en las especies que incuban sus huevos, sean o no hermafroditas y siendo la mayoría de ellas de pequeño tamaño, se produce, en el espacio interbranquial o en la cavidad paleal (Sellmer 1967, Sastry 1979). Por otra parte, algunas especies poseen huevos encapsulados que en el momento de la puesta son embebidos en una masa gelatinosa y adherente, lo que les proporciona una protección adicional en el medio externo (Sellmer 1967, Sastry 1979, Collins & Giribet 2010).

Dentro del estudio de la biología reproductiva de una especie, donde se examinan aspectos como el ciclo gonadal, índice gonadosomático, talla de primera madurez, fecundidad, etc., es también importante conocer los parámetros poblacionales relacionados con el crecimiento de dicha especie, como la tasa de crecimiento o la longevidad, entre otros. De esta forma, identificar el patrón de crecimiento de un organismo proporcionará datos ecológicos básicos, además de permitir una mejor comprensión de su biología mediante la descripción de su dinámica poblacional (Herrmann *et al.* 2009).

Existen diferentes métodos para estimar la edad de los bivalvos, y su tasa de crecimiento. Los experimentos de marcado y recaptura (Ropes *et al.* 1984, Herrmann *et al.* 2009), los anillos de crecimiento de la superficie de la concha, las líneas internas de crecimiento presentes en su microestructura (ver revisión en Richardson 2001), la distribución de la frecuencia de tallas (Bayne & Worrall 1980, Chícharo & Chícharo 2001, Michaelidis *et al.* 2005) o el análisis de

la composición de oxígeno y carbono isotópico (Keller *et al.* 2002, Schöne *et al.* 2005a) son algunos de los métodos utilizados a este efecto. Sin embargo, existen problemas prácticos con la mayoría de ellos (para una revisión de los métodos de estimación del crecimiento ver Griffiths & Griffiths (1987) o Richardson (2001). Los experimentos de marcado y recaptura exigen una gran inversión de tiempo para recopilar datos (especialmente en especies de crecimiento lento). El análisis de las marcas de crecimiento en la superficie de la concha puede llevar a resultados poco fiables, ya que puede ser imposible distinguir verdaderos anillos anuales de crecimiento de los formados por perturbaciones o condiciones de estrés (temporales, temperaturas extremas, enfermedades, depredación, factores antrópicos, etc.) o porque debido a las buenas condiciones ambientales a lo largo del año, no se produce una parada invernal o estival. Además, en los ejemplares de mayor edad de especies longevas, el margen de la concha y la región del umbo suelen estar erosionados, y los anillos de formación más reciente se depositan tan cerca uno del otro que hace muy difícil una diferenciación clara (Gaspar *et al.* 2004, Moura *et al.* 2009). La lectura e interpretación de las líneas de crecimiento presentes en la estructura interna de la concha puede resultar bastante complicado. El proceso metodológico para obtener estos cortes resulta laborioso y delicado (ej. láminas de acetato; lámina delgada), y su correcta lectura e interpretación exige unas muestras de alta calidad y personal cualificado. Por otro lado perturbaciones ambientales (cambios de temperatura, disponibilidad de alimento, etc.) pueden dar lugar a falsas bandas de crecimiento, lo que puede introducir un error en las estimaciones de crecimiento. El análisis de distribución de frecuencia de tallas es un método un tanto subjetivo, y es menos indicado para especies con un período de reclutamiento anual relativamente largo y/o la tasa de crecimiento individual altamente variable dentro de los grupos de edad (Seed 1976, Cerrato 1980).

De todos los métodos existentes para estimar la edad de los bivalvos, los más usados en la actualidad probablemente son el estudio de las líneas de crecimiento internas de la concha en lámina de acetato (*acetate peels*) y el estudio de cortes en lámina delgada, ya que solventa alguno de los inconvenientes propios de los otros métodos. El análisis de los anillos superficiales de la concha, aunque como hemos visto puede presentar problemas de interpretación en su lectura, también es un método ampliamente utilizado (Richardson 2001,

Chauvaud *et al.* 2012), ya que es rápido y barato. Otro de los métodos ampliamente utilizados es el de análisis de frecuencia de tallas, ya que permite obtener los parámetros de crecimiento sin la necesidad de tener datos pareados previos de talla–edad, que exigen una gran inversión de tiempo y esfuerzo y con frecuencia son difíciles de obtener de manera precisa. De esta forma se consigue separar una distribución de tallas compleja en cohortes y, a la vez, asignar una edad a cada una de ellas. Puesto que la talla media de cada cohorte también se puede determinar, se habrá obtenido la combinación de datos talla – edad necesaria para determinar los parámetros de crecimiento. No obstante, el análisis de un gran número de datos de frecuencia de tallas combinado con un pequeño número de lecturas de edad proporcionaría una información mucho más precisa del patrón de crecimiento de la especie (Sparre & Venema 1997).

La población *Digitaria digitaria* (L., 1758) de la bahía de Barbate presente un tamaño medio aproximadamente de 6 mm de longitud antero-posterior, y vive en fondos de arenas gruesas bioclásticas entre los 15 y los 30 metros de profundidad, bajo la influencia de fuertes corrientes marinas. Así pues, teniendo en consideración su tamaño, que no hace posible asignar *a priori* a esta especie una u otra estrategia reproductora, y que vive en un ambiente hasta cierto punto hostil, debido a las condiciones hidrodinámicas del hábitat, *D. digitaria* constituye un interesante modelo de estudio, que proporcionará valiosos conocimientos acerca de la biología reproductiva que siguen las especies con características (particularmente de talla) que no encajan en los patrones reproductivos habituales.

MATERIAL Y MÉTODOS

Reproducción

Los ejemplares de *D. digitaria* utilizados para el estudio del ciclo sexual y el crecimiento se obtuvieron en Barbate, en el litoral de Cádiz próximo al Estrecho de Gibraltar, (36° 08' 7" N - 5° 56' 7" O) entre 21 y 29 m de profundidad, así como en Cabopino en el litoral de Málaga (Sur de España), (36° 29' 6" N - 04° 41' 30" O) a 15 m de profundidad. Ambas muestras proceden de un tipo de fondo formado por bioclastos y arena gruesa bajo la influencia de fuertes corrientes.

El sexo de los ejemplares de *D. digitaria* no es fácilmente identificable a simple vista, pues no existe un patente y reconocible dimorfismo sexual en las conchas, aunque los machos son algo más grandes que las hembras en la población de estudio (ver capítulo 3), y las gónadas inmaduras no presentan diferencias de color. Por ello, la determinación del sexo de los ejemplares se realizó bajo lupa (y en caso necesario mediante el análisis microscópico de una muestra de tejido gonadal teñida con azul de toluidina) y mediante histología para los ejemplares destinados al estudio de ciclo gametogénico.

Los especímenes destinados a histología, TEM y SEM, se procesaron de la manera habitual referida en el capítulo 2, Material y Métodos, del presente estudio. Las tinciones empleadas en los cortes histológicos fueron hematoxilina de Carazzi – eosina y hematoxilina de Carazzi – tricrómico de V.O.F (Gutierrez 1967).

Tamaño de ovocitos

Para caracterizar cada estado gonadal mediante el tamaño de los gametos femeninos se analizaron 45 ejemplares representantes de los cuatro estados gonadales (activo, emisión, postactivo y preactivo), midiéndose el perímetro de un total de 3.183 gametos femeninos (Tabla 5.1), con el programa ImageJ de análisis y procesado de imagen digital de dominio público desarrollado en el National Institutes of Health (Collins 2007).

Tabla 5.1. Número de ejemplares utilizados y número de gametos femeninos medidos para la caracterización de los diferentes estados de desarrollo gonadal de las hembras de *D. digitaria*.

Estado de desarrollo gonadal	N de ejemplares	N de gametos
Preactivo	11	1128
Activo	16	772
Emisión	14	1120
Postactivo	4	163

Talla de primera madurez

Para el cálculo de la talla de madurez sexual se analizaron un total de 675 ejemplares, agrupándolos en dos categorías (1) aquellos con gónada madura y/o funcional, es decir en estado de activo, emisión, postactivo o preactivo con gametos maduros residuales, y (2) sin

gónada madura, es decir aquellos en estado indiferenciado o preactivo que no hubieran realizado una puesta previa (sin gametos maduros residuales en los folículos). Estos datos se ajustaron a un modelo de regresión logístico del que se extrajo la talla a la cual con un 50% de probabilidad un individuo de la población poseía gónada madura y/o funcional. Para la talla de los ejemplares se tuvo en cuenta la longitud máxima antero – posterior.

Índice de condición (IC) e índice gonádico medio (IGM)

Para el estudio de la condición fisiológica de los ejemplares (entendida como la cantidad relativa de tejido blando) a lo largo del ciclo reproductor se tuvo en cuenta el peso seco de las partes blandas (PS) (Tabla 1.6) y la longitud del eje antero –posterior (L), determinando el Índice de Condición ($IC = PS/ L^3$) de Beukema (1974) modificado por Ansell *et al.* (1980).

A cada estado de desarrollo gonadal se le asignó una categoría numérica en función del grado de madurez de la gónada. Cuando se encontró más de un estado de desarrollo de forma simultánea en una misma gónada, el criterio seguido se basó en la condición de la mayoría de las secciones revisadas de la gónada. Las categorías numéricas asignadas fueron las siguientes: citolítico (0), postactivo (1), preactivo (2), activo (4), emisión (3). Se calculó entonces el índice gonádico medio (IGM), como indicador mensual del estado de desarrollo gametogénico en el que se encuentra la población, según el método propuesto por Gosling (2003):

$$IGM = \frac{\sum \text{nº de ejemplares de cada estado de desarrollo} \times \text{categoría numérica}}{\text{nº total de individuos de cada muestra mensual}}$$

El IGM puede tomar valores entre 0 (todos los ejemplares de la muestra en estado citolítico) y 4 (todos los ejemplares de la muestra en estado activo). A los otros estados se les asignaron valores en función del contenido en gametos: 3 para emisión; 2 para preactivo; 1 para postactivo.

Temperatura

El material analizado en este trabajo proviene, en su mayor parte, de una colección realizada para el Proyecto de Tesis de Licenciatura de J.L. Rueda (1998). Se da el caso que para alcanzar los objetivos de dicho proyecto no se requirieron datos de temperatura, por lo que

no se dispone de un registro *in situ* de la misma durante el periodo de muestreo. Para el presente estudio del ciclo reproductor, se hace necesario conocer las oscilaciones de temperatura al ser un factor externo que influye en las variaciones del estado gonadal de los invertebrados marinos en general y de los moluscos en particular. De esta manera los datos de temperatura superficial del mar (SST) así como los de temperatura en el fondo (SBT) se obtuvieron a través del servicio Copernicus Marine Environment Monitoring Service (<http://marine.copernicus.eu/web/69-interactive-catalogue.php>).

Temperatura Superficial del Mar (SST)

El Consejo Nacional de Investigación de Italia (CNR) procesó los datos AVHRR (imágenes de satélite) mediante el programa Pathfinder V5.2 (PFV52) desde noviembre de 1981 a diciembre de 2012, conjunto de datos obtenidos del Centro Nacional de Datos Oceanográficos y GHRSSST (<http://pathfinder.nodc.noaa.gov>) de EE.UU. Los datos corresponden a valores diarios (nocturnos) y se generan a través de un algoritmo optimizado de interpolación.

La precisión de los datos de SST se evaluó mediante una comparación con datos independientes proporcionados por el MyOcean INSITU TAC para el período de 2004 a 2012, obteniendo un error de desviación estándar de 0,47 °C (Nardelli *et al.* 2015).

Temperatura del Fondo del Mar (SBT)

El “*Mediterranean Forecasting System, physical reanalysis component*” es un modelo hidrodinámico, suministrado por *Nucleous for European Modelling of the Ocean* (NEMO), que funciona mediante un esquema de asimilación de datos variables (OceanVAR) de perfiles verticales de temperatura y salinidad y anomalías del nivel del mar satelitales. El análisis se realizó a partir de datos *in situ* de temperatura tomados antes de 1987 provenientes del proyecto SeaDataNet FP6. Los errores estimados a lo largo de la columna de agua presentan un valor medio de 0,35°C, dándose los máximos aproximadamente a 50 metros de profundidad, donde el error es de 0,8°C (Simoncelli *et al.* 2015).

Crecimiento

Con el fin de estudiar el crecimiento de *D. digitaria*, se midió la longitud de la concha (distancia máxima a lo largo del eje antero – posterior) de cada ejemplar mediante un calibre con una precisión de 0,1 mm, construyéndose la distribución de frecuencia de talla para los 24 meses de estudio. Mediante el método de Bhattacharya (1967), disponible como aplicación en el programa The Fish-Stock Assessment Tool (FISAT II) (Gayanilo, Sparre & Pauly 2002), la distribución de frecuencia de tallas obtenida se dividió en cohortes con un Índice de Separación suficiente ($SI > 2$), que permitió asumir que representaban clases de edad diferentes, generando de esta forma datos pareados edad – talla. Posteriormente, los parámetros L_{∞} (longitud máxima estimada), K (coeficiente de crecimiento) y t_0 (edad teórica en la que la longitud es cero) se estimaron mediante tres métodos (Elefan I, Sheperd y Analysis Length at Age) disponibles en el paquete de programas FiSAT II, desarrollado principalmente para el análisis de los datos de frecuencia de tallas, que se usaron en la ecuación de von Bertalanffy (1960) (VBGE) para ajustar la curva de crecimiento:

$$L_t = L_{\infty}[1 - e^{-K(t - t_0)}]$$

Donde L_t es la longitud para una edad t , L_{∞} es la longitud máxima estimada, K el coeficiente de crecimiento y t_0 la edad teórica inicial en la que la longitud es cero.

Para el cálculo de la longevidad (t_{max}) de *D. digitaria* en la población de estudio se utilizó la aproximación de Pauly (1980):

$$t_{max} \approx 3 / K.$$

Donde K es el coeficiente de crecimiento

La tasa de mortalidad natural se calculó mediante el método de Chapman-Robson (1960):

$$CR = \ln\left(\frac{1 + a - 1/n}{a}\right)$$

Donde a es la edad promedio (responde a la edad de un ejemplar del tamaño promedio de la población) y n es el tamaño de muestra.

Para contrastar los datos obtenidos por análisis de la frecuencia de tallas, se estudiaron los anillos de crecimiento de la concha en lámina delgada de 6 ejemplares. Las conchas se cortaron desde el umbo hasta el margen ventral a lo largo del eje de máxima longitud, con una sierra circular de borde de diamante. Las secciones obtenidas se pulieron hasta obtener láminas de un espesor de 30 μm , para ser examinadas bajo microscopio. Las láminas delgadas se hicieron en el Departamento de Estratigrafía y Paleontología de la Universidad de Granada. También se incluyó un ejemplar completo (concha y partes blandas) en metacrilato, que fue seccionado transversalmente. Se obtuvieron escáneres digitales de cada uno de los cortes en lámina delgada mediante fotomicroscopio, que posteriormente fueron tratadas digitalmente para resaltar las bandas de crecimiento mediante el programa de edición fotográfica Adobe Photoshop CS5. El criterio para marcar una banda como una parada de crecimiento se basó en tres aspectos: 1) que formase una ancha banda oscura por aproximación de líneas de crecimiento menores, 2) la existencia de bandas de crecimiento rápido previas y posteriores, 3) que la banda no fuese superficial, sino que afectase a la capa profunda del ostraco. Una vez identificadas las bandas se midieron las distancias entre ellas y el umbo mediante el programa Image-J de análisis y procesado de imagen digital desarrollado por el National Institutes of Health (Collins 2007). Ya que estas medidas se refieren a la altura de la concha, los datos se convirtieron en longitud según la relación longitud – altura obtenida a partir de 859 ejemplares (ajuste por mínimos cuadrados; $r = 0,966$):

$$L = \frac{H + 0,1751}{0,9247}$$

A partir de la ecuación VBGE se obtuvo la expresión necesaria para el cálculo del coeficiente de crecimiento K en función de la longitud y la edad:

$$K = \frac{\text{Ln}[L_t/L_{\text{max}} - 1]}{-t}$$

Donde L_{max} es la longitud máxima observada en la población de estudio, y t es la edad en años.

RESULTADOS

Ciclo reproductor

Proporción de sexos

El tamaño de los ejemplares muestreados osciló en un rango comprendido entre 1,5 mm y 9 mm en su eje antero-posterior. Se pudo determinar el sexo de un total de 2.137 ejemplares, no pudiéndose identificar el sexo de 32, por lo que no fueron considerados para establecer la proporción entre machos y hembras en la población (Figura 5.1).

De los 2.137 especímenes, 1.023 (47,87 %) fueron machos y 1.114 (52,13 %) hembras. Se trata por tanto de una especie dioica, con sexos separados y en la que la proporción de sexos obtenida fue de 1 macho por cada 1,09 hembras. Existe una diferencia significativa entre el número de hembras y de machos en la población ($\chi^2 = 3,87$; $p > 0,05$), apareciendo un predominio de las hembras sobre los machos con respecto a la proporción 1:1 esperada.

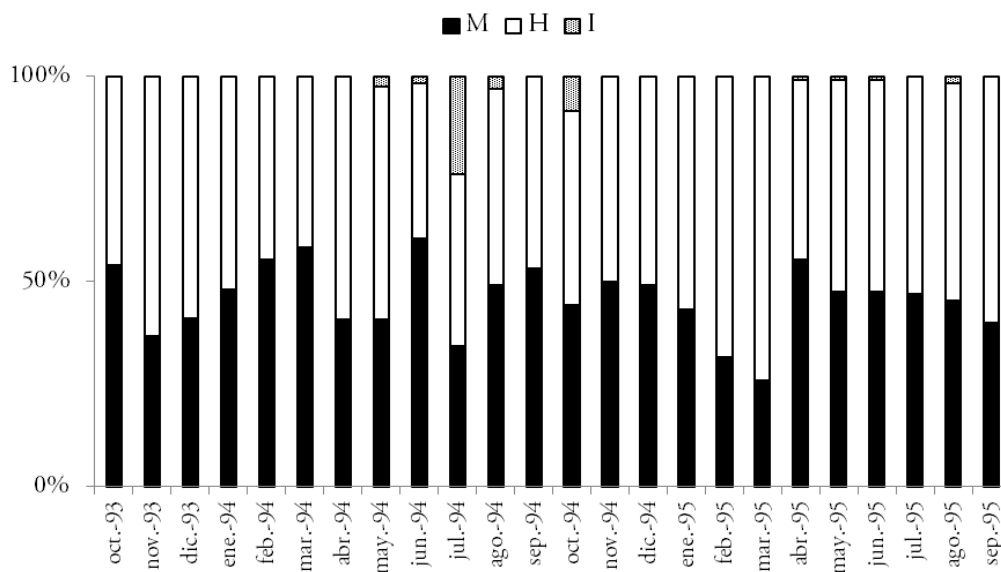


Figura. 5.1. Proporción mensual de sexos encontrada en la población de *D. digitaria* estudiada. H, hembras; M, machos; I, sexo indeterminado.

Ciclo gametogénico

Los resultados del estudio histológico realizado para la determinación del ciclo gametogénico de *D. digitaria* se presentan en la Tabla 5.2, donde se muestra el total de ejemplares utilizados

($n = 693$) y el estado de desarrollo gonadal según la escala de De Villiers (1975) (Figuras 5.2, 5.3).

Tabla 5.2. Número de ejemplares en cada estado de desarrollo gonadal utilizados para el estudio del ciclo gametogénico de *D. digitaria*.

Año	Mes	Estado de desarrollo gonadal						N
		Preactivo	Activo	Emisión	Postactivo	Citolítico	Castrada	
1993	Oc	9	6	3	4	0	1	23
	Nv	16	9	3	0	0	2	30
	Dc	19	1	3	1	0	1	25
	Total	44	16	9	5	0	4	78
1994	En	17	0	5	8	0	0	30
	Fb	16	4	3	6	1	0	30
	Mar	9	10	4	1	0	0	24
	Ab	6	11	4	7	0	2	30
	May	3	7	8	8	3	1	30
	Jn	7	4	8	6	2	3	30
	Jl	13	6	8	1	1	1	30
	Ag	16	2	3	6	0	3	30
	St	4	11	14	1	0	0	30
	Oc	4	2	10	9	3	2	30
	Nv	14	1	15	0	0	0	30
	Dc	15	2	4	8	0	1	30
	Total	124	60	86	61	10	13	354
1995	En	19	5	0	3	0	3	30
	Fb	25	1	4	0	0	0	30
	Mar	12	2	5	2	0	1	22
	Ab	5	6	11	7	0	1	30
	May	6	9	9	4	0	1	29
	Jn	24	0	1	5	0	0	30
	Jl	17	7	1	5	0	0	30
	Ag	23	1	2	1	0	3	30
	St	25	3	1	1	0	0	30
	Total	156	34	34	28	0	9	261

En individuos de menos de 3 mm de longitud antero – posterior se han encontrado gónadas funcionales en diferentes fases del ciclo gamético (post-activo 2,2 mm; emisión 2,7 mm), lo que indica la existencia de gónadas maduras funcionales en ejemplares de tallas pequeñas. El

hecho de que en *D. digitaria* la talla máxima observada sea de 9 mm y la talla media de poco más de 6 mm, pone de manifiesto que algunos ejemplares alcanza la madurez sexual de forma temprana.

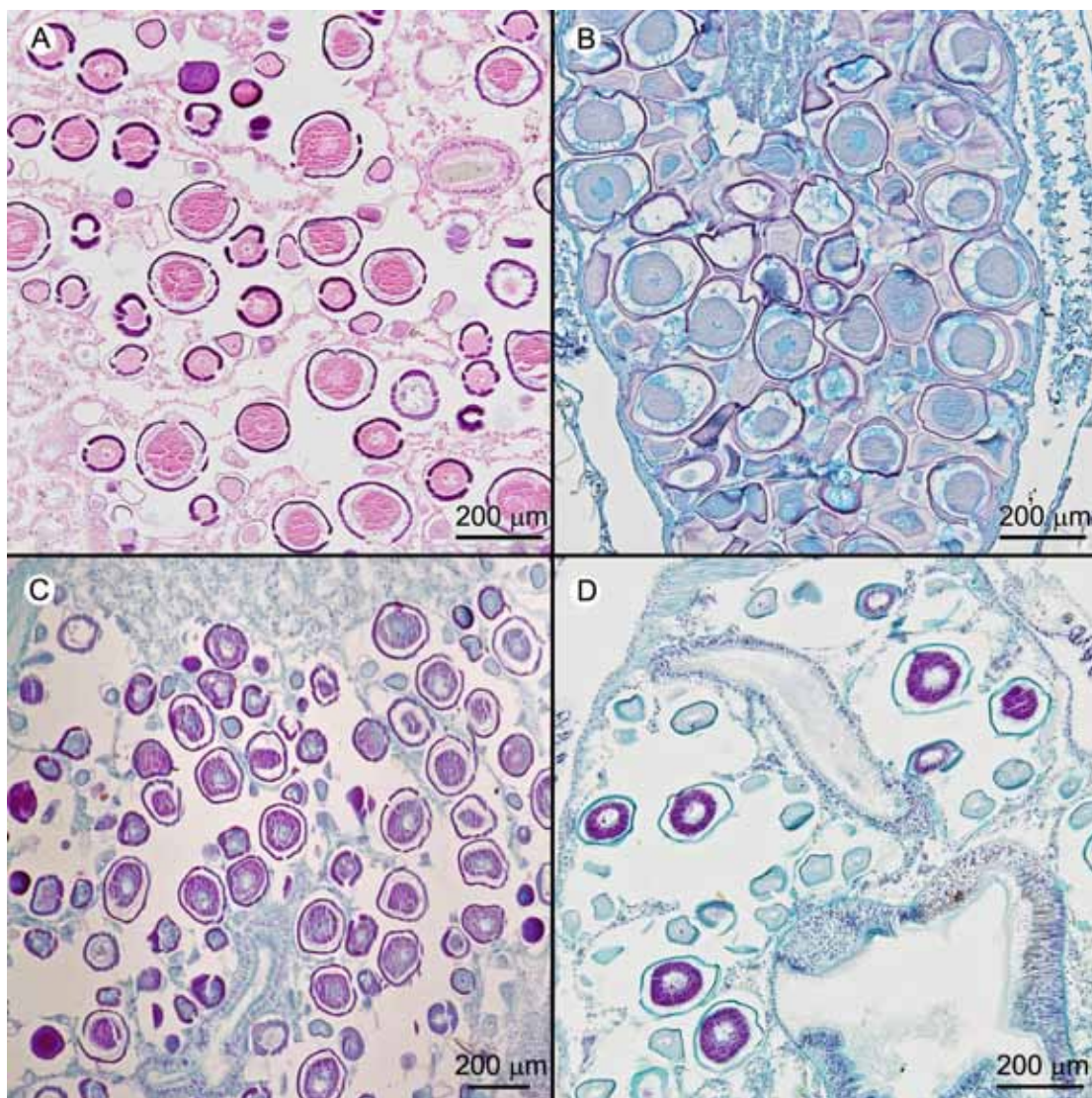


Figura 5.2. Estados de desarrollo gonadal de la hembra de *D. digitaria*. A, preactivo. B, activo. C, emisión. D, postactivo.

D. digitaria presenta gónada funcional durante todo el año, sin observarse un periodo de reposo en la población durante el cual se produzca una reabsorción de la misma. Si bien es cierto que se han encontrado un total de 10 ejemplares en estado citolítico (Tabla 5.2), éstos no aparecen en un mes concreto, sino que están dispersos en distintos meses del año y representan sólo el 1,4 % de la población estudiada. Además, de estos ejemplares sólo en uno

de ellos fue posible identificar el sexo, ya que en los nueve restantes no existía presencia alguna de gametos.

El ciclo gametogénico es asincrónico, debido a la existencia de ejemplares de tres o más estados de desarrollo gonadal en todas las muestras (Tabla 5.2). Se han observado restos de gametos maduros sin emitir junto a otros en diferentes estados de desarrollo dentro del mismo folículo gonadal (Figuras 5.2, 5.3), tanto en machos como hembras, así como diferentes áreas de la misma gónada con estados de maduración distintos, lo que apunta además a la existencia de más de una puesta al año

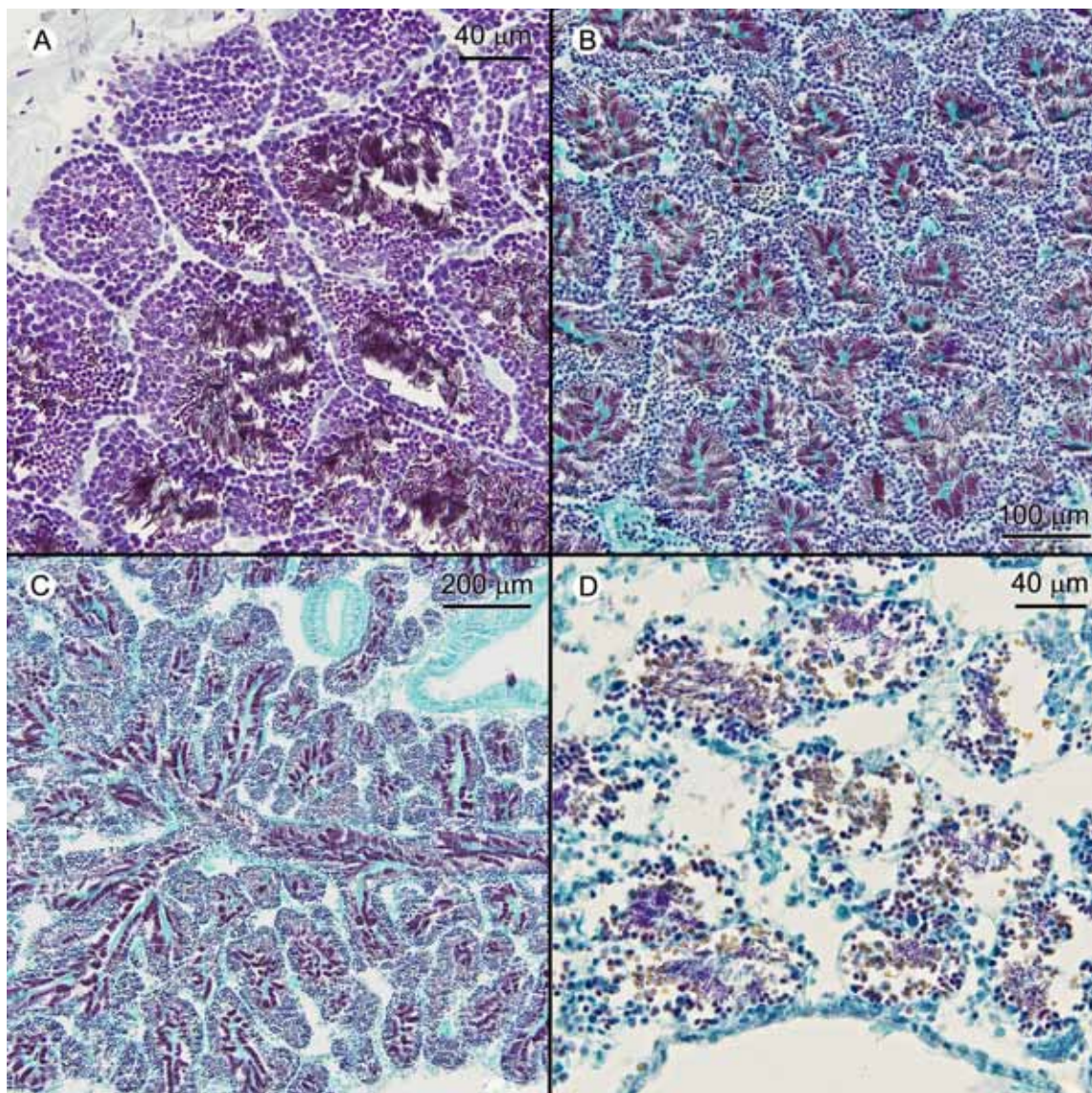


Figura 5.3. Estados de desarrollo gonadal del macho de *D. digitaria*. A, preactivo. B, activo. C, emisión. D, postactivo.

En la población se identifican dos puestas principales a lo largo del año, una en primavera (abril – mayo) y otra durante el otoño (septiembre – noviembre), produciéndose dos picos de emisión uno en mayo (28,8 % de la población) y otro en noviembre (30 % de la población). No obstante, se mantienen ciertos niveles de emisión a lo largo de todo el año, con valores que oscilan entre el 8,3 % y el 30 % de ejemplares (Figura 5.4). La temperatura de fondo (SBT) osciló entre los 14°C y los 19°C durante el periodo de estudio, de manera que el pico de puesta primavera se produjo con valores de SBT en aumento, superando los 17°C, mientras que durante el de otoño se registraron valores de SBT cercanos a los 18°C.

En los machos se observan tres picos de emisión (abril, septiembre y noviembre) con máximo de actividad en el mes de noviembre, aunque mantienen cierto grado de emisión a lo largo de todo el año (Figura 5.5). Aparecen pocos ejemplares en estado activo, lo que puede indicar que la maduración de la gónada en los machos ocurre muy rápido, llenándose de manera explosiva y emitiendo los espermatozoides sin un lapso de tiempo en el que se encuentren retenidos en los folículos.

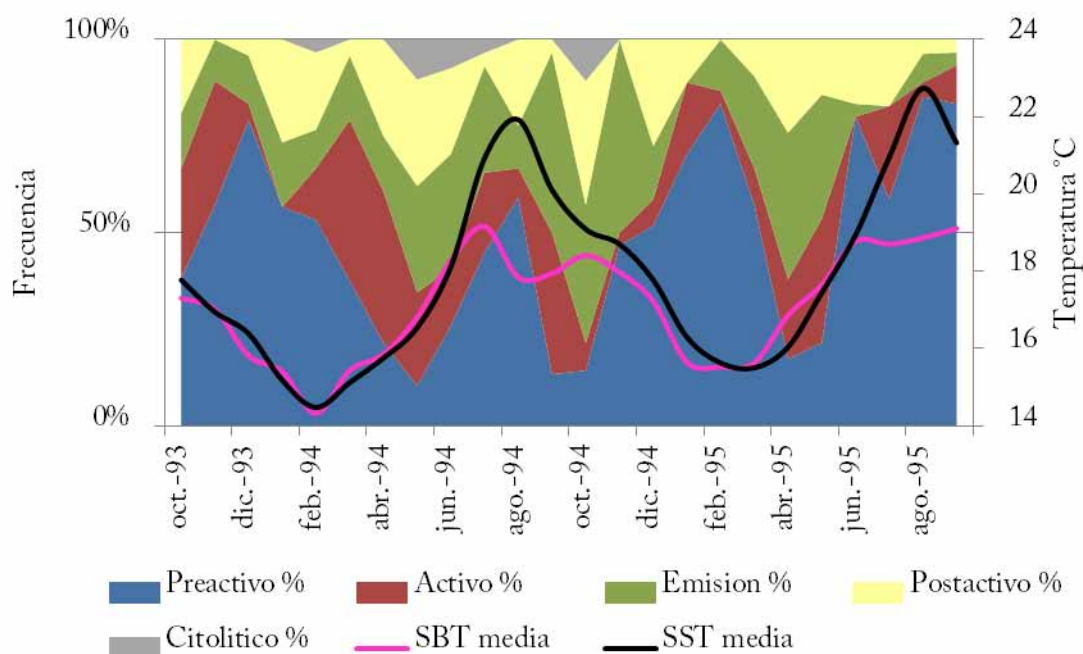


Figura 5.4. Frecuencia mensual de los estados de desarrollo gonadal en la población de *D. digitaria* a lo largo del periodo de estudio. SST, temperatura media superficial del mar; SBT, temperatura media del fondo del mar.

Para las hembras obtenemos un patrón diferente, donde aparecen dos picos de emisión, uno mayor en primavera (mayo) y otro mucho menor en otoño (octubre), siendo los ejemplares en emisión menos abundantes que en machos (Figura 5.5). En cambio, el número de ejemplares en estado activo es más elevado en hembras que en macho, indicando una mayor retención de los gametos en las gónadas antes de ser emitidos. La dinámica que se observa en la abundancia de hembras en estado activo a lo largo del año se asemeja a la de los machos en estado de emisión.

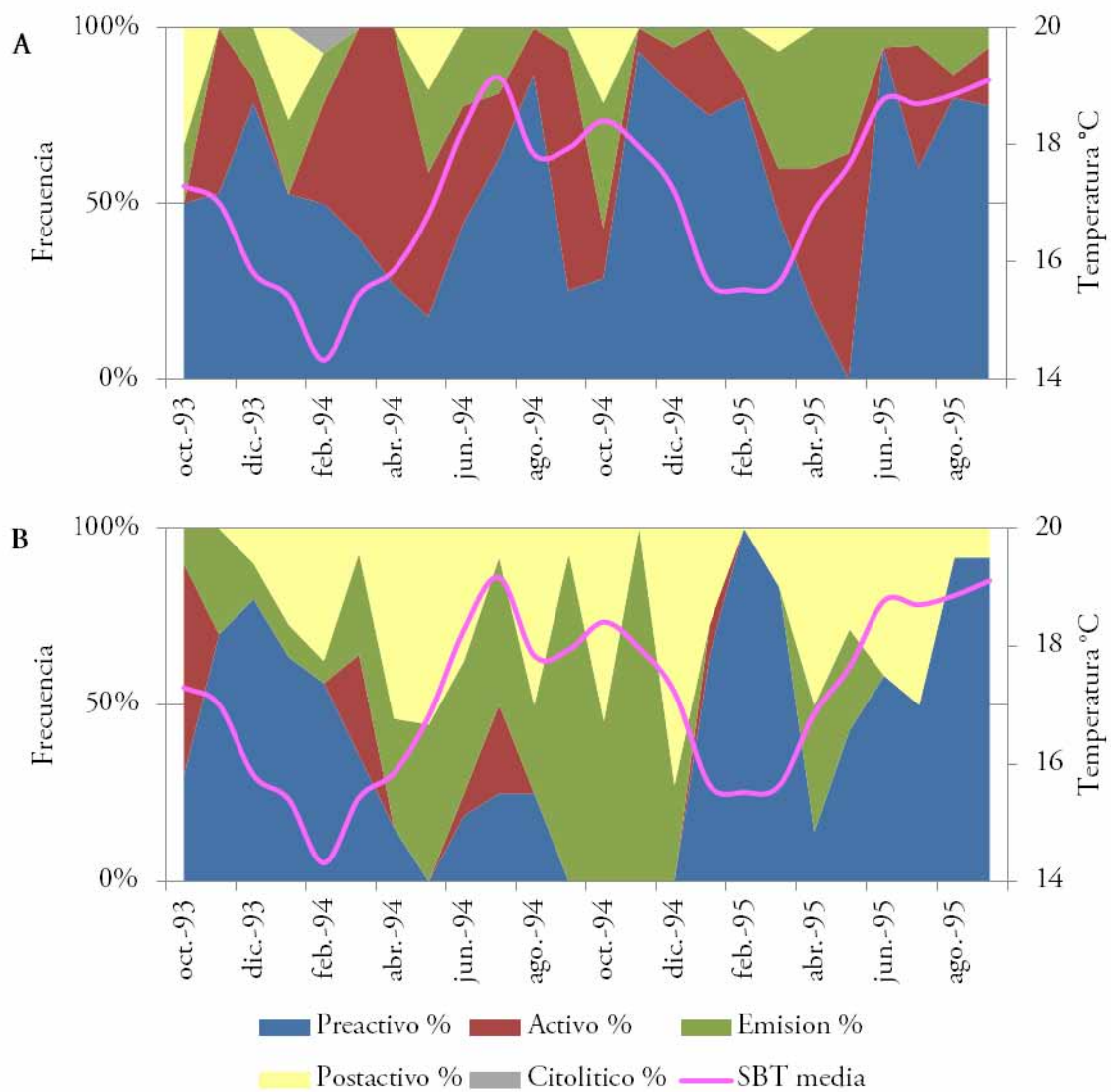


Figura 5.5. Frecuencia mensual de los estados de desarrollo gonadal de hembras (A) y machos (B) en la población de *D. digitaria* a lo largo del periodo de estudio. SBT, temperatura del agua en el fondo.

La proporción de los diferentes estados gonadales (Tabla 5.2) pone de manifiesto que en la población estudiada, *D. digitaria* sufre una maduración de la gónada muy rápida, de manera que la mayor parte de los ejemplares están en el estado de preactivo, pasando al estado de activo y emisión en poco tiempo, llenando la gónada y siendo expulsados al medio rápidamente. Esto hace que la proporción de ejemplares en estas dos fases de maduración sea baja, ya que no superan el 19 %. Los porcentajes de postactivos son también bajos, algo menos del 15 % de la población, ya que en los folículos de la gónada los gametos maduros no emitidos son reabsorbidos y los folículos se reorganizan en un estado preactivo en un corto periodo de tiempo, lo que hace que el periodo postactivo sea ciertamente corto, y el estado “latente” de la gónada sea el estado preactivo.

Tamaño de los ovocitos

De forma complementaria se caracterizaron los diferentes estados de desarrollo gonadal de las hembras mediante el valor medio del perímetro de sus gametos (Figura 5.6). El tamaño de los huevos de la población de *D. digitaria* estudiada oscila entre los 4 μm (oogonias) y los 690 μm (huevos maduros) de perímetro, apreciándose un incremento en el mismo a medida que la gónada va madurando. Se han observado valores medios menores de 300 μm para los ejemplares en etapas tempranas de desarrollo gonadal (postactivo 288 μm ; preactivo 225 μm), mientras que para etapas de mayor maduración los valores medios superan los 400 μm (activo 433 μm ; emisión 407 μm). El análisis de la varianza muestra la existencia de diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los perímetros de los cuatro estados de desarrollo gonadal (excluido el citolítico), y el análisis realizado post – hoc de Bonferroni mostró la existencia de diferencias significativas entre todos los grupos ($p < 0,0125$), siendo la más acentuada la existente entre las gónadas en estado activo y las preactivas.

Así podemos establecer un gradiente de tamaño del ovocito según su perímetro entre 200 y 500 μm , que haga referencia al estado de maduración del ejemplar. De esta manera, se podría establecer el estado de maduración general (gonadal) para un momento determinado, sin necesidad de hacer estudio histológico de la gónada.



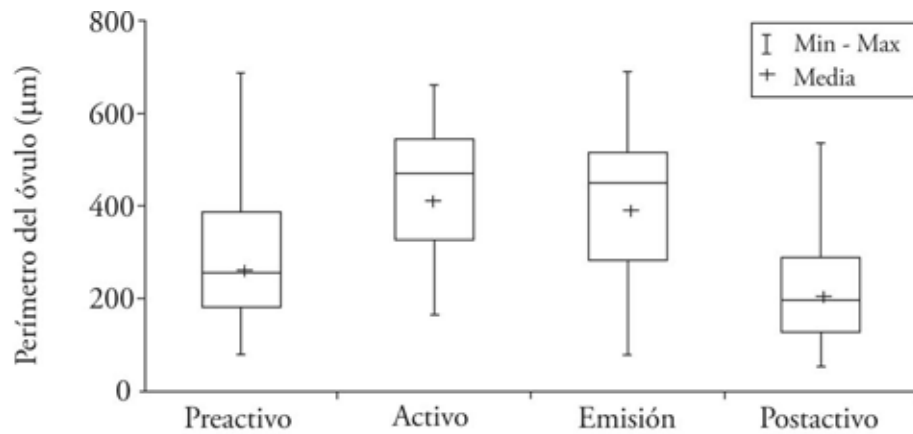


Figura 5.6. Perímetro medio de los óvulos para cada uno de los estados gonadales identificados en los ejemplares hembra de *D. digitaria*.

Talla de primera madurez sexual

La talla de madurez sexual para la población de *D. digitaria* determinada mediante el modelo de regresión logística para una probabilidad de $p = 0,5$ (50 % de la población con gónada madura) fue de 2,83 mm de longitud (Figura 5.7). No obstante, la talla mínima de madurez encontrada en los machos la presentó un ejemplar postactivo de 2,2 mm de longitud, y en las hembras un ejemplar en emisión de 2,1 mm de longitud.

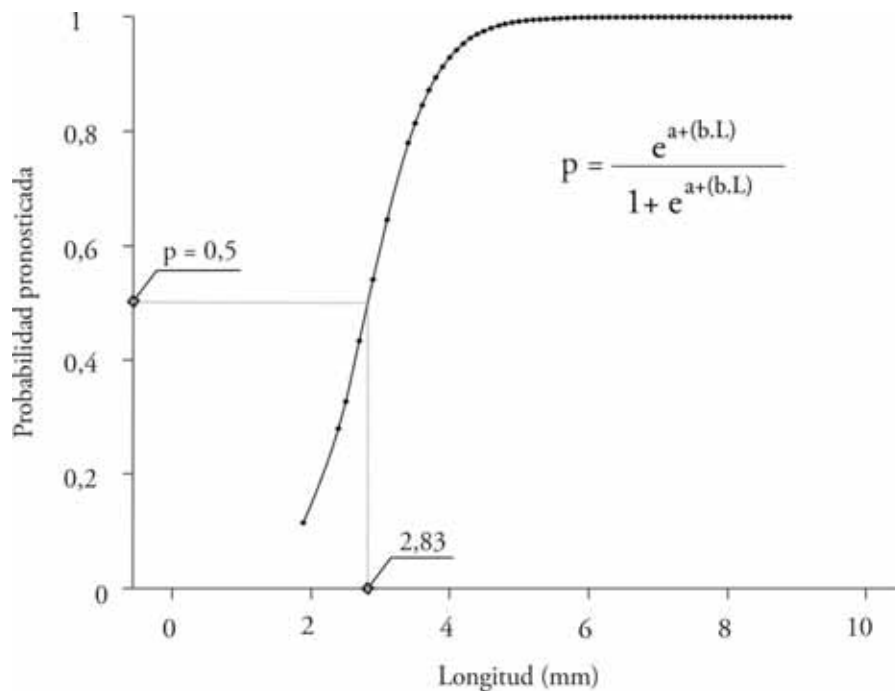


Figura 5.7. Talla de primera madurez de *D. digitaria* en la población estudiada. Se incluye la ecuación del modelo logístico donde $a = -6,198$ y $b = 2,193$.

Análisis de la condición: Cambios en la biomasa

La longitud y el peso seco medio de los ejemplares siguieron una dinámica temporal similar (Figura 5.8), experimentando un incremento desde su mínimo en el mes de enero ($L = 5,35$ mm; $PS = 1,5 \cdot 10^{-3}$ g) hasta alcanzar el máximo en abril ($L = 6,52$ mm; $PS = 3,9 \cdot 10^{-3}$ g). Desde mayo a septiembre se observó una disminución para ambas variables, con un incremento puntual en el mes de agosto. A partir de septiembre se observa una nueva tendencia aumentando los valores de ambos factores, alcanzando otro máximo de longitud en el mes de noviembre ($L = 6,56$ mm). Tanto la longitud como el peso seco mostraron una desviación estándar considerable, que responde al amplio rango de tallas encontrados en las muestras de cada mes, así como a los diferentes estados de desarrollo gonadal de cada individuo para el caso de PS.

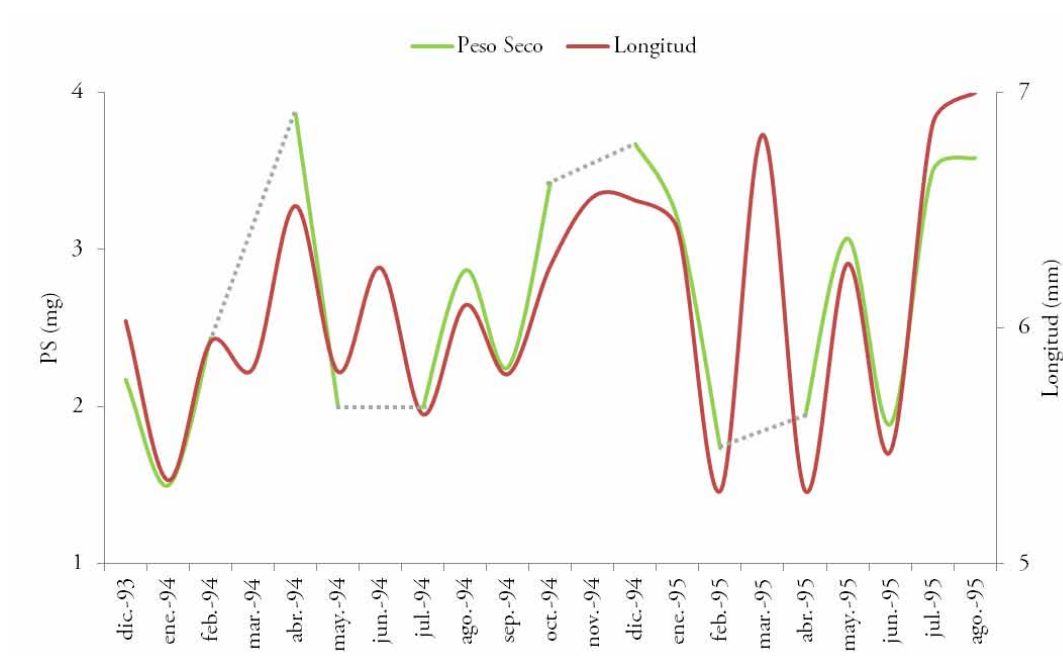


Figura 5.8. Longitud y peso seco (PS) mensual de los ejemplares de *D. digitaria* de la población estudiada.

A grandes rasgos, se puede observar que el aumento progresivo de las temperaturas desde el mes de marzo se corresponde con una caída del valor del IC, lo que implica una disminución del peso de las partes blandas de *D. digitaria*, que suele estar relacionado principalmente con disminución en el peso de las gónadas. Aproximadamente en el mes de septiembre la temperatura comienza a descender, reflejándose un incremento del valor del IC de la



población, que comienza a ganar peso, debido principalmente a la producción de nuevo material gametogénico (Figura 5.9).

El mayor incremento (δ) de PS se registró entre junio y julio de 1995 ($\delta 1,6 \cdot 10^{-3}$ g), seguido de septiembre y de octubre de 1994 ($\delta 1,18 \cdot 10^{-3}$ g). A la vista de los resultados de longitud entre febrero y marzo de 1995, probablemente el incremento sufrido por el PS hubiera sido máximo en ese periodo, pero la ausencia de datos no permite comprobarlo. La evolución del IC presentó valores máximos en primavera (abril IC = $1,32 \cdot 10^{-2}$) y otoño (octubre IC = $1,29 \cdot 10^{-2}$), presentando valores más bajos en los meses de verano e invierno (Figura 5.9). Si representamos las líneas de tendencia polinómicas del IC y de la temperatura en el fondo (SBT) se puede observar que existe una relación inversamente proporcional (Figura 5.10).

Índice gonádico medio (IGM)

El aumento del IGM se asocia al proceso de maduración de la gónada, la formación de gametos que van llenando los folículos, mientras que un descenso del IGM indica la emisión de gametos, provocando un vaciado total o parcial de la gónada.

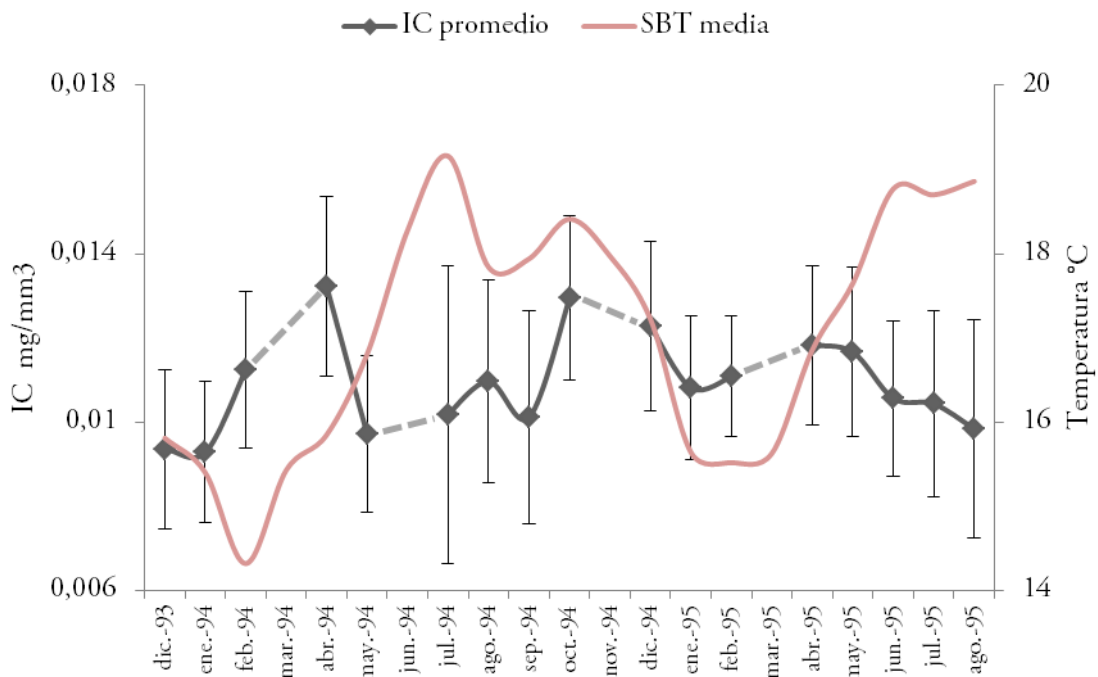


Figura 5.9. Índice de condición (IC) medio mensual de la población de *D. digitaria* durante el periodo de estudio.



En la Figura 5.11 se muestra que los valores más altos para el IGM en las hembras se dan en primavera y otoño, alcanzando los máximos en Mayo de 1995 (IGM = 3,64), seguido de abril de 1994 (IGM = 3,47) y septiembre de 1994 ((IGM = 3,44). En los machos observamos un comportamiento del IGM con fuertes oscilaciones a lo largo del periodo de estudio, que no se adaptan a un patrón estacional como ocurre con las hembras. En machos vemos valores elevados durante todo el año, excepto en invierno.

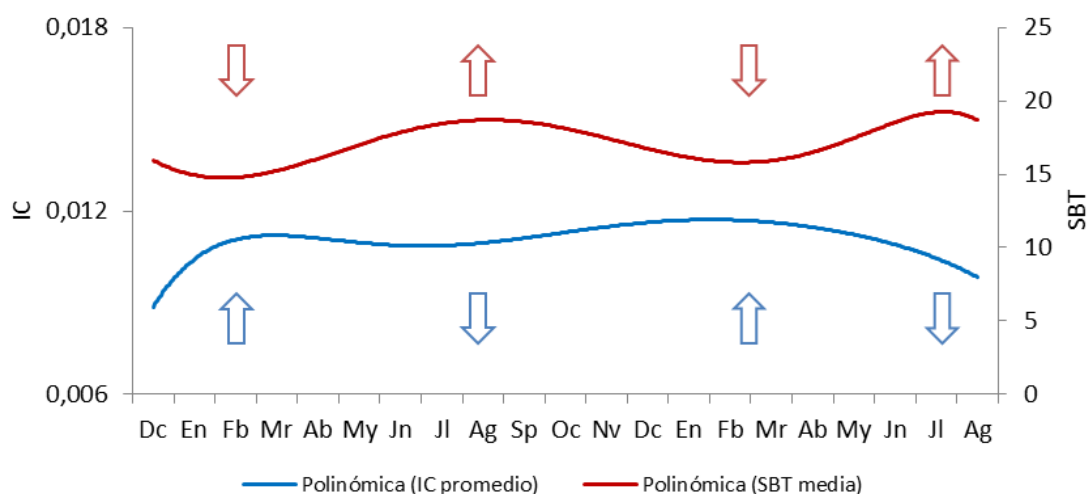


Figura 5.10. Líneas de tendencia polinómicas del IC (azul) y de la temperatura en el fondo en °C (roja). Las flechas indican las zonas donde se dan tendencias al alza o a la baja.

El valor máximo se registró en octubre de 1993 (IGM = 3,30), seguido de noviembre de 1994 (IGM = 3,00). Los valores de IGM para las hembras fueron por regla general superiores al de los machos. En la mayor parte de los casos el inicio del periodo de puesta, relacionado con una disminución del valor del IGM, coinciden con temperaturas elevadas, siempre por encima de 15°C, y de manera opuesta, en los periodos de temperaturas más bajas se aprecian unos valores del IGM en ascenso (Figura 5.11).

En el caso de los machos se observa una tendencia similar en el IC y el IGM, identificándose en ambos una tendencia del ejemplar a aumentar su biomasa en las épocas frías y a disminuirla en épocas cálidas. Aunque en ninguno de los sexos existe una correlación significativa del IGM con la temperatura en el fondo, ni para los machos (Pearson $r = 0,126$) ni para las hembras (Pearson $r = -0,071$).

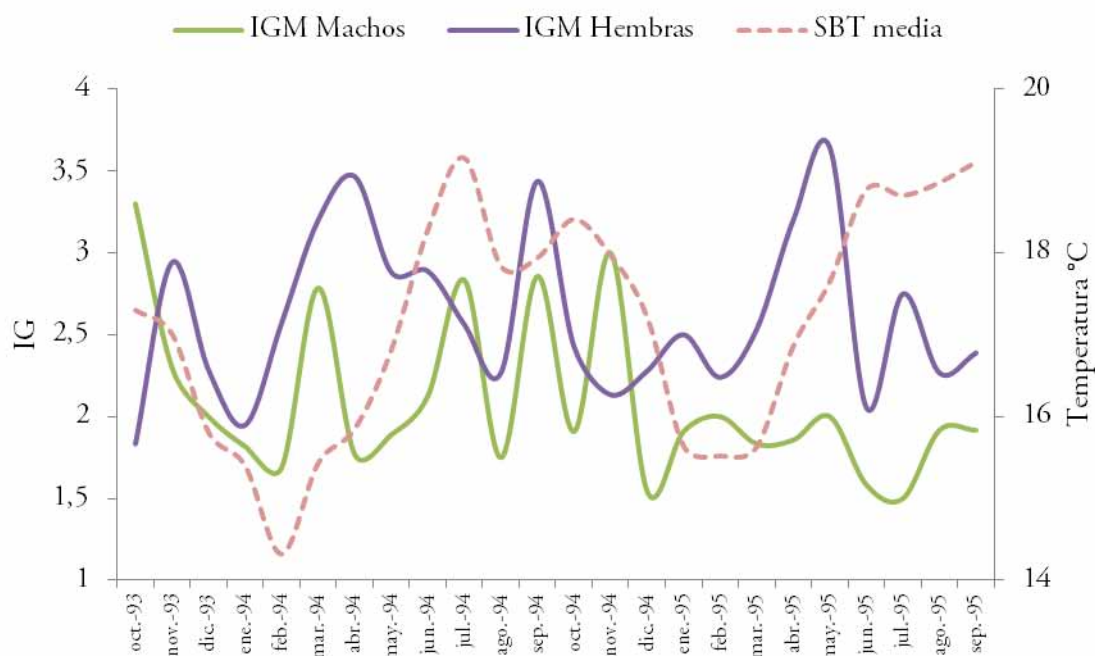


Figura 5.11. Índice gonádico medio (IGM) de machos y hembras de *D. digitaria* en la población de estudio y temperatura media del agua del fondo.

Estrategia reproductiva: Fertilización

En los machos de *D. digitaria* aparecen dos gonoporos situados a ambos lados de la masa visceral delante del músculo aductor posterior (MAP) y bajo los riñones, dando salida a los espermatozoides desde la gónada al espacio interbranquial justo por debajo del MAP, cerca de la abertura exhalante conformada por el borde del manto (Figura 5.12). Secreciones mucosas en la parte central de los folículos espermáticos favorece la cohesión del esperma evitando la dispersión del mismo al salir al exterior. En las hembras, los gonoporos también tienen salida delante del MAP, pero en este caso el eje dorsal posterior de las branquias conforma un canal de desove que recibe a los óvulos y los conduce por debajo del MAP para liberarlos uno a uno en la zona de la abertura exhalante (Figura 5.13). La tinción con hematoxilina – VOF puso de manifiesto la presencia de secreciones mucosas entorno a los óvulos emitidos, aunque no se observaron grandes masas mucosas en las que los óvulos estuvieran embebidos.

En diferentes cortes histológicos de hembras de *D. digitaria* se observó la presencia de espermatozoides almacenados en las branquias, y secciones transversales de algunos de los

ejemplares mostraron en la parte dorsal posterior de la branquia estructuras a modo de cámaras donde podrían almacenarse los espermatozoides (Figura 5.14 A, B).

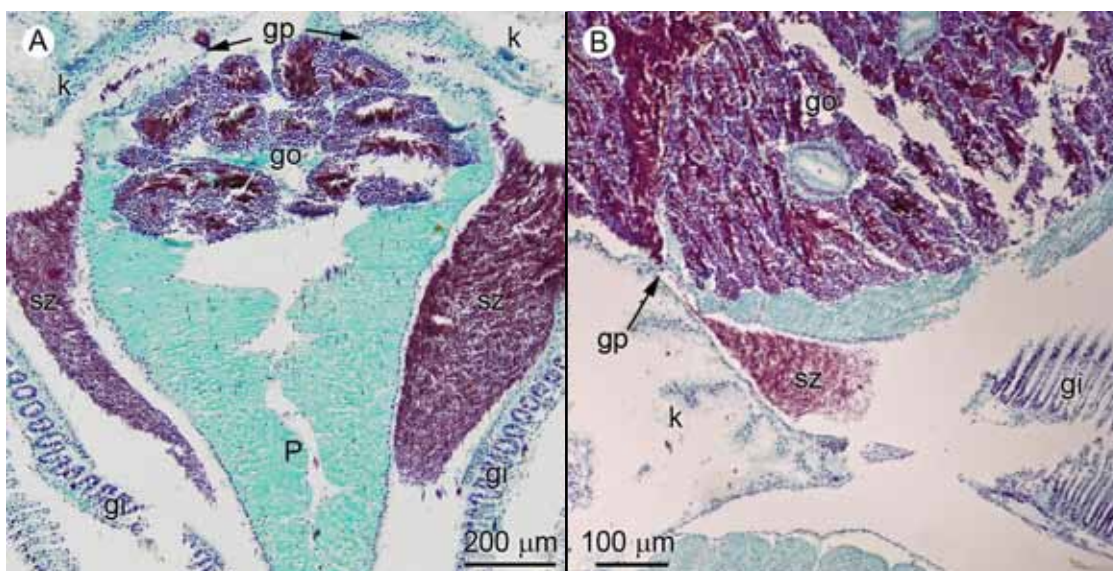


Figura 5.12. Emisión de espermatozoides por los gonoporos de un ejemplar macho de *D. digitaria*. A, corte transversal donde se aprecian los dos gonoporos situados bajo los riñones. B, detalle de la salida de los gametos por uno de los gonoporos al espacio interbranquial. Abreviaturas: gi, branquias; go, gónada; gp, gonoporo; k, riñón; P, pie; sz, espermatozoides.

También se identificó una posible abertura por la que los espermatozoides podrían pasar desde esta cámara al canal formado por las branquias que conduce los óvulos hasta la zona de la abertura exhalante (Figura 5.14 C, D). En este caso se produciría una fecundación interna, en la cavidad paleal, a lo largo del canal branquial. En cortes histológicos de una gónada femenina en estado preactivo, se detectaron óvulos inmaduros rodeados por espermatozoides (Figura 5.15 A – C), y ausentes en el resto de la sección, de manera que se descartó una hipotética contaminación. De forma paralela, en otra hembra, estudiada mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM), también en estado preactivo, se detectó igualmente la presencia de espermatozoides dentro de sus folículos, pudiéndose ver claramente el núcleo de las cabezas cortados transversalmente, similares a los observados dentro de la gónada masculina (Figura 5.15 D– F). Estas observaciones indican que la fecundación puede producirse también dentro de la propia gónada femenina, aunque no es probable que sea el patrón habitual, que seguramente se lleve a cabo a lo largo del canal branquial, donde los espermatozoides pueden llegar más fácilmente a los óvulos, debido a la cercanía del gonoporo a las branquias.

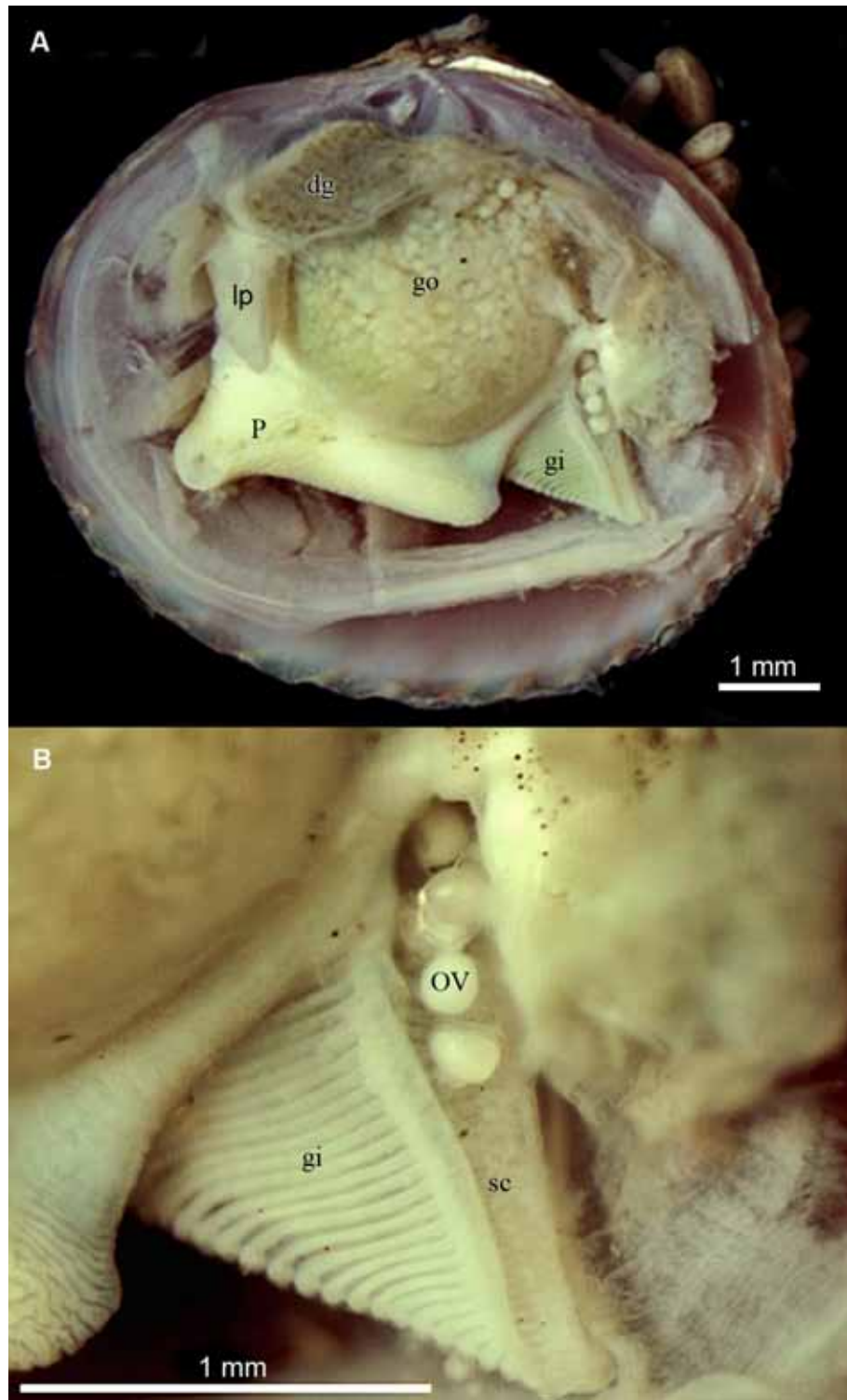


Figura 5.13. Figura. A, Visión general de una hembra con la gónada en estado de emisión en el momento de la liberación de los óvulos. La valva y la branquia izquierda han sido retiradas. B, Detalle del canal de desove por el que se ven discurriendo los óvulos en fila al salir de la gónada por el gonoporo. Abreviaturas: go, gónada; P, pie; gi, branquia; dg, glándula digestiva; sc, canal de desove; OV, óvulos.

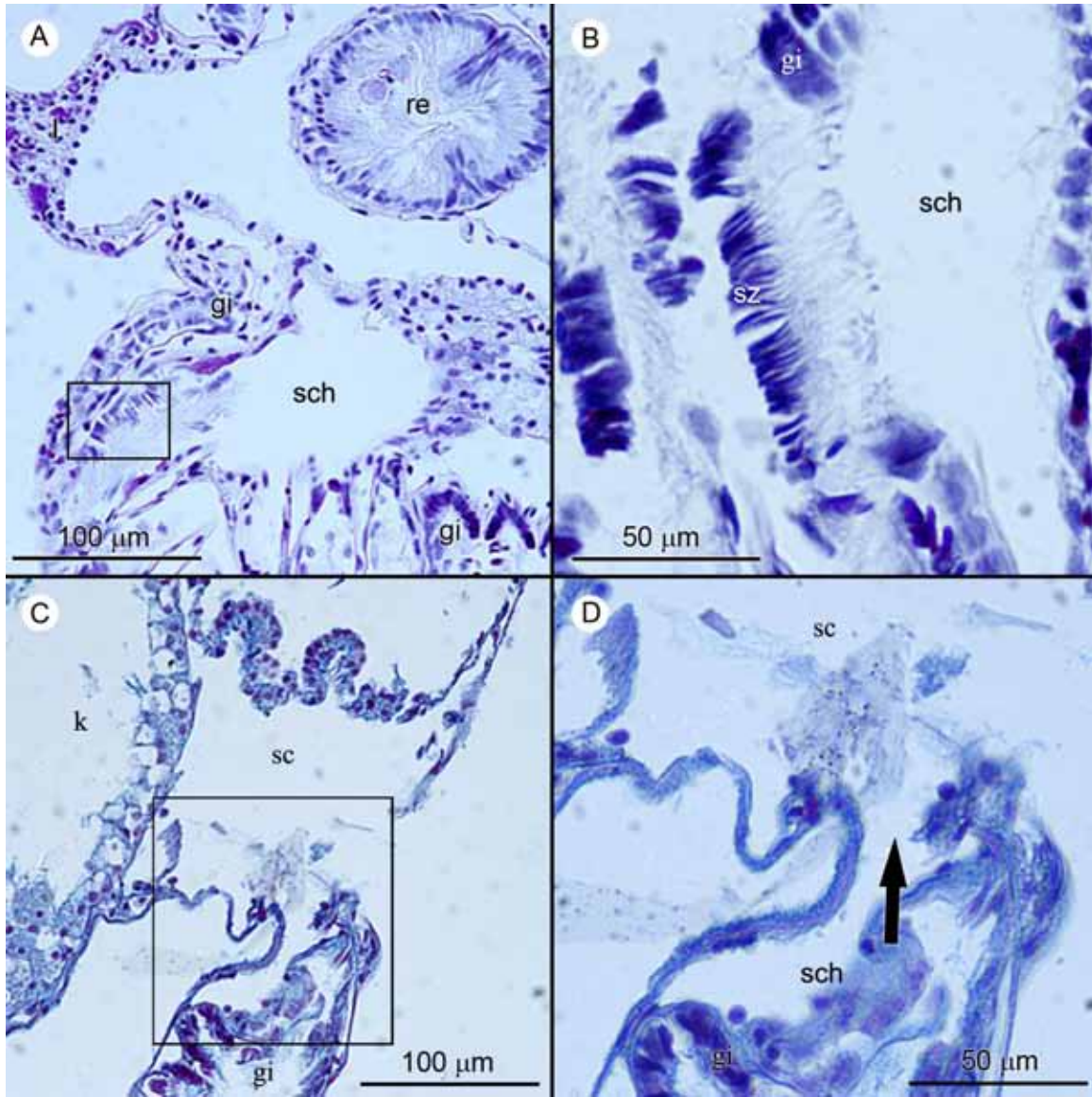


Figura 5.14. A, sección transversal de la zona dorsal posterior de una hembra de *D. digitaria* mostrando un espacio entre las branquias a modo de cámara suprabranquial en la que parecen almacenarse algunos espermatozoides. B, recuadro de A, detalle de los espermatozoides alineados en la branquia. C, corte histológico transversal del canal de desove a través del cual los óvulos son liberados. D, detalle de la abertura entre el canal de desove y las branquias (flecha), que parece mostrar el camino seguido por los espermatozoides para la fecundación de los óvulos. Abreviaturas: gi, branquias; k, riñón; re, recto; sc, canal de desove; sch, cámara suprabranquial; sz, espermatozoides.

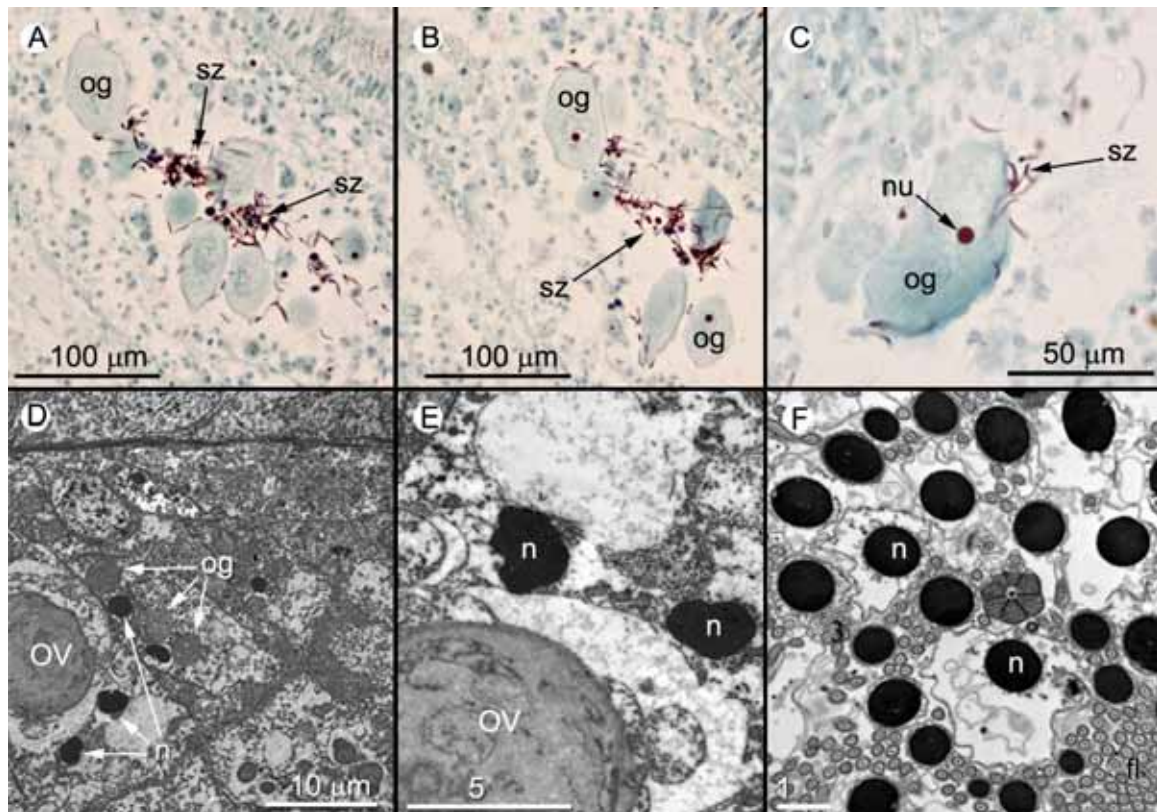


Figura 5.15. Espermatozoides dentro de los folículos de la gónada femenina de *D. digitaria*. A – C, espermatozoides agrupados en torno a algunos ovocitos dentro de la gónada femenina de *Digitaria digitaria*. Cortes histológicos teñidos con hematoxilina de Carazzi – tricómico de VOF. D y E, imágenes de TEM de una gónada femenina en la que se aprecian los núcleos de espermatozoides alrededor de los ovocitos. F, imagen de TEM de un folículo de una gónada masculina donde se observan secciones transversales del núcleo y los flagelos de los espermatozoides. Abreviaturas: n, núcleo de espermatozoide; nu, nucléolo; og, ovogonia; OV, óvulo; sz, espermatozoides.

Crecimiento

Estructura de la población

La longitud antero – posterior de la concha de los ejemplares estudiados de *D. digitaria* (N = 3.855), varía en un rango comprendido entre los 1,5 y los 9 mm, siendo la talla media de 6,13 mm. Los tres ejemplares de menor talla (1,5 mm) se encontraron en los meses de febrero y agosto de 1994 y mayo de 1995, mientras que los dos ejemplares de mayor talla observada (9 mm) aparecieron en abril y mayo de 1995. La clase de talla que presenta una frecuencia mayor es la de 6,5 mm.

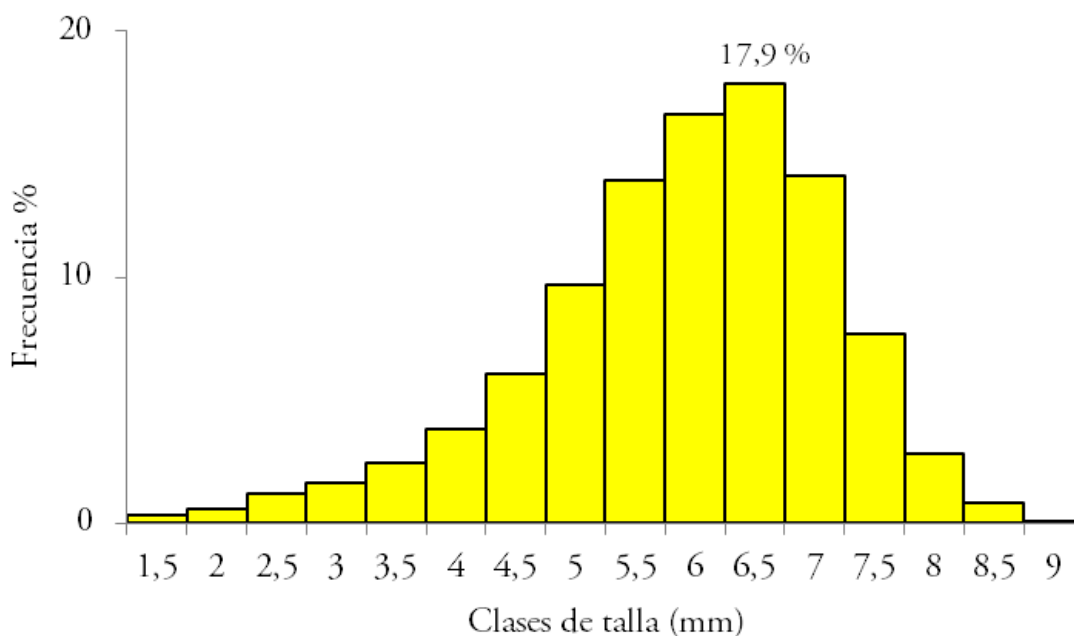


Figura 5.16. Distribución de frecuencia de clases de talla de la población de *D. digitaria* estudiada.

La distribución de las frecuencias de talla mensual se muestra en la Figura 5.17, donde se observa que la mayor parte de los ejemplares jóvenes (< de 4mm) aparecen en los meses de primavera (mayo y junio). En el cálculo del porcentaje de reclutamiento mensual se puso de manifiesto que el 62,8 % del reclutamiento en esta especie se produce entre junio y octubre, con un valor máximo en julio (18,08 %), seguido de septiembre (17,95 %), siendo el más bajo en abril (3,50 %), lo que indica un periodo de reclutamiento asociado a los meses estivales, donde las temperaturas del agua oscilan entre los 18 – 19° C (Figura 5.18).

La distribución de frecuencia de tallas mensuales fue polimodal, lo que sugiere la presencia de varias clases de edad, e incluso de sucesivas cohortes que pertenecen a la misma clase de edad. En este sentido, la aplicación del método de Bhattacharya permitió identificar tres clases de edad o cohortes ($SI > 2$; $p < 0,05$) en la distribución de la frecuencia de tallas obtenida en diciembre de 1994 (mes con mayor número de individuos muestreados, $N = 411$). La primera cohorte fue de 3,14 mm de longitud modal (4,60 meses de edad; 8,27 % del total de individuos), la segunda de 5,20 mm (9,96 meses de edad; 33,82 % del total de individuos) y la tercera de 6,82 mm (17 meses de edad; 57,91 % del total de individuos) (Figura 5.19).

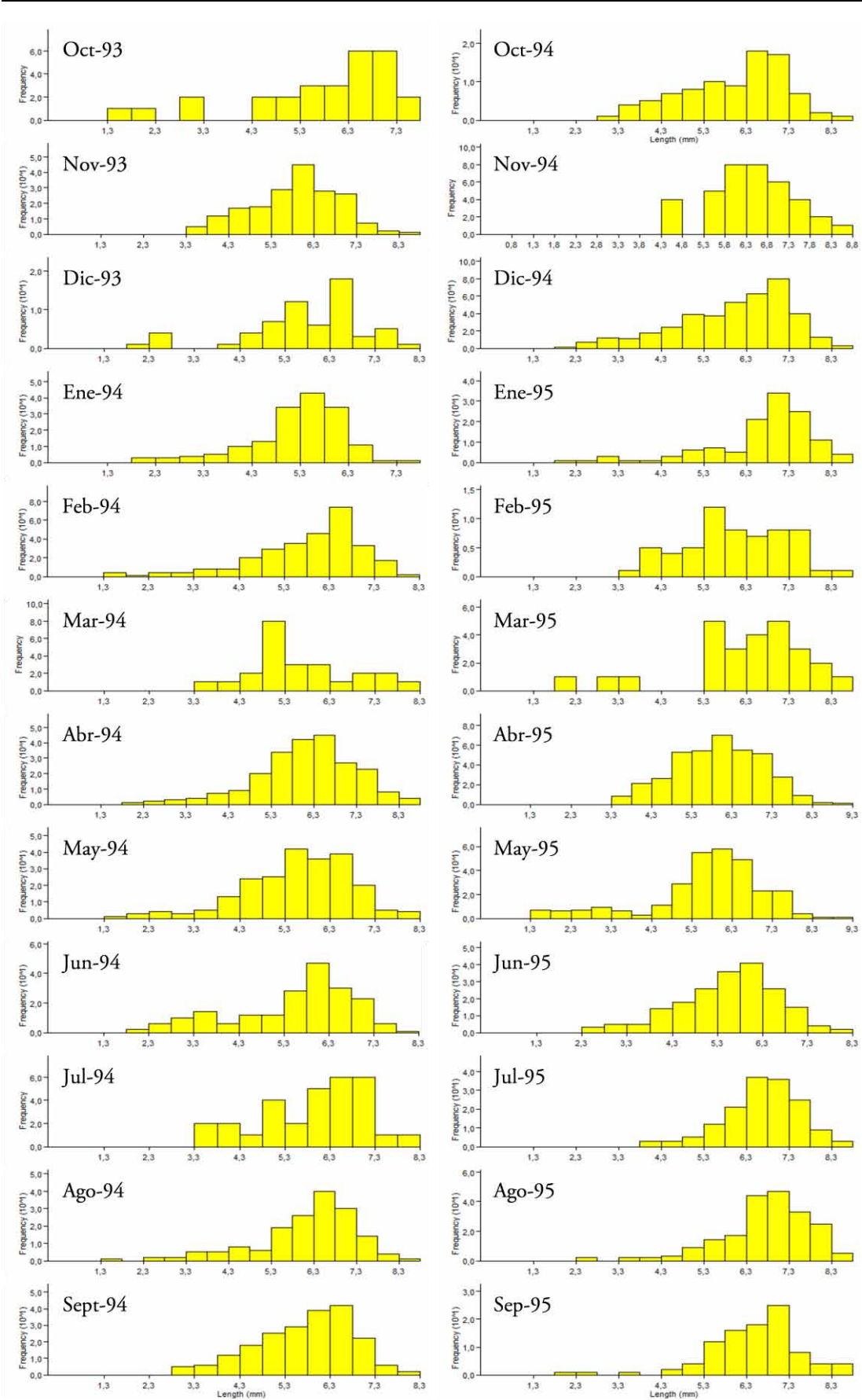


Figura 5.17. Distribución de la frecuencia de tallas de la población de *D. digitaria* a lo largo del periodo de estudio. (Leer de arriba abajo y de izquierda a derecha oct93 a sep95)

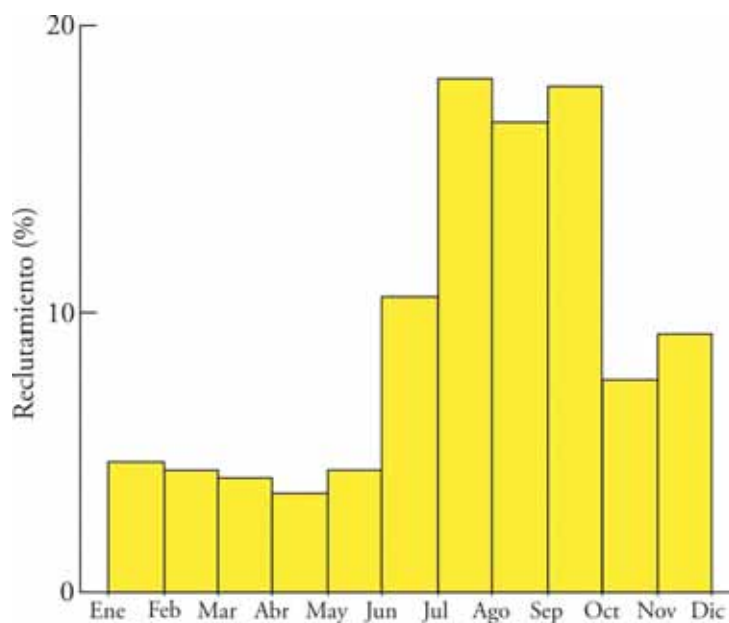


Figura 5.18. Estimación del porcentaje de reclutamiento mensual para la población de *D. digitaria* estudiada.

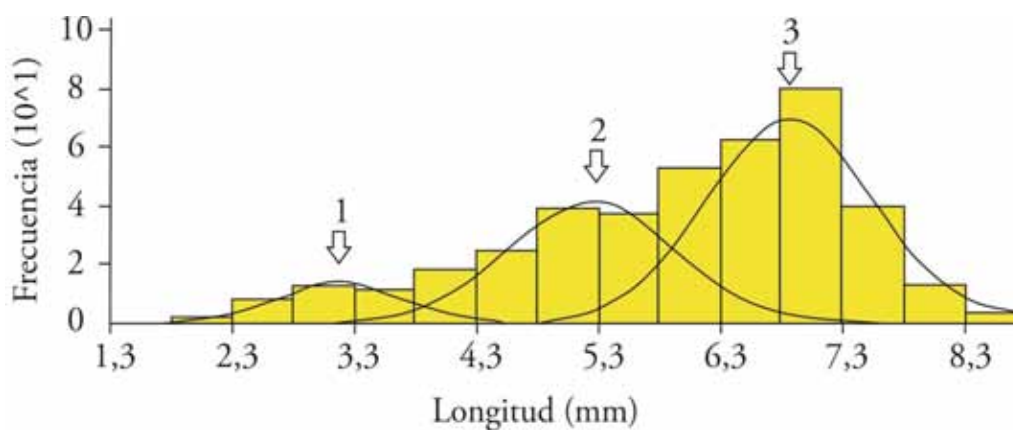


Figura 5.19. La distribución de frecuencia de tallas obtenida fue dividida en cohortes (flechas), asumiendo que representan clases de edad separadas ($SI > 2$), usando la aplicación disponible en el programa The Fish-Stock Assessment Tool (FISAT II) (Gayanilo, Sparre & Pauly 2002).

Tasa de crecimiento

Los parámetros de crecimiento *longitud máxima estimada* (L_{∞}), el *coeficiente de crecimiento* (K) y la *edad teórica inicial* en la que la longitud es cero (t_0) necesarios en la ecuación de von Bertalanffy (VBGE), se estimaron mediante tres métodos diferentes (Tabla 5.3).



Tabla 5.3. Valores obtenidos para los parámetros L_{∞} , T_0 y K mediante diferentes métodos disponibles en el paquete de programas FiSAT II.

Método	Aplicación	L_{∞}	T_0	K
Elefan I	K-scan	9,45	–	0,7
	Reponse surface	7	–	1,51
Shepherd	K-scan	9,45	–	0,83
	Reponse surface	11	–	0,51
Analysis Length at Age	con t_0	8,8	-0,05	1,03
	sin t_0	8,05	0	1,28

Se observó una oscilación de los valores de L_{∞} y K según el método utilizado. Esta variación se produce dentro de un rango relativamente estrecho, y puede deberse a la subjetividad en la elección de ciertos parámetros que sirven para realizar los cálculos, como la t_0 , así como al propio método de cálculo. Los valores para L_{∞} variaron entre 7 y 11 y para K entre 0,7 y 1,51. En la *Estimación de Máxima Longitud* (FiSAT II) se obtuvo que la talla máxima alcanzable por esta especie es de 9,25 mm ($p = 0,05$), donde el *Rango de Tamaño Máximo*, con un intervalo de confianza del 95%, está en 8,93 – 9,56 mm. Del abanico de resultados se desestimaron los obtenidos por el método de Sheperd, al no ser capaz de hacer frente a las oscilaciones estacionales de crecimiento (Sheperd 1987). Finalmente se eligieron los valores obtenidos mediante la aplicación K-scan del método Elefan I para resolver la VBGE, ya que presentó un valor de L_{∞} (9,45 mm) más acorde a la $L_{\text{máxima}}$ obtenida empíricamente (9 mm) y a que es una rutina utilizada en la identificación de las curvas de crecimiento con oscilaciones estacionales que mejor se ajustan a un conjunto de datos de frecuencia dado.

La representación de la curva de VBGE se muestra en la Figura 5.20, donde los ejemplares de *D. digitaria* alcanzan la talla media (6,13 mm) a los 18 meses de edad aproximadamente, y el rango de talla más frecuente (6,50 mm) lo hace a los 20 meses. A los doce meses se observó una desaceleración del crecimiento, cuando los ejemplares alcanzan una talla estimada de 4,76 mm. Los ejemplares de *D. digitaria* muestran un crecimiento prácticamente lineal hasta

aproximadamente los 2,4 mm de longitud (5 meses de edad), a partir de la cual el ritmo de crecimiento comienza a disminuir. La tasa de crecimiento de una especie puede diferir entre sus poblaciones, debido a factores ambientales como la temperatura, disponibilidad de alimento, etc. Por ello se calculó el Índice de Rendimiento del Crecimiento o crecimiento estándar ($\phi' = \log K + 2 \log L_{\infty}$). El valor del crecimiento estándar obtenido en el presente estudio para *D. digitaria* fue de $\phi' = 1,796$.

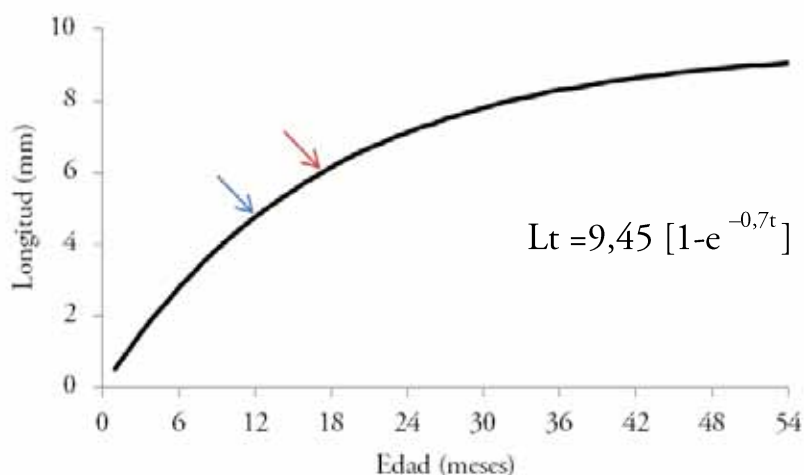


Figura 5.20. Curva de crecimiento estimado de von Bertalanffy obtenida a partir del análisis de la frecuencia de clases de talla. La flecha azul indica el punto en el que se produce una desaceleración notable del crecimiento, y la flecha roja el punto correspondiente a un ejemplar con la longitud media de la población.

De los seis ejemplares en los que se estudiaron las bandas de crecimiento en lámina delgada, tres de ellos presentaron marcas de crecimiento a lo largo de toda la superficie de corte lo suficientemente claras para ser identificadas como paradas de crecimiento, y no debidas a perturbaciones ambientales puntuales. A partir de las lecturas de las bandas de crecimiento se calcularon los coeficientes de crecimiento K en base a dos supuestos, el de una sola parada anual invernal y el de dos paradas anuales coincidentes con los dos periodos de puesta principales, en primavera y otoño (Tabla 5.4).

Tabla 5.4. Valores de los coeficientes de crecimiento K calculados en tres ejemplares para los dos supuestos, de una y dos paradas anuales. Lt, longitud del ejemplar a la edad t; t₁, edad en años en el supuesto de una sola parada anual; t₂, edad en años en el supuesto de dos paradas anuales.

Ejemplar	Nº Bandas de crecimiento	Lt	t ₁	K ₁	t ₂	K ₂
8	2	2,21	1,5	0,19	1	0,28
548	8	4,98	7,5	0,11	4	0,2
3	11	4,91	10,5	0,08	5,5	0,14

El resultado del Índice de Rendimiento del Crecimiento calculado en función del valor medio obtenido para K₂ (0,174) a partir de los ejemplares 548 y 3 a los cuatro años de edad, y para una L_∞ = 9, fue de Ø' = 1,149.

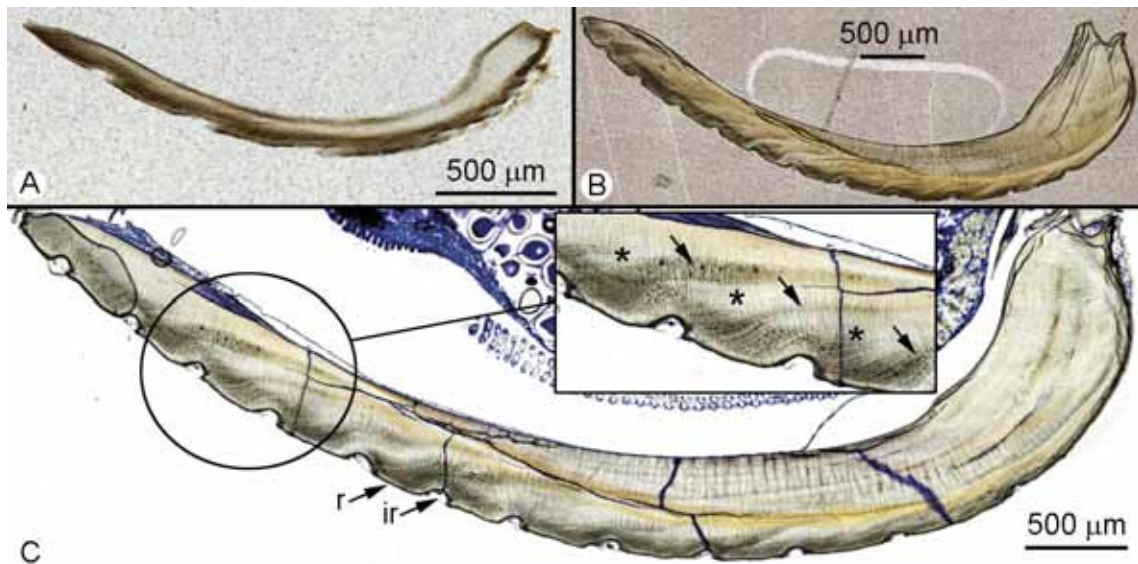


Figura 5.20. Cortes en lámina delgada de la concha de los tres ejemplares de *D. digitaria* analizados, donde se aprecian las paradas de crecimiento. A, ejemplar 8; B, ejemplar 3; C, ejemplar 548 en metacrilato. En el recuadro de C, las flechas señalan tres bandas que indican paradas de crecimiento, mientras que los asteriscos (*) marcan zonas claras de crecimiento rápido. Abreviaturas: ir, zona intercostal; r, costilla.

Mortalidad y longevidad

Con objeto de aumentar la información que permita conocer la biología de *D. digitaria*, se estimó la longevidad (Pauly, 1980), obteniendo un valor de $t_{max} = 4,3$ años según los valores de K obtenidos en el análisis de frecuencia de tallas, pero que aumentaría hasta los 17,2 años

si tenemos en cuenta el valor de K obtenido en el análisis de las bandas de crecimiento en lámina delgada.

La tasa de mortalidad natural (M) obtenida con método de Chapman-Robson (1960), para una edad promedio de la población de 1,5 años y un tamaño de muestra de 3.855 ejemplares, se estimó en 0,51. Considerando el método de análisis de las bandas de crecimiento obtendríamos una estimación de la mortalidad de 0,14.

DISCUSIÓN

Reproducción

D. digitaria es una especie dioica, que es el patrón habitual en los astártidos (Mikkelsen & Bieler 2008) y de la mayoría de los bivalvos (Sastry 1979, Gosling 2003). Este patrón se considera ancestral en el filo Moluscos en general y en la clase Bivalvos en particular, apareciendo en el clado basal de los protobranquios (Collin 2013). Siendo los astártidos también un clado basal de los bivalvos heterodontos, ser dioicos sería su patrón natural. En la población estudiada de *D. digitaria* se considera que la relación de sexos no es 1:1, ya que aparece una diferencia significativa a favor de las hembras. Este hecho puede estar relacionado con el pequeño tamaño de los ejemplares, lo que limita la capacidad de producir y almacenar óvulos, que es el factor limitante a la hora de los reclutamientos. Al ser de pequeño tamaño, *D. digitaria* podría presentar un patrón de hermafroditismo consecutivo (Sastry 1979; Sellmer 1967), en el cual las tallas más pequeñas son machos y las más grandes – con más capacidad de formar óvulos – hembras; sin embargo, en la población analizada, encontramos machos y hembras a partir de 2 mm de longitud. La ausencia de ejemplares hermafroditas, la presencia de ambos sexos en todas las clases de tallas, junto con la presencia de gametos residuales o en estado preactivo en la mayoría de ellos, nos permite confirmar que no existen cambios de sexo en la población estudiada de *D. digitaria*.

Si bien no es posible identificar el sexo por las características morfológicas de la concha, se ha detectado un dimorfismo sexual en la población analizada de *D. digitaria*. A pesar de tener un tamaño medio muy similar, los machos son algo más grandes, en longitud y sobre todo en altura ($p < 0,05$) (Tabla 3.3). La existencia de dimorfismo sexual en astártidos actuales (*Astarte*

borealis, *Astarte sulcata*, *Astarte elliptica*) (Saleuddin 1964; Ockelmann 1965) y en especies fósiles americanas (Heaslip 1968, 1969; Kauffman & Buddenhadce 1969; Kelley 1980.) es conocido, pero en todas ellas son las hembras las que presentan mayor tamaño. La mayor talla de los machos de *Digitaria* puede estar en relación con el hecho de que son ellos los que realizan el mayor “esfuerzo de producción”, ya que emiten más veces, prácticamente se estaría liberando esperma en todos los meses muestreados (Fig. 5.5B), al vivir en un ambiente inestable con corrientes en el fondo, donde las probabilidades de penetrar en la cavidad paleal de una hembra pueden estar reducidas. En cambio, los óvulos son fertilizados en la cavidad paleal, y las hembras no los emiten probablemente hasta que algunos espermatozoides al penetrar en la gónada, informan de la presencia de un reservorio en las branquias, con lo cual el riesgo de que sus óvulos no sean fertilizados es mínimo o nulo.

En algunos grupos de invertebrados marinos el tamaño de los óvulos decrece con la edad (Qian & Chia 1992). Cuando hay sucesivas puestas dentro de un mismo ciclo reproductor, el número de óvulos puede disminuir en puestas sucesivas con relación a la primera puesta (*Donax trunculus*: Tirado & Salas 1998) así como el tamaño de los huevos (*Haloa japónica*: Ito 1992; *Aldaria próxima*: Jones *et al.* 1996). Aunque hay diferencias significativas entre los tamaños de huevos según el estado gonadal, en el caso de las hembras de *D. digitaria*, no existe correlación entre talla del progenitor y tamaño de óvulo en hembras activas. Los óvulos de hembras activas no son homogéneos en tamaño, pero la variabilidad no está relacionada con el tamaño de la hembra, ya que hembras de tallas similares presentan tamaños promedios de óvulos diferentes. Es posible que dichas diferencias estén relacionadas con el número de puesta, es decir que aquellas hembras que hemos capturado antes de hacer su primera emisión dentro del ciclo presenten óvulos de tamaño mayor que las que se han capturado preparándose para una segunda emisión. En nuestro caso no hemos podido analizar la fecundidad por el escaso número de hembras en estado activo. Los huevos de *D. digitaria* son relativamente grandes (> 160 μm de diámetro), lo que *a priori* supone un incremento en la inversión energética de la hembra, favoreciendo el desarrollo lecitotrófico de las larvas (Thorson 1950, Ockelmann 1965, Foighil 1989); sin embargo, al igual que en otros invertebrados, parte del aumento de tamaño de los huevos de *D. digitaria* parece ser debido a

la presencia de sucesivas capas, algunas de tipo mucoso (“gelatinosa”) (Podolsky 2001, 2004) para favorecer la fertilización cuando el esperma constituye un factor limitante (Moran & McAlister 2009), como supondría el ambiente inestable de los fondos de bioclastos en los que aparece *D. digitaria*, donde suele haber fuertes corrientes, a lo que se une la menor proporción de machos en la población.

La talla de madurez sexual de la población analizada de *D. digitaria* es de 2,82 mm, aunque se han encontrado algunos ejemplares de menor tamaño con gónadas desarrolladas. Esta talla tan reducida representa una desventaja a la hora de la producción óvulos, cuyo número estaría condicionado por el espacio disponible. Por otro lado, se ha observado que poblaciones de bacalao con tallas de primera madurez pequeñas presentan mayores tasas de mortalidad, ya que al derivar energía hacia el desarrollo de las gónadas se ralentiza el crecimiento, lo que aumenta las probabilidades de ser depredados (Swain 2010). Este principio podría aplicarse a la población de *D. digitaria* estudiada, donde este efecto podría llevar a la población a una paradójica deriva en la que cada vez fuera necesaria una madurez sexual más temprana que cubriese la elevada mortalidad, con el consecuente incremento paralelo de esta última por depredación, creándose una tendencia negativa para la población.

El ciclo reproductor de *D. digitaria* es extenso ya que abarca todo el año, no habiendo periodo de reposo en la población estudiada. La extensión del ciclo reproductor en bivalvos se incrementa a medida que disminuye la latitud y aumentan las temperaturas durante los periodos invernales (Giese 1959, Macdonald & Thompson 1988). Otro factor que se relaciona con el alargamiento de ciclos reproductores es el aporte de nutrientes (Sastry 1979). En la bahía de Barbate, las temperaturas a nivel del fondo son bastante estables a lo largo del año y por otro lado, la salida de agua mediterránea, rica en nutrientes, por el Estrecho de Gibraltar formando pequeños afloramientos en la zona (Millot 2009), favorecerían el desarrollo de gametos durante todo el año.

La presencia en los folículos de las gónadas de *D. digitaria*, tanto masculina como femenina, de gametos en diferentes estados de maduración junto a restos de gametos ya maduros sin emitir revela la existencia de más de una puesta al año por individuo. Es difícil saber cuántas puestas puede hacer un sólo individuo, en principio según lo observado en histología, al

menos dos. De hecho, la existencia de dos picos reproductores (más patente en hembras que en machos) apunta que un alto porcentaje de los individuos tienen al menos dos periodos de puesta, uno en primavera y otro en otoño, si bien hay individuos emitiendo en otras épocas. La presencia de más de un pico de puesta es común entre los bivalvos del litoral andaluz del mar de Alborán (Tirado & Salas 1998, Tirado *et al.* 2003)

La emisión de gametos en bivalvos es un proceso en el que la temperatura es habitualmente un factor muy influyente (Gosling 2003). Se ha sugerido que cada especie posee una “ventana de temperatura”, cuyos límites superior e inferior marcan su muerte, y dentro de la cual existe un rango de temperatura óptima donde se produce la gametogénesis (Lubet & Aloui 1987). Si bien es cierto que existen muchos otros factores exógenos y endógenos que influyen en determinar el momento de liberación de los gametos, lo que provoca que no en todas las especies los perfiles de temperatura del ciclo anual se ajusten exactamente a los picos de emisión de la especie. Este parece ser el caso de *D. digitaria*, en la que aunque presenta máximos de emisión en un rango de 17°C a 18°C, la liberación de gametos se produce a lo largo de todo el año. Hubiera sido deseable poseer datos de concentración de clorofila *a*, como medida de disponibilidad de alimento en el medio ya que para muchas especies, el alimento en lugar de la temperatura es el factor principal para determinar el momento de la gametogénesis y la emisión. Este es un comportamiento lógico ya que el proceso de formación de gametos es demandante de energía, dependiendo del suministro de alimentos disponibles y/o las reservas de energía almacenada (Gosling 2003).

Las evacuaciones de gametos de forma sucesiva a lo largo del ciclo anual en “pulsos” asincrónicos, seguidos de una recuperación rápida de la gónada, pueden responder a una estrategia reproductiva de supervivencia de las especies de bivalvos de pequeño tamaño, ya que de esta forma solo comprometen una parte del efectivo gonadal. En estas especies, como es el caso de *D. digitaria*, el espacio en el que albergar los gametos no es bastante para garantizar una descendencia suficiente que pueda superar las tasas de mortalidad (Calvo *et al.* 1998). Esto haría necesaria más de una puesta durante el ciclo reproductivo, para asegurar que la cantidad de gametos emitidos produzcan el número de ejemplares suficientes para que la población no desaparezca. Según Olive (1985), la descarga gamética repetitiva dentro de

un mismo periodo reproductivo está vinculado a la variabilidad de las condiciones para la supervivencia de las larvas y los juveniles. La contrapartida a esta estrategia donde se realizan pequeñas emisiones buscando los momentos con condiciones ambientales más favorables es que esta dispersión de la carga gamética a lo largo del periodo reproductivo puede hacer que la tasa de fertilidad disminuya debido a la asincronía en la emisión. En definitiva, se aumenta las probabilidades de que una parte de la puesta sea exitosa, pero se pierde la posibilidad de un éxito masivo. Esta estrategia describe el comportamiento reproductor de *D. digitaria* en la población de estudio, que a su vez se ajustaría a la teoría denominada *Bet-hedging* (Slatkin 1974), que habla sobre la manera en la que un individuo debe optimizar su adecuación a un medio variable e impredecible. La idea que subyace en una estrategia reproductora de este tipo, es que un individuo debe disminuir la varianza de su adecuación al medio entre los años para maximizar la adecuación a largo plazo.

De hecho la estrategia de *D. digitaria* podría describirse como *Bet-hedging conservativa* (Seger & Brockmann 1987, Philippi & Seger 1989), que es una de las dos formas en las que en principio, un individuo puede disminuir la varianza de su adecuación. Así el organismo utilizaría siempre la misma estrategia reproductiva de bajo riesgo, produciendo descendencia durante todo el periodo reproductivo. Esto se basa en la idea de que la selección natural favorecerá finalmente a aquellas estrategias reproductivas cuya media de éxito en el tiempo sea más alta, aunque de manera puntual su éxito sea menor (Seger & Brockman 1987, King & Masel 2007, Olofsson *et al.* 2009). Cuando no existe un proceso de selección del ejemplar que va a fertilizar los gametos femeninos, como ocurre en la reproducción de bivalvos, se deriva otra ventaja de este tipo de estrategia reproductora, ya que la emisión de gametos femeninos en diferentes puestas a lo largo del año disminuye la probabilidad de que todos los gametos sean fecundados por los espermatozoides de un macho de “baja calidad”, y aumenta la variabilidad genética entre la descendencia (Fox & Rauter 2003), incrementándose la probabilidad de adaptación a los posibles cambios ambientales y por tanto la de supervivencia de la especie. La gran variabilidad del color de las conchas en *D. digitaria* (Figura 3.5) sería un ejemplo de la variabilidad genética presente en esta especie, posiblemente favorecida por este tipo de comportamiento reproductor.

La observación en el presente estudio de la particular liberación de óvulos en *D. digitaria* a lo largo de una estructura acanalada formada por el eje dorsal de las branquias, junto a la presencia de espermatozoides dentro de la gónada femenina así como de las branquias, confirmaría la fertilización interna de los óvulos y su emisión en forma de cordones, que podrían adherirse al sustrato mediante las secreciones mucosas generadas por la hembra, lo que les libraría de una dispersión provocada por las corrientes reinantes en su hábitat, dando cierta garantía de que los huevos fertilizados quedasen en un ambiente favorable para su desarrollo. Este tipo de desarrollo directo viene además corroborado por la presencia de una única prodisoconcha I, cuyo tamaño (170 μm de longitud) pone de manifiesto la ausencia de fase planctotrófica y el hecho de tratarse de una larva lecitotrófica (Foighil 1989, Salas & Gofas 1997, Linse & Page 2003).

Ockelmann (1958) describió la existencia en diferentes especies de la familia Astartidae (*Astarte borealis*, *A. montagui*, *A. crenata*, *A. elliptica* y *A. sulcata*), a la que también pertenece *D. digitaria*, de huevos que poseen una membrana adherente y una cubierta gelatinosa que posibilita que se fijen al sustrato, evitando su dispersión por las corrientes y el riesgo de supervivencia que ello conlleva. Las hembras de *D. digitaria*, con una talla media que apenas supera los 6 mm en la población estudiada, poseen sin embargo unos óvulos de gran tamaño, que en su estado de madurez llegan a los 160 μm de diámetro, pudiendo superar los 200 μm , lo que implica una limitación en la producción de gametos debido al poco espacio disponible para albergarlos. Este hecho, unido a las fuertes corrientes presentes en los fondos de bioclastos donde viven, supondría una desventaja en un tipo de reproducción en la que la fecundación fuera externa y la emisión de los gametos femeninos se hiciera de forma libre. La fecundación interna observada en *D. digitaria* y la protección de los huevos fertilizados, bien mediante métodos como la incubación intrapaleal o la inclusión de éstos en masa gelatinosas adheridas al sustrato como sucede en los astártidos (Ockelmann 1958), serían comportamientos acordes a la estrategia reproductiva *Bet-hedging*, ya que les proporcionaría una protección extra frente a huevos emitidos al medio de forma libre (Sastry 1979, Sellmer 1967, Collins & Giribet 2010).

El escaso número de ejemplares en estado activo, particularmente en hembras, la existencia a lo largo del ciclo de un amplio “stock” de hembras en estado preactivo, junto con el hecho que las veces que hemos observado espermatozoides en el interior de la gónada femenina, tanto a microscopía óptica como en el microscopio electrónico de transmisión, fuese en hembras preactivas, nos lleva a postular la hipótesis de que el desarrollo terminal de los óvulos (alcanzar el estado activo) y la posterior emisión, son procesos muy rápidos, pudiendo ser la entrada de algunos espermatozoides en la gónada el detonante de los mismos. De esta forma, las hembras se asegurarían la fecundación de sus óvulos, puesto que la penetración de algunos espermatozoides indicaría la disponibilidad en el medio de gametos masculinos. Así, en las emisiones parciales de óvulos estaría asegurada la fertilización de los mismos por genotipos distintos y en distintas épocas del año, lo que aseguraría condiciones favorables para al menos algunas de las puestas, cumpliéndose así la teoría *Bet-hedging* (Slatkin 1974).

Estas observaciones apoyan la hipótesis que postula la existencia de fertilización interna en especies con algún tipo de protección de la prole y/o emisión de huevos embebidos en masas o en cordones gelatinosos (Collin & Giribet 2010).

Crecimiento

Los valores obtenidos en los parámetros de crecimiento para *D. digitaria* indican que es una especie de crecimiento relativamente rápido en los primeros meses de vida, pero que después se ralentiza enormemente, con incrementos mínimos anuales, lo que parece poner de manifiesto que los individuos de esta especie, a pesar de no sobrepasar el centímetro de longitud podrían llegar a alcanzar edades superiores a los 10 años, lo cual resulta bastante inusual en bivalvos, donde hay una relación directa entre talla y edad (Ridgway *et al.* 2011), si bien es cierto, que el tamaño corporal en bivalvos solo explica el 13% de la variación de la longevidad, entrando en juego otros factores como la edad de primera madurez sexual, aunque ésta también posee una relación positiva con la edad máxima estimada en bivalvos. Todo esto apuntaría a una longevidad muy corta en el caso de *D. digitaria*. No obstante, se ha encontrado que es la tasa de crecimiento el factor que presenta un mayor peso a la hora de explicar la longevidad en los moluscos, mucho más que la talla o la edad de primera madurez, de manera que puede explicar entre el 67% al 75% (Haag & Rypel 2010, Ridgway *et al.*

2011), y en este caso la relación es inversa, de manera que tasas de crecimiento pequeñas suponen una longevidad alta. Solamente existen datos de tasas de crecimiento y longevidad para especies de mayor tamaño de la familia, como *Astarte borealis* o *A. arctica*, ya que las de tamaño más pequeño, como *Goodallia triangularis* y la propia *D. digitaria* no han sido objeto habitual de estudio, probablemente debido a su nulo valor comercial.

El Índice de Rendimiento del Crecimiento (\emptyset') se utiliza como criterio para poder comparar estimaciones de tasa de crecimiento de diferentes poblaciones (Peharda 2013; Jurić 2012), pero también puede ser válido entre especies de una misma familia. El astártido *A. borealis* presenta valores de \emptyset' que varían entre 2,78 – 3,06 (K 0,09 – 0,41; L_{∞} 35,53 – 53,40) en función de la población estudiada, mientras que para *A. arctica* se han dado valores de $\emptyset' = 3,06$ (K 0,49; L_{∞} 48,2) (calculado de Gusev 2014; Selin 2007; Gagaev 1989), valores muy por encima de los obtenidos en el presente estudio para *D. digitaria*, tanto por el método de análisis de frecuencia de tallas ($\emptyset' = 1,80$), como por el de análisis de bandas de crecimiento en lámina delgada ($\emptyset' = 1,15$). Esto indica que *D. digitaria* posee un patrón de crecimiento diferente dentro de la familia, con un rango de valores estimados del coeficiente de crecimiento K (0,174 – 0,7) por encima del de *A. borealis* y *A. arctica*. Que *D. digitaria* presente valores de K más elevados respecto a *A. borealis* y *A. arctica*, que poseen una L_{∞} entre tres y cinco veces superior, así como una longevidad que se ha estimado entre los 8 – 20 y 7 años respectivamente (Selin 2007, Skazina 2013), puede responder a factores ambientales. Las diferencias entre las esperanzas de vida es indicativo de diferencias sustanciales en las condiciones del hábitat (Selin 2007), lo cual es evidente si tenemos en cuenta que las temperaturas de fondo en los estudios citados para *A. borealis* y *A. arctica* rondan los 4°C, mientras que las temperaturas medias de fondo (SBT) en nuestra área de estudio no bajaron de los 14°C, siendo la temperatura, junto con la disponibilidad de alimento uno de los principales factores ambientales que afectan al crecimiento de los bivalvos (Gosling 2003).

La imposibilidad de identificar los anillos de crecimiento en la superficie de la concha de *D. digitaria* es un hecho frecuente en otras especies de bivalvos, como ocurre en el berberecho *Cerastoderma edule* (Guevara & Niell 1989, De Montaudouin 1996) donde los anillos de

crecimiento son difícilmente diferenciables de aquellos formados debido a perturbaciones del medio (Peharda *et al.* 2012). En el árcido *Arca noae* (Peharda *et al.* 2002), así como en algunas especies del género *Modiolus* (Peharda *et al.* 2007, Seed & Brown 1978) el habitual crecimiento de epibiontes sobre sus conchas hace de la identificación de estas estructuras una tarea complicada. En *D. digitaria* no se aprecia rastro alguno de este tipo de estructuras sobre la superficie de su concha, además las costillas oblicuas que la surcan hacen aún más difícil observar algún indicio de anillos de crecimiento. Consecuentemente, éste resultó ser un método no válido para estimar el crecimiento en *D. digitaria*. La estimación de los parámetros de crecimiento mediante el análisis de la frecuencia de tallas ha sido criticado por ser un método un tanto subjetivo (Gaspar *et al.* 2004; Moura *et al.* 2009) e inapropiado para especies con un periodo de reclutamiento anual relativamente largo, como ocurre en el caso de *D. digitaria*, y/o tasas de crecimiento individual muy variable dentro de los diferentes grupos de edad (Seed 1976, Cerrato 1980). Sin embargo, el análisis de frecuencia de tallas es un método que posee una gran ventaja, y es que las medidas tomadas se efectúan sobre ejemplares de una población que no ha sufrido perturbaciones en sus condiciones naturales hasta el momento de su captura (Gosling 2003), lo que asegura que no existen sesgos o errores en las tasas de crecimiento obtenidas debido a una intervención experimental. La precisión del análisis también depende de que las muestras recolectadas reflejen de una manera fiel la estructura de tallas de la población real (Peharda *et al.* 2007), lo que si puede representar un problema en los rangos de talla más pequeños (<1 mm). Otra gran ventaja es que cuenta con la posibilidad de analizar un elevado número de ejemplares de forma rápida y barata, sin necesidad de una cualificación ni dispositivos especiales.

Herrmann *et al.* (2009) comparan los resultados en la estimación de la tasa de crecimiento en *Donax hanleyanus* mediante el análisis de distribución de frecuencia de tallas y el análisis de incremento de talla mediante marcado in situ con tres fluorocromos (rojo de alizarina, calceína, y cloruro de estroncio) obteniendo resultados dispares. No encuentra diferencias significativas en las K obtenidas ($K_{\text{calceína}} = 0,41 \text{ año}^{-1}$; $K_{\text{frecuencia}} = 0,47 \text{ año}^{-1}$), con lo que concluye que ambos métodos son válidos para estimar el crecimiento de *D. hanleyanus*. El estudio del crecimiento mediante el marcado con fluorocromos resulta más preciso en lo

referente a determinar la tasa de crecimiento de una especie, ya que pueden obtenerse medidas diarias de crecimiento. No obstante, estas sustancias pueden provocar mortalidad en los ejemplares marcados, y su manipulación puede afectar a sus tasas reales de crecimiento. El que este tipo de experimentos se desarrollen por periodos cortos de tiempo puede dar lugar a una subestimación de L_{∞} (Herrmann *et al.* 2009). Los ejemplares estudiados mediante técnicas experimentales de captura – recaptura en los que se mantienen en cajas dentro del agua, puede ralentizar el crecimiento de sus conchas debido a que se produce una mayor competencia por el alimento. Las tasas de crecimiento estimadas en esos casos son menores, observándose valores de \emptyset' entorno a un punto por debajo de las obtenidas por métodos donde no existe manipulación previa de los ejemplares, como el análisis de distribución de frecuencia de tallas, el de incremento del crecimiento de Gulland-Holt o el de las marcas de crecimiento paleales (Peharda *et al.* 2007).

Gaspar *et al.* (2004) concluye en su estudio que el análisis de los anillos externos de la concha es un método apropiado para una estimación rápida de la edad en *C. gallina*, mientras que el método de láminas de acetato es el más recomendado para la estimación de los parámetros de la ecuación de crecimiento de Von Bertalanffy, desestimando el método de análisis de frecuencia de tallas por no estar indicado en especies con un largo periodo de reclutamiento, basándose en los trabajos de Seed (1976) y Kautsky (1982) y en que los valores obtenidos para K y L_{∞} mediante el análisis de frecuencia de tallas fueron distintos al del método de láminas de acetato. No obstante, se calculó los valores de Índice de Rendimiento del Crecimiento (\emptyset') para las tres técnicas ensayadas por Gaspar *et al.* (2004), ya que como el propio autor comenta, la tasa de crecimiento de una especie puede variar entre poblaciones, debido a factores geográficos o ambientales y es la manera más indicada a la hora de comparar ritmos de crecimiento entre poblaciones (Sparre *et al.* 1997), especies, o como en este caso, entre los resultados de diferentes métodos de estimación del crecimiento aplicados sobre una misma población. Así se obtuvo un valor de \emptyset' para el método de láminas de acetato de $\emptyset'_{\text{acetato}} = 2,85$, y para el de frecuencia de tallas de $\emptyset'_{\text{frecuencia}} = 2,75$, mientras que en el de anillos superficiales de la concha la diferencia fue mayor $\emptyset'_{\text{anillos}} = 3,00$. Además si comparamos el valor de $\emptyset'_{\text{acetato}}$ con el de otros trabajos vemos que por ejemplo Deval (2001)

obtiene un $\bar{\varnothing}' = 2,62$ y Ramón (1993) el valor de $\bar{\varnothing}' = 2,65$, más próximos al valor obtenido por el método de frecuencia de tallas en Gaspar *et al.* (2004). Además los valores de $\bar{\varnothing}'_{\text{frecuencia}}$ en Gaspar *et al.* (2004) presentan una diferencia menor respecto a Ramón (1993) ($\bar{\varnothing}' = 2,81$).

Así pues, no existen métodos mejores o peores, sino que cada caso de estudio poseerá unas particularidades, que aconsejarán el método de estimación del crecimiento más conveniente, resultando ser lo más preciso en la mayoría de los casos una combinación de ellos. No obstante, lo más deseable será que mediante un solo método de estudio consigamos una estimación de los parámetros de crecimiento lo suficientemente precisos como para construir un modelo que describa de la forma más próxima a la realidad el crecimiento de la especie.

CAPÍTULO 6



DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

DISCUSIÓN GENERAL

En el presente trabajo, la elección de *Digitaria digitaria* como modelo de estudio en bivalvos, se basó en aspectos relacionados con la concha, como la presencia de un periostraco alveolado (común en la familia Astartidae) y de una escultura de costillas oblicuas; así como en el interés por conocer las adaptaciones relacionadas con la reproducción de esta especie de reducido tamaño, cuyo hábitat es altamente inestable, como son los fondos de bioclastos con corrientes de fondo del área del Estrecho de Gibraltar, lo cual suponía todo un reto a la hora del reclutamiento y de la pervivencia de la población en estudio. De los resultados obtenidos se puede confirmar que efectivamente la elección estaba justificada, y nos ha permitido entender el porqué de muchos caracteres morfológicos, así como la respuesta biológica de la especie a los retos que planteaba su reducido tamaño.

Con relación al periostraco alveolar, característico de todos los astártidos, el análisis mediante SEM y TEM permitió identificar la presencia de bacterias en los mismos, las cuales se “sembraban” desde el lóbulo medio del manto en el propio surco periostracal. Dichas bacterias aparecían inmersas en una envuelta mucosa mientras se multiplicaban. Un estudio en curso confirma la presencia de bacterias en los alveolos del periostraco de diversas especies de astártidos (*Astarte sulcata*, *Astarte fusca* o *Goodallia triangularis*). El carácter alveolado del periostraco de Astartidae parece haber sufrido una selección positiva relacionada con su adecuación para albergar bacterias.

Por otro lado la presencia de bacterias dentro de bacteriocitos en otros órganos internos además del lóbulo medio del manto, como los folículos gonadales (en hembras y en machos), o las branquias, parece indicar, si como creemos se trata de la misma especie de bacteria, una estrecha relación simbiótica, ya que su presencia en las gónadas apunta a una transmisión vertical, de progenitores (principalmente hembras) a la prole. Estudios en curso han puesto de manifiesto también la presencia de bacterias en las gónadas de otros astártidos, lo que podría indicar que dicha simbiosis no sería exclusiva de *Digitaria*, sino de los Astartidae en su conjunto.

¿Qué ventajas tendría esta simbiosis? Los datos de los análisis con isótopos muestran que no hay relación entre las bacterias y la formación de la concha, a pesar de estar asentadas sobre ella. Sin embargo, la obtención de colonias en cultivo puro a partir de la concha, que mostraron el mismo tipo de refringencia de color verde brillante que el observado en el animal vivo a lo largo de borde del manto (concretamente en el lóbulo medio, y algo más difusa en todo el periostraco), junto con los precedentes de luminiscencia existentes en varias especies de *Astarte* (Ockelmann, 1965, Saleuddin, 1964) producida por secreciones de órganos glandulares en la parte posterior del borde del manto, nos lleva a proponer una posible relación de simbiosis por bioluminiscencia de origen bacteriano. Esta simbiosis podría ser de utilidad para atraer a organismos suspendidos en la capa de agua próxima al fondo y así obtener más recursos, o bien como reconocimiento específico a la hora de emitir gametos por parte de los machos.

Con relación a la formación de las costillas oblicuas, el presente estudio nos ha permitido observar los cambios morfológicos que se producen de forma cíclica en el borde del manto y así confirmar el manto como una unidad morfogenética, ya que es él quien detecta la presencia de un borde de costilla para continuar la secreción de la misma. De esta forma, se confirma la propuesta de Checa (2002) del modelo “guiado por contacto reducido” para la formación de las costillas oblicuas de *D. digitaria*.

“*El tamaño importa*”, esta conocida frase, se podría aplicar sin tapujos a *D. digitaria*, ya que su reducido tamaño, está en parte en el origen de su estrategia reproductora. Por ejemplo, la mayor abundancia de hembras, que permite tener puestas profusas en la población, el mayor tamaño de los machos (y por tanto de sus gónadas), que estaría relacionado con el hecho de que son ellos los que deben fertilizar al mayor número de hembras posibles, puesto que la fertilización es interna, para lo cual emiten casi continuamente masas de espermatozoides apelmazados por el mucus presente en los folículos, evitando su dispersión por las corrientes.

Nuestras observaciones sobre la reproducción de este astártido confirmarían que las especies que presentan la puesta envuelta en mucus tienen fertilización interna. Ambos aspectos, fertilización interna y envuelta de mucus, serían en realidad adaptaciones para favorecer la transmisión de bacterias simbióticas, ya que si nos fijamos en los lucínidos, la otra familia de

bivalvos en la que se han observado este tipo de puesta con envueltas mucosas (Collin & Giribet 2010), descubrimos que se caracterizan por presentar simbiosis bacteriana en todas las especies analizadas hasta la fecha.

Es posible que la fertilización interna y la puesta envuelta con mucus para fijarla al fondo, que son extremadamente adaptativos para un bivalvo de pequeño tamaño como *D. digitaria*, sean en realidad una adaptación de todos los astártidos para la transmisión de las bacterias presentes en los alveolos del periostraco a sus descendientes, puesto que las bacterias se alojan en bacteriocitos no en los óvulos, salvo en la especie incubadora *Goodallia triangularis*, donde las bacterias sí están dentro del óvulo (estudio en curso).

Según Ridway *et al.* (2011) la longevidad en bivalvos está relacionada con: (1) tamaño corporal, cuanto más grande, mayor longevidad, lo que se cumpliría en el caso de especies como *Arctica islandica* (Schöne *et al.* 2005b) o *Neopycnodonte zibrowii* (Wisshak *et al.* 2009); (2) desarrollo, cuanto más pronto se alcance la madurez sexual menor será la longevidad; y (3) tasa de crecimiento, cuanto más alta sea la tasa de crecimiento menor será la longevidad. Según Ridway y coautores el tamaño explicaría la longevidad en un 13% de los casos analizados; la relación entre edad de maduración y longevidad esta positivamente correlacionada, explicando un 48,4% de los casos. Finalmente tasa de crecimiento (a partir de datos de la curva de von Bertalanffi) y longevidad presenta una correlación negativa significativa, explicando el 64,3% de los casos analizados. Si examinamos el caso de *D. digitaria*, observamos que es una especie de pequeño tamaño (< 10 mm), con una talla (y edad) de madurez sexual muy temprana y una tasa de crecimiento (K) no muy definida, ya que oscilaría entre 1,5 según el FISAT (método Elefan) y 0,14 por el análisis de bandas de crecimiento en lámina delgada, considerando 2 paradas reproductoras anuales. Según la tasa de crecimiento considerada nos aparece un abanico de longevidad entre 4,3 años según el análisis de frecuencias de talla y 17,2 años si atendemos al análisis de las bandas de crecimiento de las capas internas de la concha. Según las conclusiones de Ridway *et al.* (2011) *D. digitaria* al ser pequeña y alcanzar la talla de madurez de forma temprana (2,82 mm y entre 1 y 1.5 años), debería de tener una vida corta, de muy pocos años, posiblemente en torno a 3 - 4 años. En el caso de *D. digitaria* el factor determinante parece ser la tasa de

crecimiento. Si atendemos a los datos obtenidos con el análisis de frecuencia de tallas, la longevidad sería de 4,3 años, lo cual se ajustaría más a los otros parámetros considerados, tamaño y edad de maduración. Pero si atendemos a las bandas de crecimiento marcadas en las conchas, entonces la longevidad para los individuos mayores de 9 mm se incrementa hasta los 17,2 años, lo cual constituiría todo un record para una especie de tamaño tan pequeño. Aunque el estudio de la tasa de crecimiento mediante láminas delgadas de un mayor número de ejemplares es un objetivo para el futuro, parece evidente que la tasa de crecimiento en *D. digitaria* es menor y la longevidad mayor de la esperada, lo que puede que sea una adaptación evolutiva para el mantenimiento de reproductores en el tiempo, con el fin de compensar el pequeño tamaño, las bajas densidades poblacionales, que junto con la depredación pondrían en riesgo la viabilidad de la especie.

CONCLUSIONES

Del estudio sobre diferentes aspectos de la biología del bivalvo *Digitaria digitaria* se han podido extraer las siguientes conclusiones:

En cuanto a la formación de la concha:

1. El origen y el proceso de formación del periostraco en *D. digitaria* es similar al descrito para otras especies de astártidos. Se confirma el aspecto alveolado como una característica de toda la familia y por tanto un carácter filogenético y de utilidad sistemática.
2. La implicación del lóbulo medio del manto en relación al periostraco se limita a su moldeado (alveolos) y al control del desplazamiento a lo largo del surco periostracal, mientras que la función de engrosamiento del periostraco está a cargo de las secreciones producidas por el lóbulo externo del manto.
3. Los alveolos grandes presentes en el periostraco de *D. digitaria* son moldeados por la primera fila de células de la superficie externa del lóbulo medio del manto, mientras que los alveolos pequeños por hileras sucesivas de células del lóbulo medio. En dichos alveolos se albergan bacterias, que provienen del propio lóbulo medio y que se instalan en el periostraco a lo largo del surco periostracal, y con las que *D. digitaria* parece mantener una relación simbiótica, pero cuya función queda aún por determinar.
4. La formación de las costillas oblicuas en *D. digitaria* responden a un modelo de “guiado por contacto reducido” donde el lóbulo externo del manto adquiere la condición de unidad morfogénica.

En lo referente a la anatomía y los parásitos:

5. El estudio anatómico de *D. digitaria* ha puesto de manifiesto caracteres que apoyan la reciente filogenia molecular del clado Archiheterodonta, como ausencia de un saco del estilete cristalino independiente del intestino, el propio estilete que es altamente mucoso, asemejándose a un protostilo. La presencia de 7

mitocondrias comprimidas en la base del núcleo del espermatozoide es un carácter singular dentro de Astartidae, que relaciona *Digitaria* con Crassatellidae.

6. La presencia de un biso funcional puede estar relacionado con un origen paedomórfico del género *Digitaria*, ya que el biso funcional es común en los juveniles de Astartidae.
7. La frecuencia y abundancia de los parásitos encontrados en *D. digitaria* pone de relieve el alto grado de parasitismo que sufren, que unido al carácter altamente patógeno de alguno de ellos como *Marteilia sp.*, que afecta al 100% de la población, indican un cierto grado de resistencia de este bivalvo al parasitismo.
8. La presencia de bacterias en las gónadas de *D. digitaria*, apunta a una transmisión vertical, lo que confirmaría la existencia de una relación simbiótica entre el bivalvo y las bacterias.

Sobre su reproducción y crecimiento:

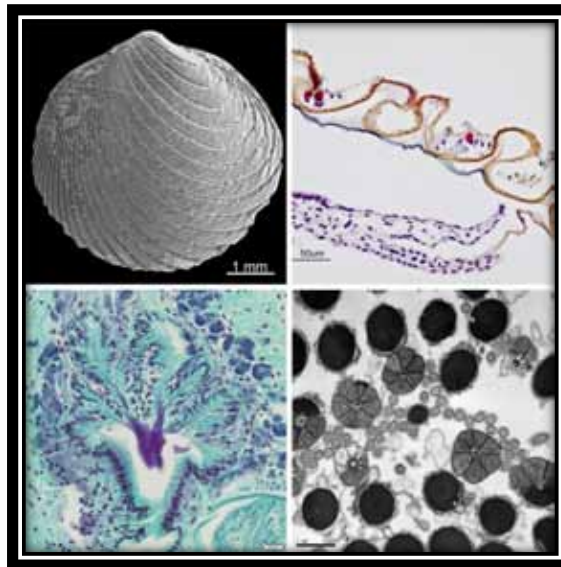
9. *D. digitaria* es dioica, con predominio de hembras, y con dimorfismo sexual, ya que los machos son de mayor talla que las hembras.
10. El ciclo reproductor es anual, asincrónico, sin periodo de reposo, con picos de emisión en primavera y otoño. La mayoría de las gónadas, sobre todo en hembras, aparecen en estado preactivo. La maduración terminal de los gametos es rápida y las emisiones son parciales. Se considera que los individuos de *D. digitaria* realizan al menos dos puestas al año, aunque podrían ser más, sobre todo en los machos.
11. La fertilización es interna en la cavidad paleal, concretamente en el eje dorsal de las hemibranquias de cada lado, por donde van saliendo los óvulos desde el gonoporo hasta la abertura exhalante. El reservorio de espermatozoides se localiza en la parte dorsal de las branquias. La penetración de algunos espermatozoides en el interior de las gónadas podría ser el detonante para la maduración definitiva de los óvulos.

12. Los óvulos están envueltos por una capa mucosa que posiblemente tenga como función, al igual que ocurre en otros astártidos, la fijación al sustrato. Parece confirmarse que la presencia de envuelta mucosa en la puesta estaría relacionada con la presencia de bacterias en dichas especies, que de esta forma se aseguran la transmisión a la descendencia.
13. El crecimiento de *Digitaria digitaria* es en conjunto lento si atendemos a las bandas que se observan en las láminas delgadas, junto con una longevidad larga (superior a los 10 años) para un bivalvo de pequeño tamaño. Los análisis de frecuencias de tallas (FISAT) indican tasas de crecimiento mayores y longevidad menor (en torno a 4,5 años).



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

RESUMEN





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

RESUMEN

Digitaria digitaria es una especie que alcanza latitudes más bajas, encontrándose de forma habitual desde el Golfo de Vizcaya (norte de España) hasta el sur de Guinea (oeste de África) y en todo el mar Mediterráneo (Gofas *et al.* 2011). Posee una concha que no sobrepasa los diez milímetros de longitud antero – posterior, de contorno orbicular o a veces algo más larga que alta, equilateral y recubierta por un periostraco alveolado, similar al observado en otras especies de la familia. Su escultura es inconfundible y exclusiva de esta especie dentro de los astártidos, ya que está formada por estrías oblicuas muy profundas, que empiezan en el margen postero – dorsal describiendo una trayectoria oblicua, curvada, hasta alcanzar el margen ventral y antero-ventral.

D. digitaria constituye pues una especie modelo, de interés tanto por los aspectos relacionados con la formación de su periostraco alveolado y de su peculiar concha de escultura oblicua, como por los relacionados con su biología, en particular la reproducción, teniendo en cuenta su pequeño tamaño y el hecho que el tipo de fondo y profundidad en el que viven suele estar sometido a corrientes de fondo, lo cual supone un reto a la hora del asentamiento larvario.

Los resultados obtenidos por objetivos son:

El periostraco. Formación y estructura

El periostraco alveolado de *D. digitaria* comienza como una película con las secreciones de una célula basal en el fondo del surco periostracal y cuenta inicialmente con dos capas, la granular y la homogénea oscura. La tercera capa que completa la formación del periostraco, la llamada capa translúcida, es secretada por el epitelio interno del lóbulo externo. Aunque el lóbulo medio aparentemente no está implicado en el proceso de síntesis del periostraco, si se ha comprobado su implicación en el moldeado de su estructura alveolado. Se ha visto como la primera fila de células del epitelio externo del lóbulo medio del manto funciona como molde para los alveolos mayores. Mientras que la formación de los alveolos menores estaría a cargo de pequeñas protrusiones celulares de carácter temporal, que provocarían un patrón menos regular, sin una pauta clara. Igualmente se ha observado como los alveolos del



periostraco de *D. digitaria* están rellenos con bacterias que se instalan en el periostraco a lo largo del surco periostracal.

La concha de *Digitaria digitaria*: Morfogénesis de las costillas oblicuas e implicaciones del borde del manto.

La escultura que presenta *D. digitaria* en su concha está constituida por costillas oblicuas que discurren desde la zona postero – dorsal hasta el borde de la concha, en las que se aprecia un incremento en la curvatura, longitud y anchura de las situadas en la zona posterior a las de la zona anterior. El hecho de haber encontrado una mayor tasa de desplazamiento anterior que posterior de las costillas a lo largo del borde de la concha y tasas de crecimiento más altas de la zona posterior que de la anterior, se traduciría en un incremento en la curvatura y anchura de las costillas desde la parte posterior a la anterior, lo que está en consonancia con la escultura de la concha descrita en este bivalvo. La construcción de este tipo de costillas en *D. digitaria* parece estar relacionado con un comportamiento complejo de los lóbulos del borde del manto, que experimentan secuencias cíclicas de cambios morfológicos que responderían al modelo “guiado por contacto reducido” propuesto por Checa (2002), donde el manto obtiene la condición de unidad morfogénica.

Anatomía descriptiva

Del estudio anatómico de las partes blandas se puede destacar la presencia en el pie de una glándula del viso funcional, que produce un cordón mucoso adhesivo. No existe un saco del estilete independiente, sino que el estilete cristalino se forma en una especie de ciego del intestino descendente; el estilete presenta una gran proporción de mucosustancias, asemejándolo al protostilo; estos caracteres se pueden considerar basales en los Heteronchia. La ultraestructura observada en los gametos masculinos de *D. digitaria* se asemeja a la de Crassatellidae y Carditidae, con núcleo y acrosoma alargados. La presencia de 7 mitocondrias comprimidas en la base del núcleo es un carácter que relaciona *D. digitaria*, y los astártidos en general, con los Crassatellidae.

Parasitismo y simbiosis

D. digitaria presenta altos porcentajes de parasitación. Es destacable, debido a su frecuencia de parasitación (96,4 %), la presencia del hidrozoo *Monobrachium parasitum*, que coloniza la parte posterior de la concha de *D. digitaria*. De los parásitos internos hay que destacar el protozoo del género *Marteilia* sp. que infecta la glándula digestiva y las paredes del estómago e intestino, con una frecuencia del 100 %, El trematodo de la familia Bucephalidae, aunque no presenta una alta frecuencia entorno al 4 %, suele provocar la castración de la gónada.

El descubrimiento de bacterias asociadas al periostraco de *D. digitaria*, dentro de los senos hemocélicos del borde del manto, en las branquias y el epitelio folicular de la gónada y masculina, hace suponer la existencia de una relación simbiótica entre el bivalvo y estas bacterias. No se ha confirmado que las bacterias encontradas en diferentes órganos de *D. digitaria* sean la misma especie, pero de ser así estaríamos ante una posible transmisión vertical desde las madres a su descendencia.

El cultivo microbiológico a partir del periostraco del bivalvo proporcionó colonias aisladas en cultivo puro que desarrollaban el mismo tipo de refringencia verde que la observada en el lóbulo del manto de ejemplares vivos del bivalvo. De confirmarse una relación basada en algún tipo de bioluminiscencia por simbiosis bacteriana, estaríamos ante el primer registro de este tipo de asociación entre los moluscos bivalvos.

Reproducción y crecimiento

D. digitaria es una especie dioica con una mayor proporción de hembras. Existe dimorfismo sexual al igual que otros astártidos, pero a diferencia del género *Astarte*, los machos de *Digitaria* son más grandes que las hembras.

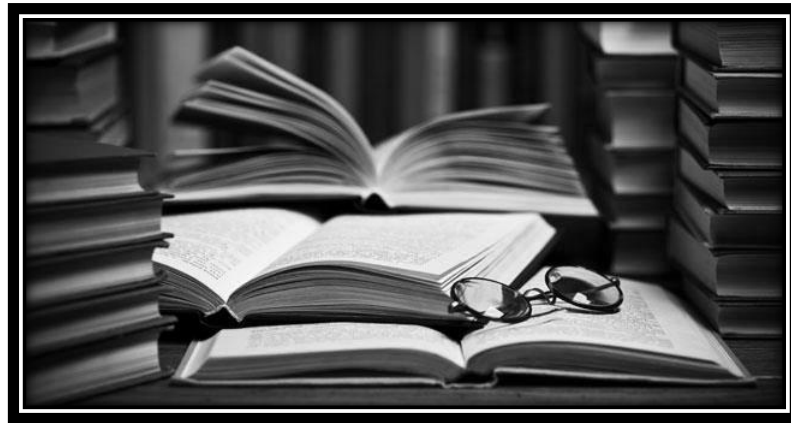
El ciclo reproductor es asincrónico, con dos picos de emisión, en primavera y otoño, más definido en las hembras que en los machos, entre los cuales hay emisiones prácticamente todos los meses. No se ha observado periodo de reposo en la población.

Los óvulos maduros, de gran tamaño (> 160 µm de diámetro), al salir por el gonoporo se deslizan por el eje dorsal posterior de las hemibranquias que forma un “canal de puesta” hasta la zona de la abertura exhalante. La presencia de espermatozoides en la parte dorsal posterior

de las branquias de las hembras, y la detección de espermatozoides dentro de la propia gónada femenina indican que la fecundación probablemente se produzca a lo largo del canal de puesta branquial, e incluso en ciertas ocasiones dentro de la propia gónada femenina

Es una especie de crecimiento lento y una longevidad larga si atendemos a su pequeño tamaño.

BIBLIOGRAFÍA





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

BIBLIOGRAFÍA

- Abolins-Kroigs, A. (1976). Ultrastructural study of the shell-repair membrane in the snail *Helix pomatia* L. *Cell Tissue Research*, 172: 455 – 476.
- Alderman, D. J. (1979). Epizootiology of *Marteilia refringens* in Europe. *Mar Fish Rev*, 41(1-2), 67-69.
- Allen, J. A. (1963). Ecology and functional morphology of molluscs. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review*, 1, 253-288.
- Alyakrinskaya, I. O. (2005). Functional significance and weight properties of the shell in some mollusks. *Biology Bulletin*, 32(4), 397-418.
- Ansell, A. D. (1961). The functional morphology of the British species of Veneracea (Eulamellibranchia). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 41(02), 489-517.
- Ansell, A. D. (1983). *The biology of the genus Donax* (pp. 607-635). Springer Netherlands.
- Ansell, A. D., Frenkiel, L., & Moueza, M. (1980). Seasonal changes in tissue weight and biochemical composition for the bivalve *Donax trunculus* L. on the Algerian coast. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 45(1), 105-116.
- Appeltans, W., Ahyong, S. T., Anderson, G., Angel, M. V., Artois, T., Bailly, et al. (2012). The magnitude of global marine species diversity. *Current Biology*, 22(23), 2189-2202.
- Ascenzo-Navarro, A. (2014). *Identificación histológica y molecular del parásito protozoario marteilia en la glándula digestiva de Digitaria digitaria* (L. 1758) (Mollusca: Bivalvia). Trabajo Final del Máster en Biotecnología Avanzada. Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga. 30pp.
- Atkins, D. (1937). On the ciliary mechanisms and inter-relationships of lamellibranchs. Part III. Types of lamellibranch gills and their food currents. *Quarterly Journal of Microscopical Science, N. S., London*, 79 (315): 375-421.
- Atkins, D. (1938). On the ciliary mechanisms and interrelationships of Lamellibranchs. Part VI. The pattern of the lateral ciliated cells of the gill filaments of the Lamellibranchia. *Quarterly Journal of Microscopical Science, N. S., London*, 80 (319): 331-344.
- Balmain, J., Hannoyer, B., & Lopez, E. (1999). Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and X-ray diffraction analyses of mineral and organic matrix during heating of mother of pearl (nacre) from the shell of the mollusc *Pinctada maxima*. *Journal of biomedical materials research*, 48(5), 749-754.

- Baron, P. J., & Ciocco, N. F. (1997). Anatomía de la almeja *Tellina petitiana* d'Orbigny, 1846. I. Organización general, valvas, manto, sifones, aductores, pie y branquias (Bivalvia, Tellinidae). *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 32(2), 95-110.
- Barón, P., & Ciocco, N. (1998). Anatomy of the clam *Tellina petitiana* d'Orbigny, 1846. III. Nervous system and gonad (Bivalvia, Tellinidae). *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 33(1), 139-154.
- Bayne, B. L., & Worrall, C. M. (1980). Growth and production of mussels *Mytilus edulis* from two populations. *Marine Ecology Progress Series*, 3, 317-328.
- Beams, H.W. & Sekhon, S.S. (1966). Electron microscope studies on the oocyte of the freshwater mussel (*Anodonta*). With special reference to the stalk and mechanism of yolk deposition. *Journal of Morphology*, 199: 477-502.
- Beedham, G. E. (1958). Observations on the mantle of the Lamellibranchia. *Quarterly Journal of Microscopical Science*, 3(46), 181-197.
- Beedham, G.E. (1965). Repair of the shell in species of *Anodonta*. *Proceedings of The Zoological Society of London* 145: 107 – 125.
- Beesley, P. L., Ross, G. J., & Wells, A. (1998). *Mollusca: the southern synthesis. Part A. Fauna of Australia Volume 5*. CSIRO publishing.
- Beekey, M. A., & Hornbach, D. J. (2004). The effect of size-limited brood capacity on brood size in a freshwater bivalve. *The American midland naturalist*, 151(2), 274-285.
- Benedict, C. V., & Picciano, P. T. (1989). Adhesives from marine mussels. *Adhesives from renewable resources*, 385, 465-483.
- Beninger, P. G., & Le Pennec, M. (1991). Functional anatomy of scallops. *Scallops: biology, ecology and aquaculture. Elsevier, Amsterdam*, 133-223.
- Beninger, P. G., St-Jean, S. D., & Poussart, Y. (1995). Labial palps of the blue mussel *Mytilus edulis* (Bivalvia: Mytilidae). *Marine biology*, 123(2), 293-303.
- Bernard, F. (1956). Contribution à la connaissance du Detroit de Gibraltar. *Bulletin du Institute Océanographique* (Fondation Albert 1), num. 1074.
- Besteiro, C., Troncoso, J. S., Parapar, J., Salvini-Plawen, L. V., & Urgorri, V. (1990). Hallazgos de *Monobrachium parasitum* (Cnidaria, Hydrozoa) en asociación con *Digitaria digitaria* (Mollusca, Bivalvia). *Iberus*, 9(1-2), 91-96.
- Beukema, J. J. (1974). Seasonal changes in the biomass of the macro-benthos of a tidal flat area in the Dutch Wadden Sea. *Netherlands Journal of Sea Research*, 8(1), 94-107.
- Bevelander, G., & Nakahara, H. (1967). An electron microscope study of the formation of the periostracum of *Macrocallista maculata*. *Calcified tissue research*, 1(1), 55-67.



- Bhattacharya, C. G. (1967). A simple method of resolution of a distribution into Gaussian components. *Biometrics*, 23(1), 115-135.
- Bieler, R., & Mikkelsen, P. M. (1998). *Ammonicera* in Florida: Notes on the smallest living gastropod in the United States and comments on other species of Omalogyridae (Heterobranchia). *Nautilus-Paper Edition*, 111(1), 1-12.
- Bieler, R., Mikkelsen, P. M., Collins, T. M., Glover, E. A., González, V. L., Graf, D. L., et al. (2014). Investigating the Bivalve Tree of Life—an exemplar-based approach combining molecular and novel morphological characters. *Invertebrate Systematics*, 28(1), 32-115.
- Bieler, R., Mikkelsen, P. M., & Giribet G. (2013). Bivalvia—A discussion of known unknowns. *American Malacological Bulletin*, 31:123-133.
- Blackwelder, P.L., & Watabe, N. (1977). Studies on shell regeneration II. The fine structure of normal and regenerated shell of the freshwater snail, *Pomacea paludosa*. *Biomaterialization* 9: 1 – 10.
- Boettiger, A., Ermentrout, B., & Oster, G. (2009). The neural origins of shell structure and pattern in aquatic mollusks. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (16): 6837 – 6842.
- Bower, S. M., Mc Gladdery, S. E., & Price, I. M. (1994). Synopsis of infectious diseases and parasites of commercially exploited shellfish. *Annual Review of Fish Diseases*, 4, 1–199.
- Boyden, C. R. (1971). A comparative study of the reproductive cycles of the cockles *Cerastoderma edule* and *C. glaucum*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 51(03), 605-622.
- Bozzo, M. G., Durfort i Coll, M., Poquet Miquel, M., & Sagristà i Mateo, E. (2015). Atlas d'histopatologia de mol·lucs bivalves. Introducció a la histologia d'algunes espècies de mol·lucs bivalves marins i les seves parasitosis més freqüents. Deposit Digital de la Universitat de Barcelona. <http://hdl.handle.net/2445/68395>
- Bright, M., & Bulgheresi, S. (2010). A complex journey: transmission of microbial symbionts. *Nature Reviews Microbiology*, 8(3), 218-230.
- Bubel, A. (1973). An electron-microscope study of periostracum formation in some marine bivalves. II. The cells lining the periostracal groove. *Marine Biology*, 20(3), 222-234.
- Burreson, E. M., Stokes, N. A., & Friedman, C. S. (2000). Increased virulence in an introduced pathogen: *Haplosporidium nelsoni* (MSX) in the eastern oyster *Crassostrea virginica*. *Journal of Aquatic Animal Health*, 12(1), 1-8.
- Caddy, J. F. (1972). Progressive loss of byssus attachment with size in the sea scallop, *Placopecten magellanicus* (Gmelin). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 9(2), 179-190.

- Calvo, J., Morriconi, E. & Orler, P.M. (1998). Estrategias reproductivas de moluscos bivalvos y equinoideos. En Boschi E.E. (Ed). *El Mar Argentino y sus recursos pesqueros*. Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero. *Mar del Plata, República Argentina*. 2: 195-231
- Cerrato, R.M. (1980). Demographic analysis of bivalve populations. In: D.C. Rhoads & R.A. Lutz, (Eds) *Skeletal growth of aquatic organisms*. 417 – 468. Plenum Press, New York.
- Chapman, D.G. & Robson, D.S. (1960). The analysis of a catch curve. *Biometrics* 16: 354-368.
- Chauvaud, L., Patry, Y., Jolivet, A., Cam, E., Le Goff, C., Strand Ø, *et al.* (2012) Variation in Size and Growth of the Great Scallop *Pecten maximus* along a Latitudinal Gradient. *PLoS ONE* 7(5): e37717. doi:10.1371/journal.pone.0037717
- Checa, A.G. (2002). Fabricational morphology of oblique ribs in bivalves. *Journal of Morphology*, 254(2), 195-209.
- Checa, A.G., & Crampton, J.S. (2002). Mechanics of sculpture formation in *Magadiceramus? rangatira rangatira* (Inoceramidae, Bivalvia) from the Upper Cretaceous of New Zealand. *Lethaia* 35: 279 – 290.
- Checa, A.G., & Jiménez-Jiménez, A.P. (2003a). Rib fabrication in Ostreoidea and Plicatuloidea (Bivalvia, Pteriomorphia) and its evolutionary significance. *Zoomorphology* 122: 145 – 159.
- Checa, A.G., & Jiménez-Jiménez, A.P. (2003b). Evolutionary morphology of oblique ribs of Bivalves. *Paleontology* 46(4): 709 – 724.
- Checa, A. & Salas C. (en prensa). *Periostracum and Shell formation in the Bivalvia*. Treatise on line. Part N revised, Volume 1, Chapter 3.
- Checa, A. G., Cartwright, J. H., & Willinger, M. G. (2009). The key role of the surface membrane in why gastropod nacre grows in towers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(1), 38-43.
- Chícharo, L. & Chícharo, M. A. (2001). Effects of environmental conditions on planktonic abundances, benthic recruitment and growth rates of the bivalve mollusc *Ruditapes decussatus* in a Portuguese coastal lagoon. *Fisheries research*, 53(3), 235-250.
- Chipperfield, P. N. (1953). Observations on the breeding and settlement of *Mytilus edulis* (L.) in British waters. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 32(02), 449-476.
- Chrpa, M. E. (2012). Morphological variability of *Astarte borealis* (MOLLUSCA, BIVALVIA) in the Camden bay, northern Alaska. In *Geological Society of America Abstracts with Programs* (Vol. 44, No. 7, p. 233).



- Ciocco, N. F., & Barón, P. J. (1998). Anatomía de la almeja *Tellina petitiana* d'Orbigny, 1846. II. Sistema digestivo, corazón, riñones, cavidad y glándulas pericárdicas (Bivalvia, Tellinidae). *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 33(1), 73-87.
- Coan, E. V., Valentich-Scott, P., & Bernard, F. R. (2000). Bivalve Seashells of Western North America: Marine Bivalve Mollusks from Arctic Alaska to Baja California. Santa Barbara Museum of Natural History. Monograph no. 2. *Studies in Biodiversity*, (2).
- Coe, W. R. (1945). Development of the reproductive system and variations in sexuality in Pecten and other pelecypod mollusks. *Trans. Conn. Acad. Arts Sci*, 36, 673-700.
- Coe, W. R. (1943). Sexual differentiation in mollusks. I. Pelecypods. *The Quarterly Review of Biology*, 18(2), 154-164.
- Collin, R. & Giribet, G. (2010). Report of a cohesive gelatinous egg mass produced by a tropical marine bivalve. *Invertebrate Biology*, 129 (2): 165-171.
- Collins, T. J. (2007). ImageJ for microscopy. *Biotechniques*, 43(1 Suppl), 25-30.
- Combes, C. (2005). *The art of being a parasite*. University of Chicago Press. 291 pp.
- Deming, T. J. (1999). Mussel byssus and biomolecular materials. *Current opinion in chemical biology*, 3(1), 100-105.
- De Montaudouin, X. (1996). Factors involved in growth plasticity of cockles *Cerastoderma edule* (L.), identified by field survey and transplant experiments. *Journal of Sea Research*, 36(3), 251-265.
- De Paula, S. M., Huila, M. F. G., Araki, K., & Toma, H. E. (2010). Confocal Raman and electronic microscopy studies on the topotactic conversion of calcium carbonate from Pomacea lineate shells into hydroxyapatite bioceramic materials in phosphate media. *Micron*, 41(8), 983 – 989.
- Deval, M. C. (2001). Shell growth and biometry of the striped venus *Chamelea gallina* (L) in the Marmara Sea, Turkey. *Journal of Shellfish Research*, 20(1), 155-159.
- De Villiers, G. (1975). Reproduccion of the sand mussel *Donax serra* Röding. *Investigation on the Sea Fisheries of the Republic South Africa. Pretoria*, 109: 1-31.
- Dohmen, M.R. (1983). Gametogenesis. In: N.H.Verdonk, J. A. van den Biggelaar & A. S. Tompa (Edit). *The Mollusca Development Academic Press, London*. 3: 1 – 48.
- Dove, J., & Sheridan, P. (1986). Adhesive protein from mussels: possibilities for dentistry, medicine, and industry. *Journal of the American Dental Association* (1939), 112(6), 879.
- Drumbauld, B.R., Ruesink, J.L. & Rumrills.S. (2009). The ecological role of bivalve shellfish aquaculture in the estuarine environment: A review with applicatuin to oyster and clam culture in West Coast (USA) estuaries. *Aquaculture*, 290:196-223.

- Establier, R. y Margalef, R. (1964). Fitoplancton e hidrografía de las costas de Cádiz (Barbate), de junio de 1961 a agosto de 1962. *Investigación Pesquera*, 25: 5-31
- Falini, G., Albeck, S., Weiner, S., & Addadi, L. (1996). Control of aragonite or calcite polymorphism by mollusk shell macromolecules. *Science*, 271(5245), 67.
- Field, I. A. (1922). Biology and economic value of the sea mussel *Mytilus edulis*. *Bulletin of the United States Bureau of Fisheries*, 38, 127–259.
- Fleury, C., Marin, F., Marie, B., Luquet, G., Thomas, J., Josse, C., Serpentine, A., & Lebel, J.M. (2008). Shell repair process in the green ormer *Haliotis tuberculata*: A histological and microstructural study. *Tissue and Cell* 40: 207–218.
- Foighil, D. Ó. (1989). Role of spermatozeugmata in the spawning ecology of the brooding oyster *Ostrea edulis*. *Gamete research*, 24(2), 219-228.
- Forbes, E., & Hanley, S. C. T. (1853). *A history of British Mollusca, and their shells* (Vol. 1). J. Van Voorst.
- Fox, C.W. & Rauter, C.M. (2003). Bet-hedging and the evolution of multiple mating. *Evolutionary Ecology Research*. 5: 273 – 286.
- Fraga, F., & Establier, R. (1974). Hidrografía de la zona del Estrecho de Gibraltar. Datos básicos de la campaña “Maroc-Iberia I” del “Cornide de Saavedra”. *Resultados expediciones Científicas Buque Oceanográfico Cornide*, 3: 53-66.
- Franc, A. (1960). Classe des bivalves. A: Grassé, P. P.[ed.]. *Traité de zoologie*. París: Masson et Cie. 5 (2): 1845-2133.
- Franzen, A.K.E. (1955). Comparative morphological investigations into the spermiogenesis among Mollusca. *Zool. Bidr. Uppsala*, 30, 399-456.
- Fretter, V., & Graham, A. (1962). British prosobranch molluscs: their functional anatomy and ecology. [Publication]/*The Ray Society* n° 144.
- Gagaev, S. Y. (1989). Growth and production of mass species of bivalves in Chaunskaya Bay, East Siberian Sea. *Okeanologiya (Moscow)*, 29(4), 658-662.
- Galtsoff, P. S. (1961). Physiology of reproduction in molluscs. *American Zoologist*, 273-289.
- García, M. A., González, M., & Espino, M. (1995). Un modelo numérico en elementos finitos para la corriente inducida por la marea. Aplicaciones al Estrecho de Gibraltar. *Revista internacional de métodos numéricos para cálculo y diseño en ingeniería*, 11(3), 383-400.
- García-Gasca, S., & García-Domínguez, F. (1995). Histología comparada del manto marginal y paleal de las almejas *Megapitaria aurantiaca* (Sowerby, 1831) y *M. squalida* (Sowerby, 1835) (Bivalvia: Veneridae). *Anales de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas México*, 40, 173-181.



- Gaspar, M. B., Pereira, A. M., Vasconcelos, P., & Monteiro, C. C. (2004). Age and growth of *Chamelea gallina* from the Algarve coast (southern Portugal): influence of seawater temperature and gametogenic cycle on growth rate. *Journal of Molluscan Studies*, 70(4), 371-377.
- Gayanilo, F.C., Sparre, P. & Pauly, D. (eds.) (2002). FISAT II: FAO-ICLARM Fish Stock Assessment Tools (version 1.0.0). FAO, Rome. World Wide Web Electronic Publications. URL: <http://www.fao.org/fi/statist/fisoft/fisat>.
- Giese, A. C. (1959). Comparative physiology: annual reproductive cycles of marine invertebrates. *Annual review of physiology*, 21(1), 547-576.
- Giribet, G. (2008). Bivalvia. In: *Phylogeny and Evolution of the Mollusca*. Edited by W.F. Ponder and D.R. Lindberg. Berkeley, CA: University of California Press, pp. 105-141.
- Giribet, G. (2015). Morphology should not be forgotten in the era of genomics—a phylogenetic perspective. *Zoologischer Anzeiger-A Journal of Comparative Zoology*, 256, 96-103.
- Giribet, G., & Distel, D. L. (2003). Bivalve phylogeny and molecular data. *Molecular systematics and phylogeography of mollusks*, (3), 45-90.
- Giribet, G., & Wheeler, W. (2002). On bivalve phylogeny: a high-level analysis of the Bivalvia (Mollusca) based on combined morphology and DNA sequence data. *Invertebrate Biology*, 121(4), 271-324.
- Gofas, S., Moreno, D., Salas, C. (coords.) (2011). *Moluscos marinos de Andalucía*. Volumen I, pp. i-xvi, 1-342; Volumen II, pp. i-xii, 343-798. Servicio de Publicaciones e Intercambio Científico, Universidad de Málaga.
- González, V. L., & Giribet, G. (2012). A new cryptic species of carditid bivalve from the Gulf of California (Mollusca, Bivalvia, Archiheterodonta, Carditidae). *Malacologia*, 55(2), 235-250.
- González, V. L., & Giribet, G. (2015). A multilocus phylogeny of archiheterodont bivalves (Mollusca, Bivalvia, Archiheterodonta). *Zoologica Scripta*, 44(1), 41-58.
- Gosling, E. (2003). *Bivalve Molluscs: Biology, Ecology and Culture*. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK. pp. 443.
- Gould, S.J. (1989). *Wonderful Life: the Burgess Shale and the Nature of Life*. Norton. Nueva York. 368 pp.
- Grabowski, J. H., Smith, M., Wells, P., Alexander, M., O Yund, P. (2006). Identification of juvenile groundfish habitat within nearshore waters of the Gulf of Maine. *Final Report Submitted to the National Marine Fisheries Service (NMFS) Northeast Region Office (NERO) Cooperative Research Partners Program (CRPP)*, 82 pp.



- Grey, M., Boulding, E. G., & Brookfield, M. E. (2006). Estimating multivariate selection gradients in the fossil record: a naticid gastropod case study. *Paleobiology*, 32(01), 100-108.
- Griffiths, C.L., & Griffiths, R.J. (1987). Bivalvia. In: Pandian, T.J., Vernberg, F.J. (Eds.), *Animal Energetics, vol. 2*. Academic Press, San Diego, pp. 1-88.
- Grizel, H. (2003). An atlas of histology and cytology of marine bivalve molluscs. *Atlas d'histologie et de cytologie des mollusques bivalves marins*.
- Grizel, H., Comps, M., Bonami, J. R., Cousserans, F., Duthoit, J. L., & Le Pennec, M. A. (1974). Recherche sur l'agent de la maladie de la glande digestive de *Ostrea edulis* Linné. *Science et Pêche*, (240), 7-30.
- Guevara, J. M., & Niell, F. X. (1989). Growth rates in a continuously immersed population of *Cerastoderma edule* L. *Scientia Marina*, 53(2), 483-489.
- Gusev, A. A., & Rudinskaya, L. V. (2014). Shell form, growth, and production of *Astarte borealis* (Schumacher, 1817) (Astartidae, Bivalvia) in the southeastern Baltic Sea. *Oceanology*, 54(4), 458-464.
- Gutiérrez, M. (1967). Coloración histológica para ovarios de peces, crustáceos y moluscos. *Investigación Pesquera*, 31, (2): 265-271.
- Haag, W. R., & Rypel, A. L. (2011). Growth and longevity in freshwater mussels: evolutionary and conservation implications. *Biological Reviews*, 86(1), 225-247.
- Haddock, S. H., Moline, M. A., & Case, J. F. (2010). Bioluminescence in the sea. *Marine Science*, 2.
- Hammer, Ø. (2000). A theory for the formation of commarginal ribs in 430 Mollusc shells by regulative oscillation. *Journal of Molluscan Studies* 66: 384 – 391.
- Hammer, Ø., & Bucher, H. (1999). Reaction-diffusion processes: application for the morphogenesis of ammonoid ornamentation. *Geobios* 32: 841 – 852.
- Harper, E. M. (1997). The molluscan periostracum: an important constraint in bivalve evolution. *Palaeontology*, 40(1), 71-98.
- Hayami, I., & Okamoto, O. (1986). Geometric regularity of some oblique sculptures in pectinid and other bivalves: recognition by computer simulations. *Paleobiology* 12: 433-449.
- Healy, J. M. (1995). Sperm ultrastructure in the marine bivalve families Carditidae and Crassatellidae and its bearing on unification of the Crassatelloidea with the Carditoidea. *Zoologica scripta*, 24(1), 21 – 28.

- Healy, J. M., Buckland-Nicks, J. A., & Jamieson, B. G. (2001). Spermatozoal ultrastructure of spiny oysters (Spondylidae, Bivalvia) including a comparison with other bivalves. *Invertebrate reproduction & development*, 40(1), 27-37.
- Heaslip, W. G. (1968). *Cenozoic evolution of the alticostate venericards in Gulf and east coastal North America*. Paleontological Research Institution.
- HEASLIP W. G. (1969). Sexual dimorphism in bivalves. In *Sexual Dimorphism in Fossil Metazoa and Taxonomic Implications* (ed. G. E. G. Westermann), pp. 6-75. Obermiller), Stuttgart.
- Heller, J. (1993). Hermaproditism in molluscs. *Biological Journal of the Linnean Society*, 48: 19-42.
- Herrmann, M., Lepore, M.L., Laudien, J., Arntz, W.E., Penchaszadeh, P.E. (2009). 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(1), 8-15.
- Hillman, R. E. (1961). Formation of the periostracum in *Mercenaria mercenaria*. *Science*, 134(3492), 1754-1755.
- Ito, K., Goshima, S., & Nakao, S. (1996). Growth and reproduction of the generalist opisthobranch *Haloa japonica*: effect of algal seasonality on growth rate. *Marine Biology*, 126(3), 395-401.
- Jabbour-Zahab, R., Chagot, D., Blanc, F., & Grizel, H. (1992). Mantle histology, histochemistry and ultrastructure of the pearl oyster *Pinctada margaritifera* (L.). *Aquatic Living Resources*, 5(04), 287-298.
- Jarms, G., & Mühlenhardt-Siegel, U. (1998). *Monobrachium parasitum* (Cnidaria: Hydrozoa) epizoic on Antarctic bivalves and its bipolarity. *Zoologische Verhandelingen*, 125-139.
- Jeffreys, J. G. (1867). *British conchology: or, An account of the Mollusca which now inhabit the British Isles and the surrounding seas* (Vol. 4). J. van Voorst.
- Jones, H. L., Todd, C. D., & Lambert, W. J. (1996). Intraspecific variation in embryonic and larval traits of the dorid nudibranch mollusc *Adalaria proxima* (Alder and Hancock) around the northern coasts of the British Isles. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 202(1), 29-47.
- Jong – Brink, M. de, Boer, H. & Joosse, J. (1983). Mollusca. In: Adiyodi, K.G. & R. G. Adiyodi (Edit.) *Reproductive biology of invertebrates. Oogenesis, oviposition and oosorption*. J. Wiley, Chichester, New York. 1: 297-355.

- Jurić, I., Bušelić, I., Ezgeta-Balić, D., Vrgoč, N., & Peharda, M. (2012). Age, Growth and Condition Index of *Venerupis decussata* (Linnaeus, 1758) in the Eastern Adriatic Sea. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 12, 613-618.
- Kabat, A. R. (1985). The allometry of brooding in *Transennella tantilla* (Gould) (Mollusca: Bivalvia). *Journal of experimental marine biology and ecology*, 91(3), 271-279.
- Kadar E, Lobo-da-Cunha A, Azevedo C, (2009). Mantle-to-shell CaCO₃ transfer during shell repair at different hydrostatic pressures in the deep-sea vent mussel *Bathymodiolus azoricus* (Bivalvia : Mytilidae). *Marine Biology*, 156, 959-967
- Kauffman, E. G., & Buddenhagen, C. H. (1969). Protandric Sexual Dimorphism in Paleocene *Astarte* (Bivalvia) of Maryland. *Sexual dimorphism in fossil Metazoa and taxonomic implications*. Stuttgart, Schweizerbart, 76-93.
- Kautsky, N. (1982). Growth and size structure in a Baltic *Mytilus edulis* population. *Marine Biology*, 68: 117–133.
- Kawaguti, S. (1962). Electron microscopy on the mantle of the bivalved gastropod. *Biological Journal of Okayama University*, 8(1).
- Kawakami, K., & Yasuzumi, G. (1964). Electron microscope studies on the mantle of the pearl oyster *Pinctada martensii* Dunker. Preliminary Report. The fine structure of the periostracum fixed with permanganate. *Journal of Electron Microscopy*, 13(3), 119-123.
- Keller, N., Del Piero, D., Longinelli, A. (2002). Isotopic composition, growth rates and biological behaviour of *Chamelea gallina* and *Callista chione* from the Gulf of Trieste (Italy). *Marine Biology* 140, 9–15.
- Kelley, P. H. (1980). Sexual dimorphism in Miocene Coastal Plain *Astarte* populations. *Journal of the Mississippi Academy of Sciences* 25, 4-13.
- Kessel, E. (1943). Über periostracum-bildung. *Zeitschrift für Morphologie und Ökologie der Tiere*, 40(1-3), 348-360.
- Kilgour, B. W., & Mackie, G. L. (1990). Relationships between reproductive output and shell morphometrics of the pill clam, *Pisidium casertanum* (Bivalvia: Sphaeriidae). *Canadian Journal of Zoology*, 68(7), 1568-1571.
- King O. D. & Masel, J. (2007). The evolution of bet-hedging adaptations to rare scenarios. *Theoretical Population Biology*, vol. 72, issue 4, pp. 560–575.
- Kocot, K. M. (2013). Recent Advances and Unanswered Questions in Deep Molluscan Phylogenetics. *American Malacological Bulletin*, 31(1), 195-208.
- Kocot, K. M., Cannon, J. T., Todt, C., Citarella, M. R., Kohn, A. B., Meyer, A., et al. (2011). Phylogenomics reveals deep molluscan relationships. *Nature*, 477(7365), 452-456.

- Kraeuter, J. N., & Castagna, M. (2001). Anatomy and Histology of *Mercenaria mercenaria*. *Biology of the Hard Clam*, 31, 117.
- Lacombe, H. (1971). Le détroit de Gibraltar, océanographie physique. *Notes et Mémoires du Service Géologique de Marocco*, 222, 111-146.
- Lacombe, H. and C. Richez (1982) The regime of the Strait of Gibraltar. In: *Hydrodynamics of Semi-enclosed Seas*. Ed. J.C.J. Nihoul, Elsevier, 13-73.
- Lane, D. J. W., & Nott, J. A. (1975). A study of the morphology, fine structure and histochemistry of the foot of the pediveliger of *Mytilus edulis* L. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 55(02), 477-495.
- Lankester, E.R. (1900). Mollusca. In: *Treatise on Zoology* (P. Pelseneer, ed.), Part 5, pp. 205-284. Black, London.
- Lauckner, G. (1987). Ecological effects of larval trematode infestation on littoral marine invertebrate populations. *International Journal for Parasitology*, 17(2), 391-398.
- Leonard, J.L. (2013). Williams' paradox and the role of phenotypic plasticity in sexual systems. *Integrative and Comparative Biology*, 53 (4): 671-688.
- Linse, K., & Page, T. J. (2003). Evidence of brooding in Southern Ocean limid bivalves. *Journal of molluscan studies*, 69(3), 290-293.
- Liñán, E., Gámez-Vintaned, J.A. y Gozalo, R. (2009). Origen y diversificación de los animales pluricelulares. In: Martínez Chacón, M.L. y Rivas, P. (eds.) *Paleontología de Invertebrados*. Sociedad Española de Paleontología, Instituto Geológico y Minero de España, Universidad de Oviedo, Universidad de Granada. 13-31.
- Lubet, P. (1959). Recherches sur le cycle sexuel et l'émission des gamètes chez les Mytilides et les Pectinides. *Rev. Trav. Inst. Pêches marit.* 23 (4): 388-545.
- Lubet, P., & Aloui, N. (1987). Limites létales thermiques et action de la température sur les gamétogenèses et l'activité neurosecrétrice chez la moule (*Mytilus edulis* et *Mytilus galloprovincialis*, mollusque bivalve). *Haliotis*, 16, 309-316.
- MacDonald, B. A., & Thompson, R. J. (1988). Intraspecific variation in growth and reproduction in latitudinally differentiated populations of the giant scallop *Placopecten magellanicus* (Gmelin). *The Biological Bulletin*, 175(3), 361-371.
- Marin, F., & Luquet, G. (2004). Molluscan shell proteins. *Comptes Rendus Palevol*, 3(6), 469-492.
- Marin, F., Luquet, G., Marie, B., & Medakovic, D. (2007). Molluscan shell proteins: primary structure, origin, and evolution. *Current topics in developmental biology*, 80, 209-276.



- Marin, F., Le Roy, N., & Marie, B. (2012). The formation and mineralization of mollusk shell. *Front Biosci*, 4, 1099-1125.
- Marincovich, L., & Gladenkov, A. Y. (1999). Evidence for an early opening of the Bering Strait. *Nature*, 397(6715), 149-151.
- McDougall, C., Green, K., Jackson, D. J., & Degnan, B. M. (2011). Ultrastructure of the mantle of the gastropod *Haliotis asinina* and mechanisms of shell regionalization. *Cells Tissues Organs*, 194(2-4), 103-107.
- Meinhardt, H. (1995). The algorithmic beauty of sea shells Springer-Verlag. *Heidelberg, New-York*.
- Meinhardt, H., & Klinder, M. (1987). A model for pattern formation on the shell of molluscs. *Journal of Theoretical Biology* 126: 63 – 89.
- Michaelidis, B., Ouzounis, C., Palaras, A., & Pörtner, H. O. (2005). Effects of long-term moderate hypercapnia on acid-base balance and growth rate in marine mussels *Mytilus galloprovincialis*. *Marine Ecology Progress Series*, 293(2), 109-18.
- Mikkelsen, P. M., & Bieler, R. (2008). *Seashells of southern Florida: living marine mollusks of the Florida Keys and adjacent regions, Bivalves* (p. 503). Princeton: Princeton University Press.
- Millot, C. (1999). Circulation in the western Mediterranean Sea. *Journal of Marine Systems*, 20(1), 423-442.
- Millot, C. (2009). Another description of the Mediterranean Sea outflow. *Progress in Oceanography*, 82(2), 101-124.
- Minas, H.J., Coste, B., y Minas, M. (1984). Océanographie de détroit de Gibraltar et des parages annexes. *Le courrier du CNRS*, 57, 10–17.
- Moran, N. A., & Baumann, P. (2000). Bacterial endosymbionts in animals. *Current opinion in microbiology*, 3(3), 270-275.
- Moran, A. L., & McAlister, J. S. (2009). Egg size as a life history character of marine invertebrates: is it all it's cracked up to be? *The Biological Bulletin*, 216(3), 226-242.
- Morse, M. P., & Zardus, J. D. (1997). Bivalvia. *Microscopic anatomy of invertebrates*, 6, 7-118.
- Morton, B. (2000). The anatomy of *Callocardia hungerfordi* (Bivalvia: Veneridae) and the origin of its shell camouflage. *Journal of Molluscan Studies*, 66(1), 21-30.
- Morton, J. E. (1960). *Molluscs: an introduction to their form and functions*. Harper Torchbooks.



- Mount, A.S., Wheeler, A.P., Paradkar, R.P., & Snider, D. (2004). Hemocyte-mediated Shell mineralization in the Eastern oyster. *Science* 304:297–300.
- Moura, P., Gaspar, M. B., & Monteiro, C. C. (2009). Age determination and growth rate of a *Callista chione* population from the southwestern coast of Portugal. *Aquatic Biology*, 5, 97-106.
- Nardelli, B. B., Pisano, A., Tronconi, C., & Santoleri, R. (2015). Evaluation of different covariance models for the operational interpolation of high resolution satellite Sea Surface Temperature data over the Mediterranean Sea. *Remote Sensing of Environment*, 164, 334-343.
- Neff, J. M. (1972). Ultrastructural studies of periostracum formation in the hard shelled clam *Mercenaria mercenaria* (L). *Tissue and cell*, 4(2), 311-326.
- Newell, R. I. E. (2004). Ecosystem influences of natural and cultivated populations of suspension-feeding bivalve molluscs: A review. *Journal of Shellfish Research*, 23:51-61.
- Nielsen, L. F., Moe, D., Kirkeby, S., & Garbarsch, C. (1998). Sirius red and acid fuchsin staining mechanisms. *Biotechnic & histochemistry*, 73(2), 71-77.
- Nicol, D. (1955). Morphology of Astartella, a primitive heterodont pelecypod. *Journal of Paleontology*, 29, 155-158.
- Nishiguchi, M. K., Ruby, E. G., & McFall-Ngai, M. J. (1998). Competitive dominance among strains of luminous bacteria provides an unusual form of evidence for parallel evolution in sepiolid squid-vibrio symbioses. *Applied and environmental microbiology*, 64(9), 3209-3213.
- Ockelmann, W. K. (1958). *The zoology of east Greenland: marine Lamellibranchiata* (Vol. 18). Bianco Lunos Bogtrykkeri A/S.
- Ockelmann, K. W. (1965). *Developmental types in marine bivalves and their distribution along the Atlantic coast of Europe* (pp. 25-35). Marine Biological Laboratory.
- Olive, P. J. W. (1985). Physiological adaptation and the concepts of optimal reproductive strategy and physiological constraint in marine invertebrates. In Laverack, M. S. (ed.) *Physiological Adaptations of Marine Animals. Symposia of the Society for Experimental Biology*, No. 39. The company of Biologists Ltd., Cambridge, England: 267–300.
- Olofsson, H., Ripa, J., Jonzen, N. (2009). Bet-hedging as an evolutionary game: the trade-off between egg size and number. *Proceedings of the Royal Society B* 276, 2963–2969.
- Owen, G., & McCrae, J. M. (1979). Sensory cell/gland cell complexes associated with the pallial tentacles of the bivalve *Lima hians* (Gmelin), with a note on specialized cilia on the pallial curtains. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 287(1017), 45-62.

- Paillard, C., & Le Pennec, M. (1993). Ultrastructural studies of the mantle and the periostracal lamina in the manila clam, *Ruditapes philippinarum*. *Tissue and Cell*, 25(2), 183-194.
- Parrilla, G., Kinder, T. H., & Preller, R. H. (1986). Deep and intermediate Mediterranean water in the western Alboran Sea. *Deep Sea Research Part A. Oceanographic Research Papers*, 33(1), 55-88.
- Parrilla, G., & Kinder, T. H. (1987). Oceanografía física del mar de Alborán. *Boletín del Instituto Español de Oceanografía*, 4(1), 133-165.
- Pauly, D. (1980). On the interrelationships between natural mortality, growth parameters, and mean environmental temperature in 175 fish stock. *Journal du Conseil International pour l'Exploration de la Mer* 39: 175-192.
- Peharda, M., Richardson, C. A., Onofri, V., Bratoš, A., & Crnčević, M. (2002). Age and growth of the bivalve *Arca noae* L. in the Croatian Adriatic Sea. *Journal of molluscan studies*, 68(4), 307-310.
- Peharda, M., Richardson, C. A., Mladineo, I., Šestanović, S., Popović, Z., Bolotin, J., & Vrgoč, N. (2007). Age, growth and population structure of *Modiolus barbatus* from the Adriatic. *Marine Biology*, 151(2), 629-638.
- Peharda, M., Ezgeta-Balić, D., Radman, M., Sinjkević, N., Vrgoč, N., & Isajlović, I. (2012). Age, growth and population structure of *Acanthocardia tuberculata* (Bivalvia: Cardiidae) in the eastern Adriatic Sea. *Scientia Marina*, 76(1), 59-66.
- Peharda, M., Popović, Z., Ezgeta-Balić, D., Vrgoč, N., Puljas, S., & Frankić, A. (2013). Age and growth of *Venus verrucosa* (Bivalvia: Veneridae) in the eastern Adriatic Sea. *Cah Biol Mar*, 54, 281-286.
- Pelseneer, P. (1911). Les lamellibranches de l'expédition du Siboga. *Siboga Expeditie, Livre, 61, Monographie 53a*, 125 pp.
- Pèrés, J.M. (1982). Major benthics assemblages. *Marine Ecology*, 5, parte1 : 373-521. Ed. O. Kinne.
- Perkins, H., Kinder, T., & Violette, P. L. (1990). The Atlantic inflow in the western Alboran Sea. *Journal of Physical Oceanography*, 20(2), 242-263.
- Peterson, G. H. (2001). Studies on some Arctic and Baltic *Astarte* species (Bivalvia, Mollusca). Meddelelser om Gronland, *Bioscience*, 52, Copenhagen, The Danish Polar Center. pp. 1-71.
- Philippi, T., & Seger, J. (1989). Hedging one's evolutionary bets, revisited. *Trends in Ecology & Evolution*, 4(2), 41-44.



- Pina, S., Barandela, T., Santos, M. J., Russell-Pinto, F., & Rodrigues, P. (2009). Identification and description of *Bucephalus minimus* (Digenea: Bucephalidae) life cycle in Portugal: morphological, histopathological, and molecular data. *Journal of Parasitology*, 95(2), 353-359.
- Plazzi, F., Ceregato, A., Taviani, M., & Passamonti, M. (2011). A molecular phylogeny of bivalve mollusks: ancient radiations and divergences as revealed by mitochondrial genes. *PLoS One*, 6(11), e27147.
- Podolsky, R. D. (2001). Evolution of egg target size: an analysis of selection on correlated characters. *Evolution*, 55(12), 2470-2478.
- Podolsky, R. D. (2004). Life-history consequences of investment in free - spawned eggs and their accessory coats. *The American Naturalist*, 163(5), 735-753.
- Poppe, G.T. & Goto, Y. (1993). *European seashells: 2. (Scaphopoda, Bivalva, Cephalopoda)*. ConchBooks: Hackenheim, Germany. 221 pp.
- Purchon, R. D. (1958). The stomach in the Eulamellibranchia; stomach type IV. In *Proceedings of the Zoological Society of London* (Vol. 131, No. 4, pp. 487-525). Blackwell Publishing Ltd.
- Purchon, R. D. (1968). *The biology of the Mollusca*. Pergamon Press, Oxford, England. 560 pp.
- Qian, P. Y., & Chia, F. S. (1992). Effect of aging on reproduction in a marine polychaete *Capitella sp.* *Journal of experimental marine biology and ecology*, 156(1), 23-38.
- Ramirez Llodra, E. (2002). Fecundity and life-history strategies in marine invertebrates. *Advances in Marine Biology*, 43, pp. 87-170.
- Ramón, M. (1993). Estudio de las poblaciones de *Chamelea gallina* (Linnaeus, 1758) y *Donax trunculus* (Linnaeus, 1758)(Mollusca: Bivalvia) en el Golfo de Valencia (Mediterraneo Occidental). *University of Barcelona*.
- Raven, C. P. (1961). Oogenesis: the storage of developmental information. *International series of monographs on pure and applied biology; Zoology Division* (Vol. 10).
- Richardson, C.A. (2001). Molluscs as archives of environmental change. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review*, 39: 103-164.
- Richardson, C. A., Runham, N. W., & Crisp, D. J. (1981). A histological and ultrastructural study of the cells of the mantle edge of a marine bivalve, *Cerastoderma edule*. *Tissue and Cell*, 13(4), 715-730.
- Ridewood, W.G. (1903). On the structure of the gills of lamellibranchs. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 195: 194-284.

- Ridgway, I. D., Richardson, C. A., & Austad, S. N. (2011). Maximum shell size, growth rate, and maturation age correlate with longevity in bivalve molluscs. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 66(2), 183-190.
- Roper, C. F. E. (2016). Architeuthidae Pfeffer 1900, *Architeuthis* Steenstrup 1857. *Architeuthis dux* Steenstrup, 1857. http://tolweb.org/Architeuthis_dux/19408/2016.02.27 in The Tree of Life Web Project.
- Ropes, J. W. (1984). Procedures for preparing acetate peels and evidence validating the annual periodicity of growth lines formed in the shells of ocean quahogs, *Arctica islandica*. *Marine Fisheries Review*, 46(2), 27-35.
- Ruby, E. G. (1996). Lessons from a cooperative, bacterial-animal association: the *Vibrio fischeri*-*Euprymna scolopes* light organ symbiosis. *Annual Reviews in Microbiology*, 50(1), 591-624.
- Ruddell, C. L. (1977). Histopathological Studies on Twelve Benthic Invertebrates from the Middle Atlantic Outer Continental Shelf. *Special Report in Applied Marine Science and Ocean Engineering*, nº 179 (10). Virginia Institute of Marine Science.
- Rueda, J. L. (1998). Estudio de los moluscos de fondos blandos infralitorales de la bahía de Barbate (Cadiz). *Tesis de Licenciatura. Universidad de Málaga*, pp.224.
- Rueda, J. L., & Salas, C. (2003). Temporal dynamics of molluscan assemblages from soft and bioclastic bottoms in the Strait of Gibraltar. *Cahiers de biologie marine*, 44(3), 237-248.
- Runham, N.W. (1992). Mollusca. In: *Reproductive Biology of Invertebrates*. Vol. 5. *Sexual Differentiation and Behaviour*. In Adiyodi KG and Adiyodi RG (Eds.) pp: 193-229.
- Ruthensteiner, B., Schröpel, V., & Haszprunar, G. (2010). Anatomy and affinities of *Micropilina minuta* Warén, 1989 (Monoplacophora: Micropilinidae). *Journal of Molluscan Studies*, 76(4), 323-332.
- Salas, C., & Gofas, S. (1997). Brooding and non-brooding *Dacrydium* (Bivalvia: Mytilidae): a review of the Atlantic species. *Journal of molluscan Studies*, 63(2), 261-283.
- Salas, C., & Hergueta, E. (1990). The functional morphology of the alimentary canal of *Donax venustus* Poli and *D. semistriatus* Poli. In: *The Bivalvia: Proceedings of a Memorial Symposium in Honour of Sir Charles Maurice Yonge* (Vol. 1, p. 213). Hong Kong University Press.
- Salas, C., Marina, P., Checa, A.G., Rueda, & J.L. (2012). The periostracum of *Digitaria digitaria* (Bivalvia: Astartidae): formation and structure. *Journal of Molluscan Studies* 78: 34 – 43.
- Saleuddin, A. S. M. (1964). The gonads and reproductive cycle of *Astarte sulcata* (Da Costa) and sexuality in *A. elliptica* (Brown). *Journal of Molluscan Studies*, 36(3), 141-148.

- Saleuddin, A. S. M. (1965). The mode of life and functional anatomy of *Astarte* spp. (Eulamellibranchia). *Journal of Molluscan Studies*, 36(4), 229-257.
- Saleuddin, A. S. M. (1967). Notes on the functional anatomy of three North American species of *Astarte*, *A. undata* Gould, *A. castanea* Say and *A. esquimalti* Baird. *Journal of Molluscan Studies*, 37(6), 381-384.
- Saleuddin, A. S. M. (1974). An electron microscopic study of the formation and structure of the periostracum in *Astarte* (Bivalvia). *Canadian Journal of Zoology*, 52(12), 1463-1471.
- Saleuddin, A. S. M. (1979). Shell formation in molluscs with special reference to periostracum formation and shell regeneration. *Pathways in Malacology*. Junk, The Hague, 47-81.
- Saleuddin, A.S.M. & Petit, H.P. (1983). The mode of formation and the structure of the periostracum. *The Mollusca*, 4, 199–234. Academic Press, New York.
- Sastry, A.N. (1979). Pelecypoda (excluding Ostreidae). In: *Reproduction of Marine Invertebrates*, vol. 5. Molluscs: Pelecypods and Lesser Classes. Giese AC & Pearse JS (Eds.) pp. 113–292. Academic Press, New York.
- Savazzi, E. (1990). Biological aspects of theoretical shell morphology. *Lethaia* 23: 195–212.
- Savazzi, E. (1998). The color patterns of cypraeid gastropods. *Lethaia* 31:15 – 27.
- Schander, C., 2001. When few become many—on a difficult group of bivalves. Review of G. Høpner Petersen 2001: Studies on some Arctic and Baltic *Astarte* species (Bivalvia, Mollusca). Meddelelser om Grønland. Bioscience 52. Copenhagen: Danish Polar Center. 71 pp. ISBN 87-90369-43-2. *Book Reviews 2001: Polar Research* 20(1), 119-120
- Scherholz, M., Redl, E., Wollesen, T., Todt, C., & Wanninger, A. (2013). Aplacophoran mollusks evolved from ancestors with polyplacophoran-like features. *Current Biology*, 23(21), 2130-2134.
- Schöne, B. R., Fiebig, J., Pfeiffer, M., Gleß, R., Hickson, J., Johnson, A. L., Dreyer, W. & Oschmann, W. (2005a). Climate records from a bivalved Methuselah (*Arctica islandica*, Mollusca; Iceland). *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 228(1), 130-148.
- Schöne, B. R., Houk, S. D., Castro, A. D. F., Fiebig, J., Oschmann, W., Kröncke I., Dreyer, W. & Gosselck, F. (2005b). Daily growth rates in shells of *Arctica islandica*: assessing sub-seasonal environmental controls on a long-lived bivalve mollusk. *Palaios*, 20(1), 78-92.
- Seed, R. (1969). The ecology of *Mytilus edulis* L. (Lamellibranchiata) on exposed rocky shores. *Oecologia*, 3(3-4), 277-316.
- Seed, R. (1976). Ecology. In: *Marine mussels: their ecology and physiology* (B.L. Bayne, ed.), 13–65. Cambridge University Press, Cambridge.

- Seed, R., & Brown, R. A. (1978). Growth as a strategy for survival in two marine bivalves, *Cerastoderma edule* and *Modiolus modiolus*. *The Journal of Animal Ecology*, 283-292.
- Seger, J. & Brockman, H.J. (1987). What is bet-hedging? In: Harvey, P.H., Partridge, L. (Eds.), *Oxford Surveys in Evolutionary Biology*. Oxford University Press, Oxford, pp. 182–211.
- Seilacher, A. (1972a). Divaricate patterns in pelecypod shells. *Lethaia* 5: 325 – 343.
- Seilacher, A. (1972b). Fabricational Noise in Adaptative Morphology. *Systematic Zoology* 22: 451 – 465.
- Seilacher, A. (1973). Fabricational noise in adaptive morphology. *Systematic Biology*, 22(4), 451-465.
- Seilacher, A. (1984). Constructional morphology of bivalves: evolutionary pathways in primary versus secondary soft-bottom dwellers. *Palaeontology*, 27(2), 207-237.
- Seilacher, A. (1991). Self-organizing mechanisms in morphogenesis and evolution. In: Schmidt-Kittler N, Vogel K, editors. *Constructional morphology and evolution*. Berlin: Springer-Verlag. pp. 251 – 271.
- Selin, N. I. (2007). Shell form, growth and life span of *Astarte arctica* and *A. borealis* (Mollusca: Bivalvia) from the subtidal zone of northeastern Sakhalin. *Russian Journal of Marine Biology*, 33(4), 232-237.
- Sellmer, G. (1967). Functional morphology and ecological life history of the gem clam, *Gemma gemma* (Eulamellibranchia: Veneridae). *Malacologia*, 5: 137–223.
- Selwood, L. (1968). Interrelationship between developing oocytes and ovarian tissues in the chiton *Sypharochiton septentriones* (Ashby) (Mollusca, Poliplacophora). *Journal of Morphology*, 125: 71-104.
- Seoane–Camba, J. (1965). Estudios sobre las algas bentónicas en la costa sur de la Península Ibérica (litoral de Cádiz). *Investigación Pesquera*, 29, 3–216.
- Sharma, P. P., González, V. L., Kawauchi, G. Y., Andrade, S. C., Guzmán, A., Collins, T. M., et al. (2012). Phylogenetic analysis of four nuclear protein-encoding genes largely corroborates the traditional classification of Bivalvia (Mollusca). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 65(1), 64-74.
- Sheffield, G., & Grebmeier, J. M. (2009). Pacific walrus (*Odobenus rosmarus divergens*): differential prey digestion and diet. *Marine Mammal Science*, 25(4), 761-777.
- Shelley, C. C., Glazebrook, J. S., Turak, E., Winsor, L., & Denton, G. R. W. (1988). Trematode (Digenea: Bucephalidae) infection in the burrowing clam *Tridacna crocea* from the Great Barrier Reef. *Diseases of Aquatic Organisms*, 4, 143-147.



- Shepherd, J. G. (1987). A weakly parametric method for estimating growth parameters from length composition data. In *Length-based methods in fisheries research. ICLARM Conference Proceedings* (Vol. 13, No. 468, pp. 113-119).
- Sigurdsson, J. B. (1976). The dispersal of young post-larval bivalve molluscs by byssus threads. *Nature*, 262, 386-387.
- Silverman, H. G., & Roberto, F. F. (2006). *U.S. Patent No. 6,987,170*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Silverman, H. G., & Roberto, F. F. (2007). Understanding marine mussel adhesion. *Marine Biotechnology*, 9(6), 661-681.
- Simoncelli, S., Bonaduce A. & Tonani, M. (2015). Medsea Reanalysis Phys 006_004. Quality Information Document for Mediterranean Sea Physical Reanalysis Product. Issue: 5.2. Copernicus Marine Environment Monitoring Service.
- Skazina, M., Sofronova, E., & Khaitov, V. (2013). Paving the way for the new generations: *Astarte borealis* population dynamics in the White Sea. *Hydrobiologia*, 706(1), 35-49.
- Slatkin, M. (1974). Hedging one's evolutionary bets. *Nature* 250, 704-705.
- Smeathers, J. E., & Vincent, J. F. V. (1979). Mechanical properties of mussel byssus threads. *Journal of Molluscan Studies*, 45(2), 219-230.
- Smith, E.A. (1881). Observations on the genus *Astarte*, with a list of the known recent species. *Journal of Conchology*, 3: 196-232.
- Smith, S. A., Wilson, N. G., Goetz, F. E., Feehery, C., Andrade, S. C., Rouse, G. W., Giribet, G. & Dunn, C. W. (2011). Resolving the evolutionary relationships of molluscs with phylogenomic tools. *NATURE*, 480, 15.
- Sowerby, G. B. II (1874). Monograph of the genus *Astarte*. In: Reeve L.A., Sowerby G. B. II (eds.) *Conchologia Iconica: or, illustrations of the shells of molluscous animals*. L Reeve & Co., London.
- Sparre, P. & Venema S.C. (1997). Introduction to tropical fish stock assesment-Part I: Manual. *FAO Fisheries Technical Paper, No. 306/1*, Rome, 420 pp.
- Stanley, S.M. (1975). Why clam have the shape they have: an experimental analysis of burrowing. *Paleobiology* 1: 48 – 58.
- Stanley, S.M. (1981). Infaunal survival: alternative functions of shell ornamentation in the *Bivalvia* (Mollusca). *Paleobiology* 7: 384 – 393.
- Stasek, C.R. (1963). Synopsis and Discussion of the Association of Ctenidia and Labial Palps in the *Bivalvia* Mollusca. *The Veliger*, vol. 6, nº. 2: 91-97.

- Stevenson, R. E. (1977). Huelva front and Malaga, Spain, eddy chain as defined by satellite and oceanographic data. *Deutsche Hydrografische Zeitschrift*, 30(2), 51-53.
- Stone, H.M.I. (1998). *The functional morphology and evolution of pronounced Shell ornament in epifaunal bivalves*. Unpublished D.Phil. Thesis, Cambridge University, Cambridge, pp 1 – 271.
- Strathmann, R. R., & Strathmann, M. F. (1982). The relationship between adult size and brooding in marine invertebrates. *American Naturalist*, 119, 91-101.
- Strathmann, R. R., Strathmann, M. F., & Emson, R. H. (1984). Does limited brood capacity link adult size, brooding, and simultaneous hermaphroditism? A test with the starfish *Asterina phylactica*. *American Naturalist*, 123, 796-818.
- Sundet, J. H., & Berenboim, B. I. (2008). Research on the red king crab (*Paralithodes camtschaticus*) from the Barents Sea in 2005–2007. *IMR / PINRO Joint Report Series*, 3, 71 PP.
- Suzuki, T., Yoshinaka, S., Mizuta, S., Funakoshi, S., & Wada, K. (1991). Extracellular matrix formation by amebocytes during epithelial regeneration in the pearl oyster *Pinctada fucata*. *Cell Tissue Research* 266: 75–82.
- Swain, D. P. (2011). Life-history evolution and elevated natural mortality in a population of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Evolutionary Applications*, 4(1), 18-29.
- Taylor, C.C. (1960). Temperature, growth and mortality, of the Pacific cockle. *Journal du Conseil* 26: 117-124.
- Taylor, J. D., Glover, E. A., Williams, S. T., Wells, F. E., Walker, D. I., & Kendrick, G. A. (2005). Another bloody bivalve: anatomy and relationships of *Eucrassatella donacina* from south Western Australia (Mollusca: Bivalvia: Crassatellidae). *The Marine Flora and Fauna of Esperance, Western Australia*, pp. 261–288.
- Taylor, J. D., Williams, S. T., Glover, E. A., & Dyal, P. (2007). A molecular phylogeny of heterodont bivalves (Mollusca: Bivalvia: Heterodonta): new analyses of 18S and 28S rRNA genes. *Zoologica Scripta*, 36(6), 587-606.
- Tëmkin, I., & Strong, E. E. (2013). New insights on stomach anatomy of carnivorous bivalves. *Journal of Molluscan Studies*, 79(4), 332-339.
- Terwilliger, R. C. & Terwilliger N. B. (1985). Molluscan hemoglobins. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 81B: 255 – 261.
- Thayer, C. W. (1983). Sediment-mediated biological disturbance and the evolution of marine benthos. In *Biotic interactions in Recent and fossil benthic communities* (Tevesz, M.J.S. & McCall, P.L., eds.). Plenum Press, New York, pp. 497 – 625.

- Thorson, G. (1950). Reproductive and larval ecology of marine bottom invertebrates. *Biological reviews*, 25(1), 1-45.
- Tirado, C., & Salas, C. (1998). Reproduction and fecundity of *Donax trunculus* L., 1758 (Bivalvia: Donacidae) in the littoral of Malaga (Southern Spain). *Journal of Shellfish Research*, 17(1), 169-176.
- Tirado, C., Salas, C., & Marquez, I. (2003). Reproduction of *Venus verrucosa* L., 1758 (Bivalvia: Veneridae) in the littoral of Malaga (southern Spain). *Fisheries research*, 63(3), 437-445.
- Tranter, D.J. (1958). Reproduction in Australian pearl oyster (Lamellibranchia). II *Pinctada albina* (Lamarck): Gametogenesis. *Australian Journal of Marine & Freshwater Research*, 9, 144 – 158.
- Tsujii, T. (1960). Studies on the mechanism of shell-and pearl-formation in Mollusca. *Journal of the Faculty of Fisheries. Prefectural University of Mie*, 5(1).
- Tsuji, F. I. (1983). Molluscan bioluminescence. *Environmental Biochemistry and Physiology, The Mollusca*, 2, 257-279.
- Ubukata, T. (1997). Mantle kinematics and formation of commarginal shell sculpture in Bivalvia. *Paleontological Research* 1: 132 – 143.
- Ubukata, T. (2003). Pattern of growth rate around aperture and shell form in Bivalvia: a theoretical morphological study. *Paleobiology* 29:480 – 491.
- Ubukata, T. (2005). Theoretical morphology of bivalve shell sculptures. *Paleobiology* 31(4): 643 – 656.
- Urta, J., Gofas, S., Rueda, J.L., & Marina, P. (2011). Molluscan assemblages in the littoral soft bottoms of the Alboran Sea (Western Mediterranean Sea). *Marine Biology Research* 7: 27 – 42.
- Varea, M., Clavel, A., Doiz, O., Castillo, F. J., Rubio, M. C., & Gómez-Lus, R. (1998). Fuchsin fluorescence and autofluorescence in *Cryptosporidium*, *Isospora* and *Cyclospora* oocysts. *International journal for parasitology*, 28(12), 1881-1883.
- Vecchio, K. S., Zhang, X., Massie, J. B., Wang, M., & Kim, C. W. (2007). Conversion of bulk seashells to biocompatible hydroxyapatite for bone implants. *Acta biomaterialia*, 3(6), 910-918.
- Vermeij, G.J. (1977). The Mesozoic marine revolution: evidence from snails, predators and grazers. *Paleobiology* 2: 245 – 258.
- Villalba, A. (1995). *Estudio de la marteiliasis del mejillón. Efectos de esta enfermedad en el mejillón cultivado en las rías gallegas*. Estudio y Trabajos. Xunta de Galicia, 139 pp.

- Vinther, J., Sperling, E. A., Briggs, D. E., & Peterson, K. J. (2012). A molecular palaeobiological hypothesis for the origin of aplacophoran molluscs and their derivation from chiton-like ancestors. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 279(1732), 1259-1268.
- Wada, K. (1968). Electron microscopic observations of the formation of the periostracum of *Pinctada fucata*. *Bulletin of the National Pearl Research Laboratory*, 13, 1540-1560.
- Waite, J. H. (1983). Quinone-tanned scleroproteins. *The mollusca*, 1, 467-504.
- Waite, J. H., Saleuddin, A. S. M., & Andersen, S. O. (1979). Periostracin—A soluble precursor of sclerotized periostracum in *Mytilus edulis* L. *Journal of comparative physiology*, 130(4), 301-307.
- Waller, T.R. (1986). A new genus and species of scallop (Bivalvia: Pectinidae) from off Somalia, and the definition of a new tribe Decatopectinini. *Nautilus* 100, 39 – 46.
- Wang, D. Y. C., S. Kumar y S. B. Hedges (1999). «Divergence time estimates for the early history of animal phyla and the origin of plants, animals and fungi». *Proceedings of the Royal Society of London, Series B, Biological Sciences*, 266 (1415): 163–171.
- Waterbury, J. B., & Stanier, R. Y. (1978). Patterns of growth and development in pleurocapsalean cyanobacteria. *Microbiological Reviews*, 42(1), 2.
- Westbroek, P., & Marin, F. (1998). A marriage of bone and nacre. *Nature*, 392(6679), 861-862.
- Wilson, N. G., Rouse, G. W., & Giribet, G. (2010). Assessing the molluscan hypothesis Serialia (Monoplacophora+ Polyplacophora) using novel molecular data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 54(1), 187-193.
- Wisshak, M., Correa, M. L., Gofas, S., Salas, C., Taviani, M., Jakobsen, J., & Freiwald, A. (2009). Shell architecture, element composition, and stable isotope signature of the giant deep-sea oyster *Neopycnodonte zibrowii* sp. n. from the NE Atlantic. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 56(3), 374-407.
- Wolowicz, M. (1987). A comparative study of a reproductive cycle of cockles *Cardium glaucum* (Poiret 1789) and *C. hauniense* (Petersen, Russell 1971)(Bivalvia), from Gdansk Bay. *Pol. Arch. Hydrobiol*, 34(1), 91-105.
- Yang, D., Huang, P., Pan, B., & Mo, Y. (2010). Inter-prismatic matrix structure characterization of mollusk shell and its effect on crystal formation. *Nano Biomedicine and Engineering*, 2(4), 218-224.
- Yonge, C. M. (1957). Mantle fusion in the Lamellibranchia. *Pubblcazioni della Stazione Zoologica di Napoli*, 29, 151-171.

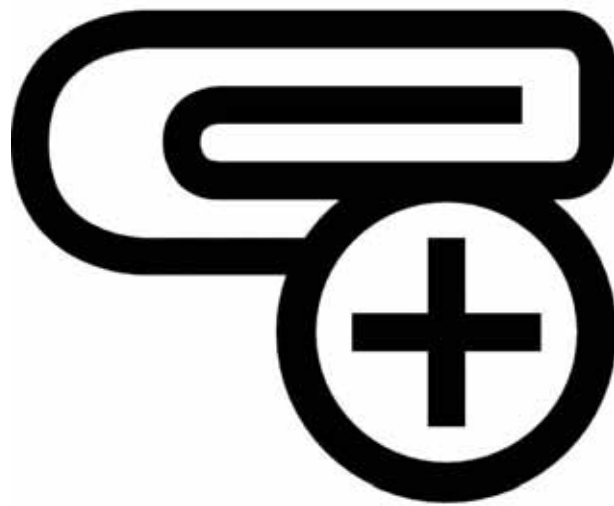


- Yonge, C. M. (1969). Functional morphology and evolution within the Carditacea (Bivalvia). *Proceedings of the Malacological Society of London*, 38: 493-527.
- Zhang, C., Xie, L., Huang, J., Chen, L., & Zhang, R. (2006). A novel putative tyrosinase involved in periostracum formation from the pearl oyster (*Pinctada fucata*). *Biochemical and biophysical research communications*, 342(2), 632-639.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

ANEXOS





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

ANEXO I: PROTOCOLOS DE TÉCNICAS HISTOLÓGICAS Y MEDIOS DE CULTIVO MICROBIOLÓGICOS.

Tabla A1.1. Protocolo adaptado para la técnica de inclusión en parafina de ejemplares del bivalvo *D. digitaria*.

Tratamiento	Nº de pasos	Tiempo (minutos)
Lavado en agua destilada	3	5
Alcohol etílico de 30º	2	5
Alcohol etílico de 50º	2	5
Alcohol etílico de 60º	2	5
Alcohol etílico de 70º	2	5
Alcohol etílico de 80º	2	5
Alcohol etílico de 90º	2	5
Alcohol etílico de 96º	2	5
Alcohol etílico de 100º	2	20
Alcohol butílico	2	20
Baño butílico–parafina (50%)	1	30
Baño en parafina	3	30
Fabricación del bloque	-	-

Tabla A1.2. Protocolo adaptado para la doble tinción de hematoxilina de Carazzi–eosina en cortes histológicos de *D. digitaria* de 10µm de grosor.

Tratamiento	Nº de pasos	Tiempo (minutos)
Xilol (desparafinado)	3	10
Alcohol etílico de 100º	1	10
Alcohol etílico de 96º	1	10
Alcohol etílico de 70º	1	10
Alcohol etílico de 50º	1	10
Alcohol etílico de 30º	1	10
Agua destilada	1	5
Hematoxilina de Carazzi	1	8
Lavado con agua corriente	1	5
Eosina	1	0,5
Lavado con agua corriente	1	5
Alcohol etílico de 70º	1	5
Alcohol etílico de 96º	1	5
Alcohol etílico de 100º	1	5
Eucaliptol	1	15
Xilol	1	10

Tabla A1.3. Protocolo adaptado para la doble tinción de hematoxilina de Carazzi – tricrómico de V.O.F en cortes histológicos de *D. digitaria* de 10µm de grosor.

Tratamiento	Nº de pasos	Tiempo (minutos)
Xilol	3	10
Alcohol etílico de 100º	1	10
Alcohol etílico de 96º	1	10
Alcohol etílico de 70º	1	10
Alcohol etílico de 50º	1	10
Alcohol etílico de 30º	1	10
Agua destilada	1	5
Hematoxilina de Carazzi	1	8
Lavado con agua corriente	1	5
V.O.F.	1	4
Lavado con agua corriente	1	5
Alcohol etílico de 70º	1	5
Alcohol etílico de 96º	1	5
Alcohol etílico de 100º	1	5
Eucaliptol	1	15
Xilol	1	10
Montaje con DPX	-	-

Tabla A1.4. Protocolo adaptado para la doble tinción PAS – Azul Alcian en cortes histológicos de *D. digitaria* de 10µm de grosor.

Tratamiento	Nº de pasos	Tiempo (minutos)
Xilol	3	10
Alcohol etílico de 100º	1	10
Alcohol etílico de 96º	1	10
Alcohol etílico de 70º	1	10
Alcohol etílico de 50º	1	10
Alcohol etílico de 30º	1	10
Agua destilada	1	5
Azul Alcian	1	5
Lavado con agua corriente	1	3
Lavado con agua destilada	1	5
Ácido peryódico	1	10
Lavado con agua corriente	1	3
Lavado con agua destilada	1	5
Reactivo de Schiff	1	15
Lavado con agua corriente	1	3
Lavado con agua destilada	1	5
Hematoxilina de Carazzi	1	20 seg.

Tabla A1.4. (Continuación). Protocolo adaptado para la doble tinción PAS – Azul Alcian en cortes histológicos de *D. digitaria* de 10µm de grosor.

Tratamiento	Nº de pasos	Tiempo (minutos)
Lavado con agua corriente	1	3
Alcohol etílico de 70º	1	5
Alcohol etílico de 96º	1	5
Alcohol etílico de 100º	1	5
Eucaliptol	1	15
Xilol	1	10
Montaje con DPX	-	-

Tabla A1.5. Protocolo adaptado para la tinción Rojo de Alizarina en cortes histológicos de *D. digitaria* de 10µm de grosor.

Tratamiento	Nº de pasos	Tiempo (minutos)
Xilol	3	10
Alcohol etílico de 100º	1	10
Alcohol etílico de 96º	1	10
Alcohol etílico de 70º	1	10
Alcohol etílico de 50º	1	10
Alcohol etílico de 30º	1	10
Agua destilada	1	5
Solución A	1	2
Lavado con agua corriente	1	3
Light Green SfYellowish	1	10 seg.
Lavado con agua destilada	1	5 – 10 seg.
Solución B	1	30 seg.
Alcohol etílico de 96º	1	10 seg.
Alcohol etílico de 100º	1	10 seg.
Eucaliptol	1	15
Xilol	1	10
Montaje con DPX	-	-

Tabla A1.6. Composición de las soluciones utilizadas en la tinción de Rojo de Alizarina.

Solución A		Solución B		Light Green SfYellowish	
Rojo de alizarina	1 gr.	Alcohol 96º	500 ml	Light green	1 gr.
Agua destilada	100 ml	HCl 35%	0,05 ml	Agua destilada	100 ml
NH ₄ OH	-			Ácido acético glacial	1 ml

Tabla A1.7. Composición del medio MN y ASN-III según Waterbury y Stanier (1978). Ingredientes para 1 litro de medio. EDTA^a, Etilenodiaminotetracetato (sal de potasio disódico). Agar^b, el agar sólo se añadirá en el caso del medio sólido.

Ingredientes	Medio	
	MN	ASN-III
Agua destilada	250 ml	1000 ml
Agua de mar	750 ml	-
NaCl	-	25 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,04 g	3,5 g
MgCl ₂ · 6H ₂ O	-	2 g
KCl	-	0,5 g
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,02 g	0,5 g
NaNO ₃	0,75 g	0,75 g
K ₂ HPO ₄ · 3H ₂ O	0,02 g	0,02 g
Ácido cítrico	0,003 g	0,003 g
Citrato férrico de amonio	0,003 g	0,003 g
EDTA ^a	0,0005 g	0,0005 g
Na ₂ CO ₃	0,02 g	0,02 g
Metales traza	1 ml	1 ml
Agar ^b	12 g	12 g

Tabla A1.8: composición de la solución de metales traza necesaria para los medios MN y ASN-III según Waterbury y Stanier (1978). Ingredientes para 100ml de solución.

Solución de metales traza	
Agua destilada	100 ml
H ₃ BO ₃	0,286 g
MnCl ₂ · 4H ₂ O	0,181 g
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0,0222 g
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,0039 g
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,0079 g
Co(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O	0,00494 g

ANEXO II: CARACTERES MORFOLÓGICOS Y ESTADO CORRESPONDIENTE QUE PRESENTA *Digitaria digitaria*, SEGÚN LISTADO DE CARACTERES DE Bieler *et al.* (2014).

Caracteres de la concha

- 01 Tipo de concha en el adulto: (2) bivalvo con músculos aductores para cerrar las valvas.
- 02 Expansiones laterales de la concha (aurículas) a cada lado del umbo: (0) ausentes.
- 03 Abertura del biso: (1) presente.
- 04 Músculo aductor anterior (o impresión): (0) presente.
- 05 Músculo aductor posterior (o impresión): (0) presente.
- 06 Posición de la impresión del músculo retractor posterior del pie en relación con la impresión del músculo aductor posterior: (2) postero dorsal (nuevo estado de carácter)
- 07 Línea paleal: (1) presente.
- 08 Seno paleal: (0) ausente.
- 09 Umbo: (1) prosogiro.
- 10 Pigmentos púrpura en la capa interna de la concha: (0) ausentes
- 11 Ligamento externo: (1) presente.
- 12 Posición del ligamento: (1) opistodético.
- 13 Tipo de ligamento: (4) parivincular
- 14 Resilifer: (0) ausente.
- 15 Lithodesma: (0) ausente.
- 16 Pseudoninfa: (0) ausente.
- 17 Opérculo: (0) ausente.
- 18 Paletas: (0) ausentes.
- 19 Grieta umbonal: (0) ausente.

- 20 Tubo calcáreo adventicio secretado por el animal: (0) ausente.
- 21 Cementación al sustrato por una secreción calcárea del borde del manto: (0) ausente.

Caracteres de la charnela

- 22 Fila de dientes de la charnela: (1) pocos dientes y diferentes (heterodonto)
- 23 Espacio entre la fila de dientes de la charnela y el umbo: (0) ausente
- 24 Diente secundario: (0) ausente
- 25 Diente cardinal: (1) presente.
- 26 Diente anterior lateral: (0) ausente.
- 27 Diente posterior lateral: (0) ausente.
- 28 Chomata: (0) ausente.

Caracteres de la microestructura de la concha

- 29 Microestructura asimétrica entre las dos valvas: (0) ausente.
- 30 Número de capas de la concha externas al miostraco paleal: (1) 1
- 31 Número de capas de la concha dentro del miostraco paleal: (0) 1
- 34 Capa M+1: (2) aragonítica, lamelar cruzada.
- 35 Capa M-1: (1) aragonítica, lamelar cruzada.
- 37 Columnas del miostraco: (0) ausente.
- 38 Prismas en el miostraco en M-1: (1) presente.
- 39 Túbulos: (0) ausentes.
- 40 Capa gredosa (con aspecto de escayola): (0) ausente.
- 41 Cámaras en la concha: (0) ausentes.
- 42 Capa orgánica dentro de la concha: (0) ausente.
- 43 Superficie externa del periostraco: (4) alveolado (nuevo estado de carácter).

- 44 Vacuolas dentro del periostraco: (0) ausentes.
- 45 Calcificación intraperiostracal: (0) ausente.
- 46 Secreciones de glándulas arenoflicas:(0) ausentes
- 47 Cerdas aplicadas del biso: (0) ausentes.
- 48 Incrustaciones extraperiostracales: (0) ausentes.
- 49 Grosor del periostraco: (1) 1,01–3,16 μm .

Caracteres de la larva y de su desarrollo

- 50 Torsión: (0) ausente.
- 51 Charnela de la concha larvaria (provinculum): sin datos
- 52 Longitud de la prodisoconcha I: (1) 150 – 229 μm (sugiere desarrollo lecitotrófico).
- 53 Longitud de la prodisoconcha II: (0) prodisoconcha II indistinta o ausente.
- 55 Protección del embrión: (2) encapsulado (saco o cápsula de huevos unida o no fuera del progenitor).
- 56 Forma larvaria: sin datos
- 57 Forma del velo larvario: sin datos
- 58 Mancha ocular larvaria: sin datos
- 59 Penacho apical larvario: sin datos
- 60 Ciliatura de la larva: sin datos

Caracteres de manto y órganos sensoriales

- 61 Lóbulos del manto: (1) presentes.
- 62 Fusión ventral del manto: (0) ausente
- 63 Sifones: (0) ausentes.
- 64 Capacidad natatoria mediante movimientos de las valvas: (0) ausente.
- 65 Tentáculos sensoriales en el manto: (0) ausentes.

66 **Órganos de Stempel:** (0) ausente.

Caracteres de los músculos, pie y glándula pedal

67 **Superficie ventral del pie:**(1) ausente

68 **Talón del pie:** (0) ausente

69 **Biso (en adulto):** (1) presente.

70 **Pérdida ontogenética del pie inmediatamente después del asentamiento:** (0) ausente.

71 **Inversión pedal:** (0) ausente.

72 **Músculo cruciforme:** (0) ausente.

Caracteres del sistema alimenticio

73 **Tracto digestivo:** (0) presente.

74 **Aparato radular:** (0) ausente.

75 **Estilo:** (2) estilete cristalino (con consistencia mucosa)

76 **Envoltura muscular del estómago:** (0) ausente.

77 **Antecámara:** (1) presente.

78 **Posición de la antecámara:** (1) anterior a la cámara principal.

79 **Pliegues longitudinales en el esófago:** (0) ausentes.

80 **Posición de la capucha dorsal relativa al escudo gástrico:** (2) dorsal.

81 **Entrada del esófago en el lumen del estómago:** no procede, el escudo gástrico no está desplazado hacia la parte anterior del estómago.

82 **Labio esofagal:** (0) ausente.

83 **Área de selección del caecum plegada y con crestas:** (0) ausente.

84 **Extensión ventral del caecum de selección de comida:** (0) ausente.

85 **Pared posterior del caecum de selección (pliegue carnosos):** no procede

86 **Surco dorsal de la capucha:**(0) ausente.

- 87 Caecum de selección de comida: (0) ausente.
- 88 Bolsa izquierda: (0) ausente.
- 89 Área de selección de la bolsa izquierda: (0) ausente.
- 90 Pliegue(s) o surco(s) que conectan la bolsa izquierda con la capucha dorsal:(0) ausente.
- 91 Bolsillos simétricos poco profundos laterales al esófago: (0) ausentes.
- 92 Cavidad vestibular izquierda de los conductos gástricos: (1) presente
- 93 Capucha dorsal: (1) presente
- 94 Apéndice posterodorsal derecho: (0) ausente.
- 95 Pared derecha en forma de horquilla: (0) ausente.
- 96 Pliegues y surcos longitudinales en la capucha dorsal: (0) ausentes.
- 97 Pliegues y surcos transversales en la capucha dorsal: (0) ausentes.
- 98 Tiflosolis: (1) presente.
- 99 Tiflosolis mayor proyectado en el lumen del estómago: (1) proyectado
- 100 Tiflosolis mayor y vestíbulo conductos gástricos anterior: (0) ausente
- 102 Surco intestinal: (0) consistente en un único surco.
- 103 Lengua del tiflosolis mayor penetrando en los conductos de los divertículos digestivos: (0) ausente
- 104 Trayectoria del tiflosolis mayor dentro del ciego de selección: (0) ausente
- 105 Costillas bajas circunnavegando el tiflosolis mayor: (0) ausente
- 106 Tiflosolis mayor y ensanchamineto de la pared del lado derecho del estómago: (0) tiflosolis no entra en el ensanchamiento.
- 107 Trayectoria del tiflosolis menor en el lumen del estómago: No se ha observado tiflosolis menor.
- 108 Área de selección entre tiflosolis mayor y menor: No procede

- 109 Área de selección en la pared derecha: (1) presente.
- 110 Posición del área de selección de la pared derecha: (0) extendida desde la pared derecha hasta la capucha dorsal
- 111 Patrón de los pliegues transversos del área de selección de la pared derecha: Sin pliegues patentes.
- 112 Pliegue posterior bordeando el área de selección de la pared derecha: (0) ausente
- 113 Pliegue anterior bordeando el área de selección de la pared derecha:(0) ausente
- 114 Área de selección accesoria en la pared derecha: (0) ausente
- 115 Pliegue anterior bordeando el área de selección accesoria de la pared derecha: No procede
- 116 Tramo de entrada de la pared derecha: (1) liso
- 117 Vestíbulo anterior para los conductos de la glándula gástrica: (3) con los conductos fusionados en un vestíbulo.
- 118 Vestíbulo posterior para los conductos de la glándula digestiva”: (0) ausentes.
- 119 “Vestíbulo de los conductos de la glándula digestiva en la pared derecha del estómago”: (1) presente.
- 120 Escudo gástrico: (1) presente.
- 121 Dientes del escudo gástrico: (1) presentes.
- 122 Cuticularización de la superficie interna del estómago: (0) ausente
- 123 Relación entre el saco del estilete y el intestino proximal: (1) confluyente
- 124 Surco uniendo el saco del estilete y las aberturas intestinales: (0) ausente.
- 125 Ciego del saco del estilete: (1) presente.
- 126 Bucle intestinal: (0) sin bucle.
- 127 Posición del bucle intestinal en relación al estómago: no procede.
- 128 Bucle del intestino dorsal, sobre el estómago: (0) ausente.

- 129 **Posición del saco del estilete:** (1) producido posteriormente.
- 130 **Posición relativa del recto y la cavidad pericárdica:** (0) recto atravesando el ventrículo.
- 131 **Término del recto:** (0) unido al músculo aductor posterior.
- 132 **Embudo anal:** (0) ausente

Caracteres endosimbióticos

- 133 **Bacterias intracelulares en los ctenidios constituyendo una simbiosis basada en la oxidación del sulfuro:** (0) ausente.
- 134 **Zooxantelas simbiotes:** (0) ausentes.
- 135 **Glándula de Deshayes conteniendo bacterias celulolíticas fijadoras del nitrógeno:** (0) ausentes.

Caracteres de las branquias y los palpos

- 136 **Palpos labiales:** (1) presentes.
- 137 **Simetría de los palpos labiales:** (0) simétricos.
- 138 **Posición relativa de los palpos labiales:** (1) cerca de la región anterior de la masa visceral.
- 139 **Probóscides de los palpos:** (0) ausentes.
- 140 **Bolsa de los palpos:** (0) ausente.
- 141 **Forma de los palpos labiales:** (0) triangulares.
- 142 **Diferenciación anterior/posterior de los palpos labiales:** (0) ausente.
- 143 **Punta del palpo labial externo:** (0) libre.
- 144 **Forma de la punta del palpo labial externo:** (1) redondeado.
- 145 **Capucha formada por los palpos labiales:** (0) ausente.
- 146 **Asociación de la branquia – palpo (inserción):** (1) presente.
- 147 **Asociación de la branquia – palpo (fusión):** (0) ausente.

- 148 **Arista de división de la lamela del palpo:** (0) ausente.
- 149 **Ctenidio:** (1) presente.
- 150 **Estructura del ctenidio:** (1) filamentos.
- 151 **Orientación de las hojas del ctenidio:** no procede.
- 152 **Relación de las hemibranquias:** (1) la hemibranchia externa se superpone parcialmente a la interna.
- 153 **Demibranchia externa:** (0) presente.
- 154 **Plegamiento de la demibranchia interna:**(0) plegada
- 155 **Plegamiento de la demibranchia externa:**(0) plegada
- 156 **Hemibranchia externa (tamaño relativo de las lamelas):** (0) lamela ascendente (externa) menor que la descendente (interna).
- 157 **Hemibranchia externa (quilla):** (1) ausente.
- 158 **Longitud de la hemibranchia:** (1) hemibranchia externa más corta que la interna.
- 159 **Forma del ctenidio:** (2) alargado
- 160 **Simetría del ctenidio:** (0) simétrico.
- 161 **Origen de la hemibranchia:** (0) aproximadamente al mismo nivel dorsoventral.
- 162 **Fusión anatómica de la hemibranchia interna:** (0) no fusionada.
- 163 **Forma de las hojas del ctenidio:** no procede.
- 164 **Hojas ensanchadas lateralmente:** no procede
- 165 **Posición de las branquias:** (0) anterior al músculo aductor posterior.
- 166 **Conexión posterior de la hemibranchia interna:** (0) ausente.
- 167 **Surco alimenticio en la hemibranchia interna:** (1) presente.
- 168 **Surco alimenticio en la hemibranchia externa:** (0) ausente.
- 169 **Conexión entre la demibranchia interna y la masa visceral:** (2) anatómica (tejido).

- 170 **Conexión entre la demibranchia externa y el manto:** (2) anatómica (tejido).
- 171 **Uniones interlamelares:** (1) múltiples barras transversales.
- 172 **Separación entre cilios frontales y latero – frontales:** no procede.
- 173 **Cilios laterofrontales de la branchia:** (1) presentes.
- 174 **Composición de los cilios latero – frontales:** sin datos
- 175 **Cilios abfrontales:** (1) ausentes.
- 176 **Entrelazado de los cilios:** no procede (solo para protobranchios).
- 177 **Barras quitinosas:** (0) ausentes.
- 178 **Filamentos principales:** (1) presente
- 179 **Filamentos apicales:** (0) ausentes
- 180 **Distribución de los filamentos principales:** (0) en toda la branchia.
- 181 **Branquias del manto:** (0) ausentes
- 182 **Septum:** (0) ausente
- 183 **Porción de la cavidad del manto ocupada por la branchias:** (0) lateral y posterior al pie.
- 184 **Interconexión mediante vasos:** (0) ausente.
- 185 **Espuelas filamentosas:** (0) ausentes.
- 186 **Discos ciliados:** (0) ausentes.
- 187 **Configuración de los discos ciliados:** no procede.
- 188 **Fusión filamentalabfrontal:** (0) ausente.
- 189 **Puentes de tejido interfilamental (filamentos ordinarios):** no procede.
- 190 **Puentes de tejido interfilamental (filamentos principales):**(1) presentes.

Carácter de transporte de oxígeno

- 191 **Hemoglobina intracelular:** presente.

Caracteres de los espermatozoides

- 192 **Vesícula acrosómica:** (0) compuesta de una sola vesícula.
- 193 **Posición del complejo acrosómico (vesícula + material subacrosomal):** (0) anterior, dispuesto verticalmente sobre el ápice del núcleo.
- 194 **Perfil de la sección longitudinal de la vesícula acrosómica:** (2) alargada – cónica, con una base ancha.
- 195 **Contenido de la vesícula acrosómica:** (0) homogéneo.
- 196 **Ápice de la vesícula acrosómica:** (0) simple.
- 197 **Material subacrosómico:** (2) depósito granular + eje.
- 198 **Forma del núcleo:** (1) forma de barra.
- 199 **Curvatura del núcleo:** (0) ausente.
- 200 **Contenido nuclear (maduro):** (1) gránulos gruesos no visibles.
- 201 **Ápice del núcleo:** (2) cóncavo y/o con una profunda foseta
- 202 **Foseta basal del núcleo:** (2) muy poco profunda o ausente, con centriolos totalmente excluidos.
- 203 **Complejo centriolar:** (2) centriolo proximal total o parcialmente modificado en una barra bandeada.
- 204 **Raicilla centriolar:** (0) sin un componente bandeado periódico.
- 205 **Material pericentriolar:** (0) difuso o ausente.
- 206 **Número usual de mitocondrias:** (3) más de 6.
- 207 **Forma de la mitocondria:** (1) subesférica con una marcada compresión lateral.
- 208 **Disposición mitocondrial en relación al complejo centriolar:** (0) radial.
- 209 **Disposición mitocondrial en relación al núcleo:** (0) mínima o sin solapamiento con el núcleo.
- 210 **Axonema:** (0) en un flagelo simple (axonema rodeado de una membrana plasmática).