



Latin American Journal of Aquatic Research

E-ISSN: 0718-560X

lajar@ucv.cl

Pontificia Universidad Católica de Valparaíso  
Chile

Concha, Christopher; Figueroa, Emilio; Winkler, Federico M.  
Asociación entre la tasa de autofecundación y la frecuencia de larvas malformadas en poblaciones  
cultivadas del ostión del norte *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819)  
Latin American Journal of Aquatic Research, vol. 39, núm. 2, julio, 2011, pp. 327-337  
Pontificia Universidad Católica de Valparaíso  
Valparaíso, Chile

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=175019398014>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica  
Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal  
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

**Research Article**

**Asociación entre la tasa de autofecundación y la frecuencia de larvas malformadas en poblaciones cultivadas del ostión del norte *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819)**

**Christopher Concha<sup>1</sup>, Emilio Figueroa<sup>1</sup> & Federico M. Winkler<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>Departamento Biología Marina, Facultad de Ciencias del Mar, Universidad Católica del Norte  
P.O. Box 117, Coquimbo, Chile

<sup>2</sup>Centro de Estudios Avanzados en Zona Áridas (CEAZA), Universidad Católica del Norte  
P.O. Box 117, Coquimbo, Chile

**RESUMEN.** El incremento de la frecuencia de malformaciones y la reducción de la viabilidad y fecundidad suelen ser las primeras manifestaciones de la depresión por consanguinidad en animales. El ostión del norte, *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819), es una especie hermafrodita funcional con autofecundación parcial y durante la reproducción artificial puede presentar altos grados de autofecundación. En este trabajo se analizó la asociación de la tasa de autofecundación con la frecuencia de larvas malformadas y la supervivencia larval. Se desovaron adultos maduros y se recogieron separadamente los gametos femeninos del 5º pulso de liberación en adelante y los masculinos. Los ovocitos fueron fecundados con espermatozoides de otro individuo, formando familias de hermanos completos. La tasa de autofecundación se verificó por la proporción de ovocitos que entra en división en una muestra de ellos sin fecundar. La tasa de autofecundación varió entre familias de 0 a 100%, con distribución de frecuencias normal. La proporción de larvas malformadas se distribuyó al azar entre las familias analizadas, pero se correlacionó negativamente, en forma moderada pero significativa, con la tasa de autofecundación y la temperatura media del cultivo. Los datos sugieren que la autofecundación en las familias de ostiones puede favorecer una mayor homeostasis del desarrollo larval.

**Palabras clave:** depresión por consanguinidad, pectínidos, hermafroditismo, homeostasis del desarrollo, *Argopecten purpuratus*.

**Association between self-fertilization rates and the frequency of malformed larvae in farmed populations of the northern scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819)**

**ABSTRACT.** Increased frequencies of malformations and the reduction of viability and fecundity are some of the first manifestations of inbreeding depression in animals. The northern scallop, *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819), is a functional hermaphrodite species with partial self-fertilization. During artificial reproduction, this species may present high degrees of self-fertilization. In this work, the association between the selfing rate and the frequency of larval malformations and survival were analyzed. Mature adults were spawned, and female and male gametes were collected separately from the fifth or later spawning pulses. Oocytes were fertilized with sperm from another individual, forming families of complete siblings. Selfing rates were verified by the proportion of cleaving oocytes in a non-fertilized sample. Self-fertilization ranged from 0 to 100% among families, with a normal distribution. The proportion of malformed larvae was distributed randomly among the families analyzed, but was negatively correlated – moderately but significantly – with the selfing rate and the mean water temperature of the culture. These results suggest that self-fertilization in scallop families can favor greater homeostasis of larval development.

**Keywords:** inbreeding depression, pectinids, hermaphroditism, developmental homeostasis, *Argopecten purpuratus*.

## INTRODUCCIÓN

La consanguinidad o endogamia es un factor relevante en el proceso de cambio de las frecuencias genotípicas en una población. En muchas especies con reproducción cruzada causa pérdida en el valor de parámetros vinculados con la adecuación biológica y la producción, conocida como depresión por consanguinidad (Falconer & Mackay, 1996; Lynch & Walsh, 1998). Este fenómeno ha sido ampliamente informado para especies de plantas y animales (Charlesworth & Charlesworth, 1979, 1987; Lande & Schemske, 1985, 1987; De Rose & Roff, 1999; Crnokrak & Roff, 1999; Lens *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2002), incluido diversas especies de moluscos, donde el incremento de la endogamia suele manifestarse en una disminución de las tasas de crecimiento, mayor mortalidad o incremento de frecuencia de malformaciones, entre otros (Beaumont, 1986; Evans *et al.*, 2004; Deng *et al.*, 2005; Ibarra *et al.*, 1995; Park *et al.*, 2006; Martínez *et al.*, 2007; entre otros).

La consanguinidad se produce por el cruzamiento entre individuos que están más emparentados entre sí que el promedio de la población (Falconer & Mackay, 1996; Martínez & Figueras, 2007), y tiene su máxima expresión en la autofecundación. Esta es común en una gran variedad de plantas hermafroditas (Charlesworth & Charlesworth, 1979), donde, sin embargo, se han descrito evidencias de adaptaciones que involucran sistemas que promueven la exofecundación (Charlesworth & Charlesworth, 1987). En animales, y particularmente en moluscos, existen diversas especies hermafroditas, como ostras (Murakoshi & Hirata, 1993; Evans *et al.*, 2004), caracoles de tierra (Ruppert & Barnes, 1996), entre otros. Sin embargo, muchas de esas especies también exhiben mecanismos que previenen la autototocundación, como la alternancia de sexos (Ruppert & Barnes, 1996; Calvo *et al.*, 1998), mecanismos eficientes de dispersión de gametos, sincronización de desoves e incompatibilidad gamética, entre otros (Knowlton & Jackson, 1993).

En los moluscos pectínidos existe un gran número de especies hermafroditas funcionales, cuyos miembros poseen una gónada dividida en una porción masculina y otra femenina (Ruppert & Barnes, 1996; Calvo *et al.*, 1998). En varios de ellos se ha informado la maduración sincrónica de ambas porciones de la gónada y desoves simultáneos (Guzmán *et al.*, 1998). Así, en el ostión del norte, *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819), se han registrado tasas de autofecundación que varían entre 0 y 100%, con promedios en torno al 10 y 20%, durante desoves en

ambiente controlado (Winkler & Estévez, 2003; Toro *et al.*, 2009). En *A. purpuratus* y otros bivalvos, como *Pecten maximus*, *Placopecten magellanicus* y *Crassostrea gigas*, el proceso de desove se inicia cuando los ovocitos pasan de la profase I a la metafase I, seguido de la ruptura de la vesícula germinal y su liberación al medio (Widoeati *et al.*, 1995; Désilets *et al.*, 1995; Kyosuka *et al.*, 1997; Martínez *et al.*, 2000). Cuando el ovocito se encuentra en metafase I puede ser fecundado por los espermatozoides y, en pectínidos, al ser evacuados ambos tipos de gametos por una vía común, es posible la autofecundación en el tracto genital (Mackie, 1984; Widoeati *et al.*, 1995). Así, la autofecundación durante el desove es considerado un fenómeno común en pectínidos hermafroditas (Beaumont, 1986; Benninger & Le Pennec, 1991; Ibarra *et al.*, 1995). En cultivos artificiales, donde los reproductores son confinados a pequeños volúmenes de agua, se presume que la autofecundación sería mayor que en la naturaleza, pero no hay estimaciones de las tasa de autofecundación en el medio natural.

El efecto del incremento en la consanguinidad derivado de la autofecundación ha mostrado resultados discrepantes entre estudios en pectínidos. Algunos autores han informado evidencias de depresión por consanguinidad, con supervivencias o crecimientos menores en larvas producidas por autofecundación que los controles producidos por fecundación cruzada (Beaumont, 1986; Ibarra *et al.*, 1995; Martínez *et al.*, 2007; Zheng *et al.*, 2008; Toro *et al.*, 2009, 2010). Otros, en cambio, no han encontrado evidencias de ello (Betancourt *et al.*, 1994; Winkler & Estévez, 2003).

El incremento de las malformaciones durante la etapa de desarrollo es una de las primeras manifestaciones de la depresión por consanguinidad (Evans *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2006). Esto se ha observado en larvas de organismos marinos, como abalones (Deng *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2006), ostras (Evans *et al.*, 2004; Naciri-Graven *et al.*, 2000) y peces (Lu & Bernatchez, 1999; Wang *et al.*, 2002), entre otros. Teóricamente, este fenómeno se asocia con pérdida de homeostasis de desarrollo, es decir, la capacidad para compensar eficientemente los efectos adversos del ambiente para desarrollar en forma precisa el plan ontogenético contenido en el genoma de los individuos, en un ambiente determinado (Waddington, 1953, 1957; Dobzhansky & Wallace, 1953; Dobzhansky, 1955; Thoday, 1958; Nijhout & Davidowitz, 2003). Así, la mayor frecuencia de malformaciones en una población se vincula con menores niveles de adecuación biológica (Evans *et al.*, 2004; Deng *et al.*, 2005).

La presencia de larvas malformadas durante la reproducción artificial de *Argopecten purpuratus* ha sido descrita por Avendaño *et al.* (2001), quienes consideran este factor como un problema en la producción de semillas de esta especie. Hasta el presente no existe un análisis de la variación en la tasa de malformaciones entre poblaciones de ostiones ni una explicación sobre sus posibles causas. Considerando que las malformaciones son una manifestación frecuente de la depresión por consanguinidad, y que durante la reproducción artificial de esta especie se producen grados variables de autofecundación, puede presumirse que ambos fenómenos están conectados. Así, en este trabajo se intenta verificar si la frecuencia de malformaciones en las larvas es una consecuencia de la consanguinidad derivada de la autofecundación que se produce durante la reproducción artificial.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se obtuvieron al azar reproductores maduros de una población de ostiones de cultivo provenientes de captación natural de bahía Tongoy, los que fueron trasladados al Laboratorio Central de Cultivos de la Universidad Católica del Norte, Sede Coquimbo. Con ellos se establecieron 91 familias, por fecundación cruzada, y en cada una de ellas se estimó la tasa de autofecundación, frecuencia de malformaciones y mortalidad. Los experimentos se realizaron entre el 3 de julio del 2008 y 14 de enero del 2009.

### Desove y obtención de gametos

Adultos maduros fueron estimulados para inducir a desove utilizando la metodología descrita por Di Salvo *et al.* (1984), recogiendo independientemente los gametos masculinos y femeninos, cada uno de un grupo diferente de ejemplares. Esta especie normalmente libera sus gametos en pulsos, iniciándose el desove con la evacuación de espermatozoides, seguido, entre 10 y 20 min después, por los ovocitos (Martínez *et al.*, 2007). El cambio de sexo fue monitoreado por observación del color del riñón. Este es observable por delante del músculo aductor al separar las valvas del reproductor, y adquiere un color blanco lechoso durante la expulsión de los espermatozoides, cambiando a un color rojo anaranjado al iniciar la liberación de ovocitos (Winkler & Estévez, 2003). Los espermatozoides se recogieron en cubetas con agua filtrada a  $1\ \mu$  y esterilizada con luz UV, retirando los individuos del recipiente antes de iniciarse el cambio en el tipo de gametos liberados. Para la recolección de ovocitos se dejó que los individuos concluyesen de emitir gametos

masculinos, se los retiró del recipiente en que estaban, lavándolos cuidadosamente con agua filtrada y esterilizada con UV, y se los colocó en un recipiente con agua de mar fresca. Los primeros cinco pulsos de emisión de ovocitos fueron descartados para prevenir un exceso de autofecundación. Para ello, luego de emitir cada pulso de gametos, el reproductor fue retirado del recipiente, lavado en la forma descrita previamente y colocado en un nuevo recipiente con agua fresca, según el procedimiento descrito por Winkler & Estévez (2003).

Previo a realizar la fecundación cruzada, se separó una muestra de 1 mL de agua desde el recipiente conteniendo los ovocitos, la que se incubó a temperatura ambiente (aprox.  $16^{\circ}\text{C}$ ) por 4 h. Al cabo de este tiempo se observó bajo microscopio, para verificar la presencia de cigotos en división, productos de autofecundación (Winkler & Estévez, 2003) y se obtuvieron tres fotos del desove de cada hembra con una cámara fotográfica digital Canon Power Shot A 620 adosada a un microscopio. Se examinaron 70 ovocitos/cigotos por hembra desovada, y la tasa de autofecundación se expresó como el porcentaje de cigotos en división sobre el total de ovocitos analizados.

El incremento en el coeficiente de consanguinidad ( $\Delta F$ ) para cada familia durante el proceso de reproducción artificial se estimó como:

$$\Delta F = (1 - C)/2$$

donde  $C$  es la proporción de individuos producidos por exofecundación en la población (Winkler & Estévez, 2003). El incremento de consanguinidad derivado del grado de parentesco entre los individuos que se cruzan se consideró despreciable para los efectos de este experimento, dado que los reproductores se obtuvieron al azar de una población silvestre (Tongoy) compuesta por más de 60 millones de individuos, de los cuales se estima que un 20% serían adultos (S. Cortez, *com. pers.*), y los cruces se hicieron al azar. Así, la consanguinidad derivada de este factor debería ser, en promedio, la misma que en la población base.

La fecundación se realizó usando una proporción aproximada de 10 espermatozoides por ovocito. Cada familia fue dispuesta en un estanque de 200 L independiente, con agua de mar filtrada a  $1\ \mu$  y esterilizada con luz UV. El cultivo larval se realizó a temperatura ambiente, con recambio completo de agua cada dos días y aeración constante a partir de las 48 h. Se alimentó a diario con 10 L de *Isochrysis galbana* var. *tahiti* ( $2,5 \times 10^4$  cel  $\text{mL}^{-1}$ ) por estanque. La densidad de larvas varió de  $\sim 12$  larvas  $\text{mL}^{-1}$  al inicio del cultivo, a  $\sim 1$  larva  $\text{mL}^{-1}$  al final de éste. La

temperatura del agua de los estanques fue registrada tres veces al día (mañana, mediodía y tarde) con un termómetro (0,1°C).

Durante el cambio de agua las larvas se retiraron en un tamiz de 45 µm, y de él se colectaron muestras de larvas siguiendo la metodología descrita por Di Salvo *et al.* (1984), las que fueron almacenadas en tubos Eppendorf de 1,5 mL con formalina al 5% hasta su análisis. La supervivencia y la frecuencia de larvas malformadas por familia se evaluó al segundo día post-fecundación, a la mitad y al final del período de cultivo. Para compensar eventuales variaciones en las tasas de desarrollo causadas por diferencias en la temperatura de cultivo (Ruiz *et al.*, 2008), la segunda medición se hizo cuando las larvas alcanzaron las 251,7 Unidades Térmicas Acumuladas (UTA) (Brenko & Calabrese, 1969; Uki & Kikuchi, 1984; Pérez, 2002; Gallegos, 2003; González, 2003). La mortalidad se estimó por la diferencia en la cantidad de larvas entre periodos sucesivos de medición. Para ello se contó bajo lupa el número de larvas vivas en una alícuota de 1 mL de la muestra obtenida del tamiz, y se extrapoló al volumen total del estanque. El alto de las larvas se midió a partir de imágenes digitales obtenidas con un microscopio de transmisión dotado con cámara fotográfica, y usando el programa Image-Pro Plus 4.0, calibrado para que las medidas fuesen registradas en micrómetros.

La presencia de malformaciones se verificó mediante observación bajo microscopio y registro microfotográfico de 50 larvas tomadas al azar por familia, para cada etapa del cultivo definida previamente. Como criterios para definir la manifestación de alteraciones en el desarrollo se usaron las descripciones de la morfología normal de las larvas de *A. purpuratus* de Bellolio *et al.* (1994) y de las deformaciones informadas por Avendaño *et al.* (2001).

### Análisis de los datos

La asociación de la frecuencia de larvas malformadas por familia con el porcentaje de autofecundación o la temperatura promedio del agua del cultivo, y la relación entre el porcentaje de autofecundación y la mortalidad larval en cultivo, se examinaron mediante análisis de regresión simple ( $Y_i = \alpha + \beta X_i$ ). La significancia de los coeficientes de regresión fue verificada mediante una prueba t-Student (Sokal & Rolf, 1981).

La distribución de frecuencias de larvas malformadas entre familia se comparó con una distribución de Poisson, usando la prueba de Chi-cuadrado para bondad de ajuste como prueba de hipótesis. Los porcentajes de autofecundación para las

familias se analizaron con una prueba de Kolmogorov-Smirnov. La proporción promedio de larvas malformadas al inicio y a mediados del cultivo fueron analizadas utilizando una prueba t-Student, para verificar si existía diferencia entre ellos.

## RESULTADOS

De las 91 familias formadas en siete eventos de reproducción (Tabla 1), sólo 20 de ellas (22%) alcanzaron el estadio de pediveliger, etapa en que se inicia el proceso de fijación, la cual se alcanzó en 20 a 22 días de cultivo, dependiendo de la temperatura de cultivo. Sesenta y dos familias (68%) sobrevivieron hasta la etapa media del desarrollo larval. La proporción de larvas vivas promedio por familia mostró una marcada caída a lo largo del cultivo, con una reducción de aproximadamente el 80% entre la primera y segunda medición, y sólo el 5% de las larvas de cada familia sobrevivió hasta el final del cultivo (Fig. 1).

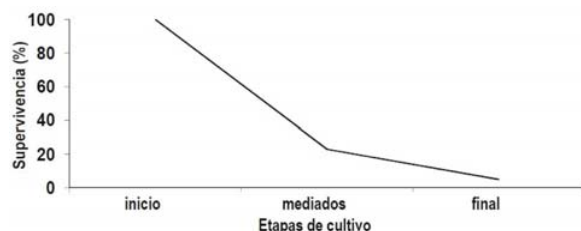
La tasa de autofecundación varió de 0% a 100% entre las familias, con un promedio general de 43%, y distribución normal ( $P > 0,05$ ). El 19% de las familias no presentó autofecundación ( $\Delta F = 0$ ) pero en un 17% de ellas todas los cigotos producidos provienen de autofecundación ( $\Delta F = 50\%$ ) (Fig. 2). Así, el incremento de la consanguinidad promedio estimado durante el proceso artificial de reproducción fue de 21,5%. La longitud de las larvas al inicio del cultivo varió entre 92 y 102 µm, con un promedio de  $98 \pm 3$  µm, alcanzando  $207 \pm 9$  µm a la edad de fijación (Fig. 3), con una tasa de crecimiento de  $4,1 \mu\text{m día}^{-1}$ .

A las 48 h post-desove todas las larvas se encontraron en estadio de veliger, con una concha de forma semicircular con bordes regulares (Fig. 4a). A mediados del cultivo esta forma se ha modificado levemente para adoptar la típica forma de larva D (Fig. 4c). En algunas larvas se observó una hendidura muy marcada en el contorno de la concha, característica que se registró tanto a inicios (Fig. 4b) como a mediados del cultivo (Fig. 4d). La proporción de larvas con esta malformación varió entre las familias de 0 a 12% al inicio, y de 0 a 10% mediados del cultivo, con promedios de 4 y 3%, respectivamente ( $P > 0,05$ ). En la última medición todas las larvas observadas se encontraron en estadio de pediveliger, con conchas de forma semicircular (Fig. 4e), y no se observaron individuos con morfologías alteradas. La distribución de frecuencias de larvas malformadas entre las familias fue al azar, tanto al inicio como a mediados del cultivo ( $P > 0,05$ ; Fig. 5).

**Tabla 1.** Temperatura promedio del agua ( $\pm$  DE) en estanques de cultivo de larvas de *Argopecten purpuratus* en tres etapas del cultivo, para siete eventos de reproducción.

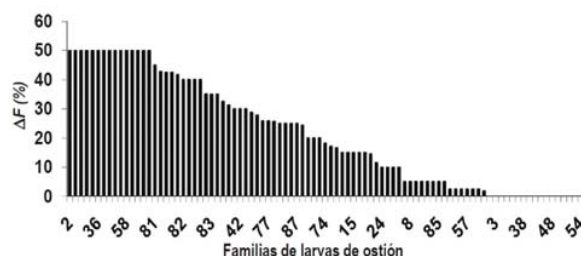
**Table 1.** Mean water temperature in culturing tanks ( $\pm$  SD) with *Argopecten purpuratus* larvae at three moments of the larval life span in seven culture batch.

Desove	Fecha	Temperatura del cultivo ( $^{\circ}$ C)			
		Inicio	Mediados	Final	Promedio
1	03/11/2008	17 ( $\pm$ 1,0)	17 ( $\pm$ 0,7)		17 ( $\pm$ 0,8)
2	14/11/2008	17 ( $\pm$ 0,6)			17 ( $\pm$ 0,6)
3	25/11/2008	17 ( $\pm$ 0,7)	18 ( $\pm$ 0,7)		18 ( $\pm$ 0,7)
4	09/12/2008	19 ( $\pm$ 1,0)	20 ( $\pm$ 0,6)	20 ( $\pm$ 0,6)	20 ( $\pm$ 0,7)
5	06/01/2009	19 ( $\pm$ 0,6)	19 ( $\pm$ 0,7)	19 ( $\pm$ 0,6)	19 ( $\pm$ 0,6)
6	07/01/2009	18 ( $\pm$ 0,6)	19 ( $\pm$ 0,8)	19 ( $\pm$ 0,7)	19 ( $\pm$ 0,7)
7	14/01/2009	19 ( $\pm$ 0,6)	19 ( $\pm$ 0,6)		19 ( $\pm$ 0,6)
Promedio		18 ( $\pm$ 0,7)	19 ( $\pm$ 0,1)	19 ( $\pm$ 0,6)	18,7 ( $\pm$ 0,5)



**Figura 1.** Supervivencia relativa promedio de larvas de *A. purpuratus* en tres momentos del periodo de cultivo.

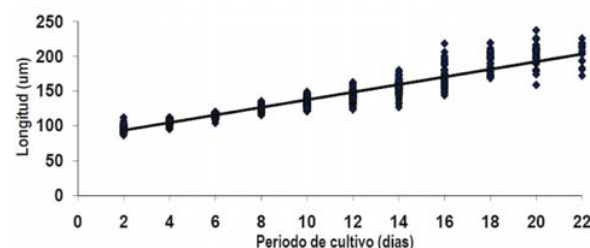
**Figure 1.** Average relative survivorship of *A. purpuratus* larvae at three moments of the larval culturing period.



**Figura 2.** Incremento de la consanguinidad ( $\Delta F$ ), estimado por la proporción de cigotos autofecundados, en 91 familias de *A. purpuratus*.

**Figure 2.** Increment of the inbreeding ( $\Delta F$ ) estimated through the selfing rate, in 91 families of *A. purpuratus*.

Las familias con tasas más altas de autofecundación tendieron a tener menor proporción de larvas malformadas que aquellas con menor autofecundación, tanto en las evaluaciones realizadas a inicios como a mediados del cultivo (Fig. 6), apreciándose una moderada pero significativa correlación negativa entre ambas variables en las dos



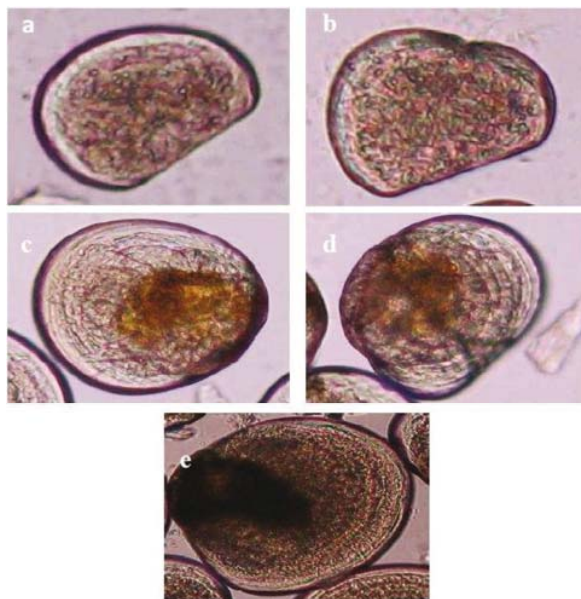
**Figura 3.** Variación en la longitud promedio de larvas de *A. purpuratus* a lo largo del periodo de cultivo.

**Figure 3.** Variation in the mean shell length of *A. purpuratus* larvae along of the larval cultivation period.

edades ( $r = 0,426$  y  $0,359$ , respectivamente;  $P < 0,05$ ). Por su parte, la temperatura media del agua del cultivo no se asoció significativamente con la frecuencia de larvas con alteraciones morfológicas a las 48 h post-fecundación ( $P > 0,05$ ), pero si se observó una moderada pero significativa asociación negativa ( $P < 0,05$ ) entre dichas variables en la medición realizada a mediados del cultivo (Fig. 7). En cambio, las tasas de autofecundación ni la temperatura media del agua se asociaron con la mortalidad larval ( $P > 0,05$ ).

## DISCUSIÓN

La presencia de una hendidura muy marcada en el contorno de la concha de las larvas a las 48 h post-fecundación es similar a las alteraciones descritas por Avendaño *et al.* (2001). Estas alteraciones persisten al menos hasta mediados del periodo de desarrollo larval, sugiriendo que ellas no serían letales en esta etapa o que pueden generarse durante el crecimiento de las larvas veliger. Su ausencia al final del cultivo, no obstante, parece indicar que estas alteraciones en la

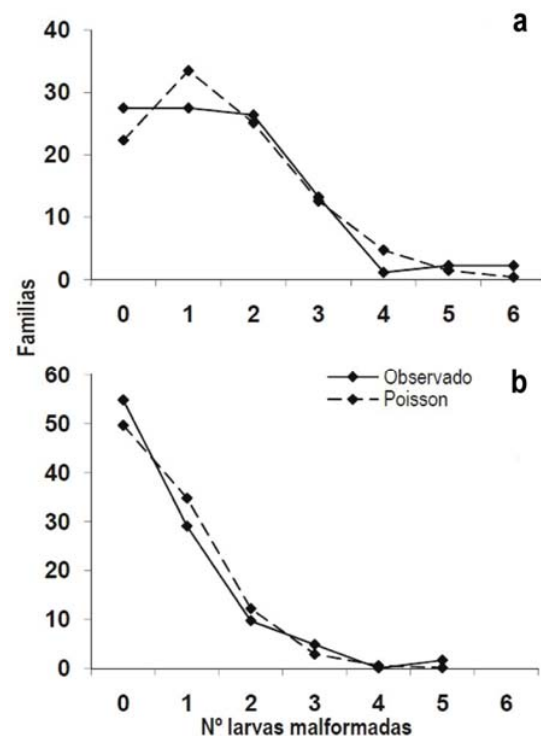


**Figura 4.** Larvas de *A. purpuratus*. a las 48 h post-fecundación: a) normal, b) malformada; a las 251,7 U.T.A. de cultivo: c) normal, d) malformada; e) al final del cultivo.

**Figure 4.** Larvae of *A. purpuratus*: after 48 h fertilization: a) normal, b) malformed; after 251.7 U.T.A. of cultivation: c) normal, d) malformed; e) at the end of the cultivation period.

concha pueden asociarse con mortalidad selectiva como proponen Avendaño *et al.* (2001). No obstante, por su baja frecuencia en los cultivos, menor al 12%, este no parece ser un factor relevante en el éxito de la producción de juveniles de ostión del norte en sistemas controlados.

Las malformaciones morfológicas se asocian con alteraciones aleatorias en el patrón de desarrollo ontogenético de los organismos (Waddington, 1957), las que se suponen no heredables y distribuidas al azar en la población, fenómeno denominado inestabilidad del desarrollo (ID; Palmer, 1994). Factores ambientales pueden incidir en la frecuencia y magnitud de la ID en las poblaciones (Markow, 1995; Dethlefsen *et al.*, 1996; Jezierska *et al.*, 2000) y la temperatura ha sido descrita como uno de ellos en distintos organismos (Zimmerman & Pechenik, 1991; Nomaguchi *et al.*, 1997; Hallare *et al.*, 2005). Nuestros resultados muestran que el incremento de temperatura, dentro de los rangos estudiados, tendería a favorecer una mayor estabilidad de desarrollo en *A. purpuratus*. Temperaturas más altas aumentan las tasas de desarrollo en moluscos (Barría *et al.*, 2005), y en particular en pectínidos (Tettelbach & Rhodes,



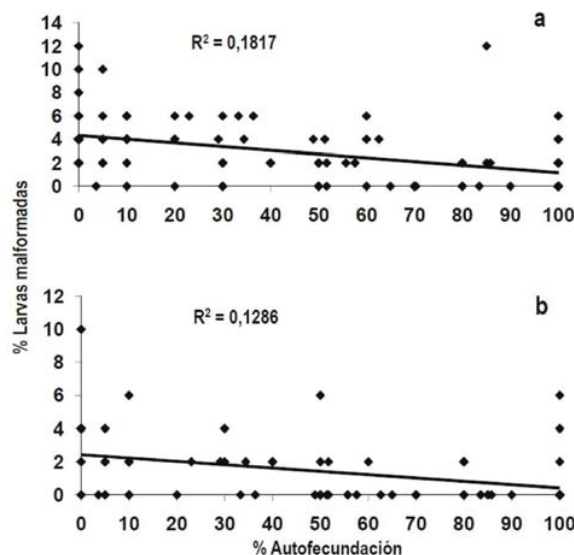
**Figura 5.** Distribución de frecuencia de familias con diferentes número de larvas malformadas por muestra: a) al inicio, b) a mediados del periodo de cultivo (251,7  $\pm$  8,9 U.T.A.). (N = 50 larvas por familia).

**Figure 5.** Frequency distribution of families with different number of malformed larvae per sample: a) at the beginning, b) at the middle of the cultivation period (251.7  $\pm$  8.9 U.T.A.). (N = 50 larvae for family).

1981; Di Salvo *et al.*, 1984; He *et al.*, 1999), y se puede presumir que al abreviarse ciertas etapas críticas de la ontogenia se reduce la probabilidad de accidentes causantes de malformaciones en los procesos de morfogénesis. No obstante, como se ha observado en *Ciona savignyi*, temperaturas superiores al óptimo para el desarrollo embrionario de la especie podrían favorecer el incremento de la ID (Nomaguchi *et al.*, 1997).

La frecuencia de larvas malformadas en *A. purpuratus* se distribuyó al azar entre familias, y se correlacionó negativamente con la tasa de autofecundación. Este resultado contradice los resultados de estudios previos sobre el efecto de la consanguinidad en especies con reproducción cruzada, en las que el incremento en la ID en las progenies suele ser una de las primeras manifestaciones de la depresión por consanguinidad (Smouse, 1986; Deng *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2006). No obstante, en cruzamientos entre especies o poblaciones conespe-



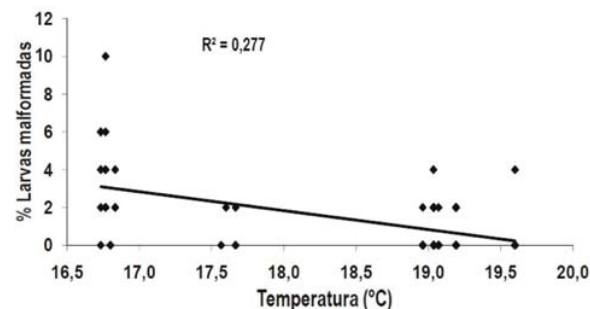


**Figura 6.** Asociación entre el porcentaje de autofecundación y frecuencia de larvas malformadas en 91 familias de *A. purpuratus*. a) al inicio, b) mediados ( $251,7 \pm 8,9^\circ$  U.T.A.) del periodo de cultivo.

**Figure 6.** Association between the self-fertilization proportion and the frequency of malformed larvae in 91 families of *A. purpuratus*. a) at the beginning, b) the middle ( $251,7 \pm 8,9^\circ$  U.T.A.) of the cultivation period.

cíficas genéticamente divergentes (subespecies, razas geográficas, etc.) también se ha observado incremento en las tasas de malformaciones, fenómeno conocido como depresión por exogamia (Alibert & Auffray, 2003). En ambos casos el fenómeno se asocia a una reducción de la homeostasis del desarrollo (HD) de las progenies respecto de sus parentales, es decir, de capacidad del genoma para compensar alteraciones causadas por el ambiente en el plan de desarrollo ontogenético contenido en los genes de un organismo (Waddington, 1957). La base genética de la pérdida de HD se ha vinculado con menores niveles de coadaptación genómica, es decir, de la capacidad del genoma de los individuos para actuar coordinadamente para producir el fenotipo normal. En el caso de la consanguinidad se atribuye al incremento de la homocigosis y una mayor probabilidad de expresión de alelos recesivos deletéreos al estado homocigoto (Woolf & Markow, 2003). En los cruces exogámicos, en cambio, se produciría por la incompatibilidad entre ambos genomas parentales para controlar eficientemente los procesos de morfogénesis individual (Alibert & Auffray, 2003).

*A. purpuratus* es una especie con alta fecundidad, pero sólo una proporción muy baja de los cigotos producidos completa su desarrollo larval, y aún menos sobreviven hasta la edad reproductiva (Di Salvo *et al.*,



**Figura 7.** Asociación entre la temperatura promedio del agua de cultivo y la frecuencia de larvas malformadas en 91 familias de *A. purpuratus* a mediados del periodo de cultivo.

**Figure 7.** Association between the average water temperature and the frequency of malformed larvae in 91 *A. purpuratus* families at the middle of the cultivation period.

1984; Avendaño *et al.*, 2001; Winkler & Estévez, 2003; Martínez *et al.*, 2007). Durante el desarrollo ontogenético de *A. purpuratus*, la proporción de individuos generados por autofecundación dentro de familias se reduce significativamente (Toro *et al.*, 2009, 2010), así como la homocigosis en loci aloenzimáticos (Winkler *et al.*, 2009), indicando la ocurrencia de fuertes efectos selectivos contra los ejemplares con más alta consanguinidad dentro de la población. No obstante, si dentro de una población diferentes genotipos multiloci producen fenotipos similarmente adaptados, mientras que otras combinaciones genotípicas tienen menor adecuación biológica relativa, en un escenario de intensa selección natural sobrevivirán y se reproducirán preferentemente los individuos con genotipos que otorguen los mejores niveles de coadaptación genómica, y las progenies producidas por autofecundación tendrán una mejor oportunidad de reunir combinaciones alélicas ventajosas que aquellas producidas por reproducción cruzada al azar. La tendencia hacia menores tasas de malformaciones en larvas de familias con mayores niveles de autofecundación se podría asociar al efecto de la selección natural en la generación parental y la probabilidad que se reproduzcan en las progenies algunos de estos genotipos particularmente ventajosos. La consanguinidad produce desequilibrios de fase gamética entre loci no ligados físicamente y favorece la conformación de complejos genéticos particularmente coadaptados (Endler, 1977, Templeton, 1986), lo que puede contribuir a acentuar este fenómeno.

Los niveles de autofecundación observados en este trabajo variaron ampliamente entre individuos y, en promedio, superan lo informado previamente para esta



especie utilizando la misma metodología de desove y cuantificación (Winkler & Estévez, 2003; Toro *et al.*, 2009, 2010). En la reproducción artificial de esta especie con fines comerciales se suelen recoger separadamente los gametos de ambos sexos y la fecundación se realiza usando pools de gametos de varios reproductores (Bellolio *et al.*, 1994), o bien se usan cruces masivos en que un gran número de reproductores desovan en un estanque y la fecundación ocurre espontáneamente. En ambos casos, los primeros pulsos de liberación de ovocitos, en los que la autofecundación es mayor (Winkler & Estévez, 2003), no se descartan. Así, es esperable que los niveles de autofecundación durante la reproducción artificial de la especie, y por lo tanto de consanguinidad, sean mayores aún que los estimados en este trabajo. En la naturaleza, en cambio, se presume que las tasas de autofecundación serían más bajas que en cultivo (Martínez *et al.*, 2000). Coherente con este supuesto, los estudios de genética poblacional no han mostrado una tendencia hacia exceso de homocigotos sobre múltiples loci (Von Brand & Kijima, 1990; Galleguillos & Troncoso, 1991; Moragat *et al.*, 2001), sugiriendo que dentro de los bancos naturales la reproducción se ajustaría a un modelo panmítico. Dado que la autofecundación parcial no incrementa progresivamente la consanguinidad de las poblaciones, si no que ésta alcanza un equilibrio (Falconer & Mackay, 1996), con tasas de autofecundación de 10%, el coeficiente de consanguinidad al equilibrio ( $F_{eq}$ ) por esta causa será aproximadamente de 5% (Winkler & Estévez, 2003). Con un 43% de autofecundación por generación, como se estimó en el presente trabajo,  $F_{eq} \sim 0,27$ , presumiendo que dicho valor no ha sido afectado por otros factores.

Por otra parte, en este estudio no se observó evidencias de depresión por consanguinidad en la supervivencia o crecimiento larval, a diferencia de lo informado por Martínez *et al.* (2007) y por Toro *et al.* (2010), pero consistente con lo informado por Winkler & Estévez (2003). Estas diferencias en resultados se han observado entre estudios con otras especies de pectínidos hermafroditas (Beaumont & Budd, 1983; Betancourt *et al.*, 1994; Ibarra *et al.*, 1995; Zheng *et al.*, 2008). Considerando que la magnitud de la depresión por consanguinidad en pectínidos puede verse afectada por el nivel de endogamia acumulado en la población estudiada (Zheng *et al.*, 2005, 2008) y una variada gama de factores pueden dificultar la detección de diferencias verdaderas entre grupos de individuos con diferentes niveles de autofecundación, como la edad de los individuos (Toro *et al.*, 2010) o la varianza de los datos, la constatación de depresión por

consanguinidad en una especie es particularmente significativa. Lo que destaca este trabajo, sin embargo, es que en una especie con autofecundación parcial, los efectos negativos de la consanguinidad en algunos rasgos, podrían ser balanceados por efectos positivos en otros.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a quienes brindaron su apoyo técnico en el trabajo, Johanna Tamayo, Janette Aliaga y Miguel Rivera; a William Fariás, Manuel Carmona y Ricardo García por su apoyo en las labores de cultivo larval; al Prof. Héctor Flores por las fructíferas discusiones y al Biol. Sergio Cortez (SERNAPESCA) por la información sobre el banco de Tongoy. Trabajo parcialmente financiado por el Proyecto INNOVA 05CR11PPT-18.

## REFERENCIAS

- Avendaño, M., M. Le Pennec & M. Cantillanez. 2001. Anormalidades en larvas de *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819) (Mollusca: Pectinidae), uno de los problemas en la producción artificial de semilla. *Estud. Oceanol.*, 20: 33-42.
- Alibert, P. & J.C. Aufray. 2003. Genomic coadaptation, outbreeding depression and developmental instability. En: M. Pollak (ed.). *Developmental instability: causes and consequences*. Oxford University Press, New York, pp. 116-134.
- Barría, E., C. Jara & A. Kurt. 2005. La temperatura como factor de variabilidad en el desarrollo de larvas zoeas de *Acanthocyclus hassleri* Rathbun (Decapoda, Brachyura, Atelecyclidae) cultivadas en laboratorio. *Invest. Mar., Valparaíso*, 33: 25-41.
- Beaumont, A.R. & M.D. Budd. 1983. Effects of self-fertilisation and other factors on the early development of the scallop *Pecten maximus*. *Mar. Biol.*, 76: 285-289.
- Beaumont, A.R. 1986. Genetic aspects of hatchery rearing of the scallop, *Pecten maximus* (L.). *Aquaculture*, 57: 99-110.
- Bellolio, G., P. Toledo & B. Campos. 1994. Morfología de la concha larval y postlarval del ostión *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819) (Bivalvia, Pectinidae) en Chile. *Rev. Chil. Hist. Nat.*, 67: 229-237.
- Benninger P.G. & M. Le Pennec. 1991. Functional anatomy of scallops. En: S.E. Shumway (ed.). *Scallops: biology, ecology and aquaculture*. Elsevier, Amsterdam, pp. 133-224.
- Betancourt, R.J., J.E. Pérez, J.E. Vélez, L. Freitas & M.I. Segnini. 1994. Efectos de la consanguinidad en la

- vieira *Euvola ziczag*. Instituto Oceanográfico, Venezuela, 34: 69-75.
- Brenko, M. & A. Calabrese. 1969. The combined effects of salinity and temperature on larvae of the mussel *Mytilus edulis*. Mar. Biol., 4: 224-226.
- Calvo, J., E. Morriconi & P. Orler. 1998. Estrategias reproductivas de moluscos bivalvos y equinoideos. En: E.E. Boschi (ed.). El mar argentino y sus recursos pesqueros. Tomo 2, pp. 195-231.
- Charlesworth, D. & B. Charlesworth. 1979. The evolutionary genetics of sexual systems in flowering plants. Proc. Roy. Soc. Lond., 205: 513-530.
- Charlesworth, D. & B. Charlesworth. 1987. Inbreeding depression and its evolutionary consequences. Ann. Rev. Ecol. Syst., 18: 237-268.
- Crnokrak, P. & D. Roff. 1999. Inbreeding depression in the wild. Heredity, 83: 260-270.
- Deng, Y., X. Liu, G. Zhang & X. Guo. 2005. Inbreeding depression and maternal effects on early performance of Pacific abalone. N. Am. J. Aquacult., 67: 231-236.
- De Rose, M. & D. Roff. 1999. A comparison of inbreeding depression in life-history and morphological traits in animals. Evolution, 54: 1288-1292.
- Désilets, J., C. Gicquaud & F. Dubé. 1995. An ultrastructural analysis of early fertilization events in the giant scallop, *Placopecten magellanicus* (Mollusca, Pelecypoda). Invert. Reprod. Dev., 27: 115-129.
- Dethlefsen, V., H. Von Westernhagen & P. Cameron. 1996. Malformations in North Sea pelagic fish embryos during the period 1984-1995. ICES J. Mar. Sci., 53: 1024-1035.
- Di Salvo, L.H., E. Alarcón, E. Martínez & E. Uribe. 1984. Progress in mass culture of *Chlamys (Argopecten) purpurata* Lamarck (1819) with notes on its natural history. Rev. Chil. Hist. Nat., 57: 35-45.
- Dobzhansky, T. 1955. Genetic homeostasis. Evolution, 9: 100-101.
- Dobzhansky, T. & B. Wallace. 1953. The genetics of homeostasis in *Drosophila*. Genetics, 39: 162-171.
- Endler, J.A. 1977. Geographic variation, speciation and clines. Princeton University Press, Princeton, 255 pp.
- Evans, F., S. Matson, J. Brake & C. Langdon. 2004. The effects of inbreeding on performance traits of adult Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). Aquaculture, 230: 89-98.
- Falconer, D.S. & T.F.C. Mackay. 1996. Introducción a la genética cuantitativa. Acribia, Zaragoza, 469 pp.
- Galleguillos, R.A. & L.S. Troncoso. 1991. Protein variation in the Chilean-Peruvian scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). In: S.E. Shumway & P.A. Sandifer (eds.). International Compendium of Scallop Biology and Culture. World Aquacult. Soc. Vol. 1, pp. 146-150.
- Gallegos, P. 2003. Estudio comparativo de los parámetros reproductivos de hembras de puye (*Galaxias maculatus*) (Jenyns, 1842) silvestres y de cultivo experimental (F1). Tesis. Escuela de Acuicultura, Universidad Católica de Temuco, 66 pp.
- González, A. 2003. Estudio comparativo de los parámetros reproductivos de hembras de puye (*Galaxias maculatus*) (Jenyns, 1842) silvestres, de primera y segunda generación en cautiverio. Tesis. Escuela de Acuicultura, Universidad Católica de Temuco, 63 pp.
- Guzmán, N., S. Saa & L. Ortlieb. 1998. Catálogo descriptivo de los moluscos litorales (Gastropoda y Pelecypoda) de la zona de Antofagasta, 23°S (Chile). Estud. Oceanol., 17: 17-86.
- Hallare, A.V., M. Schirling, T. Luckenbach, H.R. Köhler & R. Triebkorn. 2005. Combined effects of temperature and cadmium on developmental parameters and biomarker responses in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. J. Therm. Biol., 30: 7-1.
- He, Y., F. Zhang & B. Li. 1999. Effect of temperature on embryo and larval development of the scallop *Argopecten irradians concentricus* Say. Oceanol. Limnol. Sinica, 30: 284-289.
- Ibarra, A., P. Cruz & B. Romero. 1995. Effects of inbreeding on growth and survival of self-fertilized catarina scallop larvae, *Argopecten circularis*. Aquaculture, 134: 37-47.
- Jezierska, B., K. Lugowska, M. Witeska & P. Sarnowski. 2000. Malformations of newly hatched common carp larvae. EJPAU, [http://www.ejpau.media.pl/volume7/issue2/fisheries/art-01.html], Revisado: 20 Septiembre 2010.
- Knowlton, N. & J.B.C. Jackson. 1993. Inbreeding and outbreeding in marine invertebrates. In: N.W. Thornhill (ed.). The natural history of inbreeding and outbreeding: theoretical and empirical perspectives. University Chicago Press, Chicago, pp. 200-249.
- Kyosuka, K., R. Deguchi, N. Yoshida & M. Yamashita. 1997. Change of intracellular Ca<sup>2+</sup> is not involved in serotonin-induced meiosis reinitiation from the first prophase in oocytes of the marine bivalve *Crassostrea gigas*. Dev. Biol., 182: 33-41.
- Lande, R. & D.W. Schemske. 1985. The evolution of self-fertilization and inbreeding depression in plants. I. Genetic models. Evolution, 39: 24-40.
- Lens, L., S. Van Dongen, P. Galbusera, T. Schenck, E. Matthysen & T. Van De Castele. 2000. Develop-

- mental instability and inbreeding in natural bird populations exposed to different levels of habitat disturbance. *J. Evol. Biol.*, 13: 889-896.
- Lynch, M. & B. Walsh. 1998. Genetic and analysis of quantitative traits. Sinauer Associates, Sunderland, 980 pp.
- Lu, G. & L. Bernatchez. 1999. A study of fluctuating asymmetry in hybrids of dwarf and normal lake whitefish ecotypes (*Coregonus clupeaformis*) from different glacial races. *Heredity*, 83: 742-747.
- Mackie, G.L. 1984. Bivalves. In: A.S. Tompa, A.H. Veerdonk & Van Den Bigelaar (ed.). *The Mollusca. Reproduction*, Vol 7. Academic Press, San Diego, pp. 351-418.
- Markow, T.A. 1995. Evolutionary ecology and developmental instability. *Annu. Rev. Entomol.*, 40: 105-120.
- Martínez, G., A.Z. Olivares & L. Mettifogo. 2000. *In vitro* effects of monoamines and prostaglandins on meiosis reinitiation and oocyte release in *Argopecten purpuratus* Lamarck. *Invert. Reprod. Dev.*, 39: 61-69.
- Martínez, G., L. Mettifogo, M.A. Pérez & C. Callejas. 2007. A method to eliminate self-fertilization in a simultaneous hermaphrodite scallop. 1. Effects on growth and survival of larvae and juveniles. *Aquaculture*, 273: 459-469.
- Martínez, P. & A. Figueras. 2007. Genética y genómica en acuicultura. Observatorio Español de Acuicultura (OESA), Madrid, 889 pp.
- Moragat, D., M. Avendaño, J. Peña, M. Le Pennec, A. Tanguy & J. Barón. 2001. Genetic and morphological differentiation between two pectinid populations of *Argopecten purpuratus* from the northern Chilean coast. *Estud. Oceanol.*, 20: 51-60.
- Murakoshi, M. & H. Hirata. 1993. Self-fertilization in four species of giant clam. *Nippon Suisan Gakk.*, 59: 581-587.
- Naciri-Graven, Y., S. Launey, N. Lebayon, A. Gerard & J.P. Baud. 2000. Influence of parentage upon growth in *Ostrea edulis*: evidence for inbreeding depression. *Genet. Res. Camb.*, 76: 159-168.
- Nijhout, H. & G. Davidowitz. 2003. Developmental perspectives on phenotypic variation, canalization, and fluctuating asymmetry. In: M. Polak (ed.). *Developmental instability, causes and consequences*. Oxford University Press, New York, pp. 3-13.
- Nomaguchi, T., C. Nishijima, S. Minowa, M. Hashimoto, C. Haraguchi, S. Amemiya & H. Fujisawa. 1997. Embryonic thermo sensitivity of the ascidian, *Ciona savignyi*. *Zool. Sci.*, 14: 511-515.
- Palmer, A.R. 1994. Fluctuating asymmetry analyses: a primer. En: T.A. Markow (ed.). *Developmental instability: its origins and evolutionary implications*. Kluwer Academic Press, Dordrecht, pp. 335-364.
- Park, C., T. Kobayashi & A. Kijima. 2006. Inbreeding depression traits in Pacific abalone *Haliotis discus hannai* by factorial mating experiments. *Fish. Sci.*, 72: 774-780.
- Pérez, R. 2002. Evaluación de la eficacia y seguridad de bronopol durante un periodo de incubación de 90 a 170 U.T.A. en ova verde de *Salmo salar*. Tesis. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile, Valdivia, 44 pp.
- Ruiz, M., E. Tarifeño, A. Llanos, C. Padget & B. Campos. 2008. Efecto de la temperatura en el desarrollo embrionario y larval del mejillón, *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819). *Rev. Biol. Mar. Oceanogr.*, 43: 51-61.
- Ruppert, E. & R. Barnes. 1996. *Zoología de los invertebrados*. McGraw-Hill Interamericana, Madrid, 1114 pp.
- Sokal, R. & J. Rohlf. 1981. *Biometría*. Blume, Madrid, 832 pp.
- Smouse, P. 1986. The fitness consequences of multiple-locus heterozygosity under the multiplicative overdominance and inbreeding depression models. *Evolution*, 40: 946-957.
- Templeton, A.R. 1986. Coadaptation and outbreeding depression. In: M.E. Soulé (ed.). *Conservation biology: the science of scarcity and diversity*. Sinauer Associates, Sunderland, pp. 105-116.
- Tettelbach, S.T. & E.W. Rhodes. 1981. Combined effects of temperature and salinity on embryos and larvae of the northern bay scallop *Argopecten irradians irradians*. *Mar. Biol.*, 63: 249-25.
- Thoday, J.M. 1958. Homeostasis in a selection experiment. *Heredity*, 12: 401-415.
- Toro, J.E., M.P. Montoya & V. Martínez. 2009. Efecto de la autofecundación sobre la varianza aditiva, ambiental y fenotípica, y sobre el valor de la heredabilidad para el rasgo "longitud de la valva" en *Argopecten purpuratus*, utilizando un modelo animal. *Arch. Med. Vet.*, 41: 245-253.
- Toro, J.E., M.P. Montoya, V. Martínez, D. Gutiérrez & A.M. Vergara. 2010. Consecuencias de la autofecundación sobre la tasa de crecimiento y supervivencia de *Argopecten purpuratus*. *Arch. Med. Vet.*, 42: 63-70.
- Uki, N. & S. Kikuchi. 1984. Regulation of maturation and spawning of an abalone, *Haliotis* (Gastropoda) by external environmental factors. *Aquaculture*, 39: 247-261.
- Von Brand, E. & A. Kijima. 1990. Comparison of genetic markers between the Chilean scallop

- Argopecten purpuratus* and the Japanese scallop *Patinopecten yessoensis*. Tohoku J. Agric. Res. 41: 25-35.
- Waddington, C.H. 1953. The "Baldwin Effect", "Genetic Assimilation" and "Homeostasis". Evolution, 7: 386-387.
- Waddington, C.H. 1957. The strategy of the genes. George Allen & Unwin, London, 154 pp.
- Wang, S., J. Hard & F. Utter. 2002. Salmonid inbreeding: a review. Rev. Fish Biol. Fish., 11: 301-319.
- Widowati, I., G. Dorange, M. Le Pennec & J.C. Cochard. 1995. Genital tract and oocytic pathway during spawning in *Pecten maximus* (Mollusca, Bivalvia). Invert. Reprod. Dev., 28: 153-160.
- Winkler, F.M. & B. Estévez. 2003. Effects of self-fertilization on growth and survival of larvae and juveniles of the scallop *Argopecten purpuratus* L. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 292: 93-102.
- Winkler, F.M., L. Mettifogo, M.A. Pérez, C. Callejas, K.B. Borkordt & G. Martínez. 2009. Effects self fertilization on allozyme loci heterozygosity in juvenile of the hermaphrodite scallop *Argopecten purpuratus*. 17<sup>th</sup> International Pectinid Workshop, Book of Abstract: pp. 162.
- Woolf, C.M. & T.A. Markow. 2003. Genetic models for developmental homeostasis: Historical perspectives. In: M. Polak (ed.). Developmental instability, causes and consequences. Oxford University Press, New York, pp. 99-115.
- Zheng, H., X. Liu, G. Zhang & G. Zhang. 2005. Effects of effective population size on the F2 growth and survival of bay scallop *Argopecten irradians irradians* (Lamarck). Acta Oceanol. Sin., 24: 114-120.
- Zheng, H., G. Zhang, X. Guo & X. Liu. 2008. Inbreeding depression for various traits in two cultured populations of American bay scallop, *Argopecten irradians* Lamarck (1819) introduced into China. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 364: 42-47.
- Zimmerman, K. & J. Pechenik. 1991. How do temperature and salinity affect relative rates of growth, morphological differentiation, and time to metamorphic competence in larvae of the marine gastropod *Crepidula plana*? Biol. Bull., 180: 372-386.

Received: 27 September 2010; Accepted: 24 May 2011