

ESCALA DE MADUREZ GONADAL MACROSCÓPICA DE CONCHA PATA DE BURRO *Larkinia grandis* (Broderip & G.B. Sowerby, 1829) VALIDADA HISTOLÓGICAMENTE

HISTOLOGICALLY VALIDATED MACROSCOPIC GONADAL MATURITY SCALE OF MANGROVE ARK *Larkinia grandis* (Broderip & G.B. Sowerby, 1829)

Luis Tito¹Elmer Ordinola¹Ángel Perea²Solange Alemán¹

<https://doi.org/10.53554/boletin.v37i1.356>

RESUMEN

TITO, L., ORDINOLA, E., PEREA, A., ALEMÁN, S. (2022). Escala de madurez gonadal macroscópica de concha pata de burro *Larkinia grandis* (Broderip & G.B. Sowerby, 1829) validada histológicamente. *Bol Inst Mar Perú*. 37(1): 22-40.- Se realizó la validación de la escala de madurez gonadal macroscópica de la concha pata de burro *Larkinia grandis*. Se analizaron 1228 gónadas recolectadas de enero a diciembre 2017, provenientes de la pesquería artesanal efectuada en los manglares de Tumbes. Por estar fusionadas las regiones muscular, visceral y gonadal, el corte histológico incorporó todas las zonas, pero solo se investigó la región gonadal, empleándose el método de infiltración en parafina y coloración con hematoxilina-eosina. Con base a la relación de las características observadas en el análisis histológico y observaciones visuales directas de las gónadas, se asignó a cada individuo una fase de madurez macroscópica. Se efectuó la descripción de las fases de madurez: 0 (virginal), I (reposo), II (en maduración), III (maduro), IV (desovante/expulsante) y V (recuperación/post expulsante). No se han encontrado estudios histológicos similares para organismos del mismo género, por lo que este trabajo servirá de referencia para futuras investigaciones. Se recomienda el empleo de esta escala validada para estimar la talla mínima de captura y la época de mayor actividad reproductiva de la especie, con la finalidad de proponer medidas de manejo que hagan sostenible su pesquería.

PALABRAS CLAVE: *Larkinia grandis*, fases de madurez, desarrollo gonadal, histología

ABSTRACT

TITO, L., ORDINOLA, E., PEREA, A., ALEMÁN, S. (2022). *Histologically validated macroscopic gonadal maturity scale of mangrove ark Larkinia grandis* (Broderip & G.B. Sowerby, 1829). *Bol Inst Mar Peru*. 37(1): 22-40.- We validated the macroscopic gonadal maturity scale of mangrove ark *Larkinia grandis* by analyzing 1228 gonads collected from the artisanal fishery in the mangroves of Tumbes between January and December 2017. Paraffin embedding and hematoxylin-eosin staining were used for the gonads and based on the relationship of the characteristics observed in their histological analysis and direct visual observations, we assigned a macroscopic maturity stage to each individual. A total of five maturity stages were identified: 0 (virginal), I (resting), II (maturing), III (mature), IV (spawning/expelling), and V (recovery/post-expelling). No similar histological studies have been found for organisms of the same genus, so our work will serve as a reference for future research. We recommend the use of this validated scale to estimate the minimum catch size and the time of greatest reproductive activity of the species, to propose management measures to maintain the sustainability of the fishery.

KEYWORDS: *Larkinia grandis*, maturity stages, gonadal development, histology

1. INTRODUCCIÓN

Larkinia grandis conocida comúnmente como “concha pata de burro”, “casco de mula”, “pata de mula”, “sangara”, se distribuye desde bahía Magdalena, Baja California, Golfo de California a Sechura, Perú (ALAMO y VALDIVIESO, 1997; KEEN, 1971). El hábitat de la especie, es la zona intermareal y aguas sublitorales poco profundas, especialmente sobre bancos de arena o fondos fangoso de áreas de manglares

1. INTRODUCTION

Larkinia grandis, also known as mangrove ark, is a clam distributed from Magdalena Bay, Baja California, to Sechura, Peru (ALAMO & VALDIVIESO, 1997; KEEN, 1971) and whose habitat is located in the intertidal zone and shallow sublittoral waters, especially on sandbanks or muddy bottoms of mangrove areas (FISHER *et al.*, 1995; BOLAÑOS, 1996; MORALES, 2015).

1 Instituto del Mar del Perú, Laboratorio Costero de Tumbes, Perú. Itito@imarpe.gob.pe

2 Instituto del Mar del Perú, Laboratorio Costero de Chimbote, Perú.

(FISHER *et al.*, 1995; BOLAÑOS, 1996; MORALES, 2015).

Su ubicación taxonómica según WoRMS (2020):

Phylum: Mollusca
Clase: Bivalvia
Orden: Arcida
Familia: Arcidae
Género: *Larkinia*
Especie: *Larkinia grandis*

Larkinia grandis, es la especie más grande de los arcas (PÉREZ, 2007; RIASCOS *et al.*, 2004), integra el grupo de moluscos bivalvos de importancia comercial que se extraen en el ecosistema de manglares de Tumbes, entre los que también destacan la concha negra *Anadara tuberculosa*, concha huequera *Anadara similis*, concha rayada *Ilioichione subrugosa*, choro o mejillón *Mytella guyanensis*, concha lampa *Atrina maura* y concha blanca o tabaquera *Protothaca asperrima*.

La extracción de concha pata de burro en Tumbes data desde épocas prehispánicas (HOCQUENGHEM y PEÑA, 1994; VÍLCHEZ, 2012; RODRÍGUEZ, 2016), con fines de subsistencia y artesanía; en la actualidad, sustenta una pesquería artesanal de menor escala, que es efectuada por extractores denominados “concheros” o “pateadores”. Sin embargo, a la fecha no se cuenta con estudios reproductivos que permitan proponer medidas de manejo para hacer sostenible su pesquería.

Se tiene conocimiento que, durante las temporadas de veda reproductiva de concha negra, concha huequera y cangrejo del manglar (*Ucides occidentalis*); así como, la de crecimiento (muda) de este último recurso, se incrementa el número de extractores y sus desembarques para suplir la demanda de los recursos restringidos en su extracción (Ordinola, 2020: Inf. Tec. Interno Inst. Mar Perú). En Puerto Pizarro se ha registrado una talla máxima de 161 mm de longitud valvar (LV) (Ordinola, 2019: Inf. Tec. Interno Inst. Mar Perú.), superior a la reportada por FISHER *et al.* (1995) de 145 mm LV y MORALES (2015) de 156 mm LV.

En *L. grandis*, la región gonadal se encuentra fusionada con la masa visceral y el músculo pedal formando una estructura diferenciable del

According to WoRMS (2020), their taxonomic position is as follows:

Phylum: Mollusca
Class: Bivalvia
Order: Arcida
Family: Arcidae
Genus: *Larkinia*
Species: *Larkinia grandis*

Larkinia grandis, the largest Arcidae clam (PÉREZ, 2007; RIASCOS *et al.*, 2004), integrates the group of commercially important bivalve mollusks that are extracted in the mangrove ecosystem of Tumbes, among which also include the black ark *Anadara tuberculosa*, brown ark *Anadara similis*, partially-rough Venus *Ilioichione subrugosa*, ribbed mussel *Mytella guyanensis*, Maura pen shell *Atrina maura*, and *Protothaca asperrima*.

In Tumbes, since pre-Hispanic times, the mangrove ark has been extracted for subsistence and handicraft purposes (HOCQUENGHEM & PEÑA, 1994; VÍLCHEZ, 2012; RODRÍGUEZ, 2016). Currently, it supports a smaller-scale artisanal fishery, which is carried out by shellfishermen, locally known as *concheros* or *pateadores*. Nevertheless, there are no reproductive studies to date that would allow us to propose management measures to make the fishery sustainable.

During the closed seasons for the reproduction of black ark, brown ark, and mangrove ghost crab (*Ucides occidentalis*), as well as the growth (molting) of the latter resource, the number of extractors and their landings increase to meet the demand for resources restricted in their extraction (Ordinola, 2020). A maximum size of 161 mm valve length (VL) has been recorded in Puerto Pizarro (Ordinola, 2019), higher than what was reported by FISHER *et al.* (1995), with 145 mm VL, and MORALES (2015), with 156 mm VL.

The gonadal region of *L. grandis* is fused with the visceral mass and pedal muscle, thus forming a structure that can be differentiated from the rest of the body (RIASCOS *et al.*, 2004). As indicated by CRUZ (1986), males and

resto del cuerpo (RIASCOS *et al.*, 2004). Tal como lo indica CRUZ (1986), en *L. grandis*, al igual que en otros árcidos, los machos y hembras presentan distinta coloración en las gónadas, pudiendo presentar según PÉREZ (2007) diferentes tonalidades de naranja en hembras y de crema en machos, dependiendo del desarrollo gonadal.

PÉREZ (2007) señala que es importante conocer las fases de madurez gonadal de los bivalvos para fines de manejo y recomienda el análisis histológico como una base sólida para obtener mejores resultados, por ser el método más preciso para este tipo de estudios. Así mismo, BUITRÓN *et al.* (2015) indica que la determinación de las fases de madurez gonadal es la base para realizar el estudio de las variables y aspectos reproductivos, tales como el cálculo de la talla de madurez y determinación de la época de mayor actividad reproductiva y de desove.

A partir del 2017, el Laboratorio Costero de Tumbes a través del área de seguimiento de la pesquería de invertebrados marinos y del manglar; así como, el área de biología reproductiva, iniciaron el estudio biológico reproductivo del recurso *L. grandis*, con el objetivo de elaborar una escala de madurez gonadal macroscópica con base histológica, que servirá como herramienta indispensable para un mejor seguimiento de sus aspectos reproductivos, orientados a proponer medidas para un manejo sustentable de su pesquería.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

Se recolectaron 1.228 gónadas de *L. grandis*, de enero a diciembre 2017, provenientes de las actividades de extracción manual efectuadas en los manglares de Tumbes, cuyos ejemplares registraron tallas desde 33 mm hasta 124 mm de longitud valvar (LV). Posteriormente, se procedió a realizar el muestreo biométrico y biológico según SANJINEZ *et al.* (2016), con la excepción de que cada individuo fue abierto por desprendimiento de los músculos abductores con ayuda de un abridor de conchas comercializado en Perú, para abrir bivalvos y el empleo de dos cuchillos sin filo, para no dañar sus estructuras (Fig. 1), luego se procedió a observar la presencia externa a manera de hendiduras para determinar si el individuo analizado era virginal o adulto, seguidamente se practicó un corte transversal

females *L. grandis*, as in other Arcidae clams, have different coloration in the gonads, and according to PÉREZ (2007) may present different shades of orange in females and cream in males, depending on the gonadal development.

PÉREZ (2007) states that it is important to know the gonadal maturity stages of bivalves for management purposes and recommends histological analysis as a solid basis for obtaining better results, given that it is the most accurate method for this type of study. Likewise, BUITRÓN *et al.* (2015) indicate that determining the gonadal maturity stages is key to studying reproductive variables and aspects, such as determining the size at maturity and the time of greatest reproductive activity and spawning.

Since 2017, the area of monitoring of the marine invertebrate and mangrove fishery, as well as the area of the reproductive biology of the Coastal Laboratory of Tumbes, initiated the biological reproductive study of the resource *L. grandis*, to develop a scale of histologically based macroscopic gonadal maturity, which will serve as an indispensable tool for a better study of its reproductive aspects and to propose measures for the sustainable management of its fishery.

2. MATERIAL AND METHODS

From January to December 2017, 1228 gonads of *L. grandis* were collected from manual extraction activities carried out in the mangroves of Tumbes. The specimens recorded sizes ranging from 33 mm to 124 mm in valve length (VL). Then, the biometric and biological sampling was carried out according to SANJINEZ *et al.* (2016), although each individual was opened by detaching the abductor muscles using a shell opener commercialized in Peru, to open bivalves and the use of two blunt knives, so their structures were not damaged (Fig. 1). We then observed the external presence of slits to determine whether the individual analyzed was virginal or adult, subsequently, we made a transverse cut (Fig. 2) in the middle part of the body and obtained a sample of the gonads (Fig. 3).

(Fig. 2) en la parte media del cuerpo se obtuvo una muestra de las gónadas (Fig. 3). Posteriormente, se tomaron fotografías del tejido gonadal antes de ser fijados en formaldehído buferado al 10%, y ser procesados histológicamente en el laboratorio.

Para el procesamiento histológico de las gónadas se empleó el método de infiltración con parafina (HUMASON, 1979), y los cortes fueron hechos a 7 μm de grosor empleando un micrótopo de rotación. Las secciones histológicas obtenidas se colorearon manualmente con hematoxilina-eosina y como medio de montaje se utilizó Entellan (PAREDES, 2010; ORTIZ *et al.*, 2011; BUITRÓN *et al.*, 2015).

Microscópicamente, se analizaron las gónadas de las hembras y machos, con el fin de determinar sus características celulares y desarrollo gonadal (ISHIYAMA y TERUKINA, 1989; PAREDES, 2010; ORTIZ *et al.*, 2011).

Las fotografías sirvieron para realizar la descripción macroscópica de las gónadas, tomando como referencia la metodología descrita por BUITRÓN *et al.* (2015).

3. RESULTADOS

Se detallan las características macroscópicas y microscópicas de las fases de madurez gonadal observadas en las gónadas de hembras y machos de *L. grandis*.

Later, photographs of the gonadal tissue were taken before being fixed in 10% buffered formaldehyde and histologically processed in the laboratory.

The paraffin embedding method (HUMASON, 1979), was used for histological processing of the gonads, and the sections were made at 7 μm thickness using a rotating microtome. The histological sections obtained were manually stained with hematoxylin-eosin and Entellan was used as a mounting medium (PAREDES, 2010; ORTIZ *et al.*, 2011; BUITRÓN *et al.*, 2015).

The gonads of females and males were analyzed microscopically to determine their cellular characteristics and gonadal development (ISHIYAMA & TERUKINA, 1989; PAREDES, 2010; ORTIZ *et al.*, 2011).

The photographs were used to carry out the macroscopic description of the gonads, based on the methodology described by BUITRÓN *et al.* (2015).

3. RESULTS

The macroscopic and microscopic characteristics of the gonadal maturity stages observed in the gonads of females and males of *L. grandis* are detailed.



Figura 1.- Abertura de *L. grandis*
Figure 1. Opening of *L. grandis*

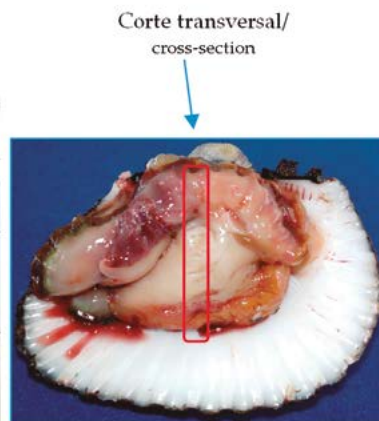


Figura 2.- Zona de corte para observar la gónada
Figure 2. Cutting area to observe the gonad

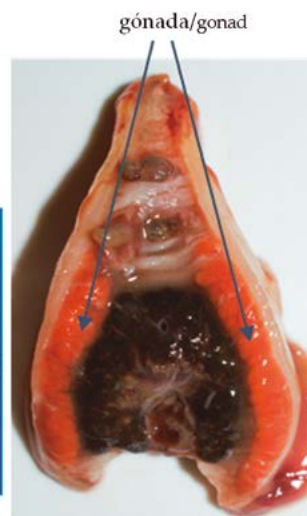


Figura 3.- Región gonadal
Figure 3. Gonadal region

**GÓNADAS NO DIFERENCIABLES
MACROSCÓPICAMENTE**

Virginal (Fase 0)

Características macroscópicas: externamente el tejido que cubre la masa visceral se observa liso y sin hendiduras. Al hacer un corte transversal no se advierte la gónada a simple vista. Son individuos juveniles que aún no han alcanzado la madurez gonadal (Fig. 4-A).

Características microscópicas: en el caso de las hembras se observan trabéculas pequeñas con ovogonias adosadas a su pared interior, también se pueden notar ovocitos inmaduros (Fig. 4-B). En los machos se advierten trabéculas pequeñas con espermatogonias adosadas a su pared (Fig. 4-C). El grosor de la capa de tejido conectivo es delgado para ambos y en algunos casos no es posible ver tejido gonadal.

MACROSCOPICALLY INDISTINGUISHABLE GONADS

Virginal (Stage 0)

Macroscopic features: externally, the tissue covering the visceral mass is observed smooth and without slits. When a transversal cut is made, the gonad is not visible to the naked eye. They are juvenile individuals that have not yet reached gonadal maturity (Fig. 4-A).

Microscopic features: for females, we can observe small trabeculae with ovogonia attached to their inner wall, as well as immature oocytes (Fig. 4-B). For males, small trabeculae with spermatogonia attached to their wall can be observed (Fig. 4-C). The thickness of the connective tissue layer is thin for both and in some cases, it is not possible to see gonadal tissue.

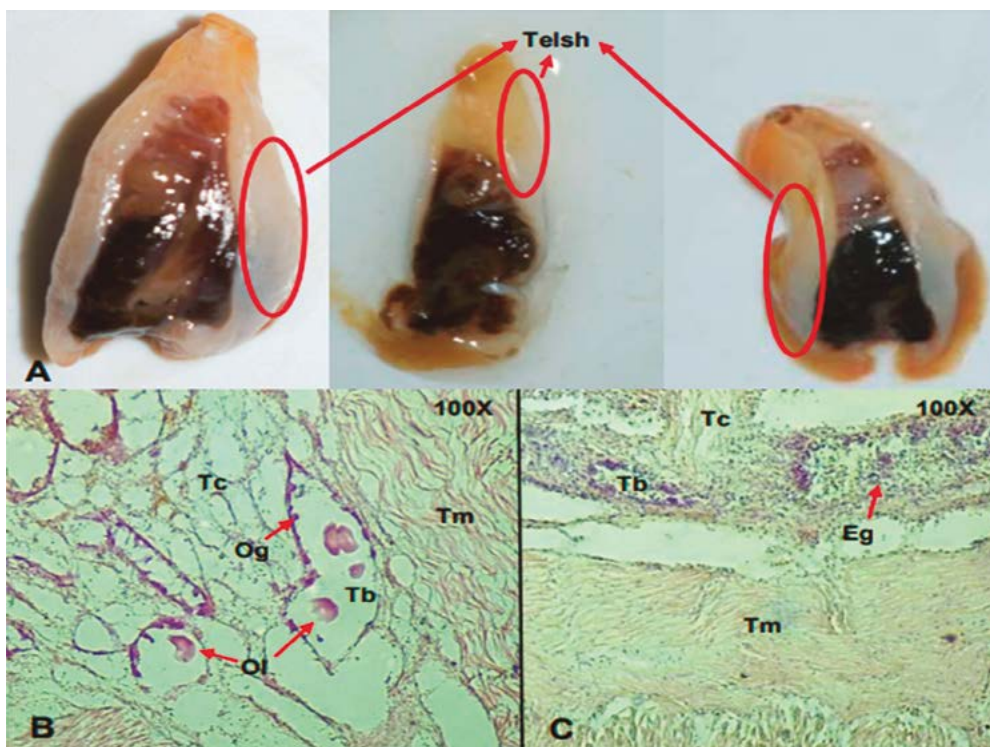


Figura 4.- Fotografía macroscópica y microscópica de la fase de madurez gonadal Virginal (0) de *L. grandis*. A (hembra y macho), B (hembra), C (macho)

Telsh: Tejido externo liso y sin hendiduras, Og: Ovogonias, Ol: Ovocitos inmaduros, Eg: Espermatogonias, Tb: Trabécula, Tc: Tejido conectivo, Tm: Tejido muscular

Figure 4. Macroscopic and microscopic photograph of the Virginal stage (0) of *L. grandis*. A (female and male), B (female), C (male).

Telsh: Smooth external tissue without slits, Og: Ovogonia, Ol: Immature oocytes, Eg: Spermatogonia, Tb: Trabeculae, Tc: Connective tissue, Tm: Muscle tissue

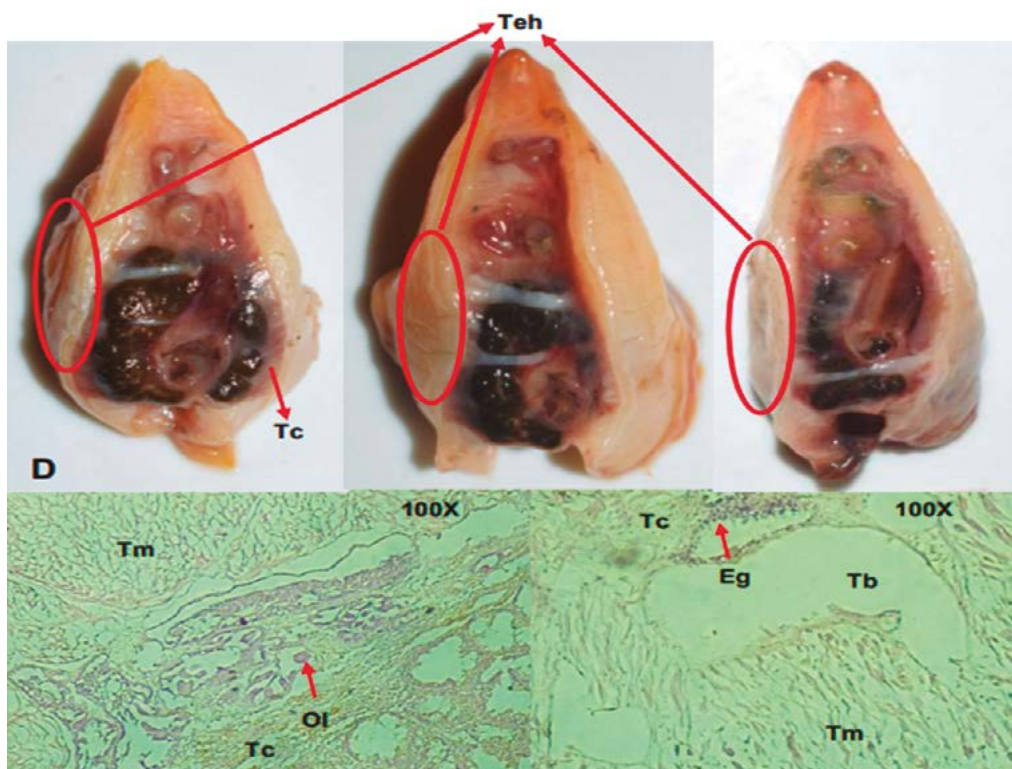


Figura 5.- Fotografía macroscópica y microscópica de la fase de madurez gonadal en Reposo (I) de *L. grandis*. D (hembra y macho), E (hembra), F (macho)

Teh: Tejido externo con hendiduras, OI: Ovocitos inmaduros, Eg: Espermatogonias, Tb: Trabécula, Tc: Tejido conectivo, Tm: Tejido muscular

Figure 5. Macroscopic and microscopic photograph of the resting stage (I) of *L. grandis*. D (female and male), E (female), F (male)

Teh: External tissue with slits, OI: Immature oocytes, Eg: Spermatogonia, Tb: Trabeculae, Tc: Connective tissue, Tm: Muscle tissue

Reposo (Fase I)

Características macroscópicas: externamente se ven hendiduras muy notorias en el tejido que cubre la masa visceral como consecuencia de la retracción o encogimiento del pie. Al realizarle un corte transversal no se observa la gónada a simple vista, pero si, en forma notoria, una capa de tejido conectivo color blanco claro a transparente entre el músculo y la masa visceral. Son individuos adultos que ya se han reproducido por lo menos una vez en su vida (Fig. 5-D).

Características microscópicas: las características son similares al estadio virginal en lo concerniente al tipo de células presentes tanto para hembras (Fig. 5-E) como para machos (Fig. 5-F), con la diferencia que la capa de tejido conectivo es gruesa en comparación con la fase virginal. En algunos casos no es posible observar tejido gonadal.

Resting (Stage I)

Macroscopic features: externally, there are very noticeable slits in the tissue covering the visceral mass due to the retraction or shrinkage of the foot. When a transversal cut is made, the gonad is not visible to the naked eye, but a layer of light white to transparent connective tissue between the muscle and the visceral mass is noticeable. They are adult individuals that have already reproduced at least once in their life (Fig. 5-D).

Microscopic features: the characteristics are similar to the virginal stage regarding the type of cells present for both females (Fig. 5-E) and males (Fig. 5-F), except that the connective tissue layer is thick compared to the virginal stage. In some cases, it is not possible to observe gonadal tissue.

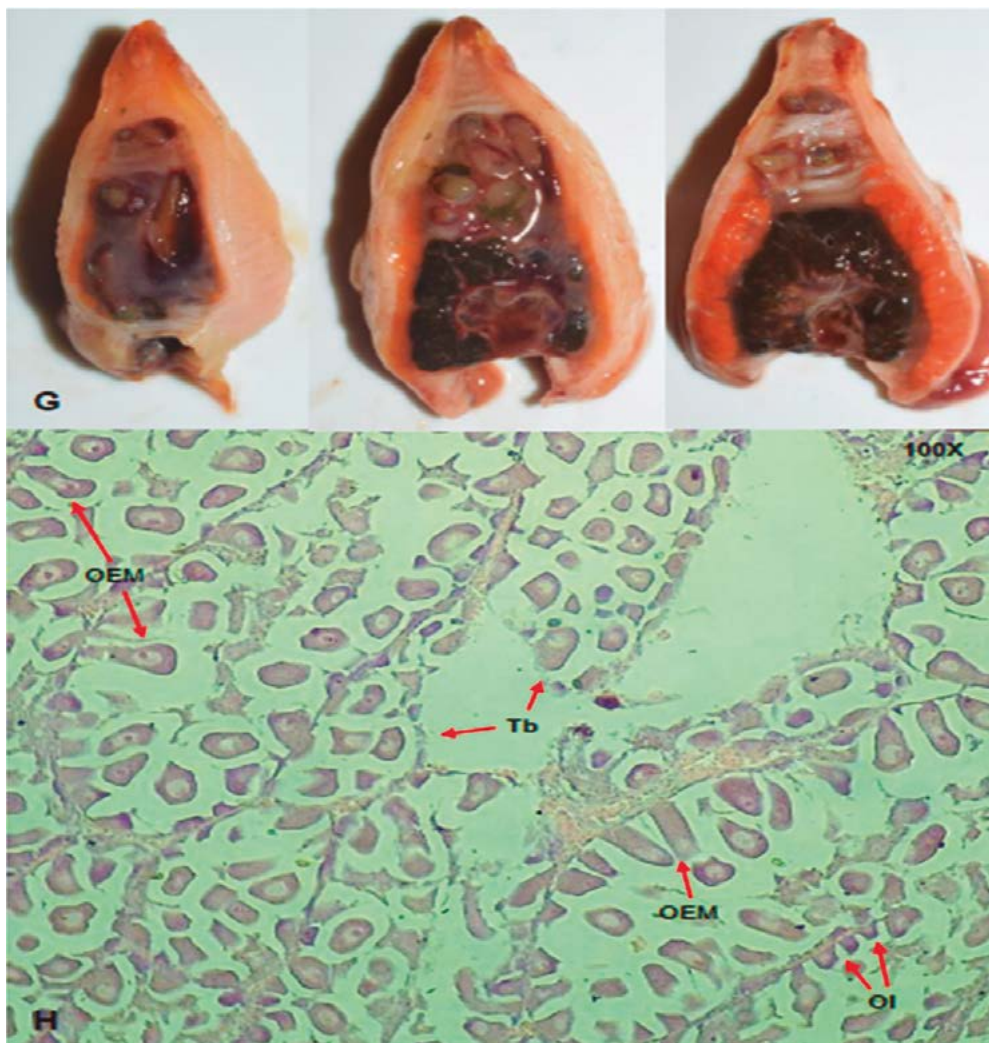


Figura 6.- Fotografía macroscópica (G) y microscópica (H) de la fase de madurez gonadal en Maduración (II) de Hembras de *L. grandis*

OI: Ovocitos inmaduros, OEM: Ovocitos en maduración, Tb: Trabécula

Figure 6. Macroscopic (G) and microscopic (H) photograph of the maturing stage (II) of female *L. grandis*
IO: Immature oocytes, OEM: Maturing oocytes, Tb: trabeculae

GÓNADAS DIFERENCIABLES MACROSCÓPICAMENTE

HEMRAS:

En maduración (Fase II)

Características macroscópicas: externamente se pueden observar o no hendiduras en el tejido que cubre la masa visceral. Al realizar un corte transversal al individuo se advierte que la gónada cubre de manera uniforme a la masa visceral. La gónada presenta un grosor que varía desde una capa fina a medianamente gruesa y es de color naranja claro a naranja brillante (Fig. 6-G).

Características microscópicas: se caracteriza por presentar trabéculas con ovogonias y ovocitos en desarrollo adosados a su pared interna. Los

MACROSCOPICALLY DISTINGUISHABLE GONADS

FEMALES:

Maturing (Stage II)

Macroscopic features: externally, slits may or may not be observed in the tissue covering the visceral mass. A cross-section of the individual shows that the gonad evenly covers the visceral mass. The gonad varies in thickness from a thin to a medium-thick layer and is light orange to bright orange (Fig. 6-G).

Microscopic features: trabeculae with ovogonia and developing oocytes attached to their inner wall. The developing oocytes are elongated

ovocitos en desarrollo tienen forma alargada y de pera y se encuentran orientados hacia el lumen de las trabéculas. Las trabéculas están distribuidas de manera continua y son poco abundantes (Fig. 6-H).

Maduro (Fase III)

Características macroscópicas: externamente no se observan hendiduras en el tejido que cubre la masa visceral como consecuencia de su estiramiento. Al realizar un corte transversal al individuo se ve una capa gruesa de gónada, color naranja brillante a intenso, que cubre de manera uniforme y en gran parte a la masa visceral. En ocasiones puede producirse el desprendimiento del contenido gonadal como consecuencia de su avanzada madurez (Fig. 7-I).

and pear-shaped and are oriented towards the lumen of the trabeculae. The trabeculae are continuously distributed and are not very abundant (Fig. 6-H).

Mature (Stage III)

Macroscopic features: externally, no slits are observed in the tissue covering the visceral mass due to its stretching. When a transverse cut is made, a thick layer of the gonad is seen, bright to intense orange, which evenly covers a large part of the visceral mass. Occasionally, detachment of the gonadal contents may occur as a result of advanced maturity (Fig. 7-I).

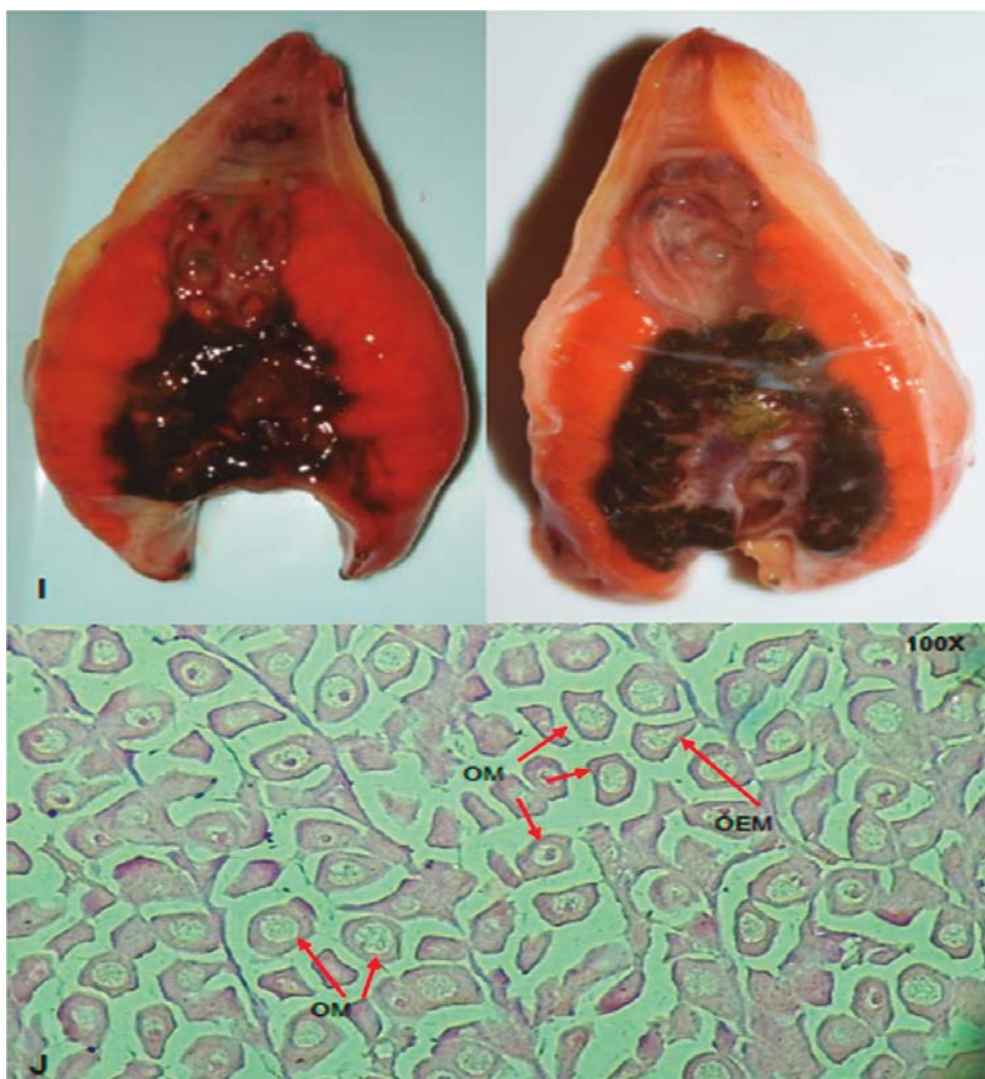


Figura 7.- Fotografía macroscópica (I) y microscópica (J) de la fase de madurez gonadal Maduro (III) de Hembras de *L. grandis*

OEM: Ovocitos en maduración, OM: Ovocitos maduros

Figure 7. Macroscopic (I) and microscopic (J) photograph of the mature stage (III) of female *L. grandis*
OEM: Maturing oocytes, OM: Mature oocytes

Características microscópicas: se caracteriza por presentar ovocitos maduros ubicados y agrupados en el lumen de las trabéculas, las cuales se observan totalmente llenas de ovocitos y con muy poco a nada de espacio interno. También se pueden observar ovogonias y ovocitos en desarrollo orientados hacia el lumen de las trabéculas. Las trabéculas se encuentran distribuidas de manera continua y son muy abundantes (Fig. 7-J).

Desovante (Fase IV)

Características macroscópicas: externamente se observan hendiduras en el tejido que cubre la masa visceral como consecuencia de su encogimiento originado por el desove. Al realizar un corte transversal al individuo se nota que la gónada no cubre de manera uniforme a la masa visceral. la gónada se visualiza con mucho o poco grosor y en forma de paquetes medianos a grandes, los cuales al realizarles una ligera presión genera el desprendimiento del contenido gonadal que tiene consistencia casi líquida. El color de la gónada es naranja brillante a intenso (Fig. 8-K).

Características microscópicas: presenta trabéculas muy desarrolladas con pocos ovocitos maduros ubicados en su lumen dando la apariencia de haber espacios vacíos entre ellos como resultado del desove; la presencia de estas trabéculas es igual o mayor al 50%. También se pueden observar ovogonias y ovocitos en desarrollo orientados hacia el lumen de las trabéculas, las cuales en ocasiones se pueden observar distribuidas abundantemente y de manera continua una tras otra y también de forma dispersa (Fig. 8-L).

Recuperación (Fase V)

Características macroscópicas: externamente se observan hendiduras en el tejido que cubre la masa visceral. Al realizar un corte transversal al individuo se ve que la gónada se encuentra dispersa en la masa visceral en forma de pequeños rezagos o paquetes los cuales al realizarles una ligera presión no produce desprendimiento del contenido gonadal y es de color naranja pálido a naranja claro (Fig. 9-M).

Características microscópicas: se observan escasas trabéculas y ovocitos deformes y dispersos en diferentes grados de reabsorción (Fig. 9-N).

Microscopic features: mature oocytes are located and grouped in the lumen of the trabeculae, which are observed filled with oocytes and with little or no internal space. Ovogonia and developing oocytes can also be observed oriented towards the lumen of the trabeculae. The trabeculae are continuously distributed and are very abundant (Fig. 7-J).

Spawning (Fase IV)

Macroscopic features: externally, slits are observed in the tissue covering the visceral mass due to shrinkage caused by spawning. When a transverse cut is made, the gonad does not cover the visceral mass evenly. The gonad is visualized with much or little thickness and in the form of medium to large packages, when light pressure is applied to them, the gonadal content is detached, which has an almost liquid consistency. The gonad is bright to intense orange (Fig. 8-K).

Microscopic features: we can observe highly developed trabeculae with few mature oocytes located in their lumen giving the appearance of empty spaces between them as a result of spawning. The presence of these trabeculae is equal to or greater than 50%. Ovogonia and developing oocytes can also be observed oriented toward the lumen of the trabeculae, which sometimes can be observed distributed abundantly and continuously one after the other and also scattered (Fig. 8-L).

Recovering (Stage V)

Macroscopic features: externally, slits are observed in the tissue covering the visceral mass. When a transverse cut is made, we can see that the gonad is scattered in the visceral mass in the form of small traces or bundles which, when light pressure is applied, do not produce detachment of the gonadal content and are pale orange to light orange (Fig. 9-M).

Microscopic features: few trabeculae and deformed and scattered oocytes with different degrees of resorption are observed (Fig. 9-N).

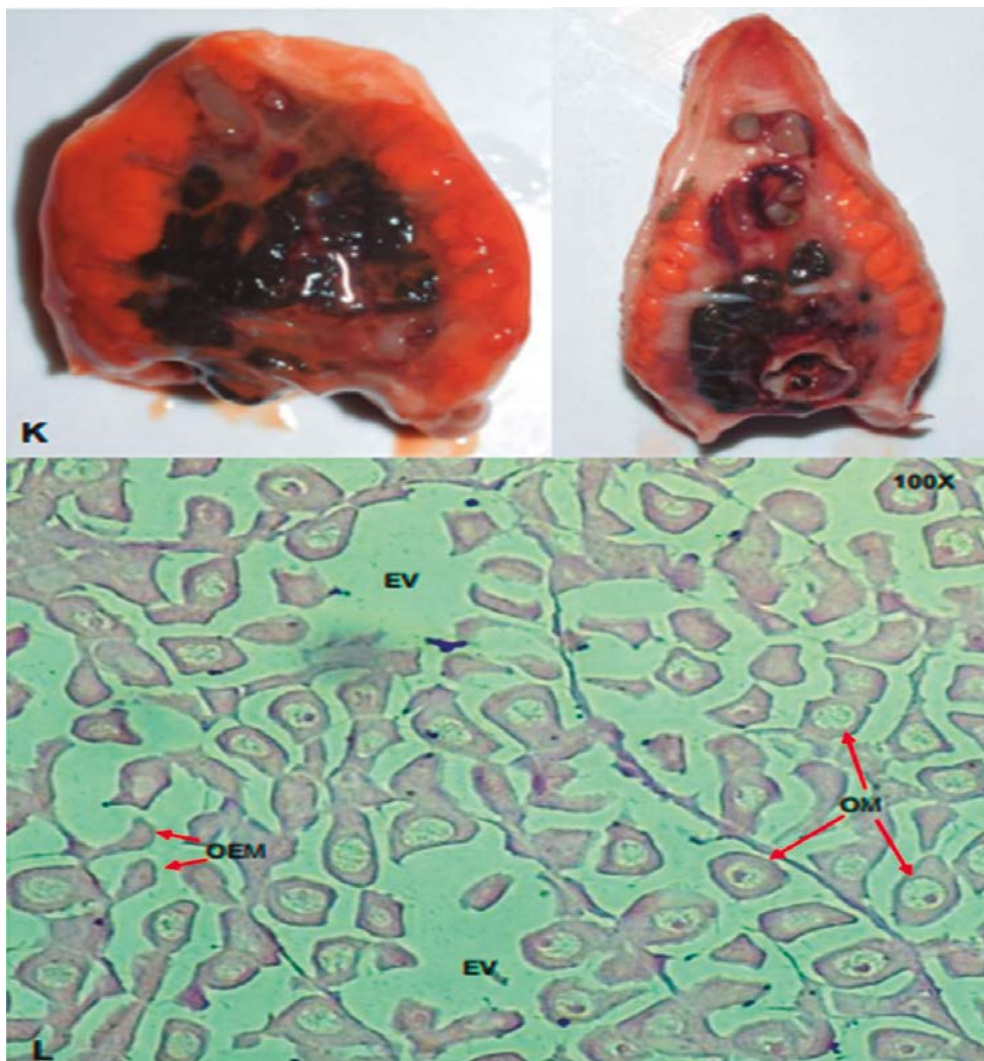


Figura 8.- Fotografía macroscópica (K) y microscópica (L) de la fase de madurez gonadal Desovante (IV) de Hembras de *L. grandis*

OEM: Ovocitos en maduración, OM: Ovocitos maduros, EV: Espacios vacíos

Figure 8. Macroscopic (K) and microscopic (L) photograph of the spawning stage (IV) of female *L. grandis*
OEM: Maturing oocytes, OM: Mature oocytes, EV: Empty spaces

MACHOS:

En maduración (Fase II)

Características macroscópicas: externamente se pueden notar o no hendiduras en el tejido que cubre la masa visceral. Al realizar un corte transversal al individuo se observa que la gónada cubre de manera uniforme a la masa visceral. La gónada presenta un grosor que varía desde una capa fina a medianamente gruesa y es de color crema claro a intenso (Fig. 10-O).

MALE:

Maturing (Stage II)

Macroscopic features: externally, slits may or may not be noted in the tissue covering the visceral mass. When a transverse cut is made, it is observed that the gonad evenly covers the visceral mass. The gonad varies in thickness from a thin to a medium-thick layer and is light to deep cream (Fig. 10-O).

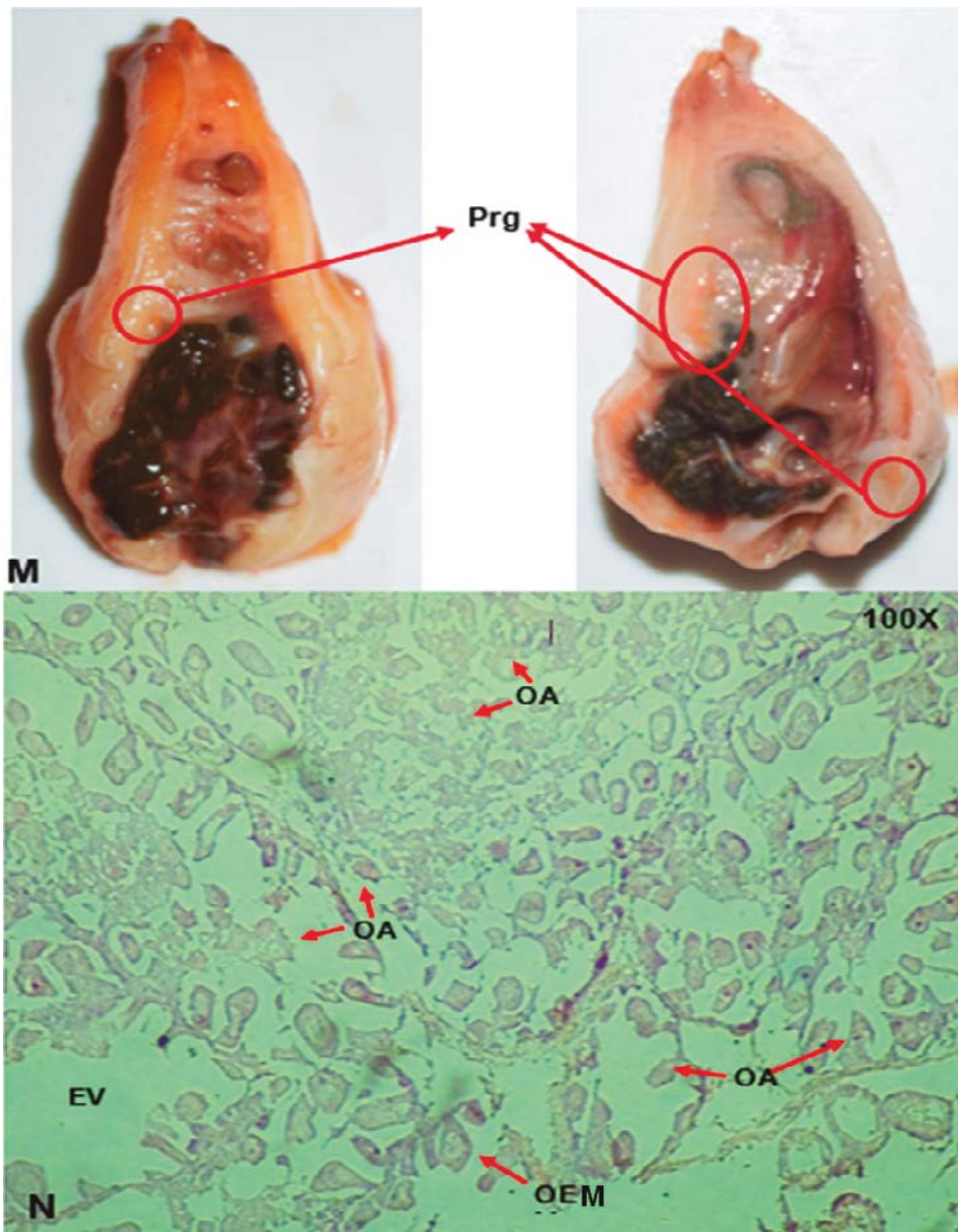


Figura 9.- Fotografía macroscópica (M) y microscópica (N) de la fase de madurez gonadal En recuperación (V) de Hembras de *L. grandis*

Prg: Pequeños restos de gónada, OEM: Ovocitos en maduración, OA: Ovocitos atrésicos, EV: Espacios vacíos

Figure 9. Macroscopic (M) and microscopic (N) photograph of the recovery stage (V) of female *L. grandis*
 Prg: Small gonad remnants, OEM: Maturing oocytes, OA: Atretic oocytes, EV: Empty spaces

Características microscópicas: se caracteriza por presentar trabéculas con espermatocitos los cuales se dirigen al lumen de la trabécula. También se pueden observar espermatogonias adosadas a la pared de las trabéculas. Las trabéculas están distribuidas de manera continua y son poco abundantes (Fig. 10-P).

Microscopic features: we can see trabeculae with spermatocytes which are directed to the lumen of the trabeculae. Spermatogonia can also be observed attached to the wall of the trabeculae. The trabeculae are distributed continuously and are not very abundant (Fig. 10-P).

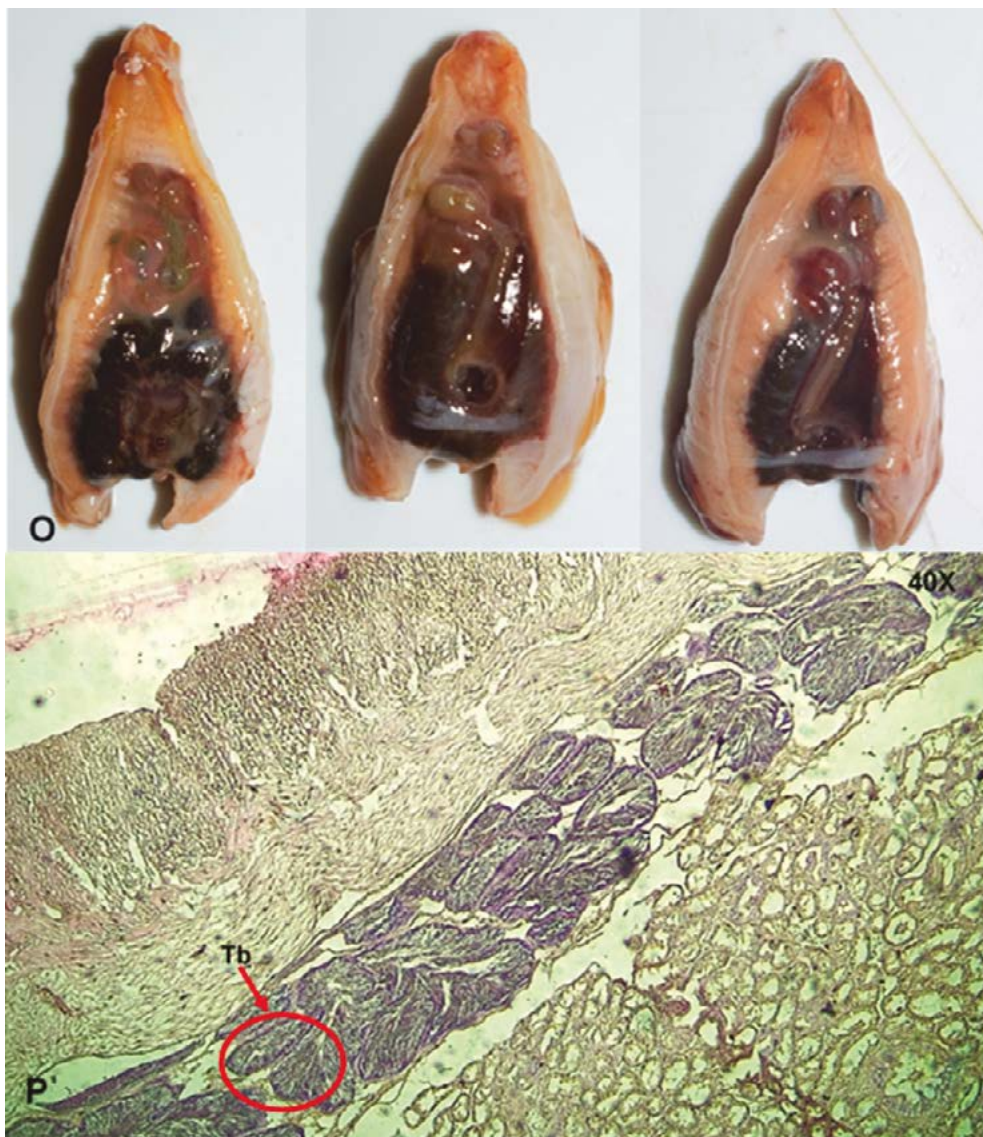


Figura 10.- Fotografía macroscópica (O) y microscópica (P) de la fase de madurez gonadal en Maduración (II) de Machos de *L. grandis*

Tb: Trabéculas conteniendo espermatocitos

Figure 10. Macroscopic (O) and microscopic (P) photograph of the maturing stage (II) of male *L. grandis*
Tb: Trabeculae containing spermatocytes

Maduro (Fase III)

Características macroscópicas: externamente no se observan hendiduras en el tejido que cubre la masa visceral como consecuencia de su estiramiento. Al realizar un corte transversal al individuo, se ve una capa gruesa de gónada, color crema claro a intenso, que cubre de manera uniforme y en gran parte la masa visceral. En ocasiones puede producirse el desprendimiento del contenido gonadal como consecuencia de su avanzada madurez (Fig. 11-Q).

Mature (Stage III)

Macroscopic features: externally, no slits are observed in the tissue covering the visceral mass due to its stretching. A cross-section of the individual shows a thick layer of the gonad, light to deep cream, which evenly and largely covers the visceral mass. Occasionally, detachment of the gonadal contents may occur resulting from advanced maturity (Fig. 11-Q).

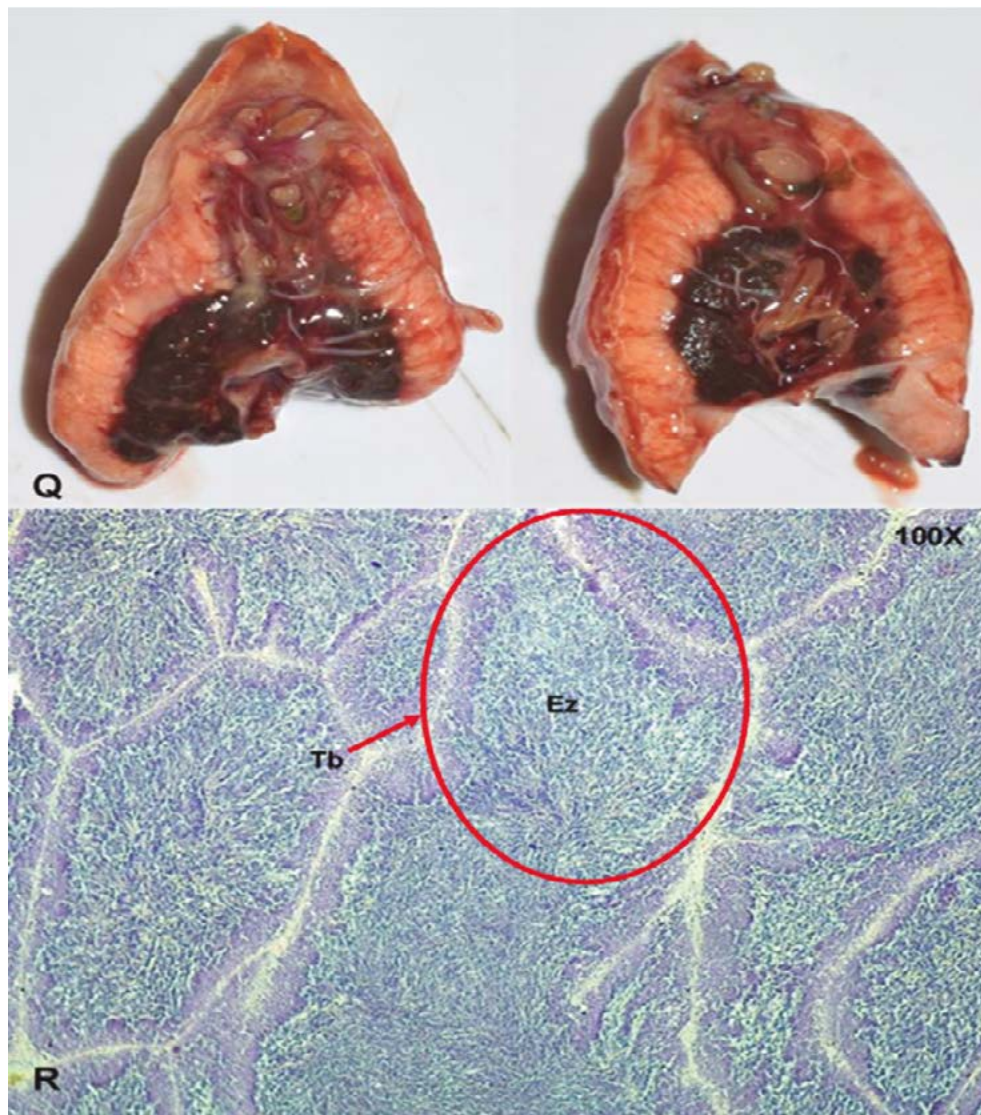


Figura 11.- Fotografía macroscópica (Q) y microscópica (R) de la fase de madurez gonadal Maduro (III) de Machos de *L. grandis*

Ez: Espermatozoides, Tb: Trabécula

Figure 11. Macroscopic (Q) and microscopic (R) photograph of the mature stage (III) of male *L. grandis*
Ez: Spermatozoa, Tb: Trabeculae

Características microscópicas: presenta trabéculas muy desarrolladas con espermatozoides ubicados en su lumen y adosadas a las franjas eosinófilas, las cuales se observan muy turgidas y con muy poco a nada de espacio interno por estar llenas de espermatozoides. También se pueden observar espermatogonias y espermatoцитos. Las trabéculas se encuentran distribuidas de manera continua una tras otra y son abundantes (Fig. 11-R).

Microscopic features: we can see highly developed trabeculae with spermatozoa located in its lumen and attached to the eosinophilic strips, which are observed very turgid and with little or no internal space due to being filled with spermatozoa. Spermatogonia and spermatocytes can also be observed. The trabeculae are continuously distributed one after the other and are abundant (Fig. 11-R).

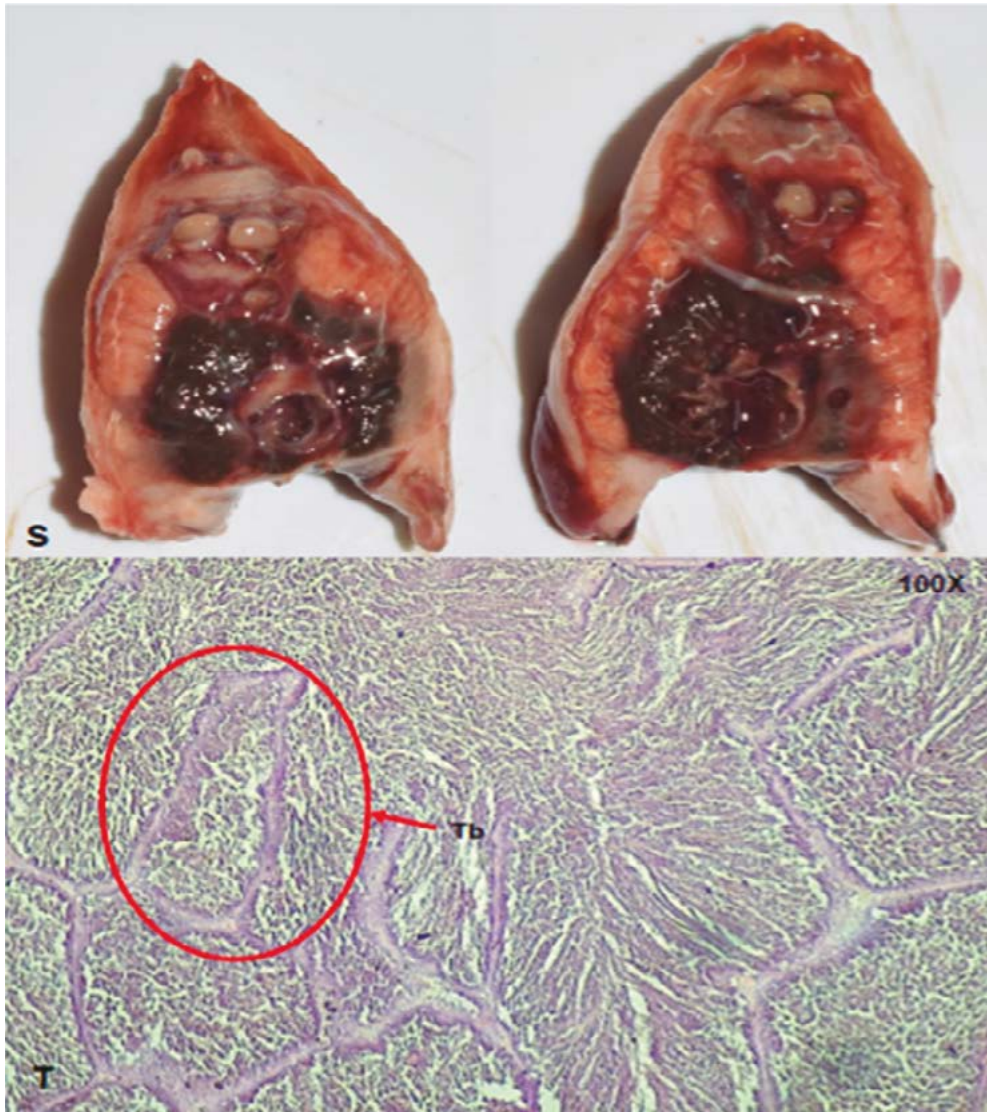


Figura 12.- Fotografía macroscópica (S) y microscópica (T) de la fase de madurez gonadal Expulsante (IV) de Machos de *L. grandis*

Tb: Trabécula semi vacía (pocos espermatozoides)

Figure 12. Macroscopic (S) and microscopic (T) photograph of the expelling stage (IV) of male *L. grandis*
Tb: Semi-empty trabeculae (few spermatozoa)

Expulsante (Fase IV)

Características macroscópicas: externamente se observan hendiduras en el tejido que cubre la masa visceral como consecuencia del encogimiento originado por la expulsión de espermatozoides. Al realizar un corte transversal, se observa que la gónada no cubre de manera uniforme a la masa visceral. La gónada se ve con mucho o poco grosor, en forma de paquetes medianos a grandes, al realizarles una ligera presión se produce el desprendimiento del contenido gonadal cuya consistencia es casi líquida. El color de la gónada es crema claro a intenso (Fig. 12-S).

Expelling (Stage IV)

Macroscopic features: externally, slits are observed in the tissue covering the visceral mass due to the shrinkage caused by the expulsion of spermatozoa. In cross-section, the gonad is not evenly covering the visceral mass. The gonad is seen with much or little thickness, in the form of medium to large bundles, and when light pressure is applied to them, the gonadal content is detached and its consistency is almost liquid. The gonad is light to deep cream (Fig. 12-S).

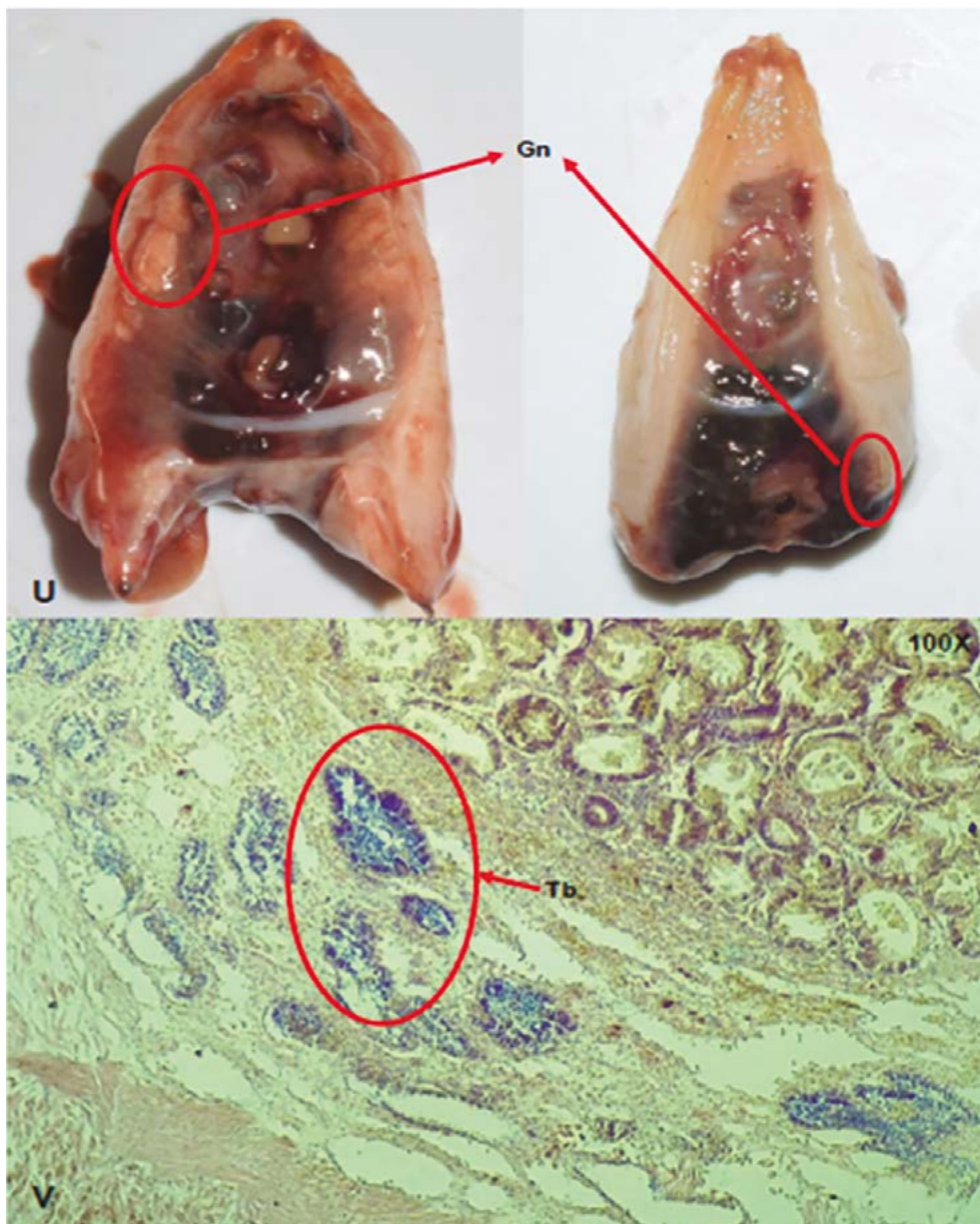


Figura 13.- Fotografía macroscópica (U) y microscópica (V) de la fase de madurez gonadal Post expulsión (V) de Machos de *L. grandis*
 Gn: Gónada en reabsorción, Tb: Trabéculas en reabsorción conteniendo espermatozoides y espermatogonias
 Figure 13. Macroscopic (U) and microscopic (V) photograph of the post-expelling stage (V) of male *L. grandis*
 Gn: Resorbing gonad, Tb: Resorbing trabeculae containing spermatozoa and spermatogonia

Características microscópicas: presenta trabéculas muy desarrolladas con poco o nada de espermatozoides en su lumen y adosados a las franjas eosinófilas dando la apariencia de haber espacios vacíos como resultado de la expulsión; la presencia de trabéculas es igual o mayor al 50%. También se observan espermatogonias y espermatoцитos. Las trabéculas pueden estar distribuidas abundantemente, de manera continua una tras otra y también de forma dispersa (Fig. 12-T).

Microscopic features: we see highly developed trabeculae with little or no spermatozoa in their lumen and attached to the eosinophilic strips giving the appearance of empty spaces as a result of expulsion. The presence of trabeculae is equal to or greater than 50%. Spermatogonia and spermatocytes are also observed. Trabeculae may be abundantly distributed, continuously one after the other and also in a scattered manner (Fig. 12-T).

Post-expulsante (Fase V)

Características macroscópicas: externamente se observan hendiduras en el tejido que cubre la masa visceral. Al realizar un corte transversal al individuo se observa que la gónada se encuentra dispersa en la masa visceral como pequeños rezagos o paquetes a los que al realizarles ligera presión no produce desprendimiento de contenido gonadal, es de color crema pálido a crema claro (Fig. 13-U).

Características microscópicas: se observan trabéculas deformes y dispersas en diferente grado de reabsorción conteniendo en su interior espermatogonias adosadas a su pared y pocos espermatozoides, que no fueron expulsados (Fig. 13-V).

4. DISCUSIÓN

PÉREZ (2007) y BUITRÓN *et al.* (2015), indican que el análisis histológico es el método más preciso para determinar las fases de madurez gonadal de los recursos pesqueros, como es el caso de *L. grandis*, ya que estos estudios permiten obtener resultados validados acerca del grado de madurez asignado y en consecuencia permite detectar el periodo de desove. Sin embargo, aún se vienen empleando técnicas rápidas (no histológicas tradicionales) para realizar estos estudios, siendo la observación *in vivo* de frotis una de las más utilizadas (PÉREZ, 2007; LUCERO *et al.*, 2013). En el presente estudio se realizaron cortes histológicos para determinar y validar las fases de madurez gonadal de la especie, esta información ha sido la base para la elaboración de una escala macroscópica propia tal como lo recomienda BUITRÓN *et al.* (2015).

Mediante el análisis histológico de las gónadas, se pudieron diferenciar tres tipos de ovocitos los cuales son: inmaduro, en maduración y maduro; así mismo, se determinaron tres tipos de células sexuales masculinas las cuales fueron: espermatogonios, espermatocitos y espermatozoides; cuya distribución en el estroma ovárico y testicular permitió determinar que es una especie con desove parcial y asincrónico, por presentar al mismo

Post-expelling (Stage V)

Macroscopic features: externally, slits are observed in the tissue covering the visceral mass. When making a transverse cut, it is observed that the gonad is scattered in the visceral mass as small traces or packages to which slight pressure does not produce detachment of gonadal content, it is pale cream to light cream in color (Fig. 13-U).

Microscopic features: there are deformed and scattered trabeculae with different degrees of resorption containing spermatogonia attached to its wall and a few spermatozoa, which were not expelled (Fig. 13-V).

4. DISCUSSION

PÉREZ (2007) and BUITRÓN *et al.* (2015) indicate that histological analysis is the most accurate method for determining the gonadal maturity stages of fishery resources, as is the case of *L. grandis*, since these studies allow obtaining validated results about the degree of maturity assigned and consequently allow detecting the spawning period. However, rapid techniques (non-histological traditional) are still being used to carry out these studies, being the *in vivo* observation of smears being one of the most used (PÉREZ, 2007; LUCERO *et al.*, 2013). In our study, histological cuts were performed to determine and validate the gonadal maturity stages of the species. Therefore, this information has been the basis for the elaboration of a macroscopic scale as recommended by BUITRÓN *et al.* (2015).

We were able to differentiate three types of oocytes by histological analysis of the gonads: immature, maturing, and mature. Also, three types of male sex cells were determined, which were: spermatogonia, spermatocytes, and spermatozoa: spermatogonia, spermatocytes, and spermatozoa, whose distribution in the ovarian and testicular stroma allowed determining that it is a species with partial and asynchronous spawning, by presenting at the same time these three types of cells in the gonads of the same individual with a

tiempo estos tres tipos de células en las gónadas de un mismo individuo con una ubicación diferenciada dentro de cada túbulo o trabécula según su sexo. PAREDES (2010) y ORTIZ *et al.* (2011) encontraron los mismos tipos de células sexuales, al realizar análisis histológicos para hembras y machos en otros bivalvos como *Tagelus dombeii* y *Trachycardium procerum*, respectivamente; determinando a la vez que ambas especies son reproductores parciales asincrónicos.

La relación de las características microscópicas obtenidas mediante el análisis histológico y las características macroscópicas realizadas por observación directa de las gónadas, además de la ayuda con imágenes fotográficas, permitieron proponer seis fases de madurez gonadal macroscópica con base histológica para hembras y machos de *L. grandis*; convirtiéndose la presente escala de madurez en una herramienta valiosa a ser utilizada para obtener resultados más precisos en estudios de sus aspectos reproductivos. ISHIYAMA y TERUKINA (1989) propusieron cuatro fases microscópicas de madurez gonadal para *Anadara tuberculosa*, mientras que PAREDES (2010) y ORTIZ *et al.* (2011) propusieron seis fases de madurez microscópica para hembras y machos de *Tagelus dombeii* y *Trachycardium procerum*, respectivamente.

En este estudio se diferencia macroscópicamente la fase virginal (0) de la de reposo (I), lo cual es importante para distinguir a los individuos juveniles de los adultos. Estos dos estados suelen ser difíciles para determinar, sin embargo, se pudo identificar la característica que los distingue con seguridad. Discriminar la fase virginal respecto del resto de fases de madurez es indispensable para el cálculo de la talla de madurez (BUITRÓN *et al.*, 2015). Así mismo, se describe y diferencia a la fase de recuperación / post-desove (V), que indica el fin de la actividad reproductiva, que es un detalle importante a considerar en el ciclo de madurez gonadal de un reproductor parcial. PÉREZ (2007) considera que la fase "indeterminado" (I) incluye a individuos en los que no es posible observar la gónada a

differentiated location within each tubule or trabeculae according to their sex. PAREDES (2010) and ORTIZ *et al.* (2011) found the same types of sex cells, when performing histological analysis for females and males in other bivalves such as *Tagelus dombeii* and *Trachycardium procerum*, respectively, thus determining at the same time that both species are asynchronous partial spawners.

The relationship between the microscopic characteristics obtained by histological analysis and the macroscopic characteristics obtained by direct observation of the gonads, along with the help of photographic images, allowed us to propose six stages of macroscopic gonadal maturity with a histological basis for females and males of *L. grandis*. Therefore, this maturity scale has become a valuable tool to be used to obtain more accurate results in studies of their reproductive aspects. ISHIYAMA & TERUKINA (1989) proposed four stages of microscopic gonadal maturity for *Anadara tuberculosa*, while PAREDES (2010) and ORTIZ *et al.* (2011) proposed six stages of microscopic maturity for females and males of *Tagelus dombeii* and *Trachycardium procerum*, respectively.

In our study, we differentiate macroscopically the virginal stage (0) from the resting stage (I), which is important to distinguish juvenile individuals from adults. These two stages are often difficult to determine, however, we were able to identify the characteristic that distinguishes them with certainty. Distinguishing the virginal stage from the other maturity stages is essential for the estimation of mature size (BUITRÓN *et al.*, 2015). Likewise, the recovery/post-spawning stage (V), which indicates the end of reproductive activity, is described and differentiated, which is an important detail to consider in the gonadal maturity cycle of a partial spawner. PÉREZ (2007) considers that the "indeterminate" stage (I) includes individuals whose gonads cannot be observed with the naked eye, thus grouping juveniles and resting adults in the same stage, which is similar to the undefined

simple vista, por lo que agrupa en una misma fase a juveniles y adultos en reposo; similar a la fase indefinido (0) descrita por GALDÁMEZ *et al.* (2007); ambos autores no consideran a la fase de recuperación o post-desove contemplada en este estudio.

La presente escala de madurez gonadal validada histológicamente para *L. grandis* contribuirá de manera significativa a los muestreos biológicos como parte de los programas de seguimiento de la pesquería permitiendo una mejora en la lectura de sus fases, con resultados más precisos de forma práctica y sencilla, ahorrando tiempo y costos de análisis; al respecto BUITRÓN *et al.* (2015) mencionan la importancia del uso de las escalas macroscópicas validadas histológicamente, las que están orientadas al manejo pesquero, definiendo con mayor precisión el periodo de mayor actividad reproductiva y la talla mínima de extracción o captura que sustenten las normas de manejo en pro de la sostenibilidad de un recurso.

5. CONCLUSIONES

- Se determinaron seis fases de madurez gonadal para hembras y machos de *Larkinia grandis*, los cuales son: virginal (0), reposo (I), en maduración (II), maduro (III), desovante/expulsante (IV) y recuperación/post-expulsante (V).
- Las fases virginal (0) y de reposo (I) en *L. grandis* son diferenciables macroscópicamente a través de la ausencia o presencia de hendiduras en la parte externa del cuerpo.
- Se determinó que *L. grandis* es un desovador parcial asincrónico, debido a la presencia de gametos en diferentes estados de desarrollo en un mismo individuo.

Agradecimientos

A la Coordinadora del Laboratorio Costero de Tumbes, Mg. Mervin Lilia Guevara Torres, por las facilidades brindadas para la realización del presente trabajo y al personal de la Institución que apoyaron durante el desarrollo de los muestreos biológicos.

stage (0) described by GALDÁMEZ *et al.* (2007). Both authors do not consider the recovery or post-spawning stage included in this study.

This histologically validated gonadal maturity scale for *L. grandis* will contribute significantly to biological sampling as part of fishery monitoring programs, allowing an improvement in the understanding of its stages, with more accurate results practically and simply, saving time and costs of analysis. In this regard, BUITRÓN *et al.* (2015) point out the importance of the use of histologically validated macroscopic scales, which are oriented to fisheries management, defining with greater precision the period of greatest reproductive activity and the minimum size of extraction or catch to support management standards for the sustainability of a resource.

5. CONCLUSIONS

- We determined six gonadal maturity stages for females and males of *L. grandis*, which are: virginal (0), resting (I), maturing (II), mature (III), spawning/expelling (IV), and recovery/post-expelling (V).
- The virginal (0) and resting (I) stages in *L. grandis* can be macroscopically differentiated through the absence or presence of slits on the external part of the body.
- It was determined that *L. grandis* is an asynchronous partial spawner, due to the presence of gametes at different stages of development in the same individual.

Acknowledgments

We would like to thank the Coordinator of the Coastal Laboratory of Tumbes, Mg. Mervin Lilia Guevara Torres, for the assistance provided for this work and the staff of the Institution who supported us during the development of the biological sampling.

6. REFERENCIAS

- ALAMO, V., VALDIVIESO, V. (1997). Lista Sistemática de Moluscos Marinos del Perú. Segunda Edición. Inst. Mar del Perú, 183 pp.
- BOLAÑOS, J. (1996). Evaluación comparativa de dos tipos de muestreo en Chucheca (*Grandiarca grandis*) y piangua (*Anadara tuberculosa*) en el Golfo de Nicoya, Costa Rica. UNICIENCIA, 13, 21 – 25 p.
- BUITRÓN, B., PEREA, A., MORÍ, J., SÁNCHEZ, J., ROQUE, C., CASTILLO, J., GÁLVEZ, M. A. (2015). Madurez gonadal de algunos peces de importancia comercial: Escalas macroscópicas validadas microscópicamente. Bol Inst Mar Perú, 30(1-2), 3-9.
- CRUZ, R. A. (1986). Caracteres generales, edad y crecimiento de *Anadara grandis* (Pelecypoda: Arcidae). UNICIENCIA, 3(1-2).
- FISHER, W., KRUPP, F., SCHNEIDER, W., SOMMER, C., CARPENTER, K., NIEM, V. (1995). Guía FAO para la identificación de especies para los fines de la pesca. Pacífico centro-oriental. Volumen I. Plantas e Invertebrados. Roma. 1-646 p.
- GALDÁMEZ, C., PACHECO, S., PÉREZ, I., KINO, S. (2007). Producción artificial de semillas, cultivo intermedio y cultivo de *Anadara tuberculosa* y *A. grandis*. Proyecto para el desarrollo de la acuicultura de moluscos en el Salvador. 83 pp.
- HOCQUENGHEM, M., PEÑA, M. (1994). La talla de material malacológico en Tumbes. Bulletin de l'Institut Français d'Etudes Andines, 23(2), 209 -229.
- HUMASON, G. (1979). Animal tissue techniques. W. Freeman Eds. 4ta Ed. 661 pp.
- ISHIYAMA, C., TERUKINA, S. (1989). Reproducción de *Anadara tuberculosa* y *Anadara similis* en la zona de Puerto Pizarro, Perú. Revista de ciencias biológicas, 16(95): 3-11.
- KEEN, A. (1971). Sea shells of tropical west América. Marine mollusks from Baja California to Perú. 2da Edition. Stanford University Press. Stanford. California, 1064 pp.
- LUCERO, C., CANTERA, J., GIL, D., MUÑOZ, O., ZAPATA, L., CORTEZ, N., GUALTEROS, W., MANJARRES, A. (2013). Análisis espacio temporal de la biología reproductiva y el reclutamiento del molusco bivalvo *Anadara tuberculosa* en la costa del Pacífico colombiano. Revista de biología marina y oceanografía, 48 (2), 321-334.
- MORALES, J. (2015). Extracción de *Anadara grandis* (Broderip & Sowerby, 1829), en el estero Ayalán del recinto Puerto El Morro de la provincia del Guayas. Tesis de grado previa a la obtención del título de Biólogo. Universidad Estatal Península de Santa Elena, 88 pp.
- ORTIZ, K., IANACONE, J., PEREA, A., BUITRÓN, B. (2011). Biología reproductiva de la "concha corazón" *Trachycardium procerum* (Sowerby, 1833) (Cardiidae, Pelecypoda) de Chimbote, Perú. The biologist (Lima), 9(1), 66-97.
- PAREDES, J. (2010). Escala y talla de primera madurez gonadal en "navaja" *Tagelus dombeii* (Lamarck, 1818), entre las zonas Parachique – Las Delicias. Universidad Nacional de Piura. 86 pp.
- PÉREZ, I. (2007). Determinación de la Madurez Gonádica de casco de burro (*Anadara grandis*), en época lluviosa y transición lluviosa-seca en la Península de San Juan del Gozo en la Bahía de Jiquilisco, Departamento de Usulután. Universidad de El Salvador. 78 pp.
- RIASCOS, J., PÉREZ, A., NAVARRETE, A. (2004). Observaciones sobre la biología reproductiva de la "sangara", *Anadara grandis* (Bivalvia: Arcidae). Boletín Científico Museo de Historia Natural Universidad de Caldas, 8, 37-45.
- RODRÍGUEZ, F. (2016). La especialización artesanal: Análisis tecnológico de objetos en material malacológico en el taller de cabeza de vaca, Tumbes. Universidad Nacional de Trujillo. 95 pp.
- SANJINEZ, M., TAIPE, A., BERRÚ, P., ALFARO, S. (2016). Protocolo para muestreo biológico y biométrico de bivalvos marinos. Inf Inst Mar Perú. 43(4), 349-364.
- VÍLCHEZ, C. (2012). Proyecto de Investigación Arqueológica y puesta en uso social Cabeza de Vaca: excavaciones en el Taller Malacológico de Cabeza de Vaca. Informe Final presentado al Ministerio de Cultura, Programa Qhapaq Ñan. Lima.
- WoRMS. WORLD REGISTER OF MARINE SPECIES. (2020). <http://www.marinespecies.org> at VLIZ. Acceso 2020-05-26. doi:10.14284/170. Acceso 11/06/2020.