

ULTRAESTRUCTURA DELS ESPERMATOZOIDES DE *Crassostrea gigas*, *Mytilus galloprovincialis* I *Donax trunculus* (MOLLUSCA, BIVALVIA)

MARIA GRÀCIA BOZZO, MONTSERRAT POQUET, ELENA SAGRISTÀ I MERCÈ DURFORT

*Departament de Biologia Cel·lular, Universitat de Barcelona.
Centre de Referència i Desenvolupament en Aqüicultura de la Generalitat de Catalunya.*

Adreça per a la correspondència: Maria Gràcia Bozzo. Departament de Biologia Cel·lular, Universitat de Barcelona. Av. Diagonal, 645. 08071 Barcelona. Adreça electrònica: *mbozzo@ub.edu*.

RESUM

La majoria dels molluscs bivalves són organismes gonocòrics, amb alguns casos d'hermafroditisme en diferents grups. La gònada masculina, quan és madura, envaeix tota la cavitat del mantell i els gàmetes són alliberats a la cavitat paleal de l'individu. Els espermatozoides dels bivalves són del tipus primitiu, com tots els dels organismes aquàtics que presenten fecundació externa. Són cèl·lules en les quals es distingeixen tres parts ben diferenciades: cap, peça intermèdia i cua. En les tres espècies estudiades, *Crassostrea gigas*, *Mytilus galloprovincialis* i *Donax trunculus*, els espermatozoides responen a aquest patró, però amb variacions morfològiques específiques que estan relacionades amb les característiques dels oòcits que han de fecundar. En *C. gigas* el cap de l'espermatozoide és arrodonit i entre l'acrosoma i el nucli destaca la regió subacrosòmica, amb components fibrillars d'actina. L'espermatozoide de *M. galloprovincialis* és molt més allargat que l'anterior i el sistema fibrillar de la regió subacrosòmica forma un canal intranuclear. L'acrosoma destaca per la seva longitud. L'espermatozoide de *D. trunculus* segueix el patró considerat primitiu, tot i que en la peça intermèdia conté més mitocondris i els centríols tenen una disposició en línia i no ortogonal, com en els altres estudiats.

Paraules clau: reproducció en molluscs bivalves, ostres, musclos, tellerines, espermatozoides.

ULTRASTRUCTURE OF THE SPERMATOZOA IN *Crassostrea gigas*, *Mytilus edulis* AND *Donax trunculus* (MOLLUSCA, BIVALVIA)

SUMMARY

The majority of bivalve mollusks are gonocoric organisms, and some cases of hermaphroditic individuals have been reported in different groups. When it reaches maturity, the male gonad invades the whole of the mantle cavity and gametes are released into the pallial cavity of the individual.

The spermatozoa of bivalve mollusks are of a primitive type, as those of all aquatic organisms with external fertilization. They are cells in which three clearly differentiated parts can be identified: a head, a middle piece and a tail. In all three analyzed species: *Crassostrea gigas*, *Mytilus galloprovincialis* and *Donax trunculus*, the spermatozoa fit within this pattern, but with specific morphological variations related to the characteristics of the oocytes they fertilize. In *C. gigas*, the sperm head is rounded and between the acrosome and the nucleus stands out the subacrosomal region with fibrillar components of actin. The sperm of *M. galloprovincialis* is much more elongated and the fibrillar system of the subacrosomal region forms an intranuclear channel. The acrosome is conspicuous because of its length. The sperm of *D. trunculus* fits with the pattern considered to be primitive, although the middle piece has more mitochondria and the centrioles are arranged in a line instead of being orthogonally oriented as in the other analyzed species.

Key words: bivalvia, reproduction in Mollusca, oysters, mussels, clams, spermatozoa.

*He vist una multitud d'animalons vivents,
més de mil, movent-se en un volum de líquid
equivalent al d'un gra de sorra.*

ANTON VAN LEEUWENHOEK, 1677, fent referència als espermatozoides.

INTRODUCCIÓ

La reproducció dels molluscs bivalves

Els molluscs bivalves tenen un sistema reproductor molt senzill en comparació dels molluscs gasteròpodes o dels cefalòpodes. La majoria de les espècies són unisexuals (dioics, gonocòrics), i tenen una gònada que continua en un gonoducte que en algunes espècies s'ajunta amb el nefridi

i desemboca conjuntament a través del porus nefridial, a la cavitat del mantell (*Mytilus*). En d'altres bivalves el gonoducte es manté independent en tot el seu trajecte i acaba en el gonopor (*Crassostrea*).

L'hermafroditisme apareix en determinats grups de bivalves, i en el cas de les ostres trobem espècies gonocòriques i espècies hermafrodites. Les espècies hermafrodites poden presentar diferents modalitats:

a) Hermafroditisme funcional o simultani: l'exemplar té túbuls seminífers i fol·licles ovàrics funcionals i madurs alhora, per bé que els gàmetes s'expulsen en dues etapes; aquest fenomen es dona en les vieires (*Pecten maximus* i *P. jacobus*) (Roman i Pérez Camacho, 1976) i en algunes espècies del gènere *Cardium* (Fretter i Graham, 1964).

b) Hermafroditisme consecutiu: en cada

cicle vital es passa per una etapa masculina que va seguida d'una etapa femenina; aquest model el trobem en *Mercenaria*, per bé que en ocasions l'ordre s'inverteix.

c) Hermafroditisme rítmic consecutiu: el trobem en les diferents espècies d'*Ostrea*. En aquest cas el mateix individu pot funcionar com a mascle i després com a femella en la mateixa temporada de posta. El pas de mascle a femella és molt ràpid, per la qual cosa es pot observar en un tall histològic la fase final de l'espermatogènesi i la fase inicial de l'oogènesi.

d) Hermafroditisme alternatiu en *Crassostrea gigas* i en *C. virginica*: en un període de posta hi ha únicament una fase sexual i el canvi de sexe no es produeix fins al període següent (Franc, 1960).

Hi ha moltes dades sobre aquests canvis de sexe i no sempre són coincidents, ja que en gran part depenen de les condicions del medi on viuen els organismes i de factors endògens procedents del sistema nerviós i de l'endocrí (Pérez Camacho i Roman, 1987).

Les èpoques de maduresa sexual varien segons factors mediambientals; així, la temperatura i la salinitat de les aigües són determinants, atesa la incidència que tenen sobre el fitoplàncton i el zooplàncton (recordem que els bivalves són espècies filtradores). Aquest fet determina que les dades que tenim de cicles reproductors d'altres latituds no serveixin de gaire per estudiar les espècies de la costa catalana; hi ha fins i tot diferències de ritme reproductor entre els exemplars de la Costa Brava i els del delta de l'Ebre.

El dimorfisme sexual extern no és freqüent en els bivalves. En alguns casos es pot determinar per la pigmentació de les gònades quan aquestes són madures. Les tonalitats varien d'una espècie a una altra. Així, en el musclos *Mytilus edulis* i *M. galloprovincialis* les femelles sexualment madu-

res en un 90 % dels casos són de color taronja i els mascles són blanquinosos, per bé que la verificació correcta cal fer-la al microscopi. En el cas de *Donax trunculus*, les tellerines, la femella és de color blau violeta i el mascle és grisós.

El grau de maduresa sexual a ull nu s'aprecia pel gruix i el color de la massa visceral, i l'observació d'aposisions de la gònada al microscopi ens permet identificar els gàmetes. En els talls histològics es quantifica la maduresa d'acord amb el desenvolupament del teixit conjuntiu intersticial i la presència dels diferents estadis de la

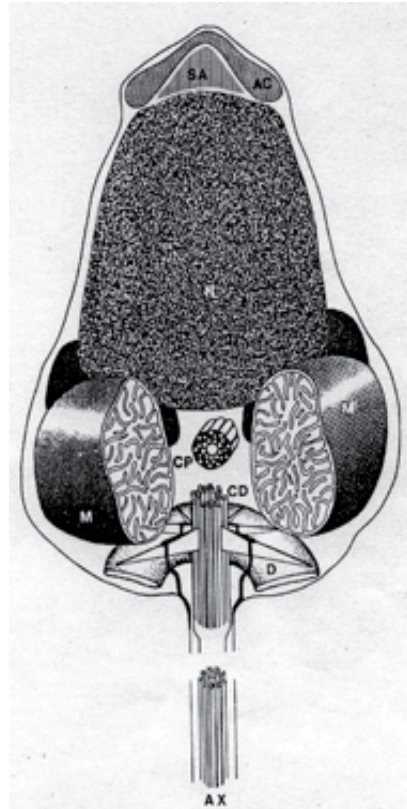


FIGURA 1. Esquema del patró de l'organització dels espermatozoides de les espècies aquàtiques, segons B. Baccetti (1977). AC: acrosoma; SA: material subacrosòmic; N: nucli; CP: centriol proximal; CD: centriol distal; AX: axonema.

gametogènesi en els túbuls seminífers i en el fol·licles ovàrics, respectivament.

Habitualment hi ha dues èpoques de maduresa sexual pel maig-juny i pel setembre-octubre, per bé que, tal com ja s'ha dit abans, això depèn dels factors mediambientals. Hi ha hagut estius molt calorosos en què la mortalitat ha estat extremadament elevada i el cicle reproductor totalment avortat. La gònada madura, dita també *bossa de putxinelli*, situada sota el peu, augmen-

ta considerablement de volum i s'expandeix entre les dues fulles del mantell, la fulla visceral i parietal, amb la qual cosa aquesta part de la massa visceral adopta la pigmentació de la gònada i podem apreciar unes ramificacions molt tènues, de color generalment més clar, que corresponen als gonoductes.

Per bé que els gàmetes s'evacuin pels gonoductes, hi ha una autèntica destrucció tissular de la gònada i del mantell, que és

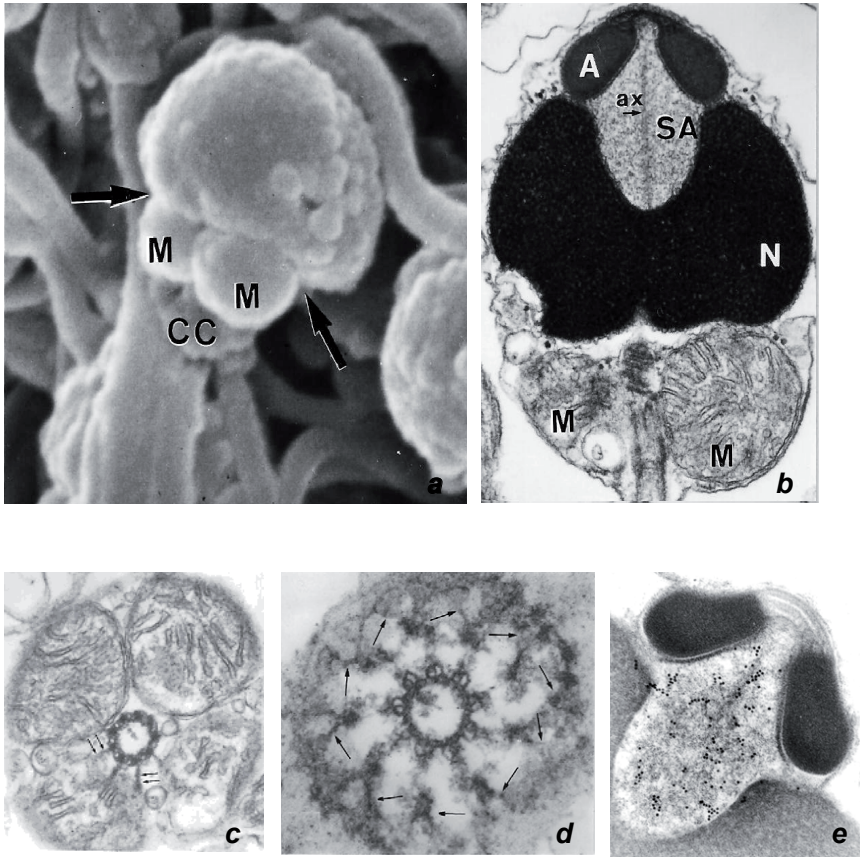


FIGURA 2. Espermatozoides de *Crassostrea gigas*. a) Micrografia electrònica de rastreig, 32.000×. b) Ultraestructura de la cèl·lula, secció longitudinal. A: acrosoma; SA: regió subacrosòmica; ax: eix fibrillar; N: nucli; M: mitocondris; 35.000×. c) Mitocondris envoltant el centriol; 60.000×. d) Sistema d'ancoratge de l'axonema a la membrana plasmàtica, que forma una estrella de nou braços (fletxes); 90.000×. e) Immunolocalització d'actina a la regió subacrosòmica; 50.000×.

seguida d'un procés de cicatrització i regeneració de les parts destruïdes.

En els bivalves la fecundació és externa: els gàmetes són evacuats a l'aigua, tot i que en algunes espècies la fecundació es dona a la cavitat paleal. El desenvolupament pot ser directe o amb larves trocòfores i velígeres. *Ostrea edulis* allibera larves de tipus velígera, mentre que *Crassostrea gigas* allibera ous fecundats, de deu a cent milions per posta (noteu la variabilitat numèrica).

Les condicions mediambientals que es donen principalment a l'estiu fan que els bivalves siguin propensos a patir infestacions per part, sobretot, de trematodes, que tenen com a principal òrgan diana l'hepatopàncrees. En els primers estadis del procés invasiu no es detecten, però quan el grau d'infestació augmenta els paràsits s'escampen i envaeixen altres òrgans, com les gònades i les brànquies, i en aquest cas hi ha elevats nivells de mortalitat (Durfort *et al.*,

1991, 2003). L'alteració de la glàndula digestiva provoca també un efecte inhibitor en el cicle reproductor dels bivalves, per exemple alterant la formació de plaquetes vitel·lines i, per tant, reduint la taxa reproductiva dels exemplars afectats (Princep *et al.*, 1996). En els molluscs bivalves de les costes catalanes s'ha detectat parasitosi per *Protoeces maculatus* en el músclo i per *Bucephalus haimeanus* en l'ostra, dues espècies de trematodes digènids força freqüents en els exemplars procedents de muscleres (Durfort *et al.*, 1995).

També a l'hepatopàncrees s'installen alguns copèpodes que destaquen pel seu color vermell en fer la dissociació de la glàndula digestiva. Són *Mytilicola intestinalis*, en el músclo, i *M. orientalis* en l'ostra. En cas de trobar-s'hi, n'hi ha de dos a vuit exemplars per bivalve, però ocasionalment pot haver-n'hi de trenta a cinquanta, amb la qual cosa l'hepatopàncrees queda pràcticament

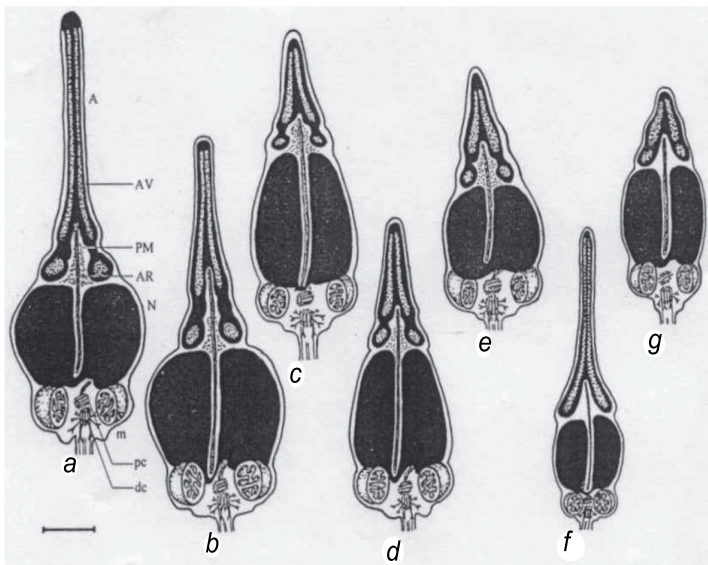


FIGURA 3. Patró de l'organització dels espermatozoides de la subfamília dels mitilínids, segons Kafanov *et al.* (1998). a: *Mytilus coruscus*, b: *Mytilus trossulus*, c: *Crenomytilus grayanus*, d: *Mytilus galloprovincialis*, e: *Mytilus edulis*, f: *Perna perna*, g: *Perna viridis*.

destruït i això provoca un alt índex de mortalitat. La incidència sobre la reproducció és indirecta, com en el cas del trematodes. També hi ha una alteració morfològica i ultraestructural important de tots els elements vibràtils de l'exemplar: brànquies, gonoductes i voreres del mantell, entre altres (Durfort *et al.*, 1990).

En menor freqüència trobem protozous paràsits, malgrat que hi ha hagut anys en què *Marteilia refringens* (Paramyxia) ha afectat un 80 % dels exemplars d'*Ostrea edulis* i de *Crassostrea gigas*, principalment a l'he-

patopàncrees (Riera *et al.*, 1995) i el mateix passa amb *Perkinsus atlanticus* (Apicomplexa), que parasita les cloïsses *Tapes decussatus* i *Tapes semidecussatus*, i causa elevades taxes de mortalitat (Santmartí *et al.*, 1995). En els oòcits de *Mytilus galloprovincialis* es troba el microsporidi *Steinhausia mytilovum* en diferents fases del seu cicle de desenvolupament. La proporció de parasitosis arriba al 50 % durant els mesos d'estiu. Les espores d'aquest protozou les podem veure fins i tot en el nucli dels oòcits (Sagristà *et al.*, 1998).

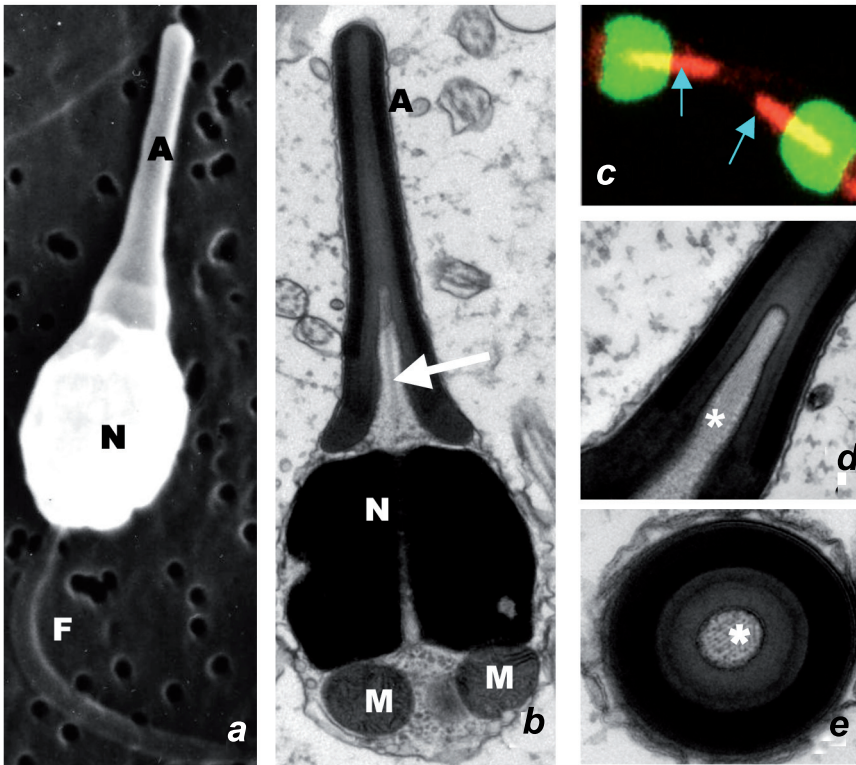


FIGURA 4. Espermatozoides de *Mytilus galloprovincialis*. a) Micrografia electrònica de rastreig; es distingeix bé el cap amb l'acrosoma (A), el nucli (N) i el flagel (F); 12.000 \times . b) Ultraestructura d'una secció longitudinal. S'observen: acrosoma (A), regió subacrosòmica (fletxa), nucli (N), peça intermèdia amb els mitocondris (M); 14.000 \times . c) Imatge obtinguda amb el microscopi confocal. En vermell es veu l'eix fibril·lar axial detectat amb fal·loïdina-TRICT; 300 \times . d) i e) Seccions longitudinal i transversal, respectivament, de l'acrosoma i la regió subacrosòmica; 60.000 i 70.000 \times .

En general la majoria de parasitosis afecten el desenvolupament normal de les gònades i, en conseqüència, l'alteració del procés reproductiu, i arriba a provocar la castració dels exemplars. Aquest fet és més freqüent en els conreus que en estat salvatge.

També hi ha contaminants dissolts en l'aigua que afecten el desenvolupament correcte de l'aparell reproductor: nivells no gaire elevats de plom, cadmi, zinc i mercuri alteren el procés de l'espermatogènesi i provoquen alteracions morfològiques a l'acrosona i a la cua dels espermatozoides, que en determinen la inviabilitat.

Morfologia dels espermatozoides dels molluscs bivalves

Les gònades masculines de moltes espècies de bivalves s'estructuren en agregats, més o menys esfèrics, constituïts per les cèl·lules germinals en successius estadis de diferenciació i maduració. Aquestes masses, anomenades per alguns autors *boles espermàtiques* o també *fol·licles testiculars*, estan envoltades per cèl·lules somàtiques, a les quals s'atorguen funcions de sosteniment i tròfiques. La sortida dels gàmetes es fa a través d'un gonoducte, tot i que sovint, en períodes d'hipertrofia de la gònada, es produeix l'explosió de les boles espermàtiques i es dona una invasió general dels gàmetes per tota la cavitat paleal de l'organisme.

La principal distinció en la morfologia dels espermatozoides és deguda al desenvolupament de la fecundació interna o externa. La fecundació externa està relacionada amb el que s'anomena *forma primitiva* de l'espermatozoide, mentre que la fecundació interna està associada a les formes d'espermatozoides més modificades.

En els bivalves els espermatozoides s'alli-

beren a l'aigua i es produeix la fecundació externa. Només s'ha registrat fecundació interna en alguns grups (Galeommatoida i Teredinidae), que utilitzen els tentacles o sífons com a òrgans copuladors, de manera semblant a com ho fan els cefalòpodes i alguns gasteròpodes.

La morfologia espermàtica és molt menys diversificada que en altres grups de molluscs. Respon al patró de l'espermatozoide d'organismes aquàtics descrit per Baccetti (1977) (vegeu la figura 1). En els molluscs de la classe bivalves, concretament en les espècies estudiades (*Mytilus galloprovincialis*, *Crassostrea gigas* i *Donax trunculus*) els espermatozoides presenten tres parts ben diferenciades: cap, peça mitjana i cua (Franzén, 1956). Els components del cap, el nucli i l'acrosona mostren certa diversitat morfològica. Les variacions en la forma del cap dels espermatozoides estan relacionades amb les característiques de les cobertes dels oòcits que han de fecundar.

El nucli conté la cromatina molt condensada i presenta una electrodensitat uniforme. A mesura que l'espermiogènesi progressa, la cromatina es va densificant i la part posterior de l'òrganul s'evagina per formar una fosseta nuclear, on s'insereix el centriol proximal. L'acrosona té una forma ben diferent en les tres espècies, i sovint és una estructura molt prominent formada per la vesícula acrosòmica i la regió subacrosòmica. La presència de la regió subacrosòmica o *perforatorium*, que és l'espai entre el nucli i l'acrosona, no és exclusiva dels bivalves, i ha estat també descrita en els espermatozoides de molts altres grups (Baccetti, 1979). La cua o flagel està ancorada a la membrana plasmàtica mitjançant sistemes radials més o menys complexos.

MATERIALS I MÈTODES

Durant un període de sis anys hem fet un seguiment de la maduració de les gònades de tres espècies de molluscs bivalves, *Crassostrea gigas*, *Mytilus edulis* i *Donax trunculus*, procedents de diferents àrees de la costa catalana, principalment de Calella, Badalona i St. Carles de la Ràpita.

Les gònades madures s'han processat per a la microscòpia electrònica de transmissió seguint el protocol de rutina: doble fixació amb glutaraldehyd al 2,5 % amb PBS 0,1 M, a pH 7,4 a 4 °C durant dues hores; després d'un rentatge de trenta minuts en la solució amortidora es va fer la postfixació amb tetròxid d'osmi a l'1 %, igualment preparat amb PBS, a pH 7,4 i a 4 °C durant una hora. Després d'una deshidratació amb acetones de graduació ascendent es van incloure les mostres amb la reïna Spurr (1969). Els talls semifins de control han estat tenyits amb blau de metilè a l'1 % preparat amb bòrax al 10 %. Els talls ultrafins han estat obtinguts amb un Ultracut (Reichert) i han estat contrastats amb acetat d'uranil i posteriorment amb citrat de plom, preparat segons la tècnica de Reynolds (1963). Alguns talls han estat contrastats amb àcid fosfotúngstic (PTA), per a la visualització de glicoproteïnes. Per a la immunolocalització de l'actina els talls ultrafins han estat tractats amb anticossos monoclonals antiactina com a primari i anti-IgG conjugats amb partícules d'or col·loïdal de 10 nm com a secundari. Les mostres a estudiar amb el microscopi de rastreig han estat recobertes amb carboni o amb or. Les observacions es van fer amb els microscopis electrònics de transmissió Phillips 300 i Hitachi 600 AB i amb el microscopi electrònic de rastreig Zeiss DSM 940 dels Serveis Científicotècnics de la Universitat de Barcelona. També s'ha aplicat la tècnica de la fal·loïdina-TRICT per observar la dis-

tribució de l'actina amb el microscopi confocal.

RESULTATS I CONCLUSIONS

Crassostrea gigas (Thunberg, 1793) (Ostra portuguesa)

L'espermatozoide madur de *C. gigas* és una cèl·lula petita; el cap té uns 2 µm de diàmetre i el flagel uns 50 µm de llargada (vegeu la figura 2a).

L'acrosoma i el nucli estan en contacte però no en tota la seva superfície. Estan separats pel material subacrosòmic, que es disposa entre els dos orgànuls i forma una fosseta, tant al nucli com a l'acrosoma (vegeu la figura 2b). El contingut de l'acrosoma és molt dens i en la part més apical es veu un sistema laminar en el qual alternen capes fines i capes denses. Aquesta regió presenta reacció positiva a la tinció de PTA (àcid fosfotúngstic) per a la detecció de glicoproteïnes (Bozzo *et al.*, 1993).

La regió subacrosòmica té un contingut finament granulós i homogeni, entre el qual es distingeix una formació axial fibril·lar (ax) amb els filaments orientats en sentit anteroposterior, com en *M. galloprovincialis*.

El reconeixement de l'actina com a component d'aquesta estructura axial s'ha comprovat mitjançant la tècnica d'immunolocalització amb microscòpia electrònica de transmissió. El resultat mostra un marcatge positiu ben patent (vegeu la figura 2e).

El nucli és més ample que llarg i té una aparença uniformement molt electrodensa.

La peça intermèdia està constituïda per quatre mitocondris disposats al voltant dels centríols proximal i distal (vegeu la figura 2c). Dels microtúbuls A del centríol distal emergeixen nou radis cap a la membrana plasmàtica, que formen un sistema d'anco-

ratge en forma d'estrella de nou puntes (vegeu la figura 2d). La prolongació del centríol distal forma l'axonema del flagel amb

l'estructura normal de 9 + 2 dobles de microtúbuls.

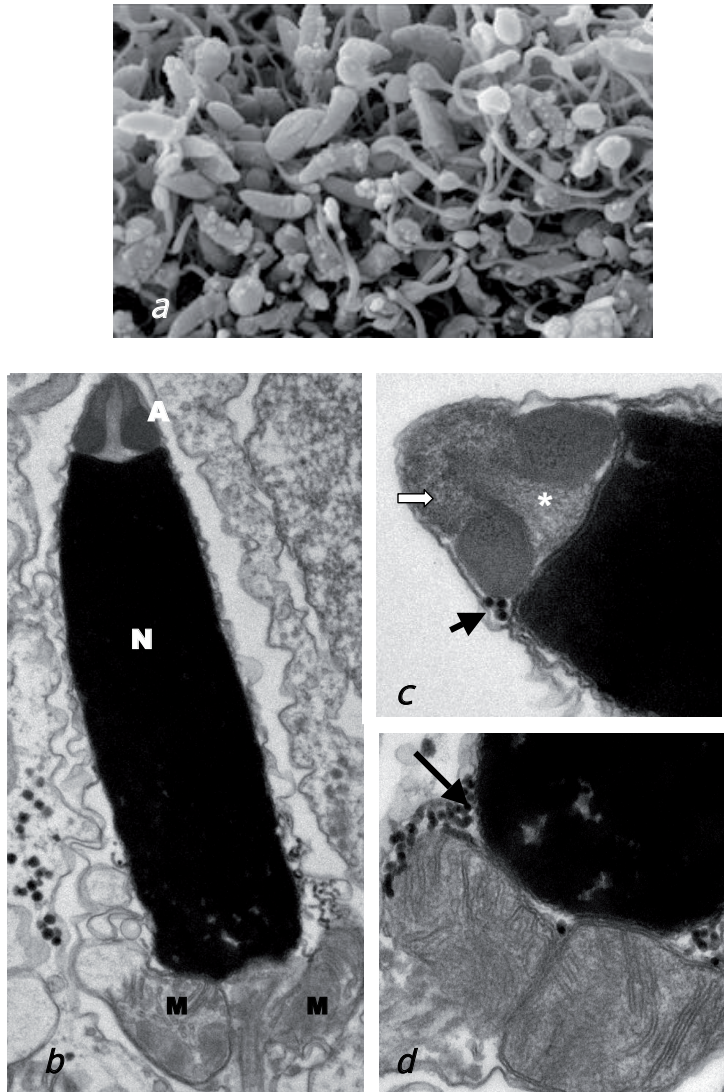


FIGURA 5. Espermatozoides de *Donax trunculus*. a) Micrografia electrònica de rastreig a 3.000 \times . b) Secció longitudinal. A: acrosoma, N: nucli, M: mitocondris; 33.000 \times . c) Detall de l'acrosoma; el constitueixen materials de diferent densitat (fletxa) i el material subacrosòmic homogeni (asterisc). També es veuen grans de glicogen (punta de fletxa); 70.000 \times . d) Regió pericentriolar, amb mitocondris i glicogen abundant; 60.000 \times .

Mytilus galloprovincialis (Lamarck, 1819) (musclo)

El patró morfològic dels espermatozoides de la subfamília dels mitilínids es pot observar a la figura 3 (Kafanov *et al.*, 1998).

L'espermatozoide del musclo *M. galloprovincialis* és una cèl·lula molt allargada. El cap de més de 6 µm de llargada conté el nucli esfèric molt electrodens i un acrosoma extraordinàriament llarg, de 5 µm de longitud, estret i amb forma cònica (vegeu la figura 4a). Segons Franzén (1983), el nucli i l'acrosoma de *M. galloprovincialis* es desvien de la forma típica dels espermatozoides dels bivalves.

L'acrosoma està format per components de diferent densitat electrònica que formen capes superposades per sota de la membrana acrosòmica (vegeu la figura 4b). La part posterior de la vesícula acrosòmica s'invaquina i forma un canal central; és la regió subacrosòmica, on hi ha l'eix fibrillar, format per filaments d'actina. La distribució específica i la localització d'aquesta proteïna es posa de manifest gràcies al marcatge amb falloidina conjugada amb TRICT (isocianat de tetrametilrodamina) i observant-ho amb el microscopi confocal. Mitjançant aquesta tècnica es pot veure com el feix de filaments d'actina penetra pel canal central del nucli (vegeu la figura 4c). El paper de l'actina està ben definit: provoca la projecció del contingut de l'acrosoma sobre la membrana vitel·lina dels oòcits, que no presenten cèl·lules fol·liculars.

El nucli té la cromatina homogènia, interrompuda pel canal intranuclear, que va d'un extrem a l'altre (vegeu la figura 4b).

La peça intermèdia conté cinc o sis mitocondris disposats en cercle, al centre del qual es troba el centríol proximal i distal, amb algunes restes de glicogen. Sota l'anella de mitocondris trobem l'aparell d'anco-

ratge que subjecta la peça mitjana a la membrana plasmàtica.

El flagel, d'uns 45 µm de llargada, respon al patró general d'axonema microtubular.

Donax trunculus (Linnaeus, 1758) (tellerina)

La morfologia de l'espermatozoide d'aquest bivalve és pot considerar que està entre les dues espècies anteriors. És una cèl·lula més allargada que els espermatozoides de *C. gigas*, però menys que els de *M. galloprovincialis*. El cap mesura 2 µm d'amplada per 4 µm de llarg. L'organització dels òrgans que conté (acrosoma i nucli) és semblant a les altres dues espècies (vegeu la figura 5b). L'acrosoma té una regió densa i una clara, i està en contacte amb el nucli, interromput per la regió subacrosòmica, el contingut de la qual és homogeni. No s'observa una estructura amb forma d'eix fibrillar, com en els casos anteriors (vegeu la figura 4c).

La peça intermèdia està formada per quatre o cinc mitocondris i sovint s'observa que els centríols no estan en disposició ortogonal, sinó que es troben alineats segons l'eix de la cèl·lula. També destaquen en aquesta zona el sistema radial d'ancoratge i grans de glicogen ben visibles (vegeu la figura 5d).

El flagel té l'estructura habitual, però s'observen algunes cèl·lules en les quals emergeix en angle recte respecte del cap.

AGRAÏMENTS

El nostre sincer reconeixement a Núria Cortadellas i a Almudena Garcia, dels Serveis Científicotècnics de la Universitat de Barcelona (Hospital Clínic), per la seva col·laboració en el processament de les mostres

per a l'estudi amb el microscopi electrònic. Aquest treball ha estat parcialment finançat per a la Xarxa de Referència de Recerca i Desenvolupament en Aqüicultura de la Generalitat de Catalunya.

BIBLIOGRAFIA

- BACCETTI, B. (1977). «Lo spermatozoo dei Sipunculidi». *R. Sc. Fisiche Mate. Natl. Acad. Naz. Lincei*, 62: 89-93.
- (1979). «The evolution of the acrosomal complex». A: FAWCETT, D. W.; BEDFORD, J. M. [ed.]. *The spermatozoon*. Baltimore: Urban & Schwarzenberg: 305-329.
- BAYED, A. (1990). «Reproduction de *Donax trunculus* sur la côte Atlantique marocaine». *Cah. Biol. Mar.*, 31: 159-169.
- BIGATTI, G.; PEHARDA, M.; TAYLOR, J. (2004). «Size at first maturity, oocyte envelopes and external morphology of sperm in three species of lucinidae (Mollusca: Bivalvia) From Florida Keys, U.S.A». *Malacologia*, 46: 417-426.
- BOZZO, M. G.; RIBES, E.; SAGRISTÀ, E.; POQUET, M.; DURFORT, M. (1993). «Fine structure of the spermatozoa of *Crassostrea gigas* (Mollusca, Bivalvia)». *Mol. Rep. Dev.*, 34: 206-211.
- DURFORT, M. (1993). *Técnicas histopatológicas en moluscos en acuicultura marina: fundamentos biológicos y tecnología*. Barcelona: Universitat de Barcelona.
- (1995). «Revisión de las parasitosis más frecuentes de los moluscos bivalvos de interés comercial del Mar Catalán (Mediterráneo)». A: *Actas V Congreso Nacional de Acuicultura*. Barcelona: Universitat de Barcelona.
- (2002). «Òrgans diana de les principals parasitosis de moluscos bivalves d'interès gastronòmic». *Rev. Reial Acad. Medicina de Catalunya*, 17: 97-102.
- DURFORT, M.; BIGAS, M.; BOZZO, M. G.; POQUET, M.; SAGRISTÀ, E. (2003) «Alteraciones tisulares y del desarrollo gonadal de *Donax trunculus* debidas a la presencia de *Gymnophallus strigatus*». *Actas XX Congreso Soc. Esp. Histología e Ingeniería Tisular*: 230.
- DURFORT, M.; BOZZO, M. G.; POQUET, M.; SAGRISTÀ, E.; FERRER, J.; GARCÍA VALERO, J.; AMOR, M. J.; RIBES, E. (1990). «Ultraestructura del epitelio vibrátil de los gonoductos de *Tapes decussatus* y de *Tapes semidecussatus*». *Actas III Congreso Nac. de Acuicultura*: 587-592.
- DURFORT, M.; FERRER, J.; SAGRISTÀ, E.; POQUET, M.; BOZZO, M. G.; GARCÍA VALERO, J.; RIBES, E. (1991). «Alteraciones tisulares en la ostra portuguesa (*Crassostrea gigas*) debidas a la presencia de esporocistos de *Bucephalus haimeanus* (Tremátodo, Digénido)». *Histología Médica*, 7: 61-63.
- ECKELBARGER, K. J.; BIELER, R.; MIKELSEN, P. M. (1990). «Ultrastructure of sperm development and mature sperm morphology in three species of commensal Bivalves (Mollusca: Galeommatoidae)». *J. Morphology*, 205: 63-75.
- ECKELBARGER, K. J.; DAVIS, C. V. (1996). «Ultrastructure of the gonad and gametogenesis in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. II. Testis and spermatogenesis». *Marine Biology*, 127: 89-96.
- ERKAN, M.; SOUSA, M. (2002). «Fine structural study of the spermatogenic cycle in *Pitar rudis* and *Chamelea gallina* (Mollusca, Bivalvia, Veneridae)». *Tissue and Cell*, 34: 262-272.
- FRANC, A. (1960). «Classe des Bivalves». A: GRASSÉ, P. P. [ed.]. *Traité de zoologie*. Paris: Masson et Cie.
- FRANZÉN, A. (1956). «On spermiogenesis, morphology of the spermatozoon, and biology of fertilization among invertebrates». *Zool. B. Uppsala*, 31: 355-482.
- (1983). «Ultrastructural studies of spermatozoa in three bivalve species with notes on evolution of elongated sperm nucleus in primitive spermatozoa». *Gamete Res.*, 7: 199-214.
- FRETTER, V.; GRAHAM, A. (1964). «Reproduction» A: WILBUR, K. M.; YONGE, C. M. [ed.]. *Physiology of mollusca*. Nova York: Academic Press: 127-164.
- GWO, J. C.; YANG, W. T.; SHEU, H. Y.; CHENG, H. Y. (2002). «Spermatozoan morphology of four species of bivalve Heterodonta, Veneridae from Taiwan» *Tissue and Cell*, 34: 39-43.
- HODGSON, A. N.; BERNARD, R. T. F.; HORST, G. VAN DER (1990). «Comparative spermatology of three species of *Donax* (Bivalvia) from South Africa». *J. Moll. Stud.*, 56: 257-265.
- KAFANOV, A. I.; DROZDOV, A. L. (1998). «Comparative sperm morphology and phylogenetic classification of recent Mytiloidea (Bivalvia)». *Malacologia*, 39: 129-139.
- LONGO, F. J. (1983). «Meiotic maturation and fertilization». A: WILBUR, K. M. [ed.]. *The mollusca*, vol. 3. Orlando: Academic Press, 49-89.
- (1997). *Fertilization*. Londres: Chapman & Hall.
- LUTZEN, J.; JESPERSEN, A.; TAKAHASHI, T.; KAI, T. (2004). «Morphology, structure of dimorphic sperm, and reproduction in the hermaphroditic commensal bivalve *Pseudopythina tsurumaru* (Galeommatoidae: Kellidae)». *J. Morphology*, 262: 407-420.
- MATOS, E.; MATOS, P.; CORRAL, L.; AZEVEDO, C. (1995). «Estudo ultraestrutural da espermatogênese de

- Donax striatus* Linnaeus (Mollusca, Bivalvia) do litoral Norte do Brasil». *Revta. Bras. Zool.*, 12: 211-220.
- PÉREZ CAMACHO, A.; ROMÁN, G. (1987). «La reproducción en los moluscos bivalvos». A: ESPINOSA DE LOS MONTEROS, J.; LABARTA, U. [ed.]. *Reproducción en acuicultura*. Madrid: Caicyt, 133-184.
- PRINCEP, M.; BIGAS, M.; DURFORT, M. (1996). «Incidencia de *Bucephallus haimeanus* (Lacaze-Duthiers, 1854) (Trematoda, Digenea) en el hepatopáncreas de *Ostrea edulis* Linné». *Iberus*, 14: 211-220.
- REYNOLDS, E. S. (1963). «The use of lead citrate at high pH as electron opaque stain in electron microscopy». *J. Cell Biol.*, 17: 208-212.
- RIERA, V.; BIGAS, M.; SANTMARTÍ, M.; DURFORT, M. (1995). «Prevalencia del protozoo parásito *Marteilia refringens* en las poblaciones de ostra plana (*Ostrea edulis*) del maresme (NE Barcelona)». *Actas V Congreso Nacional de Acuicultura*: 242-247.
- ROMÁN, R.; PÉREZ CAMACHO, A. (1976). «Cultivo de larvas de vieira, *Pecten maximus* (Linnaeus), en laboratorio». *Bol. Inst. Espa. Océano*, 223: 17.
- SAGRISTÀ, E.; BOZZO, M. G.; BIGAS, M.; POQUET, M.; DURFORT, M. (1998). «Developmental cycle and ultrastructure of *Steinhausia mytilovum*, a Microsporidian parasite of oocytes of the mussel, *Mytilus galloprovincialis* (Mollusca, Bivalvia)». *Europ. J. Protistol.*, 34: 58-68.
- SANTMARTÍ, M. M.; GARCÍA VALERO, J.; MONTES, J.; PECH, A.; DURFORT, M. (1995). «Seguimiento del protozoo *Perkinsus* sp. en las poblaciones de *Tapes decussatus* y *Tapes semidecussatus* del delta del Ebro». *Actas V Congreso Nacional de Acuicultura*: 260-265.
- SPURR, A. R. (1969). «A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy». *Journal of Ultrastructure Research*, 26: 36-43.