

## Maduración y fecundación *in vitro* de los ovocitos de *Pteria sterna* (Gould, 1851, Mollusca)

### Maturation and fertilization *in vitro* of *Pteria sterna* (Gould, 1851, Mollusca) oocytes

Citlalli Harris, Sashenka Fierro, Aimeé de la Cerda, Daniel Domínguez, Juan J. Echanove Ivett Ferreiro, Karla Garay, Brenda García, Jessica González, Juan C. González Roxana Lara, Ana Cecilia López, Javier Martínez, Maricela Montalvo, Raquel Nieto Aide Ocegüera, Cristina Orozco, Gerardo Sánchez, Ana Luisa Torres, Sandra Varela Valeria Vital, José O. Zavala, Meredith C. Gould\*

Laboratorio de Biología Celular y Molecular  
Universidad Autónoma de Baja California  
A.P. 2921, Ensenada 22860, Baja California, México  
\*E-mail: mgould@faro.ens.uabc.mx

Recibido en octubre de 2001; aceptado en diciembre de 2001

#### Resumen

Los ovocitos de *P. sterna* no pueden ser fecundados *in vitro* sin una previa inducción al desove, de manera que, en el presente trabajo se pretende desarrollar un método sencillo para inducir la ruptura de vesículas germinales, permitiendo así la fecundación sin un desove previo. Encontramos que los ovocitos extraídos de la gónada de *Pteria sterna* presentan ruptura de la vesícula germinal (RVG) ante el agente estimulante  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ( $10^{-2}$  M), es decir, se activan los ovocitos (a partir de la profase I) y continúan la meiosis hasta la metafase I, lo que permite la fecundación y el desarrollo de los organismos hasta larvas "D". Contrario a lo anterior, la serotonina ( $2 \times 10^{-5}$  M) no propicia la maduración (RVG) en los ovocitos de la especie mencionada. Esta información puede ser utilizada para la fecundación *in vitro* y en intentos de repoblación del bivalvo *P. sterna*, así como en futuros estudios sobre su reproducción.

**Palabras clave:** ovocitos, ruptura de la vesícula germinal, serotonina, cloruro de amonio, fecundación.

#### Abstract

*P. sterna* oocytes cannot be fertilized *in vitro* unless they are obtained by inducing spawning. The present work was undertaken to develop a simple method to induce germinal vesicle breakdown that would enable the oocytes to be fertilized without prior spawning. We found that *Pteria sterna* oocytes removed from the ovaries are induced to undergo germinal vesicle breakdown (GVBD) by 10 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  in seawater, and proceed to metaphase I of meiosis, at which stage they can be fertilized and will develop at least as far as "D" larvae. On the other hand, ovarian oocytes exposed to  $2 \times 10^{-5}$  M serotonin in seawater remained in prophase and did not undergo GVBD. Ammonium chloride treatment provides a simple, inexpensive procedure that can be useful in studies of fertilization and development, and for attempts to repopulate this exploited species.

**Key words:** oocytes, germinal vesicle breakdown, serotonin, ammonium chloride, fertilization.

#### Introducción

*P. sterna* es un bivalvo de interés comercial de la costa norte del Pacífico de Baja California (B.C.), México. Este trabajo pretende contribuir al estudio de la fecundación *in vitro* de los ovocitos de dicho organismo (específicamente en cuanto a la inducción a la maduración), ya que la información acerca de su biología reproductiva es escasa, y con el propósito de contribuir en intentos de repoblación de las zonas afectadas por su sobreexplotación.

En la mayoría de las especies de bivalvos, los ovocitos extraídos de las gónadas que se encuentran en profase I, no son fertilizables excepto en los casos de *Crassostrea gigas* (Osanai, 1985) y *Spisula solidissima* (Allen, 1953). En otras especies de

#### Introduction

*P. sterna* is a bivalve of commercial interest on the north coast of Baja California (B.C.), Mexico. However, little is known about the reproductive biology of this species. The present study was undertaken to develop a method for *in vitro* fertilization (especially the induction of oocyte maturation), which could be used to help in repopulating areas affected by overexploitation.

In the majority of bivalve species the prophase I oocytes removed from the ovary are not fertilizable, with the exception of *Crassostrea gigas* (Osanai, 1985) and *Spisula solidissima* (Allen, 1953). In various bivalve molluscs, the hormone serotonin will induce maturation of prophase-arrested oocytes

**Tabla 1.** Especies de bivalvos cuyos ovocitos han sido reportados con ruptura de vesícula germinal (RGV +) o sin ruptura de vesícula germinal (RGV -) al ser tratados con serotonina y/o cloruro de amonio, y con un aumento de pH intracelular reportado (pH +).

**Table 1.** Bivalve species whose oocytes have been reported to undergo germinal vesicle breakdown (RVG+) or fail to (RVG -), and to show an increase in intracellular pH (pH+) when treated with serotonin and/or ammonium chloride.

Especie	Serotonina		Cloruro de amonio		Autores
	RVG	pH	RVG	pH	
<i>Ruditapes philippinarum</i>	+		+		Guerrier <i>et al.</i> , 1993
<i>Patella Vulgata</i>		+	+	+	Guerrier <i>et al.</i> , 1986
<i>Limaria hakodatensis</i>	-		+	+	Deguchi y Osanai, 1993
<i>Hiatella flaccida</i>	+	+	+	+	Deguchi y Osanai, 1995
<i>Crassostrea gigas</i>	+	+			Kyozuka <i>et al.</i> , 1997
<i>Barnea candida</i>			+	+	Brassard <i>et al.</i> , 1988.
<i>Tapes philippinarum</i>	+				Osanai y Kuraishi, 1988.
<i>Mytilus edulis</i>	-				Osanai y Kuraishi, 1988.

moluscos bivalvos se ha encontrado que la hormona serotonina induce la maduración de los ovocitos detenidos en profase fuera del ovario, causando la ruptura de la vesícula germinal (RVG) seguida de una detención de la meiosis en la metafase I, hasta la fertilización, como ha sido reportado en *Hiatella flaccida* (Deguchi y Osanai, 1995), *Ruditapes philippinarum*, *C. gigas* (Osanai y Kuraishi, 1988; Gobet *et al.*, 1994) y *Tivela stultorum* (Alvarado-Alvarez *et al.*, 1996). La respuesta de los ovocitos a la serotonina, en todas las especies mencionadas, ha sido atribuida a la presencia de receptores para esta hormona en las membranas. Sin embargo, hay especies como *Mytilus edulis* y *Limaria hakodatensis* que no responden al estímulo de la serotonina (ver tabla 1).

Otro inductor de la maduración de los ovocitos es el cloruro de amonio (tabla 1) que, según estudios, incrementa el pH intracelular de las células (Guerrier *et al.*, 1986; Deguchi y Osanai, 1994; Gould *et al.*, 2001; Brassard *et al.*, 1988), propiciando la RVG.

En el presente trabajo se probó el efecto de la serotonina y el cloruro de amonio en la maduración de ovocitos de *P. sterna* extraídos directamente de la gónada del organismo.

## Materiales y métodos

### Organismos

Se recolectaron organismos adultos de *Pteria sterna* en la Bahía de Todos Santos, Ensenada, B.C., y de *Crassostrea gigas* en la Bahía San Quintín B. C., los cuales se mantuvieron en acuarios con agua de mar a aproximadamente 16°C, utilizando aireación y filtros biológicos.

### Obtención de gametos

Los ovocitos se obtuvieron directamente de las gónadas de tres hembras utilizando pipetas Pasteur, se resuspendieron en

removed from the ovary, causing germinal vesicle breakdown (GVBD) followed by arrest in metaphase I of meiosis until fertilization, as reported for *Hiatella flaccida* (Deguchi and Osanai, 1995), *Ruditapes philippinarum*, *C. gigas* (Osanai and Kuraishi, 1988, Gobet *et al.*, 1994), and *Tivela stultorum* (Alvarado-Alvarez *et al.*, 1996), a response which has been attributed to the presence of receptors for serotonin in the oocyte plasma membrane. However, serotonin will not induce oocyte maturation in all bivalves (e.g. *Mytilus edulis* and *Limaria hakodatensis*, see table 1). Another inducer of maturation in some species is ammonium chloride (see table 1), which presumably acts to cause germinal vesicle breakdown by raising intracellular pH (Guerrier *et al.*, 1986; Deguchi and Osanai, 1994; Gould *et al.*, 2001; Brassard *et al.*, 1988). Therefore we tried both agents on oocytes taken directly from the gonad of *Pteria sterna*.

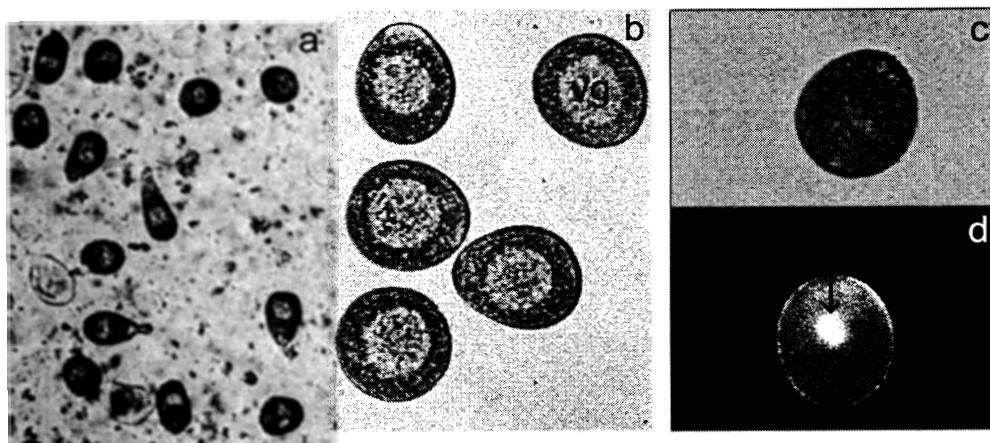
## Materials and methods

### Animals

Adult *Pteria sterna* were collected from the Bahía de Todos Santos, Ensenada, B.C., Mexico, and *Crassostrea gigas* were from Bahía San Quintín, B.C. They were maintained in seawater aquaria at approximately 16°C with aeration and biological filters.

### Obtaining gametes

Oocytes were obtained directly from the ovaries of three females with Pasteur pipets, resuspended in filtered (0.45 µm) natural seawater (fig. 1a) and maintained at 17°C or room temperature (22 °C). Pieces of gonad and other impurities were removed by filtration through cheesecloth and centrifugation



**Figura 1.** (a) Ovocitos inmaduros de *P. sterna* recién extraídos de la gónada (sin lavar); el área más clara del citoplasma corresponde a la vesícula germinal. El diámetro de los ovocitos redondos es aproximadamente 50  $\mu\text{m}$ . (b) Ovocitos inmaduros lavados, ligeramente oprimidos con el cubreobjetos para distinguir claramente la vesícula germinal (vg). (c) Ovocito sin vesícula germinal (maduro) aproximadamente 70 min después de resuspenderlo en  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (10 mM, pH 8.5, 17°C). (d) Ovocito en metafase I, 60 min después de ser resuspendido en  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (10 mM, pH 8, 17°C), teñido con bisbenzamida para revelar el grupo de cromosomas condensados en metafase I ( $\downarrow$ ).

**Figure 1.** (a) Immature oocytes of *P. sterna* removed from the ovary, before washing. The germinal vesicle (vg) is visible as a clear area in the cytoplasm. The diameter of the round oocytes is approximately 50  $\mu\text{m}$ . (b) Immature oocytes after washing. They have been flattened slightly by the coverslip to make the germinal vesicle more distinct. (c) Oocyte with GVBD after approximately 70 min incubation with 10 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , pH 8, at 17°C. (d) Oocyte fixed after 60 min in 10 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , pH 8, 17°C, and stained with bisbenzimidazole showing the cluster of condensed chromosomes in metaphase I of meiosis ( $\downarrow$ ).

agua de mar filtrada (0.45  $\mu\text{m}$ ) (fig. 1a), y se mantuvieron a 17°C o a temperatura ambiente (22°C). Mediante filtración con gasa y centrifugación, se eliminaron los restos de gónada y demás impurezas (fig. 1b). Los ovocitos limpios en suspensión, se dividieron en vasos de precipitado (15 ml de agua de mar con ovocitos a < 1 % v/v). Los espermatozoides concentrados, extraídos de las gónadas con pipetas Pasteur, se mantuvieron en hielo hasta su utilización.

#### Inducción a la maduración

**Serotonina:** Los ovocitos de *Crassostrea gigas* y *Pteria sterna* se resuspendieron en serotonina con agua de mar ( $2 \times 10^{-5}$  M; complejo sulfato creatinina 5-hidroxitriptamina Sigma). Los ovocitos de ostión funcionaron como control positivo porque se ha demostrado que la serotonina a esta concentración induce la maduración de éstos (Osanai y Kuraishi, 1988). Se hicieron observaciones al microscopio cada 30 min (durante 5 horas con *P. sterna* y 30 min con *C. gigas*), con el fin de determinar el estado de los ovocitos. Se analizaron más de cien ovocitos de cada muestra en los diferentes tratamientos.

**Cloruro de amonio:** Los ovocitos de *Pteria sterna* se resuspendieron en  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ( $10^{-2}$  M en agua de mar), se ajustó el pH a 8 y a 8.5 utilizando NaOH. Las observaciones al microscopio

(fig. 1b). The washed oocytes were divided into beakers (15 ml seawater with < 1% v/v oocytes). Concentrated sperm removed from the testes with a Pasteur pipet were maintained on ice until used.

#### Maturation induction

**Serotonin:** *C. gigas* and *P. sterna* oocytes were resuspended in seawater containing  $2 \times 10^{-5}$  M serotonin (Sigma, 5-hydroxytryptamine creatinine sulfate complex). Oyster oocytes served as positive controls since serotonin at this concentration is known to induce their maturation (Osanai and Kuraishi, 1988). Samples were observed with the microscope every 30 min (during 5 h with *Pteria* and 30 min with *Crassostrea*) to determine whether GVBD occurred.

**Ammonium chloride:** *Pteria* oocytes were resuspended in 10 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  in seawater, and the pH was adjusted to 8.0 or 8.5 with NaOH. Samples were observed under the microscope every 15 min until more than 80% underwent GVBD (fig. 1c). Some oocytes were also suspended in seawater adjusted to pH 9 with  $\text{NH}_4\text{OH}$ , and observed in the same manner.

More than 100 oocytes were analyzed in each sample from the different treatments.

se hicieron cada 15 minutos hasta que, más del 80 % de los ovocitos con tratamiento, tuvieran la vesícula germinal rota (fig. 1c).

Hidróxido de amonio: Los ovocitos de *P. sterna* se resuspendieron en agua de mar, ajustando el pH a 9 utilizando  $\text{NH}_4\text{OH}$  concentrado. Las observaciones se realizaron de la misma manera que con el cloruro de amonio.

Se analizaron más de cien ovocitos de cada muestra en los diferentes tratamientos.

### Fecundación

Los ovocitos fueron lavados por centrifugación para eliminar la serotonina, el  $\text{NH}_4\text{OH}$  y el  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , e inmediatamente después se colocaron en vasos de precipitado con agua de mar filtrada y se agregaron de 40 a 150  $\mu\text{L}$  de espermatozoides concentrados (previamente verificada la movilidad de éstos) a cada 15 ml de agua de mar con ovocitos. Se hicieron observaciones con el microscopio y, en el momento en que los ovocitos presentaron segmentación, se lavaron con el fin de eliminar los espermatozoides restantes (en los casos donde no se presentó segmentación, al mismo tiempo se eliminaron los espermatozoides). Para hacer un seguimiento en el desarrollo de los organismos, los ovocitos fecundados se resuspendieron en agua de mar.

### Tinción de núcleos y cromosomas con bisbenzimidida

Se tomaron muestras a diferentes tiempos, de los ovocitos en los diferentes tratamientos, se fijaron con formaldehído (1/3 del volumen de 5.5 % de formaldehído en agua de mar), y se guardaron a 4° C. Se eliminó el formaldehído de las muestras con tres lavadas en agua de mar y se tiñeron con bisbenzimidida (25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en agua de mar con 1 mM TAPS, pH 8).

### Fotografía

Se colocaron muestras teñidas con bisbenzimidida en portaobjetos con una gota de n-propil gallol en 90 % de glicerol (Giloh y Sadat, 1982) para ser observadas con el microscopio de epifluorescencia Olympus IX701F (objetivo 40 $\times$ ; LCPlan F1, 0.6 NA). Para observaciones con campo claro o contraste de fases, se utilizó el mismo microscopio o uno de American Optical. Se tomaron las fotografías (Plus-X Pan) con una cámara Olympus OM-2 colocada en el ocular del microscopio con un adaptador Kalt (Santa Monica, CA). Los negativos fueron escaneados en un aparato Nikon LS-2000 y se procesaron en Adobe Photoshop.

## Resultados

### Maduración con serotonina

La serotonina no induce la maduración de los ovocitos de *P. sterna*. El número de ovocitos que presentaron ruptura de

### Fertilization

Oocytes were washed by centrifugation to remove serotonin,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  or  $\text{NH}_4\text{OH}$  and placed in beakers with filtered seawater. Spermatozoa were checked for motility, then 40 to 150  $\mu\text{L}$  of the concentrated suspension was added to each 15 ml of oocytes in seawater. Samples were observed periodically, and once cleavage began, the eggs were washed to remove unbound sperm and resuspended in fresh seawater to follow their development.

### Staining nuclei and chromosomes with bisbenzimidide

Samples of oocytes from the different treatments were fixed by adding approximately 1/3 vol of 5.5% formaldehyde in seawater and stored at 4°C. Following three washes with seawater to remove formaldehyde, they were stained with bisbenzimidide (25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in seawater with 1 mM TAPS, pH 8).

### Photography

Samples stained with bisbenzimidide were placed on a slide with a drop of 0.24 M n-propyl gallol in 90% glycerol (Giloh and Sadat, 1982) and observed with the 40 $\times$  objective (LCPlan F1, N.A. 0.6) of an Olympus IX70 epifluorescence microscope. Bright field and phase contrast photographs were taken with the same microscope or with an American Optical microscope. Photographs (Plus-X Pan) were taken with an Olympus OM-2 camera mounted on the microscope ocular with a Kalt (Santa Monica, CA) adapter, and the negatives were scanned with a Nikon LS-2000 film scanner and processed with Adobe Photoshop.

## Results

### Treatment with serotonin

Serotonin failed to induce GVBD in *Pteria* oocytes. After 5 h incubation with the drug, the percentage of oocytes with GVBD (4%) was the same as in control oocytes incubated without serotonin (3%) (table 2). On the other hand, serotonin induced GVBD in 96% of *Crassostrea* oocytes after only 30-min incubation, while 54% of the oocytes without serotonin underwent spontaneous GVBD during the same period of time (table 2).

### Treatment with ammonium chloride

More than 80% of *Pteria* oocytes incubated with  $\text{NH}_4\text{Cl}$  underwent GVBD (fig. 1c) in all conditions of temperature and pH, whereas  $\leq 4\%$  of the control oocytes without  $\text{NH}_4\text{Cl}$  underwent GVBD during the same time period (table 3). Furthermore, the response was rapid, for example GVBD occurred in 100% of oocytes exposed to  $\text{NH}_4\text{Cl}$  for 30 min at 22 °C

vesícula germinal, después de 5 horas de permanecer suspendidos en serotonina (4%), es el mismo que el obtenido con los ovocitos en agua de mar sin serotonina (3%) (tabla 2). Sin embargo, la serotonina si induce la maduración de los ovocitos de *C. gigas*; se obtuvo 96% de ovocitos sin vesícula germinal después de 30 min, mientras que sin serotonina se obtuvo el 54% de ovocitos sin vesícula germinal durante el mismo periodo de tiempo (tabla 2).

#### Maduración con cloruro de amonio

Los ovocitos de *P. sterna* presentaron RVG (fig. 1c) en un porcentaje mayor al 80% (en todas las diferentes condiciones de pH y temperatura) cuando se trataron con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  y, en los ovocitos sin tratamiento de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , se presentó un porcentaje  $\leq 4\%$  de ovocitos con RVG, en el mismo periodo de tiempo en que los demás ovocitos fueron sometidos a similar tratamiento (tabla 3). Por ejemplo, el número de ovocitos maduros en un periodo de 30 min, en presencia de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , aumentó hasta en un 100% (pH 8, 22°C) (tabla 3). Mediante la observación de las muestras teñidas con bisbenzimidida al microscopio de fluorescencia se constató que los ovocitos tratados habían alcanzado la metafase I de la meiosis (fig. 1d). Los ovocitos sometidos al tratamiento de  $\text{NH}_4\text{OH}$  (pH 9; 17 y 22°C) también presentaron RVG (datos no mostrados).

#### Fertilización y desarrollo

Los ovocitos de *P. sterna*, madurados con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  fueron fecundados y se desarrollaron de manera normal hasta el estadio de larva "D" (fig. 2d). Se pudo constatar la formación de cuerpos polares durante el proceso de fecundación (fig. 2a) y los primeros estadios de segmentación (figs. 2b y c). Un dato interesante es el gran parecido que hay con el desarrollo de *C. gigas* (segmentación y larva "D").

#### Discusión

Los resultados muestran que la serotonina ( $2 \times 10^{-5}$  M) no es una hormona que active los ovocitos de *P. sterna*, detenidos en profase I, es decir, no induce la RVG (maduración), mientras que, en los ovocitos de *C. gigas*, ésta si se presentó bajo el estímulo de la serotonina. Sin embargo, con un tratamiento de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ( $10^{-2}$  M), se obtuvieron ovocitos de *P. sterna* maduros (sin vesícula germinal) que fueron fecundados *in vitro* y cuyo desarrollo, aparentemente normal, llegó hasta larvas "D".

La RVG en los ovocitos de *C. gigas*, sometidos al tratamiento con serotonina, comprueba la actividad de la hormona. Al parecer, esta respuesta está relacionada con la presencia de receptores de serotonina en las membranas de los ovocitos, de manera que los resultados obtenidos con los ovocitos de *P. sterna* permiten suponer que la serotonina no es una hormona que induzca la RVG (maduración) en los ovocitos de esta especie. Lo anterior probablemente se deba a la ausencia de

(table 3). Observation of bisbenzimidide-stained samples confirmed that the treated oocytes had reached metaphase I of meiosis (fig. 1d). Oocytes treated with seawater adjusted to pH 9 with  $\text{NH}_4\text{OH}$  also underwent GVBD (data not shown).

#### Fertilization and development

*Pteria sterna* oocytes matured with  $\text{NH}_4\text{Cl}$  developed normally to "D" larvae after fertilization (fig. 2d). Figures 2a, b and c show polar body formation and cleavage stages. It is interesting to note that cleavage and development to "D" larvae in *Pteria* closely resembled development in *Crassostrea*.

#### Discussion

The above results show that serotonin ( $2 \times 10^{-5}$  M) is unable to induce meiosis reinitiation in prophase I oocytes of *P. sterna*, although it induces GVBD in *C. gigas* oocytes. Ammonium chloride, on the other hand, readily induces oocyte maturation in *P. sterna*, followed by apparently normal development to "D" larvae when the oocytes are fertilized. These results suggest that *P. sterna* oocytes lack receptors for serotonin (which are presumably present in *Crassostrea* oocytes) and that some other unidentified hormone(s) induce(s) maturation in this species. Higher concentrations of serotonin were not tested, since  $10^{-7}$  to  $10^{-5}$  M is effective in the other species whose oocytes respond to serotonin (see references in table 1 and Alvarado-Alvarez *et al.*, 1996, whose study revealed that  $10^{-4}$  M was less effective than  $10^{-5}$  M).

The positive response to ammonium chloride makes it possible to study maturation and fertilization in more detail in this species. Furthermore, since development at least as far as "D" larvae appears to be normal, this simple method could be used to try to repopulate areas that have been overexploited and/or produce adults in culture.

Studies of the effect of ammonium on maturation indicate that it acts principally to increase intracellular pH, as reported for *Patella vulgata* (Guerrier *et al.*, 1986; Vilain *et al.*, 1991), *Limaria hakodatensis* (Deguchi and Osanai, 1993) and non-bivalve molluscs such as *Lottia gigantea* (Gould *et al.*, 2001). This could be confirmed in *Pteria* by further studies in which intracellular pH is measured during administration of  $\text{NH}_4\text{Cl}$ .

It is interesting to note that an intracellular pH increase occurs during maturation, induced by serotonin in oocytes of *C. gigas* (Kyojuka *et al.*, 1997), *H. flaccida* (Deguchi and Osanai, 1995), and *R. philippinarium* (Guerrier *et al.*, 1993) and GVBD is also induced by  $\text{NH}_4\text{Cl}$  without serotonin in *H. flaccida* (Deguchi and Osanai, 1995) and *R. philippinarium* (Guerrier *et al.*, 1993). (To our knowledge the effect of  $\text{NH}_4\text{Cl}$  on *Crassostrea* oocytes has not been tested.) Furthermore,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  induces GVBD in all species that have been tested. These observations are summarized in table 1 and suggest the interesting possibility that an intracellular pH increase may be

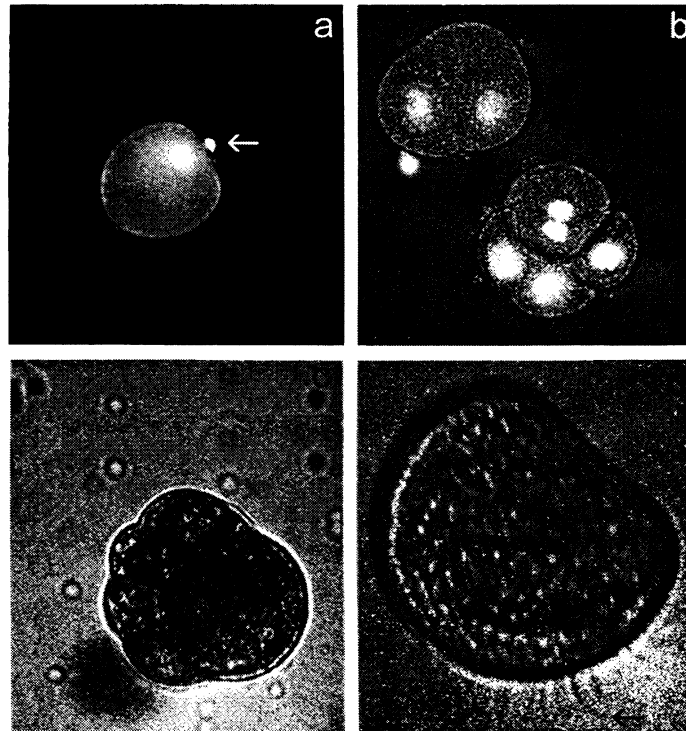
**Tabla 2.** Porcentaje de ovocitos que presentaron ruptura de vesícula germinal después de un tratamiento sin o con serotonina ( $2 \times 10^{-5}$  M)(17°C).  
**Table 2.** Percentage of oocytes with germinal vesicle breakdown following treatment with or without serotonin ( $2 \times 10^{-5}$  M)(17°C).

Especie	Tiempo (min)	+ serotonina % (n)	- serotonina % (n)
<i>Crassostrea gigas</i>	30	96 (173)	54 (237)
<i>Pteria sterna</i>	180	0.5 (203)	8 (119)
	300	4 (583)	3 (573)

**Tabla 3.** Porcentaje de ovocitos de *Pteria sterna* que presentaron ruptura de vesícula germinal después de un tratamiento sin y con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ( $10^{-2}$ M) a diferentes pHs y temperaturas (4 experimentos separados).

**Table 3.** Percentage of *Pteria sterna* oocytes with germinal vesicle breakdown following treatment with and without  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ( $10^{-2}$  M) at different pHs and temperatures (4 separate experiments).

Tiempo (min)	(+) $\text{NH}_4\text{Cl}$ % (n)	(-) $\text{NH}_4\text{Cl}$ % (n)	pH	T (°C)
30	100 (100)	3 (100)	8	22
60	94 (116)	0 (100)	8	17
75	96 (100)	4 (100)	8.5	17
155	82 (320)	0 (27)	8.5	22



**Figura 2.** Desarrollo de los ovocitos de *P. sterna* madurados con  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , pH 8 y 17°C. (a) Cigoto después de 60 min de haber inseminado los óvulos maduros, teñido con bisbenzamida; se puede observar el cuerpo polar (←). (b) Cigotos en proceso de segmentación, estadios de 2 y 4 células, teñidos con bisbenzamida. (c) Mórula después de 5 horas de haber iniciado la fecundación. (d) Larva "D" viva, 40 horas después de haber inseminado los óvulos, observada con microscopio de contraste de fases. En la parte inferior derecha se ven los cilios (←). La larva midió aproximadamente  $250 \times 225$   $\mu\text{m}$ .

**Figure 2.** Development of *P. sterna* oocytes matured with  $\text{NH}_4\text{Cl}$  at pH 8 and 17°C. (b) Bisbenzimidide-stained zygote 60 min after fertilization; a polar body is visible (←). f. Cleaving zygotes at the 2 and 4 cell stages stained with bisbenzimidide. (c) Later cleavage stage, 5 h after fertilization. (d) Living "D" larva approximately 40 h after fertilization observed with phase contrast microscopy. Cilia are visible at the lower right (←). The larva measured approximately  $225 \times 250$   $\mu\text{m}$ .

tores para esta hormona. No se probaron concentraciones más altas de serotonina porque se ha observado que concentraciones de  $10^{-7}$  a  $10^{-5}$  M son efectivas en todas las demás especies cuyos ovocitos responden a esta hormona (ver citas en la tabla 1 y Alvarado-Alvarez *et al.* (1996), quienes encontraron que  $10^{-4}$  M fue menos efectivo que  $10^{-5}$  M).

La respuesta positiva, por cuanto a la RVG, de los ovocitos de *P. sterna* al ser tratados con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  y  $\text{NH}_4\text{OH}$  abre la posibilidad de estudiar con más detalle el proceso de maduración y fecundación *in vitro* de esta especie. Además, dado que se había dado un desarrollo aparentemente normal hasta larvas "D", este sencillo método podría ser útil en intentos de repoblación de áreas sobreexplotadas o de producción de adultos en cultivo.

Algunos estudios en cuanto al efecto de las sales de amonio durante la maduración de ovocitos indican que es principalmente el aumento de pH intracelular, el que ocasiona la RVG, como son los casos reportados para *Patella vulgata* (Guerrier *et al.*, 1986; Vilain *et al.*, 1991), *Limaria hakodatensis* (Deguchi y Osanai, 1993) y *Lottia gigantea* (Gould *et al.*, 2001), de manera que el estudio de los niveles de pH intracelular de los ovocitos de *P. sterna*, al ser tratados con amonio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  o  $\text{NH}_4\text{OH}$ ), podría aclarar las causas de la maduración.

Adicionalmente se ha visto que hay un aumento en el pH intracelular durante la maduración con serotonina de los ovocitos de *C. gigas* (Kyojuka *et al.*, 1997), *R. philippinarum* (Guerrier *et al.*, 1993) y *H. flaccida* (Deguchi y Osanai, 1995). La RVG por efecto del  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (sin serotonina) también se presenta en estas dos últimas especies (Guerrier *et al.*, 1993 y Deguchi y Osanai, 1995, respectivamente), pero no fue probado en *C. gigas* (tabla 1). De lo anterior podemos suponer que la maduración de los ovocitos de *P. sterna* y de *C. gigas* difieren en cuanto al tipo de inductor (hormona) que estimula la RVG, aunque en ambas especies se requiera el aumento del pH intracelular.

El aumento del pH intracelular requerido para la RVG también se observa en la almeja *Macra chinensis* (Deguchi y Osanai, 1994) y el equiroideo *Urechis caupo* (Gould y Stephano, 1993) donde la fecundación es el estímulo. Por otro lado, la RVG inducida por 1-metiladenina en la estrella de mar (Peaucellier *et al.*, 1988) y por la progesterona en el anfibio *Xenopus laevis* (Lee y Steinhardt, 1981) no requiere de un aumento en el pH intracelular. Aunque se conoce que la activación de la proteína cinasa cdk-ciclina (factor promotor de la metafase) es necesaria para la RVG en todas las especies estudiadas (revisado por Stephano, 1993), no se sabe como está involucrado el aumento del pH intracelular en las especies que lo requieren (ver discusión en Stephano y Gould, 1997).

### Agradecimientos

Agradecemos a José Manuel Ornelas Orozco por su ayuda en el laboratorio. Los ejemplares de *Pteria sterna* fueron gentilmente proporcionados por Luis García Pámanes y los de *Crassostrea gigas* por Jesús Antonio Sesma y Carlos Loyola

a common stimulus for GVBD, although the hormone that causes the increase may not be the same.

Increased intracellular pH has also been shown to be required for GVBD in oocytes of the clam *Macra chinensis* (Deguchi and Osanai, 1994) and the echiuroid *Urechis caupo* (Gould and Stephano, 1993), in which fertilization is the stimulus. On the other hand, a pH increase is not required for GVBD induced by 1-methyladenine in starfish (Peaucellier *et al.*, 1988), or by progesterone in the amphibian *Xenopus laevis* (Lee and Steinhardt, 1981). Although activation of the protein kinase cdk-cyclin (metaphase promoting factor) is known to be required for GVBD in all species that have been studied (reviewed by Stephano, 1993), it is not known how pH affects this activation in species that require intracellular alkalization for GVBD (see discussion in Stephano and Gould, 1997).

### Acknowledgments

We thank José Manuel Ornelas Orozco for his help in the laboratory. *Pteria sterna* organisms were kindly supplied by Luis García Pámanes and *Crassostrea gigas* were by Jesús Antonio Sesma and Carlos Loyola Sánchez (Litoral de Baja California). The work was partially supported by CONACyT 35219-N and the UABC.

English translation by the authors.

Sánchez (Litoral de Baja California). El trabajo fue parcialmente apoyado por CONACyT 35219-N y la UABC.

### Referencias

- Allen, R.D. (1953). Fertilization and activation in the egg of the surf clam, *Spisula solidissima*. Biol. Bull., 105: 213–239.
- Alvarado-Alvarez, R., Gould, M.C. and Stephano, J.L. (1996). Spawning, *in vitro* maturation, and changes in oocyte electrophysiology induced by serotonin in *Tivela stultorum*. Biol. Bull., 190: 322–328.
- Brassard M., Ducholier, H. y Guerrier, P. (1988). Intracellular pH change does not appear as a prerequisite for triggering activation of *Barnea candida* (Mollusca, Pelecypoda) oocytes. Gamete Res., 20: 42–52.
- Deguchi, R. y Osanai, K. (1993). Artificial induction of meiosis reinitiation from the first prophase and from the first metaphase in the oocytes of the marine bivalve *Limaria hakodatensis*. Bull. Mar. Biol. Stn. Asamuchi Tōhoku Univ., 19: 29–38.
- Deguchi, R. y Osanai, K. (1994). Meiosis reinitiation from the first prophase is dependent on the levels of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  and pH in the oocytes of the bivalves *Macra chinensis* and *Limaria hakodatensis*. Dev. Biol. 166: 587–599.
- Deguchi, R. and Osanai, K. (1995). Serotonin-induced meiosis reinitiation from the first prophase and the first metaphase in the oocytes of the marine bivalve *Hiattella flaccida*: Respective changes in the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  and pH. Dev. Biol., 171: 483–496.

- Giloh, H. and Sadat, J.W. (1982). Fluorescence microscopy: Reduced photobleaching of rhodamine and fluorescein protein conjugates by n-propyl gallate. *Science*, 217: 1252–1255.
- Gobet, I., Durocher, Y., Leclerc, C., Moreau, M. and Guerrier, P. (1994). Reception and transduction of the serotonin signal responsible for meiosis reinitiation in oocytes of the Japanese clam *Ruditapes philippinarum*. *Dev. Biol.*, 164: 540–549.
- Gould, M.C. and Stephano, J.L. (1993). Nuclear and cytoplasmic pH increase at fertilization in *Urechis caupo*. *Dev. Biol.*, 159: 608–617.
- Gould, M.C., Stephano, J.L., Ortíz-Barrón, B.J. and Pérez-Quezada, I. (2001). Maturation and fertilization in *Lottia gigantea* oocytes: Intracellular pH, Ca<sup>2+</sup>, and electrophysiology. *J. Exptl. Zool.*, 290: 411–420.
- Guerrier, P., Brassard, M., David, C. and Moreau, M. (1986). Sequential control of meiosis reinitiation by pH and Ca<sup>2+</sup> in oocytes of the prosobranch mollusk *Patella vulgata*. *Dev. Biol.*, 114: 315–324.
- Guerrier P., Leclerc-David, C. and Moreau, M. (1993). Evidence for the involvement of internal calcium stores during serotonin-induced meiosis reinitiation of oocytes of the bivalve mollusc *Ruditapes philippinarum*. *Dev. Biol.*, 159: 478–484.
- Kyozuka, K., Deguchi, R., Yoshida, N. and Yamashita, M.. (1997). Change in 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.
- Lee, S.C. and Steinhardt, R.A. (1981). pH changes associated with meiotic maturation in oocytes of *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.*, 85: 358–369.
- Osanai, K. (1985). *In vitro* induction of germinal vesicle breakdown in oyster oocytes. *Bull. Mar. Biol. Stn. Asamuchi Tōhoku Univ.*, 18: 37–43.
- Osanai K. and Kuraishi, R. (1988). Reponse of oocytes to meiosis-inducing agents in *pelecypods*, *Bull. Mar. Biol. Stn. Asamuchi Tōhoku Univ.*, 18: 45–56.
- Peaucellier, G., Picard, A., Robert, J-J., Labbé, J.C., and Dorée, M. (1988). Phosphorylation of ribosomal proteins during meiotic maturation and following activation of starfish oocytes: Its relationship with changes in intracellular pH. *Exp. Cell. Res.*, 174: 71–88.
- Stephano, J.L. and Gould, M.C. (1997). Parthenogenesis in *Urechis caupo* (Echiura) II. Role of intracellular pH in parthenogenesis induction. *Develop. Growth Differ.*, 39: 99–104.
- Stephano, J.L. (1993). El factor promotor de la fase-M y el control de la división celular. *Ciencia*, 44: 305–322.
- Vilain, J-P., Rodeau, J-L. and Gaillard, S. (1991). Fluorescent probe measurement of intracellular pH during meiosis reinitiation by ammonia in oocytes of the mollusc *Patella vulgata*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 104A: 479–482.