

<https://doi.org/10.15517/rev.biol.trop.2022.50805>

Proporción sexual y hermafroditismo del molusco, *Anadara tuberculosa* (Bivalvia: Arcidae) en Panamá

Yolani A. Robles P.¹  <https://orcid.org/0000-0003-4140-9235>

Angel Javier Vega^{1, 2*};  <https://orcid.org/0000-0002-9535-3348>

Leisy del Carmen Díaz³;  <https://orcid.org/0000-0002-7704-5851>

1. Centro de Capacitación, Investigación y Monitoreo de la Biodiversidad en el Parque Nacional Coiba, Universidad de Panamá (CCIMBIO-Coiba-UP), Santiago de Veraguas, República de Panamá; yolany.robles@up.ac.pa, angel.vega@up.ac.pa (*Correspondencia)
2. Estación Científica Coiba (Coiba-AIP), Clayton, Panamá, República de Panamá.
3. Programa de Maestría en Ecología y Manejo de Zonas Costeras, Universidad de Panamá, República de Panamá; leysi_di@hotmail.com

Recibido 20-IV-2022. Corregido 15-VII-2022. Aceptado 07-X-2022.

ABSTRACT

Sexual proportion and hermaphroditism of the mollusc, *Anadara tuberculosa* (Bivalvia: Arcidae) in Panama

Introduction: The bivalve *Anadara tuberculosa* is an important fishery in the Eastern Tropical Pacific. The sex ratio varies along its geographic range and there are cases of hermaphroditism, occasional in some populations, normal in others. These characteristics may be a response to anthropogenic and environmental pressure.

Objective: To evaluate sex ratio and hermaphroditism of the species in the Panamanian Pacific.

Methods: Data on reproductive features of *A. tuberculosa* generated between 1994 and 2020 for Gulf of Montijo, as well as 2017 data from mangroves of David was analyzed. Macroscopic diagnosis of individual sex is sensitive to the problem of indeterminate individuals, which in turn can skew the sex ratio analysis; therefore, the macroscopic method was compared with histological sections to generate a correction factor to adjust the macroscopically determined sex ratio.

Results: For Montijo, histology indicated that the female to male sex ratio ranged from 1:1 to 3.2:1 between 1994 and 2017, while macroscopy indicated 1.9:1 to 5.1:1 between 2004 and 2020. For David, histology indicated a ratio of 3.7:1, and macroscopy 7.9:1. At both localities, larger specimens had more sex ratio variation, independently of the technique, and there was non-casual protandric hermaphroditism in 2017.

Conclusion: The occurrence of protandric hermaphroditism and sex ratio changes suggest anthropogenic and environmental pressure in all populations.

Key words: black cockles; Gulf of Chiriquí; mangroves; protandry.

RESUMEN

Introducción: El bivalvo *Anadara tuberculosa* es un recurso pesquero y económico importante en el Pacífico Este Tropical. La proporción sexual varía a lo largo de su área de distribución, con casos de aparición de hermafroditismo, ocasional para algunas poblaciones, normal en otras. Estas características podrían ser una respuesta a presiones antropogénicas y ambientales.

Objetivo: Evaluar la proporción sexual y el hermafroditismo en la especie en el Pacífico de Panamá.



Métodos: Se analizó información reproductiva de *A. tuberculosa* generada entre 1994 y 2020 para el Golfo de Montijo, así como datos de 2017 para el manglar de David. Se aplicaron procedimientos macroscópicos, contrastados con histológicos y se generó un factor de corrección para ajustar la proporción sexual macroscópica, debido al efecto, sobre la proporción sexual, que ocasiona los organismos indeterminados.

Resultados: Para el Golfo de Montijo, la histología indicó una proporción sexual hembra a macho de 1:1 hasta 3.2:1, entre 1994 y 2017, mientras que la macroscopía varió de 1.9:1 a 5.1:1 entre 2004 y 2020. Para el manglar de David, la histología indicó una proporción sexual de 3.7:1, y de 7.9:1 por macroscopía en el 2017. En ambas localidades, especímenes más grandes mostraron mayor variación en la proporción sexual, pese a la técnica implementada, así como hermafroditismo protándrico no casual en el 2017.

Conclusiones: La aparición del hermafroditismo protándrico y los cambios en la proporción sexual indican que la población de *A. tuberculosa*, en ambas localidades, está respondiendo a presiones antropogénicas y ambientales.

Palabras claves: concha negra; Golfo de Chiriquí; manglares; protandria.

INTRODUCCIÓN

La concha negra, *Anadara tuberculosa* (Sowerby, 1833), es un molusco bivalvo de la familia Arcidae, cuya área de distribución abarca desde Baja California, en México, hasta la Bahía de Tumbes, en el norte de Perú (Keen, 1971; MacKenzie, 2001).

La reproducción de *A. tuberculosa* es continua, con picos variables en dependencia de la localidad y condiciones ambientales, tales como temperatura, lluvias, salinidad y disponibilidad de alimento (García-Domínguez et al., 2008; Lucero-Rincón et al., 2013; Romo-Piñera et al., 2015). A pesar de alcanzar tallas cercanas a los 10 cm de longitud total (Vega et al., 2021), se ha reportado para Colombia que los organismos maduran a partir de los 25 mm (Borda & Cruz, 2004), machos desde 18.87 mm y hembras desde 27.70 mm (Lucero et al., 2012) y 20.18 mm (Lucero-Rincón et al., 2013). En Costa Rica, la madurez sexual inicia entre 23.2 y 26.2 mm (Ampie & Cruz, 1989), mientras que en Panamá maduran a partir de los 32 mm (Guilbert, 2007).

En Colombia, *A. tuberculosa* alcanza la talla media reproductiva poblacional (L_{50}) a los 44 mm en Tumaco (Borda & Cruz, 2004), 39.5 mm y 43.5 mm, en diferentes localidades del Pacífico (Lucero et al., 2012; Lucero-Rincón et al., 2013); en Ecuador, Santa Martha, 41.61 mm para machos y 42.98 para hembras (Pantavélez et al., 2020) y en Santo Domingo, México, 36.5 mm (Pérez-Medina, 2005).

Proporción sexual a favor de las hembras ha sido reportada en Isla de las Perlas, Pacífico de Panamá, 3.5H:1M (Guilbert, 2007), en la Reserva de Manglar al Noreste de Ecuador, 2.6H:1M (Flores & Lincadeo, 2010), Pacífico colombiano, 2.46H:1M (Lucero-Rincón et al., 2013; Lucero-Rincón et al., 2021), en Baja California, 2.09H:1M hasta 9H:1M (Romo-Piñera et al., 2015) y en Tumbes, Perú, 1.6:1 (Alemán et al., 2019) y 1.4H:1M (Ordinola et al., 2020). En contraste, la proporción sexual 1H:1M se ha reportado en El Conchalito, México (Pérez-Medina, 2005), en Costa Rica, localidades de Puntarenas (Cruz, 1982; Cruz, 1984), Térraba-Sierpe (Vega, 1994), Golfo Dulce (Silva & Bonilla, 2001; Silva-Benavides & Bonilla, 2015).

Cambios en la proporción sexual a favor de las hembras, de forma progresiva en el tiempo, se ha reportado para Perú, en el 2013 y 2014, con una proporción de 1:1 (Alemán et al., 2014; Alemán et al., 2017); mientras que en el 2019 y 2020, se reportó una proporción a favor de las hembras, aunque no en todas las localidades muestreadas (Alemán et al., 2019; Ordinola et al., 2020). En contraste, en Golfo Dulce, Costa Rica, la proporción sexual se ha mantenido 1:1, entre 2001 y 2015 (Silva & Bonilla, 2001; Silva-Benavides & Bonilla, 2015).

Para México, la relación proporción sexual-tallas se mantuvo 1H:1M, para tallas entre 36 mm y 80 mm de longitud total (LT) (Pérez-Medina, 2005). Sin embargo, para *A. anticuata*, en Tanzania, se reportó cambios en

la proporción sexual asociada al incremento de las tallas, convirtiéndose en significativa la diferencia sobre los 41 mm de LT, para análisis realizados entre los 10 mm y 70 mm de LT (Mzighani, 2005).

El hermafroditismo más común en los moluscos bivalvos es protándrico (Afiati, 2007; Mzighani 2005), condición que ha sido reportada para *A. tuberculosa* (Lucero-Rincón et al., 2013; Lucero-Rincón et al., 2021; Panta Vélez et al., 2020; Pérez-Medina, 2005); *A. antiquata* y *A. granosa* (Afiati, 2007) y *A. similis* (Manjarres-Villamil et al., 2013). Según estos autores, el hermafroditismo se puede identificar por diferencias en la proporción de sexos a favor de las hembras, hembras de mayor talla, presencia de ovocitos y espermatozoides funcionales, así como la predominancia del tejido gonadal femenino sobre el masculino.

En *A. tuberculosa* se ha reportado hermafroditismo casual en México y Ecuador, con frecuencia de aparición de esta condición de 0.98 % (N = 205) (Pérez-Medina, 2005) y 1.14 % (N = 394) (Panta-Vélez et al., 2020). Sin embargo, para Colombia se obtuvo 3.1 % (N = 290), considerada como un comportamiento normal, probablemente causada por factores endógenos o exógenos como temperatura, salinidad y nutrientes (Lucero-Rincón et al., 2013; Lucero-Rincón et al., 2021).

Cambios en la proporción sexual y el hermafroditismo pueden indicar desbalance en las poblaciones, en respuesta a cambios de factores naturales o antropogénicos (Panta-Vélez et al., 2020), y en el caso de *A. tuberculosa*, la tendencia observada, en algunas localidades de su área de distribución, ha sido a la aparición del hermafroditismo acompañado de cambios en la proporción sexual (Lucero-Rincón et al., 2013; Lucero-Rincón et al., 2021; Panta-Vélez et al., 2020; Pérez-Medina, 2005) y cambios en la proporción sexual a favor de las hembras sin hermafroditismo (Flores & Lincadeo, 2010; Guilbert, 2007; Ordinola et al., 2019, Ordinola et al., 2020; Romo-Piñera et al., 2015).

La estimación de la proporción sexual está asociada a la correcta identificación del sexo. En este sentido, estudios reproductivos en

Anadara spp. reportan con frecuencia la condición de organismos indeterminados, donde no se puede reconocer el sexo macroscópicamente, creando incertidumbre sobre el efecto que puede producir esta condición en la interpretación de los datos, sobre todo si existe proporción sexual a favor de uno u otro sexo. Por ejemplo, Flores y Licandeo (2010) indican que, de 1 997 especímenes, 333 fueron indeterminadas, sin distinguir entre *A. tuberculosa* (N = 1 273) y *A. similis* (N = 428). Panta-Vélez et al. (2020), reportan 20 % de organismos indeterminados en *A. tuberculosa* (N = 711), mientras que Manjarres-Villamil et al. (2013) observaron un 32.85 % en *A. similis* (N = 347).

El presente estudio tuvo por objetivo evaluar la proporción sexual, la presencia de hermafroditismos y el efecto de la presencia de organismos indeterminados sobre la proporción sexual, en *Anadara tuberculosa*, contrastando metodologías histológica y macroscópica, en organismos recolectados en Manglares de David y el Golfo de Montijo, Pacífico de Panamá.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitios de muestreo: Golfo de Montijo (GM): Es un Humedal de importancia internacional (Sitio Ramsar), ubicado bajo las coordenadas 7°56'4" N & 81°17'33" W; 7°59'30" N & 81°1'40" W; 7°38'20" N & 80°58'40" W y 7°36'29" N & 81° 13' 37" W (Ministerio de Ambiente, 2016). Los manglares y los bosques de Ciénaga constituyen 313 km², de los cuales 279 km² pertenecen a los manglares ubicados frente a un litoral costero con una superficie de 534.9 km² (Cámara et al., 2004) (Fig. 1).

Manglares de David (MD): Declarada área protegida a través del Decreto Municipal 21 del 6 de junio de 2007, por medio del cual se adoptaron disposiciones para la protección del ambiente y los manglares en las costas del distrito de David. Se ubica entre las coordenadas 8°22'47" N & 82°26'50" W; 8°20'09" N & 82°12'56" W; 8°13'49" N & 82°19'12" W y 8°17'19" N & 82°28'49" W. En esta zona

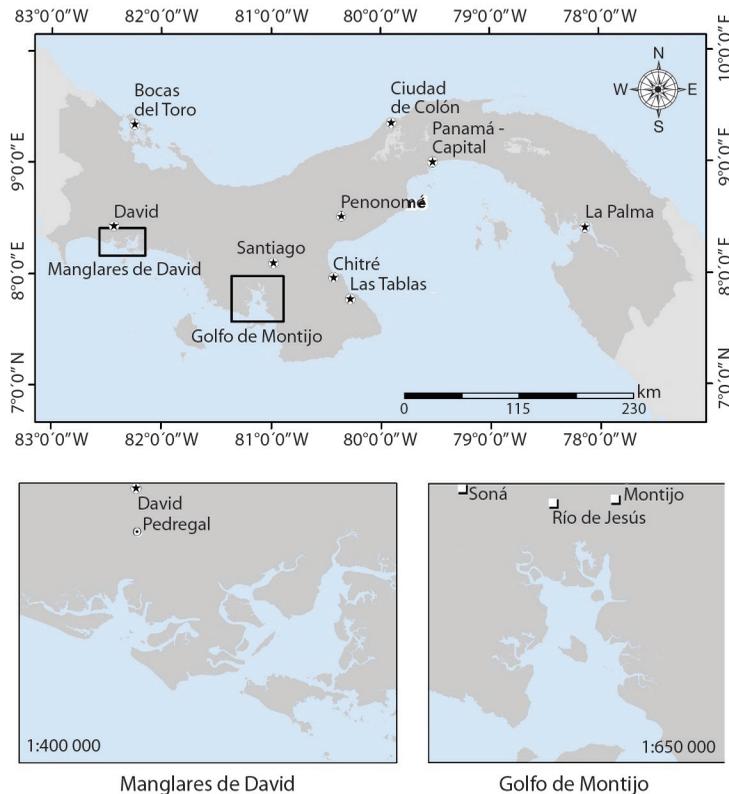


Fig. 1. Zona de estudio, Golfo de Montijo (GM) y Manglares de David (MD), Panamá. / **Fig. 1.** Study zone within the Montijo Gulf (GM) and mangroves of David (MD), Panama.

desembocan diferentes ríos, como el Platanal que forma el principal estero en puerto Pedregal y los ríos Chico y Chorchá. También desembocan otros ríos de mayor caudal, como David y Chiriquí (Díaz del Olmo et al., 2004) (Fig. 1).

Metodología de análisis: Macroscopía:

Entre marzo de 2016 y febrero de 2017, se recolectaron mensualmente y al azar, entre 80 y 140 ejemplares de *Anadara tuberculosa* procedentes de las capturas manuales de los extractores de concha en MD y GM, las cuales se midieron en su longitud total (LT) con un calibrador Vernier de 0.01 mm de precisión. A cada ejemplar se le realizaron cortes transversales y longitudinales para la evaluación de la gónada, identificar el sexo según su color, naranja para hembras y blanco a crema

en machos, así como el estadio de desarrollo reproductivo, según porcentaje de cobertura de la gónada con relación a la masa visceral y su color (Borda & Cruz, 2004; Lucero-Rincón et al., 2013). Este mismo procedimiento se aplicó entre junio de 2019 y marzo de 2020 a ejemplares recolectados en el GM. Adicionalmente, se revisó información no publicada de muestreos realizados en 2004, 2013 y 2015 para el GM.

Histología: Entre marzo de 2016 y febrero de 2017, se recolectaron mensualmente, en MD y GM, 30 organismos adultos con tallas entre 50 y 55 mm de LT, a los cuales se le identificó el sexo y estadio de desarrollo gonadal, aplicando la misma metodología descrita en el apartado de macroscopía (Borda & Cruz, 2004; Lucero-Rincón et al., 2013), para posteriormente extraerle una sección transversal, a

nivel de gónada, la cual se fijó durante 24 horas con Formaldehído - Ácido Acético - Cloruro de Calcio (F.A.A.C.C.) (Samoilys & Roelofs, 2000) y se procesó hasta obtener placas con cortes histológicos de 3 μ , teñidas con hematoxilina y eosina (Howard & Smith, 1983). Cada placa se revisó y se fotografió utilizando un microscopio Seegera con cámara digital, en los objetivos 4x y 10x y se verificó el sexo y la condición de desarrollo gonadal, según los criterios de Lucero-Rincón et al. (2013) y Manjarres-Villamil et al. (2013), que consideran el desarrollo de las células sexuales y las características de los folículos y túbulos seminíferos para definir el estadio de desarrollo gonadal.

En el mismo periodo se recolectaron ejemplares con tallas inferiores a 40 mm de longitud total en MD y GM, a los cuales se les aplicó la misma metodología de procesamiento histológico para identificar la condición sexual y la talla de inicio de la actividad reproductiva (Manjarres-Villamil, et al., 2013).

Análisis de los datos: debido a la aparición de individuos indeterminados en los análisis macroscópicos (no se observó la gónada) y su efecto en el cálculo de la proporción sexual, se procedió a generar una metodología para comparar las estimaciones de proporción sexual por procedimientos macroscópicos e histológicos y, en caso de existir diferencias en la misma, generar un factor de corrección para tratar de igualar ambas estimaciones, como se detalla a continuación:

- Los individuos indeterminados macroscópicamente se verificaron a través de cortes histológicos (Lucero-Rincón et al., 2013), para ubicarlos como machos, hembras o hermafroditas. Esto permitió establecer, del total de indeterminados, que porcentaje correspondía a machos, hembras o hermafroditas.
- Se contabilizaron los individuos clasificados como indeterminados por procedimientos macroscópicos y se multiplicó este valor por el aporte porcentual de machos, hembras y hermafroditas estimado en el

paso anterior, para calcular, del total de indeterminados, cuantos correspondían a cada condición.

- La cantidad estimada de machos, hembras y hermafroditas se sumó a la obtenida de cada condición por procedimiento macroscópico y se calculó una proporción sexual ajustada dividiendo la cantidad de hembras por la cantidad de machos.
- Al final se obtuvo una proporción sexual macroscópica, una histología y una tercera ajustada, las cuales se compararon para evaluar la utilidad del factor de corrección.

Para evaluar la variación temporal de la proporción sexual, se analizaron datos macroscópicos para el GM de 2004, 2013, 2015, 2017 y 2020 y se corroboró el resultado, por el análisis placas histológicas de 1994 y se compararon con las obtenidas en 2017. También se realizó un análisis de la proporción macroscópica por clases de tallas, con intervalos de 5 mm, a los ejemplares recolectados en el 2017 para ambas localidades. Para determinar si la proporción sexual era diferente de la esperada (1:1) se aplicó la prueba de X^2 para un $\alpha = 0.05$ (Zar, 2009).

RESULTADOS

Proporción sexual: por macroscopía, en el 2017, se estimó una proporción sexual a favor de las hembras, tanto en el GM (6.2H:1M) como en MD (7.9H:1M), lo cual fue confirmado por análisis histológico, tanto para el GM (3.2H:1M) como en MD (3.7H:1M). Por su parte, para el GM se encontró que la proporción sexual presentó variación temporal, ya que, por análisis macroscópico, pasó de 1.9H:1M en el 2004 a 5.1H:1M en el 2020 y por histología varió de 1H: 1M en 1994 a 3.2H:1M en el 2017 (Tabla 1).

Similar a lo observado en el análisis temporal, la proporción sexual varió de acuerdo con las tallas analizadas. Tanto en MD (LT 26.20 - 92.90 mm) como en el GM (LT 31.60 - 81.90 mm) se observó una proporción sexual a favor de las hembras a medida que aumentaron



TABLA 1 / TABLE 1

Variación de la proporción sexual (H:M) en *Anadara tuberculosa* capturadas en el Golfo de Montijo y Manglares de David analizados en diferentes años y localidades a través de metodología macroscópica e histológica. / Sex ratio (F:M) variation in *Anadara tuberculosa* from the Montijo Gulf and mangroves of David analyzed from different years and localities through macroscopic and histological techniques.

Loc.	año	Histológica			Macroscópica			
		(H:M)	N	LT (mm)	(H:M)	I	N	LT (mm)
GM	1994	1:1	360	45-55				
GM	2004				1.9:1*		192	45-55
GM	2013				2.6:1*	2	322	30.0-82.7
GM	2015				3.0:1*	71	604	35-79.3
GM	2017	3.2:1*	360	50-55	6.2:1*	179	1 376	26.2-92.9
GM	2017	1.1:1	24	20.2-40				
MD	2017	3.7:1*	361	50-55	7.9:1*	195	1 382	31.6-81.9
MD	2017	0.9:1	28	17.6-40.7				
GM	2020				5.1:1*	111	1 222	26.0-96.0

*diferencias significativas, I: indeterminados. / *significant differences, I: undetermined.

las tallas (Fig. 2), lo que se corroboró por análisis histológico, donde para ejemplares capturados en el GM, con tallas entre 20.2 y 40 mm (Media = 31.11, DE = 5.72, N = 24) y en MD, tallas entre 17.6 y 40.7 mm (Media = 28.51, DE = 6.42, N = 28), se estimó una proporción de 1H:1M, mientras que, para ejemplares entre 50 y 55 mm, tanto para el GM (Media = 52.65, DE = 1.88, N = 360) como para MD (Media = 52.38, DE = 1.87, N = 360) la proporción sexual fue a favor de las hembras (Tabla 1).

Aunque en ambos ecosistemas se determinó proporción sexual a favor de las hembras, la diferencia radicó en que las estimaciones macroscópicas resultaron más amplias que las histológicas (Tabla 1), definido por la existencia de organismos indeterminados en los análisis macroscópicos. Para el GM, se identificaron 30 ejemplares indeterminados a través de macroscopía, los cuales, al aplicarle a los mismos individuos procesamiento histológico, resultaron 63.3 % machos, 33.3 % hembras y 3.3 % indeterminados, y para MD, de los 58 ejemplares indeterminados, resultaron 55.2 % machos, 29.3 % hembras y 15.5 % hermafroditas. Esto implica que los individuos catalogados como indeterminados por procedimientos macroscópicos, más del 55 % resultaron machos en ambas localidades (Tabla 2).

Mediante análisis macroscópicos se identificaron 179 indeterminados (N = 1 376) para GM y 194 (N = 1 382) para MD. En ambos casos se multiplicó los indeterminados por los porcentajes asignados por análisis histológicos y, al resultado estimado, se le sumó la cantidad de ejemplares machos, hembras y hermafroditas obtenidos por macroscopía, para calcular una proporción sexual ajustada de 3.9H:M en GM y 4.6H:M, para MD, muy similares a las estimadas por histología (Tabla 2).

Hermafroditismo: Para el GM, el primer antecedente para evaluar la presencia de hermafroditismo corresponde a preparaciones histológicas de 360 individuos (LT de 45.00 a 55.00 mm), recolectados en 1994, las cuales fueron reevaluadas, sin encontrar evidencias de hermafroditismo. En el 2017, mediante observaciones macroscópicas, se determinó por primera vez hermafroditismo en dos ejemplares de 49.60 y 51.70 mm de LT, para un rango de tallas analizadas de 31.6 a 81.9 mm de LT, lo cual fue corroborado por análisis histológico, donde se observó la presencia de esta condición en 14 individuos (3.9 %), para tallas de 50.0 a 55.0 mm de LT. En el 2020 se identificó, por macroscopía, la presencia de hermafroditismo

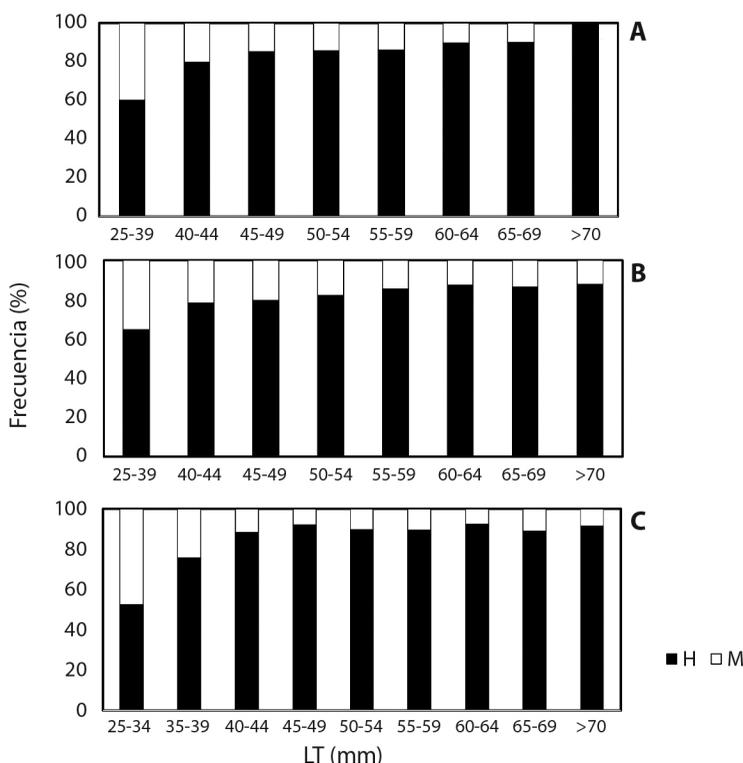


Fig. 2. Variación en la proporción sexual en *Anadara tuberculosa* capturadas en el Golfo de Montijo (GM) y Manglares de David (MD). A: GM 2017, B: GM 2020, C: MD 2017. / **Fig. 2.** Sex ratio variation in *Anadara tuberculosa* from the Montijo Gulf and mangroves of David. A: GM 2017, B: GM 2020, C: MD 2017.

en nueve ejemplares (0.74 %) en el rango de tallas de 26.0 a 97.0 mm (Fig. 3, Tabla 3).

En MD se observó en 2017, por macroscopía, siete ejemplares hermafroditas (0.51 %) para tallas entre 26.2 y 92.9 mm, mientras que por histología se identificaron 48 individuos (13.3 %) para tallas entre 50.0 y 55.0 mm de LT. En ambas localidades, por histología se determinó como dominante el tejido femenino (50 %) y el desove simultaneo en más del 75 % de los casos (Tabla 3).

DISCUSIÓN

La paridad de sexos (1H:1M) en *Anadara tuberculosa* ha sido reportada para diferentes localidades de Costa Rica (Cruz, 1984; Silva & Bonilla, 2001; Vega, 1994) y México (Pérez-Medina, 2005), contrario a lo reportado

para Perú (Ordinola et al., 2019), Colombia (Lucero-Rincón et al., 2013) y Ecuador (Flores & Licandeo, 2010), donde se presentó dominancia de hembras sobre machos. En el caso de Ecuador, se sugiere que las variaciones en la proporción sexual están relacionadas a hermafroditismo protándrico.

En Panamá, la concha negra ha sido estudiada desde 1994 en el GM, cuando se determinó una proporción sexual 1:1 (Rodríguez & González, 1995), resultado que se confirmó en 2006 (Jordán & Gómez, 2006). Si embargo en el 2004, 2013, 2015, 2017 y 2020, se encontró un desbalance en la proporción sexual a favor de las hembras, situación que coincide con los reportado por Guilbert (2007), para esta especie, en el Archipiélago de las Perlas, Pacífico panameño y el presente estudio, en MD; así como para otras especies del género *Anadara*:

TABLA 2 / TABLE 2

Proporción sexual en *Anadara tuberculosa* obtenida por tres metodologías: observación macroscópica, observación microscópica (placas histológicas) y ajustada, combinando ambas metodologías. / Sex ratio in *Anadara tuberculosa* determined by three methodologies: macroscopic observation, microscopic observation (Histological sections), and adjusted diagnostic (combining both methodologies).

Estadio Histología	Golfo de Montijo								
	CC1	%	IMA	CC2	EM	T	PMaA	PMa	PHi
H	10	33.3	179.0	59.7	1 035.0	1 094.7	3.9:1	6.2:1	3.2:1
M	19	63.3	179.0	113.4	166.0	279.4			
I	1	3.3	179.0	6.0	49.0	55.0			
HF	0.0	0.0	179.0	0.0	2.0	2.0			
	30.0	100.0							
Manglares de David									
H	17	29.3	194.0	56.9	1 042.0	1 098.9	4.6:1	7.9:1	3.7:1
M	32.0	55.2	194.0	107.0	132.0	239.0			
I	0.0	0.0	194.0	0.0					
HF	9.0	15.5	194.0	30.1	7.0	37.1			
	58.0	100.0							

CC1: Condición sexual corregida por histología a partir de ejemplares catalogados como indeterminados por análisis macroscópicos; IMA: Cantidad de ejemplares identificados como indeterminados por análisis macroscópicos; CC2: Cantidad de ejemplares catalogados por categoría (H: hembras, M: machos, I: indeterminados, HF: hermafroditas) como resultado de multiplicar el porcentaje ajustado por histología por la cantidad de indeterminado por análisis macroscópicos; EM: Cantidad de ejemplares ubicados en cada categoría por análisis macroscópicos; T: Total obtenido para cada categoría al sumar CC2 + EM; PMaA: Proporción sexual macroscópica ajustada combinando metodología macro e histológica; PMa: Proporción sexual estimada por análisis macroscópico; PHi: proporción sexual estimada por análisis histológico. / CC1: Corrected sexual condition by histology from catalogued simples as undetermined by macroscopic analysis; IMA: Quantity of samples identified as undetermined by macroscopic analysis; CC2: Quantity of simples by category (H: Females, M: Male, I: Undetermined, HF: hermaphrodites) as a result from the multiplication of the adjusted percentage by histology, by the amount of undetermined by the macroscopic analysis; EM: Quantity of simples located in each category by macroscopic analysis; T: Total obtained for each category when adding CC2 + EM; PMaA: Macroscopic sexual proportion adjusted by combining the macro and histological methodologies; PMa: Estimated sexual proportion by macroscopic analysis; PHi: Estimated sexual proportion by histological analysis.

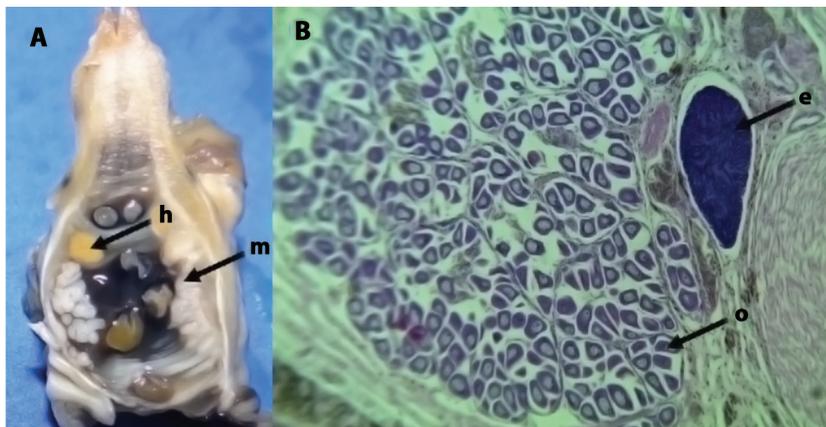


Fig. 3. *Anadara tuberculosa* hermafrodita. **A.** Corte trasversal a nivel de gónada, **B.** Microfotografía (100x). h: Gónada femenina, m: Gónada masculina, e: Espermatozoides, o: ovocitos. / **Fig. 3.** *Anadara tuberculosa* hermaphrodite. **A.** Transverse section at the level of the gonad; **B.** Photomicrography (100x). h: female gonad, m: male gonad, e: Spermatozooids; o: Oocytes.

TABLA 3 / TABLE 3

Descripción de la condición de la gónada en organismos hermafroditas en *Anadara tuberculosa* según método de análisis, tallas y porcentaje de cobertura de la condición masculina y femenina. / Gonad condition in hermaphroditic in *Anadara tuberculosa* individuals according to the method of analysis, sizes, and percentage of coverage of the male and female condition.

Loc.	Año	HM	%	Método	N	LT (mm)	Observaciones
GM	1994	0	0	Histológico	360	45.0-55.0	Se analizaron placas procesadas en 1994.
	2017	14	3.9	Histológico	360	50.0-55.0	85.7 % desove en ambos sexos. 14.3 % maduración en curso en ambos sexos. 50 % dominó el tejido femenino, en el 14.3 % masculino y en el 35.7 % fue similar.
	2017	2	0.19	Macroscópico	1 035	31.6-81.9	Mayor volumen de tejido femenino.
	2020	9	0.74	Macroscópico	1 222	26.0-97.0	Presencia de gónada de ambos sexos y mayor volumen de tejido femenino.
MD	2017	7	0.51	Macroscópico	1 376	26.2-92.9	Presencia de gónadas de ambos sexos, con predominancia de tejido femenino.
	2017	48	13.3	Histológico	361	50.0-55.0	77 % desove en ambos sexos. 23 % desove en uno de los sexos y madurez en curso en el otro. 54 % dominó tejido femenino, 12.5 % tejido masculino y en 33.5 % similar para ambos sexos

A. antiquata (Jahangir et al., 2014; Mzighani, 2005), *A. scapha* (Baron, 1992) y *A. similis* (Flores & Licandeo, 2010; Manjarres-Villamil et al., 2013).

Guilbert (2007), explicó la superioridad numérica de las hembras con base en dos posibles hipótesis: la primera, por el efecto que podrían ejercer las propiedades fisicoquímicas del agua que favorecen el desarrollo de las hembras o interfieren en el desarrollo de los machos, sin mayores evidencias de cuáles son estos factores, y la segunda, en una distribución diferencial de machos y hembras, por lo cual los machos podrían ser más difíciles de capturar. Esta última hipótesis contrasta con lo reportado por Vega et al. (2021), para el GM y MD, en un análisis de tallas y densidades para concha negra donde señalan que para los muestreos se recorrieron ampliamente los manglares y el patrón de distribución de machos y hembras fue similar en ambos ecosistemas.

El incremento en la proporción de hembras observado en GM y MD coincide con la disminución de las densidades poblacionales en ambas localidades, debido a la presión pesquera a la que ha estado sometido este recurso (Vega

et al., 2021), lo cual coincide con lo expuesto por Romo-Piñera et al. (2009), en *Megapitaria Squalida* y Breton et al. (2018), en una revisión sobre bivalvos, al plantear que es una estrategia para garantizar la reproducción de la especie. En este sentido, Dalpé et al. (2022), reportaron que en organismos sésiles (*Crassostrea gigas*), el hecho de estar agregados o no, incide sobre el cambio de sexo, y la proporción sexual, resultando que machos solitarios se convirtieron en hembras con más frecuencia que los gregarios (Yasuoka & Yusa, 2016), con lo que se podría interpretar que la disminución de las densidades puede tener un efecto similar.

Una de las razones de cambios en la proporción sexual es la protandria (Flores & Licandeo, 2010). Para GM y MD se evidenció que *A. tuberculosa* presentó diferencias en la proporción de sexos a favor de las hembras y en ejemplares hermafroditas, se presentó ovocitos y espermatozoides funcionales, así como predominancia del tejido gonadal femenino sobre el masculino y machos con maduración a menores tallas que las hembras, lo que es indicio de hermafroditismo protándrico, como lo indican Lucero-Rincón et al. (2013) y



Lucero-Rincón et al., (2021), en *A. tuberculosa*; Afiati (2007) en *A. antiquata* y *A. granosa* y Manjarrés-Villamil et al. (2013) en *A. similis*.

El presente trabajo es el primer reporte de hermafroditismo en *A. tuberculosa* para Panamá, condición que ha sido documentada previamente en México (Pérez-Medina, 2005), en el Pacífico colombiano (Lucero-Rincón et al., 2013; Lucero-Rincón et al., 2021), Ecuador (Pante-Vélez et al., 2020), así como en otras especies del género: *A. antiquata*, *A. granosa* (Afiati, 2007) y *A. similis* (Manjarrés-Villamil et al., 2013).

Los porcentajes de hermafroditismo observados por procedimientos histológicos en MD fue de 13.3 % (N = 361) y en el GM de 3.9 % (N = 360), de los más altos reportados para *A. tuberculosa*. Estudios realizados por Pérez-Medina (2005) y Panta-Vélez et al. (2020), señalan que es un evento casual, debido a la baja incidencia de la condición; sin embargo, Lucero-Rincón et al. (2021), lo describen como un proceso intrínseco a la especie, no casual, en función de su aparición en casi todos los sitios de muestreo y lo atribuyen a factores intrínsecos o extrínsecos, como la temperatura, nutrición o salinidad. Para el GM, se puede confirmar que la aparición del hermafroditismo es un evento relativamente nuevo, con la certeza de que no estaba presente en 1994, y que su aparición estuvo acompañada de cambios en la proporción sexual a favor de las hembras y la disminución de las densidades de *A. tuberculosa* (Vega et al., 2021), por lo que lo catalogamos como un evento intrínseco a la especie, como lo indica Lucero-Rincón et al. (2021), asociado a una respuesta de la población de concha negra a la disminución de las densidades, lo cual coincide con lo reportado por Romo-Piñera et al. (2009) para *Megapitaria squalida* en Baja California, y Breton et al. (2018), en una revisión sobre bivalvos.

Un factor no considerado en organismos con proporción sexual diferencial es el efecto del aporte de los indeterminados al estimado de esta. Es así como, estudios macroscópicos con resultados en la proporción sexuales a favor de las hembras, en *A. tuberculosa* y *A. similis*,

han reportado porcentajes importante de individuos indeterminados como por ejemplo, Cruz (1984) en Costa Rica, quien comunicó un porcentaje promedio de 13.84 % con un máximo del 42 % (N= 1 094), Flores & Licandeo (2010), en Ecuador, con 16.67% (N= 1 997) y Manjarrés-Villamil et al. (2013), en Colombia, con 32.85 % (N= 347), lo que implica que puede existir un sesgo en las estimaciones de la proporción sexual.

En el presente trabajo, el sesgo salió a relucir al realizar evaluaciones histológicas y macroscópicas de los mismos individuos, con lo cual se presentaron dos proporciones sexuales, una macroscópica y otra histológica, donde la primera resultó superior a la segunda, por lo que se generó un factor de corrección, basado en la frecuencia de sexos obtenida mediante la validación histológica de los ejemplares indeterminados macroscópicamente, con lo cual la proporción macroscópica ajustada se acercó a la obtenida a partir de la estimación histológica, tanto en el GM, como en MD, convirtiéndose en una alternativa para ajustar la proporción sexual cuando se hacen evaluaciones macroscópicas y existen desbalance a favor de las hembras.

Futuras investigaciones deben apuntar a confirmar la talla del cambio de sexo de la especie y tratar de identificar los factores responsables de la disminución de las densidades (Vega et al., 2021), y su relación con los cambios en la proporción sexual y el hermafroditismo, para lo cual se deben considerar los análisis histológicos por intervalos de tallas (Flores & Licandeo, 2010), así como los múltiples factores identificados como desencadenantes de estos procesos: situaciones de estrés, mecanismos inestables de determinación del sexo, factores ambientales o nutricionales y la contaminación, que puede actuar como disruptor endocrino afectando el desarrollo reproductivo (Afiati, 2007; Breton et al., 2018; Mzighani, 2005), e inclusive la plasticidad genotípica de la especie, que provoca diferentes respuestas en función de las presiones antropogénicas o ambientales a las que está sometida (Yasuoka & Yusa, 2016).

En ausencia de monitoreo ambiental, el estado de salud de las poblaciones de bivalvos y el conocimiento de la historia de vida de especies particulares, incluyendo la pérdida de la capacidad reproductiva, puede ser un indicador de alteraciones ambientales (Breton et al., 2018), donde los estudios de los factores que definen el sexo son útiles para reflejar la salud de los ecosistemas (Campos et al., 2012). Es así como, en *Tegillarca granosa*, después de 30 días de exposición a metales pesados (Cu, Zn, Pb y Cd), todos mostraron efectos significativos en la proporción de sexos, aumentando la cantidad de machos, además de reducir los valores del Índice Gonadosomático (Liu et al., 2014), y en Nicaragua se encontró que *A. tuberculosa* y *Larkinia grandis* tienen la capacidad de bioacumular metales en sus tejidos, por lo que recomiendan su uso como especies centinelas en los ecosistemas de manglares del Pacífico americano (Aguirre-Rubí et al., 2019).

En conclusión, *Anadara tuberculosa*, en el GM y MD, ha experimentado cambios en indicadores poblacionales, como la proporción y la condición sexual (aparición del hermafroditismo), asociado a reportes de disminución importantes de las densidades, acompañado de la existencia de tallas grandes (Vega et al., 2021). Estos indicadores reflejan que las poblaciones de la concha negra, en ambos ecosistemas de manglar, están sometidas a estresores que desencadenaron cambios en las poblaciones, sin claridad sobre las causas que originan esos cambios, por lo que es importante dirigir investigaciones hacia la identificación de los factores, naturales o antropogénicos, que puedan estar afectando, ya sea a la población adulta o las fases tempranas del desarrollo del molusco, como puede ser la contaminación ambiental o la sobrepesca del recurso.

Declaración de ética: los autores declaran que todos están de acuerdo con esta publicación y que han hecho aportes que justifican su autoría; que no hay conflicto de interés de ningún tipo; y que han cumplido con todos los requisitos y procedimientos éticos y legales pertinentes. Todas las fuentes de financiamiento

se detallan plena y claramente en la sección de agradecimientos. El respectivo documento legal firmado se encuentra en los archivos de la revista.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece el apoyo financiero de la Secretaría Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación de Panamá (SENACYT), a la Universidad de Panamá, a Conservación Internacional con el apoyo de la iniciativa Blue Action Fund y a la fundación Marviva por el apoyo dado a los proyectos que contribuyeron a generar la información para esta publicación. A los extractores de concha negra de Manglares de David y Golfo de Montijo por el apoyo en las recolectas.

REFERENCIAS

- Afiati, N. (2007). Hermaphroditism in *Anadara granosa* (L.) and *Anadara antiquata* (L.) (Bivalvia: Arcidae) from central Java. *Journal of Coastal Development*, 10(3), 171–179.
- Aguirre-Rubí, J. R., Ortiz-Zarragoitia, M., Izagirre, U., Etxebarria, N., Espinoza, F., & Marigómez, I. (2019). Prospective biomonitor and sentinel bivalve species for pollution monitoring and ecosystem health disturbance assessment in mangrove-lined Nicaraguan coasts. *Science of the Total Environment*, 649, 186–200.
- Alemán, S., Montero, P., & Ordinola, E. (2014). *Prospección bioecológica de los recursos concha negra Anadara tuberculosa* (Sowerby, 1833) y *concha huequera Anadara similis* (C.B. Adams, 1852) en los manglares de Tumbes. 06 al 10 de noviembre 2013. Instituto del Mar del Perú.
- Alemán, S., Ordinola, E., & Montero, P. (2019). Concha negra *Anadara tuberculosa* (Sowerby, 1833) y concha huequera *Anadara similis* (C.B. Adams, 1852) en los manglares de Tumbes, Julio 2016. *Instituto del Mar del Perú*, 46(2), 279–292.
- Alemán, S., Montero, P., Ordinola, E., & Vera, M. (2017). Prospección bioecológica del recurso concha negra *Anadara tuberculosa* (Sowerby, 1833) y concha huequera *Anadara similis* (C.B. Adams, 1852) en los manglares de Tumbes, Primavera 2014. *Instituto del Mar del Perú*, 44(3), 371–384.



- Ampie, C. L., & Cruz, R. A. (1989). Tamaño y madurez sexual de *Anadara tuberculosa* (Bivalvia) en Costa Rica. *Brenesia*, 31, 21–24.
- Baron, J. (1992). Reproductive cycles of the bivalve molluscs *Atactodea striata* (Gmelin), *Gafrarium tumidum* Röding and *Anadara scapha* (L.) in New Caledonia. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research*, 43, 393–402.
- Borda, C., & Cruz, R. (2004). Reproducción y reclutamiento del molusco *Anadara tuberculosa* (Sowerby, 1833) en el Pacífico colombiano. *Revista de Investigaciones Marinas*, 25(3), 185–195.
- Breton, S., Capt, C., Guerra, D., & Stewart, D. (2018). Sex-Determining Mechanisms in Bivalves. In J. L. Leonard (Ed.), *Transitions Between Sexual Systems: Understanding the Mechanisms of, and Pathways Between, Dioecy, Hermaphroditism and Other Sexual Systems* (pp. 165–192). Springer International Publishing.
- Cámara, A. R., Díaz Olmo, F., Martínez, J. R., Morón Monge, M. C., Gómez-Ponce, C., Tabares, E., & Vega, A. J. (2004). *Directrices de gestión para la conservación y desarrollo integral de un humedal centroamericano: Golfo de Montijo (Litoral del Pacífico de Panamá)*. Autoridad Nacional del Ambiente-Agencia Española de Cooperación Internacional.
- Campos, A., Tedesco, S., Vasconcelos, V., & Cristóbal, S. (2012). Proteomic research in bivalves: Towards the identification of molecular markers of aquatic pollution. *Journal of Proteomics*, 75(14), 4346–4359.
- Cruz, R. A. (1982). Variación mensual del índice de condición del molusco en *Anadara tuberculosa* (Pelecypoda: Arcidae) de Punta Morales, Puntarenas, Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, 30(1), 1–4.
- Cruz, R. A. (1984). Algunos aspectos de la reproducción en *Anadara tuberculosa* (Pelecypoda: Arcidae) de Punta Morales, Puntarenas, Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, 31(1), 45–50.
- Dalpé, A., Lalonde-Larue, A., Choquette, T., Cimmino, J., Leroux, É., Leung, C., Stewar, T., Angers, B., & Breton, S. (2022). The influence of environmental conditions on sex determination in the blue mussel *Mytilus edulis*. *ICES Journal of Marine Science*, 79(2), 394–402.
- Díaz del Olmo, F., Cámara-Artigas, R., & Martínez-Batlle, J. R. (2004). *Directrices y recomendaciones para el uso y gestión sostenible de los manglares de Chiriquí (República de Panamá)*. Autoridad Nacional del Ambiente-Agencia Española de Cooperación Internacional.
- Flores, L., & Licandeo, R. (2010). Size composition and sex ratio of *Anadara tuberculosa* and *Anadara similis* in a mangrove reserve from the northwest of Ecuador. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 45(3), 541–546.
- García-Domínguez, F. A., De Haro-Hernández, A., García-Cuellar, A., Villalejo-Fuerte, M., & Rodríguez-Astudillo, S. (2008). Ciclo reproductivo de *Anadara tuberculosa* (Sowerby, 1833) (Arcidae) en Bahía Magdalena, México. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 43(1), 143–152.
- Guilbert, A. (2007). *State of the Anadara tuberculosa (Bivalvia: Arcidae) fishery in Las Perlas Archipiélago, Panama* (Tesis de Maestría). Heriot-Watt University, Reino Unido.
- Howard, D. W., & Smith, C. S. (1983). *Histologic techniques for marine bivalve mollusks*. US Dept. Commerce, NOAA Tech Memo NMFS-F/NEC-25.
- Jahangir, S., Siddiqui, G., & Ayub, Z. (2014). Temporal variation in the reproductive pattern of blood cockle *Anadara antiquata* from Pakistan (northern Arabian Sea). *Turkish Journal of Zoology*, 38(3), 263–272.
- Jordán, L. Y., & Gómez, J. A. (2006). Evaluación biológica de *Anadara tuberculosa*, Golfo de Montijo, República de Panamá. *Tecnociencia*, 8(2), 191–205.
- Keen, A. M. (1971). *Sea shells of tropical West America* (2nd Ed.). Stanford University Press.
- Liu, G. X., Shu, M. A., Chai, X. L., Shao, Y. Q., Wu, H. X., Sun, C. S., & Yang, S. B. (2014). Effect of chronic sublethal exposure of major heavy metals on filtration rate, sex ratio, and gonad development of a bivalve species. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 92(1), 71–74.
- Lucero-Rincón, C. H., Cantera Kintz, J. R., & Gil-Agudelo, D. L. (2021). Hermaphroditism of bivalves *Anadara tuberculosa* and *Anadara similis* Sowerby 1883 (Arcidae) in Colombian Pacific mangroves. *Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras-INVEMAR*, 50(1), 163–170.
- Lucero-Rincón, C. H., Cantera, K., Jaime, R., Gil-Agudelo, D. L., Muñoz, O., Zapata, L. A., Cortés, N., Gualteros, W. O., & Manjarres, A. (2013). Spatio-temporal analysis of the reproductive biology and recruitment of the bivalve mollusks *Anadara tuberculosa* in the Colombian Pacific coast. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 48(2), 321–334.
- Lucero, C., Cantera, J., & Neira, R. (2012). Pesquería y crecimiento de la piangua (Arcoida: Arcidae) *Anadara tuberculosa* en la Bahía de Málaga del Pacífico colombiano, 2005-2007. *Revista de Biología Tropical*, 60(1), 203–217.
- Mackenzie, C. (2001). The Fisheries for Mangrove Cockles, *Anadara* spp., from Mexico to Peru, with Descriptions of their Habitats and Biology, the Fishermen's Lives, and the Effects of Shrimp Farming. *Marine Fisheries Review*, 63(1), 1–39.

- Manjarres-Villamil, A. E., Lucero-Rincón, C. H., Gualteros, W. O., Cantera-Kintz, J. R., & Gil-Agudelo, D. L. (2013). Abundancia y madurez sexual de *Anadara similis* en el manglar de Luisico, Bahía Málaga, Pacífico Colombiano. *Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras-INVEMAR*, 42(2), 215–231.
- Ministerio de Ambiente (25 de enero de 2016). Resolución de la Dirección de Áreas Protegidas y Vida Silvestre por la cual se establecen los límites del área protegida Humedal Golfo de Montijo. Gaceta Oficial Digital 27972 del 19 de febrero de 2016.
- Mzighani, S. (2005). Fecundity and population structure of cockles, *Anadara antiquata* L. 1758 (Bivalvia: Arcidae) from a sandy/muddy beach near Dar es Salaam, Tanzania. *Western Indian Ocean Journal of Marine Science*, 4(1), 77–84.
- Ordinola, E., Alemán, S., & Montero, P. (2020). Concha negra *Anadara tuberculosa* (Sowerby, 1833) y concha huequera *Anadara similis* (C.B. Adams, 1852) en los manglares de Tumbes, Setiembre 2018. *Instituto Mar de Perú*, 47(1), 141–158.
- Ordinola, E., Alemán, S., Inga, C., Vera, M., & Llanos, J. (2019). Sinopsis biológica, poblacional y pesquera de *Anadara tuberculosa* (Sowerby, 1833) y *Anadara similis* (C. B. Adams, 1852) en los manglares de Tumbes: 1995-2015. *Boletín Instituto Mar del Perú*, 34(1), 223–264.
- Panta-Vélez, R. P., Bermúdez-Medranda, A., Mero, P., Arrieche, D., & Acosta-Balbás, V. (2020). Reproductive Cycle of *Anadara tuberculosa* (Sowerby, 1833) (Bivalvia: Arcidae) in a Mangrove System of the Chone River Estuary, Ecuador. *Advances in Environmental Biology*, 14(2), 1–11.
- Pérez-Medina, D. R. (2005). *Biología reproductiva de Anadara tuberculosa* (Bivalvia: Arcidae) en el estero Santo Domingo, BCS, México (Tesis de doctorado). Instituto Politécnico Nacional, México.
- Rodríguez, G. M., & González, F. M. (1995). *Evaluación de algunos aspectos de la biología de Anadara tuberculosa* (Bivalvia: Arcidae) en el manglar de Diáfara, Mariato-Veraguas, Panamá (Tesis de licenciatura). Universidad de Panamá, Panamá.
- Romo-Piñera, A., García-Domínguez, F., & Félix-Pico, E. (2015). Reproductive aspects of mangrove bivalve mollusks in Baja California Sur. In R. Riosmena, A. González-Acosta, & R. Muñiz-Salazar (Eds.), *The arid mangrove forest from Baja California Peninsula* (pp. 61–80). Nova Science Publishers.
- Romo-Piñera, A., Ceballos-Vázquez, B. P., García-Domínguez, F., & Arellano-Martínez, M. (2009). Unusual high frequency of hermaphroditism in the gonochoric bivalve *Megapitaria Squalida* (Sowerby, 1835) (Veneridae). *Journal of Shellfish Research*, 28(4), 785–789.
- Samoilys, M. A., & Roelofs, A. (1997). *Defining the Reproductive Biology of a Large Serranid: Plectropomus leopardus*. CRC Reef Research Centre.
- Silva, A., & Bonilla, R. (2001). Abundancia y morfometría de *Anadara tuberculosa* y *A. similis* (Mollusca: Bivalvia) en el manglar de Purruja, Golfo Dulce, Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, 49(2), 315–320.
- Silva-Benavides, A., & Bonilla, R. (2015). Estructura de la población y distribución de *Anadara tuberculosa* Sowerby (1833) (Mollusca: Bivalvia) en los manglares de Golfito y Playa Blanca de Puerto Jiménez, Golfo Dulce, Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, 63(1), 287–298.
- Vega, A. J. (1994). *Estructura de la población, rendimiento y épocas reproductivas de Anadara spp. (Bivalvia: Arcidae) en la Reserva Forestal Térraba-Sierpe, Puntarenas Costa Rica con recomendaciones para su manejo* (Tesis de Maestría). Universidad de Costa Rica, Costa Rica.
- Vega, A. J., Robles, Y. A., Alvarado, O., & Cedeño-Mitre, C. (2021). Estructura de tallas, distribución y abundancia de *Anadara tuberculosa* (Bivalvia: Arcidae) en dos sistemas de manglar del Pacífico de Panamá. *Revista de Biología Tropical*, 69(2), 422–433.
- Yasuoka, N., & Yusa, Y. (2016). Effects of size and gregariousness on individual sex in a natural population of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Journal of Molluscan Studies*, 82(4), 485–491.
- Zar, J. H. (2009). *Biostatistical Analysis*. Prentice Hall.