



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar

“Evaluación de Diferentes Regímenes de Alimentación para el
Acondicionamiento Reproductivo de la Ostra Nativa
Crassostrea iridescens (Hanley, 1854)”

TESIS DE GRADO

Previa a la obtención del Título de:

INGENIERO EN ACUICULTURA

Presentada por:

Henry Alejandro Marín Solórzano

GUAYAQUIL-ECUADOR

Año 2011

AGRADECIMIENTOS

Al todopoderoso, a mis padres Mercy y Walter a mis hermanos Walter, y Mercedes.

A Diana Vélez.

A todo el personal del Centro de Acuicultura e Investigaciones Marinas “Edgar Arellano”.

A mis profesores de ESPOL, en especial a Marcelo Muñoz, Ph. D., Alba Calles, Ph. D. Víctor Osorio M. Sc. y Jerry Landivar M. Sc.

DEDICATORIA

A Dios por darme la vida

A mis padres Walter y Mercy, por sus
esfuerzos invaluable

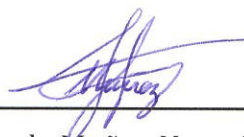
Y en especial a mi Abuelo Alci (+)

TRIBUNAL DE GRADUACION



M.Sc. Jerry Landívar Zambrano

PRESIDENTE



Marcelo Muñoz Naranjo, Ph.D

DIRECTOR



M.Sc. Víctor Osorio Cevallos

MIEMBRO PRINCIPAL

DECLARACIÓN EXPRESA

“La responsabilidad del contenido de esta Tesis de Grado, me corresponden exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL”

(Reglamento de graduación de la ESPOL)

Henry Alejandro Marín Solórzano

RESUMEN

La calidad de alimento suministrada en las dietas y la temperatura durante el acondicionamiento reproductivo de los moluscos bivalvos, afectan directamente en la madurez gonadal. El objetivo del presente estudio fue evaluar distintos regímenes de alimentación para el acondicionamiento de reproductores de la especie *Crassostrea iridescens*, en seis tratamientos cada uno con seis réplicas durante 30 y 60 días de acondicionamiento. Tres tratamientos: CHA (*Chaetoceros gracilis* 100%), TETRA (*Tetraselmis maculata* 100%), CIT (*C. gracilis* 33% + *Isochrysis galbana* 33% + *T. maculata* 33%) y uno sin alimentar (SIN) fueron realizados en el condiciones controladas de laboratorio (19.61 ± 0.87 °C y oxígeno disuelto de 7.26 ± 0.65 mg.L⁻¹).

El quinto tratamiento (EST) se mantuvo en el reservorio de la Estación Experimental de CENAIM-ESPOL (27.02 ± 1.63 °C y oxígeno disuelto de 5.54 ± 1.88 mg.L⁻¹). El sexto tratamiento (MAR) fue extraído del lugar de origen mensualmente (20.00 ± 1.00 °C y clorofila *a* de 7.56 ± 0.99 µg.L⁻¹).

Se realizaron cortes histológicos para conocer los estadios de madurez gonadal antes y después de la depuración. De igual forma se analizó los

estadios gonadales a los 30 y 60 días de acondicionamiento en todos los tratamientos evaluados.

A los 30 días de acondicionamiento el tratamiento EST (canal reservorio) presentó el mayor avance de madurez gonadal con 34% en estadio 3 (madurez definida). Mientras que los tratamientos CHA y TETRA mantenidos en el laboratorio, registraron 17% de organismos en estadio 3. El tratamiento sin alimentación (SIN) registró 33 % en estadio 2 (desarrollo tardío) a pesar de no percibir alimento. Los tratamientos CIT (mezcla) y MAR registraron 66% y 17% de organismo en estadio 2, respectivamente. Los pesos promedios registrados en los tratamientos evaluados en condiciones controladas no presentaron una relación directa con el desarrollo gonadal observado en los cortes histológicos. Sin embargo, el aumento de peso registrado en el tratamiento EST ($10,78 \pm 8,07$ g) y el desarrollo de sus gónadas (34% en estadio 3) suponen la existencia de una relación en ambos.

Posterior a los 60 días de acondicionamiento los organismos presentaron una reabsorción de sus gametos demostrada por la regresión ocurrida en los estadios gonadales con más del 50% de organismos en estadio 0 (indiferenciado). De igual forma se observó a los 102 días en el tratamiento TETRA registrando 80% de organismos en estadio 0. Esta reabsorción o atresia de los gametos no desovados, indicaría que la reabsorción de los gametos es un paso indispensable para la limpieza y reinicio de un ciclo reproductivo.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
RESUMEN.....	I
ÍNDICE GENERAL.....	III
ABREVIATURAS.....	VII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IX
ÍNDICE DE TABLAS.....	XI
INTRODUCCIÓN.....	1

CAPÍTULO 1

1. ANTECEDENTES.....	
.....4	
1.1.IMPORTANCIA DE LOS MOLUSCOS MARINOS EN EL ECUADOR.....	4
1.2. BIOLOGÍA DE LA ESPECIE	7
1.2.1. Distribución geográfica.....	7
1.2.2. Clasificación taxonómica.....	7

1.2.3. Morfología de las valvas.....	8
1.2.4. Anatomía de <i>Crassostrea iridescens</i>	9
1.2.5. Mecanismo de Filtración de los Moluscos Bivalvos.....	11
1.2.6. Mecanismo de Alimentación.....	12
1.2.7. Reproducción.....	14
1.2.7.1. Desarrollo y ciclo gonadal.....	15
1.3. ACONDICIONAMIENTO REPRODUCTIVO.....	16
1.3.1. Temperatura.....	17
1.3.2. Salinidad.....	17
1.3.3. Alimentación.....	18
1.3.3.1. Requerimiento de proteínas.....	19
1.3.3.2. Requerimiento de lípidos.....	20
1.3.3.3. Requerimiento de carbohidratos.....	21
1.3.3.4. Requerimiento de micronutrientes.....	23
1.4. MICROALGAS.....	24
1.4.1. Valor nutricional de las microalgas.....	24
1.4.1.1. <i>Chaetoceros</i> sp.....	24
1.4.1.2. <i>Isochrysis</i> sp.....	25
1.4.1.3. <i>Tetraselmis</i> sp.....	25
1.4.2. Composición bioquímica de las microalgas	26

CAPÍTULO 2

2. MATERIALES Y MÉTODOS	28
2.1. LUGAR DE ESTUDIO.....	28
2.1.1. Lugar de extracción.....	29
2.2. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	29
2.3. ACONDICIONAMIENTO DE REPRODUCTORES.....	30
2.3.1. Proceso de depuración.....	30
2.3.2. Manejo de los reproductores <i>C. iridescens</i>	31
2.4. CORTES HISTOLÓGICOS	35
2.4.1. Preparación de los cortes histológicos.....	35
2.4.2. Determinación de la condición gametogénica.....	36

CAPÍTULO 3

3. RESULTADOS	38
3.1. ACONDICIONAMIENTO DE REPRODUCTORES.....	38
3.1.1. Proceso de depuración.....	38
3.1.2. Parámetros físico-químicos.....	39
3.1.3. Análisis cuantitativo y cualitativo de las microalgas presentes en el canal reservorio.....	40

3.1.4. Monitoreo de peso de reproductores <i>C. iridescens</i>	41
3.2. ANÁLISIS DE LOS CORTES HISTOLÓGICOS	43
3.2.1. Acondicionamiento a los 30 días.....	48
3.2.2. Acondicionamiento a los 60 días.....	49
3.2.3. Acondicionamiento a los 102 días.....	50
3.3. FRECUENCIA DE SEXOS.....	51
3.4. ÍNDICES GONÁDICOS (IGS).....	53
4. DISCUSIÓN	56
CONCLUSIONES.....	63
RECOMENDACIONES.....	65

BIBLIOGRAFÍA

ANEXOS

LISTA DE ABREVIATURAS

10X	Aumentado 10 veces
°C	Grados Celcius
µm	Micrómetro (Micra)
µg	Microgramo
AA	Ácido araquidónico
Ca ²⁺	Ión Calcio
cel	Células
CENAIM-ESPOL	Centro Nacional de Investigaciones Marinas y Acuicultura "Edgar Arellano"
cm	Centímetro
d	Día
DHA	Ácido docosahexaenoico
EPA	Ácido eicosapentaenoico
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación
g	Gramo
h	Hora
IGS	Índices Gonádicos
L	Litro

Lat	Latitud
Long	Longitud
m	Metro
mg	Miligramo
mL	Mililitro
mm	Milímetro
O	Oeste
ppt	Partes por mil
PUFA	Polyunsaturated fatty acids
S	Sur
TM	Tonelada Métrica

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1	Ejemplar de <i>C. iridescens</i>9
Figura 2	Diagrama del sistema digestivo de <i>C. iridescens</i>10
Figura 3	Mecanismo de alimentación y dirección de las partículas alimenticias.....12
Figura 4	Ubicación del CENAIM-ESPOL, estación experimental y lugar de extracción de las ostras.....29
Figura 5	Set experimental N#3 CENAIM-ESPOL con la distribución aleatoria de los recipientes de vidrio utilizados para acondicionar reproductores de <i>C. iridescens</i>32
Figura 6	Pearl net con reproductores de <i>C. iridescens</i> colocados en el canal reservorio de la estación experimental de CENAIM- ESPOL.....33
Figura 7	Mantenimiento de reproductores.....34
Figura 8	Realización de las placas histológicas.....35
Figura 9	Desarrollo gonadal de <i>C. iridescens</i> antes y después de la depuración..... 39
Figura 10	Microalgas presentes en el canal reservorio de la estación experimental CENAIM-ESPOL.....41

Figura 11	Monitoreo de peso promedio de <i>C. iridescens</i> , en los distintos tratamientos evaluados durante la experimentación.....	42
Figura 12	Cortes Histológicos de <i>C .iridescens</i> , indiferenciado (estadio 0) (Transversal 4 μ m, 10X).....	43
Figura 13	Cortes Histológicos de <i>C. iridescens</i> , macho. Microfotografías de las fases de Desarrollo Gonadal (Transversal 4 μ m, 10X).....	44
Figura 14	Cortes Histológicos de <i>C. iridescens</i> , hembra. Microfotografías de las fases de Desarrollo Gonadal (Transversal 4 μ m, 10X).....	45
Figura 15	Microfotografías de los cortes histológicos en distintos tratamientos a los 30 y 60 días de acondicionamiento de reproductores de <i>C. iridescens</i> . (Cortes transversales 4 μ m, 10x).....	47
Figura 16	Desarrollo gonadal a los 30 días de acondicionamiento.....	48
Figura 17	Desarrollo gonadal a los 60 días de acondicionamiento.....	49
Figura 18	Desarrollo gonadal a los 102 días de acondicionamiento.....	50
Figura 19	Frecuencia de sexos antes y después de la depuración.....	51
Figura 20	Frecuencia de sexos a los 30 días de acondicionamiento.....	52
Figura 21	Frecuencia de sexos a los 60 días de acondicionamiento.....	53

ÍNDICE DE TABLAS

Pág.

Tabla I	Composición bioquímica de las microalgas evaluadas durante el acondicionamiento de reproductores de <i>C. iridescens</i> ...27
Tabla II	Tratamientos evaluados en el presente estudio: set experimental N# 3 CENAIM-ESPOL (CHA, TETRA, CIT, SIN), Canal Reservorio de la estación Experimental de CENAIM-ESPOL (EST) y extracción en bancos naturales (MAR).....30
Tabla III	Cuadro comparativo de los distintos estadios de madurez gonadal utilizados en la especie <i>C. iridescens</i>37
Tabla IV	Promedio diarios (\pm desviación estándar) de temperatura y oxígeno disuelto de los tratamientos con reproductores de <i>C. iridescens</i>39
Tabla V	Análisis de Clorofila <i>a</i> realizados en el lugar de extracción (Tratamiento MAR, Ayangue) durante el periodo de acondicionamiento.....40
Tabla VI	Índices gonadales promedio por sexo.....55

INTRODUCCIÓN

El ostión de roca u ostra nativa (*Crassostrea iridescens*) es un molusco bivalvo presente en la zona costera del Ecuador y su extracción es de importancia económica y alimenticia para un número importante de pescadores artesanales. Este recurso es apreciado en la gastronomía por su carne y en la industria camaronera como alimento para reproductores, además sus valvas sirven para la fabricación de artesanías. En la actualidad es escaso el conocimiento del volumen de extracción de esta especie. Sin embargo, el reducido tamaño de los ejemplares capturados y su escasa presencia en el medio, hacen suponer que estos organismos se encuentran en una situación de riesgo (*com. per.*).

Como estrategia para reducir la captura de especies nativas, el gobierno ecuatoriano ha adoptado medidas para su conservación mediante la

implementación de vedas (paro biológico) como en el caso de *Spondylus* spp., según Acuerdo Ministerial N° 136 ⁽¹⁾. Por otro lado, el Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas “Edgar Arellano” (CENAIM-ESPOL) en conjunto con la empresa privada ha impulsado un proyecto para el cultivo de moluscos (*Crassostrea gigas*) en mar abierto con el fin de mitigar el efecto de la extracción de *C. iridescens* en bancos naturales, permitiendo además generar ingresos económicos para un grupo de buzos artesanales de la comuna La Entrada ⁽²⁾. De igual forma, se podría contribuir con la conservación de estos bivalvos implementando tecnologías para la producción continua de semillas en condiciones controladas ⁽³⁾.

Para iniciar la producción de cualquier especie en cautiverio, se requiere acondicionar reproductores con el fin de revisar los principales aspectos como: la biología de la especie, parámetros de cultivo, respuesta al manejo en condiciones controladas y especialmente la alimentación para alcanzar su completo desarrollo gonadal ⁽⁴⁾. Las microalgas son el principal alimento en el cultivo de bivalvos marinos durante sus etapas de desarrollo ⁽⁵⁾, por lo que es primordial encontrar la mejor calidad nutricional para el acondicionamiento de reproductores en función del tamaño de la célula, digestibilidad, producción de toxinas y composición bioquímica, esta última presenta diferencias en sus distintos componentes como son las proteínas entre 12-35%, lípidos 7,2-23% y carbohidratos 4,6-23% expresados en peso seco ⁽⁶⁾.

Las microalgas más utilizadas en el acondicionamiento de reproductores de bivalvos marinos son: *Chaetoceros gracilis*, *Isochrysis galbana*, *Tetraselmis* sp., *Dunaliella tertiolecta*, y *Thalassiosira pseudonana* (2, 6, 7, 8). CENAIM-ESPOL tiene la capacidad de producir diariamente 10 toneladas métricas (TM) de microalgas, de las cuales se utilizan dos especies para la producción de bivalvos marinos: *C. gracilis* e *I. galbana*. Estas dos especies son las más utilizadas debido a sus aportes de ácidos grasos esenciales fundamentales para importantes procesos biológicos, principalmente en especies marinas (6). Sin embargo, en CENAIM-ESPOL se reportan producciones inestables en los cultivos masivos de *I. galbana*, probablemente debido a altas temperaturas (>25°C) que registra el agua durante la estación cálida (9).

El objetivo de esta investigación fue evaluar distintos regímenes de alimentación para el acondicionamiento de reproductores de la especie *C. iridescens*, basándose en la disponibilidad de microalgas presentes en CENAIM-ESPOL, con el fin de obtener estadios de madurez avanzados.

CAPÍTULO 1

1 ANTECEDENTES

1.1. IMPORTANCIA DE LOS MOLUSCOS MARINOS EN EL ECUADOR

Los primeros cultivos de moluscos bivalvos en Ecuador se iniciaron en el año 1990 con la creación del Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas “Edgar Arellano” (CENAIM-ESPOL), utilizando la especie foránea *Crassostrea gigas*, con reproductores introducidos de Chile ⁽¹⁰⁾.

A través de constantes investigaciones con el fin de obtener semillas de moluscos en laboratorio, se logró en el mismo centro producir en el año 2002, la especie *Argopecten circularis* ⁽¹¹⁾ y cinco años después se obtuvieron las primeras semillas de *Spondylus princeps* ⁽¹²⁾. Ambas especies tienen gran valor comercial en los mercados internacionales e importancia cultural y socioeconómica en nuestro país ⁽¹⁰⁾.

Las producciones de acuicultura de peces y crustáceos en Ecuador, llegaron a 171.020 TM en el año 2007 ⁽¹³⁾. Sin embargo, no existen estadísticas puntuales de producciones de moluscos bivalvos cultivados, solamente se han registrado 20,2 toneladas que corresponden a la exportación de moluscos capturados y procesados, generando ingresos por 122.580 dólares ⁽¹⁴⁾.

A pesar de que los moluscos bivalvos no constituyen un rubro importante en los ingresos económicos de nuestro país, poseen otros aspectos que son de vital importancia, en los que se mencionan:

1. El ecológico, en donde las valvas permiten la existencia de una variada fauna epibiótica (poliquetos, micro crustáceos, ofiuros y variadas especies de esponjas) ⁽³⁾.
2. La riqueza histórica, en la que siglos atrás las valvas de ciertas especies como *S. princeps* y *S. calcifer* formaron parte esencial en los intercambios comerciales entre los pueblos

precolombinos como Valdivia, Manteño, Machalilla y los Incas principalmente, debido a que simbolizaban belleza, prestigio y riqueza ⁽³⁾.

3. El económico, en donde actualmente la recolección de bivalvos forma parte de los ingresos económicos de las comunidades costeras del Ecuador, por tal motivo la extracción desmesurada ha llevado a colocarlas en situación de riesgo a muchas especies incluyendo a *C. iridescens* (*com. per*).

Como una forma de buscar alternativas a la extracción de especies nativas, CENAIM-ESPOL ha incentivado proyectos como el policultivo de *C. gigas* con *Litopenaeus vannamei* en estanques camaroneros ⁽¹⁰⁾ obteniendo resultados alentadores. Así mismo, se han desarrollado capacitaciones técnicas y transferencia de tecnología para la maricultura de *C. gigas* a un grupo de buzos artesanales de la comuna La Entrada en la provincia de Santa Elena ⁽²⁾.

1.2. BIOLOGÍA DE LA ESPECIE

1.2.1. Distribución Geográfica

La especie *C. iridescens* ha sido reportada desde el Golfo de California hasta el Norte de Perú. En nuestro país se encuentra en las costas de Esmeraldas, Manta, Puerto Cayo, Machalilla, Salango, Palmar, Playas y Data de Posorja ⁽¹⁵⁾.

Esta especie habita en costas rocosas expuestas a influencias directas del mar abierto, formando densos bancos entre el tercio inferior de la línea intermareal hasta 7 metros de profundidad e inclusive se la ha encontrado hasta 79 m de profundidad ⁽¹⁵⁾.

1.2.2. Clasificación Taxonómica

La clasificación de las ostras se lleva a cabo exclusivamente por los caracteres morfológicos desde la época de Linnaeus (1758). Sin embargo, dichos caracteres resultan insuficientes para identificar todas las diferencias y afinidades. Diversos autores como Linnaeus (1758), Bruguière (1791) y Lamarck (1801) reconocieron a *Ostrea* como un nombre genérico (con la especie *Ostrea edulis*). El primer investigador en enumerar las diferencias biológicas entre los géneros *Ostrea* y *Crassostrea* fue Orton (1928), basado en su forma de reproducción, considerando larvíparas al género *Ostrea* y ovíparas al género *Crassostrea* ⁽¹⁶⁾.

La ostra nativa se ubica en la siguiente escala zoológica ⁽¹⁷⁾:

Reino: Animalia

Phylum: Mollusca

Clase: Bivalvia

Sub-clase: Pteriomorpha

Orden: Filibranchiata

Sub-orden: Anysomaria

Super-Familia: Ostreioidea

Familia: Ostreidae

Género: *Crassostrea*

Especie: *iridescens*

Nombre Científico: *Crassostrea iridescens* (Hanley, 1854)

Nombre Común: Ostra nativa, Ostión de roca (Ecuador)

1.2.3. Morfología de las Valvas

La especie *C. iridescens* posee valvas gruesas y de forma irregular, existiendo triangulares, sub-rectangulares u ovaladas dependiendo del tipo y forma del sustrato, con dimensiones promedio de 110,0 mm de longitud y 150,0 mm de altura. Este organismo posee valvas desiguales, la valva inferior está frecuentemente unida al sustrato siendo plana o cóncava, mientras que la valva superior es ligeramente arqueada (Fig. 1).

La charnela de este organismo es ancha con una serie de denticiones. El color externo es gris verdoso con un lustre

metálico de color café. La superficie interna es de textura densa, de coloración aporcelanada blanquecina con un lustre iridiscente, a lo que se debe su nombre ⁽¹⁶⁾.



Figura 1. Ejemplar de *C. iridescens*

1.2.4. Anatomía de *Crassostrea iridescens*

La especie *C. iridescens* posee branquias que se unen a la base de los palpos labiales y presentan un promedio de 165 ranuras branquiales, además de un conducto cloacal pequeño, ostiolo grande y presencia de una cámara promial ⁽¹⁶⁾.

La boca se ubica en el extremo anterior, entre los pares de palpos labiales. Poseen un esófago comprimido, lateralmente corto y con un reborde de finas estrías en la entrada del estómago que es de forma irregular con ciego anterior en semiespiral. El saco del estilo es más largo que el estómago y termina en el extremo del músculo aductor. El intestino forma un asa que continúa lateralmente por el estómago hasta llegar a la base del esófago, que lo rodea parcialmente por el lado izquierdo

y empieza a descender por el lado derecho hasta la región posterior del estómago. Éste cruza hacia el músculo aductor en donde se alarga para terminar en recto y ano. Posee un músculo aductor grande en relación con el sistema digestivo (Fig. 2) (16).

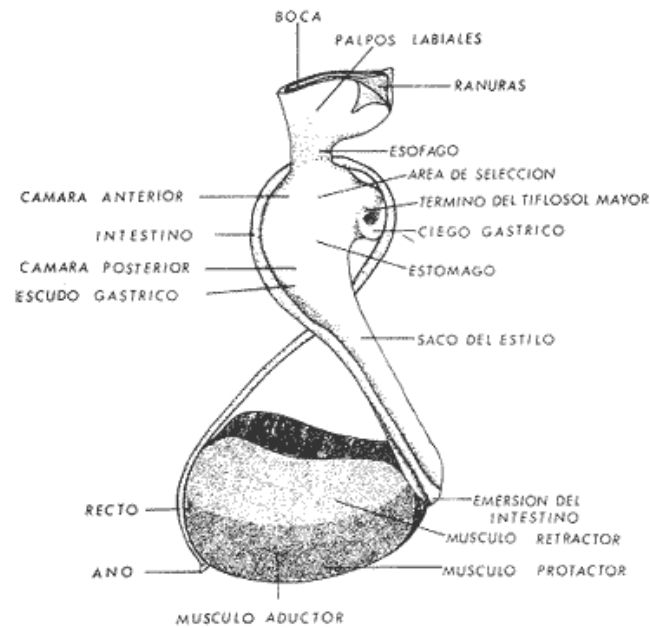


Figura 2. Diagrama del sistema digestivo de *C. iridescens*

Fuente: Castillo y García, 1984 (16).

1.2.5. Mecanismo de Filtración de los Moluscos Bivalvos

En los bivalvos lamelibranquios la captación de alimento es por filtración, la cual está en función en gran parte, por el arreglo de los cilios en los filamentos de los ctenidios. Estas estructuras musculares se contraen antero y posteriormente, pudiendo

rechazar partículas retenidas en los cilios frontales y dorsales, ayudando a desprender ya sean partículas grandes o mucosidad adherida en la superficie de las laminillas (18).

Los poderosos cilios laterales están situados a cada lado de los filamentos y dispuestos en forma de hilera continua generando las corrientes exhalantes e inhalantes (Fig. 3).

Los cilios frontales de cada filamento sirven para transportar dorsal o ventralmente material hacia la boca y los cilios latero frontales son los que realizan el mecanismo de filtración (19).

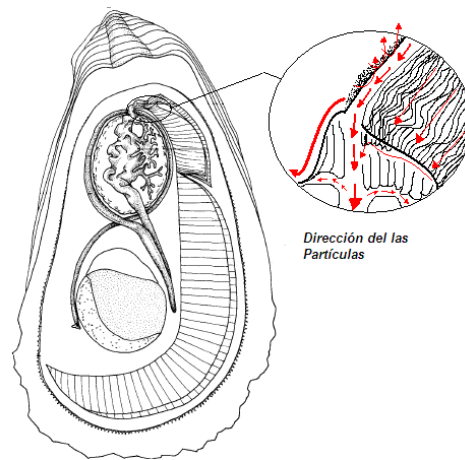


Figura 3. Mecanismo de alimentación y dirección de las partículas alimenticias

Fuente: Galtsoff, 1964 (19)

1.2.6. Mecanismo de Alimentación

En los moluscos bivalvos la alimentación y digestión se deben a procesos coordinados, en donde el alimento es acumulado en cierto período de tiempo y digerido posteriormente. Estos procesos se deben a diferentes cambios en el medio ambiente pudiendo ser las mareas, el día, la noche e inclusive la cantidad de partículas alimenticias existentes en el agua, que pueden estimular una respuesta en el animal (18). Cada estructura de los moluscos interfiere en la alimentación, como por ejemplo, los lóbulos del manto donde sus márgenes dirigen el flujo de agua a través de la cavidad del manto (19).

El mecanismo inicia cuando el agua ingresa por una zona denominada apertura inhalante, circula por la cavidad del manto, se filtra a través de los ctenidios (branquias) y luego es expulsada mediante la apertura exhalante. Ésta última tiene dos grandes funciones: la primera es sensorial en donde responde a una variedad de cambios físicos en el ambiente y la segunda es de servir como tamiz en donde restringe la entrada de grandes partículas.

Los ctenidios, además de formar parte del proceso respiratorio en la vida de los bivalvos, intervienen en el proceso de alimentación con la función de ordenamiento de partículas finas transportadas dorsalmente hacia las ranuras de alimentación, por lo que su tamaño se asume que está directamente relacionado con la cantidad de material suspendido que entra en la cavidad del manto ⁽¹⁸⁾. Con respecto a las partículas grandes que son ingeridas, éstas pasan paralelamente por los canales de alimentación mediante unas ranuras que posteriormente son evacuadas de la cavidad del manto como pseudoheces ⁽¹⁹⁾.

Los palpos labiales son estructuras que dirigen el alimento que va a entrar a la boca mediante cilios y canales especializados que separan las partículas grandes de las pequeñas (Fig. 3). Además, cumplen una función de limpieza y junto con la boca es

parte integrada del nado como en el caso de la familia Pectinidae y Limidae ⁽¹⁹⁾.

1.2.7. Reproducción

El género *Crassostrea* es hermafrodita protándrico, es decir comúnmente madura primero como macho. En zonas de buena disponibilidad de alimento, las hembras dominan la proporción sexual en especímenes adultos y pueden transformarse en machos cuando el alimento escasea; por ejemplo, cuando se encuentra en una situación de hacinamiento ⁽²⁰⁾. Estos individuos poseen la particularidad de liberar sus gametos en el medio que los rodea. Similar comportamiento ha sido observado en los pectínidos ⁽²¹⁾. Posterior a la fecundación en el agua, se inician las divisiones celulares originando larva trocófora a las 24 h y finalmente se convierte en una larva véliger a las 48 h (dependiendo de la temperatura) ⁽²²⁾.

1.2.7.1. Desarrollo y Ciclo Gonadal

Para la especie *C. virginica* los juveniles comienzan a desarrollar sus gónadas después de 6 a 10 semanas de vida. El proceso se inicia cuando en el epitelio germinal se originan células indiferenciadas que a través de su

maduración se desarrollarán en células grandes definidas. Estas células podrán generar ovocitos o espermatoцитos dependiendo de la rapidez con la que prolifera la línea germinal ⁽¹⁹⁾.

Es importante mencionar que los procesos de desarrollo gonadal no son cíclicos, ya que las células después de realizar divisiones celulares en varias generaciones detienen sus divisiones y entran en un periodo de crecimiento, el cual es más prolongado en hembras que en los machos ⁽¹⁹⁾.

La ovogénesis inicia con el surgimiento de células alargadas en el epitelio germinal, que generalmente se diferencia de otras células por su gran núcleo y crecimiento celular alrededor de la pared folicular. No existe una diferencia marcada entre un ovocito temprano con respecto a las células residuales indiferenciadas. Sin embargo, dentro de las células ocurren cambios como el que se percibe en el núcleo, el cual se ensancha y toma una forma ovoide que indica que la célula ya se encuentra madura ^(19,23).

La espermatogénesis se inicia con la formación de células indiferenciadas cercanas a la pared interna de los folículos. Ésta puede ser diferenciada de la ovogénesis por el tamaño y la disposición que van tomando las células en su desarrollo. Los ovocitos se predisponen en una sola fila a lo

largo del folículo, mientras que los espermatoцитos se agrupan alrededor de un lado del folículo (19).

1.3. ACONDICIONAMIENTO REPRODUCTIVO

El acondicionamiento de reproductores es la fase inicial en la producción de moluscos bivalvos en cautiverio. Este proceso se lo obtiene a través de la manipulación de la temperatura y el suministro de varias microalgas, donde el ciclo natural de gametogénesis (formación de gametos) está ligado a la síntesis de lípidos y a expensas del suministro de glucógeno (4,24). De igual forma, el tiempo de acondicionamiento es importante debido a que influye al complemento de la gametogénesis (4), y se ha demostrado en *C. gigas* que después de seis semanas de acondicionamiento (20°C), las ostras responden a los estímulos para el desove (25).

1.3.1. Temperatura

Uno de los parámetros físicos importantes para el acondicionamiento de reproductores es la temperatura. En condiciones naturales, cuando la temperatura aumenta a un rango de 20 a 28 °C se generan desoves y cuando disminuye entre 15 y 20 °C se desarrollan las gónadas en la especie *C. gigas* (7, 26). Otros trabajos realizados con *Ostrea edulis* (27), *Scallops* (28) y *Ostrea chilensis* (4) corroboran mantener

reproductores a temperatura que oscilan entre 15 a 22 °C para el desarrollo de las gónadas.

1.3.2. Salinidad

La salinidad por ser un factor influyente en el crecimiento de ciertas especies del género *Crassostrea*, ha sido muy estudiada en larvicultura y acondicionamiento de reproductores (29). Se ha establecido que altas salinidades de 41 ppt (30) no influyen en el desarrollo ni crecimiento en *C. gigas* (31) y *Saccostrea commercialis* (32). Sin embargo, se observó que en salinidades menores de 30 ppt se generan menores tasas de supervivencia en las larvas (31).

Por otra parte, se ha demostrado que la salinidad interviene en los desoves naturales de *O. iridescens* en aguas tropicales cuando en el periodo de mayores precipitaciones la salinidad del agua disminuye de 32 a 29 ppt (33).

1.3.3. Alimentación

La cantidad y composición de las dietas que se suministran a los reproductores de moluscos bivalvos tienen gran influencia en la reproducción y desarrollo de gametos, incluyendo también a otras especies marinas en general (6,8).

En condiciones experimentales o de cultivo, los bivalvos son alimentados con microalgas de diversas especies en donde se busca suplir los requerimientos nutritivos de estos organismos como ocurren en la naturaleza para establecer un régimen alimenticio definido para producción ⁽³⁴⁾. En la fase de acondicionamiento de ostreidos, se han utilizado diversos tipos de microalgas en las que destacan *C. gracilis* ⁽⁴⁾, *I. galbana* ^(4,35), *T. suecica* ⁽⁷⁾, y *T. pseudonana* ⁽⁷⁾.

Uno de los aspectos más discutidos sobre la alimentación en el acondicionamiento de reproductores de moluscos bivalvos, ha sido su dosificación. Para los ostreidos, generalmente se basan entre 1,5 y 6% del tejido seco ^(4,7). En el caso de los pectínidos como *Argopecten purpuratus*, se han alimentado a reproductores con concentraciones de 2×10^9 y 4×10^9 cel individuo⁻¹d⁻¹, en donde se observaron balances negativos de energía en el de menor dosificación, indicando que es una especie que requiere altas dosis de alimento durante la fase de acondicionamiento y desove ⁽³⁴⁾. De igual forma se indica que en *Argopecten ventricosus*, valores alimenticios altos como la ración equivalente al 9% del peso seco inicial de la gónada, estimula la maduración gonadal en menor tiempo ⁽³⁶⁾.

Hay que considerar en mantener una similitud con el ambiente natural, tratando también de mantener una alimentación continua

respecto al tiempo y evitar el exceso de alimentación, que provocaría el rechazo pre-digestivo en forma de pseudoheces y al cierre continuo de las valvas (37).

1.3.3.1. Requerimientos de proteínas

En el caso de las proteínas, la digestibilidad depende de los aminoácidos que la componen. Para *C. gigas* las proteínas son los componentes principales del músculo, pero a pesar de esto, contribuyen muy poco a la producción de gametos los cuales se forman a partir del glucógeno y lípidos almacenados en la glándula digestiva, manto y gónada (38,39). Sin embargo, estudios en otras especies como *A. purpuratus* dieron como resultado que el suministro alimenticio con baja proteína aumenta el tiempo de maduración gonadal, estado de desnutrición y alta tasa de respiración. Caso contrario ocurrió con el suministro de alta proteína en donde se redujo el tiempo de madurez gonadal y aumentó la fecundidad de las hembras (34).

1.3.3.2. Requerimientos de lípidos

Los requerimientos de lípidos en organismos marinos se centran en la importancia de los ácidos grasos altamente insaturados (HUFA, siglas en inglés) para el funcionamiento y mecanismo de transporte en la membrana celular ⁽⁶⁾, además son precursores de moléculas que influyen en el proceso de reproducción, osmoregulación y respuesta al estrés ^(24,25). Los más importantes y estudiados son el ácido docosahexaenoico (DHA, siglas en inglés) 22:6n-3, el ácido eicosapentaenoico (EPA, siglas en inglés) 20:5n-3 y el ácido araquidónico (ARA, siglas en inglés) 20:4n-6, los cuales intervienen en las funciones celulares, bioquímicas y fisiológicas cumpliendo un rol general en la estructuración y funcionalidad de las membranas, además son reguladores de funciones biológicas, como el aumento de la liberación de números de huevos, crecimiento y supervivencia de las larvas ^(25,27,39).

Los contenidos de estos ácidos grasos varían entre huevos de especies que han madurado en el ambiente natural en comparación con los de condiciones de laboratorio debido a los distintos regímenes de alimentación proveniente de las diatomeas y dinoflagelados ⁽⁷⁾. Por ende, los suministros de estos ácidos son esenciales en procesos de

acondicionamiento como se ha experimentado con la adición de compuestos lipídicos, en los que se observan mayores fecundidades, mejores respuestas a la inducción y mejores crecimientos larvales (25).

1.3.3.3. Requerimiento de carbohidratos

No se ha determinado los requerimientos específicos de carbohidratos para los moluscos (34). Sin embargo, este componente es reconocido como la principal fuente de energía de los bivalvos (24).

Durante la maduración gonadal y el desove se utilizan como fuente energética los componentes bioquímicos de más fácil catabolismo como son los carbohidratos que se encuentran almacenados en el músculo aductor y los lípidos de la glándula digestiva y gónada. Además se ha establecido que el ciclo natural gametogénico de los bivalvos está ligado al almacenamiento de glucógeno (24).

La acumulación de glucógeno y sus variaciones en el músculo aductor para el posterior uso en la maduración gonadal ha sido demostrada en *A. purpuratus*, a la vez que se ha encontrado que el aumento de la ración alimenticia genera incremento de carbohidratos en la gónada (40). El mismo efecto se ha obtenido en el género *Crassostrea* en

donde se sugiere que estas moléculas son las mayormente usadas durante el ciclo reproductivo (38,39).

En las familias Ostreidae y Mytilidae, la glándula digestiva y el tejido del manto son los principales órganos de almacenamiento y reserva de carbohidratos, respectivamente. En estos órganos se presenta un ciclo de almacenamiento durante el periodo de inactividad reproductiva y posteriormente la utilización de los mismos (39). Un resultado similar es reportado en el pectínido *Argopecten irradians concentricus* (41).

1.3.3.4. Requerimientos de micronutrientes

La mayoría de los micronutrientes son obtenidos por las microalgas y los minerales del mismo medio. Específicamente, los carotenoides (pigmentos orgánicos) son requeridos en la dieta de animales acuáticos debido a su incapacidad de sintetizarlos. Su importancia radica en intervenir en procesos como: actividad provitamina A, desarrollo y maduración gonadal, fertilización, eclosión y viabilidad larvaria, percepción olfatoria, quimiorrecepción, fotoprotección y actividad antioxidante, además interfiere en

la transferencia de Ca^{2+} a través de la membrana ⁽³⁴⁾. Por otra parte, las vitaminas intervienen en la tasa de crecimiento y en la capacidad sintetizadora de las bacterias del tubo digestivo, las cuales son obtenidas de las mismas microalgas.

Los moluscos bivalvos marinos, por encontrarse en un ambiente hipertónico como el agua del mar y dada la actividad filtradora de estos organismos, pueden satisfacer la mayoría de los requerimientos minerales que son vitales para la formación de estructuras rígidas como las valvas, mantenimiento de la presión osmótica, equilibrio ácido-base del cuerpo, transmisión del impulso nervioso, contracción muscular y de ser co-factor de enzimas, pigmentos respiratorios y de hormonas ⁽³⁴⁾.

1.4. MICROALGAS

Las microalgas juegan un importante rol benéfico en la naturaleza. Ellas representan la productividad primaria en ambientes acuáticos y tienen la capacidad de mantener la calidad del agua. En acuicultura representan la base de los cultivos debido a que conforman la dieta de moluscos bivalvos, ciertos crustáceos y algunas clases de peces.

1.4.1. Valor Nutricional de las microalgas

Las especies de microalgas utilizadas para alimentación de bivalvos comprenden principalmente 15 grupos entre diatomeas y algas verdes con tamaños que varían entre 5 y 25 μm ⁽⁶⁾. Las que destacan por su composición son:

1.4.1.1. Chaetoceros sp.

El género *Chaetoceros*, es el tipo de microalga más utilizada en la industria acuícola y específicamente en la producción de moluscos bivalvos ⁽⁴²⁾. Esta especie posee importantes niveles de carbohidratos, ácido graso eicosapentaenoico (EPA) y riboflavina ⁽³⁴⁾.

1.4.1.2. Isochrysis sp.

La microalga marina *I. galbana*, tiene una importancia destacable en las producciones de acuicultura debido a su composición nutricional la cual genera un gran aporte del ácido graso polinsaturado docosahexaenoico (DHA), que es indispensable para funciones biológicas ⁽⁶⁾.

1.4.1.3. Tetraselmis sp.

El género *Tetraselmis*, posee altos niveles de lípidos, carbohidratos y aminoácidos, siendo también una de las microalgas más utilizadas en acuicultura ⁽⁴³⁾.

Se ha realizado un estudio con el objetivo de disminuir costos de producción utilizando diferentes alternativas en las que se menciona el uso de *T. suecica* preservada a 4°C en la alimentación de larvas y en el manejo de reproductores de *C. gigas*, en donde se demostró que el uso de esta microalga ha sido eficiente (44).

Ciertas especies de moluscos como: *O. edulis*, *S. commercialis* y *Venerupis pullastra*, alimentadas con *T. suecica* han registrados bajos crecimientos. Sin embargo, otros organismos como: *C. gigas*, *Ruditapes decussatus* y *Mytilus* sp. utilizan eficientemente esta microalga, especialmente cuando se la ha combinado con otras especies de microalgas. Estos resultados contradictorios pueden ser explicados probablemente por los diferentes requerimientos alimenticios que poseen cada especie en particular (44).

Otras investigaciones realizadas en *C. virginica* demostraron que se obtuvieron los mejores crecimientos utilizando *Tetraselmis chui* y *T. maculata* que cualquier otra especie de microalga (45). Por lo que ciertos componentes que se encuentran en esta microalga, como los esteroides, son una buena fuente alimenticia para ciertas especies de bivalvos

como *O. edulis*, *C. gigas*, *Ruditapes decussatus* y *Mytilus* sp., que no tienen la capacidad de sintetizarlos (46,47).

1.4.2. Composición bioquímica de las microalgas

En la Tabla I, se presenta la composición bioquímica de las microalgas evaluadas (6,43):

Tabla I: Composición bioquímica de las microalgas evaluadas durante el acondicionamiento de reproductores de *C. iridescens*.

Fuente: Lavens y Sogeloos, 1996 (6) y Becker, 2007(43).

Especie:	Proteína (%)*	Carbohidratos (%)*	Lípidos (%)*
<i>Isochrysis galbana</i>	29	12.9	23
<i>Chaetoceros gracilis</i>	12	4.7	7.2
<i>Tetraselmis maculata</i>	52	15	3

* Porcentaje de su peso seco

CAPÍTULO 2

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LUGAR DE ESTUDIO

El presente trabajo fue realizado durante los meses de abril a julio de 2010 en el Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas “Edgar Arellano” (CENAIM-ESPOL) ubicado en la comuna San Pedro (-1.959476, -80.730286 UTM) y en la Estación Experimental CENAIM-ESPOL en la comuna Palmar (-2.012144, -80.725908 UTM)

de la parroquia Manglaralto, provincia de Santa Elena, Ecuador (Fig.4).



Figura 4. Ubicación del CENAIM-ESPOL, estación experimental y lugar de extracción de las ostras, Ecuador.

Fuente: Google Earth, 2010.

3.1.1. Lugar de extracción

Ostras adultas de *Crassostrea iridescens* fueron colectadas de la zona submareal de la comuna Ayangue en la parroquia Manglaralto provincia de Santa Elena, Ecuador (-1.970885, -80.756807 UTM - Fig. 4).

3.2. DISEÑO EXPERIMENTAL

Las ostras fueron divididas en seis grupos de acondicionamiento, cada uno con seis réplicas, mantenidos durante 30 y 60 días. En el laboratorio se llevaron tres tratamientos con diversas microalgas y

uno sin alimentar en base a un diseño aleatorio. Un tratamiento (EST) se mantuvo en el reservorio de la Estación Experimental CENAIM-ESPOL con la productividad presente en este cuerpo de agua y otro tratamiento (MAR) se colectó del medio natural a los 30 y 60 días (Tabla II).

Tabla II: Tratamientos evaluados en el presente estudio: set experimental N# 3 CENAIM-ESPOL (CHA, TETRA, CIT, SIN), Canal Reservorio de la estación Experimental de CENAIM-ESPOL (EST) y extracción en bancos naturales (MAR).

Tratamiento	Especie	Porcentaje de inclusión
CHA	<i>Chaetoceros gracilis</i>	100%
TETRA	<i>Tetraselmis maculata</i>	100%
CIT	<i>C. gracilis</i> + <i>I. galbana</i> + <i>T. maculata</i>	33,3%: 33,3%: 33,3%
SIN	Sin Alimentación	-
EST	Productividad Natural	-
MAR	Productividad Natural	-

3.3. ACONDICIONAMIENTO DE LOS REPRODUCTORES

3.3.1. Proceso de Depuración

Una vez colectados los organismos, se removieron los epibiontes presentes en las valvas y se descartaron los organismos muertos y con valvas rotas.

Luego de la limpieza, las ostras fueron colocadas en un tanque de 1 TM, provisto de flujo continuo de agua de mar filtrada y aeración constante por 48 h, durante este tiempo (depuración) no se suministró alimento.

3.3.2. Manejo de los reproductores *Crassostrea iridescens*

Al inicio del experimento, se registraron datos biométricos promedios de las ostras (altura: $11,86 \pm 1,35$ cm, longitud: $8,47 \pm 1,28$ cm y peso: $296,09 \pm 72,31$ g). Posteriormente, los ejemplares fueron ubicados individualmente en recipientes de vidrio con capacidad operativa de 3 L, que contenían agua de mar filtrada ($10 \mu\text{m}$) y esterilizada con rayos ultravioleta. La temperatura de acondicionamiento se mantuvo en $19,61 \pm 0,87^\circ\text{C}$. Los recipientes de vidrio con los reproductores de *C. iridescens* fueron puestos en cajas de fibra de vidrio donde circulaba agua temperada a $19 \pm 1^\circ\text{C}$, utilizando un intercambiador de calor Thermo Controller (HCR-10 Rie Sea™) y una bomba Iwaki Magnet (1 fase) para mantener constante la temperatura del

agua. El suministro de aire a los recipientes de vidrio se los realizó utilizando un sistema de tuberías suspendidas (Fig. 5).

Los individuos fueron alimentados siguiendo el protocolo de alimentación del departamento de Moluscos de CENAIM-ESPOL, basado en el 2% del peso total de las ostras (peso seco). Las dietas de microalgas en los tratamientos CHA, TETRA y CIT fueron suministradas centrifugadas, a excepción de *I. galbana* que fue adicionada directamente de carboys de 50 L.

Para el tratamiento en la estación experimental (EST), se utilizaron 5 pearl nets (4 individuos por pearl net), suspendidos en una línea con boyas flotantes a 1 m desde el fondo del canal reservorio (Fig. 6).



Figura 5. Set experimental #3 CENAIM-ESPOL con la distribución aleatoria de los recipientes de vidrio utilizados para acondicionar reproductores de *C. iridescens*.



Figura 6. Pearl net con reproductores de *C. iridescens* dispuestos a ser colocados en el canal reservorio de la estación experimental de CENAIM-ESPOL

En los tratamientos mantenidos en el laboratorio, los parámetros del agua de cultivo (oxígeno disuelto y temperatura) fueron

registrados dos veces al día (09h00 y 18h00) con un oxigenómetro YSI 55D. Se hicieron recambios de agua (100%) cada 48 h y semanalmente muestreos de peso de los individuos para ajustar la dosis de alimentación. (Fig. 7).

En el tratamiento EST se realizó una revisión cuantitativa y cualitativa del fitoplancton presente en el canal reservorio y muestreos de peso de los organismos con una periodicidad semanal registrando los valores de concentración de oxígeno disuelto y temperatura dos veces al día, en horarios de 06h00 y 18h00 (Fig. 7).



Figura 7. Mantenimiento de reproductores: a) Peso de organismos, b) Medición de organismos, c) Limpieza de los pearl nets, d) Limpieza de reproductores

A los 30 y 60 días de iniciado el experimento, se extrajeron seis organismos del medio natural (tratamiento MAR) para realizar los cortes histológicos. Se registró la temperatura del medio al momento de la extracción y se tomaron muestras de agua para análisis de clorofila *a*.

3.4. CORTES HISTOLÓGICOS

3.4.1. **Preparación de Cortes Histológicos**

Del stock de reproductores, se escogieron aleatoriamente seis organismos antes y seis después de la depuración y se procedió a realizar cortes y placas histológicas utilizando la técnica de tinción con hematoxilina y eosina ⁽⁴⁸⁾ (Fig. 8 – Anexo 1). Del mismo modo, seis animales por tratamiento fueron sacrificados a los 30 y 60 días de acondicionamiento para los análisis histológicos y determinación de sexos. Los cortes (4 μm) se realizaron transversal y longitudinalmente sobre las gónadas de los organismos sacrificados.

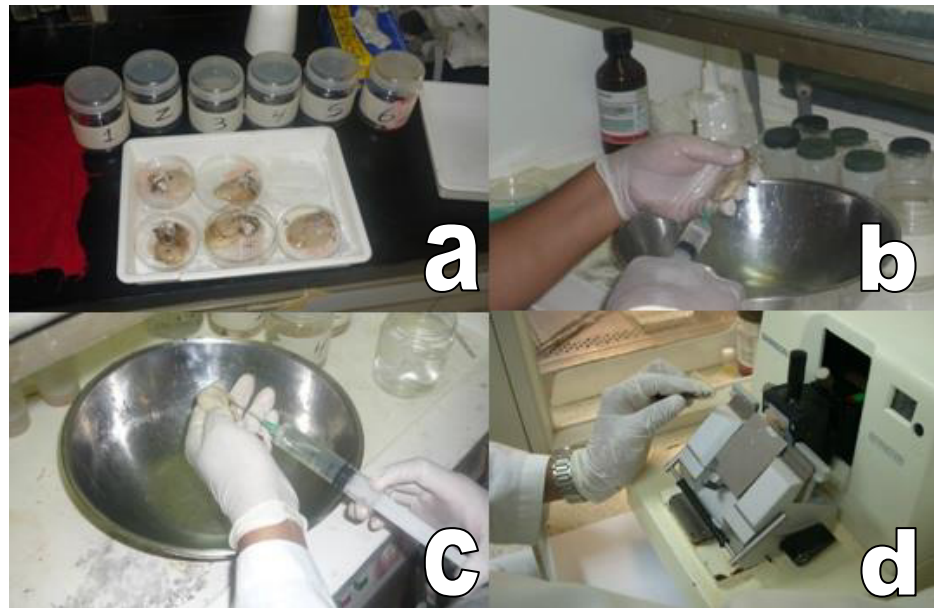


Figura 8. Realización de las placas histológicas: a) extracción de tejidos blandos, b) y c) inyección de solución Davidson, d) corte en el micrótopo (4 μ m)

A los organismos seleccionados, se les pesaron los tejidos blandos y gónadas para establecer el índice gonádico (IGS) ⁽⁴⁹⁾:

$$\text{IGS} = \frac{\text{Peso de Gónada}}{\text{Peso de Tejidos Blandos Totales}} * 100$$

Los organismos de los tratamientos TETRA y SIN fueron mantenidos en acondicionamiento por 42 días debido a que presentaron grados de madurez altos (células sexuales en desarrollo), según observaciones microscópicas.

3.4.2. **Determinación de la condición gametogénica**

Para la determinación de la condición gametogénica se utilizó la descripción de Fournier (1992) ⁽³³⁾ para *C. iridescens*, quien describe 4 estadios gonadales (Tabla III):

Tabla III: Cuadro comparativo de los distintos estadios de madurez gonadal utilizados en la especie *C. iridescens* según Fournier (1992) ⁽³³⁾.

Estadio Gonadal	Característica Biológica
Estadio 0 (Indeterminado)	Folículos están presentes en el área gonadal, sin la presencia de gametos. La apariencia externa es acuosa, translúcida. Se observa el estómago en su totalidad
Estadio 1 (Desarrollo Temprano)	Gónada ligeramente desarrollada, con pocos folículos pequeños. Presencia de espermatogonios, espermatocitos u ovogonios, pero sin la presencia de ovocitos ni espermatozoides libres. Visibilidad del estómago mayor al 50%
Estadio 2 (Desarrollo tardío)	Presencia de algunos folículos con más del 30% de gametos libres. Abundante tejido conectivo interfolicular. Visibilidad del estómago menor al 50%
Estadio 3 (Madurez)	Incremento del número de folículos llenos con más del 50% de gametos dispersados en toda el área de la gónada. Externamente la gónada tiene una densa y cremosa apariencia y el estómago es imperceptible
Estadio 4 (Desove y Reabsorción)	Presencia escasa de folículos desovados que todavía contienen gametos, mayor presencia de folículos vacíos con ovocitos y espermatozoides residuales. La gónada es blanda y llena de canales

CAPÍTULO 3

3. RESULTADOS

3.1. ACONDICIONAMIENTO DE REPRODUCTORES

3.1.1. Proceso de depuración

Los organismos colectados en la comuna Ayangue inicialmente registraron 17% en estadio 0 (indeterminados), 66 % en estadio 1 (desarrollo temprano) y 17% en estadio 2 (desarrollo tardío).

Posterior a la depuración se registraron el 66% de organismos en estadio 0 y 34% en estadio 1 (Fig. 9).

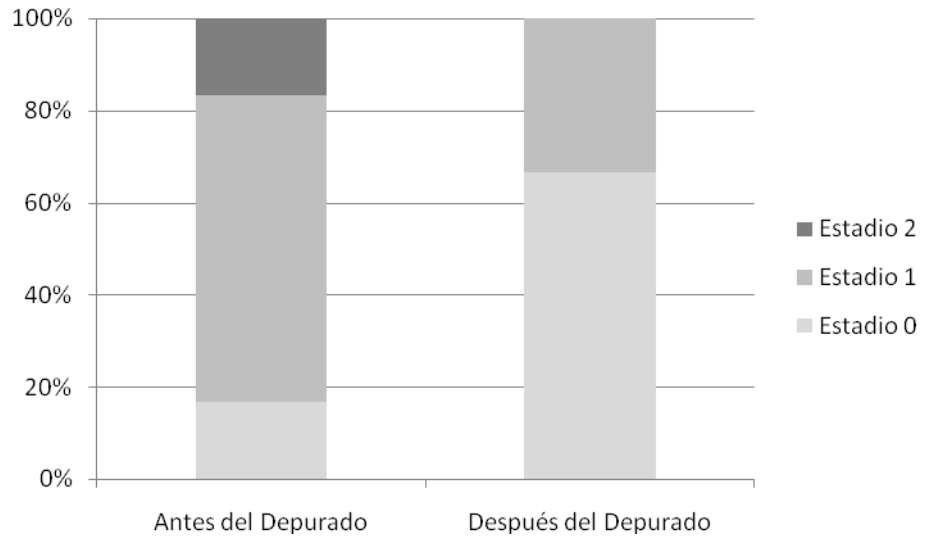


Figura 9: Desarrollo gonadal de *C. iridescens* antes y después de la depuración

3.1.2. Parámetros físico-químicos

Los valores de temperatura y oxígeno disuelto registrados durante la experimentación se muestran en la Tabla IV:

Tabla IV: Promedio diarios (\pm desviación estándar) de temperatura y oxígeno disuelto de los tratamientos con reproductores de *C. iridescens*.

Acondicionamiento	Temperatura (°C)	Oxígeno Disuelto (mg·L⁻¹)
Set #3 CENAIM-ESPOL	19,61 \pm 0,87	7,26 \pm 0,65
Canal Reservorio (EST)	27,01 \pm 2,02	5,54 \pm 1,88
Medio Natural (MAR)	20,00 \pm 1,00	---

Los análisis de clorofila *a* del agua de mar en el lugar de extracción de las ostras fue en promedio 7,56 \pm 0,99 μ g.L⁻¹ (Tabla V).

Tabla V: Análisis de Clorofila *a* realizados en el lugar de extracción (Tratamiento MAR, Ayangue) durante el periodo de acondicionamiento.

Días de acondicionamiento	Clorofila <i>a</i> (μg.L⁻¹)
Inicio de experimentación	8,31
30 días	6,44
60 días	7,92

3.1.3. Análisis cuantitativo y cualitativo de las microalgas presentes en el canal reservorio

Se identificaron 2 grupos predominantes de microalgas en la columna de agua del canal reservorio: Bacilariofitas y Cianofitas (Fig. 10).

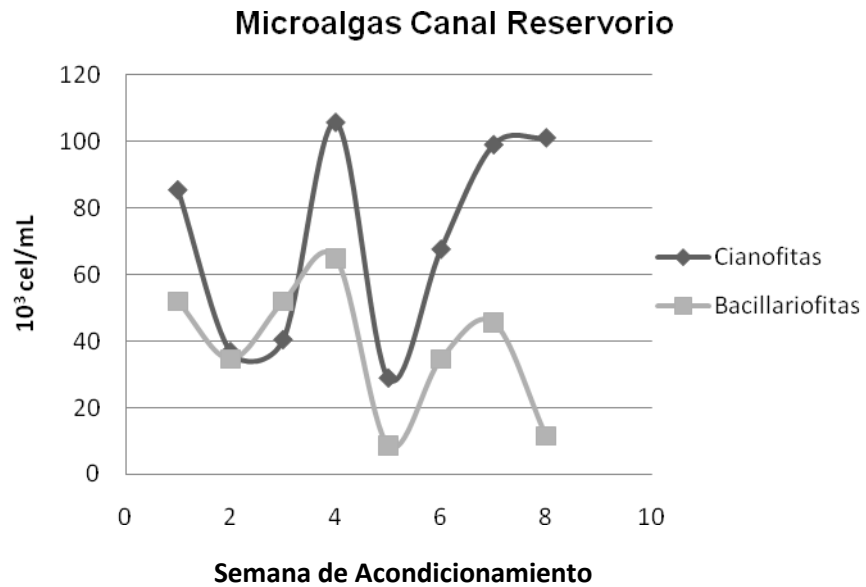


Figura 10: Microalgas presentes en el canal reservorio de la estación experimental CENAIM-ESPOL (EST).

3.1.4. Monitoreo de peso de reproductores *C. iridescens*

Los organismos mantenidos en el laboratorio registraron un peso promedio estable. Sin embargo, el tratamiento EST (canal reservorio) tuvo un incremento promedio de $10,78 \pm 8,07$ g al final de la experimentación (Fig. 11)

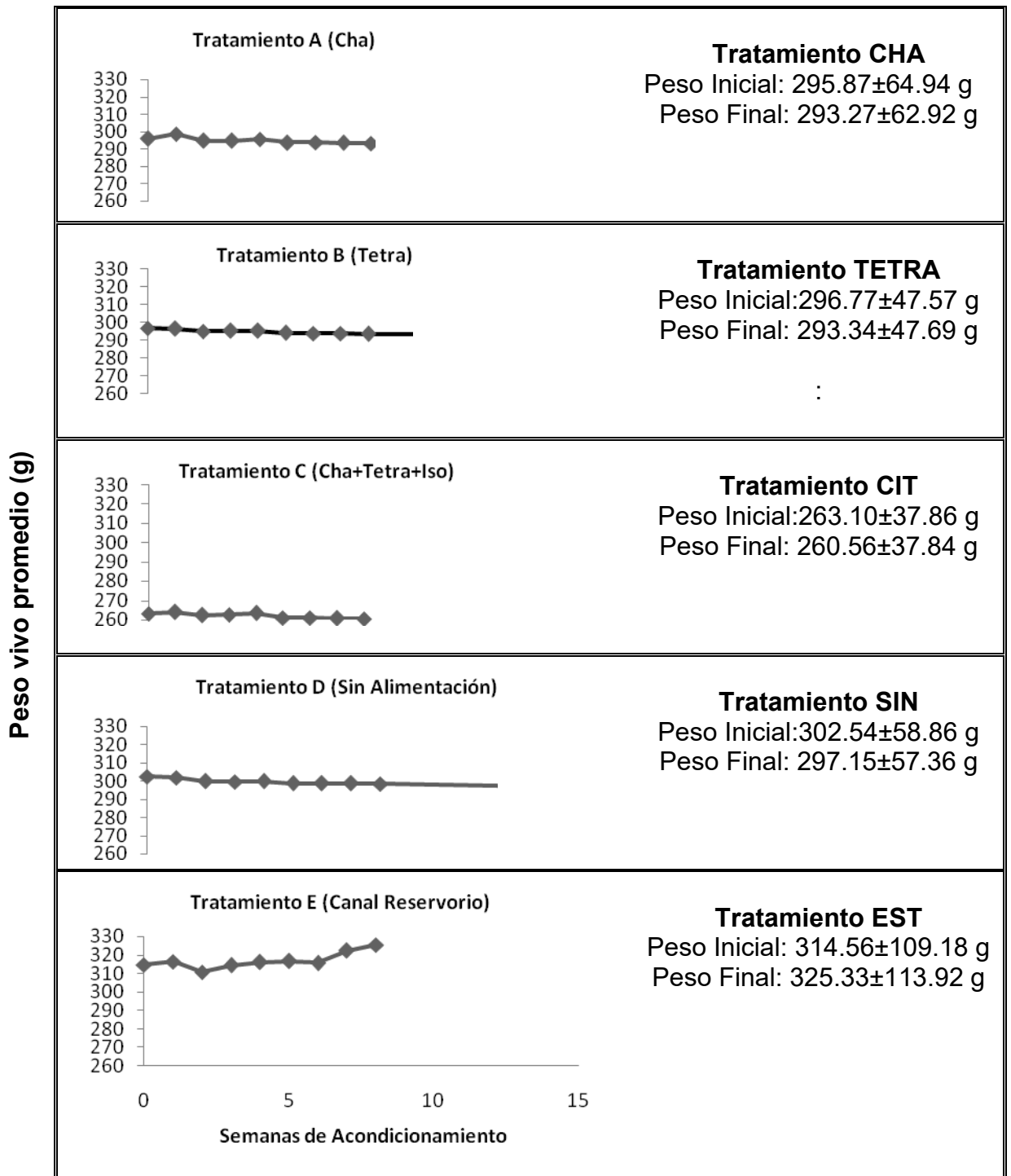


Figura 11: Monitoreo de peso promedio de *C. iridescens* en los distintos tratamientos evaluados durante la experimentación

3.2. ANÁLISIS DE LOS CORTES HISTOLÓGICOS

Se registraron diferentes estadios de desarrollo gonadal en las ostras alimentadas con los regímenes evaluados, como se puede observar en las figuras 12, 13 y 14.

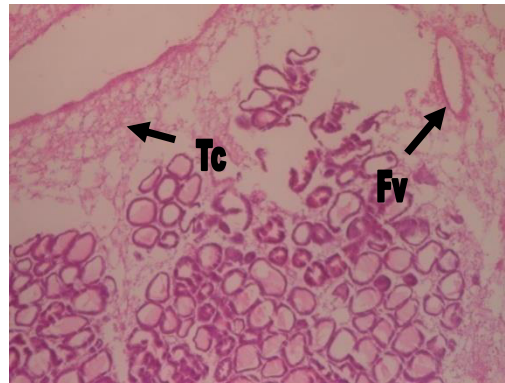


Figura 12: Corte histológico de *C. iridescens*. Microfotografías de la fase de desarrollo gonadal indeterminada (estadio 0) Corte transversal 4 μ m, 10X; Fv folículo vacío, Tc tejido conectivo.

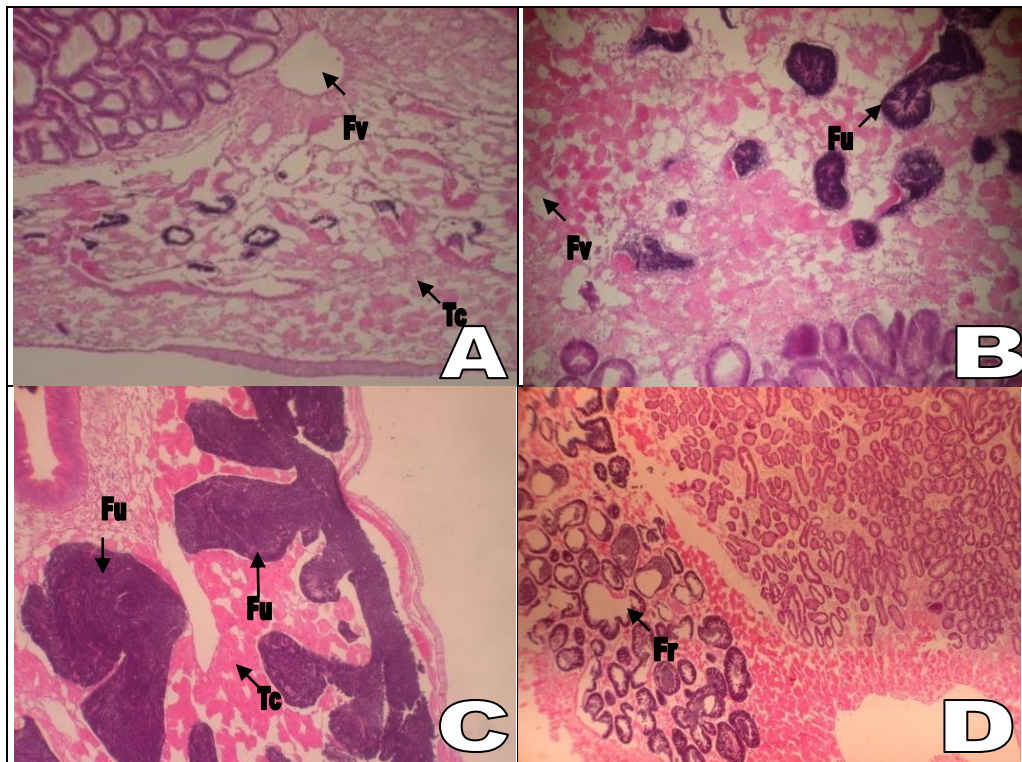


Figura 13: Cortes histológicos de *C. iridescens*, macho (Transversales 4 μ m, 10X). Microfotografías de las fases de desarrollo gonadal. a) estadio 1 (desarrollo temprano); b) estadio 2 (desarrollo tardío); c) estadio 3 (madurez); d) estadio 4 (desove-reabsorción); Fv folículo vacío, Fu folículo lleno, Fr folículo roto, Tc tejido conectivo.

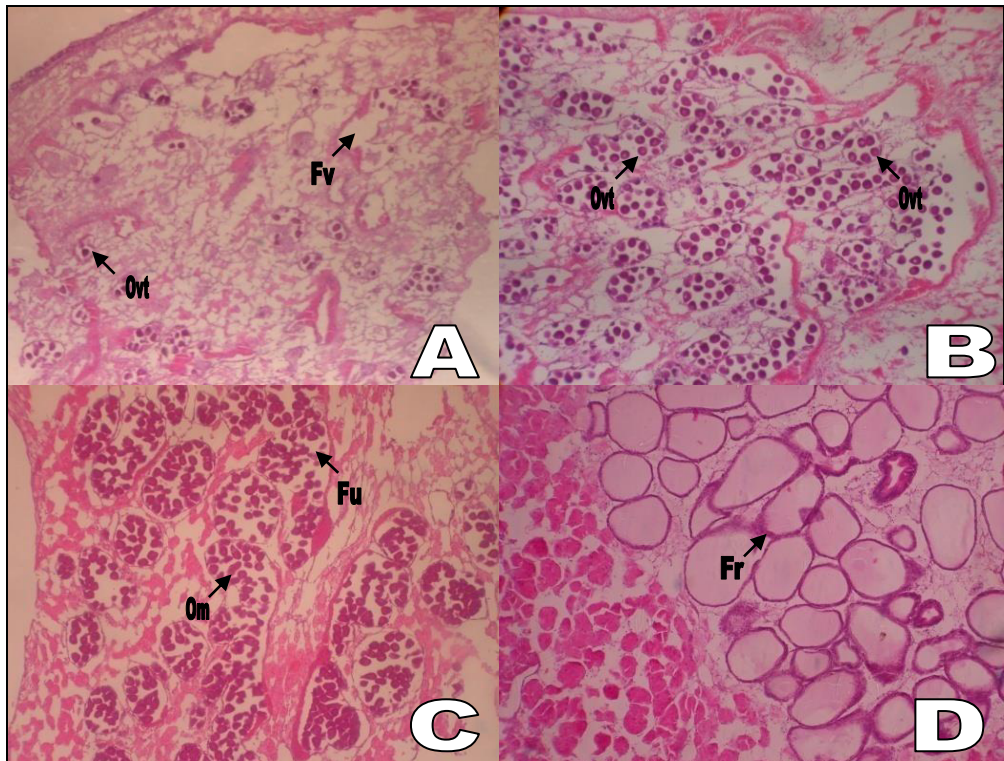
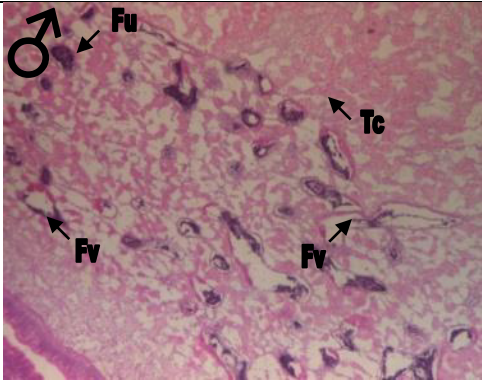
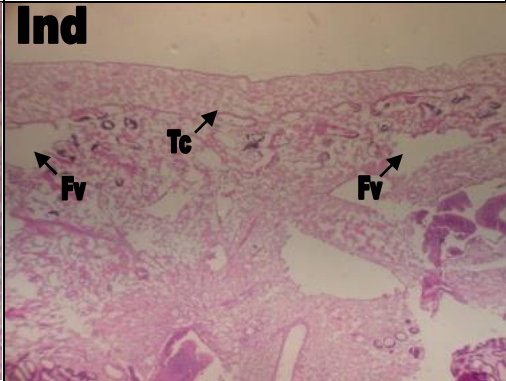
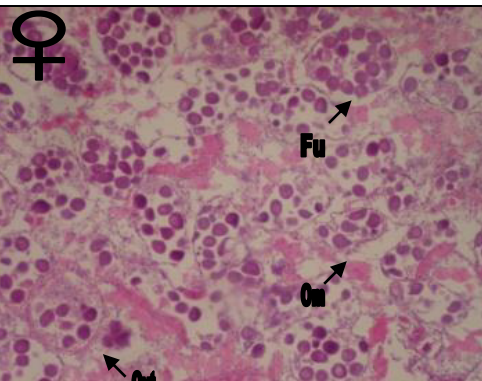
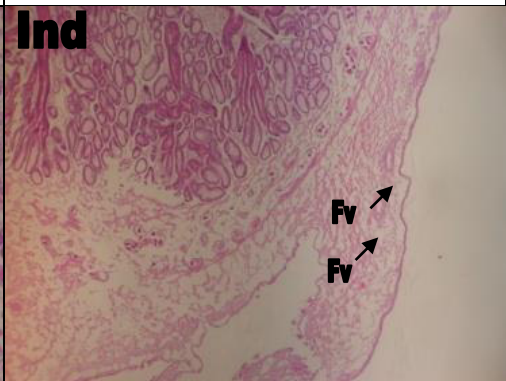
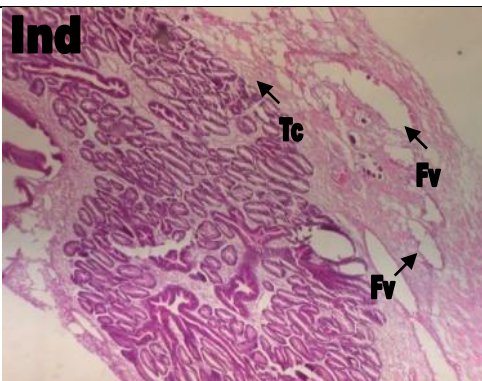
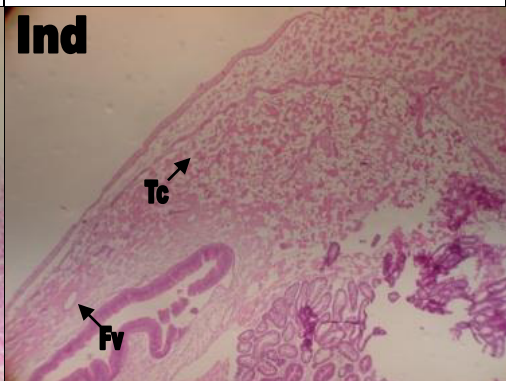


Figura 14: Cortes histológicos de *C. iridescens*, hembra (Transversales 4 μ m, 10X). Microfotografías de las fases de desarrollo gonadal. a) estadio 1 (desarrollo temprano); b) estadio 2 (desarrollo tardío); c) estadio 3 (madurez); d) estadio 4 (desove-reabsorción); Fv folículo vacío, Fu folículo lleno Ovt ovocito temprano, Om ovocito maduro.

En los análisis histológicos (Fig. 15) se puede apreciar las diferencias que existieron a los 30 y 60 días de acondicionamiento en los folículos de las gónadas, observando las características de los distintos estadios gonadales.

Tratamiento	30 Días de Acondicionamiento	60 Días de Acondicionamiento
CHA		
TETRA		
CIT		

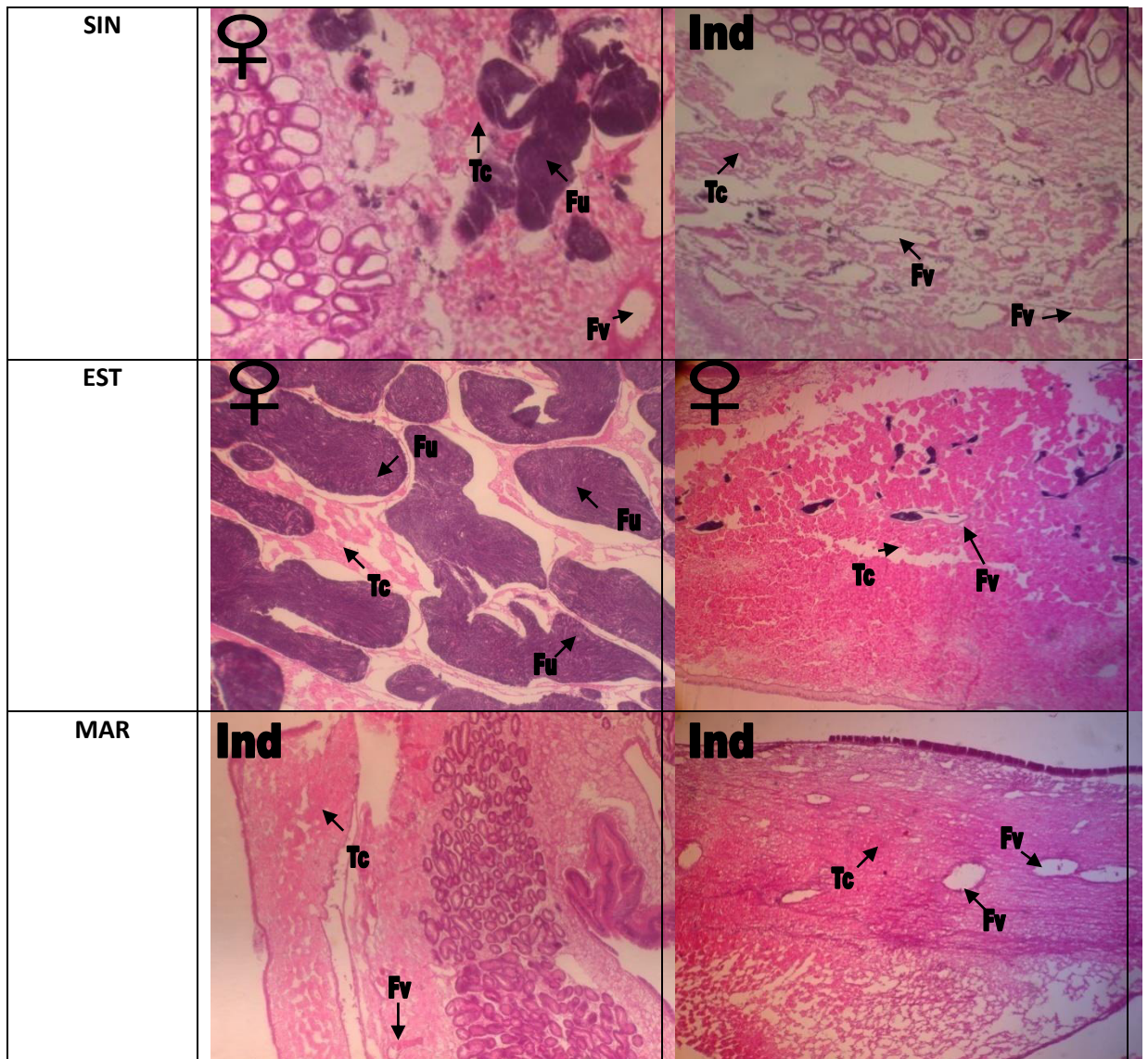


Figura 15: Microfotografías de los cortes histológicos en distintos tratamientos a los 30 y 60 días de acondicionamiento de reproductores de *C. iridescens*. Cortes transversales 4 μ m, 10x. Tc tejido conectivo, Fv folículo vacío, Fu folículo lleno, Ovt ovocito temprano, Om ovocito maduro, Ind indeterminado.

3.2.1. Acondicionamiento a los 30 días

A los 30 días de acondicionamiento el tratamiento EST (canal reservorio) registró 66% de los organismos en estadio 2 (desarrollo tardío) y 34% en estadio 3 (madurez definida). En los tratamientos CHA y TETRA presentaron 17% en estadio 3. En el tratamiento sin alimentar (SIN) se obtuvo un desarrollo en las gónadas de 34% de organismos en estadio 2. Con respecto al tratamiento CIT (mezcla) se registró 17% de organismos en estadio 2. El tratamiento MAR registró 17% de organismos en estadio 4 (desove-reabsorción - Fig. 16).

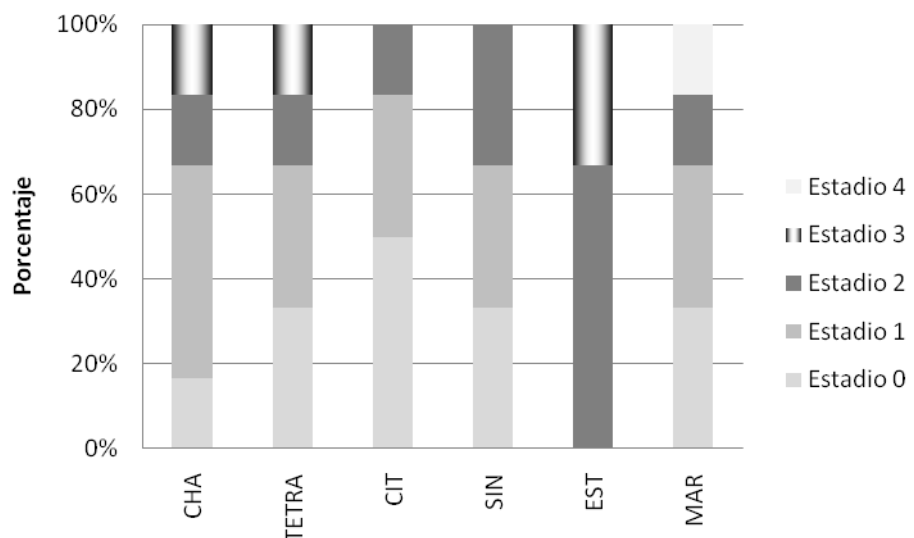


Figura 16: Desarrollo gonadal a los 30 días de acondicionamiento

3.2.2. Acondicionamiento a los 60 días

Posterior a los 60 días de acondicionamiento el tratamiento TETRA registró 66% de organismos en estadio 0, de igual forma los tratamientos CHA y EST obtuvieron 50% de individuos en el mismo estadio. En el tratamiento CIT se registró 66% de organismos en estadio 2. Con respecto al tratamiento sin alimentar (SIN) se registró un 34% de organismos en estadio 2. El tratamiento MAR registró 50% de los organismos en estadio 0 (Fig.17).

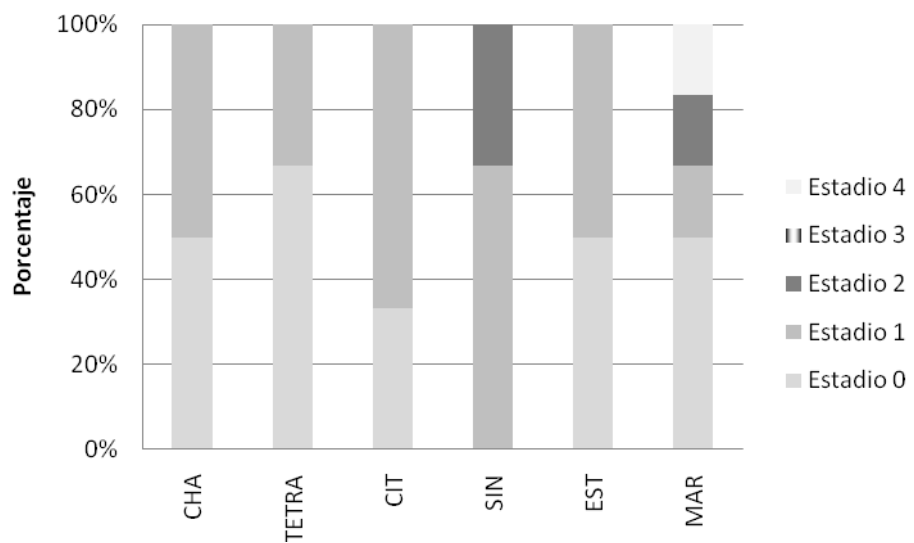


Figura 17: Desarrollo gonadal a los 60 días de acondicionamiento

3.2.3. Acondicionamiento a los 102 días

A los 102 días de acondicionamiento en el tratamiento TETRA, se obtuvo el 83% de los organismos en estadio 0 y 17% en estadio 1 (desarrollo temprano). Con respecto al tratamiento sin alimentar, se obtuvo 33,3% de organismos en estadio 0, 1 y 2 (Fig. 18).

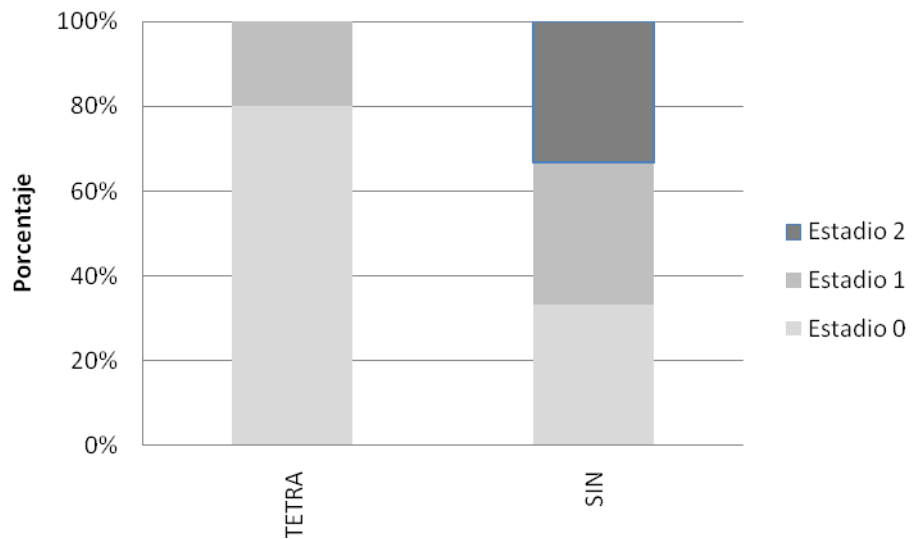


Figura 18: Desarrollo gonadal a los 102 días de acondicionamiento

3.3. FRECUENCIA DE SEXOS

De los 6 organismos extraídos del banco natural antes de la depuración, se encontraron 66% hembras, 17% machos y 17% indeterminados. Después de la depuración se registraron 34% hembras y 66% organismos indeterminados (Fig.19).

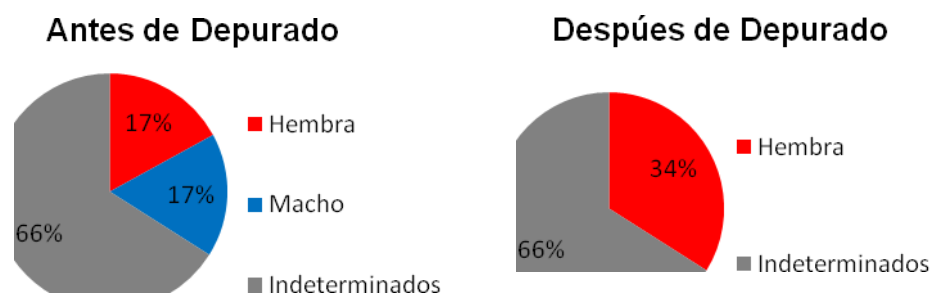


Figura 19: Frecuencia de sexos antes y después de la depuración

A los 30 días de acondicionamiento el tratamiento CHA registró 50% de hembras, 33% de machos y 17% de indeterminados. TETRA registró 50% de machos, 33% de indeterminados y 17% de hembras. En el tratamiento sin alimentación (SIN) y CIT (mezcla) registraron 67% indeterminados y 33% de machos. En el canal reservorio (EST) se registró el 83% de machos y 17% de hembras, mostrando todos los organismos un sexo definido. El tratamiento

MAR registró 33,33% en machos, hembras e indeterminados, respectivamente (Fig. 20).

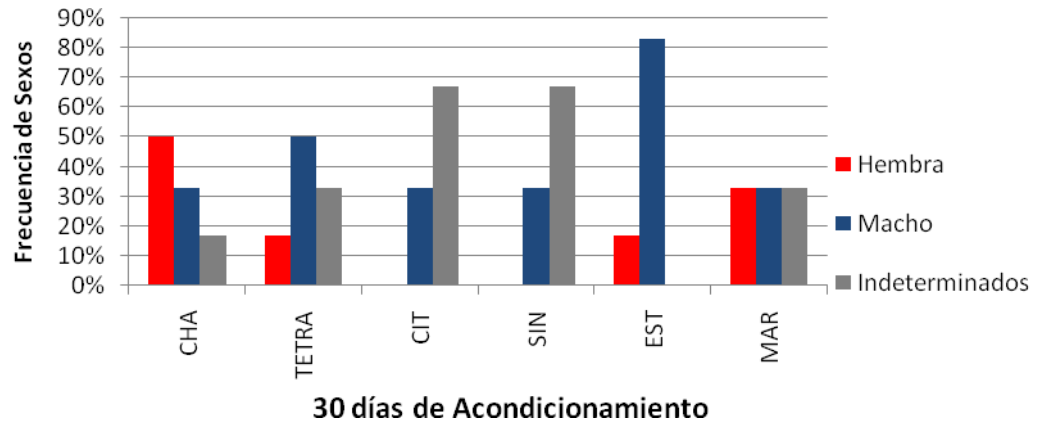


Figura 20: Frecuencia de sexos a los 30 días de acondicionamiento

Durante los 60 días de acondicionamiento, los tratamientos CHA, CIT y EST registraron 33% de machos, 67% de indeterminados. En el tratamiento TETRA se registró 33% de hembras y 67% de indeterminados. El tratamiento SIN registró 50% de hembras 17% de machos y 33% de indeterminados. Y el tratamiento MAR 50% de machos e indeterminados, respectivamente (Fig. 21).

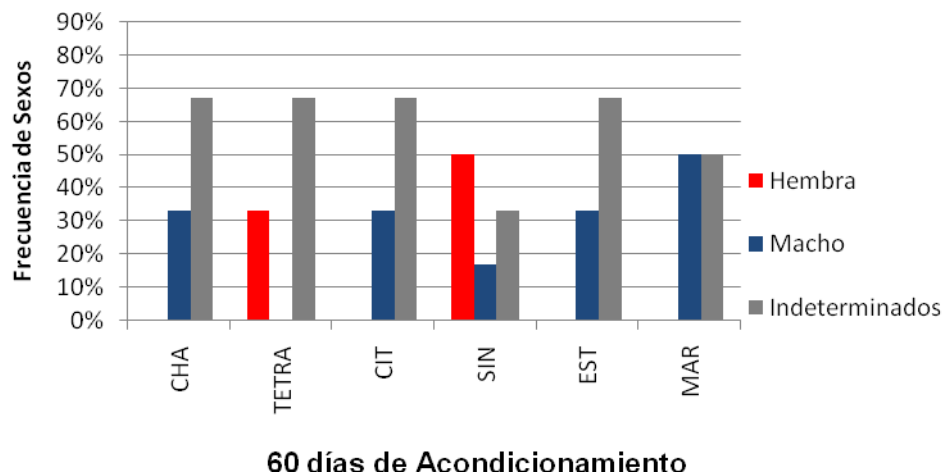


Figura 21: Frecuencia de sexos a los 60 días de acondicionamiento

3.4. ÍNDICES GONÁDICOS (IGS)

Los organismos extraídos del banco natural antes de la depuración registraron $43,06 \pm 1,70\%$ de IGS en hembras, $52,04 \pm 29,69\%$ de IGS en machos y $42,95 \pm 1,05\%$ de IGS en indeterminados. Luego de la depuración se registró $42,07 \pm 3,03\%$ en hembras y $40,89 \pm 13,18\%$ de indeterminados.

A los 30 días de acondicionamiento los IGS obtenidos con los tratamientos CHA y TETRA y SIN aumentaron en promedio a $45,84 \pm 4,91\%$. El tratamiento CIT disminuyó a $38,92 \pm 4,80\%$ de IGS. Y los tratamientos EST y MAR aumentaron en promedio a $50,74 \pm 4,36\%$ de IGS.

A los 60 días de acondicionamiento el tratamiento CHA disminuyó en promedio $30,77 \pm 8,31\%$ de IGS, mientras TETRA, CIT y SIN se

mantuvieron en promedio $47,29 \pm 3,09\%$. El tratamiento EST disminuyó a $45,19 \pm 0,02\%$ de IGS. El tratamiento MAR aumentó el IGS a $57,92 \pm 0,95\%$.

En el periodo evaluado por 102 días de acondicionamiento el IGS del tratamiento TETRA aumentó en promedio a $49,93 \pm 4,07\%$. Y el tratamiento sin alimentar (SIN) disminuyó a $44,86 \pm 1,28\%$ de IGS (Tabla VI).

Tabla VI: Índices Gonadales promedio por sexo

	Antes de Depuración	Después de Depuración
Hembra	43.06%	42.07%
Macho	52.04%	-
Indeterminados	42.95%	40.89%

		30 días	60 días	102 días
CHA	Hembra	50.21%	-	-
	Macho	37.89%	24.89%	-
	Indeterminados	48.21%	36.65%	-
TETRA	Hembra	53.13%	46.06%	-
	Macho	41.51%	-	52.81%
	Indeterminados	44.99%	50.42%	47.05%
CIT	Hembra	-	-	-
	Macho	42.31%	45.37%	-
	Indeterminados	35.52%	46.25%	-
SIN	Hembra	-	42.96%	43.40%
	Macho	47.34%	51.97%	45.73%
	Indeterminados	43.46%	48.02%	45.46%
EST	Hembra	52.18%	-	-
	Macho	52.14%	45.20%	-
	Indeterminados	-	45.17%	-
MAR	Hembra	43.00%	-	-
	Macho	53.08%	<u>57.25%</u>	-
	Indeterminados	53.30%	<u>58.59%</u>	-

(-) No existió registro

4. DISCUSIÓN

En condiciones naturales, el ciclo reproductivo del género *Crassostrea* está regido por eventos cíclicos anuales en donde la temperatura define el comportamiento de la biología reproductiva de estos bivalvos ⁽⁵¹⁾. Sin embargo, estos parámetros pueden ser modificados en condiciones de laboratorio con el fin de establecer un sistema de producción y obtener larvas viables durante todo el año. Se ha demostrado que las variaciones térmicas en el agua y la utilización de ciertas dietas de microalgas aceleran o retardan el desarrollo gonadal ⁽⁴⁾.

El inicio de un acondicionamiento reproductivo según Lannan *et al.* (1980) debe basarse en estudios de ciclos reproductivos anuales ⁽⁵⁰⁾, colectando organismos durante los meses donde se reportan menores temperaturas en el agua y mayores porcentajes de la población en estadio 0 (indeterminados). En el presente trabajo, los organismos colectados del banco natural fueron sometidos a una depuración por 48 horas con el propósito de iniciar con la mayor cantidad de organismos en estadio 0, alcanzando 67% en este estadio, además de la ausencia de machos y disminución promedio del Índice Gonádico (IGS) de 4,54%.

Después de 30 días de acondicionamiento a una temperatura de $19,61 \pm 0,87$ °C, se alcanzaron los mayores avances gonadales en las ostras alimentadas con *Chaetoceros gracilis* (CHA) y *Tetraselmis*

maculata (TETRA) registrando 17% de organismos en estadio 3 (madurez definida) en comparación con los otros tratamientos mantenidos en el laboratorio. Estos resultados fueron similares a los reportados en *O. chilensis* a una temperatura de 17°C, alimentados con *C. gracilis* durante tiempos de acondicionamiento entre 30-35 días, registrando 15% de organismos en estadio de madurez definida y 50 % en estadio 0 ⁽⁴⁾.

En este estudio, en el canal reservorio a una temperatura de $27,01 \pm 2,02$ °C se alcanzaron estadios gonadales avanzados (33% de organismos en estadio 3), posiblemente por la diversidad de microalgas especialmente bacilariofitas presentes en este cuerpo hídrico a los 30 días de acondicionamiento. A pesar de que no se obtuvieron desoves, ni se evaluó la viabilidad de los gametos, estos resultados sugieren que probablemente la obtención de estadios gonadales avanzados estaría más influenciada por la alimentación que por la temperatura. En estudios realizados en Costa Rica ⁽³³⁾ y México ⁽⁵¹⁾ sobre el ciclo reproductivo de *C. iridescens* en aguas tropicales naturales, se hace referencia a que en temperaturas entre 26-27°C y 25-24°C respectivamente, esta especie inicia su ciclo gonadal, sin mencionar los grupos o géneros de microalgas presentes.

La adición de varias microalgas en los cultivos de moluscos, ha sido estudiada con el objeto de suplir los requerimientos nutritivos de estos organismos como ocurren en la naturaleza ^(25, 34). Sin embargo, durante

este trabajo en el tratamiento mezcla de *I. galbana*, *C. gracilis* y *T. maculata* (CIT) no se registraron avances en la maduración de sus gónadas a los 30 ni 60 días de acondicionamiento (34 y 66% de organismos en estadio 1 - desarrollo temprano, respectivamente) posiblemente atribuido a la dosificación utilizada en este trabajo. La relación óptima de las combinaciones de microalgas no está determinada, debido al escaso conocimiento de los requerimientos nutricionales de *C. iridescens*. Por lo tanto, se asume que la relación 33.3%:33.3%:33.3% utilizada en este trabajo no fue adecuada para esta especie dejando abierta la posibilidad de evaluar nuevas relaciones que se adapten a las necesidades de *C. iridescens*. También se sugiere que la filtración selectiva podría ser un factor determinante para esta especie debido al tamaño, forma, motilidad y señales químicas que presentan ciertas especies de microalgas, como se ha demostrado en el acondicionamiento de *Paphies australis*, donde existió preferencias por las microalgas *Thalassiosira pseudonana* y *Chaetoceros muelleri* ⁽⁵²⁾.

A pesar que durante esta investigación no se realizaron análisis nutricionales de las diferentes microalgas, es importante mencionar la importancia del ácido graso eicosapentaenoico (EPA) ⁽³⁴⁾ y del glucógeno ⁽⁴³⁾ (componentes que se encuentran en mayor proporción en *C. gracilis* y *T. maculata*) en el desarrollo de gametos, sugiriendo incorporar estos componentes en las dietas para alcanzar estadios de

madurez avanzados (25,50), lo que concuerda con lo observado en este estudio.

Los resultados del tratamiento sin alimentar (SIN) presentaron 33% de organismos en estadio 2 (desarrollo tardío) durante toda el periodo de acondicionamiento (102 días). Estos datos sugieren que el desarrollo gonadal no solo puede provenir del alimento suministrado durante la fase de acondicionamiento (53) sino que también puede provenir de reservas almacenadas en el músculo aductor, glándula digestiva y gónadas durante periodos de reposo reproductivo (24,37,38). Sin embargo, a pesar de presentar una baja madurez (33% de organismos en estadio 2) no se pudo comprobar la viabilidad de estos gametos debido a que los reproductores no fueron inducidos a desove como ocurrió en el trabajo de Wilson *et. al.* (1996) con la especie *O. chilensis* (4) en donde dos ostras desovaron a pesar de no ser alimentadas; sin embargo a pesar de desovar los gametos no fueron viables, por lo que el autor deduce que estas reservas no fueron adecuadas para generar gametos viables.

En nuestro país, al no existir estudios del ciclo reproductivo de *C. iridescens*, es difícil estimar el tiempo necesario o los ciclos anuales en los que se encuentren estadios gonadales avanzados en el medio natural. Durante los meses que se realizó el acondicionamiento (abril-junio), la temperatura del agua en la zona de extracción se mantuvo en $20,00 \pm 1,00^{\circ}\text{C}$. El tratamiento MAR registró 17% de organismos en

estadio 4 (desove-reabsorción) a los 30 días y 60 días por lo que se puede inferir que estos individuos se encontraban en una fase de reposo esperando condiciones para desarrollar gametos y posteriormente generar desoves, como lo demuestran estudios realizados en México ⁽⁵¹⁾ donde en los meses que se reportan las temperaturas más bajas (enero-abril: 24-25 °C) inicia la gametogénesis hasta llegar a los meses más cálidos (julio-octubre: 30-31°C) donde se generan los desoves.

Después de los 60 días de acondicionamiento se observó una reabsorción de los gametos, demostrada por la regresión ocurrida en los estadios gonadales con respecto a los primeros 30 días, con más del 50% de organismos en estadio 0 en los tratamientos CHA, TETRA y EST. De igual forma los tratamientos TETRA y SIN que continuaron con el acondicionamiento por 42 días adicionales ⁽²⁸⁾ registraron 80% y 33,33 % de los organismos en estadio 0, respectivamente. Esta reabsorción o atresia de los gametos no desovados ha sido descrita en *C. gigas*, en donde se indica que la reabsorción de gametos es un paso indispensable para la limpieza y reinicio de un ciclo reproductivo ⁽⁵⁴⁾. De igual forma, es importante mencionar que los procesos de desarrollo gonadal llevados a cabo en laboratorio no son cíclicos difiriendo de las investigaciones realizadas en los ciclos reproductivos anuales en el medio natural ^(33, 51), ya que las células después de realizar divisiones

celulares en varias generaciones detienen sus divisiones y entran en un periodo de crecimiento ⁽¹⁹⁾.

Existe muy poca información sobre la variación en la frecuencia del sexo para el género *Crassostrea*, al parecer podría estar genéticamente controlada ó influenciada por factores ambientales ⁽⁵⁴⁾. Por ejemplo, lugares donde existe buena disponibilidad de alimento se registra mayor proporción de hembras ⁽²⁰⁾. Durante esta investigación la composición y combinación de microalgas utilizadas no generaron un dominio de hembras durante todo el acondicionamiento (50% en CHA, 17% en TETRA y EST a los 30 días). De igual forma no se pudo determinar el efecto de las dietas en la variación o frecuencia sexual de un organismo en particular debido a que no se realizaron cortes histológicos en el mismo individuo.

Los pesos promedios registrados en los tratamientos evaluados en condiciones controladas no presentaron una relación directa con el desarrollo gonadal observado en los cortes histológicos, como ha ocurrido en otras investigaciones que lo asocian al peso relativo de la gónada y a otros factores como la temperatura ^(55, 56). Sin embargo, el aumento de peso registrado supone una relación debido a que el tratamiento EST aumentó $10,78 \pm 8,07$ g y desarrolló un 34% de organismos en estadio 3.

Sería importante evaluar el efecto de diferentes temperaturas en condiciones controladas y evaluar la fertilidad de gametos viables ⁽⁵⁴⁾

para establecer un posible régimen de producción con el objetivo de obtener larvas viables durante todo el año. Por otro lado, no hay que descartar las ventajas que genera mantener reproductores en un medio natural (canal reservorio) haciendo evaluaciones que permitan identificar grupos de microalgas mejor aprovechadas para esta especie. De igual forma, conocer los componentes nutricionales y tasas de filtración con el fin de buscar alternativas para evitar gastos de producción que generaría acondicionar reproductores en laboratorio.

CONCLUSIONES

1. El proceso de depurado generó efectos en los organismos registrando 67% de individuos en estadio 0 (indeterminado) y disminución de organismos machos en los organismos sometidos a este proceso.
2. Los tratamientos que utilizaron dietas monoespecíficas: *Chaetoceros gracilis* (CHA) y *Tetraselmis maculata* (TETRA) registraron el mayor avance gonadal con 17% de organismos en estadio 3 (madurez definida) a los 30 días de acondicionamiento, en comparación con los otros tratamientos mantenidos en el laboratorio ($19,61 \pm 0,87$ °C).
3. El tratamiento con la productividad natural en el canal reservorio (EST) a una temperatura de $27,01 \pm 2,02$ °C registró el mayor avance de todos los tratamientos con el 33% de organismos en estadio 3 a los 30 días de acondicionamiento.
4. No se observaron avances gonadales en el tratamiento TETRA a los 60 días de acondicionamiento (68% de individuos en estadio 0). De igual forma los tratamientos CHA y EST registraron 50 % de los organismos en estadio 0.
5. No se observaron indicios sobre el desarrollo de un nuevo ciclo gonadal, debido a la reabsorción de las gónadas a los 60 días de acondicionamiento y corroborado en el tratamiento TETRA a los 102 días el cual registró 80% organismos en estadio 0.

6. El tratamiento MAR registro 17% de organismos en estadio 4 (desove) a los 30 días y 50% de organismos en estadio 0 a los 60 días, indicando que espera condiciones favorables para desarrollar gametos y su posterior desove natural.
7. El tratamiento sin alimentar (SIN), mantuvo 34% de organismos en estadio 2 durante toda la fase de acondicionamiento, posiblemente se demuestra la utilización de reservas energéticas para el desarrollo de gametos.
8. Durante este trabajo el tratamiento mezcla (CIT) no dio resultados de desarrollo gonadal avanzado, registrando el 34% y 66% de organismos en estadio 1 (desarrollo temprano) a los 30 y 60 días de acondicionamiento, respectivamente.
9. No existió predominancia de hembras en ninguno de los tratamientos (50% en CHA, 17% en TETRA y 0% de CIT a los 30 días) del laboratorio a pesar de la disponibilidad de microalgas en el laboratorio (2% peso seco).

RECOMENDACIONES

1. Evaluar el acondicionamiento a diferentes rangos de temperaturas superiores a 20 °C, para observar el efecto en la viabilidad de los gametos y tiempo de acondicionamiento.
2. Realizar un estudio nutricional sobre los requerimientos necesarios para la especie *C. iridescens*.

ANEXO 1

Técnicas de Histología aplicadas a la experimentación (Modificado de Bell y Lightner, 1998.)

Toma de muestras

Se procedió al sacrificio de las ostras adultas seleccionadas al azar en cada tratamiento, para extraerle las gónadas y definir su estadio gonadal. No se deben utilizar ostras muertas.

Fijación o Preservación

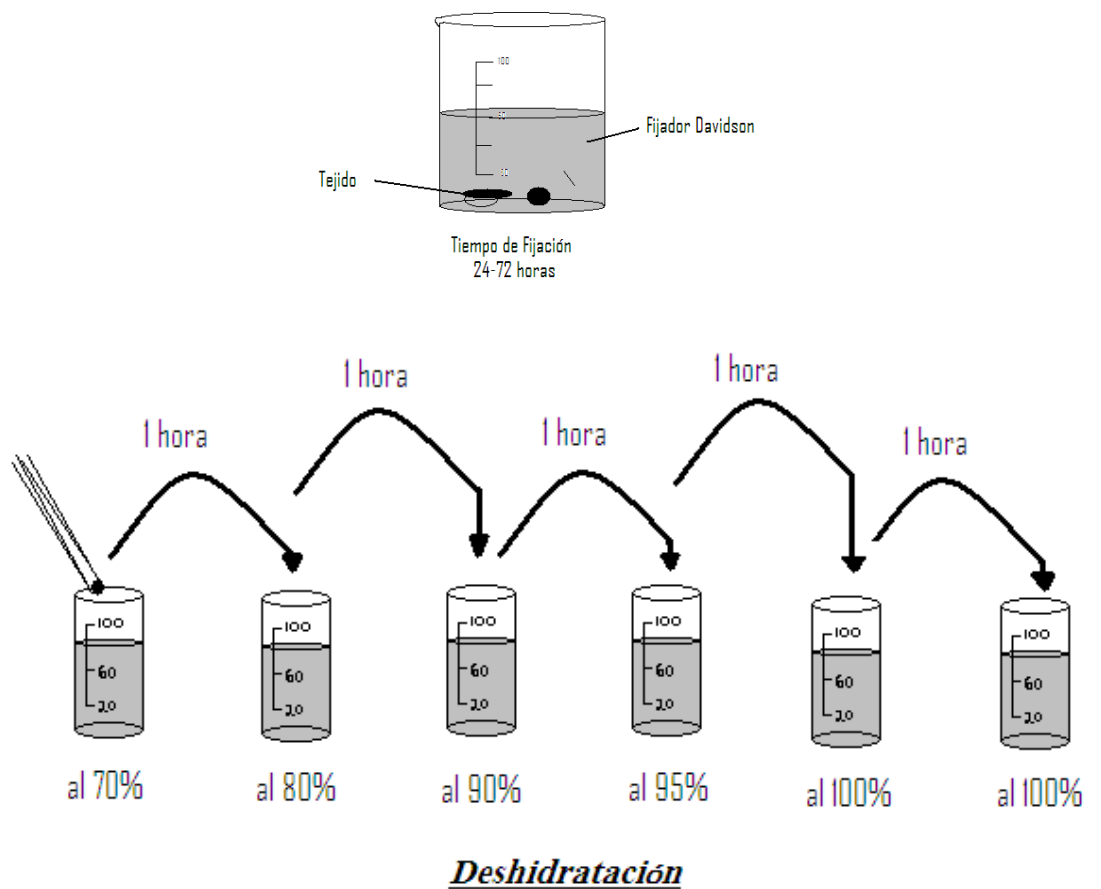
Mantener un volumen de fijador adecuado por muestra aproximadamente diez veces el volumen de cada muestra. El fijador a utilizar es el Davidson, que es el más recomendable para invertebrados, el cual está compuesto por:

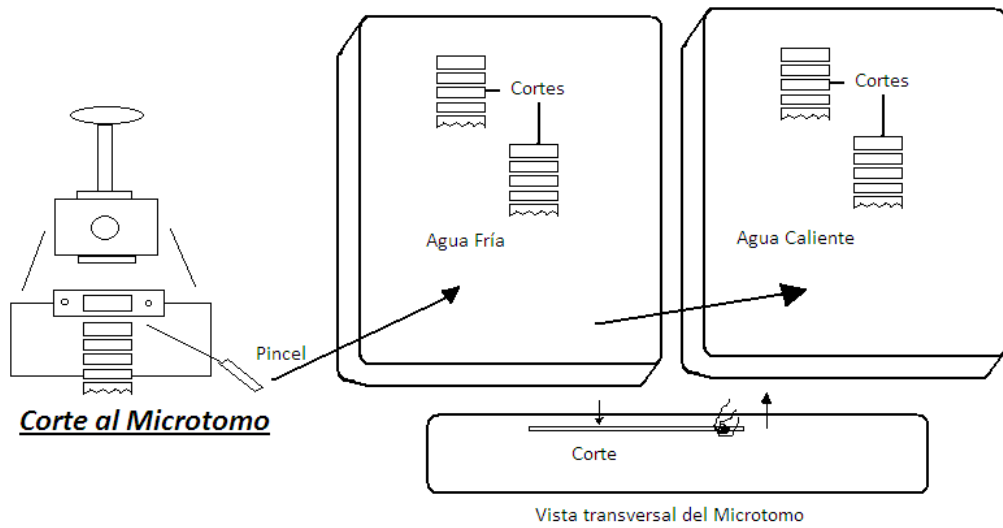
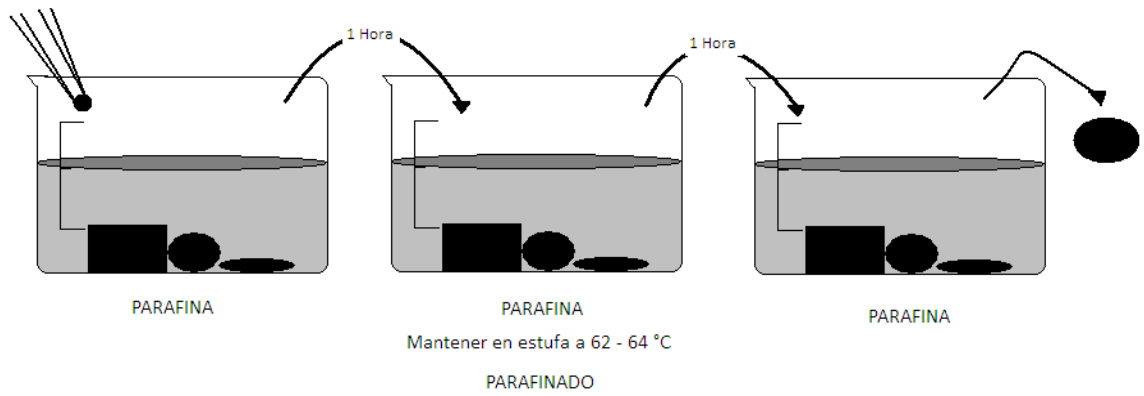
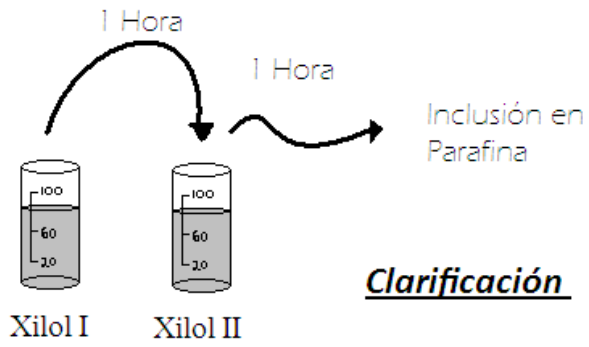
- ✓ 330 ml de Alcohol Etilico al 95%
- ✓ 220 ml de Formol (Solución acuosa saturada de gas formaldehido en una solución al 37-39%).
- ✓ 115 ml de Ácido Acético Glacial
- ✓ 335 ml de agua destilada (se puede también utilizar agua corriente)

Esta solución puede ser mantenida a temperatura ambiente.

Las muestras, una vez fijadas, deben ser pasadas a alcohol etílico al 50 % (ó 70%), donde pueden ser almacenadas por un período indefinido de tiempo.

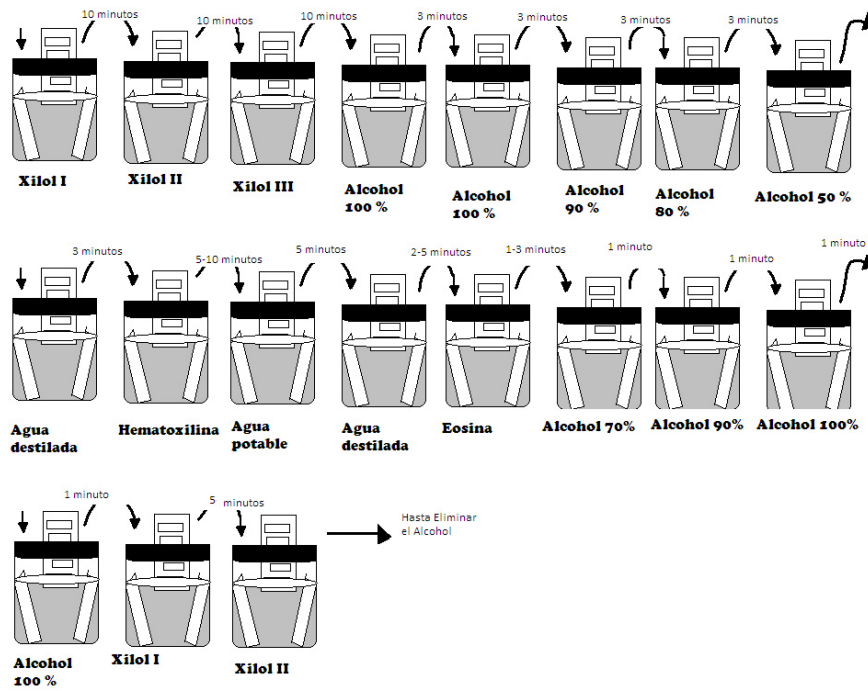
Cabe mencionar que el proceso de fijación, es para desnaturalizar la proteína y preservar los tejidos. La deshidratación sirve para eliminar el exceso de agua que se encuentra en el tejido; Y, el desparafinado elimina el exceso de parafina que hay en las placas.





Tinción (Hematoxilina- Eosina)

- ✓ Xilol (3 veces) 10 minutos
- ✓ Etanol al 100% 3 minutos
- ✓ Etanol al 90% 3 minutos
- ✓ Etanol al 80% 3 minutos
- ✓ Etanol al 50% 3 minutos
- ✓ Agua destilada 3 minutos
- ✓ Hematoxilina (de Mayer) 5 – 10 Minutos
- ✓ Agua de la Llave 5 minutos
- ✓ Eosina-Floxina 1-3 minutos
- ✓ Agua destilada 2-3 inmersiones
- ✓ Etanol al 70% 1 minuto
- ✓ Etanol al 90% 1 minuto
- ✓ Etanol al 100% (dos veces) 5 minutos
- ✓ Xilol I y II 5 minutos



Solución Pegamento

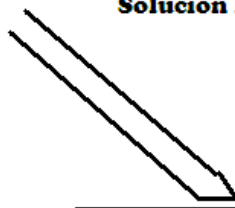


Lámina Cubreobjeto

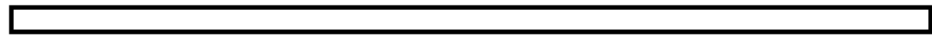


Lámina Portaobjetos

Vista Longitudinal



Vista Transversal de una placa montada

BIBLIOGRAFÍA

1. Documento de la Subsecretaría de Recursos Pesqueros. Acuerdo Ministerial N° 136. <http://www.subpesca.gov.ec/subpesca287-acuerdo-ministerial-136-veda-permanente-del-recurso-concha-spondylus.html>.
2. Cobo, M.L., D. Ortega, S. Sonnenholzner. 2007. Capacitación técnica y transferencia tecnológica a un grupo de buzos de la comuna La Entrada en la maricultura de la ostra del Pacífico (*Crassostrea gigas*). Un esfuerzo de responsabilidad social empresarial. Ed. 4. Enero-agosto. Fundación NOBIS-ODEBRECHT.
3. Fabara, M. 2003. The Age of *Spondylus* and management implications. A Feasibility analysis for the Management and Conservation of the Spiny Rock-Scallop, *Spondylus calcifer* in the Southern Coast of Manabí, Ecuador. Thesis for the attainment of Master's degree in Marine Affairs, University of Washington, pp.86.
4. Wilson, J., O. Chaparro, R. Thompson. 1996. The importance of broodstock nutrition on the viability of larvae and spat in the Chilean oyster *Crassostrea chilensis*. *Aquaculture*, 139: 63-75.
5. Cerón, A.N., B. Cordero, B. Arredondo-Vega, M. Robles. 2006. Growth of *Lyropecten (Nodipecten) subnodosus* (Sowerby, 1835) spat fed with three microalgae mixtures diets. *Journal of Fisheries International* 1 (1-2): 01-07.

6. Lavens, P., P. Sorgeloos. 1996. Manual on the production and use of live food for aquaculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations pp: 39-48.
7. Utting, S., P. Millican. 1997. Techniques for the hatchery conditioning of bivalve broodstocks and subsequent effect on egg quality and larval viability. *Aquaculture* 155: 45-54.
8. Duerr E., A. Molnar, V. Sato. 1998. Cultured microalgae as aquaculture feeds. *Journal of Marine Biotechnology* 7: 65-70.
9. López D., J. Sánchez, J. García, F. García, E. Molina. 1996. Microalga marina y su empleo en acuicultura y en la obtención de ácidos grasos poliinsaturados. N° de publicación: ES2088366. Oficina española de patentes y marcas, España.
10. Álvarez, R., L. Cobo, S. Sonnenholzner, S. Stern. 2008. Estado actual de la acuicultura de moluscos bivalvos en Ecuador. En A. Lovatelli, A. Farias e I. Uriarte (eds). Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina. Taller Técnico Regional de la FAO. 20–24 de agosto de 2007, Puerto Montt, Chile. *FAO Actas de Pesca y Acuicultura*. No. 12. Roma, FAO. pp. 129–133.
11. Blacio, E., R. Álvarez. 2002. Tecnología para el cultivo de Scallops (*Argopecten circularis*, Sowerby 1835) en Ecuador. *El Mundo Acuícola* Vol. 8(1): 56-58.

12. Cobo, M.L., D. Ortega, S. Sonnenholzner. 2007. Proyecto de Cultivo de Moluscos (*Spondylus*) con usuarios tradicionales en Salango, Provincia del Guayas. Informe Final. Proyecto PMRC. Fundación CENAIM-ESPOL. 1-38.
13. FAO Yearbook of Fishery Statistics, Aquaculture Production. 2008. Summary Table. <ftp://ftp.fao.org/fi/stat/summary/a-4.pdf>
14. National Marine Fisheries Service-Economics Division. Total de Exportaciones a EEUU 2008. Asociación de Exportadores de Pesca Blanca del Ecuador. ASOEXPEBLA. <http://www.pescablanca.com/pesca-blanca.php?id=101&gid=8>
15. Mora, E. 1990. Catálogo de Bivalvos Marinos del Ecuador. Instituto Nacional de Pesca. Boletín Científico Técnico Volumen X: Número 1. pp: 51.
16. Castillo, Z., A. García. 1984. Taxonomía y anatomía comparada de las Ostras en las Costas de México. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología. Universidad Nacional Autónoma de México. Artículo 230 Vol. 13(2): 249-314.
17. Hernández, S. M. 2005. Distribución y Abundancia de Larvas de Ostras del Género *Crassostrea* (Bivalvia: Ostreidae) en Playas Rocosas del Departamento de La Unión, El Salvador. Tesis para optar al grado de Licenciatura de Biología, Escuela de Biología, Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas. Universidad de El Salvador. 91 pp.

18. Morton, B. 1983, Feeding and Digestion in Bivalvia. The Mollusca, Vol. 5. Physiology, part 2. Academic Press, Inc. pp: 65-147.
19. Galtsoff, P.S. 1964. The American Oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin). Fishery Bulletin. Vol. 64: 219-354.
20. Helm, M., P. Millican. 1977. Experiments in the hatchery rearing of Pacific Oyster larvae (*Crassostrea gigas* Thunberg). Aquaculture, 11:1-12.
21. Román, G., G. Martínez, O. García, L. Freites. 2001. Reproducción. Los Moluscos Pectínidos de Iberoamérica: Ciencia y Acuicultura. A.N. Maeda-Martínez (ed.) Cap. 2: 27-59.
22. Mackie, G. 1984. Reproduction. The Mollusca, Vol. 7 Academic Press, Inc. pp: 351-418.
23. Cleland, K. W. 1947. Some observations on the cytology of oogenesis in the Sydney Rock oyster (*Ostrea commercialis*). Proceedings of the Linnean Society of New South Wales, Vol. 72, pp. 159-182.
24. Gabbott, P.A. 1983. Developmental and seasonal metabolic activities in marine mollusks. Pp. 165-217. En: P.W. Hochachka (ed.) The Mollusca, vol.2, Environmental Biochemistry and Physiology. Academic Press, New York.
25. Robinson, A. 1992. Dietary supplements for reproductive conditioning of *Crassostrea gigas kumamoto* (Thunberg). I. Effects on gonadal development, quantity of ova and larvae through metamorphosis. Journal of Shellfish Research, Vol. 11(2): 437-441.

26. Chávez-Villalba, J., J. Pommier, J. Andreamiseza, S. Pouvreau, J. Barret, J. Cochard, M. Le Penneç. 2002. Broodstock conditioning of the oyster *Crassostrea gigas*: origin and temperature effect. *Aquaculture* 214: 115-130.
27. Walne, P.R. 1979. *Culture of Bivalve Molluscs, 50 years Experience at Conwy Fishing News Book, UK, 189 pp.*
28. Hardy, D. 1991. *Scallop Farming. Fishing News Books. United Kingdom: 31-85 pp.*
29. Muranaka, M., J. Lannan. 1984. Broodstock management of *Crassostrea gigas*: environmental influences on broodstock conditioning. *Aquaculture*, 39: 217– 228.
30. King, M. 1977. Cultivation of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in a non-tidal hyper saline pond. *Aquaculture*, 11:123-136.
31. Hughes-Games, W. 1977. Growing the Japanese oyster (*Crassostrea gigas*) in subtropical fish pounds. I. Growth rate, survival and quality index. *Aquaculture*, 11:217-229.
32. Nell, J., J. Holliday. 1988. Effects of salinity on the growth and survival of Sydney rock oyster (*Saccrostrea commercialis*) and Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) larvae and spat. *Aquaculture*, 68: 39-44.
33. Fournier, M. 1992. The reproductive biology of the tropical rocky oyster *Ostrea iridescens* (Bivalvia: Ostreidae) on the Pacific coast of Costa Rica. *Aquaculture* 101: 371.378.

34. Farías-Molina, A. 2001. Nutrición en Moluscos Pectínidos. Los moluscos pectínidos de Iberoamérica: Ciencia y Acuicultura. A.N. Maeda Martínez (ed.) Cap.5: 89-104.
35. Gallager, S., R. Mann. 1986. Growth and Survival of Larvae of *Mercenaria Mercenaria* (L.) and *Crassostrea virginica* (Gmelin) Relative to Broodstock Conditioning and Lipid Content of Eggs. *Aquaculture* 56:105-121
36. Millán, M. 1997. Experimentos de inducción a la maduración gonádica de *Argopecten ventricosus* (Sowerby, 1842) y estudio del valor nutricional de *Isochrysis galbana* y *Chaetoceros gracilis*, durante su crianza larvaria. Tesis de Maestría en Ciencias en Acuicultura, Universidad Autónoma de Baja California Sur. La Paz, México.
37. Berthelin, C., K. Kellner, M. Mathieu. 2000. Storage metabolism in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in relation to summer mortalities and reproductive cycle (West coast of France). *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology* 125: 359-369.
38. Ren, J., I. Marsden, A. Ross, D. Schiel. 2003. Seasonal variation in the reproductive activity and biochemical composition of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) from the Marlborough Sounds, New Zealand. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 37: 171-182.

39. Matus de la Parra A, O. García, F. San Juan. 2005. Seasonal variations on the biochemical composition and lipid classes of the gonadal and storage tissues of *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1974) in relation to the gametogenic cycle. *Journal of Shellfish Research* 24: 457-467.
40. Martínez, G., M. Torres, E. Uribe, M.A. Díaz, H. Pérez. 1992. Biochemical composition of broodstock and early juvenile Chilean scallops, *Argopecten purpuratus* Lamarck 1819. *Journal Shellfish Resource* 11: 307-313.
41. Barber, J., N. Blake. 1981. Energy storage and utilization in relation to gametogenesis in *Argopecten irradians concentricus* (Say). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 52: 121-134.
42. Chotipuntu, P. 2005. Marine diatom (*Chaetoceros calcitrans*) as a monospecies diet for conditioning oyster (*Crassostrea belcheri* Sowerby) broodstock. *Walailak J Sci & Tech* 2005; 2(2): 201-207.
43. Becker, E. 2007. Micro-algae as a source of protein. *Biotechnology Advances*. Elsevier B.V. Volumen 25, Issue 2, Marzo-Abril 2007, Pages 207-210.
44. Robert, R., G. Parisi, L. Rodolfi, B. Poli, M. Tredecchi. 2001. Use of fresh and preserved *Tetraselmis suecica* for feeding *Crassostrea gigas* larvae. *Aquaculture* 192: 133-346.

45. Ukeles, R., G. Wikfors. 1988. Nutritional value of microalgae cultured in the absence of vitamins for growth of juvenile oysters, *Crassostrea virginica*. *Journal of Shellfish Resource* 7: 381-387.
46. Wikfors, G., P. Gladu, G. Patterson, G. Ferris, B. Smith. 1990. The role of sterols in oyster nutrition: evidence from Milford feeding studies. Abstract in Blogoslawski W. J.: A Brief Perspective on the Milford Shellfish Biology Seminar Series (1975-1990).
47. Pattersen, G., E. Tsitsa-Tzardis, G. Wikfors, P. Gladu, D. Chitwood, D. Harrison. 1993. Sterol of *Tetraselmis* (Prasinophyceae). *Comp. Biochemical Physiology*. Vol. 105B, No. 2, pp. 253-25.
48. Bell T., D. Lightner. 1998. A handbook of normal shrimp histology. World Aquaculture Society. Baton Rouge. Louisiana. 198 pp.
49. Sastry, A. 1970. Reproductive physiological variations in latitudinally separated populations of the Bay Scallop *Aequipecten irradians* Lamarck. *Biological Bulletin* 138: 56-65.
50. Lannan, J., A. Robinson, W. Breese. 1980. Broodstock management of *Crassostrea gigas* II. Broodstock conditioning to maximize larval survival. *Aquaculture* 21: 337-345.
51. Cuevas, C., A. Martínez. 1979. Estudio gonádico de *Crassostrea corteziensis* Hertlein, *C. palmula* Carpenter y *C. iridescens* Hanley de San Blas, Nayarit, México (Bivalvia: Ostreidae). *Instituto de Ciencias del Mar y Limnología. Universidad Nacional Autónoma de México*, 6: 81-98.

- 52.Mamat, N. 2010. Nutrition and broodstock conditioning of the New Zealand Pipi, *Paphies australis*. A thesis submitted to Auckland University of Technology in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Applied Science (MAppSc), pp 128.
- 53.Cannuel, R., P. Beningera. 2005. Is oyster broodstock feeding always necessary? A study using oocyte quality predictors and validators in *Crassostrea gigas*. Aquatic Living Resour. 18: 35–43.
- 54.Fabioux, C., M. Le Pennec, A. Huveta, P. Le Souchua, S. Pouvreau. 2005. Temperature and photoperiod drive *Crassostrea gigas* reproductive internal clock. Aquaculture 250: 458-470.
- 55.Arreola, J. 1997. Aspectos Reproductivos de *Dosinia ponderosa*, Gray 1838 (Bivalvia:Veneridae) en Punta Arena, Bahía Concepción, B.C.S. Tesis para obtener el grado de maestro en ciencias con especialidad en manejo de recursos marinos. Instituto Politécnico Nacional (CICIMAR), pp. 82.
- 56.Baquerizo, J. 2003. Análisis comparativo de diferentes dietas para el acondicionamiento de reproductores de ostión de mangle *Crassostrea columbiensis*, Hanley 1.846. Tesis para obtener el grado de acuicultor. Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL), pp. 73.