



# **ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL**

Facultad de Ingeniería Marítima, Ciencias Biológicas, Oceánicas y  
Recursos naturales

**“Desarrollo de protocolos de manejo para la inducción al desove y  
larvicultura de la ostra nativa *Crassostrea iridescens* (Hanley, 1854)”**

**TESIS DE GRADO**

Previa a la obtención del Título de:

**BIÓLOGO**

**Presentado por:**

Alfredo Gabriel Loor Mera

**Guayaquil-Ecuador**

**AÑO: 2012**

## **AGRADECIMIENTO**

A Dios, por guiar mi vida.

A mi director Wilfrido Argüello M.Sc, por la guía y el apoyo constante durante la realización de este trabajo.

Al CICYT, y a su director, Jorge Calderón. Ph.D. por el financiamiento de la tesis.

A Fanny Panchana y Doris Reyes, por el aporte brindado en las áreas de histopatología y fitoplancton.

Al personal del laboratorio de moluscos, en especial a Pedro Aquino y Víctor Granado por su esmerada dedicación en las rutinas de trabajo.

A Cecilia Campoverde, por la ayuda proporcionada para encontrar bibliografía.

A mis amigos en el CENAIM, en especial a Estefanía Gutiérrez, María Fernández y José Luis Vélez.


Alfredo Loor M.

## **DEDICATORIA**

A Dios, a mis padres Fernando Loor y Anita Mera, y a mis hermanos Fernando, David, Colón Andrés y a mi sobrinito Matías. A todos mis amigos (as) de la Facultad.

Alfredo Loor M.

## TRIBUNAL DE GRADUACIÓN



Jerry Landívar, M.Sc.  
**PRESIDENTE DEL TRIBUNAL**



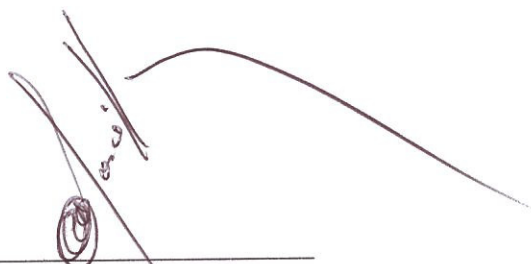
Wilfrido Argüello, M.Sc.  
**DIRECTOR DE TESIS**



Marco Álvarez, M.Sc.  
**CO-DIRECTOR DE TESIS**



Marcelo Muñoz, Ph.D.  
**MIEMBRO PRINCIPAL**

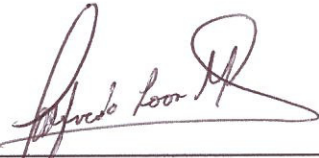


Ecuador Marcillo, M.Sc.  
**MIEMBRO PRINCIPAL**

## DECLARACIÓN EXPRESA

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

(Reglamento de graduación de la ESPOL)



---

Alfredo Loor M.

## RESUMEN

El ostión de roca (*Crassostrea iridescens*), es una especie de molusco bivalvo de valor comercial presente en la zona tropical de la costa del Pacífico americano, a pesar de ser un candidato para Acuicultura, se conoce muy poco sobre la producción de semillas en laboratorios. En este estudio se acondicionaron reproductores de *C. iridescens* en tres ambientes diferentes: dos de ellos, a  $28,26 \pm 0,87^{\circ}\text{C}$  ( $28^{\circ}\text{C}$ ) y  $22,20 \pm 0,90^{\circ}\text{C}$  ( $22^{\circ}\text{C}$ ), ambos con una dieta combinada de microalgas *Chaetoceros gracilis* e *Isochrysis galbana* (150 y 100 células. $\mu\text{L}^{-1}.\text{día}^{-1}$  respectivamente), y un tercer grupo mantenido en el reservorio de la Estación Experimental CENAIM-ESPOL, a  $24,46 \pm 2,09^{\circ}\text{C}$  (*Reservorio*). Los resultados mostraron que el acondicionamiento  $28^{\circ}\text{C}$  fue el único que alcanzó etapas avanzadas de desarrollo gonadal.

Se aplicaron siete estímulos externos para inducción al desove: cambios en la temperatura cada 60 minutos (*T60'*), cambios en la temperatura cada 30 minutos (*T30'*), incremento de la temperatura y desecación (*TAD*), disminución de la salinidad (*Smenos*), incremento de la salinidad (*Smas*), sobrealimentación (*SobA*) y adición de espermatozoides (*Esp*). Luego de 1 hora de aplicado el último estímulo, se adicionó espermatozoides. Se determinó el porcentaje de

desoves, tiempo de respuesta a la inducción, producción de óvulos y porcentaje de fertilización. Los resultados mostraron que el acondicionamiento 28°C obtuvo el mayor porcentaje de desoves (51,79%), a diferencia de 22°C (5,36%) y *Reservorio* (0%). El análisis de las variables evaluadas se lo realizó con los resultados obtenidos solo por el acondicionamiento 28°C. El estímulo *TAD* registró el 100% de organismos desovados y con menor tiempo promedio de respuesta (1,40±1,01 h). La producción de óvulos y el porcentaje de fertilización fueron en promedio 34,88±23,81\*10<sup>6</sup> y 89,82±5,90%, respectivamente. La adición de espermatozoides potenció el éxito del desove en los estímulos *T60'*, *T30'*, *TAD* y *Smenos*. Finalmente se describe el desarrollo embrionario y larvario de esta especie y se discute los factores que pudieron afectar en su crecimiento (7,21 μm.día<sup>-1</sup>) y supervivencia (1% día 22).

**Palabras claves:**

Desarrollo gonadal, inducción, desove, larvicultura, *Crassostrea iridescens*

# ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTO .....	ii
DEDICATORIA .....	iii
TRIBUNAL DE GRADUACIÓN.....	iv
DECLARACIÓN EXPRESA.....	v
RESUMEN .....	vi
ÍNDICE GENERAL .....	viii
ABREVIATURAS.....	xii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xiv
ÍNDICE DE TABLAS.....	xv
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPITULO I.....	4
1.1. <u>GENERALIDADES DEL OSTIÓN DE ROCA, <i>Crassostrea iridescens</i></u> .....	4
1.1.1. <u>DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA</u> .....	4
1.1.2. <u>TAXONOMÍA</u> .....	5
1.1.3. <u>MORFOLOGÍA DE LAS VALVAS</u> .....	5
1.1.4. <u>ANATOMÍA</u> .....	7
1.2. <u>ACONDICIONAMIENTO DE REPRODUCTORES</u> .....	7
1.2.1. <u>TEMPERATURA</u> .....	8
1.2.2. <u>SALINIDAD</u> .....	9
1.2.3. <u>ALIMENTACIÓN</u> .....	10



1.2.4. <u>FACTORES INTRÍNSECOS</u> .....	11
1.3. <u>DESARROLLO GONADAL</u> .....	12
1.4. <u>DESOVE EN AMBIENTES NATURALES</u> .....	14
1.5. <u>INDUCCIÓN AL DESOVE</u> .....	15
1.5.1. <u>ESTÍMULOS EXTERNOS</u> .....	16
1.5.1.1 Temperatura.....	16
1.5.1.2 Salinidad .....	17
1.5.1.3 Sobrealimentación .....	18
1.5.2. <u>ESTÍMULOS INTERNOS</u> .....	18
1.5.2.1 Cloruro de potasio.....	18
1.5.2.2 Serotonina.....	19
1.5.3. <u>STRIPPING</u> .....	19
1.6. <u>DESARROLLO EMBRIONARIO Y LARVARIO EN BIVLAVOS, según Helm <i>et al.</i> (2006) <sup>(16)</sup></u> .....	20
1.7. <u>CULTIVO DE LARVAS</u> .....	22
1.7.1. <u>FIJACIÓN Y METAMORFOSIS</u> .....	24
CAPITULO II. ....	26
2. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u> .....	26
2.1. <u>LUGAR DE ESTUDIO</u> .....	26
2.1.1 <u>SITIO DE EXTRACCIÓN</u> .....	27
2.2. <u>MANEJO DE REPRODUCTORES</u> .....	28
2.3. <u>DETERMINACIÓN DE LA CONDICIÓN GAMETOGÉNICA</u> .....	31

2.4 <u>INDUCCIÓN AL DESOVE</u> .....	33
2.4.1. <u>CAMBIOS DE TEMPERATURA CADA 60 MINUTOS (T60)</u> .....	33
2.4.2. <u>CAMBIOS DE TEMPERATURA CADA 30 MINUTOS (T30')</u> .....	34
2.4.3. <u>INCREMENTO DE TEMPERATURA Y DESECACIÓN (TAD)</u> .....	34
2.4.4. <u>DISMINUCIÓN DE SALINIDAD (Smenos)</u> .....	35
2.4.5. <u>INCREMENTO DE SALINIDAD (Smas)</u> .....	35
2.4.6. <u>SOBREALIMENTACIÓN (SobA)</u> .....	36
2.4.7. <u>ADICIÓN DE ESPERMATOZOIDES (Esp)</u> .....	36
2.5 <u>LARVICULTURA</u> .....	38
2.6 <u>ANÁLISIS ESTADÍSTICO</u> .....	40
CAPITULO III .....	42
3. <u>RESULTADOS</u> .....	42
3.1. <u>ACONDICIONAMIENTO DE REPRODUCTORES</u> .....	42
3.1.1. <u>ÍNDICE GONADOSOMÁTICO (IGS)</u> .....	45
3.2. <u>INDUCCIÓN AL DESOVE</u> .....	46
3.2.1. <u>PORCENTAJE DE ORGANISMOS DESOVADOS</u> .....	48
3.2.2. <u>TIEMPO DE RESPUESTA A LOS ESTÍMULOS DE INDUCCIÓN</u> .....	49
3.2.3. <u>PRODUCCIÓN DE ÓVULOS Y FERTILIZACIÓN</u> .....	51
3.3. <u>DESARROLLO EMBRIONARIO Y LARVARIO</u> .....	52
3.4. <u>FIJACIÓN</u> .....	57
CAPITULO IV .....	58
4. <u>DISCUSIÓN</u> .....	58
4.1. <u>DESARROLLO GONADAL</u> .....	58

4.2. <u>ÍNDICE GONADOSOMÁTICO</u> .....	64
4.3. <u>INDUCCIÓN AL DESOVE Y TIEMPO DE RESPUESTA</u> .....	64
4.4. <u>PRODUCCIÓN Y FERTILIZACIÓN DE ÓVULOS</u> .....	69
4.5. <u>DESARROLLO EMBRIONARIO Y LARVARIO</u> .....	71
CONCLUSIONES .....	76
RECOMENDACIONES .....	78
ANEXO I – Técnicas Histológicas.....	80
BIBLIOGRAFÍA .....	83

## ABREVIATURAS

°C	Grados Celsius
ANOVA	Análisis de Varianza
cel	Células
CENAIM	Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas
cm	Centímetros
DHA	Ácido docosahexaenoico
DS	Desviación Estándar
EPA	Ácido eicosapentaenoico
ESPOL	Escuela Superior Politécnica del Litoral
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación
g	Gramo
HUFA	Ácidos Grasos Altamente Insaturados
IGS	Índice Gonadosomático
KCl	Cloruro de Potasio
L	Litros
m	Metros
mg	Miligramo
min	Minutos
mL	Mililitro

mm	Milímetros
Mn	Manganeso
N	Normal
<i>n</i>	Número de réplicas
OD	Oxígeno Disuelto
PVC	Policloruro de Vinilo
S	Sur
TM	Tonelada métrica
UV	Ultravioleta
W	West (oeste)
μL	Microlitros
μm	Micrómetros – Micras

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Anatomía del ostión de roca <i>Crassostrea iridescens</i> .....	6
<b>Figura 2.</b> Sitio de extracción de las ostras <i>Crassostrea iridescens</i> . .....	28
<b>Figura 3.</b> Acondicionamiento para la maduración de <i>Crassostrea iridescens</i> .....	30
<b>Figura 4.</b> Cortes histológicos de gónadas de <i>Crassostrea iridescens</i> .....	32
<b>Figura 5.</b> Laboratorio de Moluscos CENAIM-ESPOL utilizado para la larvicultura de <i>Crassostrea iridescens</i> .....	39
<b>Figura 6.</b> Etapas de madurez gonadal de ostras <i>Crassostrea iridescens</i> antes y después de 7 semanas de acondicionamiento.....	43
<b>Figura 7.</b> Etapas de desarrollo gonadal encontrados en <i>Crassostrea iridescens</i> (400X).....	44
<b>Figura 8.</b> Proporción de sexos de las ostras antes y después de siete semanas de acondicionamientos.....	45
<b>Figura 9.</b> Porcentaje de organismos desovados y tiempo de respuesta promedio por tratamientos (Acondicionamiento 28°C).....	49
<b>Figura 10.</b> Tiempo de respuesta de los organismos desovados por tratamientos (Acondicionamiento 28°C).....	50
<b>Figura 11.</b> Expulsión de gametos de <i>Crassostrea iridescens</i> .....	51
<b>Figura 12.</b> Desarrollo embrionario de <i>Crassostrea iridescens</i> en las primeras 24 horas.....	53
<b>Figura 13.</b> Desarrollo larvario y semilla de <i>Crassostrea iridescens</i> .....	54
<b>Figura 14.</b> Porcentaje de supervivencia de larvas de <i>Crassostrea iridescens</i> (media±DE; n=2).....	55
<b>Figura 15.</b> Altura de la valva (media±DE; n=20) de <i>Crassostrea iridescens</i> durante su desarrollo larvario.....	56

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla I.</b> Ración alimenticia diaria (cél.µL-1) proporcionada durante el período larvario.....	39
<b>Tabla II.</b> Peso total, peso de tejido blando e índice gonadosomático general y por etapa de desarrollo gonadal para <i>Crassostrea iridescens</i> antes y después de diferentes acondicionamientos. ....	47

## INTRODUCCIÓN

El ostión de roca (*Crassostrea iridescens*), es un molusco bivalvo que se encuentra distribuido desde el sur de Baja California hasta el norte del Perú<sup>(1)</sup>. Registros indican que esta especie, al ser comercial<sup>(2)</sup> ha soportado volúmenes elevados de explotación en varios puntos de la costa del Pacífico<sup>(3)(4)(5)</sup>. En Ecuador, en la Provincia de Santa Elena, este molusco representa uno de los principales recursos para muchos pescadores artesanales, constituyendo una fuente de seguridad alimentaria y de mantenimiento de las economías locales, brindando posibilidades de empleo y mejoras sociales. Sin embargo, a pesar de no conocer la presión de extracción de esta especie, la escasa presencia de esta especie en lugares donde años anteriores era común encontrarlas, además del reducido tamaño de los ejemplares capturados, sugieren que actualmente haya sobrepasado su capacidad de recuperación en el medio natural.

La sobreextracción, causada por la demanda del mercado actual puede ser solventada mediante el desarrollo de la producción de semillas en laboratorios. Para ello, el primer paso es el acondicionamiento de los reproductores, su éxito depende de simular las condiciones que ocurren en la naturaleza durante el ciclo natural de reproducción, alcanzándose en muchas ocasiones con la manipulación de la temperatura<sup>(6)(7)(8)(9)(10)</sup>, y regímenes variados de alimentación que favorecen la viabilidad de los gametos para el



posterior desarrollo embrionario y larvario<sup>(8)(11)(12)(13)(14)(15)(16)</sup>. Sin embargo, información sobre el acondicionamiento de esta especie para la reproducción es muy escasa. Un estudio previo, menciona que ostras mantenidas en cuerpos de aguas naturales a temperaturas de  $27\pm 2^{\circ}\text{C}$  y con diversas microalgas (especialmente de las clases Bacillariophyceae y Cyanophyceae), pueden alcanzar la etapa de madurez gonadal al cabo de 30 días<sup>(17)</sup>. En ambientes naturales (Nayarit, México), se han registrado períodos de madurez gonadal en meses con temperaturas entre  $28\text{-}32^{\circ}\text{C}$  y salinidades constantes (sin mencionar el tipo de alimento presente)<sup>(3)(18)(19)</sup>.

La obtención de gametos viables provenientes de desoves causados por estimulación artificial es la segunda fase para la producción de semillas en laboratorio. A pesar de no existir registros previos de inducciones al desove de *C. iridescens*, se tiene información de muchas investigaciones en otros bivalvos, de los cuales, los métodos más comunes implican la estimulación externa, tales como cambios de temperatura<sup>(20)(21)(22)(23)(24)(25)(26)(27)(28)(29)(30)(31)(32)(33)(34)</sup>, cambios de salinidad<sup>(34)(35)(36)(37)(38)</sup>, sobrealimentación<sup>(39)(40)</sup> y adición de gametos maduros<sup>(41)</sup>. Así mismo, se han reportado trabajos que utilizan estímulos internos mediante la aplicación de químicos directamente a la gónada o músculo aductor en especies en los que estos órganos son visibles<sup>(30)(33)</sup>. Sin embargo, en *C. iridescens* supondría un daño o estrés al animal debido a que los órganos no están expuestos fácilmente. Cabe mencionar que la efectividad de

estos métodos varía dependiendo de la especie, estado de madurez y las condiciones ambientales en las cuales fueron acondicionadas.

Actualmente, la información sobre cultivos embrionarios y larvarios en especies del género *Crassostrea* es muy abundante, especialmente *C. gigas*<sup>(16)(42)(43)</sup>, *C. virginica*<sup>(16)(44)(45)</sup>, *C. belcheri*<sup>(46)</sup>, *C. madrasensis*<sup>(47)</sup> y *C. rhizophorae*<sup>(16)</sup>, no obstante, investigaciones en *C. iridescens* son inexistentes, requiriéndose de estudios sobre las variables ambientales que influyen sobre el crecimiento y supervivencia durante sus etapas de desarrollo embrionario y larvario.

El objetivo de este estudio fue evaluar la aplicación de estímulos externos para inducir desoves en *C. iridescens* acondicionados en 3 ambientes diferentes, determinando el porcentaje de desoves, tiempo de respuesta a la inducción, producción y porcentaje de fertilización de óvulos. Además de proveer información sobre las condiciones óptimas para la gametogénesis de esta especie. Finalmente se describe los primeros estudios de desarrollo embrionario y larvario hasta la fase de fijación, registrando crecimiento y porcentaje de supervivencia.

## **CAPITULO I.**

### **1.1. GENERALIDADES DEL OSTIÓN DE ROCA, *Crassostrea iridescens***

#### **1.1.1. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA**

El ostión de roca se encuentra distribuido desde el sur de Baja California hasta el norte del Perú<sup>(1)</sup>, incluyendo toda la franja costera ecuatoriana (Esmeraldas, Guayas, Santa Elena, Manabí y El Oro)<sup>(48)</sup>. Habita en costas rocosas ubicadas en mar abierto formando densos bancos y en ocasiones expuestas al

oleaje por debajo de la zona de mareas hasta los 7 metros de profundidad, aunque también pueden encontrarse entre los 24 y 79 m <sup>(1)(3)(18)(19)</sup>.

### 1.1.2. TAXONOMÍA

La clasificación taxonómica referida por Castillo y García (1984)<sup>(49)</sup> y Barnes (1989)<sup>(50)</sup> es la siguiente:

**CLASE:** BIVALVIA (También llamados Pelecípoda o Lamellibranchia).

**ORDEN:** OSTREOIDA

**SUBORDEN:** OSTREINA

**SUPERFAMILIA:** OSTREACEA

**FAMILIA:** OSTREIDAE

**SUBFAMILIA:** OSTREINAE

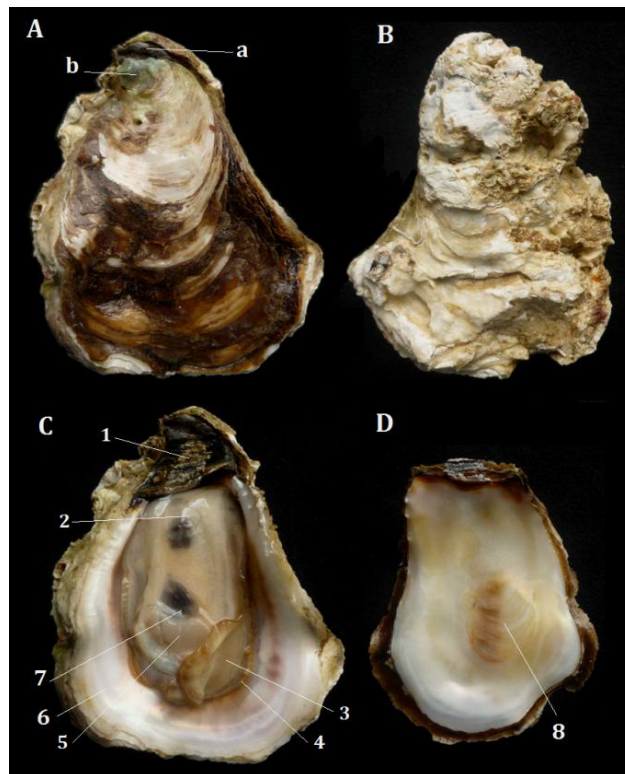
**GENERO:** *Crassostrea*

**ESPECIE:** *Crassostrea iridescens*; **Nombre común:** ostión de roca

### 1.1.3. MORFOLOGÍA DE LAS VALVAS

La ostra *C. iridescens* presenta una concha grande, pesada y gruesa, de forma alargada desde irregular-oval hasta casi rectangular. La valva izquierda

excede el tamaño de la valva derecha en convexidad, el umbo de la valva izquierda es pronunciado y significativamente curvo<sup>(51)</sup>.



**Figura 1.** Anatomía del ostión de roca *Crassostrea iridescens*: (A) valva derecha - vista externa; (B) valva izquierda - vista externa; (C) valva izquierda - vista interna; (D) valva derecha - vista interna. a: charnela; b: umbo; 1: ligamento; 2: gónada; 3: branquias; 4: manto; 5: músculo aductor; 6: concha; 7: corazón; 8: marca de músculo aductor. **Fuente:** Investigación realizada.

Poseen charnela casi recta, amplia y relativamente cuadrada, con un área ligamentosa ancha y elevada. Superficie externa de color púrpura, con líneas concéntricas formadas por láminas provistas de finas y numerosas estrías

radiales. Superficie interna de coloración iridiscente o metálica<sup>(49)</sup>. Los adultos miden alrededor de 162 mm de altura y 90 mm de longitud<sup>(49)</sup> (Fig. 1).

#### 1.1.4. ANATOMÍA

El extremo anterior de las branquias se une por una base acanalada a los palpos labiales. Las branquias presentan un promedio de 107 ranuras branquiales, pasaje cloacal amplio y ostiolo pequeño. Presencia de cámara promial<sup>(49)</sup>. Su boca se encuentra en el extremo anterior, esófago corto, comprimido lateralmente, y con un reborde de finas estrías en la entrada del estómago, que presenta forma irregular. El intestino emerge de la porción inferior a la región media lateral del saco, desciende y luego asciende para continuar lateralmente por el estómago hasta llegar a la base del esófago, lo rodea y desciende por el lado derecho hasta la región posterior del estómago, cruza hacia el músculo aductor en donde se alarga para terminar en el recto y ano. Músculo aductor grande en relación con el sistema digestivo<sup>(49)</sup>.

## **1.2. ACONDICIONAMIENTO DE REPRODUCTORES**

El acondicionamiento de reproductores es una de las principales fases en la producción de moluscos bivalvos. Su éxito depende de crear las condiciones

que ocurren en la naturaleza durante el ciclo natural de reproducción, lo cual se alcanza en muchas ocasiones con la manipulación de factores como la temperatura, regímenes de alimentación, tiempo de acondicionamiento que pueden influenciar en la gametogénesis. Generalmente, períodos de acondicionamiento de entre 4 y 6 semanas son utilizados en laboratorio para alcanzar la madurez suficiente para el desove en bivalvos<sup>(13)(14)(16)(52)</sup>.

### 1.2.1. TEMPERATURA

La gametogénesis en las ostras está directamente correlacionada con la temperatura del agua<sup>(9)</sup>. En criaderos se puede acelerar la madurez manteniendo los reproductores a temperaturas elevadas y proporcionándoles una ración alimenticia rica en ácidos grasos<sup>(16)</sup>. Se ha descrito que aumentando gradualmente la temperatura bajo condiciones artificiales durante las épocas de bajas temperaturas permiten el desarrollo normal de gametos y larvas en muchas especies de bivalvos<sup>(53)</sup>. Así mismo, la maduración sexual y la reproducción de *O. edulis* se ha alcanzado mediante un aumento gradual de la temperatura del agua conjuntamente con la adición de fitoplancton<sup>(54)</sup>. En estudios con *C. gigas* se determinó que a temperaturas entre 16 y 22°C se acelera el crecimiento de los ovocitos, detectando los primeros ovocitos maduros luego de 27 días a 16°C, 23 días a 19 °C, 19 días a 22 °C y 22 días a 25 °C <sup>(55)</sup>.

Si bien en muchos casos temperaturas elevadas inducen la madurez sexual <sup>(16)(53)(54)(56)</sup>, estudios realizados en *Argopecten purpuratus* mostraron una relación inversa entre la temperatura y el éxito de acondicionamiento. Por otro lado, es importante mantener la temperatura estable durante el proceso de acondicionamiento en laboratorios, ya que permiten la acumulación adecuada y el uso de las reservas nutricionales necesarias para producir larvas altamente viables<sup>(57)</sup>.

Para *C. iridescens*, según un estudio en la localidad de San Blas, Nayarit (México), la fase de maduración en ambientes naturales ocurrió entre junio a agosto (máximo en julio) en el año 1973<sup>(3)</sup>, registrando los máximos térmicos (30 a 32°C) justamente en los meses de junio a octubre en el mismo sitio y año<sup>(18)</sup>.

### 1.2.2. SALINIDAD

Si bien Fournier (1992)<sup>(19)</sup> manifestó que la influencia de la salinidad en la maduración de reproductores de *C. iridescens* no es clara, Parwadani (2011)<sup>(58)</sup> considera que las fluctuaciones estacionales de la salinidad son importantes para la sincronización de los ciclos gametogénicos, patrones reproductivos e inclusive para la estimulación de desoves en bivalvos. Por su



parte, Utting y Spencer (1991)<sup>(42)</sup> describen que durante la maduración gametogénica, la salinidad debería exceder los 25 g.L<sup>-1</sup> en el caso de bivalvos marinos, por ejemplo, la almeja japonesa *Tapes philippinarum* prefiere salinidades de entre 25 y 34 g.L<sup>-1</sup> con un valor óptimo de alrededor de 30 g.L<sup>-1</sup><sup>(16)</sup>. Estudios con *Ostrea edulis* consideraron que salinidades mantenidas relativamente estables durante todo el año no parecen tener influencia en la gametogénesis<sup>(56)</sup>. Existen también especies consideradas eurihalinas, tales como algunas especies del género *Crassostrea*, entre ellos el ostión de roca *C. iridescens*<sup>(2)</sup> o el ostión japonés *C. gigas*, que se acondiciona en un rango de salinidad de 15 a 34 g.L<sup>-1</sup><sup>(16)</sup>.

### 1.2.3. ALIMENTACIÓN

La disponibilidad de alimento parece ser un factor a considerar en el control del desarrollo gonadal<sup>(56)</sup>. En condiciones óptimas de alimentación, la velocidad con la que transcurre el proceso reproductivo es rápido siempre que la temperatura permita el desarrollo gonadal<sup>(52)</sup>. El contenido proteico de la dieta microalgal afecta el tiempo en alcanzar la madurez, la fecundidad de las hembras, el balance de energía y la calidad de las larvas en pectínidos<sup>(15)</sup>.

Estudios afirman que, durante la etapa de acondicionamiento es necesario que la ración alimenticia no carezca de ácidos grasos altamente

insaturados (HUFA, por sus siglas en inglés) de conocida importancia, incluyendo EPA (ácido eicosapentaenoico) y DHA (ácido docosahexaenoico). Por esta razón, suele usarse diatomeas como *Chaetoceros*, *Thalassiosira* y flagelados como *Pavlova lutherii* o *Isochrysis galbana*. Siendo preferible emplear una mezcla proporcional de estas especies que una dieta basada con especies individuales<sup>(16)(32)(42)(59)(60)(61)</sup>. Sin embargo, resultados obtenidos con *C. gigas* hembras, mostraron que la alimentación durante el acondicionamiento de reproductores puede no ser necesaria, según los autores no influye sobre la calidad del ovocito ni en el desempeño de las larvas y post-larvas, indicando que estos factores dependen de la reserva presente en los reproductores previo al acondicionamiento<sup>(62)</sup>.

#### 1.2.4. FACTORES INTRÍNSECOS

Además de las variables externas para el control de los ciclos reproductivos en bivalvos, otros factores a considerar son los intrínsecos, que contribuyen a regular estos procesos<sup>(63)</sup>. Puesto que el sistema nervioso tiene un efecto en la regulación endócrina en los bivalvos a través de la neurosecreción de monoaminas<sup>(64)</sup> tales como norepinefrina, dopamina y serotonina (5-Hidroxitriptamina). Investigaciones efectuadas con *Nodipecten subnodosus* sugirieron que esta especie utiliza diferentes neurotransmisores específicos para

cada género (masculino y femenino) y que sus usos se relacionan con el ciclo reproductivo<sup>(65)</sup>.

Por otra parte, estudios realizados en México, notaron que el porcentaje promedio de los principales componentes bioquímicos para *C. iridescens* cambian durante las variaciones estacionales, siendo: proteínas (37.9%), carbohidratos (38.6%), lípidos (11.2%) y ceniza (11.3%). El porcentaje de lípidos disminuyó en otoño y se incrementó en primavera, los carbohidratos mostraron lo contrario, mientras que los niveles de proteínas aumentaron a finales de primavera, cuando la gametogénesis y maduración ocurren en esta especie. La disminución de los hidratos de carbono concordó con la etapa de la gametogénesis<sup>(66)</sup>. Otro estudio, indica que la concentraciones del metal Manganese (Mn) muestra un máximo en el tejido gonadal correlacionándola positivamente con la maduración de la *C. iridescens* sugiriendo que dicho metal pueda realizar alguna función durante la maduración gonadal<sup>(67)</sup>.

### **1.3. DESARROLLO GONADAL**

Los organismos del género *Crassostrea* son considerados bivalvos ovíparos y dioicos<sup>(2)(50)(51)</sup>. Sin embargo, puede darse un pequeño grado de

hermafroditismo en las especies dioicas, es decir que es posible que exista protandria e inversión de sexos en *Crassostrea*<sub>(16)</sub>.

Fournier (1992)<sub>(19)</sub>, tras observaciones microscópicas y macroscópicas de las gónadas de un grupo de *C. iridescens*, determinó el sexo del individuo y su condición reproductiva, clasificándola dentro de una de las siguientes cinco etapas (modificadas de la versión de Vélez y Epifanio, 1981):

- ***Indeterminado:*** folículos presentes en la zona gonadal, pero sin evidencia de los gametos. La apariencia externa de la gónada es acuosa. El estómago completo es visible.
- ***Desarrollo temprano:*** escaso desarrollo de la gónada, con pocos folículos pequeños, presencia de espermatogonios, espermatocitos u ovogonios, pero no espermatozoides ni ovocitos libres. Más del 50% del estómago es evidente.
- ***Desarrollo tardío:*** muchos folículos con más del 30% de los gametos libres en el lumen. Tejido conectivo interfolicular abundante. Menos del 50% del estómago es evidente.
- ***Madurez:*** incremento del área total de las gónadas, completamente ocupada por los folículos con más del 50% de los gametos libres en el lumen. Externamente, la gónada tiene un aspecto denso y cremoso, y la mayor parte del estómago es imperceptible.

- **Desove:** folículos parcialmente desovados todavía contienen los gametos, pero estos son menos numerosos que en la etapa previa (madurez), y los folículos casi vacíos, con pocos ovocitos y espermatozoides residuales. La gónada es suave y llena de canales.

#### **1.4. DESOVE EN AMBIENTES NATURALES**

El período de desove en poblaciones naturales varía según la especie y situación geográfica<sup>(16)</sup>. En ambientes tropicales, algunas especies de bivalvos mantienen sus gametos maduros durante todo el año y desovan cantidades limitadas durante los doce meses<sup>(16)</sup>, en estos ambientes, los desoves de *C. iridescens* ocurren frecuentemente<sup>(19)</sup>. Mientras que en las zonas templadas, el desove suele estar limitado a un período concreto del año. Muchos bivalvos desovan en masa, y el período de desove es muy corto, durante el cual expulsan casi todo el contenido de la gónada. Otras especies de bivalvos desovan durante más tiempo, incluso durante varias semanas, y se les conoce como “desovadores parciales”, ya que van liberando unos cuantos gametos durante un período más largo. En otras especies puede haber más de un desove bien diferenciado al año, mientras que en las especies hermafroditas, el esperma se expulsa antes o después de los óvulos, minimizando así la posibilidad de autofecundación<sup>(16)</sup>.

Existe una serie de estímulos ambientales que favorecen los desoves de bivalvos, tales como la temperatura, la salinidad, la presencia de esperma de la misma especie en el agua, las corrientes de agua, o una combinación de éstos<sup>(58)(68)</sup>.

### **1.5. INDUCCIÓN AL DESOVE**

La inducción al desove es trascendental para la producción de semillas de bivalvos en criaderos e involucra el control de los tiempos de reproducción de los individuos con el fin de obtener el máximo valor de fertilización<sup>(58)</sup>. Para aplicar métodos de inducción, tales como cambios de temperatura y salinidad, es importante comprobar que el organismo se encuentre en óptimas condiciones fisiológicas, con la finalidad de que los huevos y larvas presenten los mejores índices de viabilidad<sup>(58)(68)</sup>.

Existen muchas maneras de inducir al desove en bivalvos; estímulos físicos como cambios de temperatura y salinidad, estímulos mecánicos como la exposición al aire libre previo al desove, el incremento de la concentración de partículas (alimento) suspendidas en el agua y el producido por medio de choques eléctricos; estímulos químicos tales como la adición en el agua de cloruro de potasio, peróxido de hidrógeno y la inyección de monoaminas como

serotonina, dopamina y norepinefrina, o la inyección de esteroides sexuales<sup>(58)(69)</sup>; y por último los estímulos biológicos, como la introducción de extractos de gónadas maduras en el agua<sup>(41)(58)</sup> siendo todos ellos objeto de investigaciones con la finalidad de establecer el método que sea más efectivo para inducir al desove<sup>(58)(69)</sup>. Los métodos más usados en bivalvos son, la variación de la temperatura del agua, el incremento de la circulación del agua y la inyección de serotonina<sup>(70)</sup>.

#### 1.5.1. ESTÍMULOS EXTERNOS

##### **1.5.1.1 Temperatura**

El choque térmico es quizás el método más utilizado para inducir al desove debido a su facilidad y bajo costo<sup>(69)</sup>. La técnica involucra cambios graduales o repentinos incrementando o disminuyendo la temperatura del agua<sup>(70)</sup> produciendo un stress térmico a los reproductores dando como resultado la liberación de sus gametos debido a que ocurre un cambio rápido en la temperatura interna del bivalvo<sup>(41)(58)</sup>. Se han obtenido respuestas positivas en especies como *C. gigas*, logrando desoves en alrededor de 20 a 30 minutos luego de elevar gradualmente la temperatura de 26.5 a 31°C <sup>(32)</sup> o en *Nodipecten nodosus*, mostrando una eficiencia del 91% incrementando la temperatura del

agua de 21 a 28°C, permitiendo la liberación de entre 1 a 2 millones de ovocitos por individuo<sup>(29)</sup>.

A menudo esta técnica es utilizada en combinación con otros métodos para aumentar la probabilidad de desove, tales como exposición de los reproductores al aire<sup>(41)</sup>, incremento de partículas suspendidas en la columna de agua, adición de agua esterilizada con luz ultravioleta<sup>(71)</sup>, aeración constante donde se encuentran los reproductores<sup>(40)</sup>, incremento en la circulación del agua (20 L.min<sup>-1</sup>), adición de peróxido de hidrógeno<sup>(22)</sup>, o la adición de óvulos o espermatozoides provenientes de gónadas maduras de la misma especie<sup>(7)(41)</sup>.

### 1.5.1.2 Salinidad

En ambientes naturales, los cambios de salinidad al igual que los de temperatura producen desoves en bivalvos de zonas tropicales y templadas<sup>(18)(58)</sup>, causadas principalmente por stress osmótico<sup>(72)</sup>. Estudios de inducción en laboratorio mediante cambios de salinidad en *Rangia cuneata*, *C. virginica* y *Geukensia demissa* han dado resultados positivos<sup>(34)</sup>. Así mismo, luego de acondicionar a 34 g.L<sup>-1</sup> por 2 meses los bivalvos *Saccostrea cucullata*, *S. commercialis*, *Perna viridis* y *P. indica*, se alcanzó el desove al reducir repentinamente la salinidad a 26 g.L<sup>-1</sup> <sup>(35)</sup>. Para la almeja *Meretrix lyrata* el



incremento de salinidad a  $32 \text{ g.L}^{-1}$  y posteriormente reducirla a  $15 \text{ g.L}^{-1}$  durante 30 minutos fue efectivo en la producción de huevos<sup>(36)</sup>.

### **1.5.1.3 Sobrealimentación**

En ambientes naturales los bivalvos tienden a desovar en presencia de abundante plancton<sup>(58)</sup>. Según un estudio con *Ostrea edulis*, la liberación de larvas se dio cuando la concentración de alimentos fue alta, ya que permite la construcción de reservas energéticas<sup>(56)</sup>. Illanes (2010)<sup>(40)</sup> menciona que una sobredosis de microalgas ( $3 \cdot 10^6$  a  $5 \cdot 10^6$  cel/mL) inducen desoves luego de 1 hora en ostiones. Además, agregando una concentración entre 2 y 2.5 millones de células por mL del alga *Pseudoisochrysis paradoxa*, puede inducir desoves en *Siliqua patula*<sup>(39)</sup>.

## **1.5.2. ESTÍMULOS INTERNOS**

### **1.5.2.1 Cloruro de potasio**

En moluscos bivalvos, la presencia del ion potasio ( $\text{K}^+$ ) induce la contracción de células musculares<sup>(73)</sup>. En Equinodermos, la inyección de cloruro de potasio provoca contracciones musculares que promueven la expulsión de los

gametos sin que necesariamente estos se encuentren maduros<sup>(74)</sup>. Se han obtenido desoves en los bivalvos *R. cuneata*, *C. virginica* y *G. demissa*, inyectando 0,5 mL de una solución 0,1 N de KCl en la cavidad del manto, demostrando que este agente químico produce desoves en poco tiempo comparado con otros métodos de estimulación física<sup>(34)</sup>.

### **1.5.2.2 Serotonina**

La serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT), es un neurotransmisor que regula procesos reproductivos como la maduración del ovocito<sup>(75)(76)(77)</sup>, el desove<sup>(30)(34)(41)(69)(70)(78)(79)(80)</sup> y partos (liberación de larvas) en bivalvos<sup>(81)</sup>. Por este motivo, un método usado comúnmente para la inducción al desove en bivalvos es la aplicación exógena de la serotonina mediante inyecciones intragonadales o intramusculares<sup>(70)</sup>. Sin embargo, un factor a considerar es que los gametos pueden ser liberados en estadios tempranos a la madurez, por lo que la calidad de estos y la viabilidad de las larvas pueden ser pobres si la gónada no estaba completamente madura<sup>(41)</sup>.

### **1.5.3. STRIPPING**

Cuando no se producen desoves inducidos de manera artificial, una forma común de obtener gametos es mediante la disección del tejido gonadal o

“Stripping” tanto de machos como hembras, siendo una práctica muy común en ostras (*C. gigas*, *C. virginica*, *C. rhizophorae*), pero implica el sacrificio de cierto número de adultos maduros en caso de necesitar uno de los gametos<sup>(16)(82)(83)</sup>. El tejido se mezcla con agua de mar durante 5-10 segundos y se recogen los huevos con tamices, se lava y se examina la muestra en microscopio para comprobar la fertilización. Sin embargo, este método produce menor cantidad de larvas que un desove natural<sup>(82)</sup>.

#### **1.6. DESARROLLO EMBRIONARIO Y LARVARIO EN BIVLAVOS, según Helm *et al.* (2006) <sup>(16)</sup>**

El tiempo necesario para el desarrollo embrionario y larvario varía principalmente según la especie y la temperatura. En un período de 24 horas el huevo fecundado pasa por las fases multicelulares de blástula y gástrula, y en las 12 horas siguientes se convierte en una trocófora con motilidad, de forma ovalada, de un tamaño entre 60 y 80  $\mu\text{m}$  y con una fila de cilios alrededor del centro, además un largo flagelo apical que facilita la natación.

La fase larvaria inicial es conocida como la fase de charnela recta, larva “D” o Prodisoconcha I. La longitud de la concha en la fase inicial de la charnela recta varía según la especie pero generalmente mide entre 80 y 100  $\mu\text{m}$  (más en

ostras larvíparas). La larva tiene dos valvas, un sistema digestivo completo y un velo (órgano circular presente sólo en larvas de bivalvos). Gracias a los cilios que se encuentran a lo largo del margen exterior, las larvas pueden nadar para mantenerse en la columna de agua y utilizan el velo para alimentarse del fitoplancton presente. Las larvas nadan, se alimentan, crecen, y en siete días desarrollan unas protuberancias llamadas umbos, en la concha cerca de la charnela. Conforme crecen las larvas, los umbos sobresalen más aún, encontrándose las larvas en la fase umbonada o Prodisoconcha II. La duración de la fase larvaria varía dependiendo de la especie o de determinados factores ambientales como la temperatura y salinidad, pero oscila entre los 18 y 30 días.

Al alcanzar la madurez (etapa pediveliger), la larva mide entre 200 y 330  $\mu\text{m}$  (según la especie), en este momento, desarrollan un pie y branquias rudimentarias, y aparece una pequeña mancha oscura circular, conocida como “mancha ocular”. Entre períodos de actividad natatoria, las larvas se asientan y utilizan el pie para arrastrarse sobre el sustrato. Las larvas maduras de las ostras segregan una pequeña gota de cemento en una glándula del pie, giran y colocan la valva izquierda sobre el cemento. Permanecen adheridas en esta posición durante el resto de sus vidas. En otras especies, la larva segrega un biso desde la glándula bisal del pie, que sirve de sujeción temporal para adherirse al sustrato, como preparación para la metamorfosis. Durante la metamorfosis, la larva deja su actividad natatoria y planctónica para llevar una existencia sedentaria y

bentónica. Puede haber mortalidades importantes en este tiempo, tanto en la naturaleza como en cultivos controlados.

### **1.7. CULTIVO DE LARVAS**

La larvicultura de moluscos bivalvos ha tenido gran desarrollo en los últimos años en países latinoamericanos<sup>(84)</sup>. Sin embargo, uno de los principales problemas relacionados con la investigación y desarrollo para el cultivo y manejo de bivalvos en América Latina es la deficiencia en la cantidad y calidad de semillas producidas en criaderos<sup>(85)</sup>. Estos autores mencionan como las principales causas a: 1) la alta mortalidad de larvas, postlarvas y juveniles; 2) las deficiencias en el crecimiento de postlarvas y juveniles en viveros; 3) la falta de control de la maduración y desove de reproductores; 4) la inexistente tecnología de hatchery en varias especies nativas de interés comercial, y 5) la falta de manuales de procedimientos.

La supervivencia de la larva depende mucho de los protocolos de cultivo y el grado de eliminación de las larvas de crecimiento más lento durante el proceso de cría<sup>(16)</sup>. Mientras que el crecimiento hasta alcanzar el máximo desarrollo larvario varía dependiendo de la especie o de determinados factores ambientales y la alimentación<sup>(42)(86)</sup> y la salinidad<sup>(42)(46)</sup>.

Las microalgas proveen un excelente valor nutricional especialmente para larvas y juveniles de moluscos bivalvos<sup>(87)</sup>, siendo comúnmente utilizadas en Acuicultura los géneros *Chaetoceros* spp., *Isochrysis* sp, y *Pavlova lutheri*<sup>(59)</sup>. No obstante, la cantidad, calidad y combinaciones de estas microalgas son factores importantes para la supervivencia de las larvas durante su desarrollo<sup>(42)</sup>. Con la combinación de microalgas se obtienen mejores resultados de supervivencia que si se alimentara con un solo tipo de microalgas por separado<sup>(32)</sup>. Por otra parte, en estudios con *Spondylus princeps*, utilizando *Ch. gracilis* como única fuente de fitoplancton durante su desarrollo larvario, se obtuvieron mortalidades durante las diferentes etapas<sup>(86)</sup>. Sin embargo, no existen suficientes pruebas para concluir que esto se debió a la microalga utilizada ó a la falta de combinación de éstas.

Existen otros factores que influyen también en la larvicultura, tales como el tratamiento del agua de cultivo. Las prácticas más comunes son: la filtración mecánica (de 1 a 2  $\mu\text{m}$ ) y filtración fina con luz ultravioleta<sup>(16)</sup>. El recambio del agua y la aeración constante son otros factores de importancia a considerar<sup>(31)(32)(42)</sup>.

### 1.7.1. FIJACIÓN Y METAMORFOSIS

La fase del desarrollo larvario culmina con la fijación de la larva a un sustrato y posterior metamorfosis, se conoce que ambos procesos son provocados por estímulos ambientales específicos, representando un período de altas mortalidades en las larvas al sufrir cambios fisiológicos, morfológicos y bioquímicos durante la transición de la existencia pelágica a la bentónica<sup>(63)(88)</sup>. En cultivos controlados, la proporción de larvas que llegan a sufrir la metamorfosis está relacionada con las condiciones de cultivo, entre ellas la dieta, ración alimenticia, temperatura y salinidad, variando según la especie<sup>(16)(89)</sup>.

Entre los materiales de uso común para proporcionar amplias zonas de superficie de fijación en ostras se pueden incluir: las láminas ligeramente rugosas de policloruro de vinilo (PVC, por sus siglas en inglés), trozos de conchas<sup>(89)</sup>, inclusive materiales de cerámica o plástico recubiertos de cemento<sup>(16)</sup>. Estudios realizados sobre el tipo de sustrato para las ostras muestran un efecto significativo de acuerdo a la textura del material, en su mayoría, material plástico; se ha observado que los plásticos con superficie rugosa registran la mayor tasa de fijación de ostras *C. iredalei* en comparación con plásticos de superficie lisa<sup>(90)</sup>.

Lo más recomendable luego de la larvicultura es que las semillas que han alcanzado tallas mayores a 1cm sean llevadas a sistemas de cultivo submarinos a través de líneas sumergidas o “long lines” para el engorde<sup>(28)</sup>, en virtud de que las condiciones naturales del mar ofrecen un ambiente más propicio para su desarrollo.



## **CAPITULO II.**

### **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

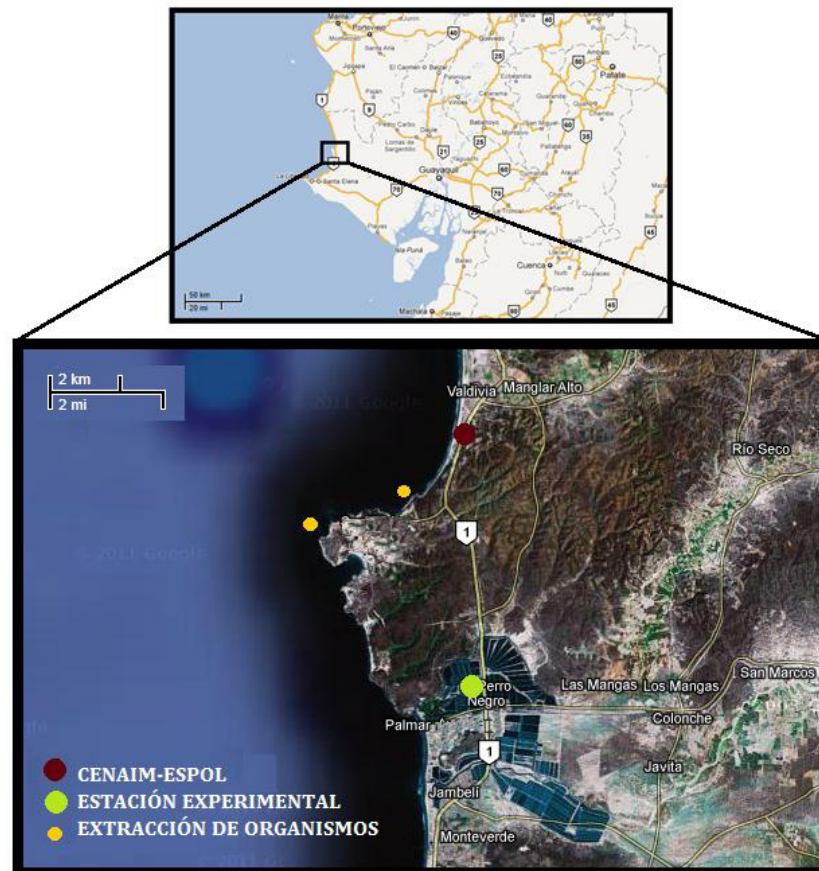
#### **2.1. LUGAR DE ESTUDIO**

El presente trabajo fue realizado durante los meses de Agosto a Diciembre del 2011 en el Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas “Edgar Arellano M.” (CENAIM-ESPOL) ubicado en la comuna San Pedro

01°57'02" S; 80°43'35" W) de la parroquia Manglaralto, Provincia de Santa Elena, Ecuador (Fig. 2).

### 2.1.1 SITIO DE EXTRACCIÓN

Un total de 218 ejemplares de *C. iridescens* (Peso: 325,11±128,32 g; altura de la valva: 11,37±1,55 cm; longitud de la valva: 8,37±1,51 cm) fueron extraídos en dos puntos en zonas cercanas a la Comuna Ayangue, Provincia de Santa Elena, Ecuador (01°57'54" S; 80°44'30" W y 01°58'27" S; 80°45'53" W – Fig.2). La temperatura y salinidad del agua al momento de la extracción fue de 23°C y 32,3 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente. Los organismos fueron colocados en recipientes plásticos con agua del sitio de la extracción y transportados cuidadosamente al laboratorio de moluscos del CENAIM-ESPOL, donde fueron limpiados del sedimento, algas, y epibiontes. Posteriormente, fueron colocados en tanques de 1 TM con circulación continua de agua de mar, aeración constante y desprovistos de alimentación (depuración) durante 3 días.



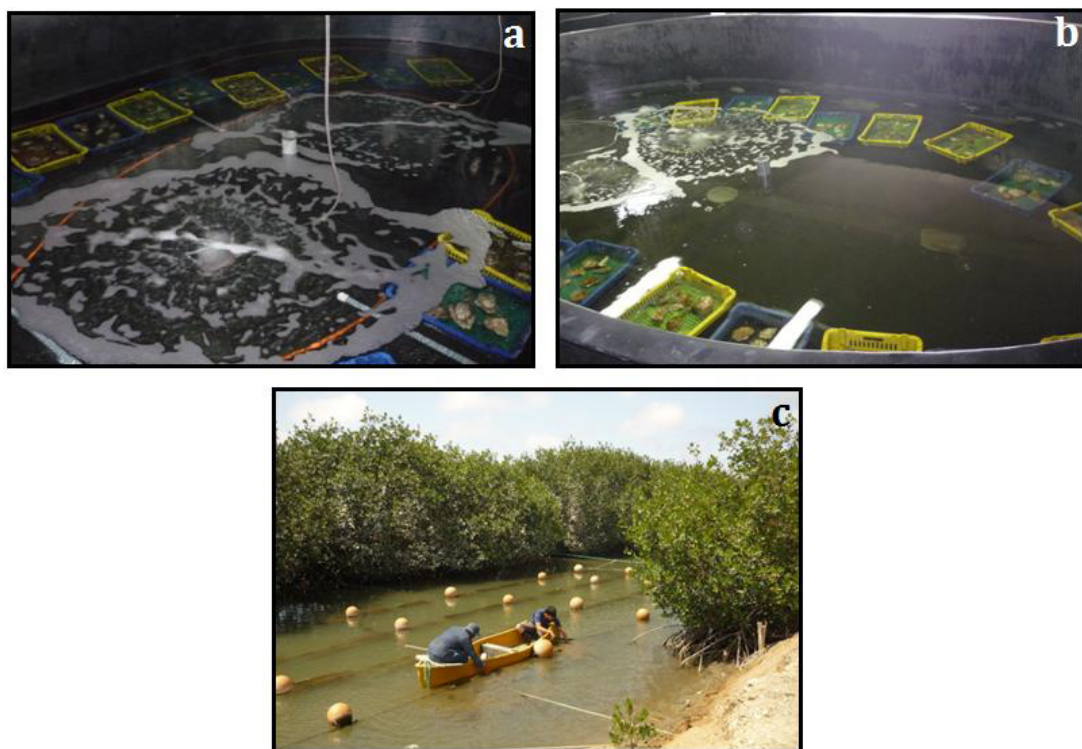
**Figura 2.** Sitio de extracción de las ostras *Crassostrea iridescens*.  
**Fuente:** Google Earth, 2011

## **2.2. MANEJO DE REPRODUCTORES**

Los reproductores de *C. iridescens* fueron divididos aleatoriamente en tres grupos de acondicionamiento, donde fueron mantenidos durante 7 semanas.

Los organismos del primer grupo (Acondicionamiento 28°C) fueron ubicados en 1 tanque de 18 TM con agua de mar filtrada (1µm) en un volumen operable de 6 TM, con aeración constante (>3,5 mgOD.L<sup>-1</sup>), mantenidos a una temperatura del agua de 28,26±0,87°C; los animales fueron aclimatados incrementando la temperatura del agua a razón de 2°C cada 24 horas durante 3 días con la ayuda de una plancha térmica adaptada a un termostato. La temperatura de acondicionamiento fue mantenida utilizando un sistema de recirculación de agua caliente conectado a un calefón a gas tipo Chun (CH-389A). El segundo grupo (Acondicionamiento 22°C) fue mantenido con la temperatura del agua de mar registrado naturalmente durante el desarrollo de este trabajo (22,20±0,90°C). La alimentación para ambos grupos de acondicionamiento estuvo basada en una ración diaria combinada de microalgas *Chaetoceros gracilis* e *Isochrysis galbana* a una concentración de 150 y 100 células.µL<sup>-1</sup>.día<sup>-1</sup> respectivamente. La salinidad se mantuvo en 32,20±0,52 g.L<sup>-1</sup> para ambos grupos. Diariamente, las heces y algas sedimentadas fueron removidas de los tanques de cultivo mediante un sifón. Además, se realizó el 60% de recambio de agua diario y semanalmente un recambio total y remoción de epibiontes de las valvas de las ostras. Los datos paramétricos fueron registrados con un oxigenómetro YSI 55D dos veces al día, antes y después de realizado el recambio (Fig. 3).

El tercer grupo de ostras (*Acondicionamiento Reservorio*) fue llevado al canal reservorio en la Estación Experimental CENAIM-ESPOL en la comuna Palmar (02°00'56" S; 80°43'29" W) de la parroquia Manglaralto, provincia de Santa Elena, Ecuador (Fig. 2). La temperatura y salinidad fue de  $24,46 \pm 2,09^\circ\text{C}$  y  $36,69 \pm 1,38 \text{ g.L}^{-1}$  respectivamente. Los organismos fueron colocados en 14 pearl nets suspendidos en una línea con boyas flotantes a 1 m del fondo (Fig. 3).



**Figura 3.** Acondicionamiento para la maduración de *Crassostrea iridescens*; (a)  $28^\circ\text{C}$ , (b)  $22^\circ\text{C}$ , (c) Reservorio. **Fuente:** Investigación realizada.

Para la clasificación y cuantificación del fitoplancton presente en el reservorio, semanalmente se tomaron muestras de agua (50 mL) en la capa superficial. Los datos de temperatura y oxígeno disuelto fueron registrados dos veces al día (09h00 y 18h00) con un oxigenómetro YSI 55D.

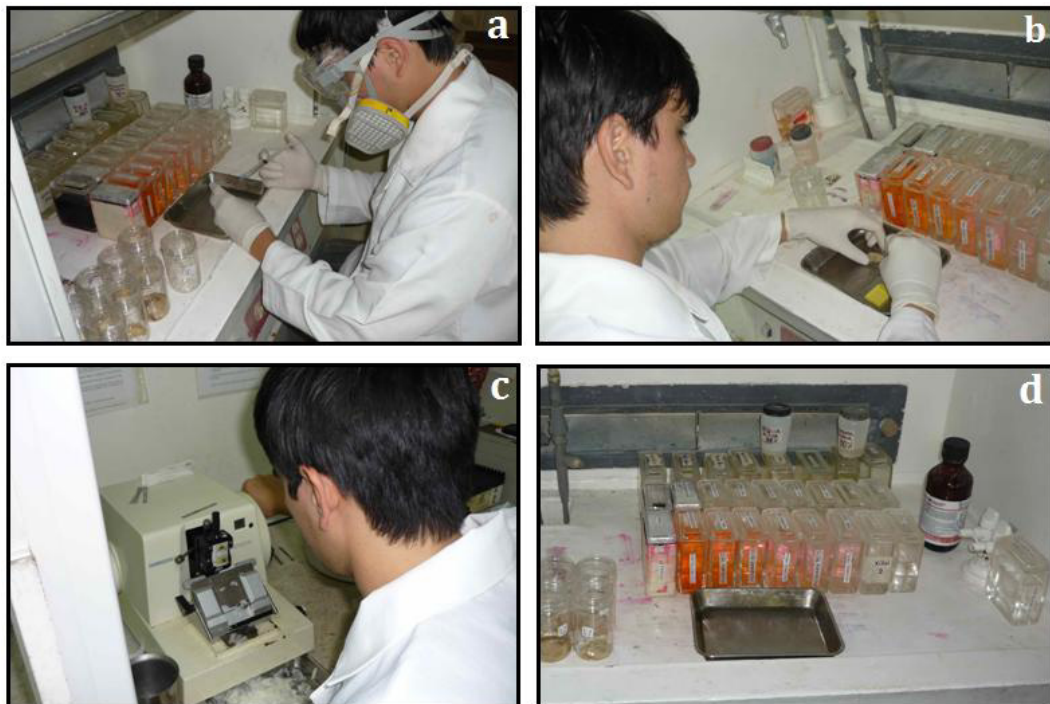
### **2.3. DETERMINACIÓN DE LA CONDICIÓN GAMETOGÉNICA**

Debido a que las gónadas de *C. iridescens* no son visibles, no se pudo determinar el estado de madurez de cada individuo por examinación visual y se sacrificaron un total de 50 organismos para determinar la etapa de madurez en el que se encontraban mediante cortes histológicos. Diez organismos fueron sacrificados luego de la extracción, diez después de la depuración, y diez ejemplares a las 6 semanas de cada uno de los acondicionamientos.

Los organismos completos fueron pesados individualmente en una balanza electrónica Libror (EB-3200 H) y posteriormente las partes blandas fueron desprendidas de las valvas. Se extrajo la masa visceral que incluyó la gónada (sin branquias, pie, manto ni músculos) con el objetivo de calcular el índice gonadosomático (IGS) como lo sugerido por Giese (1959)<sup>(6)</sup>:

$$\text{IGS} = \frac{\text{Peso de la gónada (g)}}{\text{Peso total del tejido blando húmedo (g)}} \times 100$$

La gónada fue fijada en solución Davidson durante 24 horas, posteriormente se siguieron las etapas de: deshidratación, clarificación, inclusión, corte transversal (4  $\mu\text{m}$ ), y finalmente la tinción con Hematoxilina y Eosina<sup>(91)</sup> (Fig. 4 – Anexo 1).



**Figura 4.** Cortes histológicos de gónadas de *Crassostrea iridescens*; (a) Fijación, (b) Cortes: transversal, (c) Corte en micrótopo, (d) Tinción con Hematoxilina y Eosina. **Fuente:** Investigación realizada.

Los estadios gonádicos fueron determinados basándose en las características morfológicas de la gónada, presencia o ausencia de gametos y cantidad y grado de desarrollo de los mismos, considerando cinco etapas: Indeterminado, desarrollo temprano, desarrollo tardío, madurez y desove<sup>(19)</sup>. Las muestras fueron examinadas con un microscopio Olympus BH-2 y fotografiadas con una cámara Nikon E995.

## **2.4 INDUCCIÓN AL DESOVE**

Luego de 7 semanas de acondicionamiento, se evaluaron 7 estímulos externos (tratamientos) para la inducción al desove. Se tomaron por separado 8 reproductores por cada ambiente de acondicionamiento ( $28^{\circ}\text{C}$ ,  $22^{\circ}\text{C}$  y *Reservorio*), los cuales fueron limpiados de epibiontes, secados y pesados dentro de un período de 15 minutos. Posteriormente fueron distribuidos al azar en 2 tanques de 15 L (2 réplicas con 4 organismos cada una). Los tratamientos se describen a continuación:

### **2.4.1. CAMBIOS DE TEMPERATURA CADA 60 MINUTOS (T60)**

Se realizó una disminución de  $10^{\circ}\text{C}$  a la temperatura del agua de acondicionamiento y se mantuvieron los organismos por 1 hora. Se agregó *I.*



*galbana* (200 células. $\mu\text{L}^{-1}$ ). Pasado este tiempo nuevamente se colocaron las ostras a la temperatura de acondicionamiento 1 hora y luego se disminuyó  $10^{\circ}\text{C}$  de nuevo por otra hora<sup>(31)</sup>. Una hora después se le adicionó espermatozoides de la misma especie extraídos por stripping.

#### 2.4.2. CAMBIO DE TEMPERATURA CADA 30 MINUTOS (T30)

La temperatura del agua se incrementó hasta  $30^{\circ}\text{C}$  (independientemente de la temperatura de acondicionamiento) y se mantuvo por 30 minutos. Posteriormente se disminuyó la temperatura hasta  $22^{\circ}\text{C}$  y se mantuvo por 30 minutos nuevamente. Este procedimiento fue repetido dos veces para cada temperatura (caliente-frío-caliente-frío). Finalmente fue llevado a  $30^{\circ}\text{C}$  nuevamente y se dejó reposar a temperatura ambiente ( $23^{\circ}\text{C}$ )<sup>(32)</sup>. Luego de una hora se le adicionó espermatozoides de la misma especie.

#### 2.4.3. INCREMENTO DE TEMPERATURA Y DESECACIÓN (TAD)

Se incrementó  $5^{\circ}\text{C}$  la temperatura del agua de acondicionamiento por 1 hora, luego fueron colocados al aire libre durante 30 minutos (temperatura del aire:  $23^{\circ}\text{C}$ ); posteriormente se ubicaron en agua con temperatura  $5^{\circ}\text{C}$  mayor a la

de acondicionamiento nuevamente. Transcurrida 1 hora se adicionó espermatozoides de la misma especie.

#### 2.4.4. DISMINUCIÓN DE SALINIDAD (*Smenos*)

Se colocaron los reproductores en recipientes con agua de mar a salinidad de acondicionamiento ( $32 \text{ g.L}^{-1}$ ), posteriormente fueron colocados en agua con una salinidad de  $15 \text{ g.L}^{-1}$  durante 30 minutos. Luego pasaron nuevamente a  $32 \text{ g.L}^{-1}$  de salinidad durante otros 30 minutos; este proceso se repitió dos veces<sup>(36)</sup>. Luego de una hora se añadió espermatozoides de la misma especie. La temperatura se mantuvo constante a la temperatura de acondicionamiento.

#### 2.4.5. INCREMENTO DE SALINIDAD (*Smas*)

Los animales fueron colocados en agua de mar con una salinidad 3 veces superior ( $96 \text{ g.L}^{-1}$ ) a la de acondicionamiento durante 30 minutos. Luego fueron colocados nuevamente a  $32 \text{ g.L}^{-1}$  durante 30 minutos; este proceso se repitió dos veces<sup>(7)</sup>. Luego de una hora se añadió espermatozoides de la misma especie. La temperatura se mantuvo constante a la temperatura de acondicionamiento.

#### 2.4.6. SOBREALIMENTACIÓN (SobA)

Se inoculó *Chaetoceros gracilis* a una concentración de 2800 células. $\mu\text{L}^{-1}$  al agua que contenía los reproductores de *C. iridescens*; la temperatura del agua para los tres grupos de acondicionamiento se mantuvo a 23°C <sup>(39)</sup>. Luego de una hora se añadió espermatozoides de la misma especie.

#### 2.4.7. ADICIÓN DE ESPERMATOZOIDEOS (Esp)

Se extrajeron gametos de un organismo de *C. iridescens* macho (del acondicionamiento 28°C). Se lavaron los gametos en un vaso de precipitación y posteriormente fue pasado por un tamiz de 100  $\mu\text{m}$  para remover los tejidos, el material espermático fue puesto en un vaso de precipitación de 1 L (10 millones de espermatozoides. $\text{mL}^{-1}$ ). Cada 30 minutos se le agregó 100 mL del material espermático durante 2 horas. Se mantuvo la temperatura de acondicionamiento para cada grupo<sup>(41)</sup>.

Las observaciones de la respuesta para todos los tratamientos de inducción duraron 3 horas a partir del último estímulo.

Tan pronto se produjeron los desoves, los organismos fueron trasladados cuidadosamente a un recipiente de 30 L con agua de mar filtrada ( $1\ \mu\text{m}$ ) para que desoven libremente, manteniendo la temperatura de acondicionamiento. Posteriormente, se filtraron los óvulos producidos por cada hembra a través de una malla nitex<sup>®</sup> de  $100\ \mu\text{m}$  para eliminar las impurezas. En el caso de los espermatozoides, estos fueron tamizados por mallas de  $100$  y  $30\ \mu\text{m}$ . Se estimó el número total de óvulos liberados por cada hembra mediante conteos de  $25\ \mu\text{L}$  (5 réplicas) de la suspensión de éstos y luego extrapolando este conteo al volumen total del recipiente. Los óvulos fueron fecundados mediante la adición de espermatozoides a una proporción aproximada de 10:1 (espermatozoides:óvulos) en un recipiente de 30 L con agua de mar filtrada ( $1\ \mu\text{m}$ ) y tratada con UV. El porcentaje de fecundación fue determinado luego de 30 minutos del contacto de los gametos utilizando el mismo método para estimar el número total de óvulos.

En todos los tratamientos se estimaron las siguientes variables: 1) Porcentaje de organismos desovados (número de individuos que liberaron gametos masculinos o femeninos en relación al número de ostras estimuladas), 2) Tiempo de respuesta a los estímulos (desde el primer estímulo hasta el inicio de la liberación de gametos), 3) Número de óvulos producidos por cada hembra, y 4) Porcentaje de fertilización (número de cigotos dividido para el número de óvulos producidos).

## **2.5 LARVICULTURA**

Para el desarrollo embrionario y larvario se tomaron gametos provenientes de desoves que resultaron de los métodos de inducción *T60'* y *TAD* obtenidos del acondicionamiento  $28^{\circ}\text{C}$ . Posterior a la fertilización, los huevos obtenidos fueron puestos en tanques cilíndricos de 1 TM con agua de mar filtrada ( $1\ \mu\text{m}$ ), tratada con UV y con piedras difusoras de aire para mantener el oxígeno del agua mayor a  $3,5\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . Los embriones fueron observados en un microscopio óptico Olympus CH-2 y fotografiados con una cámara Nikon E995.

Luego de 24 horas, las larvas D fueron colocadas en tanques de 1 TM a una densidad de  $1,2\ \text{larvas}\cdot\text{mL}^{-1}$ , con agua de mar filtrada ( $1\ \mu\text{m}$ ), tratada con UV y provistas de aeración constante (el OD se mantuvo mayor a  $3,5\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), la salinidad media fue de  $32,09\pm 0,42\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . La temperatura del agua fue mantenida a  $27,84\pm 1,97\ ^{\circ}\text{C}$  utilizando una plancha adaptada a un termostato (Fig. 5).



**Figura 5.** Laboratorio de Moluscos CENAIM-ESPOL utilizado para la larvicultura de *Crassostrea iridescens*. **Fuente:** Investigación realizada.

La ración alimenticia consistió en una dieta combinada de *Isochrysis galbana* y *Chaetoceros gracilis*. Durante los primeros 7 días se proporcionó el 70% de *I. galbana* y el 30% de *C. gracilis*; a partir del día 8 la combinación fue de 1:1 en número de células. A partir del día 18, la concentración de las microalgas fue mantenida en 60 células.  $\mu\text{L}^{-1}$  (Tabla I)

**Tabla I.** Ración alimenticia diaria (cél. $\mu\text{L}^{-1}$ ) proporcionada durante el período larvario.

DÍAS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Células $\mu\text{L}^{-1}$	6	9	12	16	19	22	25	28	32	35	38	41	44	48	51	54	57	60	60	60

**Fuente:** Investigación realizada.

El recambio de agua fue del 100% cada 24 horas. Durante los recambios, las larvas fueron retenidas en mallas nytex® de 40  $\mu\text{m}$  durante los primeros días (incrementando el tamaño de ojo de malla conforme crecía la larva, 60, 100, 150

$\mu\text{m}$ ) y colocadas en bandejas con 20 litros de agua de mar. Para estimar el número total de larvas, cuidadosamente se homogenizaba el agua con las larvas y se tomaba 1 mL (4 réplicas) con una pipeta, y se extrapolaba al volumen total del recipiente. Se utilizó el proyector de perfil Nikon V-10A para determinar la altura y ancho de las larvas ( $n=20$ ). Las larvas fueron observadas en un microscopio óptico Olympus CH-2 y fotografiadas con una cámara Nikon E995.

Las larvas que desarrollaban pie de fijación fueron tamizadas en mallas de 150  $\mu\text{m}$  y puestas en tanques de 500 L con 3 tipos de sustratos para fijación: conchas molidas de *C. gigas* (250-300  $\mu\text{m}$ ), valvas de *C. iridescens* (4-5 cm), y planchas de plástico. El experimento se dio por terminado a los 30 días, cuando las larvas alcanzaron la etapa pediveliger.

## **2.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los análisis estadísticos de los tratamientos de inducción fueron realizados únicamente con los datos del acondicionamiento 28°C por ser el tratamiento que registró mayor porcentaje de desoves. Los datos obtenidos del experimento fueron sometidos a la prueba de Levene para verificar homogeneidad de varianza y gráficamente se verificó la normalidad de los datos. Los valores obtenidos de los tiempos de respuesta de los organismos desovados fueron transformados con  $1/x$  para cumplir con estas condiciones. Las demás

variables evaluadas no fueron transformadas. Para determinar diferencias significativas entre la producción de óvulos y fertilización de los tratamientos, se omitió el tratamiento *T60'*, debido a que solo presentaba 1 dato. Los datos fueron explorados por medio de análisis de varianza (ANOVA) de una vía. Cuando hubo significancia al 95% ( $\alpha=0,05$ ) se realizó la prueba de Scheffé para la comparación de medias. Todas las pruebas estadísticas fueron analizadas utilizando el software Statistica® versión 5.5.

Para facilitar la interpretación los datos son presentados sin transformación como  $\text{media} \pm \text{DS}$ .



## **CAPITULO III.**

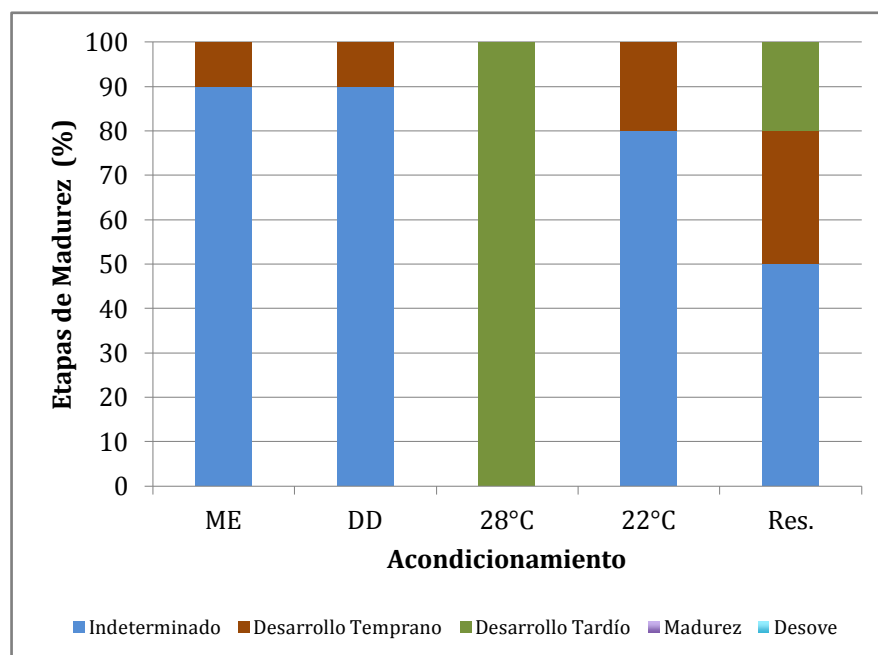
### **3. RESULTADOS**

#### **3.1. ACONDICIONAMIENTO DE REPRODUCTORES**

El canal reservorio de la Estación experimental CENAIM-ESPOL durante el período de acondicionamiento presentó una concentración promedio de fitoplancton de  $17,78 \pm 7,97$  células. $\mu\text{L}^{-1}$ . Predominando especies de las clases Bacillariophyceae (40,6%) y Cyanophyceae (59,4%). Entre los géneros presentes

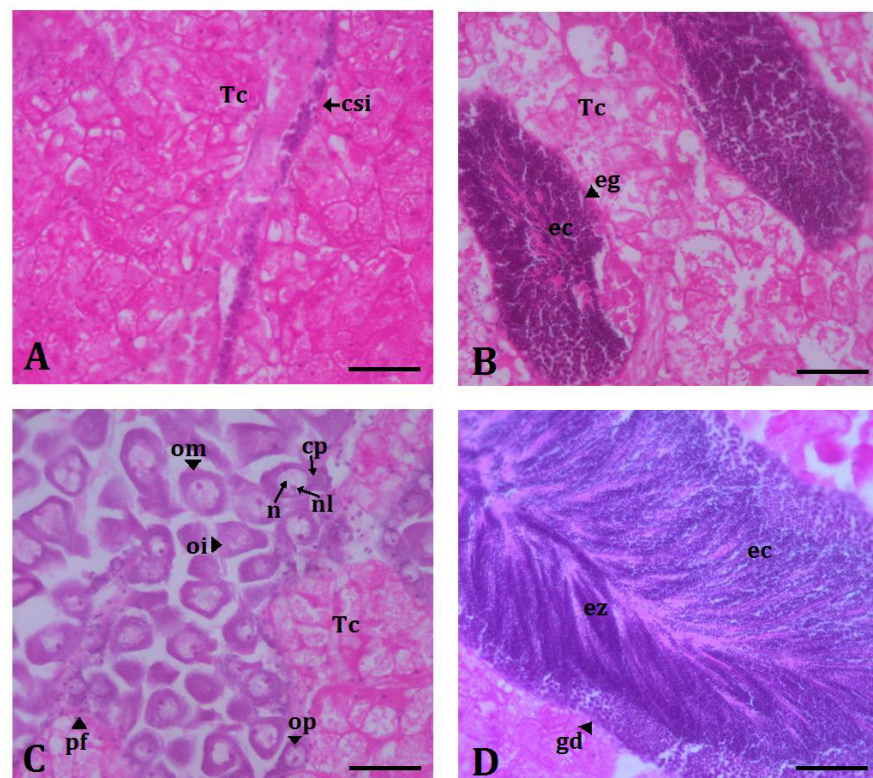
se encontraron: *Navicula* (17,7%); *Nitzschia* (12%); *Pleurosigma* (9,3%); *Chaetoceros* (1,6%); *Synechococcus* (49,7%) y *Oscillatoria* (9,6%).

Con el acondicionamiento 28°C se obtuvo el mayor porcentaje de madurez para *C. iridescens*, registrando el 100% de los organismos en la etapa de desarrollo tardío frente a los otros tipos de acondicionamiento (22°C y *Reservorio*) y comparado además con la madurez que presentaban al momento de la extracción (ME) y después del depurado (DD) (Fig. 6).



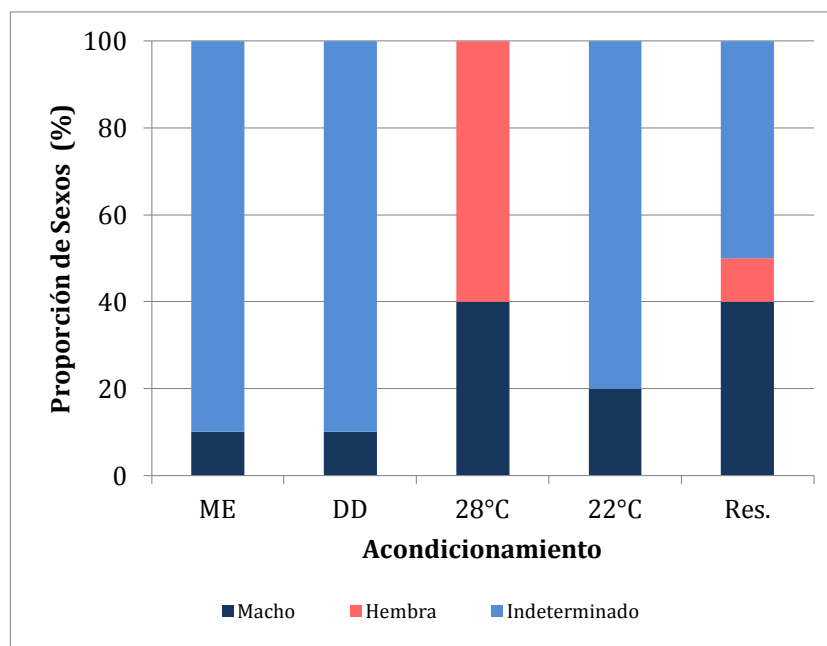
**Figura 6.** Etapas de madurez gonadal de ostras *Crassostrea iridescens* antes y después de 7 semanas de acondicionamiento. **Fuente:** Investigación realizada.

La figura 7 muestra las etapas de desarrollo gonadal encontrados en este estudio y analizado por histología. En las figuras 7C y 7D se observan óvulos y espermatozoides respectivamente.



**Figura 7.** Etapas de desarrollo gonadal encontrados en *Crassostrea iridescens* (400X): (A) Indeterminado; (B) Desarrollo temprano - macho; (C) Desarrollo tardío - hembra; (D) Desarrollo tardío - macho. Tc: Tejido conectivo; csi: células sexuales indiferenciadas; eg: espermatogonios; ec: espermatocitos; om: ovocito maduro; oi: ovocito inmaduro; op: ovocito primario; pf: pared folicular; cp: citoplasma; n: núcleo; nl: nucléolo; ez: espermatozoides; gd: gonoducto. Tamaño de la barra=50  $\mu$ m. **Fuente:** Investigación realizada.

Por otra parte, se encontró presencia de hembras únicamente en los acondicionamientos  $28^{\circ}\text{C}$  y *Reservorio* (Fig. 8). Sin embargo, en el grupo  $28^{\circ}\text{C}$  se registró el mayor porcentaje de hembras (60%) sin encontrarse organismos indeterminados.



**Figura 8.** Proporción de sexos de las ostras antes y después de siete semanas de acondicionamientos. **Fuente:** Investigación realizada.

### 3.1.1. ÍNDICE GONADOSOMÁTICO (IGS)

En general, el IGS después de la depuración (*DD*) fue de  $41,65 \pm 8,4$  % siendo significativamente inferior ( $P < 0,05$ ) a los obtenidos al momento de la extracción (*ME*) y tras las 6 semanas para todos los acondicionamientos. Por

otra parte, no se encontraron diferencias significativas ( $P>0,05$ ) entre el IGS obtenido por cada etapa de desarrollo gonadal. (Tabla II).

### **3.2. INDUCCIÓN AL DESOVE**

Luego de analizar el estado de desarrollo gonadal alcanzado por las ostras acondicionadas a diferentes ambientes durante 6 semanas, se determinó que los organismos no estaban completamente maduros por lo que se decidió realizar las inducciones una semana después.

El análisis posterior de las variables evaluadas en este estudio se lo realizó con los resultados obtenidos con el acondicionamiento  $28^{\circ}\text{C}$  que registró la mayor cantidad de desoves, con el 51,79% de los organismos estimulados en todos los métodos de inducción. El acondicionamiento  $22^{\circ}\text{C}$  solamente registró el 5,36% de los organismos estimulados (se produjeron 3 desoves en el tratamiento  $T30'$ , todos ellos machos, con un tiempo promedio de  $3,73\pm 0,68$  horas). Finalmente, el grupo *Reservorio* no registró desoves en ningún tratamiento de inducción.

**Tabla II.** Peso total, peso de tejido blando e índice gonadosomático general y por etapa de desarrollo gonadal para *Crassostrea iridescens* antes y después de diferentes acondicionamientos.

	General	Indeterminado	Desarrollo Temprano	Desarrollo Tardío	Madurez	Desove
<b>ME</b>						
Peso total (g)	364,2±100,7	371,2±104,2	301,2	---	---	---
Peso Tejido Blando (g)	29,2±9,0	29,0±9,6	30,7	---	---	---
IGS (%)	65,3±11,7 <sup>b</sup>	64,3±12,0	73,8	---	---	---
<b>DD</b>						
Peso total (g)	380,8±115,0	386,8±120,3	326,7	---	---	---
Peso Tejido Blando (g)	18,4±3,5	18,0±3,4	22,1	---	---	---
IGS (%)	41,7±8,4 <sup>a</sup>	41,4±8,9	43,9	---	---	---
<b>28°C</b>						
Peso total (g)	451,3±148,4	---	---	451,3±148,4	---	---
Peso Tejido Blando (g)	33,2±13,1	---	---	33,2±13,1	---	---
IGS (%)	59,4±8,7 <sup>b</sup>	---	---	60,2±8,4	---	---
<b>22°C</b>						
Peso total (g)	399,6±110,5	394,0±127,6	416,1±58,1	---	---	---
Peso Tejido Blando (g)	25,5±10,0	25,3±11,7	26,0±4,4	---	---	---
IGS (%)	58,6±7,7 <sup>b</sup>	56,5±7,8	64,9±1,2	---	---	---
<b>Reservorio</b>						
Peso total (g)	400,8±80,6	428,2±93,0	372,4±72,1	374,7±77,6	---	---
Peso Tejido Blando (g)	23,8±6,4	25,2±7,3	20,7±7,5	24,8±2,2	---	---
IGS (%)	55,6±5,0 <sup>b</sup>	54,3±5,6	57,4±4,0	56,0±7,0	---	---

Los resultados se muestran como media±DS. Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas para IGS ( $P<0,05$ ). **Fuente:** Investigación realizada.

### 3.2.1. PORCENTAJE DE ORGANISMOS DESOVADOS

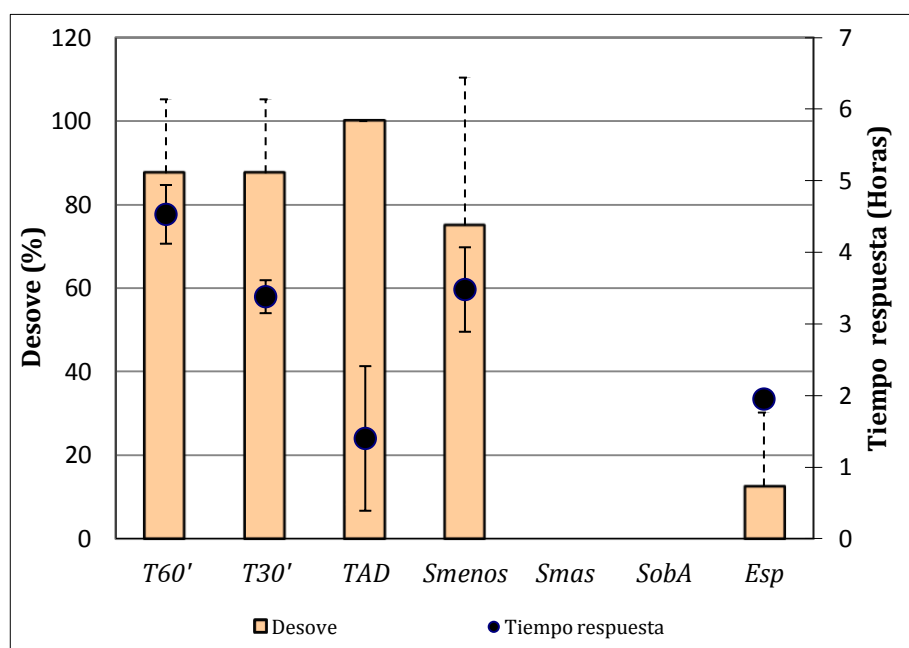
De los 7 estímulos evaluados, con los tratamientos *T60'*, *T30'*, *TAD* y *Smenos* se obtuvieron porcentajes de desoves significativamente mayores ( $P<0,05$ ) que con los tratamientos *Smas*, *SobA* y *Esp*. De todos, con los que involucraron cambios repentinos de temperatura, se registraron mejores porcentajes de desoves (*T60'*:  $87,5\pm 17,7\%$ ; *T30'*:  $87,5\pm 17,7\%$  y *TAD*: 100%) (Fig. 9).

El tratamiento *T30'* registró el mayor porcentaje de hembras desovadas con el 57,1% ( $n=7$ ), seguido del *TAD*, con el 50% ( $n=8$ ). No se determinó el sexo de los organismos no desovados. En todos los tratamientos donde se produjeron desoves (*T60'*, *T30'*, *TAD*, *Smenos* y *Esp*) el primer organismo en desovar fue macho, excepto en el tratamiento *Smenos* (Fig. 10).

A pesar de no existir diferencias significativas ( $P>0,05$ ) entre los porcentajes de desove antes y después de adicionar espermatozoides, del 100% de los organismos desovados en los tratamientos *T60'*, *T30'*, *TAD* y *Smenos*, el 75% de los desoves ocurrió después de la adición de espermatozoides. Sin embargo, en *TAD* se registró el 75% de desoves antes de la adición de espermatozoides.

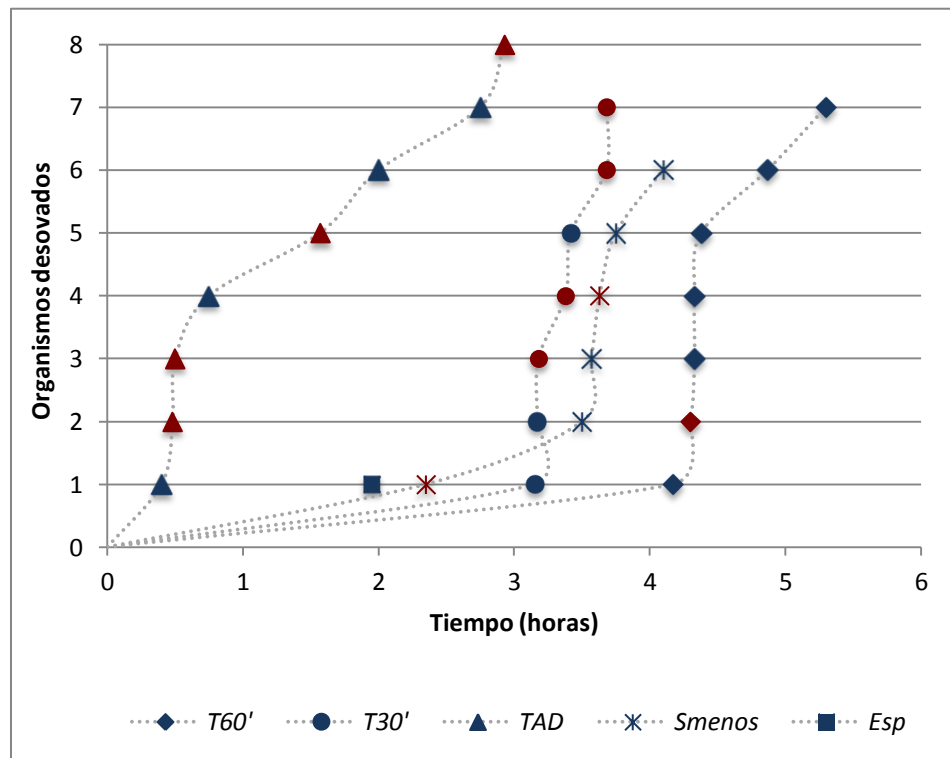
### 3.2.2. TIEMPO DE RESPUESTA A LOS ESTÍMULOS DE INDUCCIÓN

El tratamiento *TAD* produjo el tiempo de respuesta significativamente menor ( $P < 0,05$ ) a los otros tratamientos con un promedio de  $1,40 \pm 1,01$  h (*T60'*:  $4,53 \pm 0,41$  h; *T30'*:  $3,38 \pm 0,23$  h; *Smenos*:  $3,48 \pm 0,59$  h y *Esp*: 1,95 h). Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) en el tiempo de respuesta entre los tratamientos *T60'*, *T30'* y *Smenos*. (Fig. 9 y 10).



**Figura 9.** Porcentaje de organismos desovados y tiempo de respuesta promedio por tratamientos (Acondicionamiento  $28^{\circ}\text{C}$ ). **Fuente:** Investigación realizada.

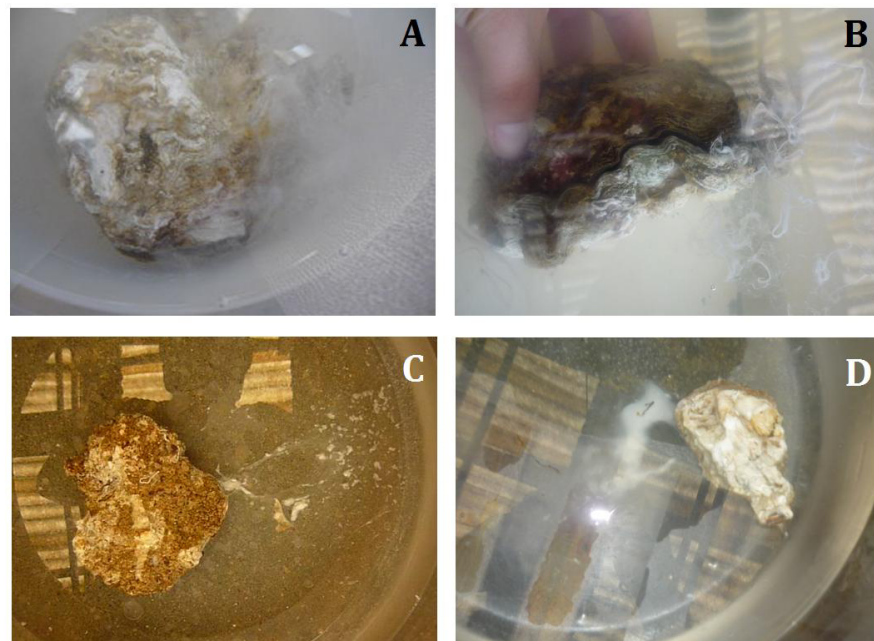




**Figura 10.** Tiempo de respuesta de los organismos desovados por tratamientos (Acondicionamiento 28°C). El color azul representa a los machos y el rojo a las hembras. **Fuente:** Investigación realizada.

Cabe destacar que, cuando se produjeron los desoves en todos los tratamientos, macroscópicamente se observó que la liberación de gametos en las hembras se producía de manera interrumpida en períodos cortos de tiempo, generando expulsión de óvulos 4 a 5 veces; mientras que la liberación de gametos en los machos tendía a ser constante y prolongada, 2 a 3 veces. Además, se pudo observar que las hembras estimuladas con variaciones térmicas (*T60'*, *T30'* y *TAD*) liberaban los gametos suavemente y que estos se mantenían en la

columna de agua, mientras que el tratamiento que involucró disminución de salinidad, lo hacían en forma aglutinada, depositando los óvulos en el fondo del recipiente. (Fig. 11).



**Figura 11.** Expulsión de gametos de *Crassostrea iridescens*: (a) Hembra tratamiento T60', (b) Macho tratamiento TAD, (c y d) Hembras tratamiento Smenos. **Fuente:** Investigación realizada.

### 3.2.3. PRODUCCIÓN DE ÓVULOS Y FERTILIZACIÓN

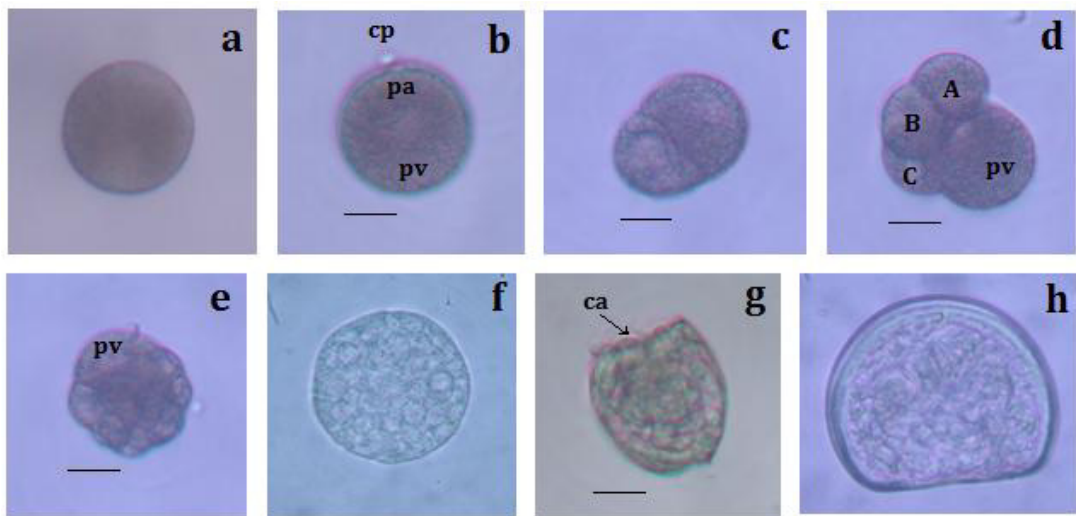
De los 4 tratamientos donde las hembras produjeron desoves (T60', T30', TAD y Smenos), TAD obtuvo el promedio más alto con  $47,19 \pm 32,12 \cdot 10^6$  óvulos

liberados; seguido de *T30'*:  $24,50 \pm 16,45 \cdot 10^6$  y *Smenos*:  $20,80 \pm 6,22 \cdot 10^6$ ; sin que existan diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) entre la cantidad de óvulos liberados en los diferentes tratamientos. El tamaño promedio de los óvulos liberados en todos los tratamientos fue  $46,95 \pm 1,53 \mu\text{m}$  ( $n=20$ ). Los porcentajes de fertilización variaron entre 82 y 98%, siendo el tratamiento *TAD* el que obtuvo el porcentaje promedio significativamente más alto ( $P < 0,05$ ) con  $95,89 \pm 1,39\%$ , seguido por *Smenos* (88,88%) y *T30'* ( $82,58 \pm 0,76\%$ ). El tratamiento *T60'* presentó solo una hembra desovada, produciendo  $45 \cdot 10^6$  óvulos con un porcentaje de fertilización de 89,20%.

### **3.3. DESARROLLO EMBRIONARIO Y LARVARIO**

El tamaño promedio de los óvulos fue  $46,95 \pm 1,53 \mu\text{m}$  (Fig. 12a). La fertilización ocurrió aproximadamente 30 minutos luego del contacto entre los gametos, donde se pudo apreciar la formación del primer cuerpo polar (Fig. 12b). Luego de 30 minutos, la primera segmentación divide el cigoto en dos células desiguales, representadas por el polo animal y polo vegetal (Fig. 12c), sesenta minutos después ocurre la segunda división, donde los blastómeros se dividen en 4 células (Fig. 12d). Las posteriores divisiones resultan en la formación de la mórula y blástula, procesos que ocurrieron entre las 6-8 h (Fig. 12e,f). La fase de gástrula, seguida por la formación de larvas trocóforas activas,

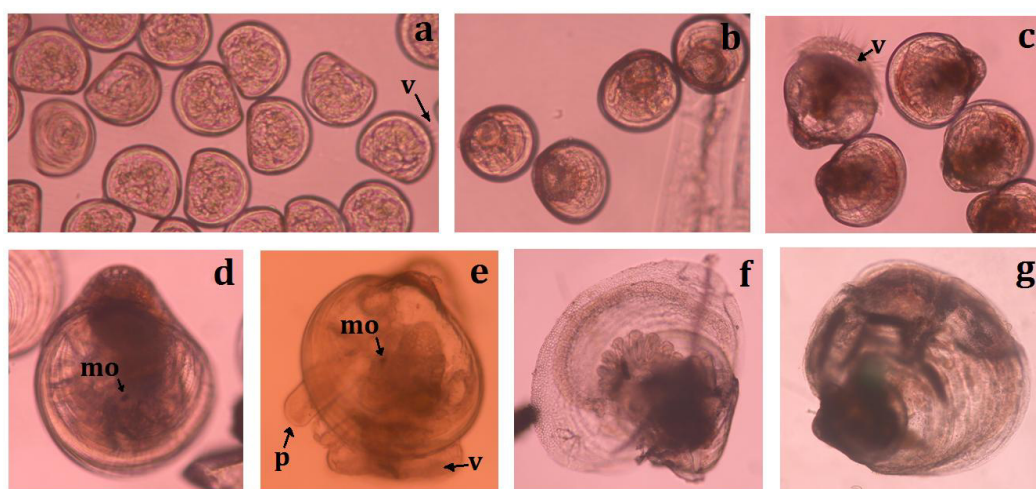
ocurrió entre las 10-12 h (Fig. 12g). Luego de transcurrido 22 a 24 horas se observaron las primeras larvas D, con una altura y longitud de la valva de  $58,0\pm 0,4\ \mu\text{m}$  y  $67,9\pm 2,3\ \mu\text{m}$  respectivamente ( $n=20$ ) (Fig. 12h y Fig. 13a), dando inicio al desarrollo larvario.



**Figura 12.** Desarrollo embrionario de *Crassostrea iridescens* en las primeras 24 horas: (a) óvulo [ $46,95\pm 1,53\ \mu\text{m}$ ]; (b) cigoto; (c) primera división; (d) segunda división; (e) mórula; (f) blástula; (g) larva trocófora; (h) larva D. cp: cuerpo polar; pa: polo animal; pv: polo vegetal; A, B, y C: blastómeros; ca: cilio apical. Tamaño de la barra= $20\ \mu\text{m}$ . **Fuente:** Investigación realizada.

Durante el desarrollo larvario, en el día 8 se tornó visible el umbo, evidenciando la fase de desarrollo temprano, con un tamaño de  $94,9\pm 12,1\ \mu\text{m}$  (Fig. 13b), en ese momento, las larvas eran nadadoras activas, encontrándose mayoritariamente en la columna de agua. La fase umbonada tardía ( $192,3\pm 15,3$

$\mu\text{m}$ ) fue observada al día 21 de cultivo (Fig. 13c). A partir del día 25 se observó la presencia de la mancha ocular (Fig. 13c) y 5 días después, las primeras larvas con pie de fijación (estado pediveliger,  $315,0 \pm 35,4 \mu\text{m}$ ) (Fig. 13e). En contraste, estas larvas se encontraban mayoritariamente en el fondo de los tanques, inclusive durante la alimentación.

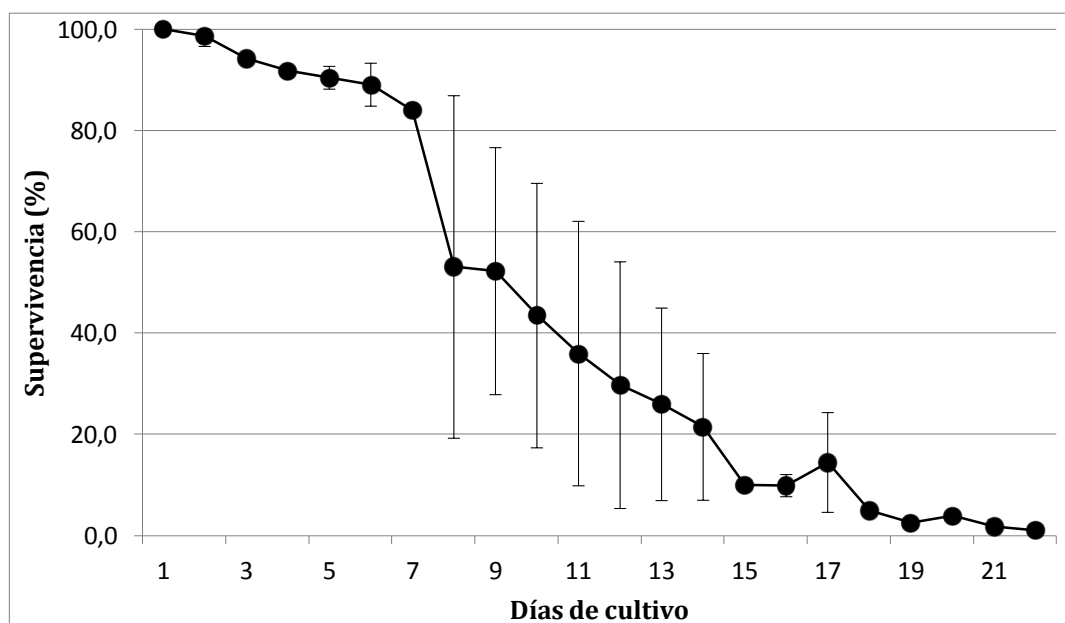


**Figura 13.** Desarrollo larvario y semilla de *Crassostrea iridescens* [altura de la valva $\pm$ DE]: (a) larva D - día 1 [ $58,0 \pm 0,4 \mu\text{m}$ ]; (b) umbonada temprana - día 8 [ $94,9 \pm 12,1 \mu\text{m}$ ]; (c) umbonada tardía - día 21 [ $192,3 \pm 15,3 \mu\text{m}$ ]; (d) umbonada tardía con mancha ocular - día 25 [ $233,4 \pm 60,5 \mu\text{m}$ ]; (e) pediveliger - día 30 [ $315,0 \pm 35,4 \mu\text{m}$ ]; (f) semilla - día 35 [ $563 \mu\text{m}$ ] y (g) semilla - día 43 [ $880 \mu\text{m}$ ]. v: velo ciliado; mo: mancha ocular; p: pie de fijación. **Fuente:** Investigación realizada.

La fase post-larval fue registrada el día 35, con la aparición de la primera semilla (Fig. 13f), con un tamaño de  $563 \mu\text{m}$ , donde se pudo observar un

desarrollo interno casi completo, con la presencia de un grupo de branquias rudimentarias.

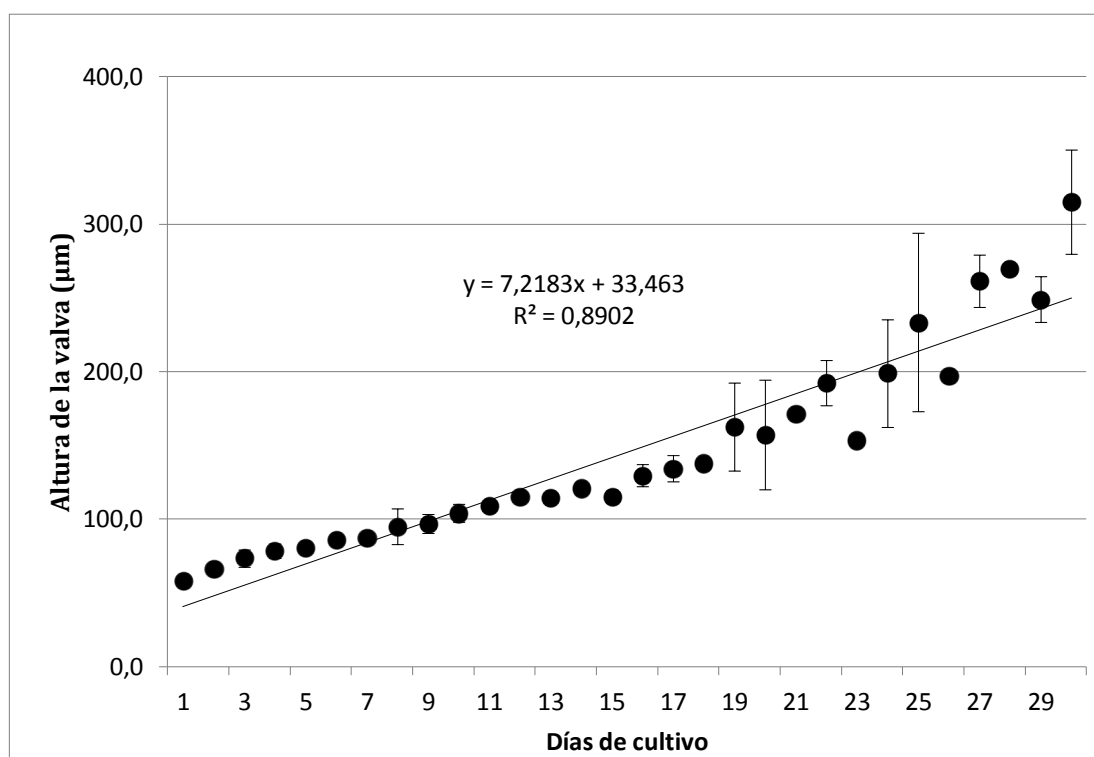
A pesar de que en los primeros días de cultivo se observó baja mortalidad en las larvas, en el día 8 se registró una disminución de la supervivencia del 30% en relación al día anterior. La supervivencia fue registrada hasta el día 22, con el 1% de organismos vivos (Fig. 14).



**Figura 14.** Porcentaje de supervivencia de larvas de *Crassostrea iridescens* (media $\pm$ DE; n=2). **Fuente:** Investigación realizada.

Durante todo el desarrollo larvario fue evidente la presencia de protozoarios. La tasa de crecimiento diario desde la larva D hasta antes de la

fijación (día 30) fue de  $7,21 \mu\text{m}\cdot\text{día}^{-1}$  considerando la altura de la valva. El desarrollo de la larva hasta el día 19 tuvo un crecimiento constante, sin embargo, a partir de ese día, se notó mayor variabilidad en las tallas. Para registrar los promedios de las mediciones se consideraron todas las larvas (grandes, medianas, pequeñas) (Fig. 15).



**Figura 15.** Altura de la valva (media $\pm$ DE; n=20) de *Crassostrea iridescens* durante su desarrollo larvario. **Fuente:** Investigación realizada.

### **3.4. FIJACIÓN**

De los 3 tipos de sustratos utilizados, en el que se encontraron “semillas” adheridas fue en las valvas de reproductores de *C. iridescens* (4 a 5 cm). En el sustrato de conchas molidas de *C. gigas* (250-300  $\mu\text{m}$ ) no se observaron “semillas” vivas, sin embargo, se notó la presencia de valvas de “semillas” vacías. En las láminas de plástico no se encontraron “semillas”. Por otra parte, se observaron semillas fijadas en el fondo del tanque de cultivo. En total a los 35 días de cultivo se registraron aproximadamente 100 semillas fijadas en todos los sustratos (<1% de fijación).



## **CAPITULO IV.**

### **4. DISCUSIÓN**

#### **4.1. DESARROLLO GONADAL**

Está documentado que la temperatura es el principal factor ambiental que regula el ciclo gametogénico en bivalvos marinos<sup>(6)(7)(8)(10)</sup>. La temperatura para el desarrollo gametogénico depende del rango característico para cada especie. Por ejemplo, durante las bajas temperaturas, los scallops almacenan

suficientes reservas nutricionales requeridas para el inicio de la gametogénesis, la cual se inicia cuando son mantenidas a altas temperaturas<sup>(8)</sup>. En medios naturales, registros de *C. iridescens* muestran comportamientos similares, al relacionarse el incremento de la temperatura del agua con el inicio de la gametogénesis. Cuevas y Martínez (1979)<sup>(3)</sup> describieron el ciclo gametogénico de *C. iridescens* en la localidad de San Blas, Nayarit (México) durante los años 1972 y 1973, registrando una fase de reposo gonádico desde octubre hasta abril, la fase de madurez gonadal entre junio a agosto y la fase de desove durante agosto y septiembre. En otro estudio realizado en la misma localidad y durante la misma época, se menciona que las máximas temperaturas (30-32°C) ocurrieron de junio a octubre, coincidiendo con la fase de maduración y desove descrita por Cuevas y Martínez (1979)<sup>(3)</sup>, mientras que las más bajas temperaturas (23-26°C) fueron registradas de noviembre a abril, conjuntamente con la fase de reposo gonádico de *C. iridescens*<sup>(18)</sup>. Por otra parte, en un estudio desarrollado en Costa Rica, se describió el ciclo gametogénico de *C. iridescens*, mencionando que la actividad reproductiva en esta especie ocurre continuamente durante todo el año al registrar mensualmente ostras en diferentes etapas de desarrollo gonadal entre abril de 1986 y junio de 1987, las temperaturas durante este período oscilaron entre 28-32°C <sup>(19)</sup>. Registros de especies del género *Crassostrea* han mostrado un comportamiento similar, en Mina Vieja (México) para *C. gigas*<sup>(92)</sup>, y en Bridgeport (USA) para *C. virginica*<sup>(93)</sup>,

al coincidir las más altas temperaturas del agua (20-23°C y 20-30°C, respectivamente) con la etapa de madurez gonadal.

Registros no publicados (CENAIM-ESPOL) de las temperaturas del agua en Ayangue (Provincia de Santa Elena, Ecuador) muestran que las más altas temperaturas se dan entre los meses de enero a abril (26-28°C), y las más bajas entre agosto y noviembre (23-25°C). En este estudio, las ostras fueron colectadas del medio natural a inicios de septiembre (23°C). Las observaciones histológicas mostraron que en este período el 90% de los organismos se encontraban en etapa indeterminada. Mientras que luego de 6 semanas de acondicionamiento, el 100% de los organismos mantenidos a 28°C, alcanzaron la etapa de desarrollo tardío, a diferencia del acondicionamiento a 22°C, con el 80% en etapa indeterminada y el 50% de los organismos del tratamiento *Reservorio* evidenciaron indicios de gametogénesis, en este último tipo de acondicionamiento, la temperatura del agua varió entre 24 y 27°C durante las tardes. Marín (2011)<sup>(17)</sup> observó estadios gonadales avanzados (33% en etapa de madurez) luego de 30 días de acondicionamiento en el mismo canal reservorio utilizado para estudio. No obstante, la temperatura fue mayor (27,01±2,02°C). Todos estos resultados evidencian la posibilidad de que la temperatura sea el principal factor ambiental que regula la gametogénesis de la ostra nativa *C. iridescens*, pudiendo alcanzar etapas avanzadas de desarrollo gonadal con temperaturas superiores a 27°C.

El suplemento alimenticio constituye otro factor de importancia durante la gametogénesis<sup>(13)(55)(56)(87)(94)</sup>. En ambientes naturales, se han encontrado picos máximos de desarrollo gonadal en *Autocomya ater* y *Ostrea edulis*, conjuntamente con la alta disponibilidad de alimento (diatomeas y microflagelados), acelerando la gametogénesis<sup>(56)(95)</sup>. Estudios mencionan que el contenido lipídico de los huevos en bivalvos depende de la disponibilidad alimenticia hacia las hembras durante la gametogénesis, permitiendo un eficaz desarrollo embrionario<sup>(12)(13)(15)</sup> y larvario<sup>(11)(13)(15)</sup>. La mezcla compuesta por microalgas (*Chaetoceros gracilis* e *Isochrysis galbana*) ricas en ácidos grasos altamente insaturados suministrada a los reproductores en este trabajo, brindan las condiciones nutricionales necesarias para el desarrollo gonadal, viéndose reflejado en el vigor del embrión y larva durante la cría<sup>(16)(42)(96)</sup>. La combinación de ambas microalgas ha sido utilizada exitosamente en *Nodipecten nodosus*<sup>(29)</sup>, *C. gigas*<sup>(97)</sup>, y *O. chilensis*<sup>(13)</sup>. Sin embargo, algunos estudios han demostrado que ostras maduras pueden ser obtenidas en laboratorios sin adicionar alimento durante el acondicionamiento, debido a que en épocas frías se produce una acumulación de suficientes reservas nutricionales que provee energía durante la gametogénesis<sup>(55)(62)</sup>. Resultados obtenidos en estudios con *C. gigas* hembras, mostraron que la alimentación durante el acondicionamiento de reproductores puede no ser necesaria, debido a que no influyó sobre la calidad del ovocito ni en el desempeño de las larvas y post-larvas<sup>(62)</sup>. Por otro lado, se ha reportado que el suplemento adicional de alimento durante el desarrollo gonadal es esencial y

que las reservas acumuladas en la glándula digestiva previa a la gametogénesis no son suficientes para soportar este proceso<sup>(8)</sup>. En este estudio, el acondicionamiento 22°C, a pesar de recibir la misma calidad y ración alimenticia que el acondicionamiento 28°C, no evidenció gametogénesis, lo que enfatiza la dependencia de la temperatura para iniciar dicho proceso. Por otra parte, el diseño experimental en este estudio no permitió evaluar la influencia que tuvo la alimentación durante el desarrollo gametogénico en el acondicionamiento 28°C.

La determinación del sexo en ostras, está genéticamente controlada y puede ser influenciada por factores ambientales<sup>(98)</sup>. En *C. gigas*, Los machos pueden predominar cuando las temperaturas son bajas<sup>(98)</sup> y las condiciones ambientales menos favorables<sup>(99)</sup>. En el presente trabajo, se registró el 60% de hembras en el acondicionamiento 28°C, lo que sugiere la probabilidad de que los factores ambientales y condiciones nutricionales fueron adecuados para la gametogénesis de ambos sexos.

A pesar de que en medios naturales se ha demostrado una correlación entre la salinidad y el ciclo gametogénico en ostras, su efecto no es claro, quizás esto se deba a un cambio nutricional que a la salinidad en sí<sup>(2)</sup>. Butler (1949)<sup>(100)</sup>, le atribuye mayor importancia a la disponibilidad de alimento en la variación y supresión de la actividad gonadal en *C. virginica*, que a las bajas salinidades registradas. Se conoce que algunas especies del género *Crassostrea* son

consideradas eurihalinas, entre ellas *C. iridescens*<sup>(2)</sup>. En este estudio, la salinidad en los acondicionamientos 28°C y 22°C se mantuvo entre 32 y 33 g.L<sup>-1</sup>, mientras que el *Reservorio* tuvo registros entre 35 y 38 g.L<sup>-1</sup>, sin embargo, no existe suficiente evidencia para determinar la influencia que pudo haber ejercido la salinidad sobre el desarrollo gonadal en los 3 grupos de acondicionamiento.

El tiempo utilizado en este estudio para acondicionar a los reproductores fue el descrito por Helm (2006)<sup>(16)</sup> para especies del género *Crassostrea* cultivadas habitualmente, tales como *C. gigas* y *C. virginica*. El acondicionamiento 28°C, si bien obtuvo etapas de desarrollo gonadal elevadas luego de 6 semanas, no registró ningún organismo en etapa de madurez completa. Estudios con *C. virginica*, *C. gigas* y *Ruditapes decussatus* han demostrado que el tiempo requerido para alcanzar la madurez, depende de la temperatura de acondicionamiento, a mayor temperatura se acelera el desarrollo gametogénico<sup>(23)(101)(102)</sup>. Esto sugiere que la ostra *C. iridescens* probablemente requirió ser acondicionado a temperaturas mayores a 28°C (dentro del rango de tolerancia) para alcanzar la etapa de madurez durante las 6 semanas. A pesar de esto, este estudio ha demostrado que es posible el acondicionamiento de reproductores de *C. iridescens* en laboratorio.

#### **4.2. ÍNDICE GONADOSOMÁTICO**

Algunos estudios han mostrado una correlación entre el IGS y la condición de desarrollo reproductivo en *S. calcifer*<sub>(103)</sub> y *C. corteziensis*<sub>(104)</sub>. En el presente trabajo, el índice gonadosomático no resultó ser un buen indicador del desarrollo gametogénico en *C. iridescens*, debido a que los 3 grupos de acondicionamiento no reflejaron las diferencias del ciclo reproductor encontradas mediante los análisis histológicos de sus gónadas. Sin embargo, el valor del IGS después de la depuración (*DD*) resultó significativamente inferior a los demás, esto puede explicarse debido a que, durante la fase de depuración, los organismos fueron desprovistos de alimentación, haciendo uso de las reservas presentes en el área gonadal, similar a lo reportado en *A. purpuratus*<sub>(105)</sub>. Es importante considerar las limitaciones del IGS como descriptor del ciclo reproductivo en bivalvos, ya que existen factores que pueden influir en su valor real como el contenido de agua presente en los tejidos, o la mala toma de la muestra.

#### **4.3. INDUCCIÓN AL DESOVE Y TIEMPO DE RESPUESTA**

En general, tomando en cuenta el porcentaje de organismos desovados dentro del grupo 28°C (51,79%), en respuesta a los estímulos aplicados a

diferencia de los grupos 22°C (5,36%) y *Reservorio* (0%), podemos indicar que esta especie es sensible a estímulos externos específicos, siempre que haya alcanzado al menos etapas cercanas a la madurez gonadal. Los cambios abruptos de temperatura y salinidad inducen desoves en ostras<sup>(43)</sup>. De todos los estímulos evaluados en este estudio, los que involucraron cambios de temperatura y descenso de salinidad registraron desoves. Si bien no existen reportes de desoves de *C. iridescens* en laboratorio, estos resultados tienen similitud con registros de desoves de esta especie en medios naturales. Fournier (1992)<sup>(19)</sup> detectó desoves en el inicio de la temporada lluviosa en el Golfo de Nicoya (Costa Rica), cuando la salinidad decreció de 32 a 29 g.L<sup>-1</sup>. Por otro lado, Cuevas-Martínez (1979)<sup>(3)</sup> registraron desoves de *C. iridescens* entre agosto y septiembre en San Blas, Nayarit (México), cuando en esa época se produjo un descenso de salinidad de hasta 0 g.L<sup>-1</sup> y un incremento de la temperatura del agua hasta 32°C<sup>(18)</sup>. Similares resultados han sido reportado en *C. virginica*, produciéndose desoves cuando la temperatura del agua se encontraba cerca del máximo anual en Bridgeport (USA)<sup>(93)</sup> y por otro lado, cuando se alcanzaron los valores más bajos de salinidad, en Yucatán (México)<sup>(106)</sup>. De igual manera en *C. corteziensis*, los desoves se produjeron cuando la temperatura se incrementó por encima de 27°C, en el Golfo de California (Sinaloa, México)<sup>(104)</sup>.

La temperatura es el factor exógeno más importante que regula los desoves en bivalvos<sup>(10)</sup>. Existe un requerimiento mínimo de temperatura para



inducir al desove en *C. gigas* y que ésta temperatura es mayor a la requerida para estimular la gametogénesis<sup>(107)</sup>. El método de inducción *TAD* utilizado en este estudio, que involucró un aumento de la temperatura y posterior desecación resultó ser el estímulo más exitoso para *C. iridescens* al obtener desoves en todos los organismos, tanto machos como hembras, y alcanzar en promedio el menor tiempo de respuesta ( $1,40 \pm 1,01$  h). El incremento de la temperatura para generar desoves en laboratorio ha sido reportado además en otros bivalvos tales como *C. gigas*<sup>(22)</sup>, *C. madrasensis*<sup>(20)</sup>, *Spisula solidissima*<sup>(21)</sup>, *R. decussatus*<sup>(23)</sup>, *Mytilus edulis*<sup>(24)</sup> y pectínidos<sup>(25)</sup> como *Chlamys aspérrima*<sup>(26)</sup>, *A. circularis*<sup>(27)(28)</sup>, *N. nodosus*<sup>(29)</sup>, y *Pecten ziczac*<sup>(30)</sup>. Los métodos de inducción donde se vieron involucrados cambios de temperatura (*T60'* y *T30'*) fueron realizados en concordancia con los estudios en *Spondylus calcifer*<sup>(31)</sup>, *Chione cancellata*<sup>(32)</sup> y *A. nucleus*<sup>(33)</sup> *Rangia cuneata*, *C. virginica*, *Geukensia demisa*<sup>(34)</sup>, generando de igual manera desoves en ambos tratamientos.

La reducción de la salinidad ha mostrado ser un estímulo importante para el desove de ostras tropicales<sup>(2)</sup>. En este estudio, la disminución de la salinidad como método de inducción (*Smenos*) produjo desoves en ambos sexos. Similares resultados han sido reportados en especies como *Saccostrea cucullata*, *S. commercialis*, *Perna viridis*, *P. indica*<sup>(35)</sup>, *Meretrix lyrata*<sup>(36)</sup>, *C. madrasensis*<sup>(37)</sup> y *Saccostrea echinata*<sup>(38)</sup>. Se ha sugerido que desoves obtenidos disminuyendo la salinidad pueden tener una influencia importante en la supervivencia larval<sup>(38)</sup>.

Rao (1951)<sup>(37)</sup> notó que el desarrollo temprano de las larvas veligers fueron óptimas a estas bajas salinidades (22-26 g.L<sup>-1</sup>). Por otra parte, el método de inducción que involucró el incremento de la salinidad (*Smas*) a pesar de haber obtenido desoves en *Rangia cuneata*, *C. virginica* y *Geukensia demissa*<sup>(34)</sup>, y *C. madrasensis*<sup>(37)</sup>, en este trabajo no se evidenciaron desoves. Ha sido registrado que cambios rápidos de salinidades en *C. gigas* tienen como efecto inicial la contracción parcial o completa del músculo aductor dependiendo de la salinidad, considerando además, que salinidades superiores resultan ser intolerables para esta especie<sup>(108)</sup>. Es probable que durante el incremento rápido de salinidad realizado en este trabajo haya tenido como consecuencia el cierre total de las valvas en *C. iridescens*, no siendo afectado por el cambio brusco de salinidad.

A pesar que la presencia de gametos ha sido reportada como un estimulante de desoves en almejas<sup>(41)</sup>, y la sobrealimentación en *Siliqua patula*<sup>(39)</sup>, en el presente trabajo, los tratamientos que involucraron únicamente la presencia de espermatozoides (*Esp*) y sobrealimentación (*SobA*) no resultaron ser métodos efectivos, al registrar tan solo el 12,5% y 0% de desoves, respectivamente. Sin embargo, cabe mencionar que el mayor porcentaje de desoves en los tratamientos *T60'*, *T30'*, y *Smenos* fueron registrados posterior a la adición de espermatozoides, inclusive se notó la liberación de gametos tanto en machos como hembras pocos segundos después de adicionarlo. Similares resultados han sido reportados en estudios con *C. virginica*, mencionando que la

presencia de espermatozoides inicia una serie de reacciones en hembras maduras, las cuales en pocos segundos finalizan en desoves causados por fuertes contracciones rítmicas del músculo aductor, sugiriendo que los espermatozoides quizás actúen a través del tracto digestivo o luego de ser absorbidos por las branquias y manto de las ostras<sup>(109)</sup>. Estudios mencionan que en ciertos casos la termoestimulación sola no es suficiente para inducir desoves, sino que requieren una estimulación adicional como la adición de pequeñas cantidades de espermatozoides u óvulos extraídas de gónadas maduras de la misma especie<sup>(7)(109)</sup>. Estas observaciones sugieren que la presencia de espermatozoides de *C. iridescens* puede estimular a organismos de la misma especie a generar desoves, siempre que éstos reciban algún estímulo externo previo. Es probable que las gónadas maduras de esta especie contengan feromonas que induzcan a otras a desencadenar desoves<sup>(110)</sup>.

De todos los estímulos evaluados en este estudio, los resultados sugieren, que al incluir cambios de temperatura ( $T60'$ ,  $T30'$ ,  $TAD$ ) y descenso de salinidad ( $Smenos$ ) se podrían generar desoves tanto en machos como en hembras en la ostra nativa *C. iridescens*, produciendo gametos viables para el posterior desarrollo embrionario y larvario. Sin embargo, cabe mencionar la efectividad de la combinación con otros estímulos, como la adición de espermatozoides, sobrealimentación o la exposición al aire del reproductor. Estos resultados producidos en laboratorio nos indican además, que el desove de la ostra *C.*

*iridescens* no está restringido para un período particular del año. Parece ser que el desove depende de la etapa de madurez gonadal y de estímulos externos favorables, sugiriendo la posibilidad de que los desoves en esta especie no son enteramente regulados por factores endógenos, sino más bien por una combinación de factores internos y externos.

#### **4.4. PRODUCCIÓN Y FERTILIZACIÓN DE ÓVULOS**

No se evidenciaron diferencias significativas entre la cantidad de óvulos liberados en los diferentes tratamientos donde se registraron desoves. Esto sugiere que en esta especie, la liberación de gametos es independiente de los tipos de estímulos utilizados. Similares resultados han sido reportados en *N. nodosus*<sup>(33)</sup>. Sin embargo, cabe mencionar que la cantidad de óvulos liberados en los bivalvos depende también de otros factores como el estado de madurez y el tamaño del organismo<sup>(16)(31)</sup>. Según las observaciones histológicas, las hembras se encontraban en etapas próximas a la madurez gonadal, y la media de la producción de óvulos en total fue de  $34,88 \pm 23,81 * 10^6$ , con una altura de la valva entre 11 y 13 cm, obteniendo resultados comparables a los de Soria, *et al.*, (2010)<sup>(31)</sup>, al reportar en una hembra de *S. calcifer*  $28,95 * 10^6$  óvulos, con altura de la valva de 11,5 cm, sin embargo, no se menciona la etapa de madurez.

Los porcentajes de fertilización de los gametos obtenidos en este estudio variaron entre 82 y 98%, siendo en general mayores comparados con otras especies como *A. nucleus* (45-76%), *A. purpuratus* (52,8%)<sup>(79)</sup> y *M. edulis* (51%)<sup>(24)</sup>, cuyos trabajos utilizaron cambios de temperatura para producir desoves. Esto sugiere que esta especie, puede ser altamente fecunda una vez alcanzado etapas avanzadas de madurez gonadal, y que los estímulos evaluados permiten la liberación de un porcentaje elevado de gametos viables. Cabe mencionar la importancia de las condiciones de acondicionamiento tales como temperatura, calidad y cantidad de alimento para obtener la máxima fecundidad, calidad del huevo y la viabilidad de la larva, sin embargo, esto difiere acorde con la edad del organismo y el estado gametogénico<sup>(24)</sup>. En este trabajo, no se consideró la edad de los reproductores, siendo el criterio de selección el tamaño de la valva (mayores a 10 cm)<sup>(17)</sup>; relacionando el porcentaje de fertilización con el estado de desarrollo gonadal al momento de la inducción. El estímulo *TAD*, si bien produjo el mayor porcentaje de fertilización con el  $95,89 \pm 1,39\%$ , no existe evidencia suficiente para determinar que se debió al estímulo en sí. Pudo deberse a otros factores como la condición de madurez, la talla o edad de una de las hembras desovadas, o simplemente a errores en la toma de la muestra.

#### **4.5. DESARROLLO EMBRIONARIO Y LARVARIO**

La talla, forma, y características de las diferentes fases embrionarias y larvarias de *C. iridescens* hasta el momento de la fijación fueron similares a los descritos previamente para otras especies de bivalvos<sup>(16)(42)(44)(45)(47)</sup>. La larva D a las 24 horas registró una altura y longitud de la valva entre  $58,0 \pm 0,4$  y  $67,9 \pm 2,3$   $\mu\text{m}$  respectivamente, presentando una similitud con otras especies del mismo género, como *C. virginica*<sup>(7)(16)(45)</sup>, *C. gigas*<sup>(16)(43)</sup> y ligeramente más grande que *C. madrasensis*<sup>(47)</sup> y *C. rhizophorae*<sup>(16)</sup>. Estas diferencias quizás se deban a la variación de los procesos de desarrollo en cada especie y a las diferencias en las condiciones de incubación, tales como temperatura, salinidad, o densidad de siembra.

La larvicultura del presente estudio fue realizada como un ensayo con la finalidad de registrar los primeros estudios de desarrollo embrionario y larvario de esta especie bajo condiciones controladas en laboratorio. Siendo necesario entender las diferentes variables ambientales que intervienen en sus etapas de desarrollo larvario y sus implicaciones con la finalidad de establecer posteriormente protocolos que permitan optimizar la producción de *C. iridescens*.

En este estudio, el crecimiento larval del ostión de roca *C. iridescens* hasta alcanzar etapas de fijación tardó aproximadamente 30 días, siendo mayor al registrado en *C. gigas* (16 días, a 25°C)<sub>(16)(42)(43)</sub> y *C. virginica* (14 a 20 días dependiendo de la temperatura del agua)<sub>(44)(45)</sub>. Rico-Villa, *et al.* (2009)<sub>(111)</sub>, en su estudio, alcanzaron tallas mayores a los 250 µm en *C. gigas* en el día 13 a 27-32°C, confirmando que el crecimiento larvario aumenta conforme se incrementa la temperatura. En *S. tenebrosus*, el período larvario hasta la fijación de la semilla tardó aproximadamente 21 días cultivados a 22-24°C<sub>(112)</sub>. En *S. calcifer*, todos los grupos de larvas alcanzaron la etapa pediveliger en 15 días (30,3±0,82°C). Otro factor importante en el desarrollo larvario es la salinidad, en *C. belcheri*, se ha registrado una supervivencia entre 20,3 y 22,6% desde la larva D hasta la fase de asentamiento, con salinidades entre 24 y 30 g.L<sup>-1</sup> (temperatura entre 27 y 29°C)<sub>(46)</sub>. Varios autores consideran que salinidades de 25-28 g.L<sup>-1</sup> y temperaturas de 25°C son condiciones adecuadas para el cultivo de embriones y primeras larvas en *C. gigas* y *C. virginica*<sub>(16)(42)</sub>. La temperatura y salinidad utilizada para el desarrollo embrionario y larvario en este trabajo fue 27,84±1,97°C y 32,09±0,42 g.L<sup>-1</sup> respectivamente, sin embargo, no existe suficiente evidencia para determinar si existió una influencia tanto de la temperatura como la salinidad sobre el crecimiento y supervivencia de la larva, siendo recomendable realizar estudios con diferentes temperaturas y salinidades. Según registros en medios naturales, las temperaturas de los meses posteriores al desove de *C. iridescens* fueron superiores a 28°C con salinidades

inferiores a 5 g.L<sup>-1</sup>, sin embargo, los autores no mencionan evidencia de la presencia de larvas durante este período<sup>(3)(18)</sup>.

Las microalgas proveen un excelente valor nutricional especialmente para larvas y juveniles de moluscos bivalvos<sup>(87)</sup>, siendo comúnmente utilizadas en Acuicultura los géneros *Chaetoceros* spp., *Isochrysis* sp, y *Pavlova lutheri*<sup>(59)</sup>. No obstante, la cantidad, calidad y combinaciones de éstas son factores importantes para la supervivencia de las larvas durante su desarrollo<sup>(42)</sup>. La combinación de microalgas (1:1) utilizada en este trabajo fue la sugerida por Soria *et al.* (2010)<sup>(31)</sup> para *S. calcifer*, sin embargo, es necesario realizar estudios para determinar la concentración celular del alimento óptimo para esta especie. A pesar de proveer una ración alimenticia inferior a la sugerida por Wallace, *et al.* (2008)<sup>(45)</sup> para ostras, la presencia de protozoarios en este estudio nos sugiere la probabilidad de que haya ocurrido una sobrealimentación. En este estudio, la ración alimenticia diaria fue provista una vez al día, mientras que para *S. calcifer*, se dividió en tres raciones diarias<sup>(31)</sup>.

Los altos porcentajes de mortalidad registrados en este trabajo, especialmente a partir del día 7, pudo deberse a la presencia de gran cantidad de protozoarios. Similar observación ha sido reportado para *C. madrasensis*<sup>(47)</sup>. La sobrealimentación puede producir enfermedades bacterianas en situaciones en las que las larvas ya padecen estrés, siendo aconsejable dividir la ración en dos



partes iguales<sup>(16)</sup>. Esto sugiere que la sobrealimentación, además de la presencia de larvas muertas en el tanque, pudo influir en la multiplicación de protozoarios, a pesar de ello, cabe mencionar que la ración alimenticia y la densidad de siembra proporcionadas en este trabajo fueron inferiores a los utilizados para *S. Calcifer*<sup>(31)</sup> y para ostras del género *Crassostrea* durante el desarrollo larvario<sup>(45)</sup>.

Por esto, mayores investigaciones que involucren diferentes raciones alimenticias, densidades de siembra, y la división de la ración durante el día deben ser evaluadas.

Las estrategias para facilitar y potenciar la fijación de larvas pediveliger varían ampliamente entre laboratorios de cultivo<sup>(16)</sup>. En este trabajo, la temperatura y salinidad de fijación fueron similares a lo sugerido en *C. gigas* (27–29 °C y 27-30 g.L<sup>-1</sup> respectivamente)<sup>(89)</sup>. A pesar de que las conchas molidas de 250-300 µm han sido sugeridas como sustrato de fijación en ostras<sup>(22)(45)(89)</sup>, en este trabajo no se encontraron semillas vivas (3 muertas). Sin embargo, se registraron semillas fijadas utilizando como sustrato valvas de ostras adultas de *C. iridescens*, similar a lo recomendado para *C. gigas*<sup>(43)</sup>. Además, se encontraron semillas fijadas en el fondo del tanque (elaborada a base de fibra de vidrio), sugiriendo que las larvas pediveliger probablemente requirieron de un sustrato adecuado disponible antes del tiempo proporcionado en este estudio. Similar observación fue reportada por Madrones-Ladja (1997)<sup>(113)</sup> al registrar altas mortalidades en la etapa pediveliger. Las láminas de plástico al parecer no son

un sustrato adecuado para la fijación de larvas *C. iridescens* según las observaciones en este trabajo.

## CONCLUSIONES

1. La temperatura del agua es posiblemente el principal factor ambiental que influye en la gametogénesis del ostión de roca *Crassostrea iridescens*.
2. La madurez gonadal de *C. iridescens* en laboratorio es posible en un período de 7 semanas con temperatura constante de 28°C y una dieta combinada de microalgas *Chaetoceros gracilis* e *Isochrysis galbana* a una concentración de 150 y 100 células. $\mu\text{L}^{-1}.\text{día}^{-1}$  respectivamente.
3. El índice gonadosomático no resultó ser un buen indicador del desarrollo gametogénico de *C. iridescens* entre los acondicionamientos ni por etapas del desarrollo gonadal.

4. Reproductores de *C. iridescens* con altura de sus valvas de  $11,37 \pm 1,55$  cm respondieron positivamente a los métodos de inducción evaluados en este estudio.
5. Ostras de *C. iridescens* son sensibles a estímulos externos específicos, tales como cambios de temperatura y disminución de salinidad siempre que se encuentren en estadios avanzados de madurez gonadal.
6. El método de inducción que involucró un aumento de la temperatura de  $5^{\circ}\text{C}$  y posterior desecación (*TAD*) resultó ser el estímulo más exitoso para *C. iridescens* tomando en cuenta el porcentaje de desove y tiempo de respuesta promedio.
7. La adición de espermatozoides puede potenciar el éxito del desove, siempre que el organismo reciba algún estímulo externo previo.
8. Las Valvas de *C. iridescens* adultas pueden ser utilizadas como sustrato de fijación.

## RECOMENDACIONES

1. Determinar el ciclo reproductivo anual de la ostra *Crassostrea iridescens* en la Provincia de Santa Elena, Ecuador, con la finalidad de comprender el rol que desempeñan los factores ambientales en el ciclo reproductivo del ostión de roca y la producción de desoves.
2. Acondicionar reproductores de *C. iridescens* a temperaturas superiores a 28°C para constatar la aceleración de la gametogénesis.
3. Evaluar la utilización de compuestos neuroactivos durante la fijación y metamorfosis en las larvas de *C. iridescens*, tales como la epinefrina (EPI, 10<sup>-4</sup> M) o el ácido  $\gamma$ -amino-butírico (GABA, 10<sup>-4</sup> M).

## **ANEXOS**

## ANEXO I - TÉCNICAS HISTOLÓGICAS

Según Bell y Lightner (1998) <sup>(91)</sup>

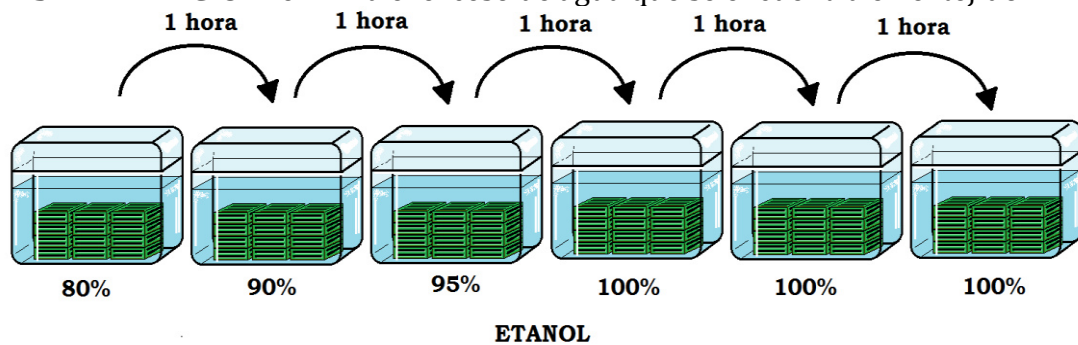
**FIJACIÓN O PRESERVACIÓN:** desnaturaliza la proteína y preserva los tejidos.

Se inyectó dentro de todos los tejidos el fijador de Davidson, el cual está compuesto por: (en 1 L)

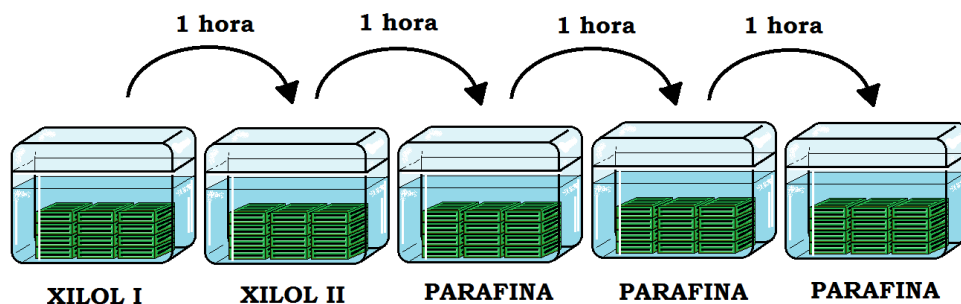
- 330 mL de Alcohol Etilico al 95%.
- 220 mL de Formol (Solución acuosa saturada de gas formaldehido en una solución al 37-39%).
- 115 mL de Ácido Acético Glacial.
- 335 mL de agua destilada (se puede también utilizar agua corriente).

Las muestras fueron fijadas durante 24 horas, posteriormente fueron pasadas a alcohol etílico al 70%.

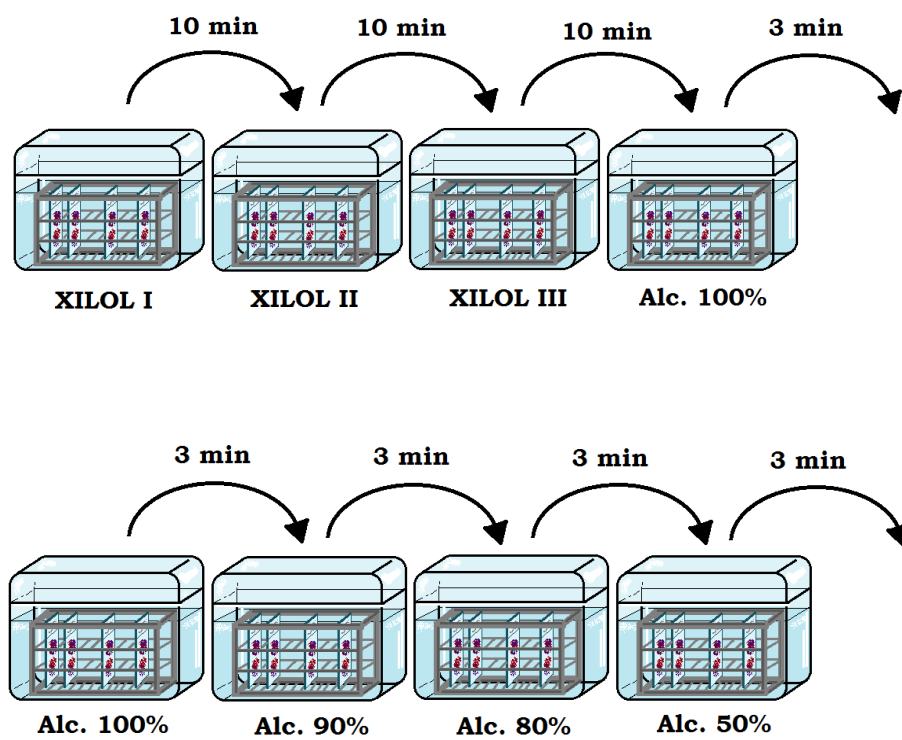
**DESHIDRATACIÓN:** elimina el exceso de agua que se encuentra en el tejido.



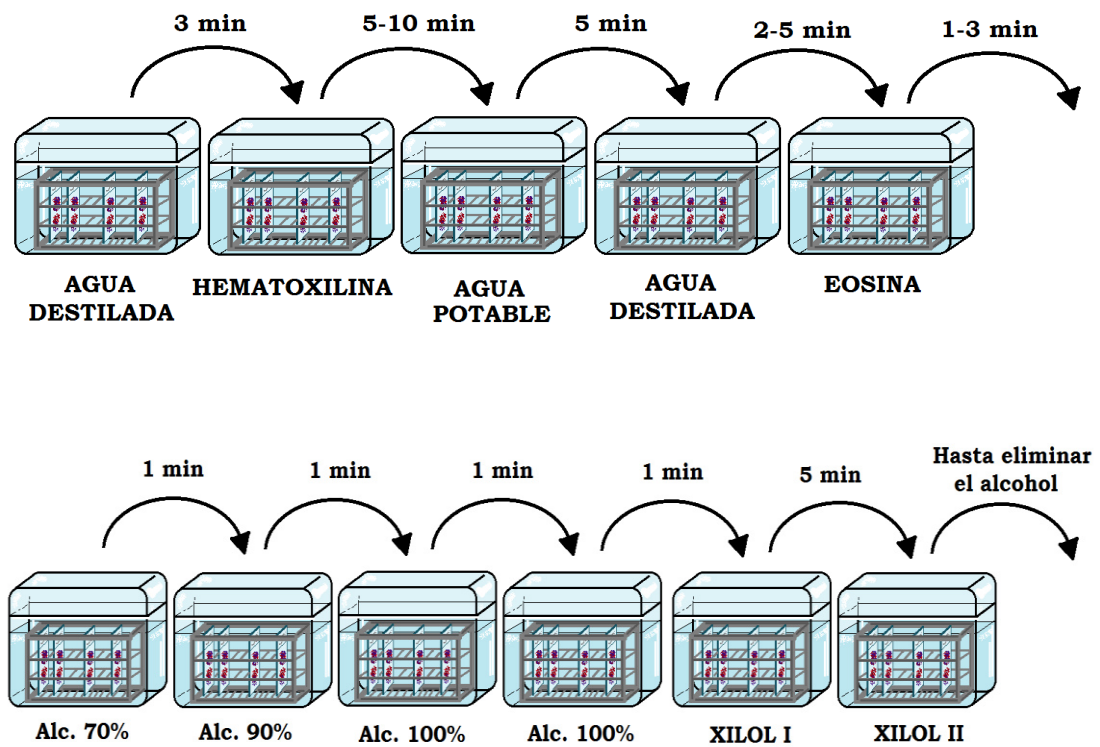
**CLARIFICACIÓN Y PARAFINADO:**



Parafina: mantenidos en estufa a 62-64 °C.

**CORTE:****Micrótomo****TINCIÓN (Hematoxilina- Eosina)**





Luego se pegó la lámina cubreobjetos utilizando Permunt®.

## BIBLIOGRAFÍA

- 1) Mora, E. 1990. Catálogo de bivalvos marinos del Ecuador. Boletín Científico y Técnico. Instituto Nacional de Pesca. Vol X (1): 51 pp.
- 2) Angell, C.L. 1986. The Biology and Culture of Tropical Oysters. ICLARM STUDIES AND REVIEWS 13: 50 pp
- 3) Cuevas, C.A. y A. Martínez. 1979. Estudio gonádico de *Crassostrea corteziensis* Hertlein, *C. palmula* Carpenter y *C. iridescens* Hanley de San Blas, Nayarit, México (Bivalvia: Ostreidae). An. Cent. Cienc. Mar Limnol., Univ. Nal. Autón. México, 6: 81-98.
- 4) Melchor, J.M., A. Luna, R. Terrazas, y C. Acosta. 2002. Mortalidad y Crecimiento del Ostión de Roca, *Crassostrea iridescens* (Hanley, 1854), En San Ignacio, Sinaloa, México. Ciencias Marinas, Vol. 28 (2): 125-132.
- 5) Ramírez, L.A. 2007. Estado de ostra de piedra (*Crassostrea iridescens*) en los principales bancos naturales de extracción en la zona costera de los

Departamentos de La Unión, San Miguel y Usulután. Publicado por el Centro de Desarrollo de la Pesca y Acuicultura (CENDEPESCA), dependencia del Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG), San Salvador, República de El Salvador Centro América y la Agencia de Cooperación Internacional del Japón (JICA) a través del Proyecto para el Desarrollo de la Acuicultura de Moluscos en la República de El Salvador, Oficina Regional CENDEPESCA Zona 3, Puerto El Triunfo, Departamento de Usulután, El Salvador. 29 pp.

- 6) Giese, A. C. 1959. Comparative physiology: Annual reproductive cycles of marine invertebrates. *Ann. Rev. Physiol.*, 21: 457-576.
- 7) Loosanoff, V. L. y H.C. Davis. 1963. Rearing of Bivalve Mollusks. *Advances in Marine Biology*, 42 (4): 607-624.
- 8) Sastry, A.N. 1966. Temperature effects in reproduction of the bay scallop, *Aequipecten irradians* Lamarck. *Biol. Bull.* 130: 118-134.
- 9) Muranaka, M.S., y J.E., Lannan. 1984. Broodstock management of *Crassostrea gigas*: environmental influences on broodstock conditioning. *Aquaculture* 39, 217-228.
- 10) Barber, B.J. y N.J. Blake. 2006. Reproductive physiology. *In*: S. E. Shumway y G.J. Parsons (*editors*). *Scallops: biology, ecology and aquaculture. Chapter 6*: 375-416.
- 11) Creekman, L. 1977. The effects of conditioning the American oyster (*Crassostrea virginica*) with *Tetraselmis suecica* and cornstarch on the

- growth, vigour and survival of its larvae. M.A. Thesis, University of Virginia, Charlottesville. 58 pp.
- 12) Gallager, S.M., R. Mann, y G.C., Sasaki. 1986. Lipid as an index of growth and viability in three species of bivalve larvae. *Aquaculture*, 56: 81-103.
  - 13) Wilson, J., O. Chaparro, y 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.
  - 14) Utting, S.D., y P.F. Millican. 1998. The role of diet in hatchery conditioning of *Pecten maximus* L.: a review. *Aquaculture* 165: 167-178.
  - 15) Farías, A., e I. Uriarte. 2001. Effect of microalgae protein on the gonad development and physiological parameters for the scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). *J. Shellfish Res.* 20: 97-105.
  - 16) Helm, M., N. Bourne, y A. Lovatelli. 2006. Cultivo de bivalvos en criadero. Un manual práctico. FAO Documento Técnico de Pesca. No. 471. Roma. 184 pp.
  - 17) Marín, H. 2011. Evaluación de Diferentes Regímenes de Alimentación para el Acondicionamiento Reproductivo de la Ostra Nativa *Crassostrea iridescens* (Hanley, 1854). Tesis de Grado. Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar. ESPOL. Ecuador, 94 pp.
  - 18) Stuardo, J., y A. Martínez. 1974. Relaciones entre algunos factores ecológicos y la biología, de población de *Crassostrea corteziensis* Hertlein, 1951, de San Blas, Nayarit, México. Trabajo presentado al V Congreso

- Nacional de Oceanografía, México. Anales del Centro de Ciencias del Mar y Limnología. 45 pp.
- 19) Fournier, M.L. 1992. The reproductive biology of the tropical rocky oyster *Ostrea iridescens* (Bivalvia: Ostreidae) on the Pacific coast of Costa Rica. *Aquaculture*, 101. 371-378.
  - 20) Nagappan Nayar, K., K. Satyanarayana Rao, M.E. Rajapandian y A.D. Gandhi. 1988. Induced maturation and spawning of *Crassostrea madrasensis*. CMFRI bulletin 42. Part Two. National Seminar on Shellfish Resources and Farming. Tuticorin Sessions II-VI. 330-333.
  - 21) Chintala, M. y J.P. Grassle. 1995. Early gametogénesis and spawning in "juvenile" Atlantic surfclams, *Spisula solidissima* (Dillwyn, 1819). *J. Shellfish Res.* Vol. 14(2): 301-306.
  - 22) Baltazar, P., P. Bermúdez, y W. Rivera. 1999. Cultivo de la ostra *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1795) en un vivero artesanal, La Arena, Casma. *Revista Peruana de Biología.* Vol. 6(2).
  - 23) Matias, D., S. Joaquim, A. Leitão, y C. Massapina. 2009. Effect of geographic origin, temperature and timing of broodstock collection on conditioning, spawning success and larval viability of *Ruditapes decussates* (Linné, 1758). *Aquacult Int.* 17: 257-271.
  - 24) Pronker, A.E., N.M. Nevejan, F. Peene, P. Geijssen, y P. Sorgeloos. 2008. Hatchery broodstock conditioning of the blue mussel *Mytilus edulis*

- (Linnaeus 1758). Part I. impact of different micro-algae mixtures on broodstock performance. *Aquacult Int.* 16: 297-307.
- 25) Culliney, J.L. 1974. Larval development of the giant scallop *Placopecten magellanicus* (Gmelin). *Biol. Bull.* 147:321-332.
- 26) O'Connor, W.A., y M.P. Heasman. 1995. Spawning induction and fertilization in the doughboy scallop *Chlamys (Mimachlamys) asperrima*. *Aquaculture* 136, 117-129.
- 27) Uriarte, I. A. Farías, y C. Muñoz. 1996. Cultivo en hatchery y preengorde del ostión del norte, *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819), en el sur de Chile. *Rev. Biol. Mar. Valparaíso.* 31 (2): 81-90.
- 28) Blacio, E., y R. Alvarez. 2001. Tecnología para el cultivo de Scallops (*Argopecten circularis* Sowerby 1835) en Ecuador. 6to Congreso Ecuatoriano de Acuicultura, Ecuador. Octubre 27 al 29.
- 29) De la Roche, J.P., B. Marín, L. Freitas, y A. Vélez. 2002. Embryonic development and larval and post-larval growth of the tropical scallop *Nodipecten (=Lyropecten) nodosus* (L. 1758) (Mollusca: Pectinidae). *Aquaculture Research.* 33: 819-827.
- 30) Vélez, A., E. Alifa, y O. Azuaje. 1990. Induction of spawning by Temperature and serotonin in the Hermaphroditic Tropical Scallop, *Pecten ziczac*. *Aquaculture*, 84, 307-313.
- 31) Soria, G., J. Tordecillas-Guillen, R. Cudney-Bueno, y W. Shaw. 2010. Spawning Induction, Fecundity Estimation, and Larval Culture of

- Spondylus calcifer* (Carpenter, 1857) (Bivalvia: Spondylidae). Journal of Shellfish Research, 29(1): 143-149.
- 32) Rengel, J., L. Guelmelit, L. Torres, y C.L. Marin. 2009. Inducción al Desove y Desarrollo Larval de Molusco Bivalvo *Chione cancellata*. Proceedings of the 62<sup>nd</sup> Gulf and Caribbean Fisheries Institute. Cumana, Venezuela. Noviembre 2 – 6: 475-480.
- 33) Velasco, L.A., J. Barros, y E. Acosta. 2007. Spawning induction and early development of the Caribbean scallops *Argopecten nucleus* and *Nodipecten nodosus*. Aquaculture 266: 153-165.
- 34) Nava, D., y Y. García de Severeyn. 2010. Desove inducido en moluscos bivalvos del sistema de Maracaibo. Ciencia 18(3): 153-164.
- 35) Stephen, D., y H.P.C. Shetty, 1981, Induction of spawning in four species of bivalves of the Indian coastal waters, Aquaculture, 25:153-159.
- 36) Thiet, Ch., y M. Kumar. 2008. Clam (*Meretrix lyrata*) Hatchery Manual. Aquaculture Research Sub-Institute for North Centre (ARSINC); South Australian Research and Development Institute (SARDI). 38pp.
- 37) Rao, K. V. 1951. Observations on the probable effects of salinity on the spawning, development and setting of the Indian backwater oyster, *Ostrea madrasensis* Preston. Proceedings of the Indian Academy of Sciences, 33 B (5). Pp. 231-256.

- 38) Southgate, P. C. y P. S. Lee. 1998. Hatchery rearing of the tropical blacklip oyster *Saccostrea echinata* (Quoy and Gaimard). *Aquaculture* 169: 275-281.
- 39) Breese, W.P. y A. Robinson, 1981, Razor clams, *Siliqua Patula* (Dixon): Gonadal development, induced spawning and larval rearing, *Aquaculture*, 22: 27-33.
- 40) Illanes, J. 2010. Acondicionamiento de reproductores de moluscos y factores que inciden en la evacuación de gametos. Capítulo II. Primer Curso Internacional. "Producción de semillas de moluscos bivalvos". Universidad Católica del Norte, Chile. 272 pp.
- 41) Ellis, S. 1998. Spawning and Early Larval Rearing of Giant Clams (Bivalvia: Tridacnidae). Center for Tropical and Subtropical Aquaculture, Publication Number No. 30. Pp. 1-55.
- 42) Utting, S.D., y D.E. Spencer. 1991. The hatchery culture of bivalve mollusk larvae and juveniles. Lab. Leaflet, MAFF Fish Res., Lowestoft, (68). 31 pp.
- 43) Choi, K.S. 2008. Oyster capture-based aquaculture in the Republic of Korea. In A. Lovatelli and P.F Holthus (eds). Capture-based aquaculture. Global overview. *FAO Fisheries Technical Paper*. No. 508. Rome, FAO. pp. 271-286.
- 44) Wallace, R. K. 2001. Cultivating the Eastern Oyster, *Crassostrea virginica*. Southern Regional Aquaculture Center Publication No. 432.



- 45) Wallace, R.K., P. Waters, y R.S. Rikard. 2008. Oyster Hatchery Techniques. Southern Regional Aquaculture Center Publication No. 4302.
- 46) Tan, S., y Wong, T. 1996. Effect of salinity on hatching, larval growth, survival and setting in the tropical oyster *Crassostrea belcheri* (Sowerby). *Aquaculture* 145: 129-139.
- 47) Samuel, D. 1983. Early larval development of Edible oyster *Crassostrea madrasensis* (Perston). *Proc. Symp. Coastal Aquaculture*, 2: 483-487.
- 48) INOCAR. 2011. Catálogo de moluscos marinos de la costa ecuatoriana. [http://www.inocar.mil.ec/biologia/catalogo\\_moluscos/12\\_i.htm#](http://www.inocar.mil.ec/biologia/catalogo_moluscos/12_i.htm#). Consultado el 29 de Julio del 2011.
- 49) Castillo, Z., y A. García. 1984. Taxonomía y anatomía comparada de las ostras en las costas de México. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología. Universidad Autónoma de México. Artículo 230. Vol. 13(2): 249 – 314.
- 50) Barnes, R. D. 1989. Zoología de los Invertebrados, editorial interamericana, 5° edición, México D.F.; 956 p.
- 51) Rodríguez, F. y M. Gasca. 2003. La especiación en ostiones del género *Crassostrea* de México y su explotación. *En: Agustín Ayala-Castañares: universitario, impulsor de la investigación científica* (L.A. Soto, Ed.) Inst. de Cienc. del Mar y Limnol. Univ. Nal. Autón. México. 363-371.
- 52) Delgado, M., y A. Pérez. 2002. Efectos de la ración de alimento en el desarrollo gonadal de la almeja *Ruditapes decussatus* (L., 1758). *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.* 18 (1-4): 293-300.

- 53) Loosanoff, V., y Davis, H.C., 1951. Delaying spawning of lamellibranchs by low temperature. *J. Mar. Res.* 10 (2), 197- 202.
- 54) FAO. 2005-2011. Cultured Aquatic Species Information Programme. *Ostrea edulis*. Cultured Aquatic Species Information Programme. Text by Gouletquer, P. In: *FAO Fisheries and Aquaculture Department* [online]. Rome. Updated 1 January 2004. [Cited 22 September 2011]. [http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Ostrea\\_edulis/en](http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Ostrea_edulis/en)
- 55) Chavez-Villalba, J., J. Pommier, J. Andriamiseza, S. Pouvreau, J. Barret, J.C. Cochard, y M. Le Pennec. 2002. Broodstock conditioning of the oyster *Crassostrea gigas*: origin and temperature effect. *Aquaculture*, 214: 115-130.
- 56) Ruiz, C., D. Martinez, G. Mosquera, M. Abad y J.L. Sánchez. 1992. Seasonal variations in condition, reproductive activity and biochemical composition of the flat oyster, *Ostrea edulis*, from San Cibrán (Galicia, Spain). *Marine Biology*; Volume 112, Number 1, 67-74.
- 57) Martínez, G., y H. Pérez. 2003. Effect of different temperature regimes on reproductive conditioning in the scallop *Argopecten purpuratus*. *Aquaculture*. Volume 228, Issues 1-4. Pag. 153-167.
- 58) Parwadani, L. 2011. Review: Spawning Induction in Bivalve. *Journal Penelitian Sains*. Volume 14 Nomer 2(D) 14207: 33-36.
- 59) Lewis, T., P.D. Nichols, P.R. Hart, D.S. Nichols, y T.A. McMeekin. 1998. Enrichment of rotifers *Brachionus plicatilis* with eicosapentaenoic acid

- and docosahexaenoic acid produced by bacteria. *J. World Aquacult. Soc.* 29, 313-318.
- 60) Duerr, E., A. Molnar, y V. Sato. 1998. Cultured microalgae as aquaculture feeds. *J Mar Biotechnol.* 7: 65-70.
- 61) Farías, A., e I. Uriarte. 2002. Nutrición en larvicultura de pectínidos: Relevancia de proteínas y lípidos. *En: Cruz-Suárez, L. E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Gaxiola-Cortés, M. G., Simoes, N. (Editores). Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 3 al 6 de Septiembre del 2002. Cancún, Quintana Roo, México.*
- 62) Cannuel, R., y P. Beninger. 2005. Is oyster broodstock feeding always necessary? A study using oocyte quality predictors and validators in *Crassostrea gigas*. *Aquat. Living Resour.* 18, 35-43.
- 63) Shumway, S.E. y J. Parsons (editors). 2006. *Scallops: Biology, Ecology and Aquaculture. Second edition. Developments in aquaculture and fisheries science. Volume 35. 1460 pp.*
- 64) Takeda, N. 1989. Hormonal control of reproduction in land snail. *Venus. Jap. Jour. Malac.* 48, 99-139.
- 65) López J.A., A. Maeda, R. Croll, y H. Acosta. 2009. Monoamine fluctuations during the reproductive cycle of the Pacific lion's paw scallop *Nodipecten subnodosus*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 154; 425-428.

- 66) Páez-Osuna, F., H.M. Zazueta-Padilla, y J.I. Osuna-López. 1993. Biochemical composition of the oysters *Crassostrea iridescens* Hanley and *Crassostrea corteziensis* Hertlein in the Northwest coast of Mexico: seasonal changes. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. Volume 170, Issue 1, 15 July 1993, Pages 1-9.
- 67) Páez-Osuna, F., M.G. Frías-Espericueta, y J.I. Osuna-López. 1994. Trace metal concentrations in relation to season and gonadal maturation in the oyster *Crassostrea iridescens*. *Marine Environmental Research*. Volume 40, Issue 1, 1995, Pages 19-31.
- 68) Bautista, C. 1989. *Moluscos. Tecnología de Cultivo*. Ediciones Mundi Prensa. España. 167 pp.
- 69) López, J.A., A. Maeda, A. Monge, y E. Yen. 2008. Inducción al desove de la almeja Catarina *Argopecten ventricosus* mediante algunas monoaminas y estrés mecánico. *Acta Pesquera*. 60-73.
- 70) Parsons, G. J., y S.M. Robinson. 2006. Sea Scallop Aquaculture in the Northwest Atlantic. En: S.E. Shumway and G.J. Parsons (Editors). *Scallops: Biology, Ecology and Aquaculture. Chapter 16: 907-943*.
- 71) Vásquez, H., S. Pachecho, I. Pérez, N. Cornejo, M. Córdova, y K. Kan. 2009. Informe Técnico Producción Artificial de Semilla y Cultivo de Engorde de Moluscos Bivalvos. Publicado por el Centro de Desarrollo de la Pesca y la Acuicultura (CENDEPESCA), dependencia del Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG), San Salvador, Republica de El Salvador Centro América

- y la Agencia de Cooperación Internacional del Japón (JICA) a través del Proyecto para el Desarrollo de la Acuicultura de Moluscos en la República de El Salvador, Oficina Regional CENDEPESCA Zona 3, Puerto El Triunfo, Departamento de Usulután, El Salvador. 76 pp.
- 72) Fong, P., K. Kyojuka, J. Duncan, S. Rynkowski, D. Mekasha, y J. Ram. 1995. The Effect of Salinity and Temperature on Spawning and Fertilization in the Zebra Mussel *Dreissena polymorpha* (Pallas) from North America. *Biol. Bull.* 189: 320-329.
- 73) Yamada, A., M. Yoshio, H. Kojima, y K. Oiwa. 2001. An *in vitro* assay reveals essential protein component for the “catch” state of invertebrate smooth muscle. *PNAS*. Vol. 98. No. 12. 6635-6640.
- 74) Salas-Garza, A., E. Carpizo-Ituarte, G. Parés-Sierra, R. Martínez-López, y R. Quintana-Rodríguez. 2005. Producción de juveniles de erizo rojo *Strongylocentrotus franciscanus* (Echinodermata: Echinoidea) en Baja California, México. *Rev. Biol. Trop.* Vol. 53: 345-355.
- 75) Alvarado-Alvarez, R., M.C. Gould, y J.L. Stephano. 1996. Spawning, *in vitro* maturation, and changes in oocyte electrophysiology induced by serotonin in *Tivela stultorum*. *Biol. Bull.* 190: 322-328.
- 76) Fong, P.P., K. Kyojuka, H. Abdelghani, J.D. Hardege, y J.L. Ram. 1994. In vivo and in vitro induction of germinal vesicle breakdown in a freshwater bivalve, the zebra mussel, *Dreissena polymorpha* (Pallas). *J. Exp. Zool.* 269: 467-474.

- 77) Siniscalchi A., S. Cavallini, D. Sonetti, G. Sbrenna, S. Capuano, L. Barbin, E. Turolla, y R. Rossi. 2004. Serotonergic neurotransmission in the bivalve *Venus verrucosa* (Veneridae): a neurochemical and immunohistochemical study of the visceral ganglion and gonads. *Marine Biology*, 144: 1205-1212.
- 78) Fong, P. 1998. Zebra mussel spawning is induced in low concentrations of putative serotonin reuptake inhibitors. *Biol. Bull.* 194: 143-149.
- 79) Martínez, G., C. Garrote, L. Mettifogo, H. Pérez, y E. Uribe. 1996. Monoamines and prostaglandin E<sub>2</sub> as inducers of the spawning of the scallop, *Argopecten purpuratus* Lamarck. *J. Shell. Res.*, 15: 245-249.
- 80) Neo, M.L, P.A. Todd, L.M. Chou, y S.L-M. Teo. 2011. Spawning induction and larval development in the fluted giant clam, *Tridacna squamosa* (Bivalvia: Tridacnidae). *Nature in Singapore*, 4: 157-161.
- 81) Fong, P., y M. Warner. 1995. Serotonin-induced parturition in the fingernail clam *Sphaerium (Musculium) transversum* (Say). *J Exp. Zoo.* 272 (2): 163-166.
- 82) Gosling, E. M. 2003. Bivalve Molluscs Biology, Ecology and Culture. Fishing News Books.
- 83) Boudry, P. 2008. Review on Breeding and Reproduction of European aquaculture species, Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Aqua Breeding*.
- 84) Lovatelli, A., A. Farías, y I. Uriarte. 2008. Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores 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. 359 pp.
- 85) Uriarte, I., A. Lovatelli, A. Farías, M. Astorga, C. Molinet, M. Medina, M. Avendaño, C. Lodeiros, L.A. Velasco, G. Rupp, J. Cáceres-Martínez, y J. Mendo. 2008. Cultivo y manejo de moluscos bivalvos en América Latina: resultados y conclusiones del primer taller – ACUIBIVA 2007. *En* A. Lovatelli, A. Farías e I. Uriarte (*Editores*). 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. 1-23 pp.
- 86) Cobo, M.L., D. Ortega, y S. Sonnenholzner. 2008. Avances en la producción de semillas del molusco Bivalvo *Spondylus princeps* en el CENAIM. *Aquacultura*, Edición 66: 30-32.
- 87) Brown, M., y R. Robert. 2002. Preparation and assessment of microalgal concentrate as feeds for larval and juvenile Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture* 207: 289-309.
- 88) Martínez, G., C. Aguilera, y E.O. Campos. 1999. Induction of settlement and metamorphosis of the scallop *Argopecten purpuratus* Lamarck by excess K<sup>+</sup> and epinephrine: energetic costs. *J. Shellfish Res.* Vol. 18. No. 1, 41-46.

- 89) Vásquez, H., R. Pérez, S. Pacheco, y K. Kani. 2007. Manual Técnico de Producción de Semillas de Ostra del Pacífico (*Crassostrea gigas*) y Manual Técnico sobre el Cultivo de Engorde de Ostra del Pacífico (*C. gigas*) en las Comunidades Modelos. Publicado por el Centro de Desarrollo de la Pesca y la Acuicultura (CENDEPESCA), dependencia del Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG), San Salvador, Republica de El Salvador Centro América y la Agencia de Cooperación Internacional del Japón (JICA) a través del Proyecto para el Desarrollo de la Acuicultura de Moluscos en la República de El Salvador, Oficina Regional CENDEPESCA Zona 3, Puerto El Triunfo, Departamento de Usulután, El Salvador. 40 pp.
- 90) Devakie, M.N., y A.B. Ali. 2002. Effective use of plastic sheet as substrate in enhancing tropical oyster (*Crassostrea iredalei* Faustino) larvae settlement in the hatchery. *Aquaculture* 212 (1): 277-287.
- 91) Bell T., y D. Lightner. 1998. A handbook of normal shrimp histology. World Aquaculture Society. Baton Rouge. Louisiana. 198 pp.
- 92) Paniagua-Chávez, C. y Acosta-Ruiz, M. 1995. Desarrollo gonadal de *Crassostrea gigas* en Bahía San Quintín, Baja California, México. *Ciencias Marinas*, 20(2): 225-242.
- 93) Brousseau, D. 1995. Gametogenesis and spawning in intertidal oysters (*Crassostrea virginica*) from western Long Island Sound. *J. Shellfish Res.* Vol. 14, No. 2, 483-487.



- 94) Thompson, R., Newell, R., Kennedy, y V., Mann, R., 1996. Reproductive processes and early development. *In*: Kennedy, V., Newell, R., Eble, A. (Editors), *The Eastern Oyster Crassostrea virginica*. Maryland Sea Grant Books, Maryland, pp. 335-370.
- 95) Jaramillo, R. y J. Navarro. 1995. Reproductive cycle of the Chilean ribbed mussel *Aulacomya ater* (Molina, 1782). *J. Shellfish Res.* Vol. 14, No. 1, 165-171.
- 96) Utting, S.D., y P.F. Millican. 1997. Techniques for the hatchery conditioning of bivalve broodstocks and the subsequent effect on egg quality and larval viability. *Aquaculture* 155: 45-54.
- 97) Song, Y., M. Suquet, I. Quéau, y L. Lebrun. 2009. Setting of a procedure for experimental fertilization of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) oocytes. *Aquaculture* 287, 311-314.
- 98) Fabioux, C., A. Huvet, P. Le Souchu, M. Le Pennec y S. Pouvreau. 2005. Temperature and photoperiod drive *Crassostrea gigas* reproductive internal clock. *Aquaculture* 250:458-470.
- 99) Steele, S. y M. F. Mulcahy. 1999. Gametogenesis of the oyster *Crassostrea gigas* in southern Ireland. *J. Mar. Biol. Ass. UK.* 70:673-686.
- 100) Butler, P.A. 1949. Gametogenesis in the oyster under conditions of depressed salinity. *Biol Bull* 96: 263-269.
- 101) Loosanoff, V., y H. C. Davis. 1952. Temperature requirements for maturation of gonads of Northern oysters. *Biol. Bull.*, 103: 80-96.

- 102) Enríquez-Díaz, S. Pouvreau, J. Chávez-Villalba, y M. Le Pennec. 2009. Gametogenesis, reproductive investment, and spawning behavior of the Pacific giant oyster *Crassostrea gigas*: evidence of an environment-dependent strategy. *Aquacult Int* (2009) 17:491–506.
- 103) Mackensen, A., T. Brey y S. Sonnenholzner. 2011. The Fate of Spondylus Stocks (Bivalvia: Spondyliadae) in Ecuador: Is Recovery Likely? *Journal of Shellfish Research*, 30(1): 115-121.
- 104) Rodríguez-Jaramillo, C., M. A. Hurtado, E. Romero-Vivas, J.L. Ramírez, M. Manzano, y E. Palacios. 2008. Gonadal Development and Histochemistry of the Tropical Oyster, *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1951) during an Annual Reproductive Cycle. *Journal of Shellfish Research*, 27(5): 1129-1141.
- 105) Martínez, G., M. Torres, E. Uribe, M.A. Diaz, y H. Perez, 1992. Biochemical composition of broodstock and early juvenile Chilean scallop, *Argopecten purpuratus* Lamarck, held in two different environments. *J. Shellfish Res.* 11, 307– 313.
- 106) Martínez, I., D. Aldana, T. Brulé y E. Cabrera. 1995. Crecimiento y desarrollo gonadal del ostión *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791) (Mollusca: Ostreidae), en la Península de Yucatán, México. *Avicennia* 3:61-75.
- 107) Mann, R. 1979. Some biochemical and physiological aspects of growth and gametogenesis in *Crassostrea gigas* (Thunberg) and *Ostrea edulis* L.

- grown at sustained elevated temperatures. J. Mar. Biol. Assoc. U. K. 59, 95-110.
- 108) Hopkins, A.E. 1936. Adaptation of the feeding mechanism of the oyster (*Ostrea gigas*) to changes in salinity. Bulletin of the bureau of fisheries. Volume XLVIII. Bulletin No. 21.
- 109) Galtsoff, P.S. 1938. Ohysiology of reproduction of *Ostrea virginica*. I Spawning reactions of the female and male. Biol. Bull., 74: 461-486.
- 110) Heslinga, G., T. Watson, y T. Isamu, 1990, Giant clam farming, Pacific fisheries development foundation (NMFS/NOAA), Honolulu, Hawaii, USA, 179pp.
- 111) Rico-Villa, B., J.R. Le Coza, C. Minganta y R. Robert. 2006. Influence of phytoplankton diet mixtures on microalgae consumption, larval development and settlement of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). Aquaculture 256 (1-4): 377-388.
- 112) Parnell, P. 2002. Larval Development, Precompetent Period, and a Natural Spawing Event of the Pectinacean Bivalve *Spondylus tenebrosus* (Reeve, 1856). The Veliger 45(1): 58-64.
- 113) Madrones-Ladja, J. 1997. Notes on the induced spawning, embryonic and larval development of the window-pane shell, *Placuna placenta* (Linnaeus, 1758), in the laboratory. Aquaculture 157: 137-146.