



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

EVALUACIÓN DE LA CALIDAD GONÁDICA DE LA
CONCHA NÁCAR *Pteria sterna* (Gould, 1851) Y SU
INFLUENCIA EN LA VIABILIDAD LARVARIA

TESIS

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación Acuicultura)

Presenta

MARÍA ELIANA GÓMEZ ROBLES

La Paz, Baja California Sur, Septiembre de 2013

ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 11:30 horas del día 13 del Mes de Septiembre del 2013, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"EVALUACIÓN DE LA CALIDAD GONÁDICA DE LA CONCHA NÁCAR *Pteria sterna* (GOULD, 1851) Y SU INFLUENCIA EN LA VIABILIDAD LARVARIA"

Presentada por el alumno:

María Eliana Gómez Robles

Aspirante al Grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN Acuicultura


Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA


Dr. Pedro E. Saucedo Lastra
CO-DIRECTOR DE TESIS


Dr. José Manuel Mazón Suástegui
CO-DIRECTOR DE TESIS


Dr. Jorge E. Chávez Villalva
CO-TUTOR


Dra. B. Patricia Ceballos Vázquez
CO-TUTOR


Dr. Federico A. García Domínguez
CO-TUTOR


DRA. ELISA BERNIERE ZARAGOZA,
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

CONFORMACIÓN DE COMITÉS

COMITÉ TUTORIAL

Dr. Pedro Enrique Saucedo Lastra, Co-director de tesis

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

Dr. José Manuel Mazón Suástegui, Co-director de tesis

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

Dr. Jorge Eduardo Chávez Villalba, Co-tutor

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

Dra. Bertha Patricia Ceballos Vázquez, Co-tutor

Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas

Dr. Federico Andrés García Domínguez, Co-tutor

Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas

COMITÉ REVISOR DE TESIS

Dr. Pedro Enrique Saucedo Lastra (CIBNOR)

Dr. José Manuel Mazón Suástegui (CIBNOR)

Dr. Jorge Eduardo Chávez Villalba (CIBNOR)

Dra. Bertha Patricia Ceballos Vázquez (CICIMAR)

Dr. Federico Andrés García Domínguez (CICIMAR)

JURADO DE EXAMEN DE GRADO

Dr. Pedro Enrique Saucedo Lastra (CIBNOR)

Dr. José Manuel Mazón Suástegui (CIBNOR)

Dr. Jorge Eduardo Chávez Villalba (CIBNOR)

Dr. Federico Andrés García Domínguez (CICIMAR)

Dra. María Teresa Sicard González, Suplente (CIBNOR)

Dr. Ángel Isidro Campa Córdova, Suplente (CIBNOR)

Resumen

El creciente interés hacia *Pteria sterna* para producción perlera en México ha propiciado investigaciones para optimizar los protocolos de acondicionamiento gonádico y producción de semilla en laboratorio, incluyendo el efecto de parámetros ambientales (e.g. temperatura y disponibilidad de alimento) sobre la gametogénesis. Los resultados obtenidos a la fecha (poco desarrollo de gametos y baja eficiencia en los desoves inducidos) sugieren que en esta especie la reproducción opera de manera diferente a otros bivalvos que se reproducen en verano. Un problema adicional en el uso de la especie para fines de actividades perleras es el insuficiente abasto de semilla, ya sea colectada del ambiente o bien producida en laboratorio. En este estudio se determinaron indicadores de calidad gonádica (índices morfo-fisiológicos, histología, histoquímica, composición bioquímica y de ácidos grasos) en diferentes momentos de la temporada reproductiva natural en Bahía de La Paz (de diciembre a abril). Estos indicadores se correlacionaron con la viabilidad larvaria y producción de semilla, así como con la dinámica ambiental. Se colectaron 40 adultos durante noviembre 2008 (periodo pre-reproductivo), febrero y abril 2009 (periodos reproductivos), y junio 2009 (periodo post-reproductivo). En cada muestreo las ostras colectadas se dividieron en dos grupos experimentales de 20 ostras cada uno. El primer grupo se utilizó para determinación de indicadores de calidad gonádica; el segundo grupo se destinó para inducciones a desove y seguimiento de desarrollo larvario. Se obtuvieron respuestas positivas a los desoves inducidos en febrero, abril y junio 2009; pero solo las ostras colectadas en abril (temperatura del agua 21.8 °C y concentración de clorofila *a* 1.3 mg/m³) ofrecieron las mejores condiciones reproductivas para completar el desarrollo larvario: predominancia de ovocitos posvitelogénicos (~82%) que registraron la mayor talla (~43 µm), y mayor contenido de lípidos (IL = 13%); se presentaron altos niveles de proteínas (~230 mg/g) en gónada, de lípidos (~160 mg/g) en glándula digestiva; y alta concentración de SAFA en ambos tejidos (>37%). En abril las larvas (véliger y pedivéliger) crecieron más rápido, estuvieron compuestas por proteínas (>88%), y los lípidos representaron el mayor equivalente energético (10.7 J µg/larva); la fijación ocurrió al día 23 (altura de la concha >200 µm) y se obtuvieron 17.1×10³ semillas. No se observaron larvas ni semilla en los muestreos de noviembre 2008 y febrero 2009. En junio, varios indicadores de calidad gonádica fueron adecuados; sin embargo, durante el cultivo se produjeron pocas larvas y semilla que no completaron la metamorfosis y fijación. Este estudio proporciona información útil que permitirá elaborar dietas adecuadas para la maduración controlada de reproductores, y para optimizar los protocolos de cultivo y fijación larvaria para promover una mayor eficacia en las zootecnias de producción de semilla de concha nácar. Se sugieren estudios futuros que se enfoquen en la acumulación de SAFA en la gónada para definir su potencial confiabilidad como indicador de calidad ovocitaria. Igualmente se recomienda la colecta de reproductores silvestres para desove inmediato durante su principal periodo de madurez dentro de la temporada natural (primavera) cuando la temperatura del agua en el medio natural se encuentre entre 21 y 22 °C. Evitando la colecta de reproductores durante la etapa final de maduración, se permite el reciclaje de nutrientes de los ovocitos residuales (sobre-madurados) y que sus reservas energéticas se utilicen para formar nuevos ovocitos con la calidad necesaria para el siguiente ciclo

gametogénico. Estas condiciones permitirían obtener gametos de mayor calidad, incrementar las posibilidades de una reproducción exitosa y aumentar el suministro de ostras sanas las operaciones de cultivo e injerto. Lo anterior podría ocasionar un impacto positivo en la industria perlera.

Palabras clave: Calidad gonádica y larvaria, *Pteria sterna*, éxito reproductivo.

Vo. Bo. Co-director
Dr. Pedro E. Saucedo Lastra

Vo. Bo. Co-director
Dr. José M. Mazón Suástegui

Abstract

“Evaluation of gonad quality in the winged pearl oyster *Pteria sterna* (Gould, 1851) and its influence on larvae viability”

A growing interest in using *Pteria sterna* for pearl production in Mexico is gradually promoting research programs aimed to optimize the protocols for gonad conditioning and hatchery rearing of spat, including the impact of environmental factors (e.g. water temperature and food availability) on gametogenesis. Nowadays, results obtained in this regard (low gamete development ending with no induced spawning) suggest that reproduction in this species operates differently when compared to bivalve species breeding in the summer. An additional problem in using the species for pearl grafting is the insufficient supply of spat, either collected from the wild or produced at the hatchery. In this study, several indicators of gonad quality (morpho-physiological indices, histology, histochemistry, biochemical, and fatty acid composition) were determined at different moments of the natural breeding season in Bahia de La Paz (from December through April). These indicators were correlated to the viability of larvae and the production of spat, as well as to the dynamics of environmental factors. Forty adults *P. sterna* were collected during November 2008 (pre-reproductive), February and April 2009 (reproductive periods) and June 2009 (post-reproductive). During each sampling, the collected oysters were divided into two experimental groups of twenty oysters each. First group was used for determining the indicators of gonad quality; oysters from second group were destined for spawning induction and larval development trials. A positive response to spawning induction occurred in February, April and June 2009; but only the oysters in April (water temperature was 21.8 °C and chlorophyll *a* 1.3 mg/m³) offered the best condition to sustain larvae development and spat production: postvitellogenic oocytes predominated (~82%) attaining the larger size (~43µm), and exhibited higher lipid content (LI = 13%); higher protein levels (~230 mg/g) in gonad, and lipid (~160 mg/g) in the digestive gland; higher SAFA (>37%) content in both tissues. Also in April, larvae (veliger and pediveliger) grew faster, were composed by protein (>88%) and lipids represented the higher energy equivalents (10.7 J/µg/larvae); spat settlement was at day 23 (>200 µm shell height), and yielded 17.1×10³ juveniles. No larvae and spat were observed in the samplings of November 2008 and February 2009. In June 2009, several quality indicators were also adequate, but ended with few larvae produced and no spat completing metamorphosis and settlement. This study provides useful information for preparing suitable diets for broodstock during gonad conditioning trials, and for optimizing the protocols for hatchery production of spat to promote major efficiency in zootechnical spat production for this pearl oyster species. Future work aimed to study the accumulation of SAFA in the gonad as reliable indicator of oocyte quality is suggested. Similarly, we recommend the sampling of wild broodstock for spawn at hatchery during the main ripeness peak of the natural breeding season (spring) when water temperature reaches 21–22 °C. Avoiding broodstock sampling at the ending of natural breeding season, allows residual oocytes (over-ripened) to recycle nutrients, so energy reserves are used to new and quality oocytes to start the next gametogenic cycle. These conditions may provide higher-quality gametes, increase the chances of successful broodstock

reproduction, and enhance the supply of healthy oysters for grafting operations. This could help support the growth of the pearl industry in Mexico.

Key words: Gonad and larvae quality; *Pteria sterna*; reproductive success.

Dedicatoria

A Dios, quien en tu infinita Gloria intercediste en mi salud para continuar con vida para lograr mis metas, para guiar y proteger a mi hija. Algo quieres que aprenda Señor, por eso me enviaste esa prueba, y gracias a ti tengo vida por delante para descubrir qué es.

A mi hija Aurora, mi pequeño gran logro

A mis padres Sandra y Sergio, por su amor

A mis hermanos Valeria y Sergio, por su apoyo

GRACIAS

Agradecimientos

Al CIBNOR por ser la institución que me ha permitido realizar una meta profesional más.

A las autoridades de CONACYT por la beca No. 17098 otorgada para la realización de este posgrado.

Al personal del la Dirección de Estudios del CIBNOR, en especial a la Dra. Elisa Serviere, Lic. Osvelia Ibarra, C. Claudia Olachea, Lic. Leticia González Rubio y C. Horacio Sandoval, por el apoyo y facilidades prestadas durante mis estudios de doctorado así como sus palabras y bendiciones hacia mí y mi familia durante el momento difícil que atravesamos.

Al M. en C. Horacio Bervera, José Juan Ramírez (“Johnny”) y Mario Cota (CIBNOR) por las salidas de campo para la recolecta de organismos.

Al personal del Laboratorio de Cultivo de Moluscos Bivalvos (CIBNOR), M. en C. Mario Osuna, Téc. Pablo Ormart, M. en C. Delfino Barajas y Biólogo Marino Gabriel Villegas.

A la M. en C. María del Carmen Rodríguez Jaramillo y la Sra. Eulalia Meza del Laboratorio de Histología e Histoquímica (CIBNOR) por todas las facilidades otorgadas durante los análisis correspondientes.

A Roberto Herrera del Laboratorio de Bioquímica Fisiológica (CIBNOR) por el entrenamiento técnico, las pruebas bioquímicas con las “benditas” larvas, y por mostrar la mejor disponibilidad para apoyarme durante mi estancia en el laboratorio.

A la Bióloga Martha Hawkins (Universidad Santa Martha, Colombia) y la M. en C. Laura Carreón (CIBNOR) por su apoyo técnico y académico durante los análisis de ácidos grasos.

Al Dr. Héctor Acosta Salmón (CIBNOR), por su asesoría y valiosa participación en el primer artículo publicado.

Al Dr. Jorge Iván Cáceres Puig (Perlas del Cortez) por la ayuda otorgada con las muestras de agua de mar para los análisis correspondientes.

Al Dr. Carlos Cáceres Martínez y la Bióloga Marino Nashieli Ramos por la disponibilidad de trabajar en equipo durante el análisis de muestras de agua de mar, en el Laboratorio de alimentos del Departamento de Pesquerías de la Universidad Autónoma de Baja California Sur (UABCS).

A mi comité tutorial integrado por el Dr. Jorge E. Chávez Villalba (CIBNOR, Unidad Guaymas), la Dra. Bertha P. Ceballos Vázquez y el Dr. Federico A. García

Domínguez del Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas (CICIMAR), por las aportaciones y revisiones hechas al presente trabajo a lo largo de mis estudios doctorales, mismos que hoy se ven plasmados.

A mis co-directores de CIBNOR, Dr. Pedro Saucedo y Dr. Manuel Mazón, por las revisiones y sugerencias que enriquecieron el presente trabajo, por todas las enseñanzas sobre todo por el claro ejemplo de que “tres cabezas piensan mejor que una”.

A Pedro (“padre mío”), por guiarme en la orientación correcta dentro de mi formación personal que inicio contigo hace ya unos “ayeres”. Pedro, no sólo te agradezco el ser mi mentor, sino también por creer en mí, por la confianza, por las enseñanzas y por la amistad. ¡Gracias!

A Manuel (“doc”), por las enseñanzas, por la disponibilidad a echarme la mano si me trababa en algo; pero sobre todo gracias por la paciencia mostrada.

A mis compañeros y amigos en “armas”: Fernando “Fercho” Abasolo, Jorge Iván Cáceres, Laura Guzmán, Julio Sánchez, Andrés y Jazmín Granados, Érika Zavala, Alejandro Ramos, por el tiempo compartido en lo académico y en lo no académico.

A mis amigas, mis hermanas, Elizabeth, Chuyita, Cyndia, Jessica. Por tantos años de amistad, por tantas experiencias vividas, por estar cuando todos están, pero más cuando nadie está. A Daniel Hernández Name, Marcela Garay, Karyme Noriega y Francisco Flores, por su amistad y las eternas porras para terminar la tesis.

A todos los miembros de mi familia, Robles Cota y Gómez Villalba, por su amor y apoyo en mis realizaciones profesionales. Gracias por no abandonarme cuando más los he necesitado.

A mis padres y hermanos por demostrarme una vez más su amor, sobretodo en el difícil momento por el que atravesamos; gracias por el apoyo en las decisiones que he tomado, tanto profesionales como personales.

A mi hija Aurora, porque desde el día que llegaste a mi vida supe lo que era vivir, y la necesidad de existir. Por el tiempo robado para cumplir esta meta, esto es por ti y para ti, mi vida, para que te sientas orgullosa de tu mami.

Contenido

Resumen.....	i
Abstract.....	iii
Dedicatoria.....	v
Agradecimientos.....	vi
Contenido.....	viii
Lista de figuras.....	x
Lista de tablas.....	xii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	4
2.1. Indicadores de calidad gonádica en procesos reproductivos de bivalvos.....	4
2.2. Fisiología reproductiva en bivalvos y ostras perleras con énfasis en <i>P. sterna</i>	7
2.3. Biología reproductiva de <i>P. sterna</i>	8
2.4. Fases tempranas de desarrollo y estudios con larvas de <i>P. sterna</i>	9
2.5. Efecto del ambiente sobre la reproducción de bivalvos, con énfasis en <i>P. sterna</i>	12
3. JUSTIFICACIÓN.....	14
4. OBJETIVOS.....	16
4.1. General.....	16
4.2. Particulares.....	16
5. HIPÓTESIS.....	17
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
6.1. Origen y manejo de organismos adultos.....	18
6.2. Dinámica ambiental.....	18
6.2.1. Análisis de la concentración de seston.....	19
6.2.2. Análisis de la calidad del alimento.....	19
6.3. Evaluación de indicadores de calidad gonádica de adultos.....	21
6.3.1. Índices morfo-fisiológicos.....	21
6.3.2. Análisis histológicos e histoquímicos: determinación de la proporción sexual, estadios de desarrollo gonádico y análisis de ovocitos.....	22
6.3.3. Análisis bioquímicos y determinación de coeficientes de contenido energético.....	24
6.3.4. Composición proximal de tejidos.....	26
6.4. Evaluación de indicadores de calidad larvaria.....	27
6.4.1. Obtención de gametos y cultivo de larvas.....	27
6.4.2. Crecimiento, supervivencia y total de semillas fijadas.....	28
6.4.3. Composición bioquímica y valores energéticos.....	29
6.5. Tratamiento estadístico de datos.....	30
7. RESULTADOS.....	32
7.1. Dinámica ambiental.....	32
7.1.1. Temperatura, salinidad y concentración de clorofila <i>a</i>	32
7.1.2. Análisis de la concentración de seston.....	34
7.1.3. Análisis de la calidad del alimento.....	36
7.2. Indicadores de la calidad gonádica de adultos.....	38
7.2.1. Índices morfo-fisiológicos.....	38

7.2.2. Proporción sexual, estadios de desarrollo gonádico y análisis de ovocitos....	41
7.2.3. Composición bioquímica de gónada y tejidos somáticos.....	47
7.2.4. Análisis energético de tejidos.....	51
7.2.5. Análisis energético con relación al desarrollo gonádico.....	53
7.2.6. Análisis proximal de tejidos (ácidos grasos).....	55
7.3. Indicadores de calidad larvaria.....	58
7.3.1. Inducción al desove.....	58
7.3.2. Supervivencia, crecimiento absoluto y fijación de semilla.....	59
7.3.3. Composición bioquímica específica por larva y valores energéticos.....	61
8. DISCUSIÓN.....	65
8.1. Indicadores de calidad reproductiva en adultos y ovocitos y su relación con la dinámica ambiental.....	65
8.2. Indicadores de calidad larvaria y su relación con la dinámica ambiental.....	73
9. CONCLUSIONES.....	77
10. LITERATURA CITADA.....	79
11. ANEXOS.....	97

Lista de figuras

Figura 1.	Ciclo de vida de <i>P. sterna</i> . Tomado de Cáceres-Puig (2012).....	11
Figura 2.	Temperatura promedio del agua de mar en Bahía de La Paz durante 2008–2009.....	32
Figura 3.	Salinidad promedio del agua de mar en Bahía de La Paz durante 2008–2009.....	33
Figura 4.	Concentración de clorofila <i>a</i> del agua de mar en Bahía de La Paz durante 2008–2009.....	34
Figura 5.	Valores promedio del seston total (a), orgánico (b) e inorgánico (c) en el agua de mar en Bahía de La Paz durante 2008–2009. Las barras representan el error estándar.....	35
Figura 6.	Razón SI/SO en el agua de Bahía de La Paz durante 2008–2009.....	36
Figura 7.	Contenido de proteínas, carbohidratos y lípidos (a), así como valores promedios de la energía contenida (b) en el agua de mar de Bahía de La Paz durante 2008–2009. Las barras representan el error estándar.....	37
Figura 8.	Índice alimenticio (IA) y material alimenticio en el agua de mar de Bahía de La Paz durante 2008–2009.....	38
Figura 9.	Valores promedio de los índices morfo-fisiológicos de <i>Pteria sterna</i> durante la temporada natural de maduración 2008–2009 en Bahía de La Paz. Las barras representan el error estándar. Letras sobre marcadores señalan diferencias significativas ($P < 0.05$).....	40
Figura 10.	Frecuencia de sexos de <i>Pteria sterna</i> durante la temporada natural de maduración 2008–2009 en Bahía de La Paz. I = indiferenciados; H = hembras; M = machos.....	41
Figura 11.	Etapas de desarrollo gonádico de <i>Pteria sterna</i> durante la temporada natural de maduración 2008–2009 en Bahía de La Paz. Ina = inactivo; Des= desarrollo; Mad= madurez; Dsv = desove; Pos = postdesove.....	42
Figura 12.	Diámetro teórico (DT) de los ovocitos de <i>Pteria sterna</i> durante la temporada natural de maduración 2008–2009 en Bahía de La Paz. Las barras representan el error estándar. Letras sobre marcadores señalan diferencias significativas ($P < 0.05$).....	43
Figura 13.	Frecuencia de aparición de los diferentes tipos de ovocitos en <i>Pteria sterna</i> durante la temporada natural de maduración 2008–2009 en Bahía de La Paz. Prev = previtelogénicos; Vite = vitelogénicos; Posv = posvitelogénicos.....	44
Figura 14.	Microfotografía (40×) de un corte transversal de gónada de <i>Pteria sterna</i> teñida con Azul Alciano-PAS para identificación de carbohidratos (a) y Sudan Negro B para identificación de lípidos (b), mostrando los folículos ováricos (Fov), ovocitos previtelogénicos (Opr), ovocitos vitelogénicos (Ovi), ovocitos postvitelogénicos (Opo), gotas de lípidos (Gli) y gránulos de	

	glucógeno (Grg). Escala = 100 μm	45
Figura 15.	Valores promedio del índice lipídico (IL) e índice glucídico (IG) en los ovocitos de <i>Pteria sterna</i> durante la temporada natural de maduración 2008–2009 en Bahía de La Paz. Las barras representan el error estándar. Letras sobre/debajo marcadores (negro para IL, gris para IG) señalan diferencias significativas ($P < 0.05$).....	46
Figura 16.	Composición bioquímica promedio de la gónada de <i>Pteria sterna</i> durante la temporada natural de maduración 2008–2009 en Bahía de La Paz. Las barras representan el error estándar. Letras sobre marcadores señalan diferencias significativas ($P < 0.05$).....	47
Figura 17.	Composición bioquímica promedio de la glándula digestiva de <i>Pteria sterna</i> durante la temporada natural de maduración 2008–2009 en Bahía de La Paz. Las barras representan el error estándar. Letras sobre marcadores señalan diferencias significativas ($P < 0.05$).....	48
Figura 18.	Composición bioquímica promedio del músculo aductor de <i>Pteria sterna</i> durante la temporada natural de maduración 2008–2009 en Bahía de La Paz. Las barras representan el error estándar. Letras sobre marcadores señalan diferencias significativas ($P < 0.05$).....	49
Figura 19.	Composición bioquímica promedio del manto de <i>Pteria sterna</i> durante la temporada natural de maduración 2008–2009 en Bahía de La Paz. Las barras representan el error estándar. Letras sobre marcadores señalan diferencias significativas ($P < 0.05$).....	50
Figura 20.	Supervivencia larvaria de <i>Pteria sterna</i> durante los cultivos realizados en 2009.....	60
Figura 21.	Crecimiento absoluto promedio en altura de la concha de larvas de <i>Pteria sterna</i> durante los cultivos larvarios realizados en 2009. Las barras representan el error estándar.....	61

Lista de tablas

Tabla I.	Organismos seleccionados para análisis de ácidos grasos.....	27
Tabla II.	Contenido energético de la gónada y tejidos somáticos de <i>Pteria sterna</i> durante la temporada natural de maduración 2008–2009 en Bahía de La Paz.....	52
Tabla III.	Contenido energético por fase de desarrollo gonádico de <i>Pteria sterna</i> durante la temporada natural de maduración 2008–2009 en Bahía de La Paz.....	54
Tabla IV.	Concentración (media \pm error estándar) del total de ácidos grasos (%) de gónada y tejidos somáticos de <i>Pteria sterna</i> durante la temporada natural de maduración 2008–2009 en Bahía de La Paz.....	56
Tabla V.	Análisis de correlación de Spearman entre las variables ambientales vs. índices morfo-fisiológicos y talla de ovocitos de <i>Pteria sterna</i>	58
Tabla VI.	Variaciones en la composición bioquímica ($\mu\text{g}/\text{larva}$) de las larvas de <i>Pteria sterna</i> durante los cultivos de 2009.....	62
Tabla VII.	Equivalentes energéticos en larvas de <i>Pteria sterna</i> cultivadas durante 2009.....	62
Tabla VIII.	Resumen de indicadores de calidad gonádica y desempeño reproductivo en <i>Pteria sterna</i> durante la temporada reproductiva natural 2008–2009 en Bahía de La Paz.....	64

1. INTRODUCCIÓN

En países como Japón, Polinesia Francesa y Australia, las operaciones de perlicultura y nacaricultura dependen de la colecta de semilla silvestre y/o de la extracción de adultos en los bancos naturales (Gervis y Sims, 1992; Southgate y Beer, 1997; Monteforte *et al.*, 2005). En laboratorio en particular, las ostras perleras han sido cultivadas de forma metódica desde los años 70's (ver rev. de Saucedo y Southgate, 2008). Para citar un ejemplo, en Indonesia la industria perlera se sustenta en la producción de semilla en laboratorio, asegurando de esa manera el suministro de juveniles para las operaciones de cultivo e implante (Rose y Baker, 1994; Southgate y Beer, 1997). Debido a ello, es amplia la cantidad de estudios relativos al cultivo en laboratorio de las principales especies de ostras productoras de perlas tales como *Pinctada fucata* (Dharmaraj *et al.*, 1987; Victor *et al.*, 1995), *P. maxima* (Rose y Baker, 1994; Taylor, 1999) y *P. margaritifera* (Southgate y Beer, 1997; Doroudi *et al.*, 1999). La mayoría de estos estudios se han dirigido a evaluar la respuesta de larvas y semillas hacia variaciones en factores externos, como la temperatura del agua, salinidad, fotoperiodo, dieta, densidad de siembra, etc., así como para determinar los requerimientos nutricionales y fisiológicos de reproductores de la especie de interés. Tales estudios han permitido establecer protocolos de manejo de estas especies a escala experimental, piloto y comercial, que han derivado en algunos casos, en procesos de generación y transferencia de tecnología con aplicación industrial en proyectos comerciales técnicamente eficientes y económicamente rentables.

En lo que concierne a las ostras perleras mexicanas *P. mazatlanica* (Hanley, 1856) y *Pteria sterna* (Gould, 1851), existe a la fecha gran interés científico por desarrollar su cultivo en cautiverio. Los estudios actuales se han centrado en generar mayor conocimiento sobre las necesidades de adultos y larvas en laboratorio, con el propósito de lograr una producción suficiente de semilla. En el caso particular de *P. sterna*, es insuficiente la información disponible sobre los requerimientos fisiológicos y nutricionales de adultos y larvas, y ésta se refleja en la poca seguridad de obtener gónadas de calidad y gametos viables durante los desoves inducidos en laboratorio, aún cuando los reproductores silvestres se

colecten dentro de su temporada reproductiva natural. Particularmente, se requiere información más precisa acerca de la condición fisiológica de los reproductores, es decir, sobre la calidad de las gónadas (gametos), y su influencia en el subsiguiente éxito de las etapas embrionaria y larvaria. Esto significa que una pobre condición de reproductores se traducirá en gametos de mala calidad, los cuales producirán a su vez larvas poco viables e incapaces de alcanzar la metamorfosis y fijarse. Por el contrario, una óptima condición de reproductores generará gametos de buena calidad y larvas sanas y fuertes con potencial de completar su desarrollo y alcanzar con éxito la metamorfosis y la fijación. A la fecha, son pocos los estudios que relacionan ambos aspectos y se centran en especies de bivalvos comestibles de importancia comercial, como *Pecten maximus* (Le Pennec *et al.*, 1990), *Crassostrea gigas* (Chávez-Villalba *et al.*, 2003) y *Ostrea edulis* (Burke *et al.*, 2008).

Aunado a lo anterior, otra problemática que se ha incrementado en las últimas décadas es la errática captación de reclutas en campo, ya que ésta presenta fluctuaciones interanuales importantes que hacen discontinuo el suministro de semilla, afectando con ello el desarrollo de proyectos perleros basados exclusivamente en colecta de semilla silvestre (Monteforte *et al.*, 1995; Cáceres-Puig *et al.*, 2009; Cáceres-Puig, 2012). Esta situación afecta además, los proyectos encaminados a la recuperación de las poblaciones naturales y, en concreto, las operaciones de las granjas perleras localizadas en el Golfo de California (Perlas Únicas S.A. de C.V. en Guaymas, Sonora, y Perlas del Cortez S. de R.L. MI. en Bahía de La Paz, B.C.S.). Estas dos empresas producen perlas esféricas y medias perlas (*mabes*) de gran calidad en el mercado nacional e internacional, pero que dependen del suministro de semilla sana obtenida del campo (Nava *et al.*, 2000; Kiefert *et al.*, 2004; Ruíz-Rubio *et al.*, 2006). Más aún, ambas granjas, junto con otras que han existido en el pasado, son fuentes de empleos y generadoras de divisas que contribuyen al desarrollo cultural, social y económico regional, razón por la cual es necesario apoyar su crecimiento y consolidación (Cariño y Monteforte, 1995; Monteforte y Cariño, 1992).

Por todo lo anterior, el presente estudio utilizó diferentes herramientas como índices morfo-fisiológicos, histología, histoquímica, bioquímica gruesa y fina y

coeficientes energéticos para estimar la condición fisiológica de las gónadas de los adultos (reproductores) de *P. sterna* durante su temporada reproductiva y su relación con la dinámica ambiental (e.g. temperatura, salinidad, alimento disponible), evaluando su influencia sobre la viabilidad larvaria. El objetivo estuvo dirigido a generar criterios confiables de calidad gonádica (ovocitaria en particular), para asegurar el suministro continuo y suficiente de semilla de la especie para el apoyo de las operaciones de injerto en las granjas perleras. A su vez, estos resultados podrían permitir desarrollar o innovar nuevas tecnologías sobre la reproducción y/o producción de semilla de *P. sterna* en el laboratorio, con un impacto positivo en la industria perlera nacional.

2. ANTECEDENTES

2.1. *Indicadores de calidad gonádica en procesos reproductivos de bivalvos*

Existen muchos estudios referentes a la importancia que reviste el estado físico general de los organismos sexualmente maduros (condición reproductiva), la cantidad de energía destinada a los gametos (esfuerzo reproductivo) y la supervivencia larval y de la progenie (éxito reproductivo) (Gabbott, 1975; Robinson *et al.*, 1981; Barber y Blake, 1981; Epp *et al.*, 1988; Barber y Blake, 2006; Couturier y Newkirk, 1991; Paulet y Boucher, 1991; Lango-Reynoso *et al.*, 2000; Kang *et al.*, 2000; Lodeiros *et al.*, 2001; Arellano-Martínez *et al.*, 2004). De estos, se desprende el uso de ciertos indicadores biológicos (e.g. índice de condición, índice gonadosomático, índice hepato-somático), indicadores histológicos (caracterización de desarrollo gonádico), indicadores de composición bioquímica (lípidos, carbohidratos y proteínas) y de ácidos grasos, indicadores histoquímicos (composición fina de lípidos, carbohidratos y proteínas en el interior de las células). En general, estos indicadores han sido relacionados con el ciclo reproductivo y/o gametogénico de los organismos (Ojea *et al.*, 2004; Mladineo *et al.*, 2007; Dridi *et al.*, 2007; Mouneyrac *et al.*, 2008), condición fisiológica de reproductores (Gallager *et al.*, 1986; Fraser, 1989; Martínez *et al.*, 2000), calidad ovocitaria (Holland, 1978; Enríquez-Díaz *et al.*, 2003; Rodríguez-Jaramillo, 2004; Cannuel y Beninger, 2005; Gómez-Robles *et al.*, 2005, Gómez-Robles y Saucedo, 2009) y/o composición de larvas (Gallager y Mann, 1986b; Leonardos y Lucas, 2000; Martínez *et al.*, 2000; Bochenek *et al.*, 2001). Sin embargo, son pocos los estudios enfocados a establecer la relación existente entre adultos (gónadas), huevos y larvas de algunas especies de bivalvos, como *C. gigas* (Chávez-Villalba *et al.*, 2003) y *O. edulis* (Burke *et al.*, 2008).

Los estudios anteriores establecen que el efecto de la calidad fisiológica de adultos (medida a partir del contenido bioquímico de tejidos y de una razón numérica triglicéridos/esteroles) es dependiente de la temperatura y disponibilidad de alimento, e influye directamente sobre la gametogénesis, la producción de ovocitos y larvas viables para alcanzar la fase de semilla (en campo o en laboratorio). En el caso de *O. edulis*, el alto porcentaje de reclutamiento de semilla se ha relacionado con el valor máximo de la razón triglicéridos/esteroles,

sugiriendo que este es un buen indicador de calidad larvaria en la especie (Burke *et al.*, 2008).

Los índices de condición más comunes que se han utilizado en moluscos bivalvos, evalúan los cambios en la biomasa del organismo entero o de un tejido particular sobre el conjunto de actividades fisiológicas de dichos organismos, incluyendo su crecimiento, nutrición, reproducción, y metabolismo, y también se emplean para detectar la presencia de contaminantes o enfermedades y su efecto (Brown y Hartwick, 1988; Crosby y Gale, 1990; Mason y Nell, 1995; Baghurst y Michell, 2002). Lo anterior se determina debido a que los cambios en estos índices reflejan déficits energéticos asociados a estrés ambiental, transferencia de energía entre la gónada y tejidos somáticos, o bien a la pérdida de energía acumulada durante el desove y liberación de gametos. De estos índices, quizá el más utilizado es el índice de condición (IC) –llamado índice de condición general, ICG, en este estudio–, que es el más sencillo y práctico para determinar el cambio en la biomasa húmeda o seca de la masa visceral, incluyendo el tejido gonádico, con el fin de monitorear la actividad reproductiva de los organismos (Okumus y Stirling, 1998; Mladineo *et al.*, 2007).

Los ácidos grasos juegan un papel principal en la reproducción de bivalvos marinos. Esto es cierto en especies como *Patinopecten yessoensis*, *Argopecten purpuratus*, *C. corteziensis* (Martínez *et al.*, 2000; Hurtado *et al.*, 2009), entre otros. La acumulación de los ácidos grasos en bivalvos marinos se ha establecido, ya sea por incorporación directa en los tejidos somáticos a partir del alimento disponible (fitoplancton), o a través de la conversión de carbohidratos almacenados en el músculo aductor vía lipogénesis (Gabbott, 1975; Palacios *et al.*, 2007). Una vez incorporados, los ácidos grasos se utilizan directamente para el desarrollo de los gametos y, de no requerirse en su momento, se acumulan en la glándula digestiva, músculo aductor o manto. Por otro lado, los componentes importantes requeridos durante la embriogénesis incluyen lípidos totales y ácidos grasos, los cuales deben estar disponibles para los reproductores en su ambiente natural para soportar su demanda energética durante la gametogénesis, y en el caso de reproductores

mantenidos en laboratorio, ser proporcionados en la dieta de maduración durante el acondicionamiento para propiciar su almacenamiento en los ovocitos.

Finalmente, estos nutrientes esenciales indispensables en gónada, son transferidos a los ovocitos en desarrollo y usados como reserva energética por los embriones para concluir exitosamente su desarrollo y convertirse en larvas pedivelíger o larvas "D" que, habiendo soportado el periodo de transición entre su alimentación endógena (basada en sus reservas vitelinas) y el inicio de su alimentación exógena (basada fundamentalmente en microalgas), puedan continuar su desarrollo, alcanzando los estadios de larva umbada y pedivelíger, fijarse, metamorfozarse y convertirse en juveniles (semillas) (Acosta-Salmón, 2004).

En cuanto a la calidad de gametos, existen varios estudios que emplean indicadores diferentes a la histología convencional o la talla de ovocitos (Lango-Reynoso *et al.*, 2000; Enríquez-Díaz *et al.*, 2003). Sin embargo, aspectos finos de la cinética de los gametos se desconocen casi por completo en los moluscos bivalvos. Al respecto, se sabe que los lípidos y carbohidratos constituyen dos de los componentes más importantes del vitelo de los ovocitos (Holland, 1978), siendo la dieta y las reservas almacenadas la fuente principal de provisión de estos nutrientes. Los lípidos en particular –y entre estos los triglicéridos, ácidos grasos altamente insaturados y esteroides–, son esenciales como reservas energéticas, constituyentes de las membranas celulares (Ackman, 2000) y precursores de otros metabolitos, como prostaglandinas (Palacios *et al.*, 2007). Por ello, estos compuestos son clave en el esfuerzo reproductivo, calidad de las gónadas (Gallager *et al.*, 1986; Palacios *et al.*, 2007), vigor y viabilidad de embriones y larvas (Fraser, 1989; Gallager y Mann, 1986b) y éxito reproductivo.

A partir de estos conocimientos, se ha estudiado recientemente la relación entre el nivel de lípidos en la gónada y la gametogénesis en especies de importancia comercial como *P. maximus* (Soudant *et al.*, 1996), *Atrina maura* (Rodríguez-Jaramillo, 2004), *Ruditapes decussatus* (Delgado *et al.*, 2004), *Nodipecten subnodosus* (Palacios *et al.*, 2007) y *C. gigas* (Cannuel y Beninger, 2005). En contraste, la correlación entre el contenido de lípidos de los ovocitos y la viabilidad larvaria solo

se ha evaluado en *P. maximus* (Le Pennec *et al.*, 1990) y *O. edulis* (Frolov y Pankov, 1992), lo que confirma la utilidad y pertinencia del presente estudio.

2.2. Fisiología reproductiva en bivalvos y ostras perleras con énfasis en *P. sterna*

Los bivalvos marinos presentan ciclos de almacenamiento y utilización de energía están estrechamente relacionados con los ciclos reproductivos y estos a su vez, con variaciones en las condiciones ambientales (Sastry, 1979; Giese y Pearse, 1979; Gabbot, 1975; Bayne, 1976; Barber y Blake, 1981, 2006; Robinson *et al.*, 1981; Epp *et al.*, 1988; Couturier y Newkirk, 1991; Kang *et al.*, 2000, entre otros). Como resultado de estos estudios se sabe que la mayoría de las especies tienen la capacidad de almacenar reservas nutritivas en sus tejidos corporales durante periodos de elevado suministro alimenticio (seston), y movilizarlas durante momentos de escasez de alimento y/o elevadas demandas energéticas (Barber y Blake, 1981, 2006; Epp *et al.*, 1988; Mathieu y Lubet, 1993).

Una de las demandas energéticas más importantes durante la reproducción de bivalvos se presenta durante la gametogénesis; además, en muchas especies el crecimiento y el desarrollo gonadal ocurren de manera simultánea. Por lo que durante estos procesos, los costos energéticos (tanto de mantenimiento como de la producción de gametos) deben ser cubiertos ya sea por la energía derivada del consumo inmediato de alimento, por el uso de reservas energéticas almacenadas, o mediante una combinación de ambas estrategias (Bayne, 1976; Barber y Blake, 2006; Mathieu y Lubet, 1993). Al respecto, Bayne (1976) propuso una clasificación para dichas estrategias utilizadas por bivalvos para obtención y utilización de la energía requerida durante la reproducción. Esta clasificación denomina como "oportunistas" a aquellas especies que utilizan, para la formación de gónada, la energía obtenida recientemente del seston; mientras que aquellas especies que producen gónada a costa de las reservas bioquímicas almacenadas en sus tejidos somáticos (glándula digestiva, músculo aductor y manto) durante los periodos de elevado suministro alimenticio, se denominan "conservadoras".

En ostras perleras son escasos los estudios sobre fisiología reproductiva. Sin embargo, en *P. mazatlanica* se ha caracterizado el ciclo reproductivo (García-

Domínguez *et al.*, 1996; Saucedo y Monteforte, 1997; García-Cuellar *et al.*, 2004), y se ha analizado la dinámica energética relacionada con la gametogénesis (Saucedo *et al.*, 2002). De estos estudios, se ha logrado identificar dos picos de maduración (primavera y verano) de los cuales es más importante el de primavera (marzo a mayo), ya que el crecimiento de la gónada y la formación de gametos ocurren a expensas de las reservas protéicas del músculo aductor y la glándula digestiva, respectivamente. Más detalles sobre el tema pueden consultarse en la revisión de Saucedo y Southgate (2008). Por otra parte, se sabe que *P. sterna* combina ambas estrategias para obtención y utilización de las reservas energéticas. La especie sigue una estrategia *conservadora* durante el invierno, cuando la gametogénesis se realiza a partir de la energía previamente almacenada en los tejidos somáticos, y sigue una estrategia *oportunist*a en primavera, sustentando principalmente su desarrollo gonadal a partir de la energía que obtiene del alimento ingerido en corto plazo (Vite-García y Saucedo, 2008; Cáceres-Puig *et al.*, 2009).

2.3. Biología reproductiva de *P. sterna*

La concha nácar presenta sexos separados (gonocorismo), la proporción sexual macho: hembra tiende a ser 1:1 en condiciones naturales, mientras que en condiciones de cultivo la proporción se orienta a favor de los machos, particularmente en situación de hacinamiento, lo que provoca estrés, y por tanto, la producción del sexo energéticamente más barato (Sevilla, 1969; Acosta-Salmón y Southgate, 2005; Saucedo y Southgate, 2008). En Bahía de La Paz, B.C.S., la especie alcanza la madurez sexual a partir de una talla de ~40 mm de altura de la concha, la cual corresponde a unos 17 meses de vida (Saucedo y Monteforte, 1997). Contrariamente, la especie llega a la madurez sexual a los 49 mm de altura (machos) y 56 mm de altura (hembras) en la Bahía de Acapulco, Gro., misma que se alcanza a los 6–7 meses de edad (Serna-Gallo, 2011). La especie presenta hermafroditismo protándrico, es decir madura inicialmente como macho y cambia a hembra a partir de los 50 mm de talla (Saucedo y Monteforte, 1997).

En general, los estudios sobre la biología reproductiva de la especie se han enfocado a describir las fases del ciclo reproductivo, así como la temporalidad de

los principales eventos relacionados con su reproducción, particularmente el desove, y la relación de este evento con la temperatura del agua (Giese y Pearse, 1979; Barber y Blake, 1981, 2006). En este sentido, se sabe que en Bahía de Los Ángeles, B.C., *P. sterna* desova de manera continua a lo largo del año presentando tres picos reproductivos en diciembre, febrero y agosto (Hernández-Díaz y Bückle-Ramírez, 1996); en Bahía de La Paz, la especie presenta dos picos de desove a lo largo del año, uno en febrero y otro en mayo a una temperatura de entre 22.2 y 23.4 °C (Saucedo y Monteforte, 1997). En Guaymas, Sonora, se ha reportado un solo periodo de desove, cuando la temperatura del agua varía de 19 a 22 °C (Arizmendi-Castillo, 1996); mientras que en Laguna Ojo de Liebre, B.C.S., se reporta la ocurrencia del desove a temperaturas de entre 23 y 25 °C (Hernández-Olalde *et al.*, 2007).

Otros estudios se ha enfocado al desarrollo y composición de la gónada y tejidos somáticos de la especie en laboratorio y su relación con la temperatura del agua (Granados-Amores, 2012), la dieta suministrada a los reproductores (Hernández-López, 2012), y la respuesta ecofisiológica (tasas de filtración y aclaración, eficiencia de absorción, tasas de excreción y respiración, y ecuación de balance energético) a diferentes temperaturas. De estos estudios se desprende que la respuesta fisiológica óptima de adultos para procesos reproductivos ocurre en el rango de temperaturas de 22 a 25 °C y a una concentración de alimento (microalgas) de $120\text{--}150 \times 10^3$ células/mL.

2.4. Fases tempranas de desarrollo y estudios con larvas de *P. sterna*

La fecundación, así como el desarrollo pelágico embrionario y larval de *P.sterna* ocurren en la columna de agua (Fig. 1). Su ciclo de vida, al igual que el de la mayoría de los bivalvos, está dividido en diferentes etapas e inicia con la unión de un óvulo y un espermatozoide, formando un cigoto del cual se desarrolla más adelante un embrión que atraviesa por una primera, segunda y tercera división celular, que ocurren aproximadamente a los 26, 33 y 55 minutos, respectivamente; mientras que la cuarta división se presenta alrededor de los 70 minutos después de la

fecundación. Las siguientes estadios secuenciales del desarrollo embionario son mórula, blástula y gástrula, fases que tienen una duración promedio de 1–3 horas, 4–5 horas y 6–12 horas, respectivamente. En tiempo total promedio requerido para que la especie complete su desarrollo embrionario es aproximadamente de 22–24 horas desde la fecundación hasta la aparición de larvas trocóforas ciliadas, a una temperatura media de 28 °C (Serrano-Guzmán y Salinas-Ordáz, 1993; Araya-Núñez *et al.*, 1995). Sin embargo, el tiempo de desarrollo hasta larva trocófora varía de acuerdo a la temperatura de cultivo, oscilando entre 24 y 25 horas después de la fecundación (Serrano-Guzmán y Salinas-Ordáz, 1993).

La larva trocófora posee tres bandas de cilios y un flagelo en posición apical, mismos que le dan movilidad en la columna de agua entre 12 y 24 horas que dura esta fase. Al término de ésta última, se forma una estructura que encierra completamente el cuerpo y los órganos elementales (Rose y Baker, 1994; Doroudi y Southgate, 2003). Al final del estadio trocófora, en la región central aparecen pequeñas marcas que generarán la típica concha en forma "D" del primer estadio véliger (o de charnela recta) (Fig. 1). El término véliger D es la segunda fase larvaria y adopta su nombre de una estructura llamada *velum* que le permite alimentarse, respirar y mantenerse en la columna de agua mediante movimientos natatorios helicoidales (Araya-Núñez *et al.*, 1995; Martínez-Fernández *et al.*, 2003). Hasta este momento, el desarrollo es sostenido por las reservas endógenas vitelinas (lípidos principalmente) (Gallager y Mann, 1986b; Gallager *et al.*, 1986).

En el medio natural, las corrientes marinas ejercen la mayor influencia en la dispersión de las larvas, ya que su habilidad natatoria es limitada. La fase larvaria pelágica tiene una duración variable (entre 12 y 25 días), tiempo durante el cual la larva crece en tamaño y complejidad anatómica hasta convertirse en una larva pedivéliger con un velum reducido y un órgano musculoso (pie), que le permite reptar en búsqueda de un sustrato adecuado, fijarse, metamorfizarse y finalmente convertirse en juvenil (o semilla) y posteriormente en adulto (Fig. 1). El proceso de pérdida de capacidad natatoria, actividad reptante para la *elección* de un sustrato adecuado para fijarse y efectuar la metamorfosis, tiene una duración promedio, para una población o cohorte larvaria, de 2 a 6 días (Serrano-Guzmán y Salinas-Ordáz, 1993; Araya-Núñez *et al.*, 1995). En resumen, la duración de la fase de vida

planctónica de las larvas de *P. sterna*, depende de varios factores, entre ellos la temperatura del agua y la alimentación que reciban.

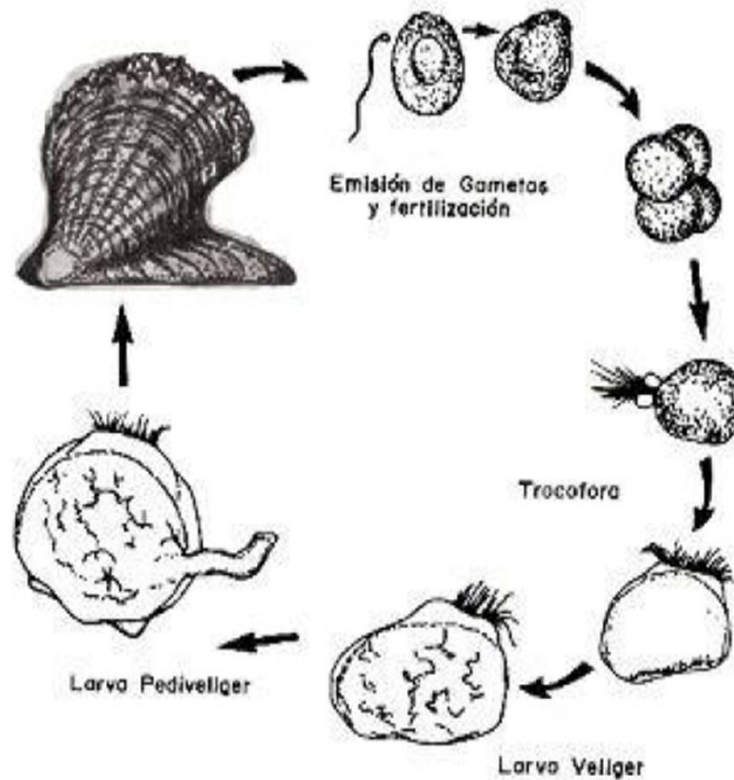


Figura 1. Ciclo de vida de *P. sterna*. Tomado de Cáceres-Puig (2012).

En cuanto a las investigaciones enfocadas a obtener nuevo conocimiento científico y zootécnico, aplicable al desarrollo de tecnología para la reproducción y la producción de semilla de la concha nácar en ambiente controlado (laboratorio), existen estudios dirigidos hacia la maduración y desove de reproductores con fines de cultivo larvario. El acondicionamiento gonádico es una técnica reportada como exitosa para la maduración y desove de reproductores de moluscos bivalvos de importancia comercial, incluso fuera de su estación reproductiva (Utting, 1993; Lannan, 1980; Muranaka y Lannan, 1984). En el caso de la concha nácar, Avilés-Quevedo y Mazón-Suástegui (1989) y Mazón (1988) obtuvieron resultados positivos al utilizar como alimento dietas artificiales a base de harina de arroz y

fécula de maíz, en sistemas abiertos o cerrados, en un rango de temperaturas de 19 a 20 °C.

De acuerdo con diversos autores, la temperatura óptima para fijación larvaria de *P. sterna* se encuentra entre los 21 y 25 °C. McAnally-Salas y Valenzuela-Espinoza (1990) reportan un rango de temperaturas de entre 21 y 22 °C como adecuado para fijación de larvas al día 38 de su desarrollo. Esto coincide con los reportes de Araya-Núñez *et al.* (1991, 1995), quienes observaron fijación larvaria entre los días 35 y 40, a temperatura de 21.1 a 24.6 °C. Otros estudios reportan que la fijación larvaria de la concha nácar ocurre a una temperatura de 22 a 23 °C al día 19 (Saucedo, datos no publicados).

2.5. Efecto del ambiente sobre la reproducción de bivalvos, con énfasis en *P. sterna*

El proceso reproductivo de las ostras perleras, así como de cualquier especie de bivalvo, se rige en general por una combinación compleja de factores exógenos (temperatura, disponibilidad de alimento, fotoperiodo) y endógenos (neurosecreciones, factores genéticos), que condicionan el ciclo reproductivo de estos invertebrados desde el inicio de la gametogénesis, la maduración, el desove y la reabsorción de gametos residuales, etc. (Bayne, 1976; Giese y Pearse, 1979; Lubet, 1981; Barber y Blake, 2006; Román *et al.*, 2002; Saucedo y Southgate, 2008). Lo anterior propicia una plasticidad en cada especie, o población de la misma especie, para adaptarse a diferentes condiciones ambientales con la finalidad de ampliar su distribución geográfica (latitudes, profundidades y hábitats) (Bayne, 1976; Giese y Pearse, 1979; Sastry, 1979; Lubet, 1981; Baber y Blake, 2006).

En general, se asume que la temperatura es el principal modulador de los eventos que ocurren durante el ciclo reproductivo de bivalvos, mientras que la alimentación regula la duración de dichos eventos a partir de la cantidad de energía disponible para la gametogénesis. Esta energía es tomada directamente del alimento disponible en ese momento (seston) o bien de reservas energéticas previamente almacenadas en tejidos especiales. El seston incluye partículas orgánicas e inorgánicas, cuya cantidad y calidad varía de acuerdo a ciclos estacionales

dependientes de la fluctuación anual e inter-anual de factores físicos y biológicos como mareas, tormentas, fotoperíodo, viento, presencia de agentes patógenos y consumidores primarios (Berg y Newell, 1986; Luna-González *et al.*, 2000). Los bivalvos tienen la capacidad de almacenar reservas nutritivas en sus tejidos somáticos durante periodos de elevado suministro de alimento, las cuales posteriormente pueden movilizar en momentos de escasez alimenticia y/o de altas demandas de energía, como puede ser la reproducción o al presentarse condiciones de estrés fisiológico (Barber y Blake, 2006; Mathieu y Lubet, 1993). Sin embargo, las cantidades de energía que almacenan los organismos son limitadas en tiempo y espacio y son repartidas de manera diferencial, es decir, tanto para el crecimiento de tejidos somáticos como para la reproducción (MacDonald y Thompson, 1985; Paulet y Boucher, 1991).

Se ha estudiado el efecto de factores bióticos y abióticos sobre la dinámica del reclutamiento de semilla de *P. sterna* en Bahía de La Paz, encontrándose que tanto la temperatura (entre 19 y 24 °C), como la energía contenida en el alimento (seston, $\sim 1.3 \times 10^{-2}$ mg/L), generan el mayor impacto sobre el reclutamiento de semillas y la mejor condición fisiológica (contenido energético en tejidos) de reproductores (Cáceres-Puig, 2012).

Por todo lo anteriormente mencionado, generar este tipo de información es importante para determinar la influencia de factores ambientales sobre los eventos reproductivos de *P. sterna* en el área de estudio. Sin embargo, se necesita determinar indicadores que permitan estimar, por ejemplo, la condición fisiológica de los reproductores en diferentes etapas de su ciclo gametogénico principalmente durante su temporada natural de maduración; y la correspondiente calidad ovocitaria, a partir de la cual se puedan generar desoves exitosos y mayor viabilidad larvaria en el laboratorio. En atención a esta necesidad, el presente es uno de los estudios que han surgido para ampliar la información referente a los aspectos biológicos y fisiológicos de la especie, relacionados con la influencia de factores ambientales, sobre los eventos reproductivos y su potencial aplicación en acuicultura.

3. JUSTIFICACIÓN

La semilla es el principal insumo biológico para el desarrollo de proyectos acuícolas, incluida la perlicultura. En México, el mayor obstáculo para el establecimiento de una industria perlera es el abasto insuficiente de semilla silvestre, así como un bajo nivel de efectividad en el manejo de las zootecnias disponibles. Lo anterior para asegurar la maduración de reproductores en laboratorio, y la calidad de sus gónadas para obtener gametos viables y larvas saludables que permitan asegurar la producción de semilla para el sustento de las operaciones de perlicultura. Si bien en la región Noroeste del país existen dos granjas perleras que cultivan la concha nácar *P. sterna* a escala comercial (y a escala piloto la madreperla *P. mazatlanica*), ninguna de ellas ha logrado auto-abastecerse de organismos para escalar comercialmente el cultivo de ostras perleras y la producción rentable de perlas (Kiefert *et al.*, 2004; Cáceres-Puig *et al.*, 2009). La etapa de larvicultura en particular sigue representando el cuello de botella más serio para la producción de semilla, y es consecuencia de diversos factores de entre los cuales se identifican los siguientes: 1) la imposibilidad de garantizar una adecuada calidad gonádica de los reproductores colectados en campo, aún cuando estos se puedan obtener sexualmente maduros durante su temporada reproductiva natural; 2) la poca seguridad de obtener gametos viables y larvas sanas durante los desoves inducidos en laboratorio, a partir de reproductores silvestres o acondicionados mediante zootecnias que funcionan bien para otros bivalvos; 3) la falta de criterios rápidos y confiables para estimar la condición fisiológica de los reproductores (e.g. óptima, no-óptima) en diferentes etapas de su ciclo gametogénico, principalmente durante la temporada natural de maduración reportada para Bahía de La Paz; y (4) la presencia de fenómenos oceanográficos como El Niño o La Niña y la influencia de factores ambientales en la reproducción de la especie.

La relevancia de generar tal información científica a corto plazo, es su potencial aplicación para el diseño e innovación de tecnologías y protocolos para la reproducción de la especie y producción de semilla en el laboratorio. Hacer efectiva esta vinculación ciencia-tecnología puede tener también un impacto favorable en la industria, debido a la necesidad e importancia de producir semillas sanas para

apoyar las operaciones de perlicultura de las granjas perleras localizadas en el Golfo de California.

4. OBJETIVOS

4.1. General

Evaluar la utilidad de diferentes indicadores de calidad gonádica en adultos reproductores silvestres de concha nácar *Pteria sterna*, estableciendo su influencia en la viabilidad larvaria y su relación con diversos parámetros ambientales durante la temporada natural de maduración 2008–2009 en Bahía de La Paz., B.C.S., México.

4.2. Particulares

- Estudiar la relación de la calidad gonádica de los reproductores con las variaciones en la temperatura, salinidad, concentración de clorofila *a*, cantidad del alimento disponible (seston total, orgánico e inorgánico) y su calidad (razón SI/SO, composición bioquímica e índice alimenticio).
- Evaluar la calidad gonádica mediante las variaciones en el índice de condición general, índice gonadosomático, índice de rendimiento muscular e índice de manto.
- Determinar la calidad gonádica mediante la estimación de la proporción sexual, grado de desarrollo gonádico, talla de los ovocitos y variaciones en el contenido de lípidos y carbohidratos mediante histoquímica cuantitativa y análisis digital de imágenes.
- Determinar la calidad gonádica mediante variaciones en la composición bioquímica (proteínas, carbohidratos, lípidos, triglicéridos) y proximal (ácidos grasos) de la gónada y tejidos somáticos (glándula digestiva, manto, músculo aductor), así como mediante los coeficientes energéticos de estos tejidos.
- Evaluar la viabilidad larvaria en función del crecimiento y supervivencia larvaria, porcentaje de semillas fijadas y cantidad de semillas producidas, así como de los cambios en la composición bioquímica y valores energéticos de larvas tempranas (véliger) y maduras (pedivéliger), cultivadas en laboratorio.

5. HIPÓTESIS

Si la condición fisiológica de los reproductores (calidad de las gónadas) y su subsecuente viabilidad larvaria varían en función de la temporada reproductiva así como de factores ambientales, entonces ambos procesos dependen de la dinámica ambiental por lo que la definición de criterios de calidad que tomen en cuenta estos aspectos permitirá identificar los momentos óptimos para la colecta y desove de reproductores con fines de larvicultura y producción de semilla en el laboratorio.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Origen y manejo de organismos adultos

El presente trabajo se llevó a cabo durante la temporada natural de maduración de *P. sterna* en la Bahía de La Paz, que abarca en general los meses de diciembre a mayo (Saucedo y Monteforte, 1997). En este caso el ciclo que se cubrió fue 2008–2009. Los muestreos incluyeron un periodo considerado pre-reproductivo (noviembre 2008), dos de los principales picos de maduración (febrero y abril 2009), y un periodo considerado post-reproductivo (junio 2009). El sitio de recolecta fue un cultivo comercial en Bahía de La Paz (Perlas del Cortez, 24°16' N, 110°19' W).

En cada uno de los cuatro muestreos se recolectaron un total de 40 organismos con tallas entre los 80 y 102 mm de altura de la concha, durante su segundo año reproductivo, para asegurar la presencia de ambos sexos (Saucedo y Monteforte, 1997). Los organismos se trasladaron en húmedo a las instalaciones del CIBNOR, se limpiaron de epifauna y se dividieron al azar en dos grupos experimentales de 20 organismos cada uno. El primer grupo se destinó para la determinación de indicadores cualitativos y cuantitativos de calidad gonádica; mientras que el segundo grupo de 20 organismos se utilizó para inducción al desove y cultivo larvario (sección 6.4).

Paralelo a la recolecta de las ostras, se registraron parámetros fisicoquímicos del agua de mar, tales como temperatura (0.01 °C) y salinidad (0.01 ups), empleando un medidor portátil de multi-parámetros (Modelo YSI-59). Adicionalmente, se tomaron *in situ* muestras de agua de 2 L por cuadruplicado (8 L en total), que se utilizaron para determinación de la cantidad y calidad de alimento disponible.

6.2. Dinámica ambiental

Las muestras de agua de mar (8 L por cada muestreo) se filtraron usando una bomba de vacío portátil y filtros Whatman GF/C (47 mm) por cuadruplicado (2 L de agua de mar por filtro). Los filtros fueron previamente lavados con agua

destilada, secados en estufa (100 °C), quemados en mufla (450 °C durante 4 horas), y pesados con balanza analítica (0.001 g). Todos los filtros se guardaron en papel aluminio, se transportaron al laboratorio en hielo y se almacenaron a -20 °C para análisis bioquímicos posteriores.

Para determinar la concentración de clorofila *a*, como indicador parcial de la biomasa fitoplanctónica y de la productividad primaria disponible en la capa superior del océano (Behrenfeld *et al.*, 2006), se utilizaron los valores obtenidos de la base de datos de la National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA) para los meses de estudio (noviembre 2008, febrero, abril y junio 2009). Esto se hizo mediante el buscador Coast Watch (<http://coastwatch.pfeg.noaa.gov>).

6.2.1. Análisis de la concentración de seston

Los cuatro filtros, previamente congelados, se liofilizaron por 32 horas y se pesaron. Se determinó el contenido total de seston (ST), así como de las fracciones orgánica (seston orgánico, SO) e inorgánica (seston inorgánico, SI). Se tomaron dos de los filtros (4 L agua de mar filtrada) y a los valores iniciales de peso, que corresponden al material particulado junto con el filtro, se restaron del peso del filtro previamente quemado para obtener el contenido de ST. Posteriormente, los filtros (con las muestras secas de ST) se colocaron en papel aluminio y se incineraron en la mufla a 450 °C durante 4 horas. Una vez finalizado este proceso, los filtros se colocaron en un desecador hasta enfriarse y se pesaron para obtener el valor del SI. El SO se obtuvo mediante la diferencia entre el SI y ST.

6.2.2. Análisis de la calidad del alimento

Se calculó la razón de la porción orgánica e inorgánica (SI/SO) del alimento, como una medida de la dilución del SO. La composición bioquímica de proteínas, carbohidratos y lípidos en el SO se determinó siguiendo la metodología propuesta por Luna-González *et al.* (2000) y aplicada por Cáceres-Puig (2012). Los

dos filtros restantes (4 L agua de mar filtrada) se rehidrataron con 3 mL de agua destilada y se trituraron con ayuda de un homogenizador.

La determinación de proteínas en el seston se realizó siguiendo el método de Lowry *et al.* (1951) y modificado por Malara y Charra (1972a). Este método se basa en la reacción de una solución cúprica con las proteínas en un medio alcalino para formar enlaces cromogénicos en la proteína, y la reducción posterior del reactivo de Folin Ciocalteu por la proteína tratada con cobre, la cual produce un complejo de color azul. La absorbancia se leyó a 750 nm en un espectrofotómetro. Paralelo a las muestras, se corrió una curva de calibración a partir de cinco puntos usando como estándar albúmina de bovino a partir de 300 µg/mL.

Para la determinación del contenido de carbohidratos se siguió el método establecido por Dubois *et al.* (1956) y modificado por Malara y Charra (1972b). Este método se basa en la formación de furfurales a partir de hexosas en presencia de un ácido mineral fuerte (H₂SO₄, concentrado). Los furfurales y sus derivados se combinan con fenol (C₆H₅OH) para dar como resultado un complejo de color rojo-anaranjado. Las lecturas de absorbancia se midieron a 490 y 600 nm en espectrofotómetro (Beckman DU-640). Paralelo a la lectura de las muestras, se corrió una curva de calibración con cinco puntos usando glucosa anhidra como estándar a partir de 300 µg/mL. Para determinar la concentración de carbohidratos a partir de las dos lecturas ópticas, se utilizó la siguiente fórmula de densidad óptica:

$$\text{Densidad Óptica (DO)} = Do_{490 \text{ nm}} - 1.5 (Do_{600 \text{ nm}} - 0.003) \dots \dots \dots (1)$$

La extracción se realizó mediante un micro-método desarrollado por Cáceres-Martínez (1982), a partir del procedimiento descrito por Bligh y Dyer (1959), basaso en el principio de la existencia de un sistema monobásico según la proporción de los componentes de la mezcla terciaria de cloroformo-metanol-agua. La mezcla terciaria empleada fue diclorometano-metanol-agua, que arrastra los lípidos que son obtenidos después de ser separados en la mezcla monobásica,

misma que es evaporada en ausencia de oxígeno. La cantidad de lípidos fue obtenida inmediatamente después por su peso directo.

Paralelo a la composición bioquímica del seston, se determinó el contenido energético del material alimenticio empleando los coeficientes de equivalencia energética propuestos por Halver (1972): 5.65 kCal/g para proteínas; 4.15 kCal/g para carbohidratos; 9.4 kCal/g para lípidos. Los resultados se expresaron en kJ/L.

El índice alimenticio (IA) propuesto por Widdows *et al.* (1979) es una medida que expresa la calidad del seston como alimento para organismos filtradores. Se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Índice alimenticio (IA)} = MA / ST \times 100 \dots\dots\dots (2)$$

donde *MA* = material alimenticio ($\mu\text{g/L}$); *ST* = seston total ($\mu\text{g/L}$).

El material alimenticio se calculó sumando los componentes bioquímicos del seston total (expresado en $\mu\text{g/L}$) (Widdows *et al.*, 1979).

6.3. Evaluación de indicadores de calidad gonádica de adultos

6.3.1. Índices morfo-fisiológicos

Los organismos del primer grupo recolectados en cada muestreo fueron medidos con vernier (± 0.1 mm) para registrar la altura de la concha y pesados en fresco con todo y concha en una balanza (± 0.1 g). Posteriormente, fueron disectados para extraer la gónada, glándula digestiva, músculo aductor y manto. De cada tejido se registró el peso húmedo (± 0.1 g) y los datos se emplearon para calcular los siguientes índices, tomados y modificados de Arellano-Martínez *et al.* (2004) para *Nodipecten subnodosus*:

$$\text{Índice de condición general (ICG)} = MV / CO \times 100 \dots\dots\dots (3)$$

$$\text{Índice gonadosomático (IGS)} = GO / MV \times 100 \dots\dots\dots (4)$$

$$\text{Índice de rendimiento muscular (IRM)} = MU / MV \times 100 \dots\dots\dots (5)$$

$$\text{Índice de manto (IMA)} = MA / MV \times 100 \dots\dots\dots (6)$$

donde MV = Peso de la masa visceral (g); CO = Peso del organismo con concha (g); MU = Peso del músculo aductor (g); GO = Peso de la gónada (g); MA = Peso del manto (g).

Una vez calculados estos índices, se tomó una porción de gónada para fijación en solución Davidson por 48 horas para análisis histológico e histoquímico (sección 6.3.2.). Posteriormente, se tomaron dos porciones de cada tejido recolectado (gónada, glándula digestiva, músculo aductor y manto) y se almacenaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para análisis bioquímicos y de ácidos grasos (secciones 6.3.3 y 6.3.4.).

6.3.2. Análisis histológicos e histoquímicos: determinación de la proporción sexual, estadios de desarrollo gonádico y análisis de ovocitos

La primera porción de la gónada de cada organismo y fijada previamente en solución Davidson, fue deshidratada en una serie ascendente de alcoholes (70–100%), incluida en Paraplast-TX[®], y cortada con microtomo (3 μm de grosor) para generar tres grupos de laminillas. El primer grupo de laminillas se tiñó con hematoxilina-eosina (Kim *et al.*, 2006) y se observó bajo un microscopio compuesto (Olympus BX41) a diferentes aumentos (20 \times , 40 \times , 60 \times y 100 \times), para contabilizar el número de hembras, machos y organismos sexualmente indiferenciados para determinar la proporción sexual hembra: macho. A su vez, el grado de desarrollo de la gónada se estableció siguiendo el esquema de clasificación propuesto por Saucedo y Monteforte (1997) y Saucedo *et al.* (2002) para ostras perleras, el cual divide el ciclo reproductivo en cinco estadios o etapas: (1) Inactivo, (2) Desarrollo, (3) Madurez, (4) Desove y (5) Posdesove. Detalles de las características histológicas de cada estadio puede consultarse en Saucedo y Southgate (2008).

Para determinar la talla de los ovocitos se empleó un sistema de análisis digital de imágenes, el cual está integrado por un microscopio compuesto (Olympus BX41), una cámara digital (CoolSnap-Pro) y una computadora cargada con el programa Image Pro Plus® (versión 5.1, Media Cybernetics, E.U.A.). De manera manual, se trazó el contorno de los ovocitos con el ratón de la computadora y el programa calculó automáticamente su área (μm^2). Debido a que la forma de los ovocitos es variable dentro de los folículos ováricos, se manejó el diámetro teórico (μm) para estandarizar el diámetro de los ovocitos a la fórmula de una esfera perfecta. Para ello, se empleó la fórmula de la circunferencia propuesta por Saout *et al.* (1999):

$$\text{Diámetro teórico (DT)} = \sqrt{4A/\pi} \dots\dots\dots (7)$$

donde, A = área, π = 3.1416.

Con base en las tallas calculadas, los ovocitos se clasificaron considerando el proceso de vitelogénesis en: (1) ovocitos previtelogénicos (aquellos inmaduros, de talla pequeña que están anclados a la pared folicular con tallas de 9 a 15 μm), (2) ovocitos vitelogénicos (aún inmaduros, pero con un notable crecimiento citoplásmico, aunque aún ligados a la pared del folículo) y (3) ovocitos postvitelogénicos (de forma poliédrica, maduros y ya libres en el lumen de los folículos) (DeGaulejac *et al.*, 1995). Durante cada muestreo, se midió la frecuencia de cada tipo de ovocito capturando imágenes de tres campos visuales elegidos al azar por cada hembra, y se contabilizó el número de ovocitos presentes por campo (Grant y Tyler, 1983). Las imágenes digitalizadas se capturaron con el objetivo de 40 \times .

El segundo y tercer grupo de laminillas histológicas se destinaron para tinción histoquímica de Sudan negro B para identificación de lípidos y triglicéridos (Bayliss, 1984) y azul alciano-PAS para carbohidratos y mucopolisacáridos (Spannhof, 1966). Una vez teñidas, las laminillas fueron observadas bajo microscopio compuesto (20 \times , 40 \times , 60 \times , 100 \times) y de nueva cuenta se utilizó un sistema de análisis digital de imágenes para estimar el contenido de gotas de lípidos

y gránulos glucídicos dentro del citoplasma de los ovocitos vitelogénicos y postvitelogénicos. Para cada tipo de ovocito, el procedimiento se repitió dos veces para los dos tipos de análisis (lípidos y carbohidratos). Primeramente, de cada hembra se capturaron tres campos visuales al azar, de los cuales se seleccionaron 30 ovocitos también al azar. Con estos datos, se calcularon indicadores de calidad de los ovocitos de acuerdo al protocolo previamente establecido por Rodríguez-Jaramillo (2004) en *Atrina maura*:

$$\text{Índice Lipídico (IL)} = ACL / AO \times 100 \dots\dots\dots (8)$$

$$\text{Índice Glucídico (IG)} = ACC / AO \times 100 \dots\dots\dots (9)$$

donde, *ACL* = área de cobertura de gotas lipídicas; *ACC* = área de cobertura de gránulos de carbohidratos y *AO* = área del ovocito.

6.3.3. Análisis bioquímicos y determinación de coeficientes de contenido energético

Se liofilizaron ~100 mg de los tejidos previamente almacenados a -80 °C. Posteriormente se rehidrataron en 3 mL de solución salina (35%) y se homogeneizaron hasta obtener un extracto crudo para determinar la composición bioquímica y de ácidos grasos en gónada, glándula digestiva, músculo aductor y manto.

Para la determinación de proteínas totales, se aplicó el método colorimétrico del ácido bicinconínico (BCA), que se fundamenta en la formación de un complejo de proteína y el ion Cu^{2+} bajo condiciones alcalinas, seguido de la reducción de Cu^{2+} (azul) a Cu^{1+} (morado) (Smith *et al.*, 1995). La cantidad de reducciones es proporcional a la cantidad de proteína presente. Para la realización de este método, el homogenizado (10 μL) fue diluido a razón de 1:10 con hidróxido de sodio (NaOH, 0.1 N), se dejó en incubación durante 2 horas y al término de este tiempo se tomó una muestra de 25 μL y se le adicionaron 200 μL de reactivo BCA. Se llevó al horno a 60 °C durante 15 minutos Paralelo a la reacción de las muestras se corrió una curva tipo de cinco puntos usando albúmina bovina a partir de 2.5 mg/mL de

albúmina como estándar. La absorbancia se leyó a 595 nm en un lector de microplaca.

La determinación de carbohidratos totales se evaluó de acuerdo a Van Handel (1965). Este método determina los carbohidratos, ya sean libres o en forma de polisacáridos, debido a la presencia de un ácido sulfúrico fuertemente oxidante. Los azúcares reaccionan con la solución de antrona bajo condiciones ácidas y da como resultado una coloración azul-verde. Se tomaron 25 μL del extracto crudo y se realizó una dilución 1:2 con 50 μL de ácido tricloroacético al 20%, con la finalidad de remover las proteínas presentes en la muestra. La mezcla resultante se centrifugó a 3600 rpm a 10 °C, durante 10 minutos. Una vez recuperado el sobrenadante, 25 μL fueron adicionados con 250 μL de antrona al 2% disuelta en ácido sulfúrico (H_2SO_4) al 76% y se llevó a baño María (85 °C) durante 4 minutos. El resultado se leyó en un lector de microplaca a 630 nm y la concentración de carbohidratos totales se determinó realizando una curva tipo de siete puntos, usando una solución de dextrosa como estándar a partir de 5 mg/mL.

El contenido de lípidos totales se estimó empleando una versión modificada del método de sulfofosfovainillina de Barnes y Blackstock (1972), utilizando un kit comercial (Merck 3321). Este método se basa en la reacción de productos de degradación lipídica con aldehídos aromáticos, dando como resultado una coloración rojiza. Se llevó a cabo una digestión lipídica, tomando 25 μL de muestra y 250 μL de ácido sulfúrico concentrado. La mezcla se calentó en baño María (90 °C) durante 10 minutos; posteriormente se tomaron 20 μL de muestra ácida y se adicionaron 200 μL de fosfovainillina al 0.2% en ácido fosfórico (H_3PO_4). Se dejó reaccionar durante 40 minutos sobre una microplaca y la absorbancia se registró a 540 nm. Paralelo a la lectura de las muestras se corrió una curva de calibración preparada con solución estándar de lípidos (Lin-Trol Sigma # L2648) a partir de 10 mg/mL.

Para la determinación de triglicéridos, se empleó un kit colorimétrico GPO-PAP (Merck No. 1.1434.001), que se basa en la hidrólisis enzimática con lipasas. Se tomaron 20 μL de muestra y se le adicionaron 200 μL de reactivo comercial. La reacción se realizó sobre una microplaca durante 20 minutos. La absorbancia se

leyó en un lector de microplacas a 540 nm, y la determinación de triglicéridos se realizó con una curva tipo de ocho puntos a partir de 200 mg/mL. Los resultados de cada componente bioquímico se expresaron en mg/g de peso de tejido seco por cada tejido.

Los datos bioquímicos de concentración de carbohidratos, proteínas y lípidos, se utilizaron para realizar un análisis de la cantidad de energía por gramo de peso seco de tejido que aportan estos substratos a los organismos. Para ello se utilizaron los coeficientes de conversión energética propuestos por Beukema y De Bruin (1979) para proteínas = 20.1 kJ/g, carbohidratos = 17.2 kJ/g y lípidos = 35.3 kJ/g.

6.3.4. Composición proximal de tejidos

La extracción y análisis de ácidos grasos se realizó de acuerdo a la modificación del método de Bligh y Dyer (1959), estandarizado por Carreón-Palau *et al.* (2007). Este método se basa en la formación de una mezcla monofásica de cloroformo, metanol y agua $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$, con la que se asegura la extracción de la mayoría de los lípidos, incluyendo aquellos que se encuentran ligados a otras moléculas. Se tomó una muestra representativa de seis organismos de cada muestreo, considerando el sexo y la etapa de desarrollo gonádico en que se encontraban (Tabla I).

Los tejidos liofilizados (gónada, glándula digestiva, músculo aductor y manto se emplearon para extraer los lípidos con una solución de cloroformo-metanol-agua (1:2:0.5, v/v/v) (Bligh y Dyer, 1959). Los lípidos se derivatizaron por transesterificación con una solución de ácido clorhídrico y metanol (5:95, v/v) (Sato y Murata, 1988). Los ácidos grasos metil-esterificados (FAMEs, por sus siglas en inglés) se extrajeron con 2 mL de hexano, se evaporaron con nitrógeno gaseoso y se analizaron en un cromatógrafo de gases (VARIAN Mod. CP 3800, Agilent Technologies, Santa Clara, CA) acoplado a un detector de masas (VARIAN Mod. 1200, Agilent Technologies) y una columna capilar de sílica fundida (OMEGAWAXTM de 30 μm longitud \times 0.25 μm espesor \times 0.25 μm diámetro interno, Sigma-Aldrich).

Tabla I. Organismos seleccionados para análisis de ácidos grasos.

Muestreo	Condición gonádica	Sexo/Número
Noviembre 2008	Madurez	H3, M3
Febrero 2009	Posdesove	M3
	Desarrollo	M1, H2
Abril 2009	Inactivo	I3
	Desarrollo	M2,H1
Junio 2009	Madurez	H3
	Posdesove	M2, H1

H = hembra; M = macho; I = indiferenciado.

Los FAMES fueron posteriormente identificados y clasificados, de acuerdo a sus siglas en inglés, como: SAFA (ácidos grasos saturados, sin dobles enlaces), MUFA (ácidos grasos monoinsaturados, con un enlace doble), PUFA (ácidos grasos poli-insaturados, con dos o tres dobles enlaces), y HUFA (ácidos grasos poli-insaturados, con cuatro o más enlaces dobles) (Sargent, 1995). La concentración de FAMES se expresó como el porcentaje de cada ácido graso con respecto al total de FAMES.

6.4. Evaluación de indicadores de calidad larvaria

El segundo grupo de 20 organismos recolectados de cada uno de los cuatro muestreos, se utilizaron como reproductores y fueron inducidos a desovar para dar seguimiento al desarrollo larvario. Esto se llevó a cabo en el Laboratorio de Larvicultura de Moluscos del CIBNOR, de acuerdo a los procedimientos descritos por Martínez-Fernández *et al.* (2004), Saucedo *et al.* (2007) y Mazón-Suástegui *et al.* (2011).

6.4.1. Obtención de gametos y cultivo de larvas

Los reproductores colectados fueron inducidos a desovar por choque térmico con tres cambios, de 20–30 °C, de 30 minutos en cada temperatura. Los gametos de ambos sexos fueron obtenidos por separado en contenedores de 4 L de forma

individual e inmediatamente fecundados de forma controlada en contenedores de 200 L con agua de mar filtrada a 1 μm , cuidando de mantener una proporción esperma:óvulo de 10:1, aproximadamente. Los huevos fecundados fueron cultivados a una densidad de 40–50/mL en tanques cónicos de fibra de vidrio de 1500 L con agua de mar filtrada a 1 μm (22 ± 1 °C y 37 ± 1 ups). Aproximadamente 24 horas después de la fecundación, los tanques se drenaron colectando las larvas D que se colocaron por duplicado en tanques idénticos a los anteriores, a una densidad de 5–7 larvas/mL. Estas se alimentaron con una mezcla 1:1:1 (por número de células) de las microalgas *Isochrysis galbana*, *Pavlova salina* y *Chaetoceros calcitrans* (abril) y *Ch. gracilis* (junio), suministradas a una densidad de $20\text{--}30 \times 10^3$ cel/mL (día 1 al 10) y $30\text{--}40 \times 10^3$ cel/mL (después del día 11) (Saucedo *et al.*, 2007). Los tanques de cultivo fueron drenados, limpiados y rellenados con agua de mar limpia cada tercer día.

6.4.2. Crecimiento, supervivencia, y total de semillas fijadas

Durante los recambios de agua, las larvas fueron retenidas en un tamiz de 60 μm y colocadas en un contenedor de 10 L con agua de mar filtrada, con el fin de cuantificar la población total y estimar la supervivencia larvaria en cada grupo experimental y sus réplicas. Para esto se tomaron muestras por triplicado de 1 mL de cada grupo que fueron colocadas en una cámara Rafter para observación y conteo bajo el microscopio. En cada ocasión, las larvas fueron fotografiadas y las imágenes de tres diferentes campos al azar se incorporaron a una computadora para estimar el crecimiento en altura de la concha (μm) con ayuda de un sistema de análisis digital de imágenes (Image Pro Plus). A partir de la base de datos obtenida, se estimó la tasa diaria de crecimiento larvario de la siguiente manera:

$$\text{Tasa crecimiento (TC)} = (T_{\text{final}} - T_{\text{inicial}}) / t \dots \dots \dots (10)$$

donde, T = talla inicial y final del cultivo larvario y t = tiempo en días.

Cuando aproximadamente la mitad de la población larvaria alcanzó el estadio pedivéliger, las larvas (maduras e inmaduras) fueron transferidas a tanques de fijación idénticos a los de cultivo larvario, pero provistos de colectores artificiales para la fijación larvaria y obtención de semillas. Se utilizaron colectores de costal cebollero (tanto la bolsa contenedora como el sustrato interno), de color oscuro con el fin de maximizar el asentamiento larvario (Saucedo *et al.*, 2007) y permanecieron en los mismos tanques para permitir el crecimiento post-larvario (pre-engorda inicial) por dos semanas. Durante este periodo se proporcionó alimento *ad libitum* constituido por una mezcla de las microalgas *I. galbana*, *P. salina*, *Ch. calcitrans* y *Ch. gracilis*.

Al término de un periodo de quince días posteriores a la fijación, los colectores se extrajeron de los tanques y se colocaron en taras plásticas de 80 L para separar, de manera manual, la semilla fijada. Del total de semillas recuperadas se pesaron muestras de ~1 g, por triplicado, y de cada muestra se contó el número de semillas para estimar, por extrapolación, el total de semillas fijadas. Esto para estimar la eficiencia del proceso de fijación en cada grupo experimental, se tomó como referencia la cantidad inicial de larvas al momento de instalar los colectores para la fijación, así como la cantidad de semillas separadas al final de los mismos colectores.

6.4.3. Composición bioquímica y valores energéticos

Al inicio y final de los cultivos en los cuales fue posible obtener larvas, se tomaron muestras de dos estadios representativos véliger (inicio cultivo larvario) y pedivéliger (final cultivo larvario), para el análisis de su composición bioquímica (proteínas, carbohidratos y lípidos totales). Las muestras se mantuvieron congeladas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ y previo a los análisis bioquímicos, se realizaron pruebas preliminares para adaptar las técnicas descritas por Gireesh *et al.* (2009) para larvas de la almeja *Paphia malabarica*. Esto permitió ajustes a la técnica para disminuir inexactitud en los cambios bioquímicos debida a la presencia de la concha larvaria, que es una estructura dura, gruesa y difícil de eliminar, cuya composición compleja

(cristales de aragonita, calcita, carbonato de calcio, proteínas, agua y sales minerales) interfiere con la determinación de la composición bioquímica en larvas de moluscos (Fariás *et al.*, 1998; Gireesh *et al.*, 2009; Gagné *et al.*, 2010).

Una vez estandarizadas las técnicas bioquímicas, las muestras de larvas se filtraron, se lavaron con formato de amonio (HCOONH_4) para eliminar sales, se pesaron (0.001 g), liofilizaron (4000 rpm, 60 minutos, 5 °C), rehidrataron en 3 mL de solución salina fría al 35%, y se homogenizaron para obtener un extracto crudo. La determinación de proteínas totales, carbohidratos totales y lípidos totales se realizó siguiendo los procedimientos descritos en la sección 6.3.3, modificando únicamente las cantidades de muestra y de reactivos. Los resultados de cada componente bioquímico se expresaron en $\mu\text{g}/\text{larva}$.

Finalmente, se calcularon los equivalentes energéticos de las larvas véliger y pedivéliger mediante la pérdida de proteínas, carbohidratos y lípidos durante estas dos fases. Se emplearon los factores de conversión energética (20.0, 17.5 y 39.5 $\text{mJ}/\mu\text{g}$) propuestos por Brett y Groves (1979) y posteriormente utilizados en la almeja *P. malabarica* por Gireesch *et al.* (2009). Los datos se reportan en $\text{J}/\mu\text{g}/\text{larva}$.

6.5. Tratamiento estadístico de datos

Para inferir normalidad de los indicadores calculados en adultos (tallas, índices morfo-fisiológicos, composición bioquímica y proximal de gónada y tejidos somáticos) y análisis de ovocitos (talla, contenido de lípidos y carbohidratos) se aplicó la prueba Kolmogorov-Smirnov, junto con una prueba Lilliefors para confirmar homocedasticidad de varianzas. Con ello se determinó el tipo de pruebas estadísticas a utilizar (paramétricas o no paramétricas) (Sokal y Rohlf, 1981). Una vez confirmado lo anterior, se aplicaron ANOVAS de una vía para detectar diferencias significativas en los indicadores antes mencionados con respecto al tiempo (muestreos). Para detectar diferencias significativas entre los valores energéticos de gónada, glándula digestiva, manto y músculo en función del tiempo y desarrollo gonádico, se aplicaron ANOVAS de dos vías. En el caso de que existieran diferencias significativas se utilizó una prueba *post hoc* de Tukey para

comparación múltiple de medias. A su vez, se aplicaron análisis de correlación de Pearson para comprobar la fortaleza de las relaciones entre los siguientes indicadores: 1) IGS vs. ICG, IRM e IMA; 2) ICG, IGS, IMA, IRM vs. composición bioquímica de la gónada; 3) IGS vs. composición de ácidos grasos de la gónada; 4) talla de ovocitos vs. IL e IG.

A su vez, se aplicaron correlaciones de rangos de Spearman para establecer la relación entre la condición reproductiva (ICG, IGS, IRM, IMA, talla de ovocitos) y las variables ambientales (temperatura, salinidad, concentración de clorofila *a*, ST, SO, proteínas, carbohidratos y lípidos de seston, IA). Cuando fue necesario, es decir cuando los valores de los indicadores se representaban como porcentajes, los datos fueron transformados a la función *arcoseno*. Sin embargo, todos los datos se reportan como medias \pm error estándar sin transformar. Para el análisis estadístico se utilizó el software Statistica vers. 7.0 (Statsoft, Inc., Tulsa, OK). El nivel de significancia se fijó en $P < 0.05$ para todos los análisis y se reportan solo los datos significativos.

7. RESULTADOS

7.1. Dinámica ambiental

7.1.1. Temperatura, salinidad y concentración de clorofila a

Las variaciones promedio en la temperatura del agua fueron considerables durante el periodo de estudio (Fig. 2). A partir de noviembre 2008, se presentó la temperatura más cálida (26.2 °C), y se observó una tendencia a disminuir hasta alcanzar el valor más bajo (21.1 °C) en febrero 2009. En abril y junio del mismo año se presentó un ligero incremento en la temperatura del agua, de 21.8 a 22.5 °C (Fig. 2).

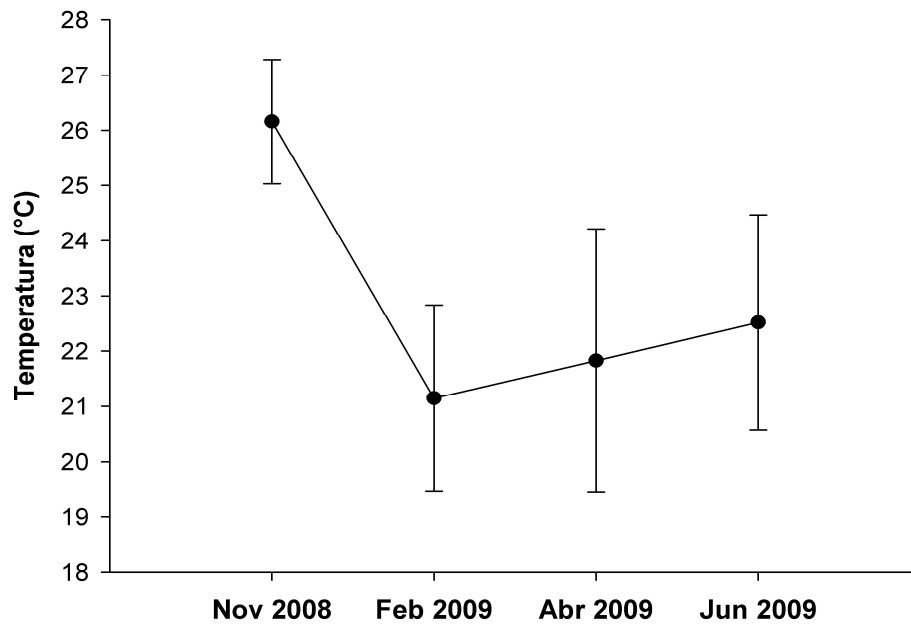


Figura 2. Temperatura promedio del agua de mar en Bahía de La Paz durante 2008-2009.

Se registraron ligeras fluctuaciones, de alrededor de 1 ups, en la salinidad del agua. El valor mínimo se registró en noviembre 2008 (35.8 ups) y el máximo en los meses de febrero y abril 2009 (~36.3 ups) (Fig. 3).

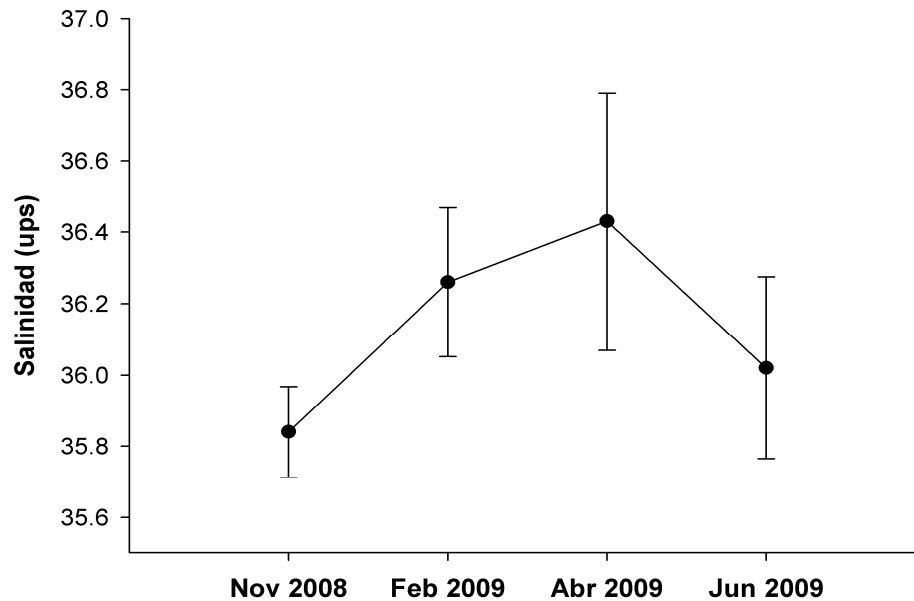


Figura 3. Salinidad promedio del agua de mar en Bahía de La Paz durante 2008–2009.

La concentración de clorofila *a* registró su valor más elevado en febrero 2009 (1.9 mg/ m³), mientras que la concentración más baja se registró en junio del mismo año (0.8 mg/m³) (Fig. 4). En noviembre 2008 y abril 2009 se mantuvo un valor entre 1.3–1.4 mg/m³.

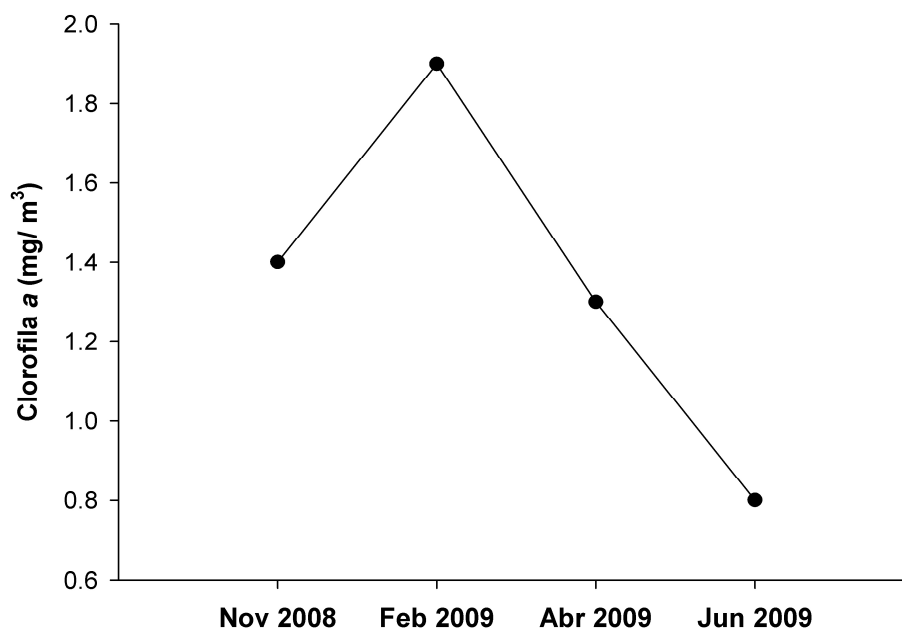


Figura 4. Concentración de clorofila *a* del agua de mar en Bahía de La Paz durante 2008–2009.

7.1.2. Análisis de la concentración de seston

Las variaciones promedio en la concentración de seston total (ST), seston inorgánico (SI) y seston orgánico (SO) registraron tendencias diferentes durante el período 2008–2009. La mayor concentración de ST ocurrió en abril 2009 (32.3 ± 0.2 mg/L) y la más baja en noviembre 2008 (20.8 ± 0.2 mg/L) (Fig. 5a). A su vez, se observó que la mayor parte del seston correspondió a SI, registrándose una tendencia similar a la del ST, con valores más elevados nuevamente en abril (29.1 ± 0.5 mg/L) y más bajos en noviembre (17.8 ± 0.1 mg/L) (Fig. 5b). Por su parte, el SO presentó los valores más elevados en febrero y abril 2009 (~ 3.2 mg/L) y los más bajos en noviembre 2008 (3.0 ± 0.1 mg/L) (Fig. 5c).

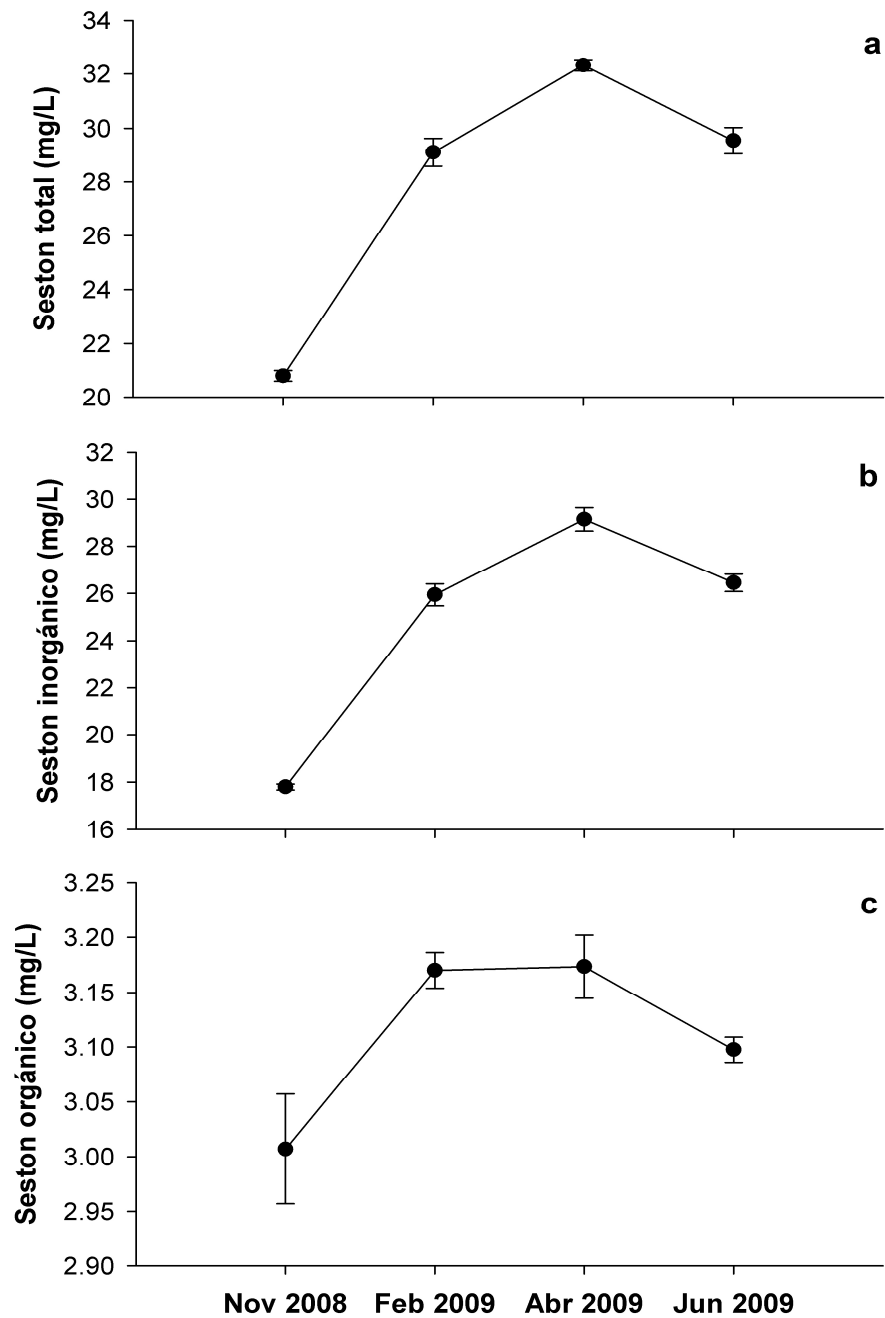


Figura 5. Valores promedio del seston total (a), orgánico (b) e inorgánico (c) en el agua de mar en Bahía de La Paz durante 2008–2009. Las barras representan el error estándar.

7.1.3. Análisis de la calidad del alimento

Con respecto a la dilución del seston, medido con la razón SI/SO, se registró el valor más bajo en noviembre 2008 (5.9) y el valor más alto en abril 2009 (9.2) (Fig. 6).

La concentración de proteínas del seston fue mínima en noviembre 2008 (93.7 $\mu\text{g/L}$), aumentó a >200 $\mu\text{g/L}$ en los meses de febrero y abril 2009 y alcanzó su máximo en junio del mismo año (301.1 $\mu\text{g/L}$) (Fig. 7a). Por su parte, la concentración de carbohidratos fue baja en noviembre (86.4 $\mu\text{g/L}$), elevada en abril (176.2 $\mu\text{g/L}$) y volvió a disminuir en junio del mismo año (157.9 $\mu\text{g/L}$). En el caso de los lípidos, no se presentó una variación marcada; la concentración más baja de este metabolito se registró en noviembre (49.6 $\mu\text{g/L}$) y la más elevada en abril (66.9 $\mu\text{g/L}$) (Fig. 7a).

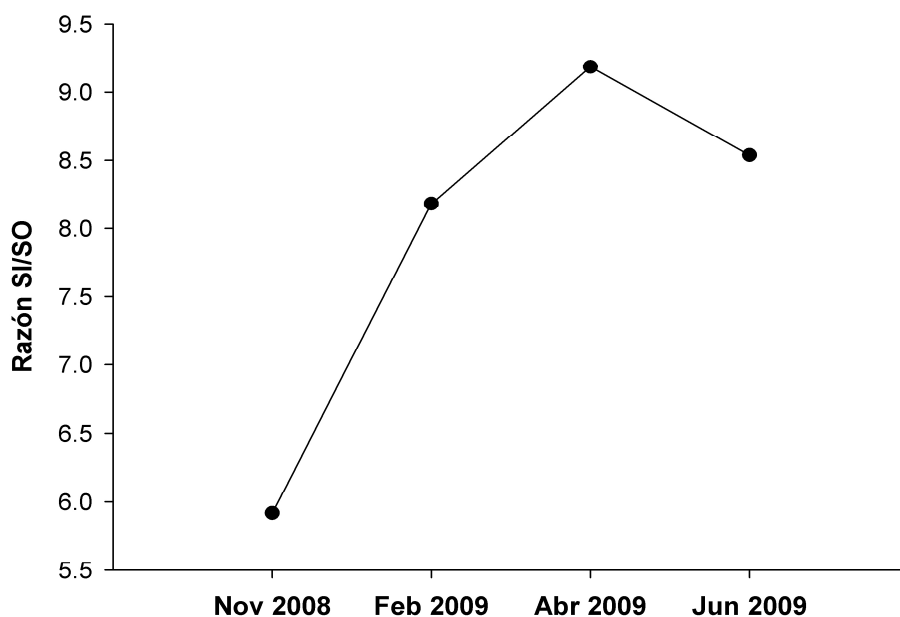


Figura 6. Razón SI/SO en el agua de Bahía de La Paz durante 2008–2009.

El mayor contenido energético del seston fue proporcionado por las proteínas en junio (7.1×10^{-3}), mientras que los carbohidratos, y en particular los lípidos, mostraron una tendencia más estable en el aporte energético durante el periodo de estudio (Fig. 7b).

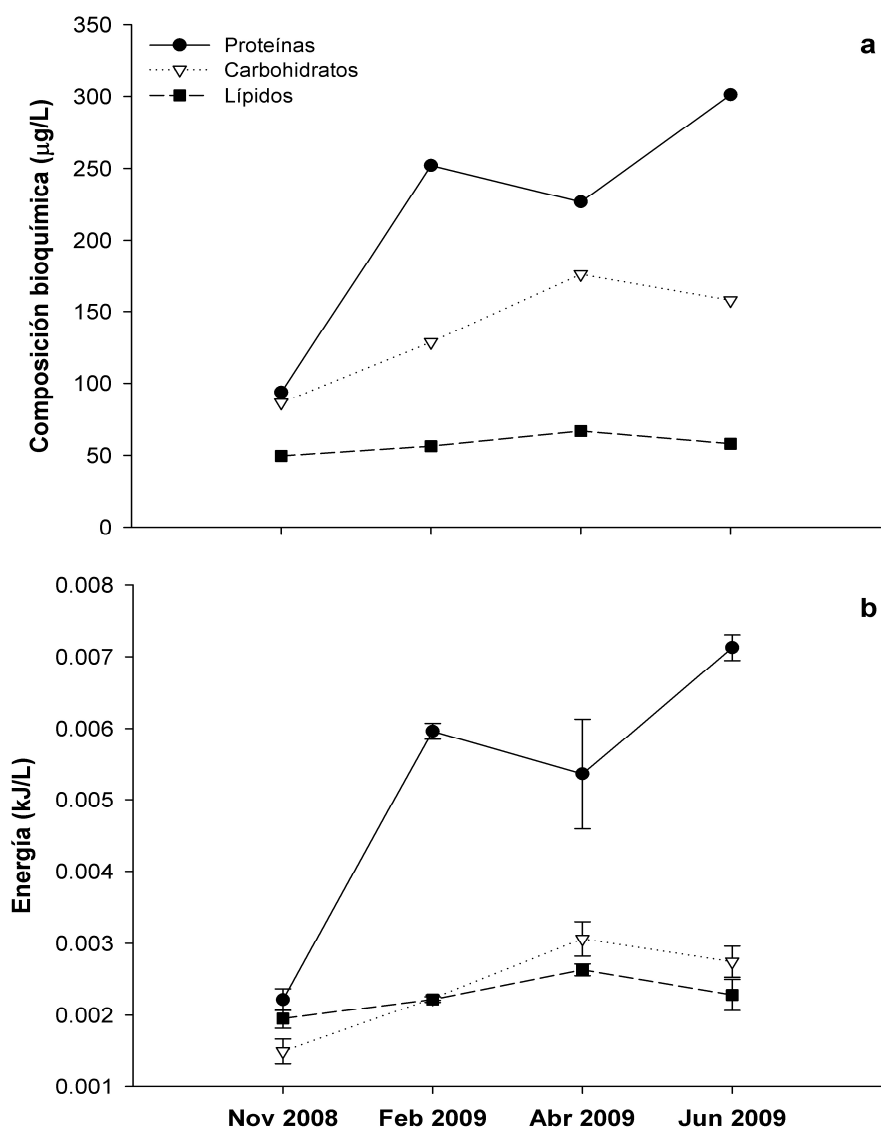


Figura 7. Contenido de proteínas, carbohidratos y lípidos (a), así como valores promedio de la energía contenida (b) en el agua de mar de Bahía de La Paz durante 2008–2009. Las barras representan el error estándar.

El índice alimenticio (IA) presentó un comportamiento similar al de la composición bioquímica (proteínas y carbohidratos en particular) del seston, lo cual es normal dado que la concentración de estos metabolitos fue mayor. Durante el periodo de estudio, los valores de IA aumentaron de 1.1 en noviembre a 1.5 en febrero y abril 2009 (1.5), con un pico en junio del mismo año (1.8) (Fig. 8). Por su parte, el material alimenticio, de mayor a menor orden, se registró durante junio (517.1 $\mu\text{g/L}$), abril (469.8 $\mu\text{g/L}$), febrero 2009 (436.9 $\mu\text{g/L}$), y noviembre 2008 (229.8 $\mu\text{g/L}$) (Fig. 8).

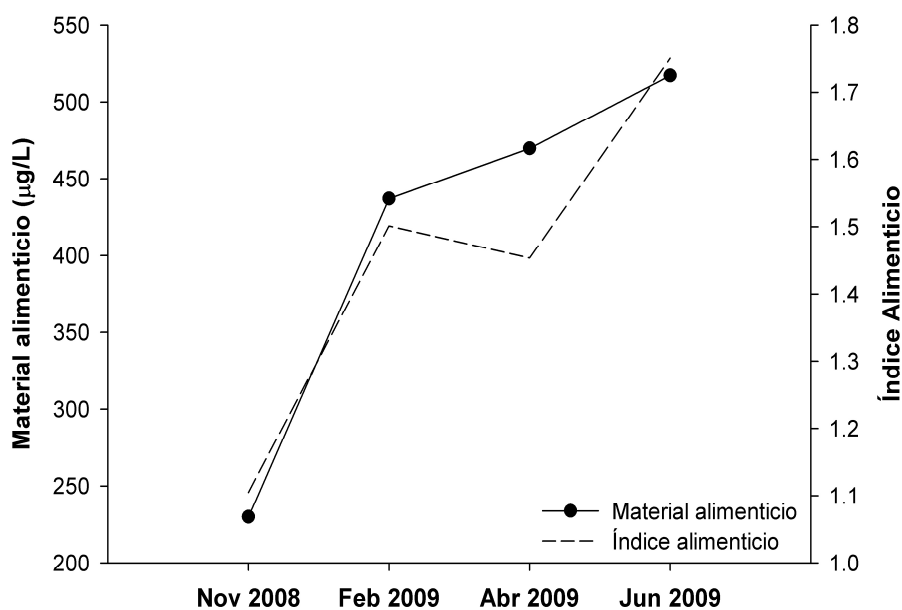


Figura 8. Índice alimenticio (IA) y material alimenticio en el agua de mar de Bahía de La Paz durante 2008–2009.

7.2. Indicadores de la calidad gonádica de adultos

7.2.1. Índices morfo-fisiológicos

El índice de condición general (ICG) presentó su valor mínimo en febrero ($11.4 \pm 0.6\%$) y abril 2009 ($11.6 \pm 0.6\%$), mientras que en junio del mismo año se registró el valor máximo ($20.3 \pm 0.7\%$) (Fig. 9). El índice gonadosomático (IGS)

presentó su valor más bajo en abril ($36.6 \pm 1.7\%$) y el más elevado en junio ($48.6 \pm 1.6\%$). En lo que respecta al IRM (índice de rendimiento muscular), los valores mínimo y máximo se presentaron en noviembre 2008 ($21.4 \pm 1.4\%$) y abril 2009 ($24.5 \pm 1.2\%$). Finalmente, el índice de manto (IMA) registró sus valores máximo y mínimo en abril ($38.9 \pm 1.0\%$) y junio ($28.4 \pm 1.1\%$), respectivamente (Fig. 9). Se detectaron diferencias significativas en los valores del ICG ($F = 41.3$), el IGS ($F = 7.7$) y el IMA ($F = 8.2$) en función del tiempo. Los valores del IRM no reflejaron diferencias significativas ($P > 0.05$) en el tiempo. Se detectaron correlaciones significativas entre el IGS vs. ICG ($r = 0.9$), IRM e IMA ($r = 0.8$, cada una).

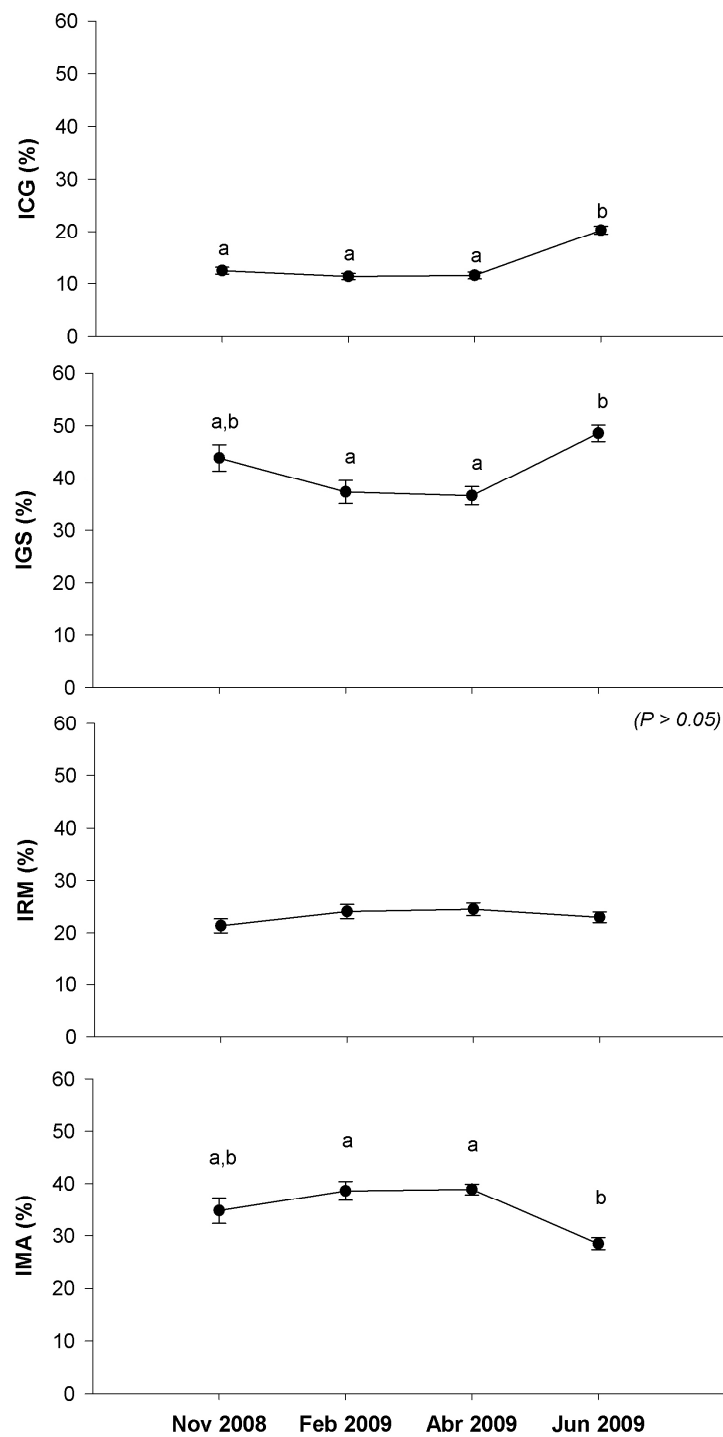


Figura 9. Valores promedio de los índices morfo-fisiológicos de *Pteria sterna* durante la temporada natural de maduración 2008–2009 en Bahía de La Paz. Las barras representan el error estándar. Letras sobre marcadores señalan diferencias significativas ($P < 0.05$).

7.2.2. Proporción sexual, estadios de desarrollo gonádico y análisis de ovocitos

El análisis histológico mostró un mayor número de machos (61.8%) que de hembras (26.3%), obteniéndose una proporción sexual global de 0.3 hembras por 0.6 machos (0.3:0.6). En la frecuencia de cada sexo se observó que durante todo el periodo de estudio los machos predominaron, particularmente durante febrero (80%) y junio (70%) 2009; mientras que la frecuencia de hembras se mantuvo baja sobretodo en febrero (15%) (Fig. 10). En general, los organismos indiferenciados sexualmente se mantuvieron poco durante el periodo de estudio; sin embargo, en abril se observó que los organismos indiferenciados y las hembras presentaron una frecuencia de aparición similar (31.6% en cada caso) (Fig. 10).

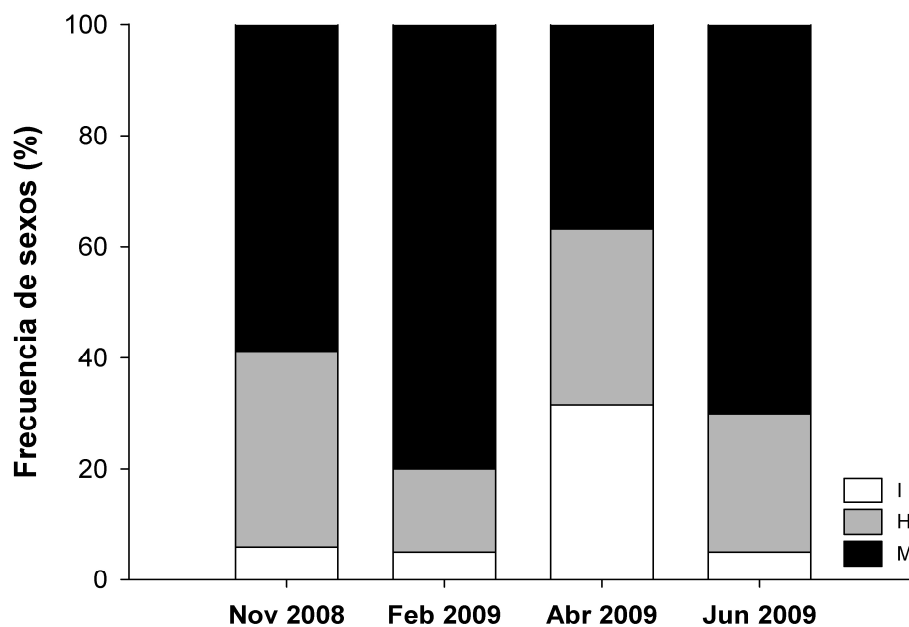


Figura 10. Frecuencia de sexos de *Pteria sterna* durante la temporada natural de maduración 2008–2009 en Bahía de La Paz. I = indiferenciados; H = hembras; M = machos.

En cuanto a los estadios de desarrollo gonádico, en febrero 2009 predominó la etapa de desarrollo (65%) (Fig. 11), mientras que la etapa de madurez estuvo bien caracterizada en noviembre 2008 (65%) y junio 2009 (40%). Se registraron dos eventos de desove durante febrero (5%) y junio (10%) 2009. La etapa de postdesove sí se presentó a lo largo del periodo de estudio, con una predominancia del 12% en abril (Fig. 11).

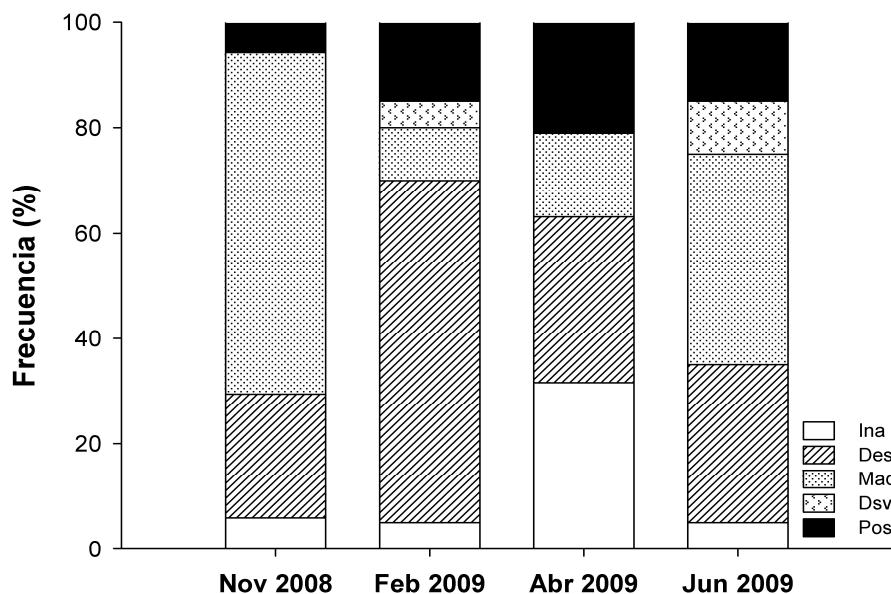


Figura 11. Etapas de desarrollo gonádico de *Pteria sterna* durante la temporada natural de maduración 2008–2009 en Bahía de La Paz. Ina = inactivo; Des= desarrollo; Mad= madurez; Dsv = desove; Pos = postdesove.

Con respecto al análisis de ovocitos, se observó que el valor del diámetro teórico (DT) registrado en noviembre 2008 ($39.7 \pm 0.3 \mu\text{m}$) disminuyó ligeramente hacia febrero 2009 ($36.6 \pm 1.1 \mu\text{m}$); en abril del mismo año se registró la talla más grande ($42.7 \pm 0.7 \mu\text{m}$) (Fig. 12). Estas variaciones fueron significativas ($F = 29.7$) en función del tiempo. Se encontró una correlación significativa directa entre el DT vs. el IL ($r = 0.8$), así como una correlación inversa entre el DT vs. IG ($r = -0.9$).

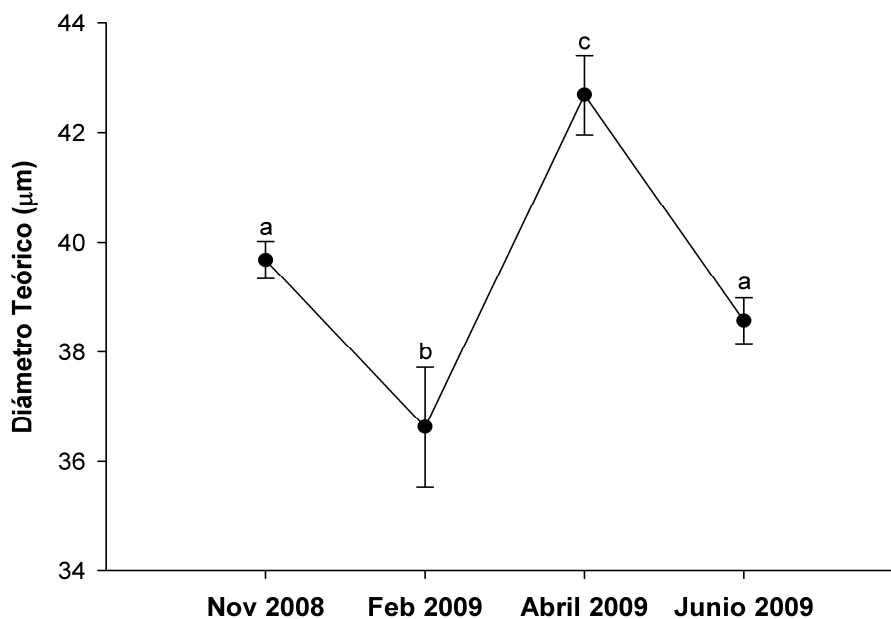


Figura 12. Diámetro teórico de los ovocitos de *Pteria sterna* durante la temporada natural de maduración 2008–2009 en Bahía de La Paz. Las barras representan el error estándar. Letras sobre marcadores señalan diferencias significativas ($P < 0.05$).

Las variaciones en la frecuencia de los diferentes tipos de ovocitos mostraron predominancia de ovocitos vitelogénicos y posvitelogénicos durante la temporada natural de maduración (Fig. 13). Los ovocitos vitelogénicos estuvieron presentes particularmente en junio 2009 (47%), en tanto que los ovocitos posvitelogénicos predominaron en abril del mismo año (81.9%). Por su parte, los ovocitos previtelogénicos fueron escasos (Fig. 13).

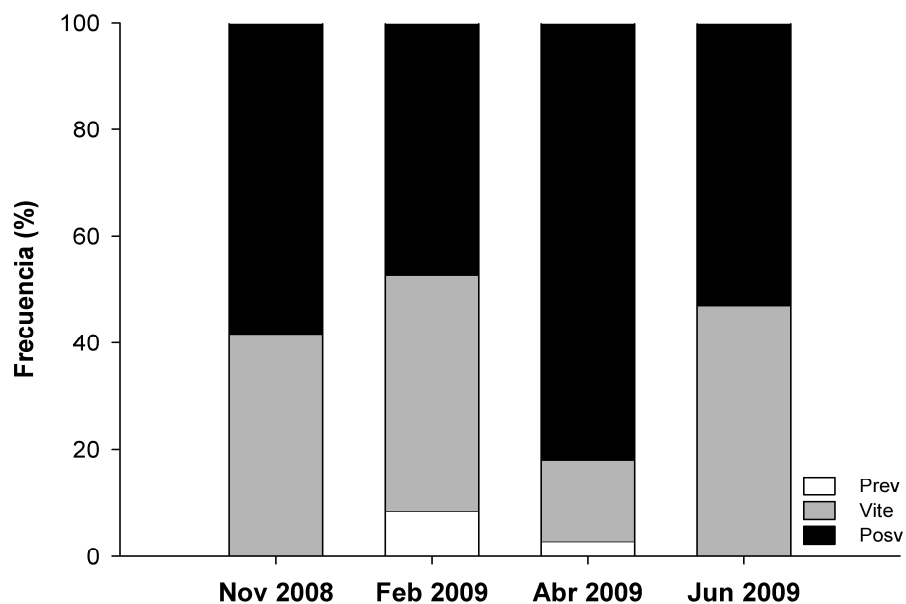


Figura 13. Frecuencia de aparición de los diferentes tipos de ovocitos en *Pteridaster sterna* durante la temporada natural de maduración 2008–2009 en Bahía de La Paz. Prev = previtelogénicos; Vite = vitelogénicos; Posv = posvitelogénicos.

En este estudio se pudieron distinguir los lípidos y carbohidratos en el vitelo de los ovocitos de *P. sterna* mediante las tinciones histoquímicas empleadas. Ambas técnicas, Sudan Negro B (Fig. 14a) y Azul Alciano-PAS, permitieron identificar los lípidos de reserva (triglicéridos) y los carbohidratos y mucopolisacáridos, respectivamente, de acuerdo a las tonalidades manejadas por el analizador de imágenes (Fig. 14b).

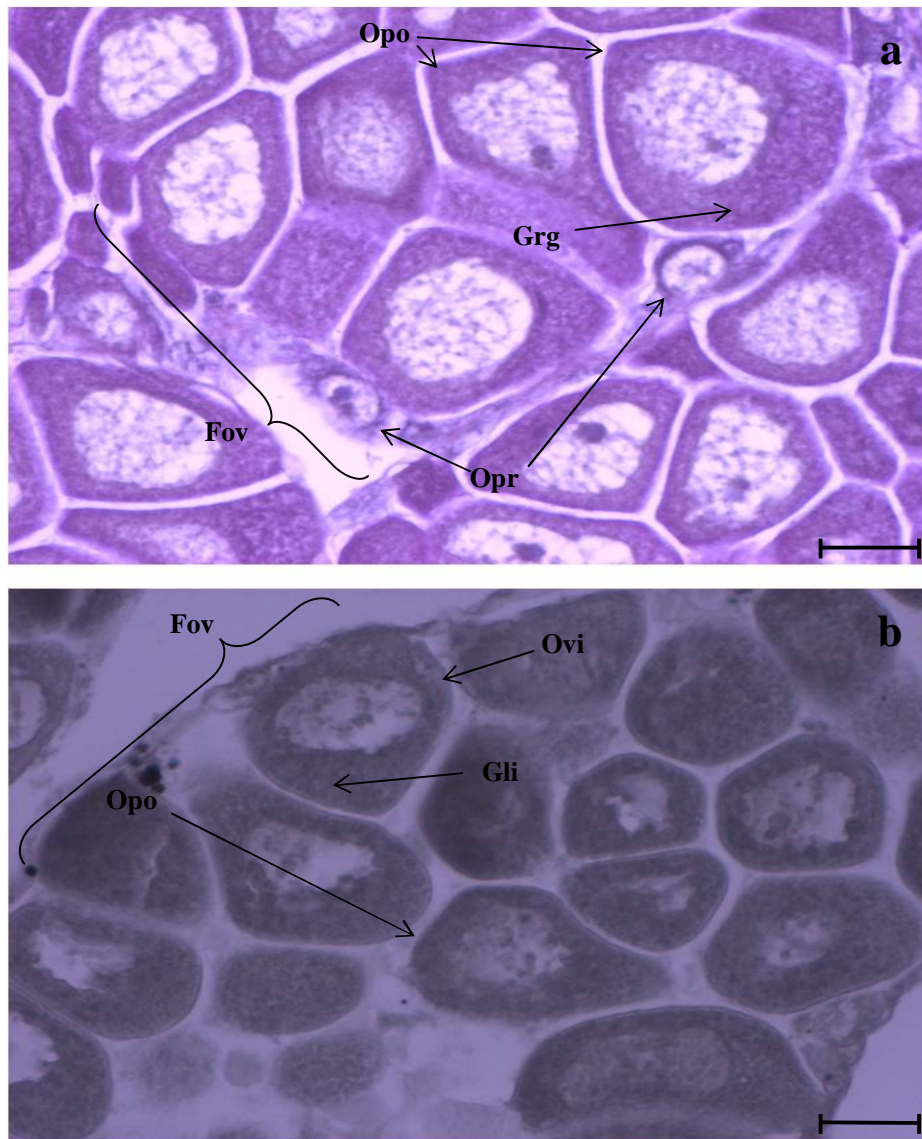


Figura 14. Microfotografía (40×) de un corte transversal de gónada de *Pteria sterna* teñida con Azul Alciano-PAS para identificación de carbohidratos (a) y Sudan Negro B para identificación de lípidos (b), mostrando los folículos ováricos (Fov), ovocitos previtelogénicos (Opr), ovocitos vitelogénicos (Ovi), ovocitos postvitelogénicos (Opo), gotas de lípidos (Gli) y gránulos de glucógeno (Grg). Escala = 100 μ m.

A lo largo del periodo de estudio, los valores del índice lipídico (IL) estuvieron por debajo de los valores del índice glucídico (IG). Los valores máximos del IL ($13 \pm 1.2\%$) e IG ($29 \pm 1.3\%$) se registraron en abril y junio 2009, respectivamente. Los valores mínimos de ambos indicadores ovocitarios se registraron al final (junio, IL = $6.7 \pm 0.5\%$) y al inicio (noviembre 2008, IG = 10.1 ± 0.6) (Fig. 15) del periodo de estudio. Estas variaciones fueron significativas en función del tiempo, tanto en el IL ($F = 9.9$), como en el IG ($F = 68.1$).

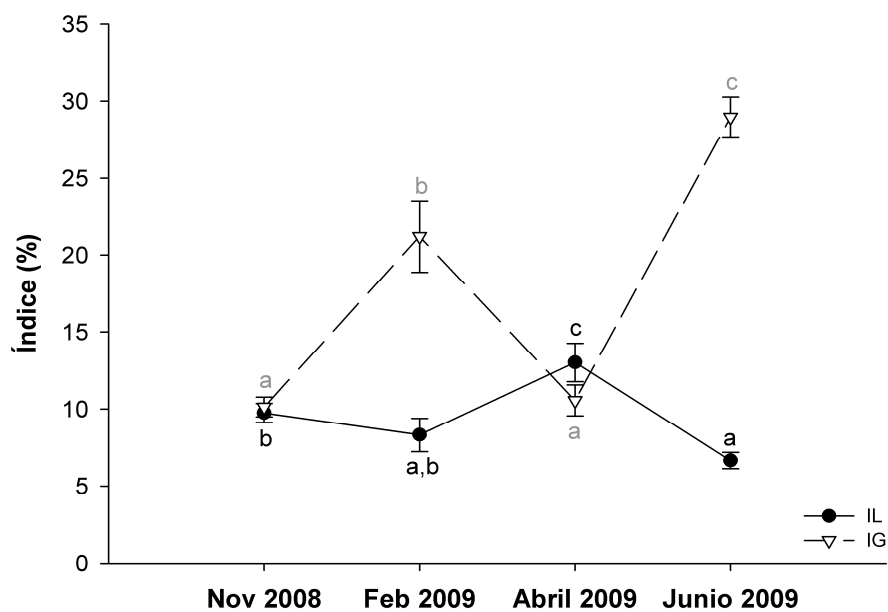


Figura 15. Valores promedio del índice lipídico (IL) e índice glucídico (IG) en los ovocitos de *Pteria sterna* durante la temporada natural de maduración 2008–2009 en Bahía de La Paz. Las barras representan el error estándar. Letras sobre/debajo marcadores (negro para IL, gris para IG) señalan diferencias significativas ($P < 0.05$).

7.2.3. Composición bioquímica de gónada y tejidos somáticos

En la gónada, la concentración más elevada de proteínas se registró en noviembre 2008 (238.6 ± 26.1 mg/g), mientras que la mínima se observó en junio 2009 (92 ± 18 mg/g) (Fig. 16). De carbohidratos, la concentración mínima y máxima se registraron en noviembre 2008 (17.8 ± 2 mg/g) y abril 2009 (60.1 ± 5.8 mg/g), respectivamente. Los lípidos y triglicéridos fueron más elevados en junio 2009 (153.3 ± 43 mg/g y 47 ± 15.3 mg/g, respectivamente) (Fig. 16). Se observaron diferencias significativas en los niveles de proteínas ($F = 4.4$), carbohidratos ($F = 15.1$), lípidos ($F = 15.7$) y triglicéridos ($F = 4.7$) en función del tiempo. Se registraron correlaciones significativas entre el ICG vs. contenido de lípidos y triglicéridos ($r = -0.7$, cada una).

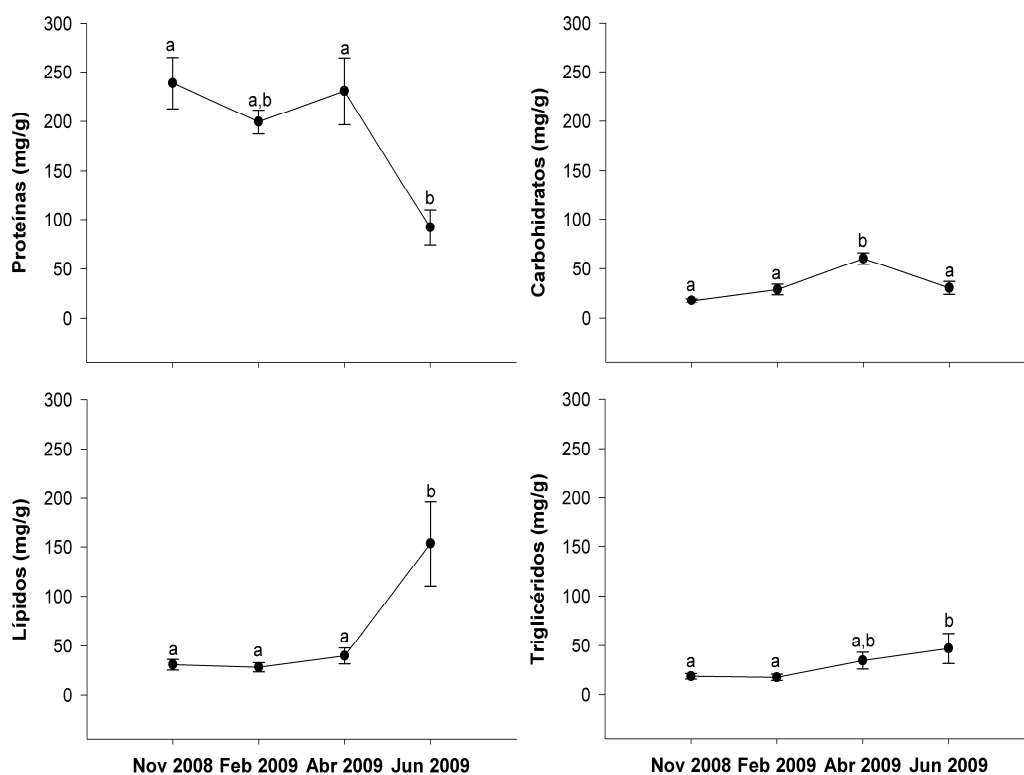


Figura 16. Composición bioquímica promedio de la gónada de *Pteria sterna* durante la temporada natural de maduración 2008–2009 en Bahía de La Paz. Las barras representan el error estándar. Letras sobre marcadores señalan diferencias significativas ($P < 0.05$).

En glándula digestiva, los carbohidratos registraron la menor concentración en comparación con los demás metabolitos (Fig. 17). El nivel máximo de carbohidratos se registró en junio 2009 (42.7 ± 5.2 mg/g) y el mínimo en noviembre 2008 (16.0 ± 1.2 mg/g). Por su parte, el nivel máximo de proteínas se registró en febrero 2009 (301.8 ± 16 mg/g) y el de lípidos y triglicéridos en junio del mismo año (lípidos: 295.3 ± 24.7 mg/g; triglicéridos: 78.4 ± 9.9 mg/g) (Fig. 17). Las variaciones en los niveles de proteínas ($F = 6.9$), carbohidratos ($F = 15.2$), lípidos ($F = 5.5$) y triglicéridos ($F = 4.9$) fueron significativas en función del tiempo ($P < 0.05$).

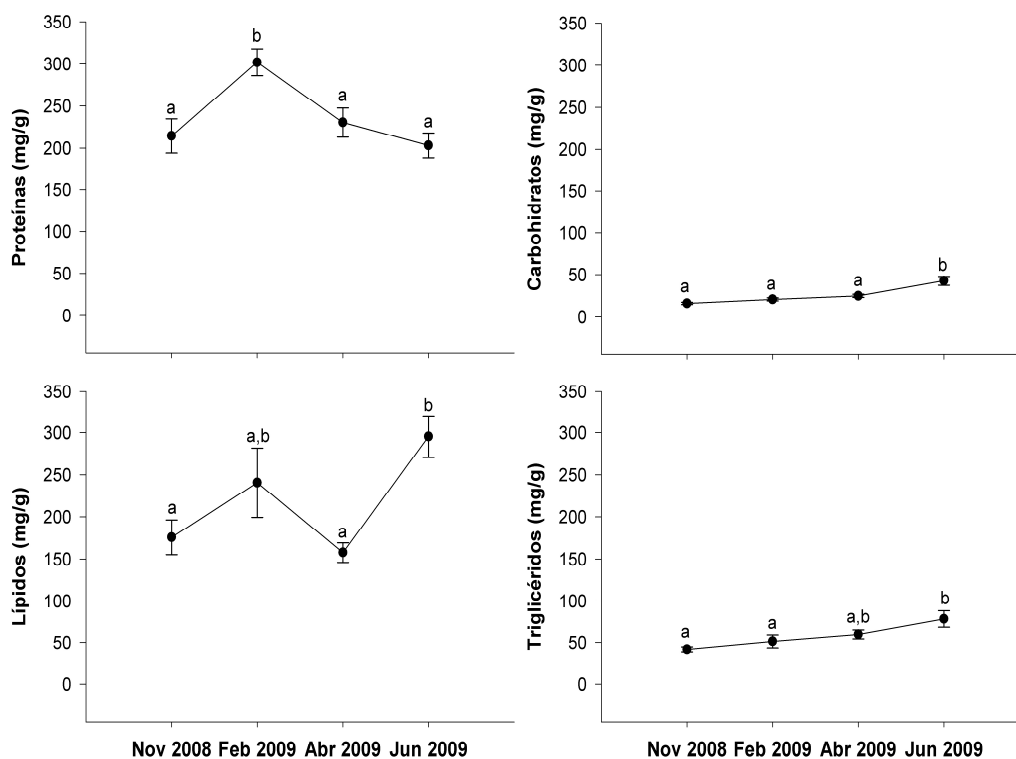


Figura 17. Composición bioquímica promedio de la glándula digestiva de *Pteria sterna* durante la temporada natural de maduración 2008–2009 en Bahía de La Paz. Las barras representan el error estándar. Letras sobre marcadores señalan diferencias significativas ($P < 0.05$).

La concentración de proteínas y carbohidratos en el músculo aductor fueron elevados en abril 2009 (419.6 ± 17.3 mg/g y 146.9 ± 14.9 mg/g, respectivamente) (Fig. 18). Por su parte, los niveles más altos de lípidos (18.3 ± 1.6 mg/g) y triglicéridos (9.5 ± 1.1 mg/g) se registraron en noviembre 2008 y febrero 2009, respectivamente (Fig. 18). Se encontraron diferencias significativas en los niveles de proteínas ($F = 55.7$), carbohidratos ($F = 17.2$), lípidos ($F = 23.2$) y triglicéridos ($F = 12.6$) en función del tiempo ($P < 0.05$).

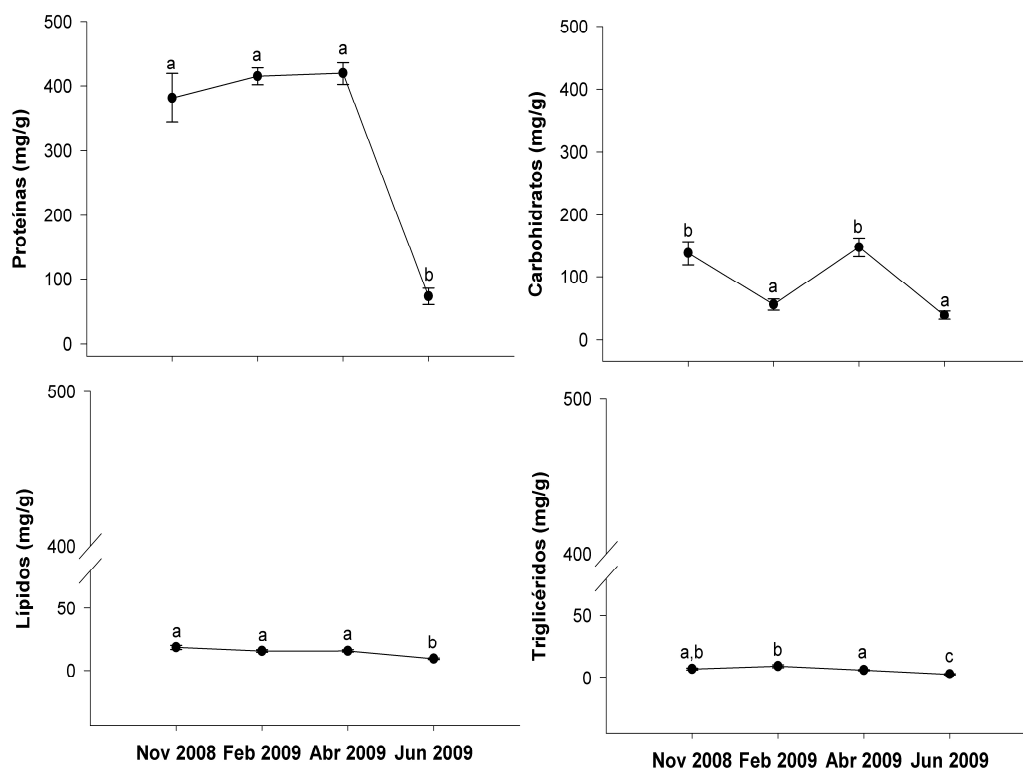


Figura 18. Composición bioquímica promedio del músculo aductor de *Pteria sterna* durante la temporada natural de maduración 2008–2009 en Bahía de La Paz. Las barras representan el error estándar. Letras sobre marcadores señalan diferencias significativas ($P < 0.05$).

En el manto, siguiendo el mismo patrón descrito anteriormente en músculo, las proteínas (509.6 ± 26.8 mg/g) y carbohidratos (45.0 ± 10.4 mg/g) mantuvieron sus niveles más altos en abril 2009 (Fig. 19); mientras que los niveles más bajos de ambos combustibles se observaron en junio del mismo año (proteínas: 200.6 ± 22.6 mg/g; carbohidratos: 13.7 ± 2 mg/g). Los niveles más elevados de lípidos (20.1 ± 2.1 mg/g) se registraron en junio 2009, mientras que el nivel más elevado de triglicéridos ocurrió en febrero 2009 (18.5 ± 1.4 mg/g) (Fig. 19). Las variaciones en los niveles de proteínas ($F = 30.7$) y carbohidratos ($F = 6.8$) fueron significativas en relación en el tiempo ($P < 0.05$), no así en los niveles de lípidos y triglicéridos ($P > 0.05$).

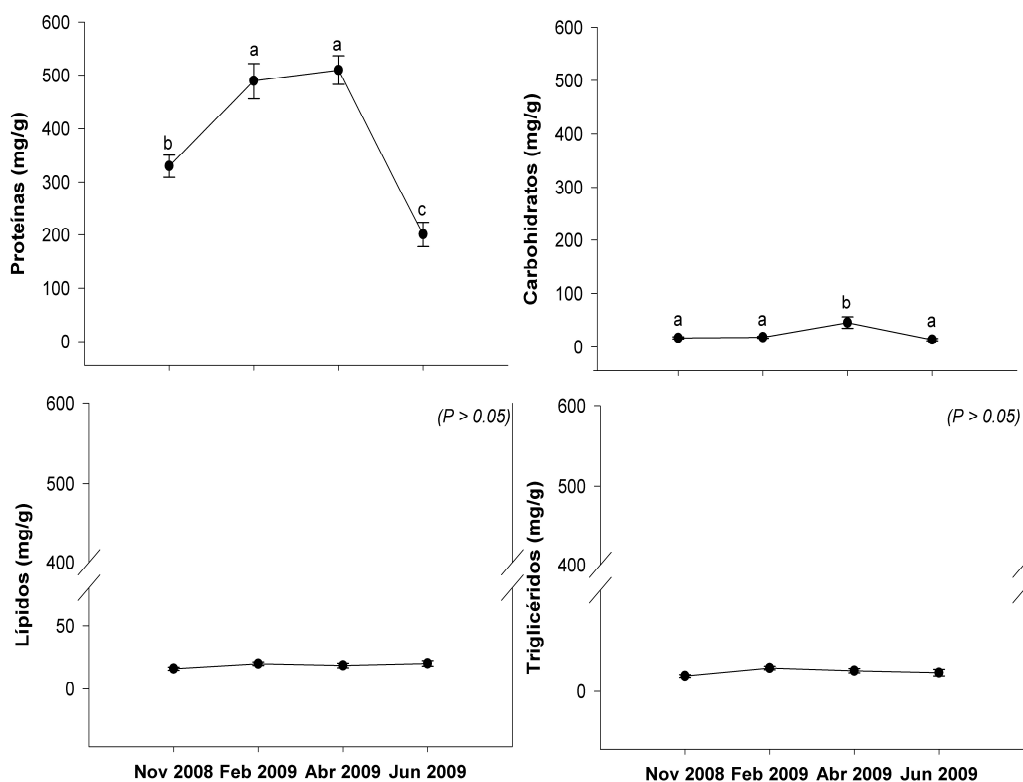


Figura 19. Composición bioquímica promedio del manto de *Pteria sterna* durante la temporada natural de maduración 2008–2009 en Bahía de La Paz. Las barras representan el error estándar. Letras sobre marcadores señalan diferencias significativas ($P < 0.05$).

7.2.4. Análisis energético de tejidos

En la Tabla II se presentan las variaciones promedio en el contenido energético de los diferentes metabolitos de la gónada y tejidos somáticos en *P. sterna* durante el periodo de estudio. En la gónada, el máximo contenido energético provino de las proteínas (11.9 kJ/g) en noviembre 2008, seguido de los lípidos (4.3 kJ/g) en junio 2009 (Tabla II). Se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) en el contenido energético de proteínas ($F = 4.3$), carbohidratos ($F = 14.3$) y lípidos ($F = 15.2$) en el tiempo.

Por su parte, en la glándula digestiva las proteínas aportaron la mayor cantidad de energía en febrero 2009 (15 kJ/g), seguido de los carbohidratos (12.5 kJ/g) en noviembre 2008. Se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) en el contenido energético de proteínas ($F = 6.9$), carbohidratos ($F = 83.9$) y lípidos ($F = 5.5$) en el tiempo.

En el músculo aductor, las proteínas aportaron más energía (20.9 kJ/g) en abril 2009, seguidos de los carbohidratos (8.5 kJ/g) en el mismo mes. Se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) en el contenido energético de proteínas ($F = 55.7$), carbohidratos ($F = 17.2$) y lípidos ($F = 11.7$) en el tiempo.

Finalmente, en el manto el máximo contenido energético provino de las proteínas (25.4 kJ/g) en abril 2009 (Tabla II). Se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) en el contenido energético de proteínas ($F = 30.7$) y carbohidratos ($F = 6.7$) con respecto al tiempo, no así en el de los lípidos ($P > 0.05$).

Tabla II. Contenido energético de la gónada y tejidos somáticos de *Pteria sterna* durante la temporada natural de maduración 2008–2009 en Bahía de La Paz.

		Noviembre 2008	Febrero 2009	Abril	Junio
Gónada		kJ/g			
	Pro	11.9 ^a	9.9 ^{a,b}	11.5 ^a	4.6 ^b
	Car	1.0 ^a	1.7 ^a	3.5 ^b	1.8 ^a
	Lip	0.9 ^a	0.8 ^a	1.1 ^a	4.3 ^b
Glándula digestiva		kJ/g			
	Pro	10.7 ^a	15.0 ^b	11.5 ^a	10.1 ^a
	Car	12.5 ^b	1.2 ^a	1.4 ^a	2.5 ^a
	Lip	5.0 ^a	6.8 ^{a,b}	4.4 ^a	8.3 ^b
Músculo aductor		kJ/g			
	Pro	19.0 ^a	20.6 ^a	20.9 ^a	3.7 ^b
	Car	8.0 ^b	3.3 ^a	8.5 ^b	2.3 ^a
	Lip	0.5 ^a	0.4± ^a	0.4 ^a	0.3 ^b
Manto		kJ/g			
	Pro	16.4 ^c	23.1 ^a	25.4 ^a	10.0 ^b
	Car	1.0 ^a	1.0 ^a	2.6 ^b	0.8 ^a
	Lip	0.4	0.5	0.5	0.6

Letras en superíndice indican las diferencias significativas ($P < 0.05$). Pro = proteínas; Car = carbohidratos; Lip = lípidos.

7.2.5. Análisis energético con relación al desarrollo gonádico

Las variaciones en los valores energéticos por metabolito de acuerdo al desarrollo gonádico se muestran en la Tabla III. En la gónada, el contenido energético de las proteínas aumentó desde la etapa de inactividad hasta madurez (8.5 a 9.8 kJ/g) para después disminuir durante el desove (2.4 kJ/g). Sin embargo, el mayor contenido de energía de este metabolito se registró durante el posdesove (11.4 kJ/g). En lo que respecta al contenido energético de carbohidratos, éste fue mayor durante las etapas de inactividad gonádica (2.5 kJ/g) y posdesove (2.3 kJ/g); mientras que el menor valor (de carbohidratos) se registró durante la etapa de desove (1 kJ/g).

En glándula digestiva, el contenido energético de proteínas fue relativamente constante, registrándose el mayor contenido durante el desove (9.9 kJ/g). Por su parte, los carbohidratos presentaron su máximo y mínimo contenido energético durante las etapas de madurez (6.7 kJ/g), desove y posdesove (~2.0 kJ/g, cada uno). El contenido energético de lípidos incrementó desde el estadio de inactividad gonádica (5.1 kJ/g) hasta el desove (7.4 kJ/g), para disminuir durante la etapa de posdesove (5.5 kJ/g) (Tabla III).

En músculo aductor, el contenido energético de proteínas disminuyó desde la inactividad gonádica (16.3 kJ/g) hasta la fase de desove (7.6 kJ/g) para volver a incrementar durante el posdesove (18.5 kJ/g). Los carbohidratos registraron un decremento en su contenido energético entre las etapas de inactividad gonádica (5.2 kJ/g) y desarrollo (4.6 kJ/g). Durante la etapa de madurez se registró el mayor contenido de energía de carbohidratos (6.3 kJ/g). Por su parte, el contenido energético de lípidos fue bajo en general, con un incremento de 0.4 kJ/g a 1.7 kJ/g de la inactividad gonádica al desarrollo, respectivamente. El contenido de energía lipídica entre las etapas de madurez y posdesove fue similar (~1.4 kJ/g) (Tabla III).

Finalmente, en el manto el contenido de energía protéica se incrementó de 18.3 kJ/g durante la inactividad gonádica, hasta un 19.3 kJ/g en la etapa de desarrollo. Este valor disminuyó durante las etapas de madurez y desove, para nuevamente

incrementar en el posdesove (18.1 kJ/g). El contenido energético de carbohidratos disminuyó de 2.5 kJ/g a 1.1 kJ/g durante las etapas de inactividad hasta madurez, respectivamente; el máximo contenido energético de carbohidratos se registró durante el desove (1.7 kJ/g). Por último, el contenido energético de lípidos fue relativamente bajo, registrándose el mayor contenido durante la inactividad gonádica y la madurez (~1.6 kJ/g, cada uno) (Tabla III).

En ningún caso se detectaron diferencias significativas en los valores energéticos y el desarrollo gonádico ($P > 0.05$).

Tabla III. Contenido energético por fase de desarrollo gonádico de *Pteria sterna* durante la temporada natural de maduración 2008–2009 en Bahía de La Paz.

		Gónada				
		<i>Ina</i>	<i>Des</i>	<i>Mad</i>	<i>Dsv</i>	<i>Pos</i>
Pro		8.5	8.8	9.8	2.4	11.4
Car		2.5	1.6	1.5	1.0	2.3
Lip		0.7	1.0	1.7	1.4	0.6
		Glándula digestiva				
		<i>Ina</i>	<i>Des</i>	<i>Mad</i>	<i>Dsv</i>	<i>Pos</i>
Pro		11.7	12.5	11.0	9.9	10.2
Car		5.8	3.3	6.7	2.0	2.0
Lip		5.1	6.4	6.3	7.4	5.5
		Músculo aductor				
		<i>Ina</i>	<i>Des</i>	<i>Mad</i>	<i>Dsv</i>	<i>Pos</i>
Pro		16.3	15.9	13.0	7.6	18.5
Car		5.2	4.6	6.3	1.4	5.9
Lip		0.4	1.7	1.4	0.5	1.5
		Manto				
		<i>Ina</i>	<i>Des</i>	<i>Mad</i>	<i>Dsv</i>	<i>Pos</i>
Pro		18.3	19.3	15.6	12	18.1
Car		2.5	1.4	1.1	1.7	1.2
Lip		1.7	0.7	1.6	0.4	0.5

Pro = proteínas; Car = carbohidratos; Lip = lípidos; Ina = inactivo; Des = desarrollo; Mad = madurez; Dsv = desove; Pos = posdesove.

7.2.6. Análisis proximal de tejidos (ácidos grasos)

Se detectaron un total de 39 ácidos grasos en los tejidos de *P. sterna*, pero para efectos de representatividad por significancia, solamente se reportan los datos correspondientes a 22 ácidos grasos cuya representatividad fue $>0.5\%$ (Tabla IV).

En la gónada, los porcentajes de las diferentes clases de ácidos grasos de *P. sterna* se muestran en la Tabla IV. Los ácidos grasos saturados (SAFA) registraron su concentración más elevada ($46.4 \pm 5.2\%$) en noviembre 2008, misma que disminuyó ligeramente hacia febrero y abril 2009, para nuevamente incrementarse ($44.1 \pm 4.5\%$) en junio del mismo año. Los HUFA mostraron una tendencia opuesta, ya que su concentración más elevada se registró en febrero ($37.5 \pm 3.9\%$) y abril 2009 ($33.1 \pm 4.1\%$), mientras que la concentración fue menor en noviembre ($24.2 \pm 4.0\%$) y junio 2009 ($26.1 \pm 3.9\%$). Los MUFA y PUFA presentaron bajos porcentajes durante todo el periodo de estudio.

De los ácidos grasos esenciales, las concentraciones más importantes correspondieron al ácido graso docosahexaenoico o DHA (22:6n3) en febrero 2009 ($14.8 \pm 1.4\%$). Por su parte, el ácido eicosapentaenoico o EPA (20:5n3) registró su máximo valor en junio 2009 ($13.7 \pm 2.3\%$) (Tabla IV). Se encontraron correlaciones significativas entre el IGS vs. el ácido merístico (14:0) y el ácido palmítico (16:0) ($r = 0.8$, cada una).

Tabla IV. Concentración (media \pm error estándar) del total de ácidos grasos (%) de gónada y tejidos somáticos de *Pteria sterna* durante la temporada natural de maduración 2008–2009 en Bahía de La Paz.

	2008		2009	
	Noviembre	Febrero	Abril	Junio
GÓNADA				
Σ SAFA	46.4 \pm 5.2	36.3 \pm 2.5	37.8 \pm 3.4	44.1 \pm 4.5
Σ MUFA	15.4 \pm 3.3	11.8 \pm 1.4	15.9 \pm 3.0	17.4 \pm 2.0
Σ PUFA	9.4 \pm 2.0	9.0 \pm 2.2	8.4 \pm 1.9	6.8 \pm 2.3
Σ HUFA	24.2 \pm 4.0	37.5 \pm 3.9	33.1 \pm 4.1	26.1 \pm 3.9
20:4n6	3.9 \pm 0.5	4.4 \pm 0.2	5.8 \pm 0.5	1.9 \pm 0.2
20:5n3	8.0 \pm 1.5	13.5 \pm 1.6	13.3 \pm 2.0	13.7 \pm 2.3
22:6n3	9.7 \pm 1.4	14.8 \pm 1.4	9.0 \pm 0.8	7.2 \pm 1.0
GLÁNDULA DIGESTIVA				
Σ SAFA	40.7 \pm 5.1	36.2 \pm 1.7	36.9 \pm 2.3	37.8 \pm 2.2
Σ MUFA	12.4 \pm 3.1	9.2 \pm 1.2	12.4 \pm 2.2	11.4 \pm 1.7
Σ PUFA	9.3 \pm 3.1	11.2 \pm 1.3	12.6 \pm 1.7	11.1 \pm 1.7
Σ HUFA	29.8 \pm 5.5	38.2 \pm 2.6	33.3 \pm 2.1	34.1 \pm 3.0
20:4n6	4.5 \pm 0.9	4.9 \pm 0.2	6.0 \pm 0.4	4.0 \pm 0.3
20:5n3	8.4 \pm 1.2	9.0 \pm 0.7	9.7 \pm 0.3	9.8 \pm 1.0
22:6n3	13.8 \pm 2.5	20.2 \pm 1.2	12.8 \pm 0.8	16.4 \pm 1.1
MÚSCULO ADUCTOR				
Σ SAFA	39.9 \pm 3.9	37.2 \pm 1.3	38.0 \pm 2.1	37.3 \pm 1.2
Σ MUFA	11.1 \pm 2.2	9.9 \pm 0.6	9.1 \pm 0.9	10.6 \pm 1.1
Σ PUFA	11.6 \pm 2.2	12.2 \pm 0.7	12.4 \pm 1.0	11.9 \pm 0.8
Σ HUFA	37.7 \pm 3.8	39.0 \pm 1.8	38.9 \pm 1.6	38.6 \pm 1.7
20:4n6	5.3 \pm 0.6	5.0 \pm 0.2	6.3 \pm 0.2	4.2 \pm 0.2
20:5n3	10.0 \pm 1.0	9.7 \pm 0.4	8.4 \pm 0.4	9.2 \pm 0.6
22:6n3	18.4 \pm 1.9	19.9 \pm 1.0	19.2 \pm 0.5	20.6 \pm 0.5
MANTO				
Σ SAFA	40.4 \pm 12.7	49.9 \pm 15.4	37.4 \pm 1.8	43.3 \pm 12.6
Σ MUFA	11.7 \pm 2.4	9.6 \pm 2.2	8.2 \pm 0.4	8.8 \pm 1.1
Σ PUFA	19.0 \pm 6.9	14.9 \pm 2.9	15.4 \pm 0.7	19.6 \pm 19.6
Σ HUFA	46.7 \pm 18.1	49.4 \pm 10.5	38.8 \pm 1.1	40.3 \pm 12.9
20:4n6	3.9 \pm 1.0	5.6 \pm 0.7	7.4 \pm 0.2	5.7 \pm 0.6
20:5n3	6.6 \pm 1.7	8.1 \pm 1.6	6.6 \pm 1.5	2.2 \pm 0.1
22:6n3	13.4 \pm 3.2	24.7 \pm 1.4	19.4 \pm 0.5	15.8 \pm 6.6

SAFA = ácidos grasos saturados; MUFA = ácidos grasos monoinsaturados; PUFA = ácidos grasos poliinsaturados; HUFA = ácidos grasos altamente insaturados; 20:4n6 = ácido araquidónico; 20:5n3 = ácido eicosapentanoico; 22:6n3 = ácido docosahexaenoico.

En glándula digestiva, los ácidos grasos predominantes fueron los saturados (SAFA), particularmente en noviembre 2008 ($40.7 \pm 5.1\%$), mientras que los PUFA presentaron los menores porcentajes en este mismo mes ($9.3 \pm 3.1\%$). Los HUFA por su parte presentaron un porcentaje elevado en febrero 2009 ($38.2 \pm 2.6\%$), y de estos el DHA mantuvo una concentración importante a lo largo del periodo de estudio, particularmente en febrero ($20.2 \pm 1.2\%$). En el caso del EPA, la máxima concentración se registró en junio 2009 ($9.8 \pm 1.0\%$). Finalmente, el ARA presentó las menores concentraciones ($\sim 4.8\%$) a lo largo de todo el estudio (Tabla IV).

En músculo aductor, los MUFA y PUFA presentaron las menores concentraciones a lo largo del estudio, sin embargo se observó una tendencia opuesta entre ambos grupos de ácidos grasos: los MUFA presentaron las mínimas concentraciones en febrero ($9.9 \pm 0.6\%$) y abril ($9.1 \pm 0.9\%$) 2009, mientras que en estos mismos periodos se registraron las mayores concentraciones de PUFA ($12.2 \pm 0.7\%$ en febrero, y $12.4 \pm 1.0\%$ en abril). Las concentraciones más elevadas correspondieron a los SAFA en noviembre 2008 ($39.9 \pm 3.9\%$) y HUFA en abril 2009 ($39.0 \pm 1.8\%$). Dentro de los HUFA, la mayor concentración correspondió al DHA, particularmente en junio ($20.6 \pm 0.5\%$), en tanto que el ARA fue el ácido graso esencial con menores concentraciones ($4.2 \pm 0.2\%$).

Finalmente, en manto las máximas concentraciones correspondieron a los SAFA ($49.9 \pm 15.4\%$) y HUFA ($49.4 \pm 10.5\%$), ambos en febrero 2009 (Tabla IV). De los ácidos grasos esenciales, nuevamente el DHA presentó las mayores concentraciones ($24.7 \pm 1.4\%$, en febrero), mientras que el EPA ($2.2 \pm 0.1\%$, en junio 2009) y el ARA ($3.9 \pm 1.0\%$, en noviembre 2008) mantuvieron bajas concentraciones a lo largo del periodo de estudio. Los PUFA y MUFA presentaron las menores concentraciones, particularmente durante febrero ($14.9 \pm 2.9\%$) y abril ($8.2 \pm 0.4\%$) 2009, respectivamente.

En lo que respecta a la condición reproductiva de *P. sterna*, en la Tabla V se presentan las correlaciones detectadas entre las variables ambientales sobre los

diferentes indicadores evaluados en adultos (índices morfo-fisiológicos y talla de ovocitos).

Tabla V. Análisis de correlación de Spearman entre las variables ambientales vs. índices morfo-fisiológicos y talla de ovocitos de *Pteria sterna*.

	ICG	IGS	IRM	IMA	Talla ovocitos
Temperatura	-0.6	-0.6	0.15	0.6	0.22
Salinidad	0.6	0.6	-0.19	-0.7	0.01
Clorofila <i>a</i>	0.9	0.7	-0.01	-0.7	-0.43
ST	-0.11	0.07	-0.14	-0.06	0.29
SO	0.6	0.7	-0.19	-0.7	0.01
Pro seston	-0.8	-0.22	-0.03	0.6	-0.16
Car seston	-0.11	0.07	-0.14	-0.06	0.29
Lip seston	-0.11	0.07	-0.14	-0.06	0.29
IA	0.8	0.22	0.03	-0.6	0.16

Valores significativos se indican en negritas. ICG = índice de condición general; IGS = índice gonadosomático; IRM = índice de rendimiento muscular; IMA = índice de manto; ST = seston total; SO = seston orgánico; Pro = proteínas; Car = carbohidratos; Lip = lípidos; IA = índice alimenticio.

7.3. Indicadores de calidad larvaria

7.3.1. Inducción al desove

Las inducciones al desove por choque térmico resultaron positivas en tres de cuatro ocasiones, en febrero (invierno, 4 machos y 2 hembras) y en abril y junio 2009 (primavera y verano, 2 machos y 1 hembra en cada caso). La respuesta al desove fue únicamente negativa en noviembre 2008 (otoño). De los casos positivos, solamente las larvas obtenidas en primavera (abril) fueron viables y tuvieron el suficiente vigor (reservas energéticas del vitelo) para completar el desarrollo, alcanzar la metamorfosis

y fijación. Las ostras recolectadas en junio 2009 (fin de primavera), también presentaron gónadas cuya condición permitió dar seguimiento a unas pocas larvas, no obstante éstas no completaron su desarrollo al día 23 de cultivo. Las ostras colectadas en noviembre 2008 y febrero de 2009 no permitieron obtener larvas.

7.3.2. Supervivencia, crecimiento absoluto y fijación de semilla

La supervivencia larvaria fue de ~22% en abril y 10% en junio, al día 11 en ambos cultivos. Hacia el final del cultivo se registró una supervivencia mayor en abril (2% al día 23) y menor en junio (0.015% al día 21 de cultivo) (Fig. 20). En cuanto a la talla, durante el estadio véliger las larvas tenían una altura promedio de la concha de 40 μm , tanto en abril como en junio. Sin embargo, al final del cultivo, las larvas alcanzaron tallas más altas en abril (>200 μm) que en junio (~180 μm) (Fig. 21).

La tasa de crecimiento larvario fue ligeramente mayor en abril 2009 (7 $\mu\text{m}/\text{día}$) que en junio 2009 (6.7 $\mu\text{m}/\text{día}$). Sin embargo, solamente en abril se tuvo una buena cantidad de larvas (~184 000) con presencia de mancha ocular y pie activo, aptas para superar la etapa de fijación, la cual ocurrió al día 23. Mientras que en junio se produjeron pocas larvas (~1 000 al día 21 de cultivo), mismas que no completaron la metamorfosis y fijación.

Transcurridos quince días de la transferencia, de las larvas cultivadas en abril, a los tanques de fijación que contenían los colectores, se separó la semilla y se determinó el peso húmedo total de la semilla fijada (83.6 g), a partir de muestras de 1.2 g (por triplicado), y se contabilizó un total de ~17 068 semillas (17×10^3).

Esta semilla fue trasladada en húmedo a un núcleo de cultivo extensivo (instalación de cultivo submarino) localizado en la Caleta El Merito, B.C.S., para su cultivo en campo. Para evitar pérdidas debidas al tamaño de la semilla, ésta se colocó en bolsas de siembra (hechas de malla tipo mosquitera) dentro de canastas ostrícolas (Nestier), formando módulos de 5–6 unidades sobrepuestas que finalmente se

colocaron sobre la plataforma de soporte del mencionado cultivo submarino (Granja Experimental de Cultivo del CIBNOR).

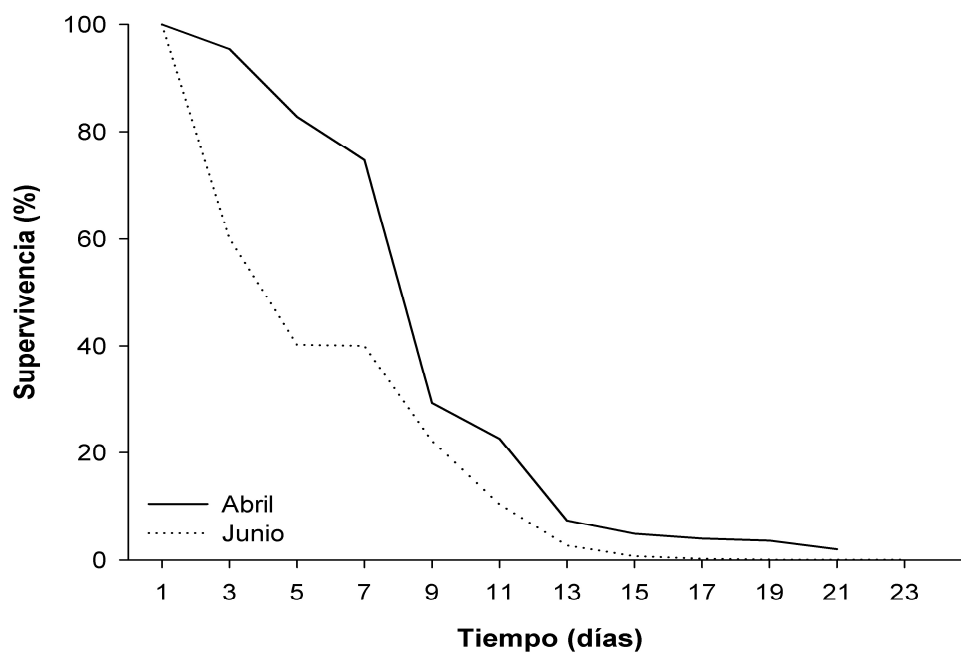


Figura 20. Supervivencia larvaria de *Pteria sterna* durante los cultivos realizados en 2009.

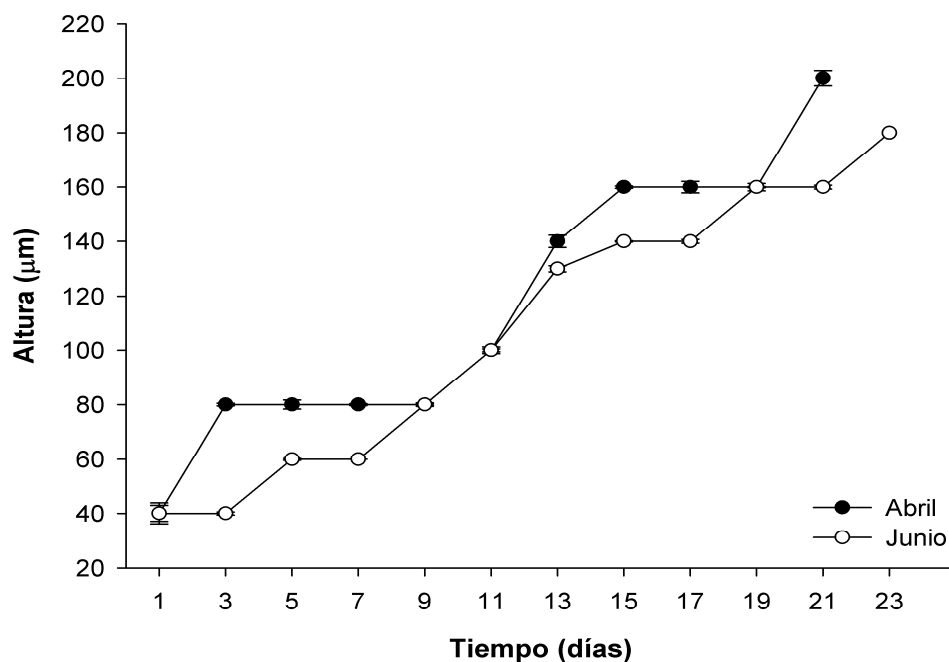


Figura 21. Crecimiento absoluto promedio en altura de la concha de larvas de *Pteria sterna* durante los cultivos larvarios realizados en 2009. Las barras representan el error estándar.

7.3.3. Composición bioquímica específica por larva y valores energéticos

Durante el estadio véliger, las larvas presentaron un alto contenido de proteínas en abril ($0.46 \pm 2 \times 10^{-3}$ μg/larva) y junio 2009 ($0.41 \pm 3 \times 10^{-2}$ μg/larva), y en menor grado por carbohidratos y lípidos (Tabla VI). Todos los componentes incrementaron sus niveles hacia los días 23 (abril) y 21 (junio) de cultivo larvario (estadio pedivéliger), manteniendo una composición química similar a la registrada al inicio de los cultivos. Es decir, se mantuvo la tendencia hacia una predominancia de las proteínas como el principal componente bioquímico, secundadas por carbohidratos y lípidos (Tabla VI).

Tabla VI. Variaciones en la composición bioquímica ($\mu\text{g}/\text{larva}$) de las larvas de *Pteria sterna* durante los cultivos de 2009.

Estadio		Proteínas	Carbohidratos	Lípidos
		$\mu\text{g}/\text{larva}$		
Abril	<i>Véliger</i>	$0.46 \pm 2 \times 10^{-2}$ (96.4%)	$1.3 \times 10^{-2} \pm 6 \times 10^{-3}$ (2.8%)	$4 \times 10^{-3} \pm 2 \times 10^{-3}$ (0.8%)
	<i>Pedivéliger</i>	6.65 ± 0.7 (88.2%)	$0.75 \pm 7 \times 10^{-2}$ (10.0%)	$0.14 \pm 2 \times 10^{-2}$ (1.8%)
Junio	<i>Véliger</i>	$0.41 \pm 3 \times 10^{-2}$ (96.0%)	$1.4 \times 10^{-2} \pm 6 \times 10^{-3}$ (3.2%)	$3 \times 10^{-3} \pm 2 \times 10^{-3}$ (0.8%)
	<i>Pedivéliger</i>	3.18 ± 0.3 (91.9%)	$0.23 \pm 1 \times 10^{-2}$ (6.7%)	$0.05 \pm 1 \times 10^{-2}$ (1.4%)

Aun cuando las proteínas fueron el principal componente metabólico en las fases véliger y pedivéliger de ambas corridas larvarias (abril y junio 2009), los equivalentes energéticos más elevados correspondieron a lípidos, particularmente durante el estadio véliger las larvas obtuvieron $10.7 \text{ J}/\mu\text{g}/\text{larva}$ (abril) y $12 \text{ J}/\mu\text{g}/\text{larva}$ (junio) (Tabla VII).

Tabla VII. Equivalentes energéticos en larvas de *P. sterna* cultivadas durante 2009.

		Proteínas	Carbohidratos	Lípidos
		$\text{J}/\mu\text{g}/\text{larva}$		
Abril	<i>Larva véliger</i>	0.044	1.31	10.7
	<i>Larva pedivéliger</i>	0.003	0.02	0.3
Junio	<i>Larva véliger</i>	0.05	1.29	12.0
	<i>Larva pedivéliger</i>	0.01	0.08	0.8

Con base en los indicadores de calidad gonádica y ovocitaria definidos en *P. sterna* durante cuatro diferentes momentos de su temporada reproductiva natural, así como su consecuente papel en la viabilidad larvaria y el efecto del ambiente, se considera que abril y junio 2009 fueron los momentos óptimos para incrementar el desempeño reproductivo de la especie y mayor viabilidad de las larvas (Tabla VIII). Las condiciones de los adultos colectados en noviembre 2008 y febrero 2009 no permitieron la producción de larvas ni semilla (Tabla VIII).

En abril particularmente, la calidad de la gónada, así como el contenido de lípidos en ovocitos, fue adecuada para que las larvas producidas completaran su desarrollo y se fijaran. En junio, aún cuando las ostras colectadas estaban en madurez gonádica y el contenido de carbohidratos en ovocitos fue alto, durante el cultivo se produjeron pocas larvas que no completaron la metamorfosis y fijación (Tabla VIII).

Tabla VIII. Resumen de indicadores de calidad gonádica y desempeño reproductivo en *Pteria sterna* durante la temporada reproductiva natural 2008–2009 en Bahía de La Paz.

	2008	2009		
	Noviembre	Febrero	Abril	Junio
Temperatura del agua (°C)	26.2	21.1	21.8	22.5
Clorofila <i>a</i> (mg/m ³)	1.4	1.9	1.3	0.8
ICG (%)	12.5 ± 0.6	11.4 ± 0.6	11.6 ± 0.7	20.3 ± 0.8
IRM (%)	21.4 ± 1.4	24.1 ± 1.3	24.5 ± 1.2	23.0 ± 1.0
IGS (%)	43.9 ± 2.5	37.3 ± 2.2	36.6 ± 1.7	48.6 ± 1.6
Etapas desarrollo gonádico	Mad	Des	Des	Mad
Principales SAFA (%)	16:0 (29.8)	16:0 (22.1)	16:0 (23.3)	16:0 (27.7)
Principales MUFA (%)	16:1n7 (4.4)	16:1n7 (3.6)	16:1n7 (5.1)	16:1n7 (7.6)
Principales PUFA (%)	22:2NMI (2.8)	22:2NMI (2.4)	18:2n6c (1.7)	18:3n3 (3.1)
Principales HUFA (%)	22:6n3 (9.7)	22:6n3 (14.8)	20:5n3 (13.3)	20:5n3 (13.7)
Talla promedio ovocitos (µm)	39.7 ± 0.3	36.6 ± 1.1	42.7 ± 0.7	38.6 ± 0.4
IL (%)	9.7 ± 0.6	8.3 ± 1.1	13.0 ± 1.2	6.7 ± 0.5
IG (%)	10.1 ± 0.6	21.2 ± 2.3	10.6 ± 1.0	29.0 ± 1.3
Respuesta inducción al desove	Negativa	Positiva	Positiva	Positiva
Larvas pedivéliger (individuos)	0	0	184 × 10 ³	1 × 10 ³
Supervivencia (%)	0	0	2	0.015
Talla (µm)	0	0	200	180
Componente bioquímico (µg/larva)	0	0	Pro (6.7)	Pro (3.2)
Producción de semilla	0	0	17 × 10 ³	0

ICG = índice de condición general; IGS = índice gonadosomático; IRM = índice de rendimiento muscular; Mad = madurez; Des = desarrollo; 16:0 = ácido palmítico; 16:1n7 = ácido palmitoléico; 18:2n6 = ácido linoéico; 18:3n3 = ácido linoléico; 22:2NMI = ácidos grasos C₂₂ no-metilen-interrumpidos; 20:5n3 = ácido eicosapentaenoico; 22:6n3 = ácido docosahexaenoico; IL = índice lipídico; IG = índice glucídico; Pro = proteína.

8. DISCUSIÓN

8.1. Indicadores de calidad reproductiva en adultos y ovocitos y su relación con la dinámica ambiental

Como se mencionó anteriormente, existe una fuerte problemática en torno al errático reclutamiento en campo y a la discontinua producción en laboratorio de semilla de *P. sterna*, la cual está directamente relacionada con la calidad de las gónadas de los reproductores así como con la dinámica ambiental (Saucedo y Southgate, 2008). Durante la temporada reproductiva natural de la especie, se ha reportado que existe un mayor reclutamiento de semilla cuando la temperatura del agua es baja (entre los 19–24 °C) y la cantidad de energía en el alimento es alta (~19 J/L), lo cual suele ocurrir en invierno y primavera (entre enero y mayo aproximadamente), salvo cuando se presentan eventos oceanográficos como El Niño o La Niña (Monteforte y García-Gasca, 1994; Monteforte *et al.*, 1995; Cáceres-Puig, 2012). Ambas variables (temperatura del agua y disponibilidad de alimento) son las que guardan una relación más estrecha con la condición fisiológica de los reproductores (calidad de gametos), el esfuerzo reproductivo, fecundidad y éxito reproductivo de las especies (Heral y Deslous-Paoli, 1983; MacDonald y Thompson, 1985; Ramírez-Llodra, 2002; Barber y Blake, 2006). En el presente estudio, se detectaron relaciones tanto directas como indirectas entre la condición gonádica de *P. sterna* y el ambiente (Tabla V), las cuales permitieron establecer cuáles factores ambientales tuvieron mayor efecto sobre la calidad gonádica de los reproductores durante la temporada reproductiva 2008 y 2009.

Durante este estudio, noviembre 2008 y junio 2009 representan periodos considerados pre y pos-reproductivos, respectivamente, y no corresponden a los tiempos de maduración natural reportados para la especie en la Bahía de La Paz (Saucedo y Monteforte, 1997; Vite-García y Saucedo, 2008; Cáceres-Puig *et al.*, 2009). Sin embargo, muchos de los indicadores de calidad gonádica fueron adecuados en el mes de junio en particular, y sugieren la existencia de un desfase en la ocurrencia de los picos de maduración que han sido reportados por décadas para la especie. Este

desfase parece estar relacionado con la presencia de anomalías térmicas durante el periodo 2008–2009, con variaciones desde $-0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ más frío en noviembre, hasta $+2\text{ }^{\circ}\text{C}$ más cálido en junio (base de datos de la NOAA) (Hawkins-Martínez, 2012). A su vez, estas anomalías térmicas podrían reflejar la presencia de un evento oceanográfico anómalo, como El Niño. Adicional a las anomalías térmicas, la disponibilidad de alimento durante noviembre 2008 y junio 2009, así como los niveles registrados en las reservas energéticas de gónada, glándula digestiva y músculo, parecen indicar que *P. sterna* adoptó una estrategia conservadora durante noviembre (baja disponibilidad de alimento, temperatura alta, niveles bajos de lípidos y triglicéridos en gónada), y una estrategia oportunista en abril y junio cuando había una alta disponibilidad de alimento, temperatura templada, niveles altos de lípidos y triglicéridos en gónada y glándula digestiva (Tabla VIII).

En cuanto a la cantidad de alimento, los valores de seston inorgánico (17.8 a 29.1 mg/L) y orgánico (3.0 a 3.2 mg/L) fueron consistentes con el promedio registrado en otros puntos de la Bahía de La Paz, como la rada del puerto de Pichilingue (Luna-González *et al.*, 2000) e Isla La Gaviota (Cáceres-Puig, 2012). Además, los valores de seston orgánico coinciden con los meses más fríos registrados en febrero y abril 2009. Esto concuerda parcialmente con lo propuesto por Jiménez-Illescas (1996), quien establece que durante los meses más fríos del año (diciembre y enero) es cuando ocurre la mayor concentración de seston orgánico, debido a surgencias frecuentes. Con base en la información arriba presentada, y en estudios previos sobre la reproducción de *P. sterna* en Bahía de La Paz (Saucedo y Monteforte, 1997; Vite-García y Saucedo, 2008; Cáceres-Puig *et al.*, 2009), se asumió que al inicio de este estudio las ostras recolectadas en febrero y abril 2009 estarían predominantemente maduras (concretamente en el pico de madurez) y aquellas de noviembre 2008 y junio 2009 en estadios incipientes de desarrollo, desovadas o incluso en proceso de reabsorción de la gónada. Sin embargo, la evidencia histológica mostró que solamente el 16% de las ostras recolectadas en abril se encontraban en madurez gonádica. Este resultado confirma la ocurrencia de un

desfase en la ocurrencia de los eventos reproductivos, ocasionado por las condiciones ambientales.

Dado que la temperatura del agua en abril fue de 21.8 °C y la concentración de seston fue alta (~32 mg/L), es decir, que las condiciones ambientales seguían siendo favorables, existe la posibilidad que las ostras recolectadas en abril habían desovado recientemente y las gónadas se encontraban parcialmente reabsorbiendo y reciclando los nutrientes (21% en posdesove) con el fin de iniciar un nuevo ciclo gametogénico, concretamente un ciclo corto en el que se omite el estadio de inactividad (Saucedo y Southgate, 2008). Esta evidencia, en conjunto con la obtenida en la composición bioquímica de tejidos (analizada más adelante), sugieren que en junio los ovocitos ya estaban sobre-maduros y no tuvieron la calidad suficiente para sustentar el desarrollo de las larvas, lo que explica por qué estas no alcanzaron la metamorfosis para fijarse. El fenómeno de sobre-maduración de gametos (ovocitos) ya ha sido observada en *C. gigas*, donde el reciclaje de nutrientes, derivado de la reabsorción de gametos no liberados para el desarrollo de nuevos gametos, es un factor que influencía el desarrollo gonádico y, posiblemente, la calidad gonádica (Chávez-Villalba *et al.*, 2003). Lo anterior confirma que la calidad de los ovocitos es vital para asegurar el vigor inicial de los embriones para alcanzar y sostener el estadio larvario temprano, además de que su efecto puede perdurar hasta fases avanzadas como la metamorfosis (Gaffney y Allen, 1993).

La determinación de índices morfo-fisiológicos es comúnmente relacionada con el ciclo de almacenamiento y uso de reservas energéticas para sustentar la gametogénesis en moluscos bivalvos. Esto es consistente con lo reportado para ciertas especies de importancia comercial, como *Argopecten circularis* (Villalejo-Fuerte y Ceballos-Vázquez, 1996), *Nodipecten subnodosus* (Arellano-Martínez *et al.*, 2004), *Ruditapes decussatus* (Ojea *et al.*, 2004), *C. gigas* (Dridi *et al.*, 2007), *Modiolus barbatus* (Mladineo *et al.*, 2007) y *Fluvia mutica* (Liu *et al.*, 2008), entre otros. También se ha reportado que algunas especies (e.g. *Placopecten magellanicus*, *A. irradians*, *P. maximus*, entre otros) exhiben un patrón inverso entre el índice gonadosomático (IGS) y el índice

de rendimiento muscular (IRM), atribuido al almacenamiento y movilización de reservas energéticas entre el músculo aductor y gónada durante la gametogénesis (Robinson *et al.*, 1981; Barber y Blake, 2006).

Dependiendo de la especie, este patrón se relaciona con un decremento en los niveles de proteínas y carbohidratos en el músculo aductor, combinado con un incremento en los niveles de proteínas, lípidos y triglicéridos en la gónada. Por ejemplo, en ciertas especies (e.g. *P. mazatlanica*) los carbohidratos se movilizan activamente del músculo hacia la gónada durante el pico reproductivo de primavera, en tanto que las proteínas son las que se transfieren de este tejido a la gónada durante el pico reproductivo de verano (Saucedo *et al.*, 2002). En *P. sterna* se observó el mencionado patrón inverso entre el IGS (bajo) y el IRM (alto) en abril cuando las ostras se encontraban predominantemente en desarrollo; así como una disminución de los niveles de lípidos (~15 mg/g) y triglicéridos (~6 mg/g) del músculo aductor, acompañada con un incremento de los mismos combustibles en la gónada (~39 mg/g lípidos, 34 mg/g triglicéridos) (Figs. 16 y 18).

En lo que respecta al IGS, este fue alto en junio cuando las ostras se encontraban en madurez, coincidiendo con un bajo contenido de proteínas en gónada y altos niveles de lípidos y triglicéridos en glándula digestiva. Sin embargo, tal como se mencionó anteriormente, la información obtenida sugiere una sobre-maduración de los ovocitos que afectó la calidad de los mismos para permitir la metamorfosis de las larvas y subsecuente fijación. Por otro lado, el valor más bajo del IGS coincidió con valores altos del IRM e IMA en abril 2009. Al respecto se encontró que en abril los altos niveles de proteínas y carbohidratos en el músculo aductor (>400 mg/g), así como los altos niveles de proteínas (>500 mg/g) en el manto, coincidieron con una importante concentración de proteínas (~230 mg/g) en la gónada. Nuevamente, *P. sterna* pareció seguir una estrategia oportunista en abril, que como se mencionó anteriormente, está sustentada en una alta concentración de alimento. Es importante aclarar que el IGS empleado en este estudio es solo un indicador parcial de la calidad de la gónada, debido a que a diferencia de los moluscos pectínidos donde la gónada

está presente como órgano discreto, en *P. sterna* ésta se desarrolla difusamente como parte de la masa visceral a medida que el animal va madurando.

Las adaptaciones que los bivalvos presentan ante condiciones ambientales cambiantes, también se pueden analizar a partir de variaciones en los índices morfo-fisiológicos. Por ejemplo, en *C. gigas* se ha detectado una relación inversa entre el índice de condición (IC) y la disponibilidad de alimento (seston) en Laguna El Soldado, Sonora: a elevados valores del índice de condición, baja disponibilidad de alimento; en tanto que a bajos valores del índice de condición, alta disponibilidad de alimento (Chávez-Villalba *et al.*, 2007). Un patrón similar fue observado en el presente estudio entre el ICG de *P. sterna* y la concentración de clorofila *a* en Bahía de La Paz, puesto que el valor de éste índice disminuyó cuando la concentración de clorofila *a* fue alta en febrero 2009 (1.9 mg/m³), pero el ICG incrementó cuando la concentración de este pigmento fotosintético fue baja en junio del mismo año (0.8 mg/m³) (Tabla VIII).

La participación de tejidos somáticos especializados durante la reproducción en *P. sterna* ya ha sido reportada previamente (Vite-García y Saucedo, 2008; Cáceres-Puig *et al.*, 2009). Estos estudios han demostrado que la especie dirige la mayor parte de la energía necesaria para el inicio y sustento de la gametogénesis desde la glándula digestiva (~35%) en primer lugar, seguida del músculo aductor (~28%). En este estudio se confirma lo previamente reportado por Vite-García y Saucedo (2008) y Cáceres-Puig *et al.* (2009) respecto a que la glándula digestiva es el principal tejido de reserva en *P. sterna* al registrarse altos niveles lípidos y triglicéridos en abril y junio 2009, cuando las ostras estaban predominantemente en desarrollo y madurez. En el caso del músculo aductor, los resultados mostraron altos niveles de proteínas y carbohidratos en abril, cuando se registró que la mayoría de las ostras se encontraban en desarrollo gonádico. El manto por su parte se ha reportado como un tejido de reserva para la gametogénesis en mitílidos (Mathieu y Lubet, 1993), y algunos pectínidos (Epp *et al.*, 1988; Lodeiros *et al.*, 2001; Racotta *et al.*, 2003; Arellano-Martínez *et al.*, 2004). En *N. subnodosus* por ejemplo, Arellano-Martínez *et al.* (2004) registraron un agotamiento de las proteínas del manto durante el desarrollo gonádico, en conjunto con una reducción

de glucógeno durante la fase final de madurez y desove. Los autores concluyeron que estas reducciones indican una participación del manto (aunque mínima) para sustentar la gametogénesis de esta especie en Laguna Ojo de Liebre, B.C.S. En *P. sterna* se ha reportado que el manto actúa como un depósito energético de corto plazo para reservas proteínicas, las cuales sirven para cubrir algunas necesidades de la gametogénesis (Cáceres-Puig *et al.*, 2009). En este estudio se registró un incremento significativo en el contenido proteínico del manto de noviembre 2008 a abril 2009, cuando las ostras se encontraban predominantemente en desarrollo, acompañado de un decremento de proteínas en junio cuando, adicional a la madurez gonádica, se registraron también organismos en desove y posdesove. Ahora bien, dado que el manto es un tejido de composición bioquímica enzimática muy compleja, pues participa en diversas funciones relacionadas con la calcificación de la concha durante el crecimiento (Checa, 2000), existe la posibilidad de que este tejido almacene otros tipos de proteínas que no tengan participación en la reproducción.

De la fracción lipídica, se sabe que los ácidos grasos juegan un papel clave en la reproducción de bivalvos y que la cantidad de éstos está relacionada con el subsecuente éxito en el desarrollo embrionario y larvario de los moluscos (Holland, 1978; Gallager y Mann, 1986a, b; Gallager *et al.*, 1986). En algunas especies de ostras perleras como *P. margaritifera*, se sabe que los embriones usan ácidos grasos saturados, especialmente los ácidos grasos merístico (14:0) y palmítico (16:0) durante las primeras 48 horas de desarrollo, mientras que los niveles de MUFA y PUFA solo se incrementan ligeramente, sugiriendo su síntesis *de novo* (Acosta-Salmón, 2004). En *P. sterna* se observó un patrón de acumulación de SAFA en la gónada y glándula digestiva de febrero a junio 2009, coincidiendo con porcentajes elevados de estos ácidos grasos en gónadas en desarrollo y madurez, así como en desove (10% en junio) y posdesove (21% en abril).

De los SAFA, el ácido palmítico fue particularmente más abundante en la gónada (29.8%), cuando la mayoría de las ostras estuvieron en desarrollo gonádico (febrero 2009). Se ha reportado que esta acumulación de ácido palmítico es utilizada

principalmente como combustible energético para la gametogénesis (Aras *et al.*, 2003). Lo anterior, aunado con lo sugerido por Acosta-Salmón (2004) sobre el papel de los SAFA en la maduración de los ovocitos de *P. margaritifera*, sugiere que este tipo de ácido graso puede ser un indicador confiable para definir la calidad ovocitaria y el subsecuente vigor larvario en ostras perleras. Ello debido a que dicho ácido no requiere la incorporación o protección de antioxidantes (carotenoides y vitaminas) para mantener su estabilidad. Estos antioxidantes son conocidos por ejercer influencia en la capacidad reproductiva de algunos invertebrados, como el crecimiento gonádico, fecundidad, desarrollo embrionario y malformaciones, talla y supervivencia larvaria (Vershinin y Lukyanova, 1993; George *et al.*, 2001). La acumulación de SAFA registrada en la gónada de *P. sterna*, en combinación con los reportes sobre la baja cantidad de antioxidantes en los ovocitos y embriones de ostras perleras (Acosta-Salmón, 2004), proporciona información complementaria que apoya el uso preferencial de los SAFA para maximizar el rendimiento reproductivo en ostras perleras. Con lo anterior, la concentración de SAFA podría ser utilizada como criterio para definir dietas apropiadas tanto para reproductores como para larvas, tal como lo sugirió Acosta-Salmón (2004) en *P. margaritifera*.

Se sabe que el origen de las reservas lipídicas, incluyendo ácidos grasos en la gónada, es a partir del seston orgánico. En aguas subtropicales como las de Bahía de La Paz, las poblaciones fitoplanctónicas se encuentran representadas principalmente por diatomeas (~71%) y dinoflagelados (~29%), ambos ricos en HUFA. Estos grupos presentan picos de concentración (florecimientos) particularmente durante la temporada fría, para después decrecer a medida que avanza la temporada cálida en la Bahía (Signoret y Santoyo, 1980). Durante el periodo de estudio, la temporada más fría (febrero 2009) registró la concentración más elevada de clorofila *a*, así como altos porcentajes de HUFA en todos los tejidos, excepto en el manto, lo cual coincidió con la presencia de ostras predominantemente en desarrollo. En la gónada, la concentración de HUFA decreció de febrero a junio 2009 (de 37 a 26%), lo cual revela que a diferencia de *P. margaritifera* (Acosta-Salmón, 2004), en *P. sterna* estos ácidos

grasos pueden ser nutrientes no limitantes para asegurar el desarrollo gonádico, embrionario y larvario. La alta disponibilidad de HUFA en el alimento implica una mayor concentración de ácidos grasos esenciales, los cuales son importantes durante la gametogénesis de muchas especies de bivalvos. Por ejemplo, en *P. maximus* existe una acumulación preferencial de DHA, ARA y EPA en la gónada, de los cuales el ARA influencia directamente la gametogénesis y el DHA la formación del vitelo (Soudant *et al.*, 1996); mientras que un pico de concentración de EPA coincide con la madurez sexual de esta especie (Besnard, 1991). En la gónada de *P. sterna*, en abril se registró una concentración importante (pico) de ARA (4.8%) que coincidió con la presencia de ovocitos de mayor talla y con altos niveles en el índice lipídico (IL); mientras que en junio se registró un pico de EPA (13.7%), que cual coincidió con un importante porcentaje de ostras maduras (40%) (Tabla VIII).

En este estudio se encontró que la talla de los ovocitos (expresada como diámetro teórico, DT) mantuvo una relación directa con el índice lipídico (IL) y una relación inversa con el índice glucídico (IG) (Tabla VIII). Se encontró, además, que ambos índices estuvieron inversamente correlacionados entre sí, particularmente en los meses de febrero y junio 2009, cuando el IL fue menor y el IG mayor. Esto sugiere que las reservas lipídicas y glucídicas son diferencialmente almacenadas y movilizadas hacia la gónada, por lo que ambos componentes desempeñan un papel diferente en la ovogénesis (específicamente durante la vitelogénesis). Los lípidos en particular han sido considerados durante décadas como indicadores confiables de calidad ovocitaria en bivalvos, ya que son incorporados activamente en ovocitos en crecimiento pero en el clímax de la vitelogénesis, su almacenamiento disminuye o incluso se detiene (Gallager y Mann, 1986b; Delgado *et al.*, 2004). Es importante considerar que hacia el final de la vitelogénesis, lo que se incrementa es la incorporación de fosfolípidos, más que de triglicéridos, como una estrategia para culminar la formación de las membranas celulares, lo que permite fortalecer a los ovocitos antes de ser liberados al medio a través del desove (Briegel, 1990). En este estudio el IL solamente consideró la carga nutricia de los triglicéridos, como el componente energético más importante que

posteriormente desempeñará un papel fundamental durante el desarrollo embrionario y larvario (Holland, 1978).

8.2. Indicadores de calidad larvaria y su relación con la dinámica ambiental

Los estudios sobre desarrollo embrionario y larvario de *P. mazatlanica* y *P. sterna* realizados en México (Araya-Núñez *et al.*, 1991, 1995; Martínez-Fernández *et al.*, 2003, 2004; Saucedo *et al.*, 2007) reportan bajas tasas de supervivencia larvaria (<2%), las cuales son consistentes con las reportadas para otras especies de ostras perleras, como *P. fucata* (Dharmaraj *et al.*, 1987; Victor *et al.*, 1995), *P. maxima* (Rose y Baker, 1994; Taylor, 1999) y *P. margaritifera* (Southgate y Beer, 1997; Taylor y Southgate, 1998; Doroudi *et al.*, 1999). Estas bajas tasas de supervivencia parecen ser el resultado del tipo de ambiente en el que la mayoría de las especies de ostras perleras habitan, que en el caso particular de ostras del género *Pinctada* corresponde a aguas oligotróficas relativamente transparentes y con bajos contenidos de materia orgánica (Yukihira *et al.*, 1999, 2006). Por el contrario, *P. sterna* es una especie que vive en fondos más de tipo arenoso, lodoso donde los contenidos de materia orgánica suelen ser mayores. En el presente estudio, los mejores indicadores de calidad gonádica y, por consiguiente, la viabilidad larvaria se presentaron en abril y junio de 2009, cuando la temperatura del agua fue de 21.8 y 22.5 °C, respectivamente. Sin embargo, como ya se mencionó antes, solo las larvas en abril lograron completar su desarrollo, completar la metamorfosis y fijarse. Por el contrario, a pesar de que varios de los indicadores de calidad de gametos fueron favorables para el mes de junio, incluyendo el porcentaje de madurez de los gametos (40%), no fue posible lograr la fijación de semilla. Aunado a lo ya analizado en la sección 8.1, este resultado puede estar relacionado con la calidad del agua de mar utilizada para el cultivo de las larvas, que en el mes de junio en el laboratorio del CIBNOR incluye valores promedio relativamente altos para la temperatura del agua (25–26 °C) y concentraciones variables de sólidos suspendidos (0.6–2.4 mg/L) y bacterias patógenas ($1-2.8 \times 10^2$ UFC/mL) (Abasolo-Pacheco *et al.*, 2009). Si bien estos

valores pueden ser aceptables para larvas de especies de bivalvos enterradores (infauna), que viven en contacto directo con el sustrato, o que habitan aguas heterotróficas con altos contenidos de materia orgánica (e.g. *C. gigas*), no parecen serlo para larvas de *P. sterna*, debido probablemente a que las partículas en suspensión tapan o dañan su sistema filtrador y ocasionan que no se puedan alimentar y mueran (Yukihira *et al.*, 1999).

En los laboratorios de cultivo de larvas de moluscos se emplean generalmente microalgas como alimento vivo, el cual incluyen diversas especies entre las que destacan los flagelados *Isochrysis* spp. y *Pavlova* spp., así como las diatomeas del género *Chaetoceros* (Helm, 2006). Estas cepas son relevantes para las larvas por su tamaño pequeño, que facilita la ingestión y digestión (Martínez-Fernández y Southgate, 2007), y por sus perfiles nutricionales balanceados (Brown *et al.*, 1989), particularmente de ácidos grasos altamente insaturados (Ehteshami *et al.*, 2011). Combinaciones de algunas de estas microalgas han dado resultados positivos en el cultivo de larvas de *P. margaritifera* (Martínez-Fernández y Southgate, 2007), *P. maxima* (Rose y Baker, 1994) y *P. mazatlanica* (Saucedo *et al.*, 2007; Ojeda-Ramírez *et al.*, 2008). De hecho, en *P. margaritifera* se ha observado una relación directa entre la concentración de alimento (mezcla de *I. galbana* y *Ch. calcitrans* a concentraciones de 18×10^3 células/mL) y el desarrollo gonádico y diferenciación de células germinales (Ehteshami *et al.*, 2011). En este estudio, las microalgas *I. galbana*, *P. salina* y *Ch. calcitrans* fueron proporcionadas en una condición *ad libitum* para satisfacer los requerimientos nutricionales de las larvas de *P. sterna*, de acuerdo a lo establecido por González-Jiménez (2012).

En bivalvos, el desarrollo embrionario es sustentado por las reservas energéticas provenientes del vitelo de los ovocitos, el cual está compuesto por proteínas, lípidos y carbohidratos (Holland, 1987; Gallager y Mann, 1986a, b), y que en ciertas especies como la almeja *Paphia malabarica* alcanzan valores cercanos al 63.2% (proteínas), 25.4% (lípidos) y 11.4% (carbohidratos) (Gireesh *et al.*, 2010); estas reservas vitelinas son reducidas al final de la embriogénesis. A pesar de lo anterior, son los lípidos los que constituyen la principal reserva energética en los ovocitos y los que tienen

influencia directa en el desarrollo larvario, incluso aún más que proteínas y carbohidratos combinados (Gireesh *et al.*, 2009). En este estudio se encontró que las proteínas representaron el principal componente bioquímico de las larvas en los estadios véliger (~96%) y pedivéliger (~88%), en los cultivos de abril y junio; mientras que los lípidos proporcionaron el mayor aporte energético a las larvas (~11 J/ μ g/larva en abril, y 12J/ μ g/larva en junio). Este es el primer estudio sobre los cambios en las reservas energéticas de las larvas de una ostra perlera durante su desarrollo. Sin embargo, es necesario profundizar en aspectos tales como los cambios en la composición bioquímica de huevos, larvas véliger, larvas umbadas y semillas. Con lo anterior se podría establecer un indicador larvario confiable que contribuya en mejoras (e.g. adición de complementos artificiales como almidón de maíz y microcápsulas de lípidos) durante la elaboración de dietas microalgales, suministradas a los reproductores en maduración controlada hasta el cultivo larvario.

Dados los resultados obtenidos sobre los indicadores de calidad gonádica y de ovocitos en cuatro diferentes momentos de la temporada natural de maduración de *P. sterna*, abril y junio 2009 (abril particularmente dados los registros de temperatura fría y alta disponibilidad de alimento) fueron los momentos óptimos para maximizar el desempeño reproductivo de la especie y la mayor viabilidad de las larvas para completar su desarrollo y fijarse como semilla. Se recomienda la colecta de reproductores silvestres para desove inmediato en el laboratorio durante su principal periodo de madurez dentro de la temporada natural (primavera), ya que presentan la mejor calidad gonádica y se presentan condiciones ambientales favorables (temperatura del agua cercana a los 22 °C y concentraciones de clorofila >1 mg/m³). A su vez se sugiere no coleccionar/desovar reproductores durante la etapa final de dicho período, para permitir que de manera natural, los nutrientes de los ovocitos residuales del ciclo principal (ovocitos sobre-madurados) sean reciclados y sus reservas energéticas se utilicen para formar nuevos ovocitos con la calidad necesaria para el siguiente ciclo gametogénico.

Se considera que esta estrategia permitirá que los gametos alcancen una mayor calidad con el fin de incrementar la viabilidad de las larvas y con ello el suministro de juveniles saludables para operaciones de injerto continuas. Esto podría ayudar a sostener la industria perlera en crecimiento en México y facilitar la elaboración protocolos de producción de semilla más efectivos para esta especie.

9. CONCLUSIONES

- La temperatura del agua mostró una relación inversa con los indicadores definidos en adultos (índices de condición general e índice gonadosomático), mientras que estos mismos índices mostraron una relación directa con la concentración de clorofila *a*.
- Se registró un desfase en los picos de maduración reportados para la especie dentro de su temporada natural de reproducción. Tal desfase se asocia a perturbaciones anómalas en la temperatura del agua durante el periodo de estudio.
- Tanto el índice lipídico como el glucídico mostraron ser indicadores confiables de calidad en ovocitos, además de que ambos índices estuvieron inversamente relacionados entre sí, lo que indica que tanto lípidos como carbohidratos de la gónada femenina se almacenan de manera particular y juegan un papel diferencial en la ovogénesis (especialmente en la vitelogénesis).
- La glándula digestiva fue el principal tejido de reserva en la gametogénesis de *P. sterna*, al registrarse altos niveles lípidos y triglicéridos en abril y junio, que coincide con los principales picos de desarrollo y madurez.
- Los ácidos grasos saturados (SAFA) fueron los más representativos en la gónada de *P. sterna* a lo largo del periodo de estudio, por lo que este tipo de compuestos parecen ser buenos indicadores de calidad de gametos, particularmente ovocitos.
- Los mejores indicadores de calidad gonádica se observaron en las ostras colectadas en abril (altos niveles de proteínas en gónada y de lípidos en glándula digestiva; alta concentración de SAFA en ambos tejidos, ovocitos posvitelogénicos más abundantes, de mayor talla y con mayor contenido lipídico) para sustentar el desarrollo de larvas competentes y la producción de semilla sana (17.1×10^3) de ~2 y 3 mm (altura de la concha) al día 38 de cultivo (23 días de cultivo larvario más 15 días en tanques de fijación).
- Las proteínas representaron el principal componente bioquímico (>88%) de las larvas véliger y pedivéliger cultivadas en abril y junio. Sin embargo, los lípidos

aportaron el mayor contenido energético ($>10 \text{ J}/\mu\text{g}/\text{larva}$) en ambas corridas larvarias.

- Aunque en junio varios indicadores de calidad reproductiva fueron buenos (índice de condición general e índice gonadosomático altos, ostras maduras, abundancia de ovocitos posvitelogénicos y con mayor contenido de carbohidratos), la producción de larvas fue pobre y no se logró la fijación larvaria ni la producción de semilla, debido a una posible sobre-maduración y pérdida de calidad ovocitaria.

10. LITERATURA CITADA

- Abasolo-Pacheco, F., J.M. Mazón-Suástegui, P.E. Saucedo. 2009. Response and condition of larvae of the scallops *Nodipecten subnodosus* and *Argopecten ventricosus* reared at the hatchery with different seawater sources. *Aquaculture* 296: 255–262.
- Ackman, R.G. 2000. Fatty acids in fish and shellfish. En: Chow, C.K. (ed.) *Fatty acids in foods and health implications*. CRC Press, Nueva York, EUA. 153–174p.
- Acosta-Salmón, H. 2004. Broodstock and egg quality of the pearl oysters *Pinctada margaritifera* and *Pinctada fucata*. Tesis de Doctorado, James Cook University, Australia.
- Acosta-Salmón, H., P.C. Southgate. 2005. Histological changes in the gonad of the blacklip pearl oyster (*Pinctada margaritifera* Linnaeus, 1758) during the reproductive season in north Queensland, Australia. *Moll. Res.* 25: 71–74.
- Aras, N.M, H.İ. Haliloğlu, Ö. Ayik, H. Yetim. 2003. Comparision of fatty acid profiles of different tissues of mature trout (*Salmo trutta labrax*, Pallas, 1811) caught from Kazandere Creek in the Corugh region, Erzurum, Turkey. *Turk J Vet Anim Sci* 27: 311–316.
- Araya-Núñez, O., B. Ganning, F. Bückle-Ramírez. 1991. Gonad maturity, induction of spawning, larval breeding and growth in the American pearl-oyster (*Pteria sterna* Gould). *Calif. Fish Game* 77: 181–193.
- Araya-Núñez, O., B. Ganning, F. Bückle-Ramírez. 1995. Embryonic development, larval culture, and settling of American pearl-oyster (*Pteria sterna*, Gould) spat. *Calif. Fish Game* 81: 10–21.
- Arellano-Martínez, M., I.S. Racotta, B.P. Ceballos-Vázquez, J.F. Elorduy-Garay. 2004. Biochemical composition, reproductive activity and food availability of the lion's paw *Nodipecten subnodosus* in the Laguna Ojo de Liebre, Baja California Sur, Mexico. *J Shellfish Res.* 23: 15–23.

- Arizmendi-Castillo, E. 1996. Ciclo reproductivo de las ostras perleras *Pinctada mazatlanica* (Hanley, 1856) y *Pteria sterna* (Gould, 1851) (Pteriidae), en el área de Guaymas, Sonora, México. Tesis de Maestría, Instituto Tecnológico de Estudios Superiores de Monterrey, México.
- Avilés-Quevedo, A., J.M. Mazón-Suástegui. 1989. Acondicionamiento gonádico e inducción al desove de *Pteria sterna* (Gould, 1851), con dietas artificiales. VII Simposio Int. Biol. Mar., 1–5 de junio de 1989. 71–77p.
- Baghurst, B.C., J.G. Mitchell. 2002. Sex-specific growth and condition of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg). *Aquacult. Res.* 33: 1253–1263.
- Barber, B.J., N.J. Blake. 1981. Energy storage and utilization in relation to gametogenesis in *Argopecten irradians concentricus* (Say). *J Exp. Mar. Biol. Ecol.* 52: 121–134.
- Barber, B.J., N.J. Blake. 2006. Reproductive physiology. En: Shumway, S.E., Parsons, G.J. (eds.) *Scallops: biology, ecology, and aquaculture*. Elsevier. Second edition. The Netherlands. 357–416p.
- Barnes, H., J. Blackstock. 1973. Estimation of lipids in marine animal tissues: detailed investigation of the sulphophosphovanillin method for total lipids. *J Exp. Mar. Biol. Ecol.* 12: 103–118.
- Bayliss, H.O. 1984. *Lipid histochemistry*. Oxford University Press, New York. 68p.
- Bayne, B.L. 1976. Aspects of reproduction in bivalve mollusks. En: Wiley, M. (ed.) *Estuarine processes*. Academic Press, London. 432–448p.
- Behrenfeld, M.J., K. Worthington, R.M. Sherrell, F.P. Chavez, P. Strutton, M. McPhaden, D.M. Shea. 2006. Control on tropical Pacific Ocean productivity revealed through nutrient stress diagnostic. *Nature* 442: 1025–1028.

- Berg, J.A., R.I.E. Newell. 1986. Temporal and spatial variations in the composition of seston available to the suspension feeder *Crassostrea virginica*. Est. Coast. Shelf Sci. 23: 375–386.
- Besnard, J.Y. 1991. Seasonal variations in the lipids and fatty acids on the female gonad of the scallop *Pecten maximus* (Linnaeus, 1758) in the Bay of Seine (French Channel). En: Shumway, S.E., Sandifer, P.A. (eds.) An international compendium of scallops biology and culture. World Aquac. Soc. 74–86p.
- Beukema, J.J., W. De Bruin. 1979. Calorific values of the soft parts of the tellinid bivalve *Macoma balthica* (L.) as determined by two methods. J Exp. Mar. Biol. Ecol. 37: 19–30.
- Bligh, E.G, W.J. Dyer. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J Biochem. Physiol. 37: 911–917.
- Bochenek, E.A., J.M. Klinck, E.N. Powell, E.E. Hofmann. 2001. A biochemically based model of the growth and development of *Crassostrea gigas* larvae. J Shellfish Res. 20: 243–265.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye-binding. Anal. Biochem. 72: 248–254.
- Brett, J.R., T.D.D. Groves. 1979. Physiological energetics. En: Hoar W.S., Randall, D.J., Brett J.R. (eds.) Fish Physiology. Academic Press, London. 279–325p.
- Briegel, H. 1990. Metabolic relationship between female body size, reserves, and fecundity of *Aedes aegypti*. J Insect Physiol. 36: 165–172.
- Brown, J.R., E.B Hartwick. 1988. Influences of temperature, salinity and available food upon suspended culture of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. II. Condition index and survival. Aquaculture 70: 253–267.

- Brown, M.R., S.W. Jeffrey, C.D. Garland. 1989. Nutritional aspects of microalgae used in mariculture: a literature review. CSIRO Marine Laboratories Report 205. 44p.
- Burke, K., E. Bataller, G. Miron, M. Ouellette, R. Tremblay. 2008. Larval quality of a nonnative bivalve species (European oyster, *Ostrea edulis*) off the East Canadian Coast. *J Shellfish Res.* 27: 701–710.
- Cáceres-Martínez, C. 1982. Composition en glucides, protéines, lipides et en pigments totaux chez l'algue monocellulaire *Tetraselmis suecica*, en culture semicontinue. Tesis DEA, Université de Bretagne Occidentale. Faculté des Sciences et Techniques de Brest.
- Cáceres-Puig, J.I. 2012. Dinámica del reclutamiento de semilla de la concha nácar *Pteria sterna* en la Bahía de La Paz Baja California Sur, México. Tesis de Doctorado, Centro de Investigaciones Biológicas de Noroeste, México.
- Cáceres-Puig, J.I., C. Cáceres-Martínez, P.E. Saucedo. 2009. Annual reproductive effort of pacific winged pearl oyster *Pteria sterna* and its relation with the timing for planning pearl seeding operations. *J Shellfish Res.* 28: 471–476.
- Cannuel, R., P.G. 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.
- Cariño, M.M., M. Monteforte. 1995. History of pearling in the Bay of La Paz, South Baja California, Mexico (1533–1914). *Gems Gemol.* 31: 88–108.
- Carreón-Palau, L., J.A. Del Ángel-Rodríguez, M.O. Arjona-López. 2007. Determinación de ácidos grasos por Cromatografía de gases espectrometría de masas. En: Arredondo-Vega, B.O., Voltolina, D. (eds.) Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal. Editorial CIBNOR. 97p.

- Chávez-Villalba, J., J. Barret, C. Mingant, J.C. Cochard, J.C., M. Le Pennec. 2003. Influence of timing of broodstock collection on conditioning, oocyte production, and larval rearing of the oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg), at six production sites in France. *J Shellfish Res.* 22: 465–474.
- Chávez-Villalba, J., R. Villelas-Ávila, C. Cáceres-Martínez. 2007. Reproduction, condition and mortality of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) in Sonora, Mexico. *Aquacult. Res.* 38: 268–278.
- Checa, A. 2000. A new model for periostracum and shell formation in Unionidae (Bivalvia, Mollusca). *Tissue Cell* 32: 405–416.
- Couturier, C., G. Newkirk. 1991. Biochemical and gametogenic cycles in scallops, *Placopecten magellanicus* (Gmelin 1791), held in suspension culture. En: Shumway, S.E., Sandifer, P.A. (eds.) *An international compendium of scallop biology and culture.* World Aquaculture Society, EUA. 107–117p.
- Crosby, M.P., L.D. Gale. 1990. A review and evaluation of bivalve condition index methodologies with a suggested standard method. *J Shellfish Res.* 9: 233–237.
- Delgado, M., A. Pérez-Camacho, U. Labarta, M.J. Fernández-Reiriz. 2004. The role of lipids in the gonadal development of the clam *Ruditapes decussatus*. *Aquaculture* 241: 395–411.
- Dharmaraj, S., D. Kandasami, K. Alagarswami. 1987. Some aspects of physiology of pearl oyster. *Central Mar. Fish. Res. Inst. Bull. (Cochin)* 39: 21–29.
- Doroudi, M.S., P.C. Southgate, R.J. Mayer. 1999. The combined effects of temperature and salinity on embryos and larvae of the black-lip pearl oyster, *Pinctada margaritifera* (L.). *Aquacult. Res.* 30: 271–277.
- Doroudi, M.S., P.C. Southgate. 2003. Embryonic and larval development of *Pinctada margaritifera* (Linnaeus, 1758). *Moll. Res.* 23: 101–107.

- Dridi, S., M.S. Romdhane, M. Elcafsi. 2007. Seasonal variation in weight and biochemical composition of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* in relation to the gametogenic cycle and environmental conditions of the Bizert lagoon, Tunisia. *Aquaculture* 263: 238–248.
- Dubois, M., K.A. Guilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers, F. Smith. 1956. Calorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28: 350–356.
- Enríquez-Díaz, M., C. Cáceres-Martínez, J. Chávez-Villalba, G. Le Pennec, M. Le Pennec. 2003. Gametogenesis of *Atrina maura* (Bivalvia: Pinnidae) under artificial conditions. *Invertebr. Reprod. Dev.* 43: 151–161.
- Epp, J., V.M. Bricelj, R.E. Malouf. 1988. Seasonal partitioning and utilization of energy reserves in two age classes of the bay scallop *Argopecten irradians irradians* (Lamarck). *J Exp. Mar. Biol. Ecol.* 121: 113–136.
- Ehteshami, F., A. Christianus, H. Rameshi, S.A. Harmin, C.R. Saad. 2011. Proximate and fatty acid composition of the gonads of wild versus hatchery-conditioned *Pinctada margaritifera* broodstock. *Aquacult. Nutr.* 17: 675–682.
- Farías, A., I. Uriarte, J.C. Castilla. 1998. A biochemical study of the larval and postlarval stages of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus*. *Aquaculture* 166: 37–47.
- Fraser, A.J. 1989. Triacylglycerol content as a condition index for fish, bivalve, and crustacean larvae. *Can. J Fish. Aquat. Sci.* 46: 1868–1873.
- Frolov, A.V., S.L. Pankov. 1992. The reproduction strategy of oyster *Ostrea edulis* L. from the biochemical point of view. *Comp. Biochem. Physiol. B* 103: 161–182.
- Gabbott, P.A. 1975. Storage cycles in marine bivalve molluscs: a hypothesis concerning the relationship between glycogen metabolism and gametogenesis.

- En: Barnes, H. (ed.) Ninth European Marine Biology Symposium, Aberdeen University Press. Aberdeen, UK. 191–211p.
- Gaffney, P.M., S.K. Allen. 1993. Hybridization among *Crassostrea* species: a review. *Aquaculture* 116: 1–13.
- Gagné, R., R. Tremblay, F. Perney, P. Miner, J.F. Samain, F. Olivier. 2010. Lipid requirement of the scallop *Pecten maximus* (L.) during larval and post-larval development in relation to addition of *Rhodomonas salina* in diet. *Aquaculture* 309: 212–221.
- Gallager, S.M., R. Mann. 1986a. Growth and survival of larvae of *Mercenaria mercenaria* (L.) and *Crassostrea gigas* (Gmelin) relative to broodstock conditioning and lipid content of eggs. *Aquaculture* 56: 105–121.
- Gallager, S.M., R. Mann. 1986b. Individual variability in lipid content of bivalve larvae qualified histochemically by absorption photometry. *J Plankton Res.* 8: 927–937.
- Gallager, S.M., R. Mann, G.C. Sasaki. 1986. Lipid as an index of growth and viability in three species of bivalve larvae. *Aquaculture* 56: 81–103.
- García-Cuellar, J.A., F.A. García-Domínguez, D. Lluch-Belda, S. Hernández-Vázquez. 2004. El Niño and La Niña effects on reproductive cycle of the pearl oyster *Pinctada mazatlanica* (Hanley, 1856) (Pteriidae) at Isla Espíritu Santo in the Gulf of California. *J Shellfish Res.* 23: 113–120.
- García-Domínguez, F.A., B.P. Ceballos-Vázquez, A. Tripp-Quezada. 1996. Spawning cycle of the pearl oyster *Pinctada mazatlanica* (Hanley, 1856) (Pteriidae) at Isla Espíritu Santo, Baja California Sur, Mexico. *J Shellfish Res.* 15: 297–303.
- Gaulejac De, B., M. Henry, N. Vicente. 1995. An ultrastructural study of gametogenesis in *Pinna nobilis* (Linnaeus 1758). I. Oogenesis. *J Moll. Stud.* 61: 375–392.

- George, S.B., J.M. Lawrence, A.L. Lawrence, J. Smiley, L. Plank. 2001. Carotenoids in the adult diet enhance egg and juvenile production in the sea urchin *Lytechinus variegatus*. *Aquaculture* 199: 353–369.
- Gervis, M.H., N.S. Sims. 1992. The biology and culture of pearl oysters (Bivalvia: Pteriidae). *ICLARM Stud. Rev.* 21. 49p.
- Giese, A.C., J.S. Pearse. 1979. Introduction: general principles. En: Giese, A.C., Pearse, J.S. (eds.) *Reproduction of marine invertebrates*. Academic Press, Nueva York. 1–49p.
- Gireesh, R., A. Biju, P. Muthiah. 2009. Biochemical changes during larval development in the short neck clam, *Paphia malabarica* Chemnitz. *Aquacult. Res.* 40: 1510–1515.
- Gómez-Robles, E., M.C. Rodríguez-Jaramillo, P.E. Saucedo. 2005. Digital image analysis of lipid and protein histochemical markers for measuring oocyte development and quality in pearl oyster *Pinctada mazatlanica* (Hanley, 1856). *J Shellfish Res.* 24: 1197–1202.
- Gómez-Robles, E., P.E. Saucedo. 2009. Evaluation of quality indices of the gonad and somatic tissues involved in reproduction of the pearl oyster *Pinctada mazatlanica* with histochemistry and digital image analysis. *J Shellfish Res.* 28: 329–335.
- González-Jiménez, A. 2012. Efecto de la temperatura y concentración de alimento sobre la ecofisiología de la concha nácar *Pteria sterna* bajo condiciones controladas de laboratorio. Tesis de Maestría, Universidad del Mar, Puerto Angel, Oaxaca.
- Granados-Amores, A. 2012. Efecto de la temperatura en el desarrollo y composición gonadal de la concha nácar *Pteria sterna* en condiciones controladas de laboratorio. Tesis de Maestría, Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, México.

- Grant, A., P.A. Tyler. 1983. The analysis of data in studies of invertebrate reproduction. II. The analysis of oocyte size/frequency data, and comparison of different types of data. *Int. J Invertebr. Reprod.* 6: 271–283.
- Halver, J.E. 1972. *Fish Nutrition*. Academic Press, New York. 713p.
- Hawkins-Martínez, M. 2012. Evaluación de la calidad de gónada y glándula digestiva de la concha nácar *Pteria sterna* (Gould, 1856) a partir del contenido de lípidos y ácidos grasos. Tesis de Maestría, Universidad del Magdalena, Colombia.
- Helm, M.M., N. Bourne, A. Lovatelli. 2006. Cultivo de bivalvos en criadero. Un manual práctico. FAO Documento técnico de pesca. No. 471. Roma, FAO. 184p.
- Heral, M., J.M. Deslous-Paoli. 1983. Energetic value of the tissue of the oyster *Crassostrea gigas* estimated by microcalorimetric measures and by biochemical evaluation. *Oceanol. Acta* 6: 193–199.
- Hernández-Díaz, A., L. Bückle-Ramírez. 1996. Ciclo gonádico de *Pteria sterna* (Gould, 1852) (Mollusca: Bivalvia) en Baja California, México. *Cienc. Mar.* 22: 495–509.
- Hernández-López, C. 2012. Efecto de la dieta en el desarrollo y composición de la gónada y tejidos somáticos relacionados con la reproducción de la concha nácar *Pteria sterna* (Gould, 1851) en el laboratorio. Tesis de Maestría, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, México.
- Hernández-Olalde, L., F. García-Domínguez, M. Arellano-Martínez, B.P. Ceballos-Vázquez. 2007. Reproductive cycle of the Pearl oyster *Pteria sterna* (Pteriidae) in the Ojo de Liebre Lagoon, B.C.S., México. *J Shellfish Res.* 26: 543–548.
- Holland, D.L. 1978. Lipid reserves and energy metabolism in the larvae of benthic marine invertebrates. En: Malin, D.C., Sargent, J.R. (eds.) *Biochemical and biophysical perspectives in marine biology*. Academic Press, London. 85–123p.

- Hurtado, M.A., M. Reza, A.M. Ibarra, M. Wille, P. Sorgeloos, P. Soudant, E. Palacios. 2009. Arachidonic acid (20:4*n*-6) effect on reproduction, immunology, and prostaglandin E₂ levels in *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1951). *Aquaculture* 294: 300–305.
- Jiménez-Illescas, A.R. 1996. Análisis de procesos barotrópicos y baroclínicos en La Bahía de La Paz, BCS. Tesis de Doctorado, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Kang, C.K., M.S Park, P.Y. Lee, W.J. Choi, W.C. Lee. 2000. Seasonal variations in condition, reproductive activity, and biochemical composition of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), in suspended culture in two coastal bays of Korea. *J Shellfish Res.* 19: 771–778.
- Kiefert, L., D. McLaurin-Moreno, E. Arizmendi-Castillo, H.A. Hänni, S. Elen. 2004. Cultured pearls from the Gulf of California, Mexico. *Gems Gemol.* 40: 26–38.
- Kim, Y., K.A. Ashton-Alcox, E.N. Powell. 2006. *Histological Techniques for Marine Bivalve Molluscs: Update*. Silver Spring, MD. NOAA Technical Memorandum NOS NCCOS 27. 76p.
- Lannan, J.E. 1980. Broodstock management of *Crassostrea gigas*. I. Genetic and environmental variation in survival in the larval rearing system. *Aquaculture* 21: 323–336.
- Lango-Reynoso, F., J. Chávez-Villalba, J.C. Cochard, M. Le Pennec. 2000. Oocyte size, a means to evaluate the gametogenic development of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture* 190: 183–199.
- Le Pennec, M., F. Gueguen, J.C. Cochard, Y.M. Paulet, G. Dorange. 1990. Relations between lipid content of oocytes of *Pecten maximus* (Mollusc, Bivalve) and larval development. *Haliotis* 10: 101–113.
- Leonardos, N., I.A.N. Lucas. 2000. The use of larval fatty acids as an index of growth in *Mytilus edulis* L. larvae. *Aquaculture* 184: 155–166.

- Liu, W.G., Q. Li, Y.D. Yuan, S.H. Zhang. 2008. Seasonal variations in reproductive activity and biochemical composition of the Cockle *Fluvia mutica* (Reeve) from the Eastern Coast of China. *J Shellfish Res* 27: 405–411.
- Lodeiros, C.J., J.J. Rengel, H.E. Guderley, O. Nusetti, J.H. Himmelman. 2001. Biochemical composition and energy allocation in the tropical scallop *Lyropecten (Nodipecten) nodosus* during the months leading up to and following the development of gonads. *Aquaculture* 199: 63–72.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A. Lewis-Farr, R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol. Chem.* 193: 265–275.
- Lubet, P. 1981. Action de la température sur le cycle de reproduction des lamellibranches. *Bull. Soc. Zool. Fr.* 106: 283–292.
- Luna-González, A., C. Cáceres-Marínez, C. Zúñiga-Pacheco, S. López-López, B.P. Ceballos-Vázquez. 2000. Reproductive cycle of *Argopecten ventricosus* (Sowerby 1842) (Bivalvia: Pectinidae) in the Rada del puerto de Pichilingue, B.C.S, Mexico and its relation to temperature, salinity, and food. *J Shellfish Res.* 19: 107–112.
- MacDonald, B.A., R.J. Thompson. 1985. Influence of temperature and food availability on the ecological energetics of the giant scallop *Placopecten magellanicus*. II. Reproductive output and total production. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 25: 295–303.
- Malara, G., R. Charra. 1972a. Dosage des protéines particulières selon la méthode de Lowry. Note interne de travail No. 5. Station Zoologique de Villefranche-Sur-Mer. France. 7p.
- Malara, G., R. Charra. 1972b. Dosage des glucides particulières du phytoplancton selon la méthode de Dubois. Note interne de travail No. 6. Station Zoologique de Villefranche-Sur-Mer. France. 7p.

- Martínez, G., C. Aguilera, L. Mettifogo. 2000. Interactive effects of diet and temperature on reproductive conditioning of *Argopecten purpuratus* broodstock. *Aquaculture* 183: 149–159.
- Martínez-Fernández, E., H. Acosta-Salmón, C. Rangel-Dávalos, A. Olivera-Bonilla, H. Ruiz-Rubio, A.K. Romo-Piñera. 2003. Spawning and larval culture of the pearl oyster *Pinctada mazatlanica* in the laboratory. *World Aquac.* 34: 36–39.
- Martínez-Fernández, E., H. Acosta-Salmón, C. Rangel-Dávalos. 2004. Ingestion and digestion of 10 species of microalgae by winged peal oyster *Pteria sterna* (Gould, 1851) larvae. *Aquaculture* 230: 417–423.
- Martínez-Fernández, E., P.C. Southgate. 2007. Use of tropical microalgae as food for larvae of the black-lip pearl oyster *Pinctada margaritifera*. *Aquaculture* 263: 220–226.
- Mason, C.J., J.A. Nell. 1995. Condition index and chemical composition of meats of Sydney rock oysters (*Saccostrea commercialis*) and Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) at four sites in Port Stephens, NSW. *Mar. Freshw. Res.* 46: 873–881.
- Mathieu, M., P. Lubet. 1993. Storage tissue metabolism and reproduction in marine bivalves – a brief review. *Invertebr. Reprod. Dev.* 23: 123–129.
- Mazón Suástegui, J.M. 1988. Acondicionamiento y desove de cuatro especies de moluscos bivalvos, alimentados con dietas artificiales. *Rev. Latinoam. Acuicult.* 38: 4–12.
- Mazón-Suástegui, J.M. 2007. Avances en el cultivo larvario y producción de semilla de *Crassostrea corteziensis* y *Nodipecten subnodosus* en el Centro de Transferencia Tecnológica (CTT). Reporte Interno CIBNOR-Cluster Acuícola, 21p.
- Mazón-Suástegui, J.M., M.C. Ruíz-García, J. Chávez-Villalba, C. Rodríguez-Jaramillo, P.E. Saucedo. 2011. Analysis of growth and first reproduction of hatchery-reared juvenile Cortez oyster (*Crassostrea corteziensis*) in northwestern Mexico: proposal of a minimal fishing size. *Aquacult. Res.* 10: 1558–1568.

- McAnally-Salas, L., E. Valenzuela-Espinoza. 1990. Crecimiento y supervivencia de larvas de la ostra concha nácar *Pteria sterna* en condiciones de laboratorio. *Cienc. Mar.* 16: 29–41.
- Mladineo, I., M. Peharda, S. Orhanović, J. Bolotin, M. Pavela-Vrančić, B. Treursić. 2007. The reproductive cycle, condition index and biochemical composition of the horse-bearded mussel *Modiolus barbatus*. *Helgol Mar. Res.* 61:183–192.
- Monteforte M., M.M. Cariño, 1992. Exploration and evaluation of natural stocks of pearl oysters *Pinctada mazatlanica* and *Pteria sterna* (Bivalvia: Pteriidae) in La Paz Bay, South Baja California, Mexico. *Ambio* 21: 314–320.
- Monteforte, M., E. Kappelman-Piña, B. López-Espinosa. 1995. Spatfall of pearl oyster *Pteria sterna* (Gould), on experimental collectors at Bahia de La Paz, South Baja California, Mexico. *Aquacult. Res.* 26: 497–511.
- Monteforte, M., H. Bervera, J.J. Ramírez, P. Saucedo, C.O. López. 2005. Effect of stocking density on growth and survival of the rainbow pearl oyster *Pteria sterna* (Gould 1852) during nursery and late culture in Bahia de La Paz, Baja California Sur, Mexico. *Aquacult. Int.* 13: 391–407.
- Mouneyrac, C., S. Linot, J.C. Amiard, C. Amiard-Triquet, I. Métais, C. Durou, C. Minier, J. Pellerin. 2008. Biological indices, energy reserves, steroid hormones and sexual maturity in the infaunal bivalve *Scrobicularia plana* from three sites differing by their level of contamination. *Gen. Comp. Endocrinol.* 157: 133–141.
- Muranaka, M.S., J.E. Lannan. 1984. Broodstock management of *Crassostrea gigas*: environmental influences on broodstock conditioning. *Aquaculture* 39: 217–228.
- Nava, M., E. Arizmendi, S. Farell, D. McLaurin. 2000. Evaluation of success in the seeding of round nuclei in *Pteria sterna* (Gould, 1851), a new species in pearl culture. *SPC Pearl Oyster Inf. Bull.* 14: 12–16.

- Ojea, J., A.J. Pazos, D. Martínez, S. Novoa, J.L. Sánchez, M. Abad. 2004. Seasonal variation in weight and biochemical composition of the tissues of *Ruditapes decussatus* in relation to the gametogenic cycle. *Aquaculture* 238: 451–468.
- Ojeda-Ramírez, J.J., J.I. Cáceres-Puig, J.M. Mazón-Suástegui, P.E. Saucedo. 2008. Nutritional value of *Pavlova* spp. (Prymnesiophyceae) for spat of the Cortez oyster *Crassostrea corteziensis* during late-nursery culturing at the hatchery. *Aquacult. Res.* 39: 18–23.
- Okumus, I., H.P. Stirling. 1998. Seasonal variations in the meat weight, condition index and biochemical composition of mussels (*Mytilus edulis* L.) in suspended culture in two Scottish sea lochs. *Aquaculture* 159: 249–261.
- Palacios, E., I.S. Racotta, O. Arjona-Leyva, Y. Marty, J.R. Le Coz, J. Moal, J.F. Samain. 2007. Lipid composition of the pacific lion-paw scallop, *Nodipecten subnodosus*, in relation to gametogenesis. 2. Lipid classes and sterols. *Aquaculture* 266: 266–273.
- Paulet, Y.M., J. Boucher. 1991. Is reproduction mainly regulated by temperature or photoperiod in *Pecten maximus*? *Invertebr. Reprod. Dev.* 19: 61–70.
- Racotta, I.S., J.L. Ramírez, A.M. Ibarra, M.C. Rodríguez-Jaramillo, D. Carreño, E. Palacios. 2003. Growth and gametogenesis in the lion-paw scallop *Nodipecten (Lyropecten) subnodosus*. *Aquaculture* 217: 335–349.
- Ramírez-Llodra, E. 2002. Fecundity and life-history strategies in marine invertebrates. *Adv. Mar. Biol.* 43: 87–170.
- Robinson, W.E., W.E. Wehling, M.P. Morse, G.C. McLeod. 1981. Seasonal changes in soft-body component indices and energy reserves in the Atlantic deep-sea scallop, *Placopecten magellanicus*. *Fish. Bull.* 79: 449–458.

- Rodríguez-Jaramillo, M.C. 2004. Efecto de la temperatura sobre la gametogénesis en el callo de hacha *Atrina maura* (Sowerby, 1835) (Bivalvia: Pinnidae). Tesis de Maestría, Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, México.
- Román, G., G. Martínez, O. García, L. Freitas. 2002. Reproducción. En: Maeda-Martínez, A.N. (ed.) Los moluscos pectínidos de Iberoamérica: Ciencia y acuicultura. Editorial Limusa, México. 27–60p.
- Rose, R.A., S.B. Baker. 1994. Larval and spat culture of the Western Australian silver- or goldlip pearl oyster, *Pinctada maxima* Jameson (Mollusca: Pteriidae). *Aquaculture* 126: 35–50.
- Ruíz-Rubio, H., H. Acosta-Salmón, A. Olivera, P.C. Southgate, C. Rangel-Dávalos. 2006. The influence of culture method and culture period on quality of half-pearls ('mabé') from the winged pearl oyster *Pteria sterna*, Gould, 1851. *Aquaculture* 254: 269–274.
- Saout, C., C. Quéré, A. Donval, Y.M. Paulet, J.F. Samain. 1999. An experimental study of the combined effects of temperature and photoperiod on reproductive physiology of *Pecten maximus* from the Bay of Brest (France). *Aquaculture* 172: 301–314.
- Sargent, J.R. 1995. Origins and function of egg lipids: nutritional implications. En: Bromage, N.R., Robert, R.J. (eds.) *Broodstock management and egg and larval quality*. Blackwell Science, Oxford, UK. 353–372p.
- Sastry, A.N. 1979. Pelecypoda (Excluding Ostreidae). En: Giese A.C., Pearse J.S. (eds.) *Reproduction of marine invertebrates. Molluscs: Pelecypods and lesser classes*. Academic Press, USA. 113–265p.
- Sato, N., N. Murata. 1988. Membrane lipids. *Methods Enzymol.* 167: 251–259.

- Saucedo, P., M. Monteforte. 1997. Breeding cycle of pearl oysters *Pinctada mazatlanica* (Hanley 1856) and *Pteria sterna* (Gould 1851) at Bahía de La Paz, Baja California Sur, Mexico. *J Shellfish Res.* 16: 103–110.
- Saucedo, P.E., I.S. Racotta, H. Villarreal, M. Monteforte. 2002. Seasonal changes in the histological and biochemical profile of the gonad, digestive gland, and muscle of the Calafia mother-of-pearl oyster *Pinctada mazatlanica* (Hanley, 1856) associated with gametogenesis. *J Shellfish Res.* 21: 127–135.
- Saucedo, P.E., P. Ormart-Castro, M. Osuna-García. 2007. Towards development of large-scale hatchery cultivation of larvae and spat of the pearl oyster *Pinctada mazatlanica* (Hanley, 1856) in Mexico. *Aquaculture* 273: 478–486.
- Saucedo, P.E., P.C. Southgate. 2008. Reproduction, development, and growth. En: Southgate P.C., Lucas J.S. (eds.) *The pearl oyster: biology and culture*. Elsevier Science, Oxford, UK. 129–184p.
- Serna-Gallo, M.I. 2011. Crecimiento y ciclo reproductivo de la concha nácar *Pteria sterna* cultivada en la Bahía de Acapulco. Tesis de Maestría, Universidad Autónoma de Nayarit, México.
- Serrano-Guzmán, S.J, D. Salinas-Ordáz. 1993. Cultivo de larvas y producción de semilla de *Pteria sterna* (Mollusca: Bivalvia) en un criadero comercial. *Rev. Inv. Cient.* 4: 81–90.
- Sevilla, M.L. 1969. Contribución al conocimiento de la madreperla *Pinctada mazatlanica* (Hanley, 1845). *Rev. Soc. Mex. Hist. Nat.* 30: 223–262.
- Signoret, M., H. Santoyo. 1980. Aspectos ecológicos de la Bahía de La Paz, Baja California Sur. *An. Inst. Nac. Cienc. Mar. Limnol., Univ. Nal. Autón. Mex.* 7: 217–248.

- Smith, P.K., R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Geoke, B.J. Olson, D.C. Klenk. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150: 76–85.
- Sokal, R.R., Rohlf, F.J. 1995. *Biometry: the principles and practice of statistics in biological research.* W.H. Freeman. Third edition. San Francisco, USA. 880p.
- Soudant, P., Y. Marty, J. Moal, R. Robert, C. Quéré, J.R. Le Coz, J.R. Samain. 1996. Effect of food fatty acid and sterol quality on *Pecten maximus* gonad composition and reproduction process. *Aquaculture* 143: 361–378.
- Southgate, P.C., A.C. Beer. 1997. Hatchery and early nursery culture of the blacklip pearl oyster (*Pinctada margaritifera* L.). *J Shellfish Res.* 16: 561–567.
- Spannhof, L. 1966. *Histoquímica práctica.* Editorial Acribia, Zaragoza, España. 195p.
- Taylor, J.J. 1999. Spat production, nursery rearing and grow-out of the silver-lip pearl oyster, *Pinctada maxima* (Jameson). Tesis de Doctorado, James Cook University, Australia.
- Utting, S.D. 1993. Procedures for the maintenance and hatchery-conditioning of bivalve broodstocks. *World Aquac.* 24: 78–82.
- Van Handel, E. 1965. Estimation of glycogen in small amounts of tissue. *Anal. Biochem.* 11: 256–265.
- Vershinin, A., O.N. Lukyanova. 1993. Carotenoids in the developing embryos of sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*. *Comp. Biochem. Physiol. B* 104: 371–373.
- Victor, A.C.C., A. Chellam, S. Dharmaraj, T.S. Velayudhan. 1995. *Manual on pearl oyster seed production, farming and pearl culture.* CMFRI, Special Publication, No. 63. India. 53p.
- Villalejo-Fuerte M., B.P. Ceballos-Vázquez. 1996. Variación de los índices de condición general, gonádico y de rendimiento muscular en *Argopecten circularis* (Bivalvia: Pectinidae). *Rev. Biol. Trop.* 44: 591–594.

- Vite-García, M.N., P.E. Saucedo. 2008. Energy storage and allocation during reproduction of Pacific winged pearl oyster *Pteria sterna* at Bahía de La Paz, Baja California Sur, Mexico. *J Shellfish Res.* 27: 375–383.
- Widdows, J., P. Fieth, C.M. Worrall. 1979. Relationships between seston, available food and feeding activity in the common mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.* 50: 195–207.
- Yukihira, H., D.W. Klumpp, J.S. Lucas. 1999. Feeding adaptations of the pearl oysters *Pinctada margaritifera* and *P. maxima* to variations in natural particulates. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 182: 161–173.
- Yukihira, H., D.W. Klumpp, J.S. Lucas. 2006. The pearl oysters, *Pinctada maxima* and *P. margaritifera*, respond in different ways to culture in dissimilar environments. *Aquaculture* 252: 208–224.

11. ANEXOS

Artículo publicado

Gómez-Robles, E., J.M. Mazón-Suástegui, H. Acosta-Salmón, M. Hawkyns-Martínez and P.E. Saucedo. 2013. Internal nutrient management associated with gonad quality and successful reproduction in the winged pearl oyster *Pteria sterna*. *Aquaculture* 412: 45–51.

Artículo sometido

Eliana Gómez-Robles, Pedro E. Saucedo, Héctor Acosta-Salmón, Martha Hawkyns-Martínez and José M. Mazón-Suástegui. Larval performance of the winged pearl oyster *Pteria sterna* and its relation to broodstock condition and environmental factors.