



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

EFFECTO DE LA DIETA EN EL DESARROLLO Y
COMPOSICIÓN DE LA GÓNADA Y TEJIDOS
SOMÁTICOS DE LA CONCHA NÁCAR *Pteria sterna*
(GOULD, 1851)

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
Orientación: Acuicultura

Presenta

CRISTAL GUADALUPE HERNÁNDEZ LÓPEZ

La Paz, Baja California Sur, [Febrero] de [2012]

ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 12:00 horas del día 23 del Mes de febrero del 2012, 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:

“Efecto de la dieta en el desarrollo y composición de la gónada y tejidos somáticos de la concha nácar *Pteria sterna* (Gould, 1851)”

Presentada por el alumno:

Cristal Guadalupe Hernández López

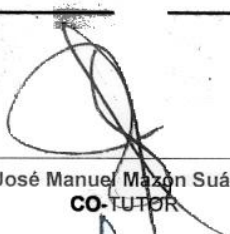
Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN **ACUICULTURA**

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 Enrique Saucedo Lastra
DIRECTOR DE TESIS


Dra. María Concepción Lora Vilchis
CO-TUTOR


Dr. José Manuel Mazón Suástegui
CO-TUTOR


DRA. FELISA SERVIERE ZARAGOZA
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

COMITÉ TUTORIAL

Dr. Pedro Enrique Saucedo Lastra
Director de tesis
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

Dr. José Manuel Mazón Suástegui
Tutor
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

Dra. María Concepción Lora Vilchis
Tutor
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

COMITÉ REVISOR

Dr. Pedro Enrique Saucedo Lastra
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

Dr. José Manuel Mazón Suástegui
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

Dra. María Concepción Lora Vilchis
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

JURADO DE EXAMEN DE GRADO

Dr. Pedro Enrique Saucedo Lastra
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

Dr. José Manuel Mazón Suástegui
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

Dra. María Concepción Lora Vilchis
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

Dr. Teodoro Reynoso Granados
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste
Suplente

Resumen

En los moluscos bivalvos, el proceso reproductivo está regulado por una compleja interacción de factores abióticos y bióticos, de entre los cuales la temperatura y la disponibilidad de alimento revisten particular importancia. En la concha nácar *Pteria sterna* se desconoce de qué manera influye la dieta en el desarrollo y composición de la gónada y los tejidos somáticos involucrados en el almacenamiento de energía, así como el efecto de complementar la dieta microalgal con alimentos artificiales de diferente perfil nutricional (carbohidratos y lípidos principalmente). Se recolectaron 132 organismos en Bahía La Paz fuera de la temporada reproductiva y se mantuvieron a una temperatura constante de 23 ± 1 °C en un sistema de flujo continuo. Las raciones de alimento fueron estimadas con base al peso seco de los tejidos de los individuos (PS). Las dietas experimentales fueron: (A) un grupo control consistente en el 100% de una dieta preparada con las microalgas *Isochrysis galbana*, *Pavlova salina* y *Chaetoceros calcitrans*, en una proporción 1:1:1 y con base al 2% del PS; las dietas B y C incluyeron la dieta control complementada con fécula de maíz al 1 y 2% del PS, respectivamente; y las dietas D y E incluyeron la dieta control complementada, respectivamente al 1 y 2% del PS con microcápsulas (GAM) preparados en el laboratorio con Omega-Mex DHA30[®] comercial. Se obtuvieron las tallas de los organismos (0.1 mm) y pesos (0.1 g) al inicio y final del experimento, así como muestras de gónada, glándula digestiva, músculo y manto. Con las muestras de glándula digestiva-gónada se calculó un índice de cobertura de tejido gonádico (ITG) y con los restantes tejidos se determinaron los índices de condición (IC) y rendimiento muscular (IRM). A su vez, las muestras de tejidos se destinaron a estudios histológicos (desarrollo gonádico), histoquímicos (índices lipídico y glucídico) y bioquímicos (concentraciones de proteínas, carbohidratos y lípidos). Las variaciones en el IC y el IRM no resultaron significativas para ninguno de los tratamientos ($P > 0.05$). Se obtuvo un bajo número de hembras, las cuales mostraron un ITG por arriba del 50%, mientras que para los machos sus valores estuvieron por debajo del 40%. Los análisis histoquímicos mostraron que hay una mayor presencia de lípidos en la glándula digestiva (entre 30 y 50%) que en el resto de los tejidos, incluyendo la gónada. También pudo observarse una mayor acumulación de carbohidratos en el tejido conjuntivo (20 y 30%). La glándula digestiva resultó el tejido con mayor acumulación de carbohidratos y lípidos, estos últimos con una concentración significativa en el tratamiento con 2% PS de GAM ($P < 0.05$). En cuanto a las proteínas, el músculo presentó la mayor concentración con los niveles más altos en el tratamiento control ($> 670 \text{ mg/g}^{-1}$). En el tejido gonádico, se observó un decremento en la concentración de carbohidratos con respecto al valor inicial, obteniendo mayores niveles en los tratamientos suplementados al 1 y 2% con fécula de maíz ($P < 0.05$); las proteínas se mantuvieron en niveles por arriba de los 400 mg/g^{-1} , mientras que los lípidos obtuvieron los mayores concentraciones con respecto a los otros tejidos, destacando los tratamientos suplementados al 1 y 2% GAM. Estos resultados ayudarán a definir las necesidades nutricionales de *P. sterna* en condiciones de laboratorio.

Palabras clave: alimento artificial, histología, *P. sterna*, desarrollo gonádico

abstract

"Effect of diet on the development and composition of the gonad and somatic tissues of the winged pearl oyster *Pteria sterna* (Gould, 1851)"

In bivalve molluscs, the reproductive process is regulated by a complex interaction of abiotic and biotic factors, among which temperature and food availability play a key role. In the winged pearl oyster *Pteria sterna*, it is yet unknown the influence of the diet on development and composition of the gonad and somatic tissues involved in energy storage, as well as the effect of supplementing the algal diet with artificial feeds of different nutritional profile (mainly carbohydrates and lipids). A total of 132 organisms were collected from a submarine trestle in Bahia La Paz off the natural breeding season and were kept at a constant temperature of 23 ± 1 ° C with a continuous flow-through system. Estimations of food rations were based on the dry weight of soft tissues of individuals (DW). The experimental diets included: (A) a control group consisting of 100% of a diet prepared with the microalgae *Isochrysis galbana*, *Pavlova salina* and *Chaetoceros calcitrans*, at a 1:1:1 ratio and on the basis of 2% DW; (B and C) included the control diet supplemented with commercial corn starch at 1 and 2% DW, respectively; and (D and E) included the control diet supplemented with gelatin-acacia microcapsules (GAM) at 1 and 2% DW respectively, which were prepared from HUFA-rich commercial Omega-Mex DHA30[®]. The size (0.1 mm) and weight (0.1 g) of organisms were determined at the beginning and end of the experiment, together with samples of the gonad, digestive gland, adductor muscle, and mantle. With the samples of the gonad and digestive gland we calculated an index of tissue coverage (ITG) and the remaining tissues were used for determining a condition index (CI) and muscle performance index (MPI). In turn, all tissue samples were used for histological (gonad development, sex ratio, oocyte size), histochemical (measurement of lipid and carbohydrate droplets within oocytes) and biochemical (concentration of protein, carbohydrate and lipid substrates) analyses. The variations in the CI and MPI were not significant between treatments. The presence of females was a low throughout the study and yielded values of ITG above 50% in all treatments, while the ITG was below 40% for males. Histochemical analysis showed there was a greater content of lipid droplets in the digestive gland (30 to 50%) than in other tissues, including the gonad. We also observed a greater accumulation of carbohydrate granules in the tissue (20 and 30%) in conjunctive tissue. The digestive gland accumulated more carbohydrates and lipids, the latter with a significant concentration in those oysters supplemented with 2% DW GAM. In contrast, the muscle had the highest protein concentration in the control group (> 670 mg/g⁻¹). In the gonad there was a decrease in the carbohydrate concentration from baseline, achieving significantly higher levels in the treatment supplemented at 1 and 2% with corn starch. Protein levels remained above of 400 mg/g⁻¹ in gonadic tissue, while lipid concentrations were higher compared to other tissues, particularly in the oysters supplemented at 1 and 2% with GAM. These results help to define the nutritional requirements of *P. sterna* under laboratory conditions.

Keywords: microalgae; artificial feeds, *Pteria sterna*, gonad development

Dedicatoria

A mis padres, Rosy y Cristobal

Por su amor, esfuerzo, dedicación y apoyo en todo momento, por enseñarme el valor de las cosas y del trabajo; este también es un logro de ustedes.

A mis hermanos Alfredo y Cristobal, por su cariño, amor y comprensión.

A mis abuelos, ejemplo de trabajo y esfuerzo que me acompañan siempre, Isabel y Francisco Luz y Cristobal.

Alana y Jesús, la chispa de nuestra familia

Agradecimientos

Al CIBNOR, particularmente a la Dirección de Estudios de Posgrado, por las facilidades y el apoyo otorgado durante mi permanencia como estudiante en esta institución. Al CONACyT por la beca otorgada. A la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco por incluirme en el Programa Institucional de Superación Académica 2010. El apoyo económico de ambas instituciones me permitió dedicarme en tiempo completo a la culminación de mis estudios.

Durante la realización de este trabajo fue muy importante la participación del personal de varios laboratorios del CIBNOR, a quien agradezco infinitamente su disposición, amabilidad y orientación para cada etapa descrita en este documento.

En primer lugar al personal del Laboratorio de Moluscos, Mario Osuna García, Pablo Ormart Castro, Guadalupe Leyva Miranda, Gabriel Robles Villegas. Gracias a todos, su ayuda fue muy importante en el desarrollo de este experimento.

Del Laboratorio de Histología, a María del Carmen Rodríguez Jaramillo y María Eulalia Meza, por su invaluable apoyo y entrenamiento técnico y académico para la realización de este trabajo. Gracias por su ayuda y sobre todo por su amistad, es un laboratorio donde se trabaja con mucha alegría.

A Roberto Hernández Herrera del Laboratorio de Bioquímica Fisiológica por su entrenamiento y apoyo durante la realización de los análisis correspondientes.

A todo el personal del Laboratorio de Microalgas, Cynthia Aldana, Julián Garzón, Adriana Greene, Eleonora Puente, que diariamente me proporcionaron el alimento para los organismos experimentales durante el desarrollo de mi trabajo.

A la Dra. Teresa Sicard y a los técnicos Rosa Linda Salgado García y Gilberto González Soriano, por las facilidades otorgadas para la realización de las biometrías en el Laboratorio de Ecofisiología de organismos acuáticos. Así también a Sonia Rocha Meza y Dolores Rondero Astorga del laboratorio de bromatología, y a Patricia Hinojosa Baltazar del lab.de fisiología comparada gracias por su apoyo en las instalaciones, uso y manejo de equipo, fue muy importante en el desarrollo del experimento.

A Héctor Acosta Salmón por su valiosa asesoría para la realización de este trabajo.

A mi tutor el Dr. Pedro Saucedo, gracias *Doc* por darme la oportunidad y confiar en mí, por alentarme y apoyarme, académica y moralmente, pero sobre todo gracias por su paciencia.

A mis asesores, Dra. Cony, gracias por sus observaciones, comentarios, pero sobre todo por su interés en mejorar este trabajo. Al Dr. Manuel Mazón le agradezco su confianza y su apoyo, muy importantes sobre todo en estos tiempos extras.

No podría dejar de agradecer a todos los amigos que estuvieron para apoyarme y alentarme: Oscar, Andrés eres el culpable que volviera al CIBNOR.

A mis amigos de la generación 2009-2011 y anexos, por esos buenos momentos que nos hicieron la estancia fácil y divertida.

Finalmente mi más grande y profundo agradecimiento es a ustedes, Rosy y Cristóbal, por enseñarnos lo esencial de la vida: el amor a la familia. Gracias por impulsarme siempre a superarme, por demostrarme su amor en todo momento, que vale la pena todo el esfuerzo y el trabajo, este es un logro de ustedes, me siento muy orgullosa de ser su hija.

Contenido

Resumen.....	i
abstract.....	ii
Dedicatoria.....	iii
Agradecimientos	iv
Contenido.....	vi
Lista de figuras.....	viii
Lista de tablas	xi
1. Introducción.....	1
2. Antecedentes.....	4
2.1. Estudios sobre el uso de dietas naturales en moluscos bivalvos.....	4
2.2. Estudios sobre la determinación de los requerimientos nutricionales en moluscos bivalvos.....	6
2.3. Estudios sobre el uso de alimentos alternativos en moluscos bivalvos	7
3. Justificación	12
4. Objetivos.....	13
4.1. Objetivo general.....	13
4.2. Objetivos específicos	13
5. Hipótesis	14
6. Materiales y métodos	15
6.1. Recolección y aclimatación de organismos	15
6.2. Estimación de peso seco de los organismos y las raciones alimentarias	15
6.3. Cultivo de microalgas y preparación de alimentos artificiales	16
6.4. Muestreo inicial	18
6.5. Diseño experimental	20
6.5.1. Manejo de organismos experimentales.....	21
6.6. Determinación de la condición general de los organismos.....	23
6.7. Análisis histológico y digital de imágenes	23
6.8. Análisis histoquímico y digital de imágenes	25
6.9. Análisis bioquímico	27
6.10. Tratamiento estadístico de los datos	27
7. Resultados.....	29
7.1. Análisis inicial de tallas de los organismos	29
7.2. Condición general de los organismos	29
7.3. Análisis histológico y digital de imágenes	31
7.3.1. <i>Proporción sexual y desarrollo gonádico de los organismos</i>	31
7.3.2. <i>Talla de ovocitos</i>	36
7.3.3. <i>Índice de tejido gonádico (ITG)</i>	37
7.4. Análisis histoquímico y digital de imágenes	39
7.4.1. <i>Gónada</i>	39
7.4.2. <i>Glándula digestiva</i>	41
7.4.3. <i>Tejido conjuntivo</i>	43
7.5. Análisis bioquímico	45

7.5.1. Gónada.....	45
7.5.2. Glándula digestiva.....	47
7.5.3. Músculo.....	49
7.5.4. Manto.....	51
8. Discusión.....	53
8.1. Consideraciones generales sobre la ración alimenticia y manejo de las dietas y su efecto en el desarrollo y composición de la gónada y tejidos somáticos de <i>P. sterna</i>	53
8.2. Evidencia de los índices de condición y análisis histológicos, histoquímicos y bioquímicos.....	58
9. Conclusiones.....	67
10. Literatura citada.....	68
11. Anexos.....	83

Lista de figuras

- Figura 1. Procedimientos aplicados para biometría (a) y disección (b) de organismos experimentales (*P. sterna*), para obtener muestras de tejidos para histología, histoquímica y análisis bioquímico. 19
- Figura 2. Unidades experimentales (a) y alimentadores (b y c) para suministro continuo de microalgas y complementos artificiales, a reproductores de (*P. sterna*). 22
- Figura 3. Microfotografías de cortes histológicos de glándula digestiva de *P. sterna*: A) selección utilizada para el cálculo del índice de tejido gonádico (ITG) a 20X, la zona punteada indica el tejido gonádico; B) Regiones localizadas de los cortes utilizados para los cálculos histoquímicos (4X); C) tinción Azul Alciano Pas para identificación de carbohidratos (CHOS) a 20X en glándula digestiva; D) tinción Sudan Negro B para identificación de lípidos (Lip) a 20X en glándula digestiva. 26
- Figura 4. Variaciones en el Índice de Condición (IC) de organismos de *P. sterna* alimentados con diferentes dietas durante 30 días. Se muestran las medias \pm error estándar. A= Control; B= 1% MAZ; C= 2% MAZ; D= 1% GAM; E= 2% GAM. 30
- Figura 5. Variaciones en el Índice de Rendimiento Muscular (IRM) de organismos de *P. sterna* alimentados con diferentes dietas durante 30 días. Se muestran las medias \pm error estándar. A= Control; B= 1% MAZ; C= 2% MAZ; D= 1% GAM; E= 2% GAM. 30
- Figura 6. Proporción de sexos en organismos de *P. sterna* alimentados con diferentes dietas durante 30 días. Se muestran en porcentaje del total de organismos por tratamiento. A= Control; B= 1% MAZ; C= 2% MAZ; D= 1% GAM; E= 2% GAM. 31
- Figura 7. Fases de desarrollo gonádico de hembras y machos de *P. sterna* alimentados con diferentes dietas durante 30 días. Se muestran en porcentaje del total de hembras identificadas. A= Control; B= 1% MAZ; C= 2% MAZ; D= 1% GAM; E= 2% GAM. DES= Desarrollo, MAD= Madurez, DSP= Desove Parcial, PSD= Postdesove. 33
- Figura 8. Microfotografías de gónadas (20X) de *P. sterna* teñidas con azul alciano pas, donde se muestran diferentes estadios de desarrollo: I=indiferenciado DES= Desarrollo, MAD= Madurez, DSP= Desove Parcial, PSD= Postdesove. 34
- Figura 9. Microfotografía de una gónada (20X) hermafrodita de *P. sterna* teñida con Azul Alciano Pas. El corte corresponde a un organismo alimentado con MAZ al 2% a los 15 días. ER= espermias residuales, O1= ovocito previtelogénico, O2= ovocito vitelogénico temprano, O3= ovocito vitelogénico avanzado. 35
- Figura 10. Microfotografía de una gónada (20X) hermafrodita de *P. sterna* teñida con Azul Alciano Pas. El corte corresponde a un organismo alimentado con MAZ al 1% a los 30 días. E6= espermatozoides maduros, O1= ovocito previtelogénico. 35

- Figura 11. Variaciones temporales en el diámetro teórico de ovocitos de hembras de *P. sterna* alimentadas con diferentes dietas durante 30 días. Se muestran las medias \pm error estándar. Las letras diferentes reflejan diferencias significativas entre tratamientos ($P \leq 0.05$) por tiempo experimental. A= Control; B= 1% MAZ; C= 2% MAZ; D= 1% GAM; E= 2% GAM..... 36
- Figura 12. Variaciones temporales en el índice de tejido gonádico (ITG) de hembras y machos de *P. sterna* alimentados con diferentes dietas durante 30 días. A= Control; B= 1% MAZ; C= 2% MAZ; D= 1% GAM; E= 2% GAM..... 38
- Figura 13. Variaciones en el índice glucídico (IG) e índice lipídico (IL) de la gónada de reproductores de *P. sterna* alimentados con diferentes dietas durante 30 días. Se muestran las medias \pm error estándar. A= Control; B= 1% MAZ; C= 2% MAZ; D= 1% GAM; E= 2% GAM..... 40
- Figura 14. Variaciones en el índice glucídico (IG) e índice lipídico (IL) de la glándula digestiva de reproductores de *P. sterna* alimentados con diferentes dietas durante 30 días. Se muestran las medias \pm error estándar. Las distintas letras indican diferencias significativas entre tratamientos ($P \leq 0.05$) después de Kruskal-Wallis. A= Control; B= 1% MAZ; C= 2% MAZ; D= 1% GAM; E= 2% GAM..... 42
- Figura 15. Variaciones en el índice glucídico (IG) e índice lipídico (IL) del tejido conjuntivo de reproductores de *P. sterna* alimentados con diferentes dietas durante 30 días. Se muestran las medias \pm error estándar. Las distintas letras indican diferencias significativas entre tratamientos ($P \leq 0.05$) después de Kruskal-Wallis. A= Control; B= 1% MAZ; C= 2% MAZ; D= 1% GAM; E= 2% GAM..... 44
- Figura 16. Variaciones en el contenido de carbohidratos, lípidos y proteínas de la gónada de reproductores de *P. sterna* alimentados con diferentes dietas durante 30 días. Se muestran las medias \pm error estándar. diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos ($P \leq 0.05$) por tiempo experimental, después de Kruskal-Wallis. A= Control; B= 1% MAZ; C= 2% MAZ; D= 1% GAM; E= 2% GAM..... 46
- Figura 17. Variaciones en el contenido de carbohidratos, lípidos y proteínas de la glándula digestiva de reproductores de *P. sterna* alimentados con diferentes dietas durante 30 días. Se muestran las medias \pm error estándar. diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos ($P \leq 0.05$) por tiempo experimental, después de Kruskal-Wallis. A= Control; B= 1% MAZ; C= 2% MAZ; D= 1% GAM; E= 2% GAM..... 48
- Figura 18. Variaciones en el contenido de carbohidratos, lípidos y proteínas del músculo de reproductores de *P. sterna* alimentados con diferentes dietas durante 30 días. Se muestran las medias \pm error estándar. diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos ($P \leq 0.05$) por tiempo experimental, después de Kruskal-Wallis. A= Control; B= 1% MAZ; C= 2% MAZ; D= 1% GAM; E= 2% GAM..... 50

- Figura 19. Variaciones en el contenido de carbohidratos, lípidos y proteínas del manto de reproductores de *P. sterna* alimentados con diferentes dietas durante 30 días. Se muestran las medias \pm error estándar. diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos ($P \leq 0.05$) por tiempo experimental, después de Kruskal-Wallis. A= Control; B= 1% MAZ; C= 2% MAZ; D= 1% GAM; E= 2% GAM..... 52
- Figura 20. Microfotografía (20X) se muestra la reabsorción de gametos femeninos en *P. sterna*. OA= ovocitos atrésicos. Tinción azul alciano pas. 91
- Figura 21. Microfotografía (20X) se muestra la reabsorción de gametos masculinos en *P. sterna*. OA= ovocitos atrésicos. Tinción azul alciano pas. 91
- Figura 22. Microfotografía (20X) donde se indica la presencia de hemocitos en tejido conjuntivo de *P. sterna*. Tinción azul alciano pas. 92
- Figura 23. Microfotografía (20X) donde se indica la presencia de hemocitos en tejido conjuntivo de *P. sterna*. Tinción azul alciano pas. 92
- Figura 24. Microfotografía (20X) donde se muestran las lipofuscinas presentes en tejido conjuntivo de *P. sterna*. Tinción azul alciano pas. 93
- Figura 25. Microfotografía (20X) donde se muestran las lipofuscinas presentes en tejido conjuntivo de *P. sterna*. Tinción afp para lipofuscinas. 93

Lista de tablas

- Tabla I. Diseño experimental para organismos adultos de *P. sterna* donde se expresan las diferentes dietas a suministrar, los alimentos correspondientes y su ración alimenticia diaria durante 30 días. 21
- Tabla II Resultados de las pruebas de normalidad y homogeneidad de varianzas de altura, longitud de la concha y peso húmedo total de adultos de *P. sterna* al inicio del bioensayo. 29
- Tabla III. Concentraciones promedio (μM) de nitritos (NO_2) nitratos (NO_3) amonio (NH_4), sólidos disueltos totales (SDT) y sólidos suspendidos totales (SST) de agua por tratamiento experimental de organismos de *P. sterna* alimentados con diferentes dietas naturales y artificiales en el laboratorio en diferentes tiempos experimentales, 5, 15 y 30 días. BC= blanco, agua de mar filtrada sin organismos ni alimento, A= Control; B= 1% MAZ; C= 2% MAZ; D= 1% GAM; E= 2% GAM. 88
- Tabla IV. Porcentajes de peso seco de organismos de *P. sterna* alimentados con una dieta microalgal complementada con alimentos artificiales para la determinación de las raciones. 89
- Tabla V. Peso seco de tres especies de microalgas a utilizar en experimento de dietas con organismos de *P. sterna* durante 30 días (modificado de Helm, 2006). 89
- Tabla VI. Contenido energético de las dietas suministradas a organismos de *P. sterna* durante 30 días. Se expresan en peso seco (PS). A= Control; B= 1% MAZ; C= 2% MAZ; D= 1% GAM; E= 2% GAM. Mazón-Suástegui *et al.*, 2008; Lora-Vilchis, 2004. 90

1. Introducción

De acuerdo al último anuario de la FAO publicado en 2011, la producción mundial de peces, crustáceos y moluscos durante 2008 fue de 142,287,124 t, de las cuales México aportó 1,739,922 t, es decir, 1.21% del total. Estos datos indican que México ocupa el lugar número 25 y su producción genera \$USD 531,449.00 anuales. En lo que respecta a la acuicultura, se produjeron 52,546,205 t a nivel mundial, correspondiendo a México el 0.28% con 151,065 t de peces, crustáceos y moluscos cultivados.

La producción acuícola en México está liderada por los crustáceos (130,320 t y 86.26% del total nacional), seguida por las 7,322 t que corresponden a moluscos, con el 4.84% del total. Las especies de moluscos reportadas en las estadísticas de cultivo (FAO, 2008) son: *Haliotis rufescens*, *Haliotis* spp., *Crassostrea gigas*, *C. virginica*, *C. corteziensis*, *Argopecten ventricosus* y algunos miembros de la familia Mytilidae (mejillones). En el estado de Baja California Sur en particular se cuenta con no menos de 10 especies de moluscos bivalvos susceptibles de ser cultivadas en forma extensiva o intensiva, tales como: la almeja voladora (*Euvola ziczac*), la almeja mano de león (*Nodipecten subnodosus*), el hacha china y el hacha larga (*Atrina maura* y *Pinna rugosa*), la almeja blanca (*Megapitaria aurantiaca*), la almeja chocolate negra y roja (*Megapitaria squalida* y *M. aurantiaca*) y las ostras perleras (*Pinctada mazatlanica* y *Pteria sterna*). Estas dos últimas especies, que pertenecen a la familia Pteriidae, son las más importantes productoras de perlas a nivel mundial (Fassler, 1991; Saucedo, 1995; Monteforte, 1996; Saucedo, 2001; Haws, 2002; FAO, 2008).

De acuerdo con FAO (2011), para el cultivo de ostras perleras (nacaricultura) y de perlas (perlicultura), se reporta una producción de 21,579 t en 2008, que generó \$USD 115,659.00 en países como China, Islas Fiji, Polinesia Francesa, Indonesia y Papúa Nueva Guinea. En estas cifras se incluyen perlas, madreperlas y conchas, destacando las especies del género *Pinctada* (*P. fucata*, *P. margaritifera* y *P. maxima*) y *Pteria penguin*. Sin embargo, debe considerarse que la misma FAO reconoce que estas cifras son incompletas.

En México, la Concha Nácar *P. sterna* tiene gran importancia, ya que ha sido utilizada en el Noroeste del país para sustentar la operación de granjas perleras. Existen empresas que cultivan la concha nácar a escala comercial y la madreperla *P. mazatlanica* a escala piloto. En el área de Guaymas, Sonora se ubica Perlas Únicas S.A. de C.V. (antes Perlas del Mar del Cortés S.A. de C.V) y en la Bahía de La Paz, B.C.S. se localiza la empresa Perlas del Cortés S. de R.L. M.I. En ambas localidades, las dos especies producen perlas de alta calidad y poseen reconocimiento internacional (Kiefert *et al.*, 2004).

Las ostras perleras pueden aprovecharse integralmente, ya que además de la producción de perlas, la concha puede ser utilizada en la elaboración de objetos ornamentales y para la fabricación de joyería de fantasía; el nácar se destina a la industria farmacéutica y cosmética para elaboración de cremas de belleza, así como para la reconstrucción de huesos rotos y regeneración de la médula ósea; el músculo aductor para consumo humano en diversas presentaciones; y el resto del cuerpo para alimentación de otros organismos de cultivo (Monteforte, 1990; Saucedo, 2001).

Las ostras perleras son un recurso biológico con un gran potencial de aprovechamiento, por lo que los esfuerzos para desarrollar su cultivo no han cesado. La industria de perlas en México tiene un grado de desarrollo incipiente y requiere de apoyos para su desarrollo. En este sentido, es necesario generar nuevo conocimiento para conocer los factores que permiten un adecuado manejo de las especies perlícolas, sobre todo durante su período reproductivo. Una de las partes esenciales del proceso de cultivo es asegurar una producción continua y suficiente de semilla en condiciones de laboratorio. Su disponibilidad permitiría contribuir al desarrollo de la perlicultura en México.

En las ostras perleras, así como en la mayoría de los moluscos bivalvos, el proceso reproductivo está controlado por una compleja combinación de factores exógenos (profundidad, periodos lunares, temperatura, abundancia y disponibilidad de alimento, fotoperiodo) y endógenos (genéticos, hormonales, neuroendocrinos), los cuales condicionan el inicio y término de la gametogénesis, la maduración y desove de los gametos y su reabsorción para el reciclamiento de los nutrientes (Bayne, 1976; Lubet,

1981; Baber y Blake, 1991; Saucedo y Southgate, 2008). De estos, los factores exógenos como la temperatura y la disponibilidad de alimento revisten particular importancia, pues ejercen un mayor efecto sobre el ciclo reproductivo de los bivalvos (Gosling, 2003), incluidas las ostras perleras (Saucedo y Southgate, 2008).

Hasta el momento, la mayoría de los trabajos existentes sobre el proceso reproductivo en las ostras perleras *P. mazatlanica* y *P. sterna* se han centrado casi por completo en los organismos silvestres, de los que ya se han descrito los ciclos reproductivos anuales (Sevilla, 1969; García-Domínguez *et al.*, 1996; Saucedo y Monteforte, 1997); el esfuerzo reproductivo invertido en la gametogénesis (Cáceres-Puig *et al.*, 2007); los ciclos de almacenamiento y utilización de energía (Vite-García y Saucedo, 2008), y la definición de indicadores finos de calidad de tejidos germinales y somáticos (Gómez-Robles *et al.*, 2005; Gómez-Robles y Saucedo, 2008). Sin embargo, a pesar de la generación de estos conocimientos, existe en contraparte un vacío significativo de información sobre los requerimientos fisiológicos y nutricionales de los organismos en condiciones de laboratorio. Para la parte de nutrición en particular, se desconoce de qué manera influye la dieta sobre el desarrollo y composición de los tejidos involucrados en el almacenamiento de energía para el crecimiento y reproducción de los organismos.

Por esta razón, el presente estudio, tiene como principal objetivo analizar el efecto de la dieta natural por excelencia (microalgas), complementada en diferentes porcentajes de la biomasa seca de los organismos, con alimentos artificiales preparados a base de carbohidratos y lípidos, sobre el desarrollo y composición de los diferentes tejidos germinales (gónada) y somáticos (glándula digestiva, músculo y manto). La meta es contribuir al entendimiento de las necesidades nutricionales básicas de la especie, generando nuevo conocimiento potencialmente aplicable al desarrollo y optimización de los protocolos de acondicionamiento gonádico para la maduración de reproductores en el laboratorio, mediante el suministro de dietas naturales y artificiales.

2. Antecedentes

2.1. Estudios sobre el uso de dietas naturales en moluscos bivalvos

En el cultivo de bivalvos el aspecto nutricional ha sido por mucho tiempo un factor determinante, incluso en cultivo en campo, ya que la disponibilidad de alimento es un criterio de selección del sitio (Laing y Milllican, 1986; Helm, 2006). Debido a la naturaleza filtradora de estos organismos, es de especial relevancia la selección del alimento, ya que el crecimiento y el desarrollo gonadal guardan relación estrecha con la cantidad y calidad de alimento ingerido (Albentosa *et al.*, 1996). La mayoría de la información disponible con respecto a la salud y estrategias reproductivas en los bivalvos proceden de estudios realizados en el medio natural, donde la disponibilidad de alimento varía durante el período de desarrollo sexual, así como otros parámetros ambientales como la temperatura (Rodríguez-Jaramillo *et al.*, 2001). Sin embargo, la mayoría de los experimentos documentados con diversas alternativas de alimento natural y/o artificial, se han realizado en etapas tempranas de desarrollo (Mazón-Suástegui *et al.*, 2008, 2009).

En el medio natural los bivalvos reciben una enorme cantidad de partículas de diversa naturaleza que les confieren lo necesario para completar su ciclo vital, tales como diatomeas, silicoflagelados, nanoplancton, flagelados, incluso materiales inertes (Haven, 1965; Epifanio, 1975). Las microalgas son parte del fitoplancton y algunas son utilizadas por los bivalvos como alimento vivo para todas las etapas de su desarrollo. En condiciones de se requieren sistemas eficientes de producción de microalgas de buena calidad para asegurar el éxito en la producción de semilla. Los costos de producción de alimento pueden llegar hasta el 40% del costo total de producción de la semilla (Helm, 2006).

Las especies de microalgas que actualmente se emplean como alimento vivo para bivalvos son alrededor de 50, y de éstas, al menos 10 que pertenecen a la familia Bacillariophyceae se cultivan para alimentar a los bivalvos en forma comercial. Existe una serie de atributos clave para su elección, basados en su morfología y composición, ya que deben ser adecuadas para la ingesta y aprovechamiento. La mayoría son células nanoplanctónicas, es decir, con un tamaño entre 2 y 20 μm , y además deben ser de fácil digestión (Helm, 2006).

Además, deben tener altas tasas de crecimiento y ser fácilmente cultivables a escala masiva, debiendo tolerar fluctuaciones de temperatura, luz y nutrientes. Por último, las microalgas deben tener una buena composición nutritiva, particularmente de ácidos grasos altamente insaturados o HUFAs, así como la ausencia de toxinas que podrían ser transferidas a niveles superiores en la cadena alimentaria. No obstante algunas dificultades para su cultivo, las microalgas aun son indispensables para el cultivo de bivalvos, sobre todo en etapas muy demandantes, como el acondicionamiento gonádico de reproductores y el cultivo larvario (Knauer y Southgate, 1999).

Entre las microalgas identificadas como alimento de buena calidad para el cultivo de bivalvos, se encuentran *Isochrysis galbana*, *Isochrysis* sp. (T-Iso), *Pavlova lutheri*, *Tetraselmis suecica*, *Pseudoisochrysis paradoxa*, *Chaetoceros calcitrans* y *Skeletonema costatum* (Persoone y Claus, 1980). Estas especies pueden variar significativamente en su valor nutricional en función de las condiciones de cultivo (Brown *et al.*, 1997). Esto podría tener efecto positivo por la posibilidad de modificar la calidad nutritiva de una determinada especie, manipulando las condiciones de luz, nutrientes, etc., pero al mismo tiempo aumenta la complejidad para mantener una misma calidad a lo largo de todo el proceso de alimentación de los bivalvos. Por ello mismo, generalmente se propone el uso de mezclas de microalgas para favorecer un efecto sinérgico por la complementación de metabolitos importantes (Pernet *et al.*, 2005; Milke *et al.*, 2004, 2006; Uriarte *et al.*, 2001).

Las distintas especies de diatomeas que se cultivan habitualmente en los laboratorios acuícolas tienen niveles de HUFA parecidos, todos ricos en ácido eicosapentanoico (EPA= 20:5n-3). Las cantidades totales de ácidos grasos particulares en las distintas especies de diatomeas son variables. Suelen ser más altas en los cultivos que entran en la fase estacionaria que durante el crecimiento exponencial (Helm, 2006). Este autor también reporta que las pequeñas algas flageladas desnudas como *P. lutherii* tiene un perfil de HUFA parecido a *I. galbana* pero ésta última suele tener niveles mayores de ácido docosahexanoico (DHA = 22:6n-3). En cambio, el clon T-Iso de *Isochrysis* contiene sólo entre un 50 y 70% de DHA de *I. galbana* cuando se cultiva al lado de ésta en las mismas

condiciones de luz y de nutrientes y suele cultivarse en más laboratorios porque es más fácil de cultivar durante todo el año y es tolerante a temperaturas más altas.

2.2. Estudios sobre la determinación de los requerimientos nutricionales en moluscos bivalvos

De acuerdo con Helm (2006), la ración diaria de alimento para reproductores de moluscos bivalvos oscila por lo general entre el 2% y el 4% del peso seco medio de la carne de los organismos al inicio del período de acondicionamiento, expresado en peso seco de las microalgas suministradas por día. Delgado y Pérez-Camacho (2002) probaron diversas concentraciones de microalgas en *Ruditapes decussatus*, referidas como peso orgánico del alimento respecto al peso vivo del individuo, desde 0.1 % disminuyendo gradualmente hasta 0,025 %. Los autores obtuvieron mejores resultados con una ración de 0.1%.

En lo que respecta a otras fuentes de alimento, los bivalvos pueden asimilar carbohidratos particulados o en solución, mediante ingestión directa o fagocitosis a través de células especializadas presentes en el manto y branquias; esto en función de la acidez de su tracto digestivo y la producción de amilasa. Además existe gran evidencia de la transformación metabólica de carbohidratos en grasas y viceversa, y se ha visto que el glucógeno y los lípidos disminuyen en la gónada con el avance de la gametogénesis (Mazón-Suástegui, 1988). El contenido del glucógeno varía en las diferentes épocas del año, presentando períodos de almacenamiento para después utilizarse en la producción de gametos (Avilés-Quevedo y Mazón-Suástegui, 1989).

Los lípidos que representan la principal fuente energética son los triglicéridos, en particular los ácidos grasos de cadena corta y saturados, que son los que predominantemente se utilizan con fines energéticos, vía β -oxidación. Por otro lado, los requerimientos de esteroides, principalmente colesterol, suministrados por las microalgas en general no son limitantes para el crecimiento larvario (Tremblay *et al.*, 2007) y además, los bivalvos muestran biosíntesis de esteroides, cuya composición puede ser fuertemente modificada por la dieta, y el lugar de origen de los bivalvos (Napolitano *et al.*, 1994; Pazos *et al.*, 2005). En términos de ácidos grasos esenciales, los bivalvos muestran requerimientos de DHA,

EPA, y ácido araquidónico (ARA 20:4), los que tienen mayor influencia en el desarrollo gonádico y que posteriormente aseguran el éxito reproductivo (Farías *et al.*, 2003; Nevejan *et al.*, 2003; Farías y Uriarte, 2006; Milke *et al.*, 2006).

El requerimiento de proteínas para los bivalvos ha sido bien documentado. En el uso de dietas microalgales el total de proteínas requerido por bivalvos ha sido estimado entre un 13 y 20% en juveniles, 30-60% en larvas y 17% en adultos. Sin embargo, también existen variaciones estacionales que influyen en el uso de proteínas durante el ciclo reproductivo de muchas especies de moluscos bivalvos (Knauer y Southgate, 1999). Los estudios realizados en cuanto a aminoácidos esenciales presentes en las microalgas muestran que en general todas presentan los diez aminoácidos considerados esenciales para organismos marinos en cantidad suficiente para suplir las demandas de los bivalvos (Farías y Uriarte, 2001; Uriarte y Farías, 1999; Uriarte *et al.*, 2004). Estos autores reportan que el contenido de proteína de las microalgas determina en *A. purpuratus* aspectos de fecundidad, duración del periodo de acondicionamiento, y tasa de crecimiento de la progenie, mientras que en *C. gigas*, solo se observa efecto en la supervivencia larvaria en la progenie de reproductores alimentados con variaciones de proteína microalgal (Uriarte *et al.*, 2004).

Finalmente, debe mencionarse que aun cuando el alimento tenga una composición adecuada para el organismo, el sistema de suministro es un factor importante. Es así como en el caso del acondicionamiento de reproductores, es preferible que la alimentación se realice de manera continua en sistemas abiertos y de manera intermitente (a pulsos), en sistemas cerrados, con regulación de la temperatura (Mazón-Suástegui, 1988; Helm, 2006).

2.3. Estudios sobre el uso de alimentos alternativos en moluscos bivalvos

Debido a la complejidad de mantener la calidad de las especies de microalgas empleadas como alimento para bivalvos y a su alto costo, ha habido intentos para sustituirlas y con ello para tratar de atenuar los costos de producción, disminuir la dificultad tecnológica y la variabilidad nutricional del cultivo microalgal, e incluso, tratar de implementar la calidad nutricional de las microalgas vivas (Avilés-Quevedo y Muciño-Díaz, 1988; Helm, 2006). Entre los sustitutos que más se han estudiado se encuentran las levaduras (Coutteau *et al.*,

1994; Chien y Hsu, 2006), las microalgas secas (Doroudi *et al.*, 2002; Espinosa y Allam, 2006), las pastas de microalgas (Heasman *et al.*, 2000; Bonaldo *et al.*, 2005), los microencapsulados (Langdon y Waldock, 1981; Langdon *et al.*, 1985) y las emulsiones de lípidos (Coutteau y Sorgeloos, 1992; Coutteau *et al.*, 1996; Navarro *et al.*, 2000; Uriarte *et al.*, 2003; Uriarte *et al.*, 2004).

El análisis del contenido estomacal de moluscos bivalvos revela la presencia de diatomeas, silicoflagelados, bacterias, detritus orgánico, esporas de macroalgas, granos de polen, nanoplancton, flagelados y partículas inertes (Haven, 1965), por lo que puede deducirse que pueden filtrar gran cantidad de partículas. Los cereales se han empleado como una fuente rica en carbohidratos; estos fueron los primeros suministrados como dietas artificiales en suspensión acuosa (Galtsoff, 1964; Dunathan *et al.*, 1969). El empleo de cereales como alimento en acuicultura se ha probado en peces, en crustáceos y en menor medida en los moluscos. En éstos últimos se han empleado principalmente para el crecimiento de semilla, sin embargo, algunos estudios han sugerido que las harinas de maíz, trigo y arroz pueden ser una buena opción para el acondicionamiento gonádico de los moluscos bivalvos (Mazón-Suástegui, 1988; Mazón-Suástegui y Avilés-Quevedo, 1988; Avilés-Quevedo y Mazón-Suástegui, 1989; Dupuy *et al.*, 1997; Baltazar *et al.*, 1999; Pirini *et al.*, 2007).

En el medio marino muchos organismos filtradores obtienen cantidades considerables de carbohidratos a partir de la ingesta de microalgas que acumulan reservas en forma de almidón. Igualmente, pueden obtener carbohidratos disueltos (azúcares) y particulados (almidón), a partir del detritus derivado de la maceración y descomposición de restos de algas y fanerógamas marinas (Turgeon y Haven, 1978). El almidón es la forma química de almacenaje de azúcar o glucosa en los vegetales, representa la mayor reserva alimenticia de carbohidratos y consecuentemente constituye el mayor componente de carbohidratos en los alimentos de animales.

Avilés-Quevedo y Mazón-Suástegui (1989) en experiencias con *P. sterna*, reportan desoves en un 40% del total de los machos con fécula de maíz (harina de solo germen y

mucho más fina), pero obtienen en esta misma especie el 100% de desove en ambos sexos cuando fueron alimentados con harina de arroz y fécula de maíz. En otras experiencias, el empleo de dietas artificiales basadas en harinas (carbohidratos) ha dado buenos resultados en el acondicionamiento gonádico de la ostra perlera japonesa *P. martensii* (Kuwatani y Nishii, 1968) y el ostión americano *C. virginica* (Dupuy *et al.*, 1977; Turgeon y Haven, 1978; Baltazar *et al.*, 1999). Aunque estos autores no registraron desarrollo por medio de estudios histológicos, tuvieron buenos resultados en la producción de semilla en organismos alimentados con productos alternativos tales como harina de trigo, maíz y arroz.

Entre las ventajas de utilizar harinas de cereales, están el que existen los productos comerciales de fácil acceso, como la fécula de maíz, harina de arroz y de trigo que en su mayoría poseen más del 90% de carbohidratos, además de la facilidad de preparar la suspensión para emplearla como alimento en cualquier momento. Entre las desventajas está el que un mal manejo puede generar alta concentración de bacterias, algunas de las cuales podrían ser nocivas a los organismos.

Los lípidos juegan un papel fundamental en la alimentación de los bivalvos sobre todo en fases críticas como las etapas larvales tempranas y de desarrollo gonádico. Debido a la naturaleza hidrófoba de los lípidos, diversas investigaciones se han enfocado a implementar métodos para añadirlos en forma de partículas al medio de cultivo, al mantenimiento de dichas partículas en suspensión mediante modificaciones tanto al sistema de aireación como al del medio acuoso ej. por contraflujo, así como también realizar ajustes de ración (Farías, 2008). Una manera de agregar estos lípidos al medio es en forma de emulsiones. Por ejemplo, en *A. purpuratus*, se ha estudiado la sustitución parcial de la dieta microalgal con emulsiones de lípidos enriquecidas en ácidos grasos esenciales como el ácido DHA y el EPA lo cual reflejó aumentos significativos en estos ácidos grasos en gónadas masculinas y femeninas, mostrando una movilización desde la glándula digestiva (Caers *et al.*, 2003). Pernet *et al.* (2004); Delaporte *et al.* (2007), también probaron emulsiones lipídicas preparadas con un aceite comercial de origen marino en especies como *Placopecten magellanicus*, *Ruditapes philippinarum* y *C. gigas*

respectivamente, mostrando como resultado que los organismos con dietas suplementadas tienen mayor concentración de ácidos grasos.

Otro de los métodos utilizados en acuicultura es el de los microencapsulados. Dentro del término se incluyen las microcápsulas, las micropartículas, nanocápsulas y sustancias activas atrapadas o embebidas, aunque existen algunas terminologías específicas dependiendo de cómo se encuentre distribuido el material encapsulado o de los métodos de elaboración (Pedroza-Islas, 2002). El intervalo de tamaño varía según diversos autores, pero el tamaño máximo que se registra es de 5000 μm (Luzzi, 1970; Bakan, 1973; King, 1995). Están formadas por un núcleo activo (sólido, gaseoso o líquido) y una delgada membrana de origen natural o sintético que lo envuelve, llamada pared. Se utilizan para preservar y/o proteger numerosos ingredientes comerciales (Balassa y Brody, 1968; Gibas *et al.*, 1999). Pueden encapsularse vitaminas, proteínas, etc., para fines de alimentación de moluscos, las cápsulas han sido usadas principalmente para proveer lípidos a larvas. Es así como el primer registro que se tiene del uso de lípidos encapsulados es el de vesículas lipídicas o liposomas (Langdom y Waldock, 1981).

Los liposomas se elaboran con moléculas anfifílicas (cationes orgánicos) que poseen sitios hidrofóbicos (ácidos grasos, fosfolípidos, etc) y sitios hidrofílicos (colina, serina, inositol). En la fase acuosa se coloca en material a encapsular cuando es hidrofílico o bien se agrega en el solvente orgánico donde se disuelven los fosfolípidos, si es lipofílico (Benita, 1999). La técnica de elaboración de referencia emplea un evaporador rotatorio sin embargo existen otras técnicas como la diálisis y el secado por aspersion siendo este el más ampliamente conocido (Redziniak y Perrier, 1996). Los encapsulantes o materiales formadores de pared más utilizados han sido: carbohidratos (almidón y derivados, maltodextrinas, jarabes de maíz, ciclodextrinas, carboximetil-celulosa y derivados); gomas (arábica, mezquite, alginato de sodio); lípidos (ceras, parafinas, grasas) y proteínas (gelatina, proteína de soya, caseinatos, suero de leche, zeína) (Pedroza-Islas, 2002).

Otro método diseñado para alimentación de moluscos bivalvos es el de Southgate y Lou (1995), que consiste en encapsular un aceite (de pescado, calamar, etc.) en una mezcla de

gelatina y acacia al 2%, previamente disueltas en agua destilada, por medio de variaciones de pH. El tamaño del diámetro de las partículas es de $4.7 \pm 2.2 \mu\text{m}$; que está dentro del tamaño del nanoplancton; estas pueden mantenerse en refrigeración hasta nueve días (Knauer y Southgate, 1997); este tipo de alimentación les permitió tener más supervivencia en larvas de *C. gigas*.

A partir de estos métodos, Caers *et al.* (2000) realizaron estudios con larvas de *C. gigas* alimentadas con *T. suecica* en los que compararon la eficiencia al complementar esta dieta con ácidos grasos en forma de emulsiones y liposomas; el crecimiento y la composición de ácidos grasos al emplear emulsiones mostraron un aumento altamente significativo en el peso seco libre de cenizas comparado con las dieta adicionada con liposomas o la de solo microalgas. Los autores refieren que la diferencia puede deberse al tamaño de las partículas de ambos complementos.

3. Justificación

La información actualmente disponible sobre la reproducción de *P. sterna* en el laboratorio es limitada pues se desconoce su respuesta “fina” a variables como la temperatura, cantidad y calidad de alimento, y otros más, que afectan todos los indicadores fisiológicos de almacenamiento y utilización de reservas energéticas durante la maduración y desove (Bayne *et al.*, 1976; Bayne y Newell, 1983; Barber y Blake, 1991; Román *et al.*, 2002).

Bajo condiciones experimentales y de producción acuícola, los moluscos se alimentan principalmente de microalgas, cuya producción requiere de instalaciones adecuadas y de personal especializado para asegurar un suministro consistente en cantidad y calidad. El cultivo de microalgas representa cerca del 40% del total de costos de producción en cualquier cultivo experimental y/o comercial (Helm, 2006). Buscando alternativa a este alimento natural, se han utilizado complementos artificiales como macroalgas pulverizadas y harina de cereales (Mazón-Suástegui 1988, Mazón-Suástegui y Avilés-Quevedo 1988, Avilés-Quevedo y Mazón-Suástegui 1989), así como emulsiones lipídicas y microencapsulados (Saucedo y Southgate, 2008). Aunque a la fecha no ha sido posible sustituir totalmente la microalga cultivada, su ración diaria (cél/org/día), se ha reducido al 50%, complementando la dieta con almidón de maíz (*cornstarch*), logrando abatir costos operativos en el laboratorio, sin afectar la calidad de la semilla obtenida en términos de crecimiento y composición bioquímica (Mazón-Suástegui *et al.*, 2008, 2009).

La falta de conocimiento sobre los procesos fisiológicos de nutrición y almacenamiento de reservas en *P. sterna* hace más difícil su manejo en el laboratorio e imposibilita la producción de semilla bajo condiciones controladas. Es indispensable el desarrollo innovador y mejora continua de zootecnias eficientes para el acondicionamiento gonádico de reproductores (maduración). La importancia de este estudio, es que se busca profundizar en aspectos de la nutrición de la especie objetivo, a fin de generar nuevo conocimiento potencialmente aplicable en el desarrollo y optimización de tecnologías para la producción de semilla (juveniles), necesaria para optimizar la operación de granjas perleras en México.

4. Objetivos

4.1. Objetivo general

Estudiar el efecto de utilizar (*Isochrysis galbana*, *Pavlova lutherii* y *Chaetoceros calcitrans*) como dieta microalgal sola o complementada con productos ricos en almidón (Fécula de maíz, Maizena[®]) y lípidos (Aceite orbital de atún, Omega-Mex DHA30[®]) durante el proceso de acondicionamiento gonádico de reproductores de concha nácar *P. sterna*, y determinar su influencia sobre el desarrollo y composición de gónada y tejidos somáticos.

4.2 Objetivos específicos

- ✓ Evaluar la condición general y del músculo aductor de los organismos experimentales.
- ✓ Evaluar la proporción de sexos, área de cobertura, grado de desarrollo de la gónada y variaciones en la talla de ovocitos de los organismos experimentales.
- ✓ Determinar variaciones en la composición de gránulos de carbohidratos y gotas de lípidos de los ovocitos de la gónada, adenómeros de la glándula digestiva y tejido conjuntivo de los organismos experimentales.
- ✓ Determinar las variaciones en la composición bioquímica de carbohidratos, lípidos y proteínas de la gónada, glándula digestiva, músculo aductor y manto de los experimentales

5. Hipótesis

El uso de dietas microalgales complementadas con alimenticios artificiales como almidón de maíz y microcápsulas de aceite orbital de atún con alto contenido de carbohidratos y lípidos respectivamente, generará un desarrollo y composición bioquímica en los tejidos de reproductores de concha nácar, equivalente o superior al de aquellos alimentados únicamente con microalgas en condiciones de laboratorio.

6. Materiales y métodos

6.1. Recolección y aclimatación de organismos

Los organismos utilizados en el presente estudio fueron recolectados de las instalaciones de un cultivo submarino del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), localizado en la Caleta de El Merito, Bahía La Paz, B.C.S. (24°16' N; 110°19'O). La recolecta se hizo en los meses de septiembre y octubre del 2010, es decir, fuera de la temporada reproductiva (Saucedo y Monteforte, 1997) con el fin de asegurar que el grado de desarrollo gonádico fuera incipiente en todos los organismos. Los organismos se trasladaron al Laboratorio de Moluscos del CIBNOR, donde se limpiaron de fauna de acompañamiento y se colocaron en contenedores de plástico de 60L provistos de agua de mar filtrada a 1 μm y esterilizada por luz UV para ser aclimatados por dos semanas. Durante este periodo se mantuvo una temperatura constante de 23 °C, salinidad de 37 ups y fotoperiodo de 12:12 horas (Saucedo, 2001). Los organismos fueron alimentados de forma continua con una dieta consistente en las microalgas *I. galbana*, *P. salina* y *C. calcitrans* en proporción 1:1:1 y concentración de 25,000 cel/mL⁻¹.

6.2. Estimación de peso seco de los organismos y las raciones alimentarias

Para poder estimar las raciones alimentarias fue necesario determinar el peso seco (PS) de los individuos. Para ello, se disecaron 16 organismos elegidos al azar y se registraron sus pesos húmedos con concha y de la masa en una balanza digital Mettler Toledo (Mod. BD202, precisión 0.001 g). A continuación se colocó cada organismo en una charola individual (concha y masa visceral) y se introdujeron a una estufa VWR (Mod. 10505) a 75 °C por 48 h. Al finalizar el tiempo de secado, nuevamente se pesaron las conchas y masa visceral de los organismos, así por diferencia de pesos se calculó en primer lugar el porcentaje total correspondiente al peso de masa visceral y concha:

(1)

De la misma manera para estimar el contenido de humedad en la masa visceral se aplicó la siguiente fórmula:

(2)
$$\frac{\text{Humedad}}{\text{Masa}} \times 100$$

Con los cálculos anteriores se estimó la ración diaria de alimento por organismo, por tratamiento, la cual fue del 2% del PS de la masa visceral (Helm, 2006) expresada también en PS de la microalga a suministrar. Posteriormente, se realizó el cálculo de las raciones a suministrar de las tres microalgas: *I. galbana*, *P. salina* y *C. calcitrans*, la cual fue 1:1:1 y la complementación con alimento artificial (fécula de maíz y microcápsulas), misma que fue del 1 y 2% de la biomasa seca de los organismos.

Finalmente para calcular la ración diaria se aplicó la siguiente fórmula:

(3)
$$R = \frac{\text{Biomasa}}{\text{Ración}} \times 100$$

Se realizó el cálculo para cada componente del alimento a evaluar: microalgas (con lo reportado por Helm, 2006), fécula de maíz preparada a base de Maizena[®] disuelta en agua en ebullición y microcápsulas preparadas a base de una mezcla de gelatina y polvo de acacia (denominadas GAM por sus siglas en inglés).

6.3. Cultivo de microalgas y preparación de alimentos artificiales

Las microalgas se cultivaron en el Laboratorio de Microalgas del CIBNOR utilizando un sistema estático de bolsas de 40 L a temperatura de 23 ± 1 °C empleando medio de cultivo f/2 para los flagelados *I. galbana* y *P. salina* y f/2 más un complemento de metasilicatos para la diatomea *C. calcitrans*. La cosecha para su empleo como alimento se realizó siempre con cultivos microalgales en fase de crecimiento exponencial.

El primer complemento artificial rico en carbohidratos, se elaboró con un producto comercial (Maizena[®]), con alto contenido de fécula o almidón de maíz. Se determinó el PS del producto por triplicado en muestras de 10 g secadas a 70 °C por 24 h y por diferencia

con el peso inicial se obtuvo una media de PS con respecto al peso total. Con esta materia prima se preparó una suspensión nutritiva térmicamente tratada, aplicando la metodología de Mazón-Suástegui (1988). Una vez pesada la ración diaria de harina a suministrar (PS) por cada tratamiento, se mezcló con 100 mL de agua dulce fría y enseguida se vertió en 2L de agua dulce en ebullición, agitando manualmente durante 2 minutos para evitar la formación de grumos. Una vez fría, la suspensión se aforó a un volumen de 6 L, agregando agua mar fría, filtrada y esterilizada y se suministró a las unidades experimentales de forma continua por goteo durante todo el día (figura 2).

El segundo complemento artificial con alto contenido de lípidos se preparó mediante la microencapsulación de otro producto comercial (Omega-Mex DHA30[®]). De acuerdo con el proveedor, este producto es un extracto de orbital de atún compuesto principalmente de ácidos grasos altamente insaturados (HUFAs), el proveedor asegura un 30% de ácido docosahexanoico o DHA (22:6 n-3). Para su utilización como complemento nutricional se siguió el protocolo de Southgate y Lou (1995) que utiliza una mezcla de gelatina y acacia (goma arábiga) para su microencapsulación. Después de realizar los ensayos correspondientes, se tomó la decisión de suprimir el centrifugado y la dilución 1:1 del stock en agua destilada, mejorando la eficiencia del proceso. Atendiendo sugerencia de los autores, las microcápsulas se elaboraron en la cantidad requerida para su consumo en una semana.

Se prepararon dos soluciones de 100 ml cada una, una de goma arábiga y otra de gelatina, ambas al 2%. En una licuadora se mezclaron las soluciones anteriores, adicionando el aceite por goteo, lo cual produjo un color blanquecino, característico de las emulsiones. Esta emulsión se calentó a 40 °C con agitación constante y se le agregó por goteo una solución de ácido clorhídrico (HCl) al 10% hasta que el pH llegó a 3.7; se agitó por 5 minutos, a continuación y también por goteo, se agregó hidróxido de sodio (NaOH 0.5 M) hasta elevar el pH a 9.3 y nuevamente se agitó por 5 minutos para homogenizar.

Siguiendo los pasos antes mencionados, se prepararon cuatro stocks de microcápsulas, el volumen total (aprox. 800 mL) fue adicionado de agua destilada hasta 1.2L y se colocó en

refrigeración (5 °C) por 24 h. Pasado este tiempo se recuperaron las microcápsulas con una espátula en la superficie del contenedor (se observa como una especie de nata muy blanquecina) y enseguida fueron resuspendidas en agua destilada a un volumen de 10 mL. Cada vez que se preparó un nuevo stock de microcápsulas, se determinó el PS por triplicado en muestras de 2 mL del concentrado.

6.4. Muestreo inicial

Al inicio del experimento se pesaron y se marcaron en su totalidad los organismos para estimar su índice de condición inicial o IC (ver sección 6.6) y se tomó una muestra de 11 organismos, para determinación y registro de altura, longitud y grosor de la concha (precisión 0.1 mm) y peso húmedo total con concha (precisión 0.1 g). Posteriormente, los organismos se disecaron para obtener muestras de la gónada, glándula digestiva, músculo y manto (figura 1). Una porción de aproximadamente de 1 cm² de glándula digestiva fue preservada en solución Davidson (figura 1-b) para su posterior análisis. Mediante técnicas de histología se determinó el grado de desarrollo gonádico y la talla de los ovocitos (ver sección 6.7) y el contenido de carbohidratos y lípidos por histoquímica (ver sección 6.8). Otra porción de la gónada, y los restantes tejidos somáticos (glándula digestiva, músculo y manto) fueron conservados en ultracongelación a -80°C para análisis bioquímicos de composición de proteínas, carbohidratos y lípidos totales (ver sección 6.9).

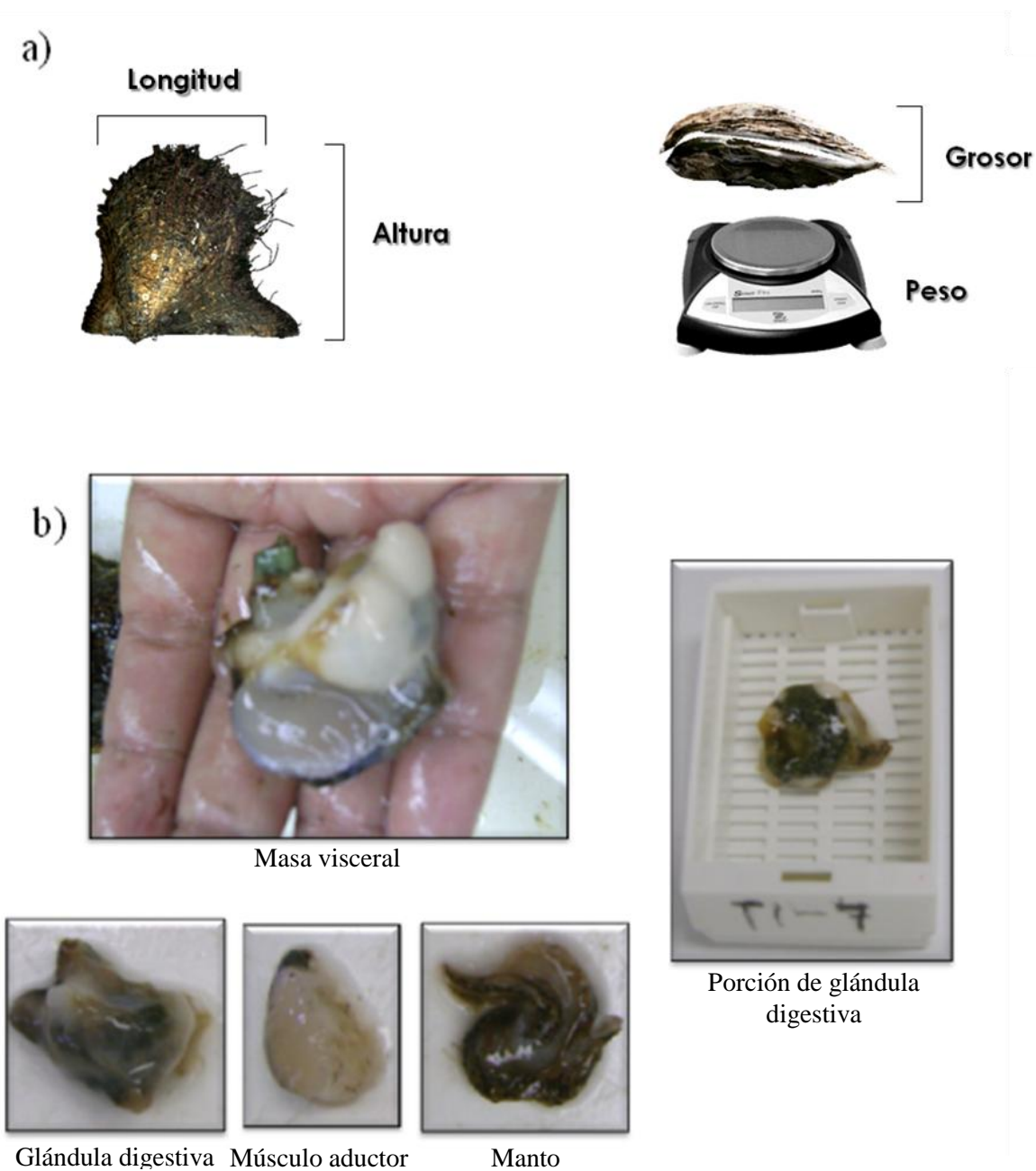


Figura 1. Procedimientos aplicados para biometría (a) y disección (b) de organismos experimentales (*P. sterna*), para obtener muestras de tejidos para histología, histoquímica y análisis bioquímico.

6.5. Diseño experimental

Finalizada la etapa de aclimatación, los organismos recibieron una de cinco dietas definidas en el diseño experimental. La ración diaria de alimento se definió como un porcentaje de la masa visceral, expresado en peso seco de alimento y de organismos:

Dieta A: Mezcla ternaria de microalgas (*I. galbana*, *P. salina* y *C. calcitrans*) en proporción 1:1:1, proporcionada a razón del 2% del PS de la masa visceral de los organismos experimentales. Este tratamiento constituye el grupo control y en lo sucesivo se denomina MIC.

Dieta B: Dieta A complementada con suspensión elaborada con Maizena[®] (MAZ), proporcionada a razón del 1% del PS de la masa visceral de los organismos experimentales.

Dieta C: Dieta A complementada con suspensión elaborada con Maizena[®] (MAZ), proporcionada a razón del 2% del PS de la masa visceral de los organismos experimentales.

Dieta D: Dieta A complementada con microcápsulas de Omega-Mex DHA30[®] (GAM), proporcionada a razón del 1% del PS de la masa visceral de los organismos experimentales.

Dieta E: Dieta A complementada con microcápsulas de Omega-Mex DHA30[®] (GAM), proporcionada a razón del 1% del PS de la masa visceral de los organismos experimentales.

El trabajo experimental se llevó a cabo durante 30 días, a temperatura de $23 \pm 1^\circ\text{C}$, salinidad de 36.5 ± 0.5 ups y fotoperiodo de 12:12h, de acuerdo a lo sugerido por Saucedo (2006) para esta especie, aplicando el siguiente diseño experimental; (tabla I).

Tabla I. Diseño experimental para organismos adultos de *P. sterna* donde se expresan las diferentes dietas a suministrar, los alimentos correspondientes y su ración alimenticia diaria durante 30 días.

Dieta	Tratamiento	Ración diaria en % de PS	Número de organismos	Biomasa en PS	Ración diaria en g/PS
A	Microalgas	2%	24	37.34	0.75
B	Microalgas Maizena [®]	2% 1%	24	42.47	0.99
C	Microalgas Maizena [®]	2% 2%	24	40.91	1.37
D	Microalgas GAM (Omega-Mex DHA30 [®])	2% 1%	24	48.58	1.13
E	Microalgas GAM (Omega-Mex DHA30 [®])	2% 2%	24	40.65	1.35

6.5.1. Manejo de organismos experimentales

Los organismos se colocaron en unidades experimentales de alimentación, consistentes en cajas o taras plásticas de 60 L de capacidad con 12 organismos cada una. Se manejaron cinco unidades de alimentación (una por dieta o tratamiento) y cada dieta se manejó a su vez por duplicado. En las unidades experimentales se utilizó agua marina filtrada (1 μm), esterilizada por luz UV y aireada de forma vigorosa para mantener el alimento en constante suspensión. La ración diaria de microalgas fue suministrada por gravedad a cada grupo experimental de manera continua durante 24 horas/día desde un contenedor principal. Los complementos artificiales se proporcionaron por separado, de manera continua utilizando pequeños contenedores individuales para cada grupo experimental. En ambos casos se utilizaron válvulas de paso para asegurar el flujo adecuado y las raciones exactas para cada tratamiento (figura 2).

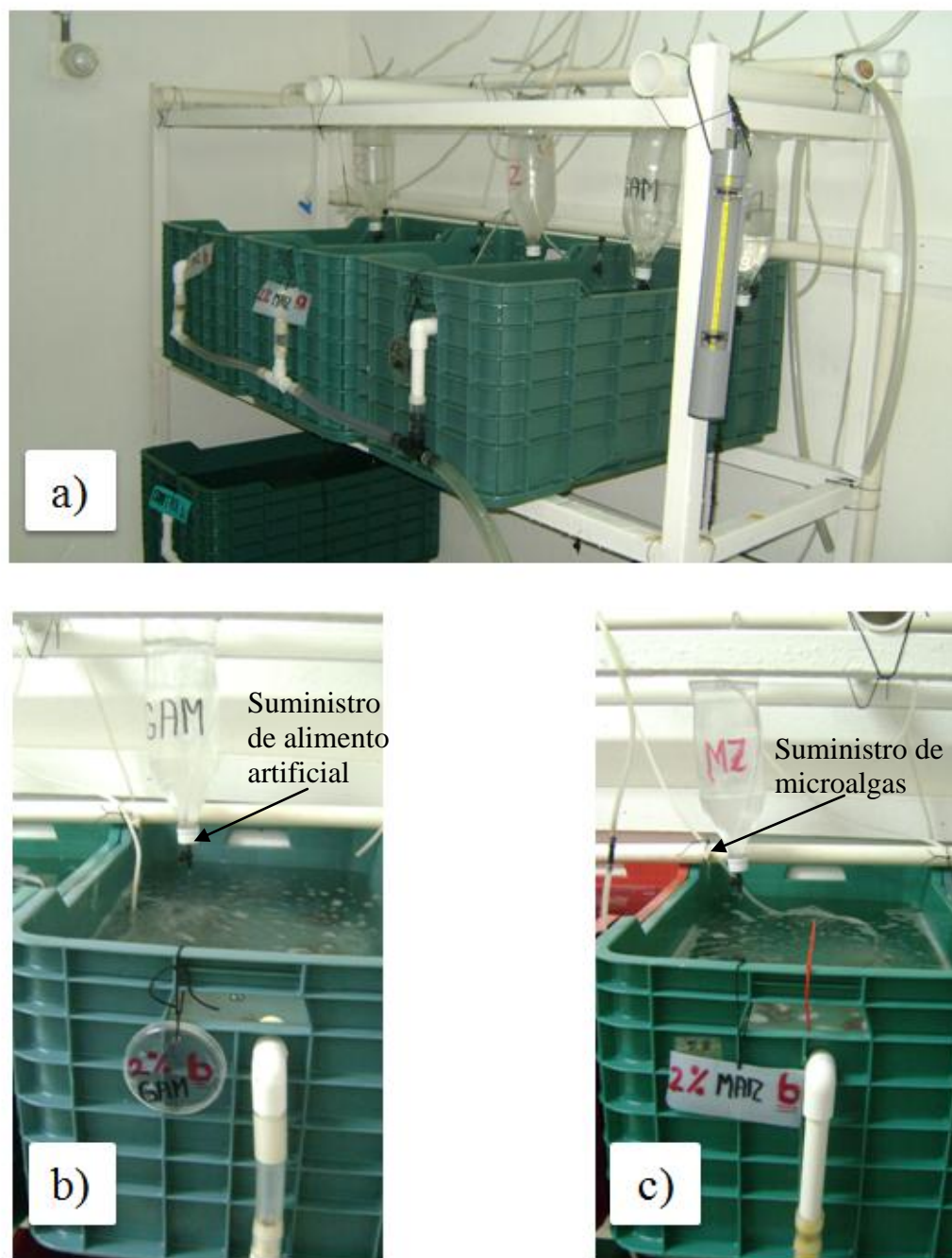


Figura 2. Unidades experimentales (a) y alimentadores (b y c) para suministro continuo de microalgas y complementos artificiales, a reproductores de (*P. sterna*).

Se realizaron muestreos a la mitad (día 15) y al final (día 30) del periodo experimental, tomando seis organismos al azar por tratamiento (12 en total considerando el duplicado). Los organismos fueron medidos (0.1 mm), pesados (0.1 g) y disecados (ver figura 1) y los tejidos procesados de la misma forma como se indicó antes para el cálculo de índices, análisis histológico, histoquímico y bioquímico.

6.6. Determinación de la condición general de los organismos

Para cada uno de los muestreos (días 0, 15 y 30), se realizó el cálculo del índice de condición (IC) propuesto por Sastry (1979) y el índice de rendimiento muscular (IRM) sugerido por Arellano-Martínez (2004).

(4) —

(5) —

Donde:

Mv = Peso de la masa visceral (g); Mm = Peso del músculo aductor (g); C = Peso del organismo con concha (g).

6.7. Análisis histológico y digital de imágenes

Las muestras de gónadas previamente fijadas en solución Davidson fueron deshidratadas en alcoholes de graduación ascendente (70 a 100%), incluidas en Paraplast-TX[®], cortadas a 4 µm en micrótopo de rotación y teñidas por contraste con hematoxilina-eosina (Howard y Smith, 1983). Las laminillas resultantes se observaron bajo el microscopio óptico Olympus BX-40 (10 y 20X) y se digitalizaron para su análisis posterior con una cámara digital (CoolSNAP-Pro) instalada al microscopio y estos a su vez a una computadora con el programa Image Pro Plus[®] (versión 7.0 Media Cybernetics, E.U.A). Ello para la determinación del sexo y los estadios gonádicos.

El grado de desarrollo gonádico se determinó mediante el esquema de clasificación propuesto por Saucedo y Monteforte (1997) y Saucedo *et al.* (2002) para ostras perleras, mediante el cual se divide el ciclo reproductivo en cinco estadios: (1) indiferenciado o inactivo, (2) desarrollo activo, (3) madurez, (4) desove parcial y (5) post-desove o reabsorción de gametos.

A su vez, se determinó el índice de tejido gonádico (ITG) propuesto por Rodríguez-Jaramillo (2004) para estimar el grado de cobertura de la gónada en los muestreos inicial, intermedio y final. Para ello, las laminillas histológicas de las gónadas fueron digitalizadas a alta resolución (3600 dpi; 3465×5184 pixeles) y procesadas también mediante el programa Image Pro Plus, seleccionando con el cursor del ratón el área correspondiente a tejido gonádico. Posteriormente se aplicó la siguiente fórmula:

$$(6) \quad \text{ITG} = \frac{\text{ACT}}{\text{ACI}} \times 100$$

Donde:

ACT = Área de Cobertura del Tejido gonadal y ACI = Área de Cobertura de la Imagen completa (constante para todas las imágenes).

Finalmente, se calculó la talla promedio de los ovocitos por hembra, por tratamiento durante los muestreos inicial, intermedio y final. Para ello, se seleccionaron ovocitos completos, desarrollados y con núcleo, obtenidos de imágenes capturadas a 20X de tres campos visuales tomados al azar. Se midieron 50 ovocitos por organismo, nuevamente utilizando el programa Image Pro Plus. Rodeando el contorno de cada ovocito con el puntero del ratón de la computadora. Posteriormente se obtuvo el diámetro teórico de los ovocitos con la aplicación de la siguiente fórmula (Briarty, 1975; Saout *et al.*, 1999):

$$(7) \quad \text{DT} = \sqrt{\frac{4A}{\pi}}$$

Donde:

DT= Diámetro Teórico; A=Área del ovocito; $\pi= 3.1416$

6.8. Análisis histoquímico y digital de imágenes

Para los análisis histoquímicos, las muestras de gónada-glándula digestiva (deshidratadas e incluidas en Paraplast-TX[®]) y cortadas a 4 μm ; se tiñeron con dos colorantes específicos para carbohidratos y mucinas (Azul Alciano Pas) y lípidos (Sudan Negro B). Para la realización de este análisis se ubicaron tres regiones de cada tejido, digitalizando cada una a alta resolución (3600 dpi; 3465×5184 pixeles) a partir de tres secciones tomadas al azar a 20X. Los detalles sobre el manejo de cada técnica pueden consultarse en el Anexo 1.

Las laminillas teñidas para cuantificación de carbohidratos y mucinas con Azul Alciano Pas generan colores que varían entre azul, magenta y azul oscuro, de los cuales el programa selecciona de forma manual los pixeles de tonos magenta-rosa. En el caso de los lípidos (Sudan Negro B) el resultado es una imagen en tonos grises, azul oscuro y negro, y para realizar la cuantificación se seleccionan los pixeles más oscuros (negro y azul).

Una vez seleccionados los pixeles del color correspondiente el programa realiza el cálculo del área de los pixeles en cada fotografía (μm^2). Posteriormente, los datos obtenidos se utilizaron para la determinación de índice glucídico (IG) e índice lipídico (IL), calculando una media de las tres fotografías en cada tejido señalado (figura 3). Para ello, se utilizaron las fórmulas estandarizadas por Rodríguez-Jaramillo (2004, 2008):

$$(8) \quad \text{---}$$

$$(9) \quad \text{---}$$

Donde:

ACC= Área de cobertura de carbohidratos (μm^2); ACL= Área de cobertura de lípidos (μm^2); AT= Área total de la imagen (μm^2).

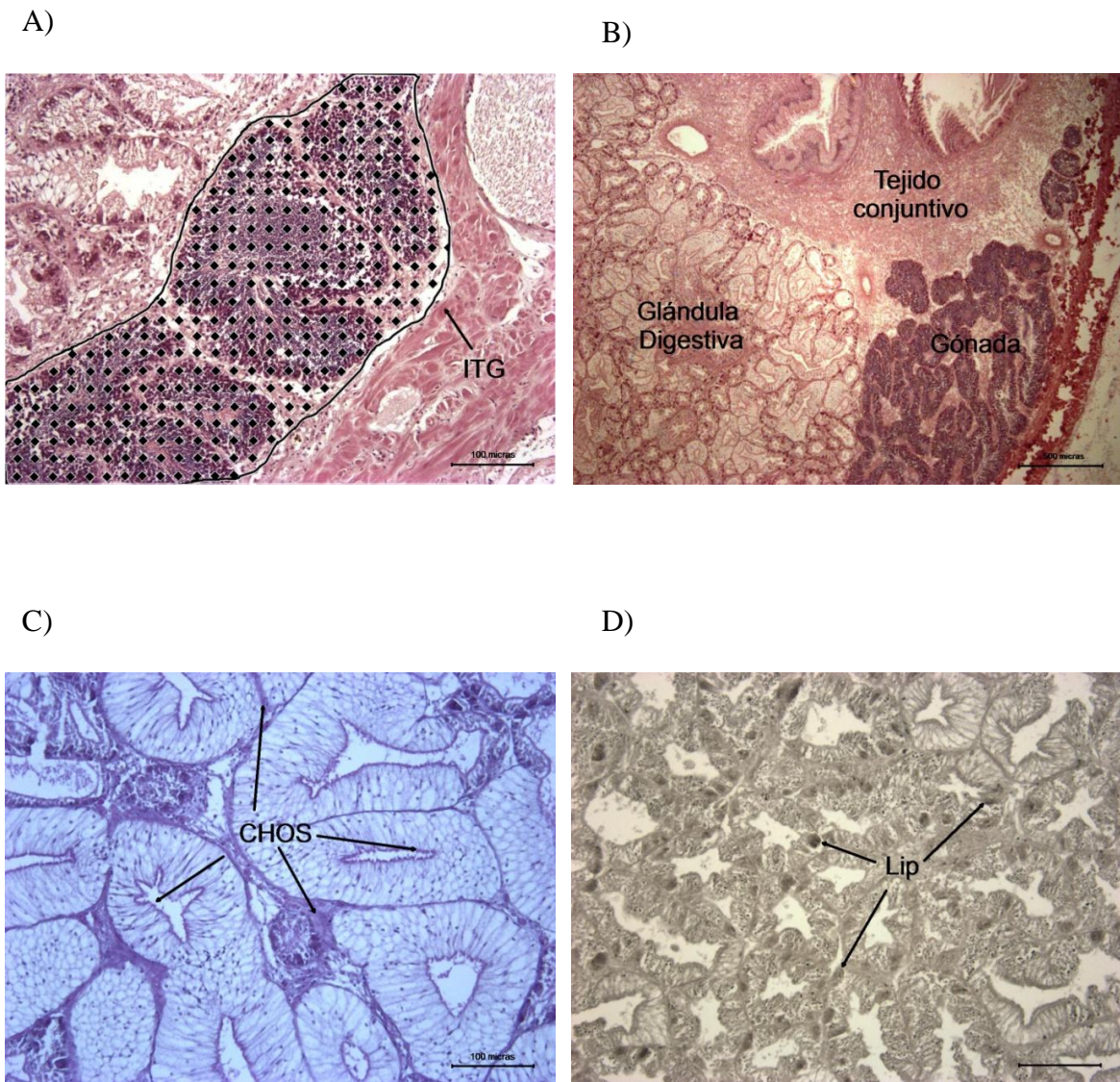


Figura 3. Microfotografías de cortes histológicos de glándula digestiva de *P. sterna*: A) selección utilizada para el cálculo del índice de tejido gonádico (ITG) a 20X, la zona punteada indica el tejido gonádico; B) Regiones localizadas de los cortes utilizados para los cálculos histoquímicos (4X); C) tinción Azul Alciano Pas para identificación de carbohidratos (CHOS) a 20X en glándula digestiva; D) tinción Sudan Negro B para identificación de lípidos (Lip) a 20X en glándula digestiva.

6.9. Análisis bioquímico

Las muestras de gónada de ambos sexos, junto con muestras de glándula digestiva, músculo aductor y manto previamente conservadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, fueron pesadas (0.1 g), liofilizadas, rehidratadas en 3 ml de solución salina fría (35 %) y homogenizadas para la obtención de los extractos crudos correspondientes. Los extractos crudos fueron utilizados para la determinación del contenido de carbohidratos, de acuerdo al método de Van Handel (1965). Para ello, se mezclaron 0.1 ml del extracto crudo con 1 ml de reactivo de antrona (0.1% disuelto en ácido sulfúrico al 76%). El resultado se lee en un espectrofotómetro a 620 nm contra un blanco; la concentración total se cuantificó a partir de una solución de dextrosa como estándar.

Para el caso de las proteínas totales, el extracto crudo fue diluido en proporción 1:5 en solución de hidróxido de sodio (0.5 N) para su posterior cuantificación soluble mediante el protocolo de ácido bicinconínico (BCA). Este utiliza un reactivo colorimétrico comercial (Sigma B6916) y suero de albúmina de bovino como estándar (Sigma 9048-46-8). La absorbancia se lee a 595 nm.

El contenido de lípidos totales se estimó mediante una modificación de la técnica de Bligh y Dyer (1959), en la cual la lectura se hace en una microplaca ELISA utilizando 25 μl del homogenizado, se le agregan 250 μl de ácido sulfúrico y se calienta en baño María por 10 minutos, se enfría en baño de hielo y finalmente se añaden 250 μl de una enzima comercial (kit de Randox TL100) como reactivo (Racotta *et al.*, 1998), utilizando Lin-trol (L2648 Sigma) como estándar. La absorbancia se lee a 560 nm.

6.10. Tratamiento estadístico de los datos

Primeramente, los datos morfométricos de los organismos (altura, longitud y peso húmedo total) obtenidos al inicio de los bioensayos fueron corroborados para normalidad y homogeneidad de varianzas mediante prueba de Kolmogorov-Smirnoff y Levene respectivamente (Sokal y Rohlf, 1981). A pesar de que las pruebas confirmaron la normalidad de los datos (ver resultados), se aplicaron métodos estadísticos no paramétricos

debido al tamaño de muestra manejado ($n= 6$ organismos/tratamiento/réplica/muestreo). Por ello, se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis para detectar diferencias significativas en los IC, IRM, composición bioquímica de tejidos e índices histoquímicos de los organismos en función de la dieta utilizada. En caso necesario, se aplicaron pruebas de comparación múltiple de medias de rangos para jerarquizar dichas diferencias. Los análisis se realizaron por separado para cada uno de los muestreos realizados a la mitad y al final del experimento. Todo ello se hizo con el programa STATISTICA 7 (StatSoft Inc., E.U.A.). En todos los casos el nivel de significancia se fijó a $P \leq 0.05$. Para la elaboración de los gráficos se utilizó el programa Slide Write (Versión 5.0-Bit edition, E.U.A.).

7. Resultados

7.1. Análisis inicial de tallas de los organismos

Para iniciar con el análisis de datos fue necesario comprobar la normalidad y homogeneidad de los mismos, los resultados se presentan en la tabla II.

Tabla II Resultados de las pruebas de normalidad y homogeneidad de varianzas de altura, longitud de la concha y peso húmedo total de adultos de *P. sterna* al inicio del bioensayo.

Variable	Media	K-S	Levene
Altura	50.2	P > 0.20	P > 0.20
Longitud	48.7	P < 0.15	P < 0.01
Peso húmedo total	31.5	P < 0.15	P < 0.01

7.2. Condición general de los organismos

El IC muestra una tendencia a incrementarse al tiempo medio del experimento con respecto al muestreo inicial en todos los tratamientos (figura 4). Los valores más bajos se registraron en todo el bioensayo en el tratamiento control (27.54 y 22.70% respectivamente), en tanto que los máximos se observaron en el tratamiento GAM al 1% (30.29%) hacia el tiempo medio y GAM al 2% (28%) al finalizar el experimento. Sin embargo, estas variaciones no fueron significativas entre tratamientos en ambos tiempos ($H=2.99$, $P > 0.05$ y $H=4.89$, $P > 0.05$ hacia el tiempo medio y final).

Se aprecia una tendencia a disminuir la biomasa muscular para el tiempo medio del experimento y posteriormente a estabilizarse hacia el final, independientemente del tratamiento utilizado (figura 5). A pesar de ello, el valor más alto de IRM se presentó en organismos alimentados con MAZ al 2% (10.86 %) a los 15 días, en tanto el valor más bajo ocurrió en los organismos alimentados con GAM al 2% (8.85 y 8.86% a la mitad y final del experimento respectivamente). Estas diferencias no resultaron significativas entre tratamientos en ninguno de los dos tiempos de muestreo ($H= 5.36$, $P > 0.05$; y $H= 1.2$, $P > 0.05$ respectivamente).

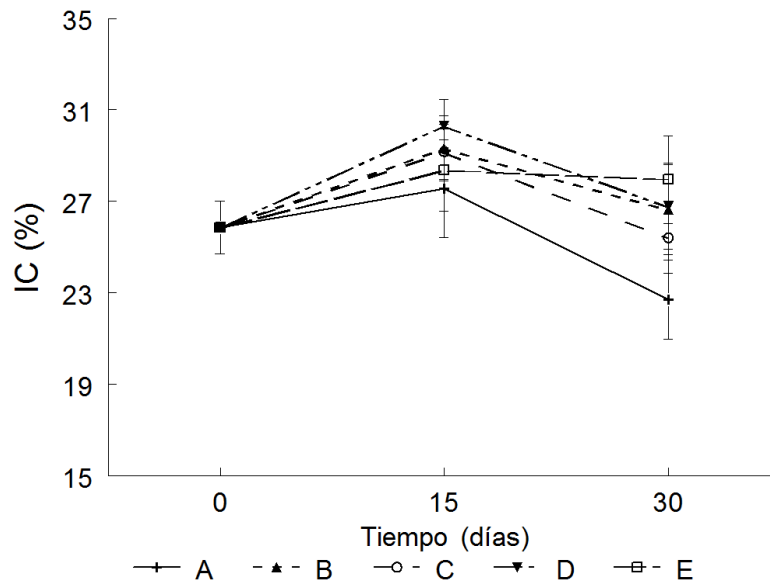


Figura 4. Variaciones en el Índice de Condición (IC) de organismos de *P. sterna* alimentados con diferentes dietas durante 30 días. Se muestran las medias \pm error estándar. A= Control; B= 1% MAZ; C= 2% MAZ; D= 1% GAM; E= 2% GAM.

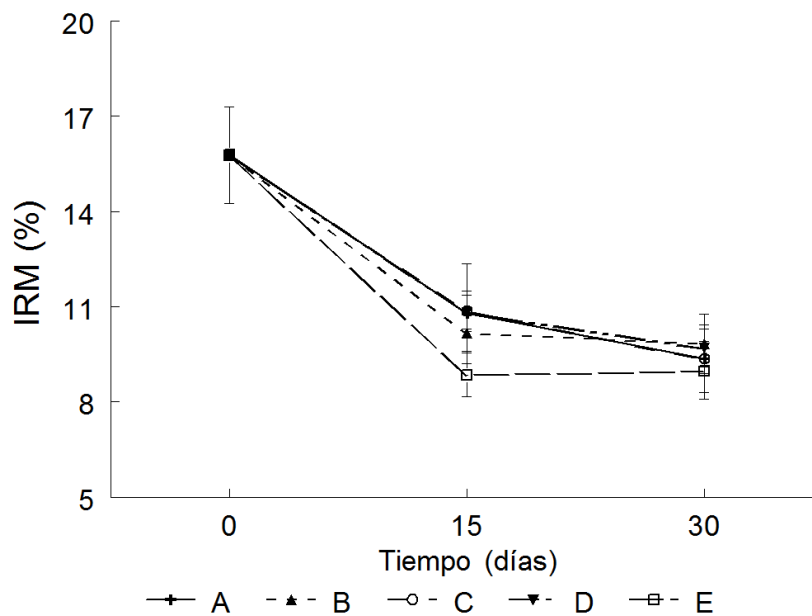


Figura 5. Variaciones en el Índice de Rendimiento Muscular (IRM) de organismos de *P. sterna* alimentados con diferentes dietas durante 30 días. Se muestran las medias \pm error estándar. A= Control; B= 1% MAZ; C= 2% MAZ; D= 1% GAM; E= 2% GAM.

7.3. Análisis histológico y digital de imágenes

7.3.1. Proporción sexual y desarrollo gonádico de los organismos

Al inicio del experimento, más del 60% de los organismos se encontraban indiferenciados sexualmente, alrededor del 35% fueron machos y no se detectó presencia de hembras (figura 6). A la mitad del experimento, se observa una mayor presencia de machos en todos los tratamientos, excepto en el grupo control, en el que los organismos indiferenciados representan el 55%; así también solo hay presencia de hembras en los tratamientos al 2% de alimentación con MAZ y GAM al 1 y 2% (C, D y E). Al final del experimento hay una mayor presencia de organismos indiferenciados con respecto al muestreo anterior, siendo el tratamiento GAM al 1% en donde se obtuvo la menor proporción de ellos (0 y 15% respectivamente), así como una mayor presencia de hembras en el tratamiento 2% GAM (35%). El grupo control no tuvo presencia de hembras en ninguno de los dos tiempos de muestreo.

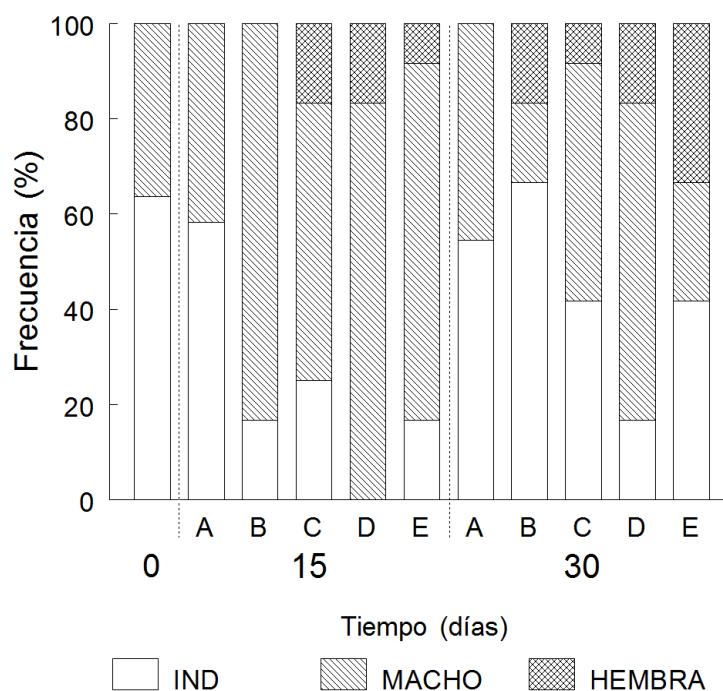


Figura 6. Proporción de sexos en organismos de *P. sterna* alimentados con diferentes dietas durante 30 días. Se muestran en porcentaje del total de organismos por tratamiento. A= Control; B= 1% MAZ; C= 2% MAZ; D= 1% GAM; E= 2% GAM.

En la Figura 7 se presenta el desarrollo gonádico de los organismos en cada tratamiento. Se aprecia que en el muestreo inicial no se encontraron hembras, así como tampoco en el grupo control ni en el tratamiento de 1% MAZ, hacia la mitad del experimento. En los restantes tratamientos el 100% de las hembras se encontraron en fase de desarrollo. Al final del experimento se evidencia un desarrollo gonádico avanzado, particularmente en hembras maduras en los tratamientos complementados al 1 y 2% con GAM (D y E). De la totalidad de las hembras, en el tratamiento 2% GAM, la mitad corresponden a etapas de reabsorción de gametos residuales, lo que sugiere la presencia de un desove no detectado visualmente en el medio experimental.

En el caso de los machos, se muestran más variedad de estadios en cada tiempo experimental muestreado (figura 7). Al inicio solo se observan organismos en desarrollo gonádico incipiente, mientras que a la mitad del experimento la mayoría presentaron desarrollo de gónada en todos los tratamientos (~80%) y en menor proporción las fases de madurez (15%), desoves parciales (2%) y postdesove (3%); éste último estuvo representado por un solo individuo en el tratamiento 1% MAZ. Hacia el final del experimento no hubo organismos en desarrollo, predominando los organismos en postdesove (~50%), madurez (~40%) y en desove parcial (10%).

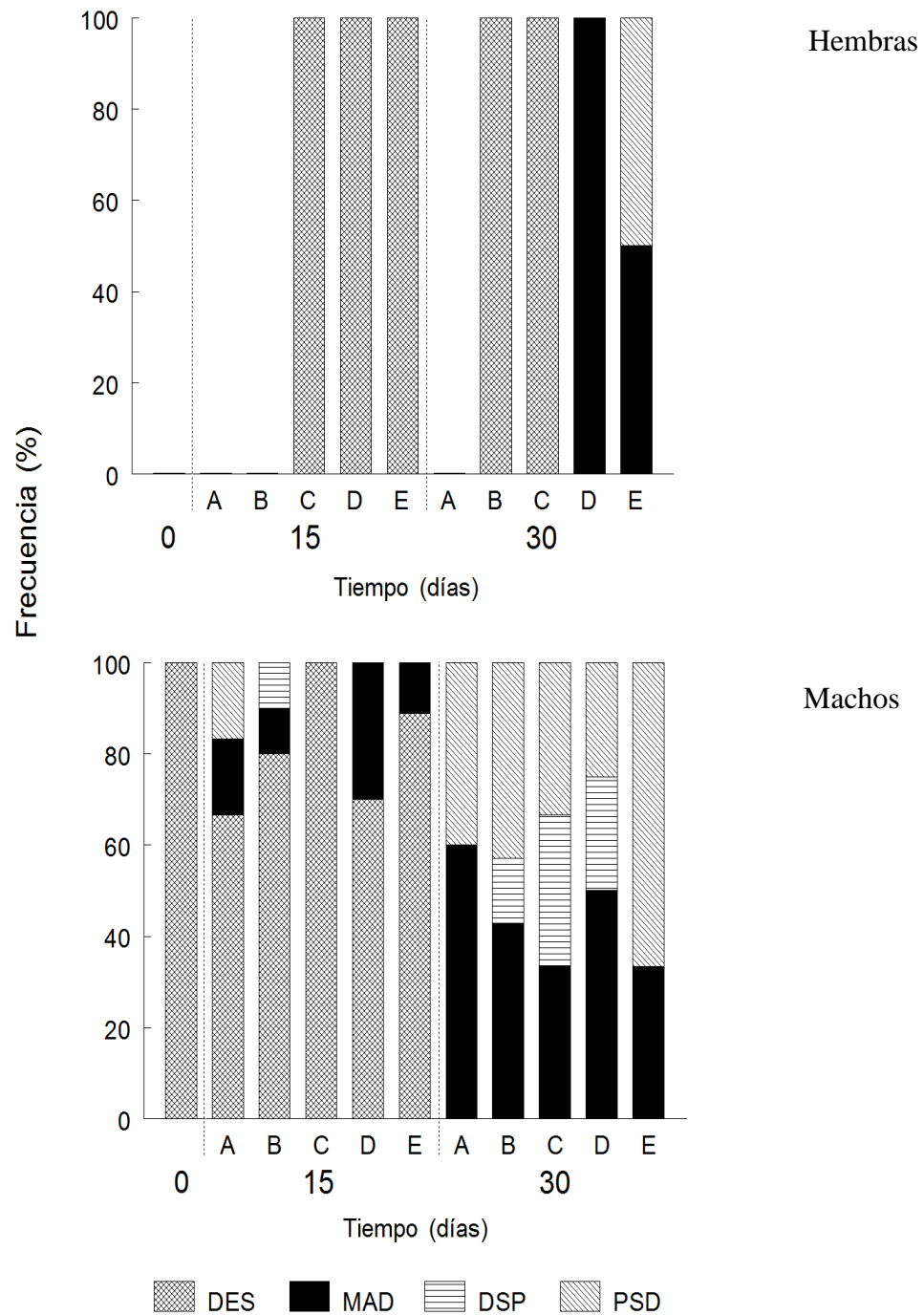


Figura 7. Fases de desarrollo gonádico de hembras y machos de *P. sterna* alimentados con diferentes dietas durante 30 días. Se muestran en porcentaje del total de hembras identificadas. A= Control; B= 1% MAZ; C= 2% MAZ; D= 1% GAM; E= 2% GAM. DES= Desarrollo, MAD= Madurez, DSP= Desove Parcial, PSD= Postdesove.

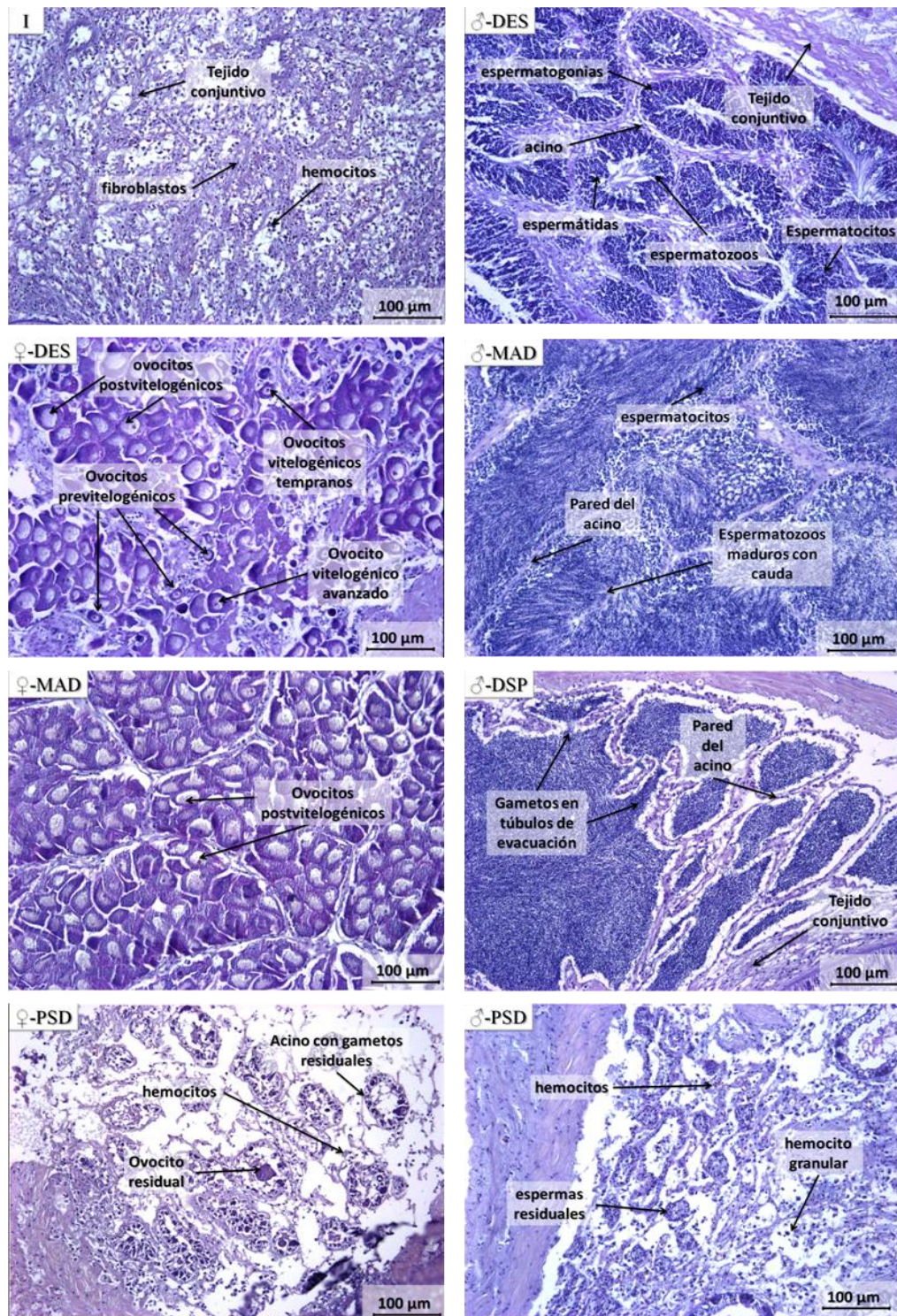


Figura 8. Microfotografías de gónadas (20X) de *P. sterna* teñidas con azul alciano pas, donde se muestran diferentes estadios de desarrollo: I=indiferenciado DES= Desarrollo, MAD= Madurez, DSP= Desove Parcial, PSD= Postdesove.

La observación de laminillas histológicas también reveló la presencia de dos individuos hermafroditas y se presume que son machos en regresión con formación de gametos femeninos (figuras 9 y 10). Éstos dos organismos se encontraron en los tratamientos adicionados con el 2% MAZ Y 1% MAZ en la parte media y final del experimento respectivamente.

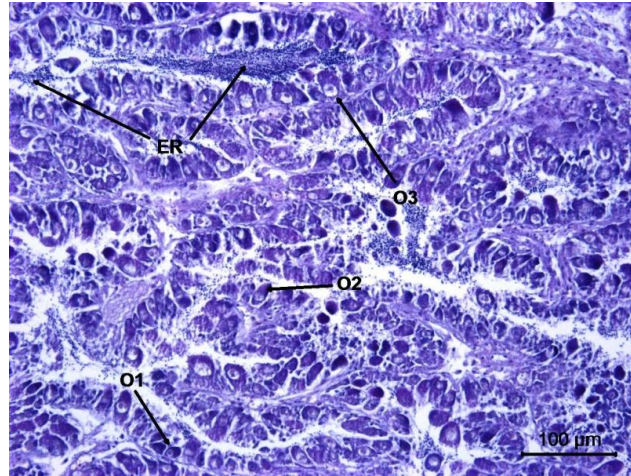


Figura 9. Microfotografía de una gónada (20X) hermafrodita de *P. sterna* teñida con Azul Alciano Pas. El corte corresponde a un organismo alimentado con MAZ al 2% a los 15 días. ER= espermias residuales, O1= ovocito previtelogénico, O2= ovocito vitelogénico temprano, O3= ovocito vitelogénico avanzado.

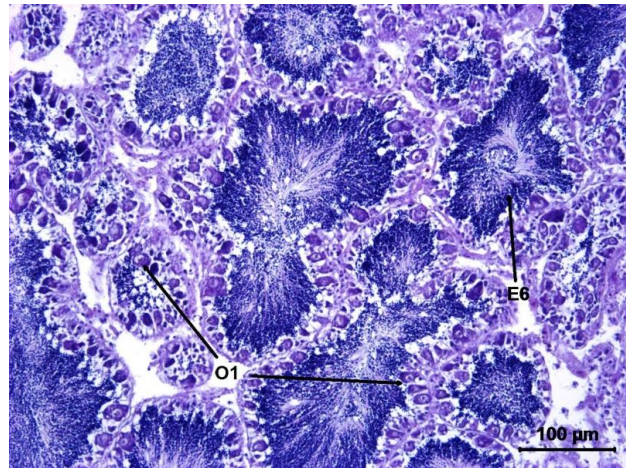


Figura 10. Microfotografía de una gónada (20X) hermafrodita de *P. sterna* teñida con Azul Alciano Pas. El corte corresponde a un organismo alimentado con MAZ al 1% a los 30 días. E6= espermatozoides maduros, O1= ovocito previtelogénico.

7.3.2. Talla de ovocitos

Este análisis se realizó con poca representación de hembras en la mayoría de los tratamientos, por lo que los resultados no son concluyentes (figura 11). A la mitad del experimento se observaron ovocitos con un intervalo más amplio de valores en el diámetro teórico, desde 32 μm (2% GAM) hasta 38 μm (2% MAZ), lo cual se tradujo en diferencias significativas entre tratamientos a este tiempo ($H= 31.46, P < 0.05$). El análisis de rangos indica que la diferencia se encuentra entre los tratamientos 1 y 2% GAM ($P < 0.05$). Hacia el final, las variaciones en el diámetro teórico son menores y van desde 35 μm en el tratamiento de 1% GAM hasta 41 μm en el de 2% GAM. En este caso, dichas variaciones no resultaron significativas ($H= 6.21, P < 0.05$).

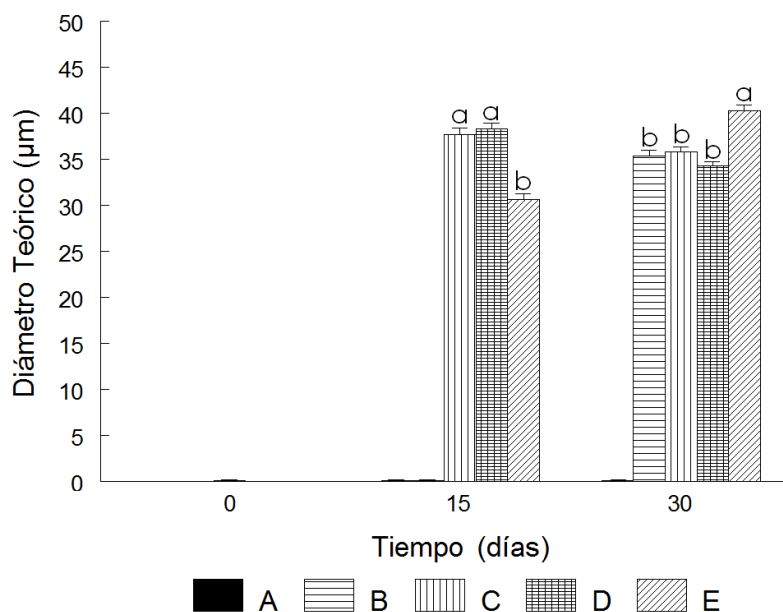


Figura 11. Variaciones temporales en el diámetro teórico de ovocitos de hembras de *P. sterna* alimentadas con diferentes dietas durante 30 días. Se muestran las medias \pm error estándar. Las letras diferentes reflejan diferencias significativas entre tratamientos ($P \leq 0.05$) por tiempo experimental. A= Control; B= 1% MAZ; C= 2% MAZ; D= 1% GAM; E= 2% GAM.

7.3.3. Índice de tejido gonádico (ITG)

En hembras, se observaron valores superiores al 30% de cobertura gonádica en el tratamiento suplementado al 1% con GAM durante el experimento (> 50%), lo cual indica mayor presencia de gametos (figura 12). De la mitad del experimento hacia el final aumenta la presencia de gametos femeninos y con ello su ITG en casi todos los tratamientos, excepto con el 2% GAM, en el que este índice disminuyó (15%). Sin embargo, es en este tratamiento donde se presentan organismos en estadio de Postdesove (17%). Estas diferencias en los valores de ITG no fueron significativas entre tratamientos en cada tiempo de muestreo ($H= 3.27, P > 0.05$; y $H= 1.33; P > 0.05$ en la parte media y al final respectivamente).

En el caso de los machos, a partir de la media más baja del ITG en el muestreo inicial (~20%), se observó una tendencia a incrementar a la mitad del experimento en todos los tratamientos (figura 12), para finalmente descender al final, excepto en los tratamientos complementados al 2% con GAM, donde se mantuvo constante (29%). Estas variaciones no fueron significativas entre tratamientos hacia la mitad ($H= 2.50, P > 0.05$) ni al final del experimento ($H= 0.42, P > 0.05$).

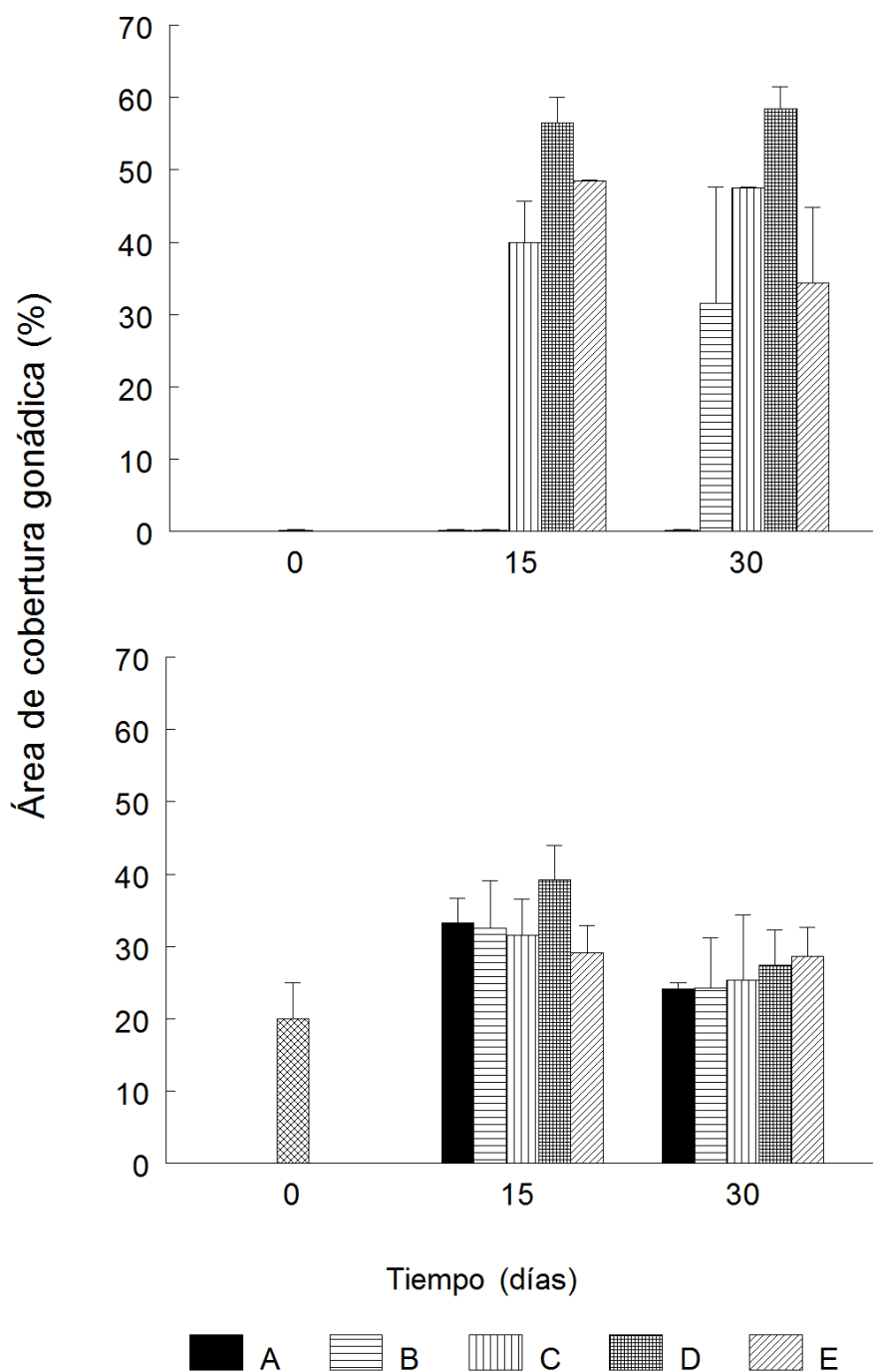


Figura 12. Variaciones temporales en el índice de tejido gonádico (ITG) de hembras y machos de *P. sterna* alimentados con diferentes dietas durante 30 días. A= Control; B= 1% MAZ; C= 2% MAZ; D= 1% GAM; E= 2% GAM.

7.4. Análisis histoquímico y digital de imágenes

7.4.1. Gónada

La porción de tejido correspondiente a la gónada muestra valores medios muy cercanos al índice glucídico (IG) desde el muestreo inicial con 15.56% y durante todo el experimento (figura 13). Hacia la mitad del experimento, el IG osciló entre 14.92% en 1% MAZ y 15.85% en 2% MAZ, por lo que no se detectaron diferencias significativas en este tiempo entre tratamientos ($H= 0.72$, $P > 0.05$). Al finalizar el experimento el intervalo de medias aumenta de 13.21 % en los tratamientos de 2% GAM y 16.50% en 1% MAZ, no obstante tampoco redundaron en diferencias significativas entre tratamientos ($H= 1.66$, $P > 0.05$).

Inicialmente, la gónada muestra valores promedio menores de lípidos que de carbohidratos. Al tiempo medio experimental, se muestran valores promedio más altos que en el muestreo inicial (5.53%), los cuales variaron desde 8.89% en el tratamiento de 2% GAM y hasta 18.89% en 2% MAZ. Hacia el final del experimento se observa una disminución de valores promedio para todos los tratamientos, excepto en el 2% GAM, en el que se incrementa el IL hasta alcanzar 16.29%. Estas variaciones no resultan significativas entre tratamientos para ninguno de los dos tiempos experimentales en gran parte debido a la gran variabilidad de los contenidos observados ($H= 1.44$, $P > 0.05$, $H= 5.11$, $P > 0.05$ tiempo medio y final respectivamente).

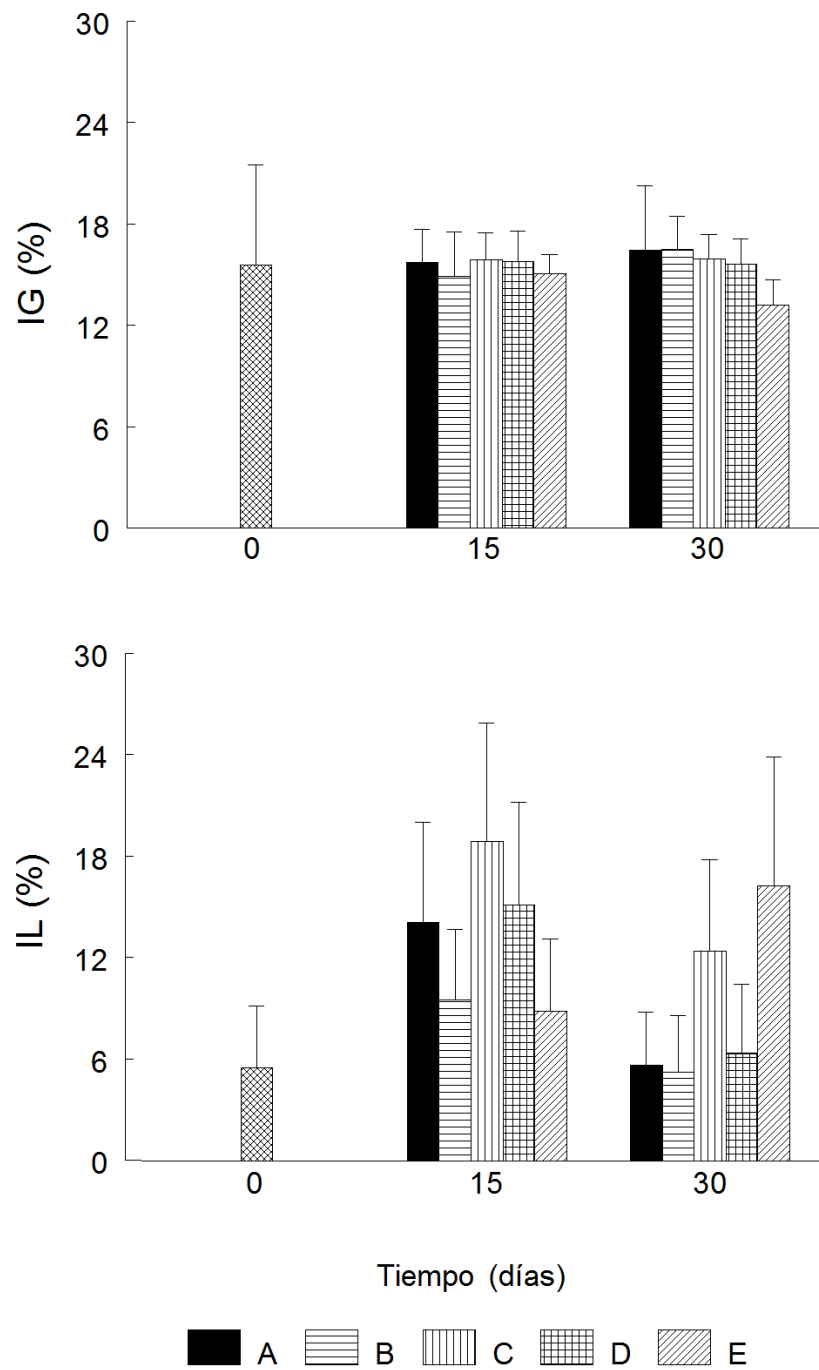


Figura 13. Variaciones en el índice glucídico (IG) e índice lipídico (IL) de la gónada de reproductores de *P. sterna* alimentados con diferentes dietas durante 30 días. Se muestran las medias \pm error estándar. A= Control; B= 1% MAZ; C= 2% MAZ; D= 1% GAM; E= 2% GAM.

7.4.2. Glándula digestiva

El IG de la glándula digestiva varió entre tratamientos (figura 14), destacando el 1% MAZ con el menor valor a la mitad del experimento (15.4%), que generó diferencias significativas con respecto a los otros tratamientos ($H= 11.62$, $P < 0.05$); los organismos alimentados al 1% con MAZ se separaron del grupo control y 1% GAM ($P > 0.05$ en ambos casos), con valores más altos (20.4 y 22.03% respectivamente). Al finalizar el ensayo, los valores del IG fueron más altos en el tratamiento 2% GAM (24.38%), lo que resultó en diferencias significativas con respecto a los otros tratamientos ($H= 13.07$, $P < 0.05$).

El IL fue más alto que el IG en la glándula digestiva (figura 14). Al iniciar el experimento se obtuvo una media de 38.23%, que se incrementó en los tratamientos complementados al 2% MAZ, 1% y 2% GAM. Al tiempo medio del experimento los valores del IL también variaron significativamente entre tratamientos ($H= 38.92$, $P < 0.05$), siendo el grupo control y 1% MAZ los que se separaron de los organismos alimentados al 2% MAZ y 1% y 2% GAM ($P < 0.05$ en todos los casos). Al final del experimento no se observaron diferencias significativas entre tratamientos ($H= 2.20$, $P > 0.05$).

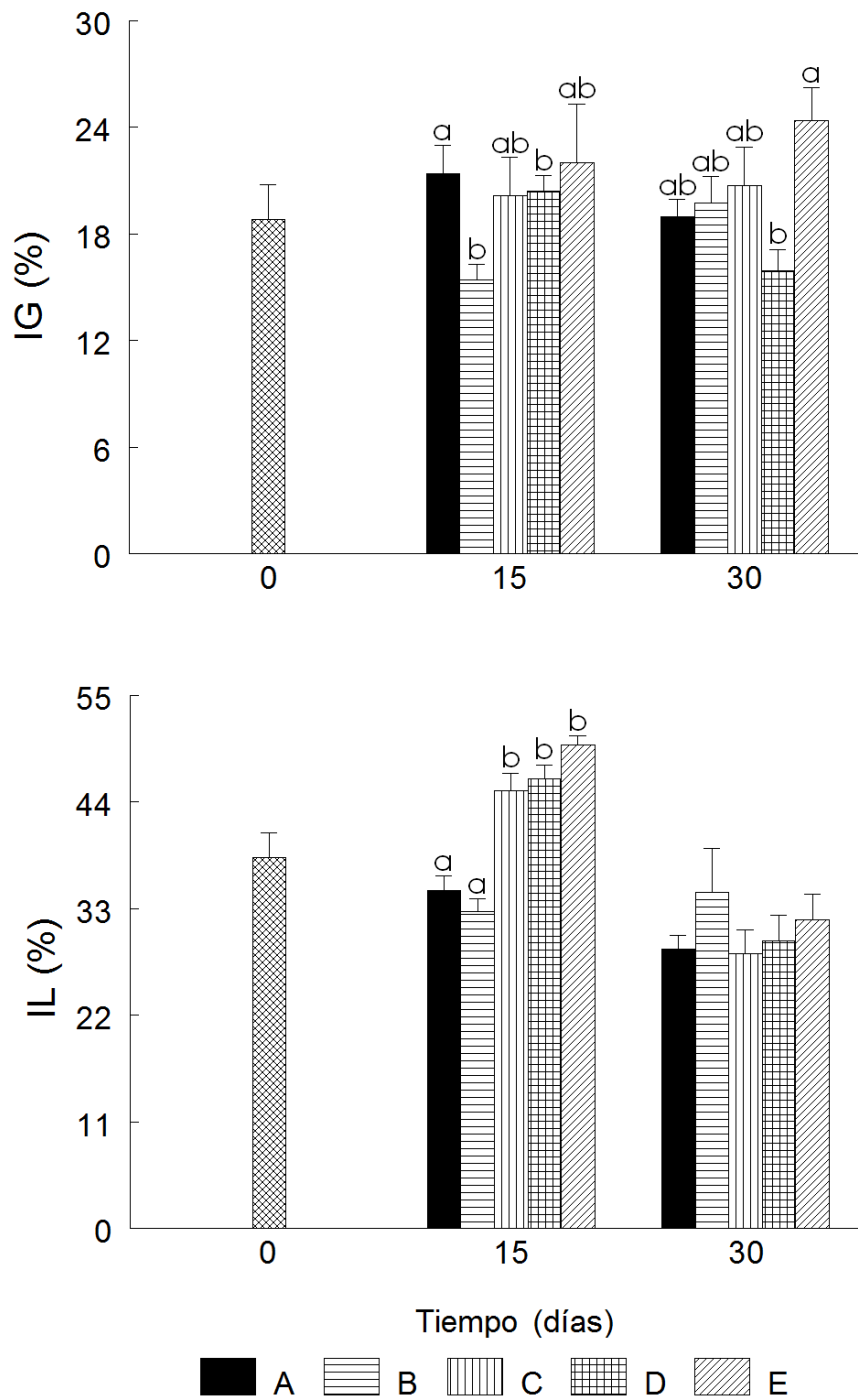


Figura 14. Variaciones en el índice glucídico (IG) e índice lipídico (IL) de la glándula digestiva de reproductores de *P. sterna* alimentados con diferentes dietas durante 30 días. Se muestran las medias \pm error estándar. Las distintas letras indican diferencias significativas entre tratamientos ($P \leq 0.05$) después de Kruskal-Wallis. A= Control; B= 1% MAZ; C= 2% MAZ; D= 1% GAM; E= 2% GAM.

7.4.3. Tejido conjuntivo

En este tejido, el IG fue mayor en el muestreo inicial (33.35%) y disminuyó a los 15 días. Destacan los valores mínimos de 19.01% del tratamiento 2% MAZ y máximo de 25.2% en el grupo control (figura 15). Al finalizar el experimento la tendencia fue al aumento del IG en los tratamientos Control, 1% MAZ y 2% MAZ, siendo este último el que registró el mayor aumento en este índice (de 19% a 32%). Estas diferencias no fueron significativas en ninguno de los dos tiempos de muestreo ($H= 6.85$, $P > 0.05$; y $H= 4.23$, $P > 0.05$ respectivamente).

La figura 15 muestra las variaciones del IL en el tejido conjuntivo. Se observa un mínimo de 23% en el tratamiento complementado al 1% MAZ y un máximo de 42% en el 2% GAM, lo que representó diferencias entre los tratamientos a este tiempo ($H= 25.41$, $P < 0.05$), particularmente en el grupo control y el tratamiento de 1% MAZ, que fueron diferentes de los dos tratamientos suplementados con 1% y 2% GAM ($P > 0.05$). Hacia el final hay una tendencia a volver a los valores promedio iniciales del IL, y no se observan diferencias significativas entre tratamientos ($H=1.06$, $P > 0.05$).

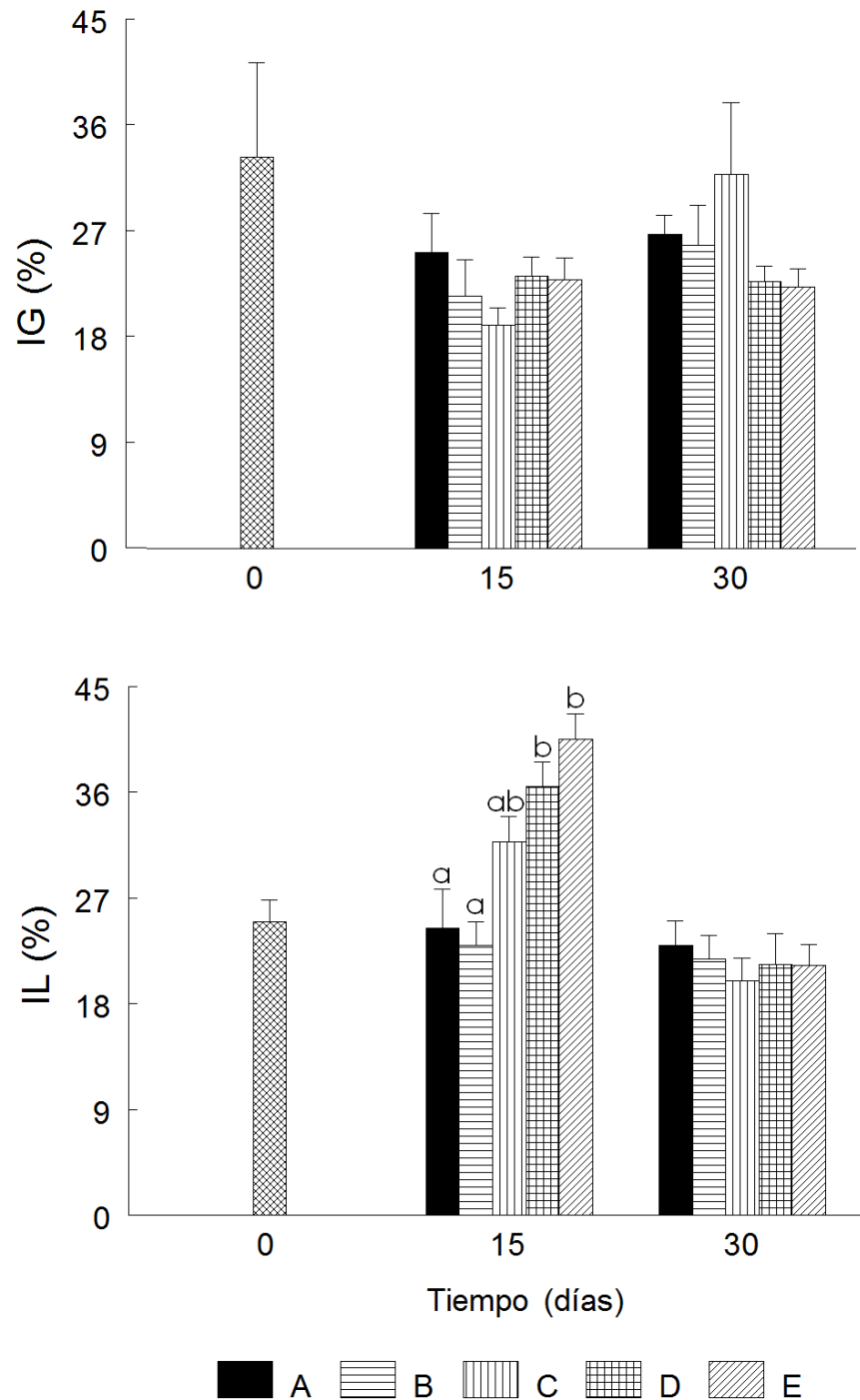


Figura 15. Variaciones en el índice glucídico (IG) e índice lipídico (IL) del tejido conjuntivo de reproductores de *P. sterna* alimentados con diferentes dietas durante 30 días. Se muestran las medias \pm error estándar. Las distintas letras indican diferencias significativas entre tratamientos ($P \leq 0.05$) después de Kruskal-Wallis. A= Control; B= 1% MAZ; C= 2% MAZ D= 1% GAM; E= 2% GAM.

7.5. Análisis bioquímico

7.5.1. Gónada

Físicamente, la cantidad de tejido gonádico en los organismos fue muy variable en todos los muestreos. Los niveles de carbohidratos durante la parte intermedia y final del experimento se mantuvieron por debajo del inicial 62.37 mg/g^{-1} de peso seco (figura 16), siendo los valores más altos en los tratamientos complementados con MAZ al 1% y 2% (35.29 y 50.44 mg/g^{-1} respectivamente) y más bajos en el grupo control (20.46 mg/g^{-1}). Estas diferencias fueron significativas ($H= 17.04$, $P < 0.05$) y ubicaron al tratamiento de 2% MAZ diferente del control y los complementados al 1% y 2% con GAM. Al finalizar el experimento, la concentración de carbohidratos disminuyó en todos los tratamientos, principalmente en el 2% MAZ (22.82 mg/g^{-1}), que generó diferencias significativas ($H= 16.37$, $P < 0.05$) con respecto a los tratamientos 2% MAZ y 1% GAM.

Los niveles de lípidos en todo el periodo experimental mostraron niveles más altos que el muestreo inicial (41.64 mg/g^{-1}) (figura 16). Al tiempo medio, se obtuvo una concentración de hasta 69.54 mg/g^{-1} en el tratamiento complementado al 1% GAM y un valor de alrededor de 51 mg/g^{-1} en los tratamientos 2% MAZ y 2% GAM, no obstante estas diferencias no resultaron significativas ($H= 3.30$, $P > 0.05$). Al finalizar el experimento, dichos valores se incrementaron en el grupo control y el complementado con MAZ al 1% y 2% ($\sim 62 \text{ mg/g}^{-1}$), pero particularmente el complementado con GAM al 2% (84.29 mg/g^{-1}). Sin embargo, estas variaciones no son estadísticamente significativas ($H= 1.05$, $P > 0.05$). Los valores iniciales de proteínas del tejido gonádico (564.63 mg/g^{-1}) disminuyeron en el tratamiento complementado al 2% MAZ (516 mg/g^{-1}) y se incrementaron en el suplementado al 1% GAM (592 mg/g^{-1}) a la mitad del bioensayo. A pesar ello, las diferencias entre tratamientos no resultaron significativas ($H= 3.99$, $P > 0.05$). Hacia el final del experimento, los organismos del grupo control poseen la concentración más alta de proteínas (602.63 mg/g^{-1}) y el mínimo se obtuvo en el tratamiento complementado al 1% GAM (411.08 mg/g^{-1}). Estas diferencias no resultaron significativas entre tratamientos ($H= 6.25$, $P > 0.05$).

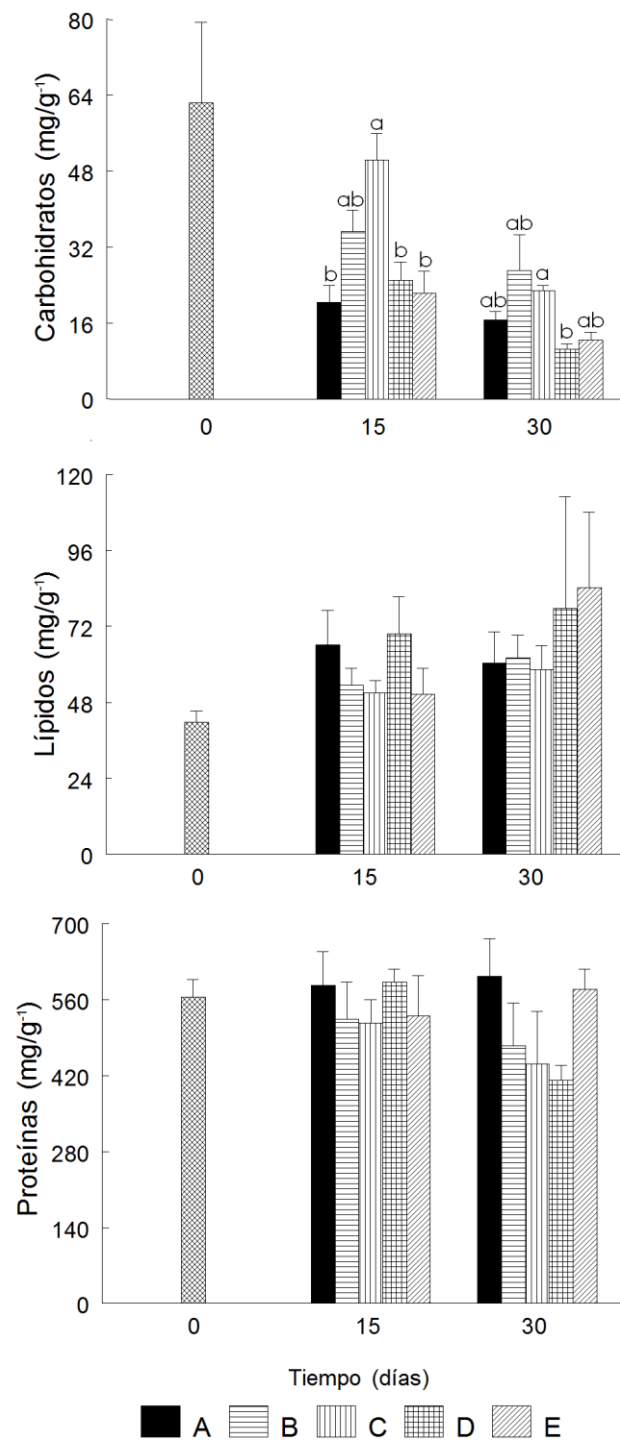


Figura 16. Variaciones en el contenido de carbohidratos, lípidos y proteínas de la gónada de reproductores de *P. sterna* alimentados con diferentes dietas durante 30 días. Se muestran las medias \pm error estándar. diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos ($P \leq 0.05$) por tiempo experimental, después de Kruskal-Wallis. A= Control; B= 1% MAZ; C= 2% MAZ; D= 1% GAM; E= 2% GAM.

7.5.2. Glándula digestiva

La concentración de carbohidratos en la glándula digestiva (figura 17) al tiempo medio del experimento fue muy similar a los valores de inicio (56.42 mg/g^{-1}), excepto en el tratamiento 2% MAZ (75.75 mg/g^{-1}) que presentó valores promedio mayores aunque no hubo diferencias significativas entre los tratamientos ($H= 5.87, P > 0.05$). Por el contrario al final si se observaron diferencias entre los tratamientos con el menor valor correspondiente al control (62 mg/g^{-1}). Al final del experimento, los valores de carbohidratos mostraron diferencias significativas ($H= 9.93, P < 0.05$), destacando el tratamiento de 1% GAM con los valores significativamente más bajos (50.84 mg/g^{-1}).

La composición de lípidos de la glándula digestiva fue un aproximadamente un 50% más baja en todos los tratamientos excepto al final en el tratamiento de 2% GAM (figura 17). Los valores disminuyeron de 120 mg/g^{-1} a entre 45 mg/g^{-1} y 61 mg/g^{-1} en la mayoría de los casos en el tiempo medio y final, observándose diferencia significativa entre tratamientos 1% MAZ y 2% GAM en el tiempo medio ($H= 9.79, P < 0.05$). Al final cuando al parecer se recupera el nivel inicial de lípidos solo con el tratamiento de 2% de GAM por lo que también se observa una diferencia significativa entre tratamientos ($H= 23.09, P < 0.05$), debido principalmente al tratamiento 2% GAM, que duplicó su concentración con respecto al muestreo anterior (de 59.61 a 120.76 mg/g^{-1}) y con respecto a los cuatro tratamientos restantes.

El contenido de proteínas en la glándula digestiva mostró una gran variación, sin definir una tendencia con respecto a los tratamientos o el tiempo (figura 17). Al tiempo medio, los tratamientos no mostraron diferencias significativas ($H= 6.82, P= 0.14$), pero ubicaron al tratamiento 1% GAM con el menor contenido de proteínas (307.66 mg/g^{-1}) y a los complementados con MAZ (1% y 2%) los más altos (393.58 y 391.37 mg/g^{-1}). Al finalizar el experimento también se obtuvieron diferencias significativas ($H= 26.85, P < 0.05$), representadas por el tratamiento 2% MAZ con el valor mínimo (255.81 mg/g^{-1}) y al grupo control con el valor máximo (503.77 mg/g^{-1}).

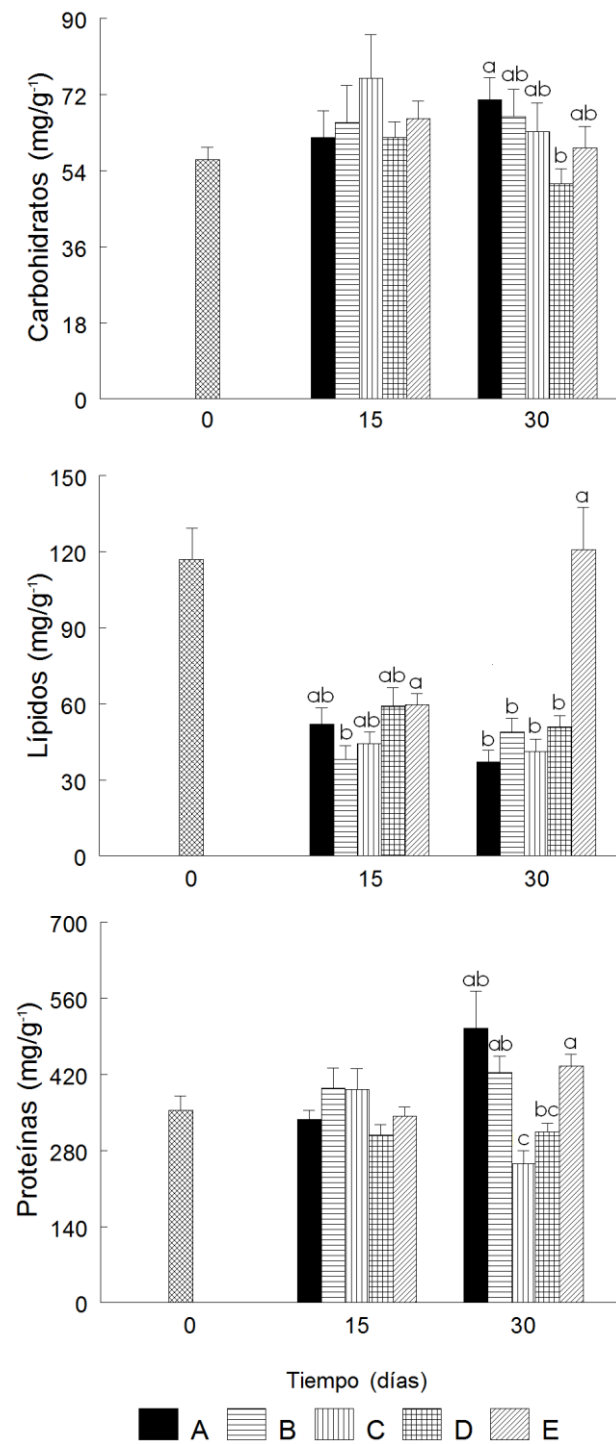


Figura 17. Variaciones en el contenido de carbohidratos, lípidos y proteínas de la glándula digestiva de reproductores de *P. sterna* alimentados con diferentes dietas durante 30 días. Se muestran las medias \pm error estándar. diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos ($P \leq 0.05$) por tiempo experimental, después de Kruskal-Wallis. A= Control; B= 1% MAZ; C= 2% MAZ; D= 1% GAM; E= 2% GAM.

7.5.3. Músculo

La Figura 18 muestra las variaciones en los niveles de carbohidratos en el músculo, desde el muestreo inicial con valores altos (129.64 mg/g^{-1}) hasta los observados en el grupo control (11.16 mg/g^{-1}) y el complementado con 2% MAZ (81.68 mg/g^{-1}), que disminuyeron significativamente hacia la mitad del experimento ($H= 23.04$, $P < 0.05$) en casi todos los tratamientos. Al final del experimento, nuevamente la tendencia es a disminuir la concentración de carbohidratos, lo cual se tradujo en diferencias significativas ($H= 19.72$, $P < 0.05$) del tratamiento 2% MAZ (39.71 mg/g^{-1}) con respecto del control (8.91 mg/g^{-1}) y el tratamiento de 2% GAM (9.26 mg/g^{-1}).

Los niveles de lípidos tendieron a mantenerse por debajo de los 30 mg/g^{-1} , desde el muestreo inicial y durante todo el experimento (figura 18). Hacia la mitad, las variaciones entre los tratamientos y respecto al inicio fueron significativas ($H= 9.86$, $P < 0.05$) y separaron a las dietas del grupo control y 2% MAZ por sus valores más bajos y altos (17.52 y 25.98 mg/g^{-1}) respectivamente con respecto a los restantes tratamientos. Hacia el final del experimento se obtuvieron también diferencias significativas en la composición de lípidos del músculo ($H= 19.04$, $P < 0.05$), representadas por el valor más alto del control (24 mg/g^{-1}) y más bajo de las dietas complementadas con MAZ al 1% y 2% ($\sim 14 \text{ mg/g}^{-1}$).

El contenido de proteínas a la mitad del experimento muestra valores aproximados al inicial, siendo el menor y mayor en los tratamientos de 1% MAZ (617.07 mg/g^{-1}), y 2% GAM (703.84 mg/g^{-1}), respectivamente. Estas variaciones no resultaron significativas ($H= 6.64$, $P > 0.05$). Hacia el final del experimento, la concentración de proteínas tuvo un máximo en el tratamiento control (700 mg/g^{-1}) y un mínimo en 2% MAZ (386.81 mg/g^{-1}). Las diferencias fueron significativas con respecto al control, 1% MAZ y 2% GAM ($P < 0.05$).

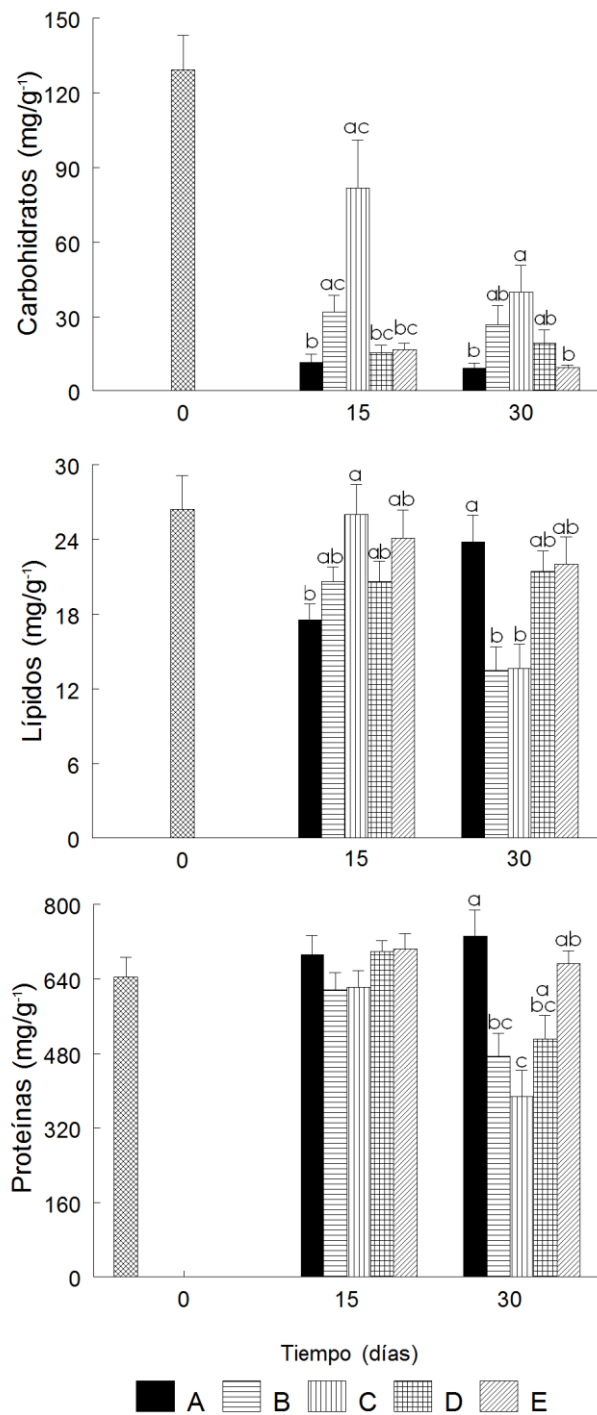


Figura 18. Variaciones en el contenido de carbohidratos, lípidos y proteínas del músculo de reproductores de *P. sterna* alimentados con diferentes dietas durante 30 días. Se muestran las medias \pm error estándar. diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos ($P \leq 0.05$) por tiempo experimental, después de Kruskal-Wallis. A= Control; B= 1% MAZ; C= 2% MAZ; D= 1% GAM; E= 2% GAM.

7.5.4. *Manto*

El manto muestra los valores más bajos de carbohidratos en los tres tiempos de muestreo (día 0, 15 y 30) con respecto al resto de los tejidos, manteniendo valores por debajo de 35 mg/g⁻¹ (figura 19). Hacia la mitad del experimento, el tratamiento 2% MAZ mostró el valor más alto (34.46 mg/g⁻¹) y el mínimo el tratamiento 1% GAM (10.88 mg/g⁻¹), variaciones que resultaron significativas (H= 27.46, P < 0.05) y separan ambos tratamientos del control y los complementados al 1% y 2% con GAM. Hacia el final del experimento se obtuvieron diferencias significativas en el contenido de carbohidratos (H= 17.70, P < 0.05), representadas por el tratamiento con el valor más alto 1% MAZ (23.02 mg/g⁻¹) y diferente de aquel complementado al 1% GAM; del mismo modo la dieta 2% MAZ resultó diferente de aquellas de GAM al 1% y 2%.

Los lípidos hacia la mitad del experimento obtuvieron medias cercanas al valor inicial (26.71 mg/g⁻¹), aunque el valor máximo se obtuvo en la dieta complementada al 2% GAM (36 mg/g⁻¹) (figura 19). Estas variaciones fueron significativas entre tratamientos (H= 16.67, P < 0.05) y se encuentran entre el tratamiento 2% GAM y los tratamientos control, 1% MAZ y 1% GAM. Al finalizar el experimento el tratamiento 1% MAZ incrementó su concentración de lípidos (54.65 mg/g⁻¹), aunque no resultó significativamente diferente con respecto al tratamiento 2% MAZ con el valor más bajo (25.68 mg/g⁻¹) (H= 7.97, P > 0.05).

La concentración de proteínas al tiempo medio experimental estuvo por debajo del valor inicial (455.69 mg/g⁻¹), obteniendo un máximo de 448.81 mg/g⁻¹ en el tratamiento 2% MAZ y un mínimo de 301.91 mg/g⁻¹ en 1% GAM. Estas diferencias no fueron significativas (H= 8.79, P > 0.05). Hacia el final del experimento el valor mínimo corresponde al tratamiento control (297.41 mg/g⁻¹) y el máximo al complementado al 1% GAM (455.69 mg/g⁻¹), lo que no se tradujo en diferencias entre tratamientos (H= 8.79, P > 0.05).

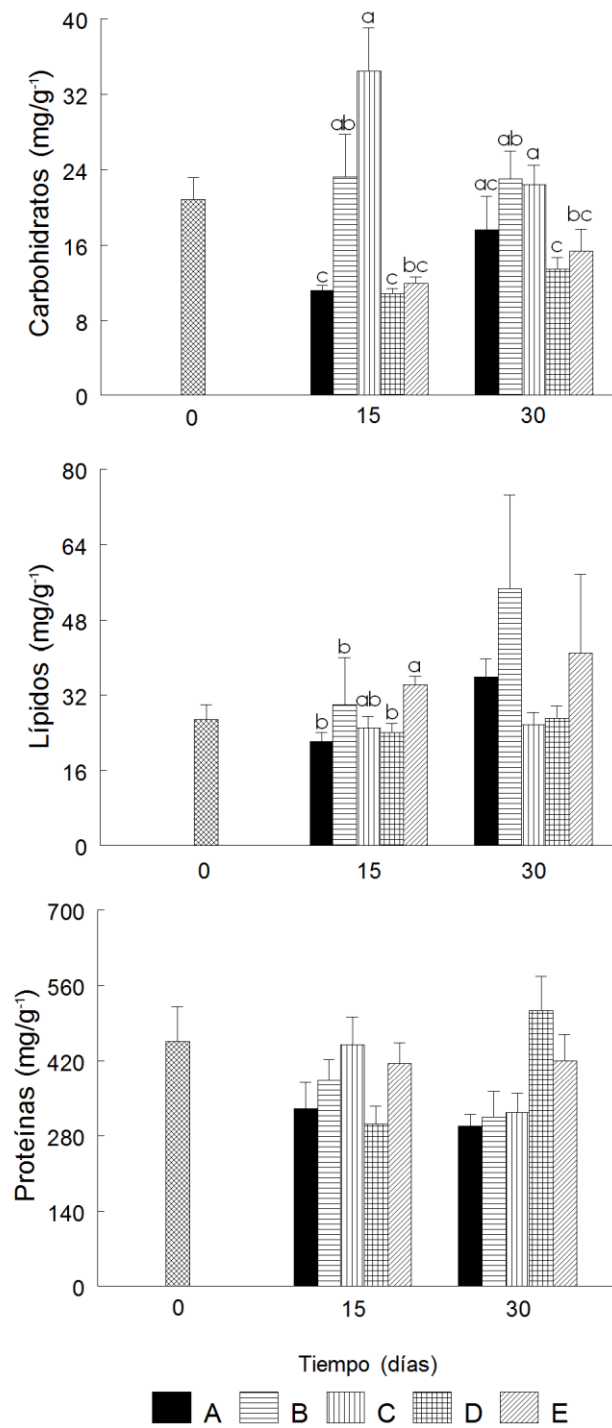


Figura 19. Variaciones en el contenido de carbohidratos, lípidos y proteínas del manto de reproductores de *P. sterna* alimentados con diferentes dietas durante 30 días. Se muestran las medias \pm error estándar. diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos ($P \leq 0.05$) por tiempo experimental, después de Kruskal-Wallis. A= Control; B= 1% MAZ; C= 2% MAZ; D= 1% GAM; E= 2% GAM.

8. Discusión

8.1. Consideraciones generales sobre la ración alimenticia y manejo de las dietas y su efecto en el desarrollo y composición de la gónada y tejidos somáticos de *P. sterna*

La definición de los tratamientos dietéticos y de la ración diaria de alimento a proporcionar se realizó tomando como referente una dieta principal (control) constituida por una mezcla de microalgas que se ha reportado como adecuada y con un efecto complementario entre flagelados y diatomeas de diferentes especies, con diferente calidad nutricional (*I. galbana*, *P. salina* y *C. calcitrans*), que resultan adecuadas para la alimentación de moluscos bivalvos en condiciones de cultivo experimentales o piloto y comercial (ver Ojeda *et al.*, 2008; González-Jiménez, 2012). Igualmente, se seleccionaron como complementos artificiales para la dieta natural por excelencia (microalgas), dos productos comerciales de fácil acceso en el mercado, como la Maizena[®] y el Omega-Mex DHA30[®], los cuales son ricos en carbohidratos y ácidos grasos (30% de DHA en particular), respectivamente.

La utilización de complementos alimenticios ha sido una estrategia útil para optimizar el cultivo de diversas especies de moluscos bivalvos, particularmente con el fin de obtener mejores resultados en las etapas de acondicionamiento gonádico para maduración de reproductores en el laboratorio (Knauer y Southgate, 1997; Helm, 2006). En este caso, la cantidad y calidad de alimento suministrado juega un papel fundamental en el incremento en peso y acumulación de reservas energéticas en los gametos para mejorar su condición fisiológica y asegurar el éxito de las subsiguientes etapas de desarrollo embrionario y larvario (Langdon y Waldock, 1981; Langdon y Siegfried, 1984; Gallager *et al.*, 1986).

La respuesta a estas condiciones varía dependiendo de la especie, poblaciones de la misma especie, e inclusive del sexo (Epp *et al.*, 1988; Barber y Blake, 1991). Aunque existe a la fecha un cierto grado de conocimiento sobre los requerimientos nutricionales de ciertas especies de bivalvos de las familias Pectinidae, Ostreidae y Mitylidae (ver revisión de Knauer y Southgate, 1997 y Brown *et al.*, 1989), para otras especies de la familia Pteriidae, como *P. sterna*, se desconocen casi por completo estos requerimientos, particularmente la ración diaria de alimento requerida para animales mantenidos en laboratorio. Por esta

razón, se adoptó la ración recomendada por Helm (2006) para moluscos bivalvos en general y se suministró del 2 al 4% del peso seco de la masa visceral expresada en peso seco de las microalgas y de los complementos seleccionados.

Se ha considerado que un aumento en la cantidad de alimento podría ocasionar que los organismos incrementen su masa visceral y peso húmedo y en consecuencia “engorden”, pero no necesariamente madure sexualmente la gónada y se produzcan gametos viables. En este sentido, se aclara que el objetivo central de este estudio no fue dirigido a madurar sexualmente a los organismos ni a obtener gametos fertilizables. Por el contrario, el trabajo se enfocó principalmente a evaluar el efecto de la dieta en el desarrollo y composición de la gónada y tejidos somáticos relacionados de una o de otra manera con el proceso reproductivo de la especie.

Al respecto, las evidencias histológicas, histoquímicas y bioquímicas indican que casi ninguno de los tratamientos resultaría del todo satisfactorio si el objetivo hubiese sido promover un desarrollo activo de la gónada con fines de maduración, desove y producción de larvas. Tampoco se aprecia una movilización determinante de reservas energéticas de los tejidos somáticos (glándula digestiva, músculo aductor y manto) hacia la gónada. Solo en aquellos individuos en los que la dieta microalgal fue suplementada con cápsulas GAM de aceite orbital de atún Omega-Mex DHA30[®] y de Maizena[®] se observó una proporción alta de diferenciación sexual (hasta del 100% en los alimentados al 1% con GAM). En contraste, los animales alimentados únicamente con microalgas (grupo control) mostraron un 50% de diferenciación sexual y no hubo presencia de hembras, lo que sugiere que esta dieta no fue suficiente para el sustento de la ovogénesis.

El tema de la ausencia de hembras requiere especial atención, debido a que a la fecha existe controversia en la manera en que se expresa la sexualidad en los miembros de la familia Pteriidae, particularmente en organismos silvestres o provenientes de cultivo (ver revisión de Saucedo y Southgate, 2008). Por ejemplo, Wada (1973), Tranter (1958) y Gervis y Sims (1992) reportaron que la proporción sexual en ostras de la población natural era 1:1 después del primer año de vida. Sin embargo, esto no parece cumplirse del todo en

las ostras de diferente especie y de diferente talla, pues se ha encontrado que la proporción sexual no siempre alcanza la unidad en *Pinctada fucata* de la India (Chellam, 1987), *P. mazatlanica* de Costa Rica (Solano-López *et al.*, 1997) y México (Saucedo *et al.*, 2002b), *Pinctada albina sugillata* de Australia (O'Connor, 2002), *Pinctada imbricata* también de Australia (O'Connor y Lawler, 2004) y *P. penguin* de Tailandia (Arjarasirikoon *et al.*, 2004).

En adición a lo anterior, se han observado dos fenómenos reproductivos importantes en adultos de *P. mazatlanica* de más de un año de edad que provienen de cultivo extensivo y que probablemente están sometidos a condiciones de estrés por alta densidad (Saucedo *et al.*, 2002). El primero es que existe una marcada predominancia de organismos sexualmente indiferenciados sobre aquellos en estadio de desarrollo activo o madurez. El segundo es que la proporción sexual tiende a sesgarse fuertemente hacia los machos, con valores hembra:macho cercanos a 0.2:1. Valores similares de proporción sexual H:M ya han sido observados también en *P. mazatlanica* proveniente de cultivo extensivo por Gómez-Robles *et al.* (2005) y Vite-García y Saucedo (2008).

Mientras que la condición de indiferenciación sexual implica la no diferenciación de las células germinales y la retención de la fase vegetativa de manera indefinida por la existencia de condiciones poco propicias para la gametogénesis, la segunda condición confirma la dificultad de las ostras que seguramente estaban sometidas a condiciones de estrés para desarrollar el sexo femenino, el cual es energéticamente más costoso de producir que el sexo masculino (Acosta-Salmón y Southgate, 2005).

El limitado desarrollo de la gónada y la poca movilización de reservas de los tejidos somáticos a la gónada, pudiera ser atribuible a la temperatura del agua, que es uno de los factores más relevantes en el proceso de maduración sexual y juega un papel clave en la regulación de numerosos procesos fisiológicos involucrados en la reproducción de los moluscos de las familias Bivalvia (Bayne, 1976), Mytilidae (Seed, 1976), Ostreidae (Andrews, 1979), Veneridae (Mackie, 1984), Pectinidae (Román *et al.*, 2002; Barber y Blake, 2006), y Pteriidae (Saucedo y Southgate, 2008).

La única experiencia previa de maduración de *P. sterna* en cautiverio se realizó con reproductores alimentados con una dieta artificial a base de diferentes tipos de cereales ricos en carbohidratos, como fécula de maíz, harina de trigo, arroz y maíz (Mazón-Suástegui, 1988). Este autor logró incrementar la proporción de la biomasa gonádica y asegurar hasta 100% de éxito en el desove cuando los organismos fueron alimentados con fécula de maíz y harina de arroz en proporción 1:1. Estos resultados sugieren que el alto contenido de carbohidratos que poseen estas dietas favorece un incremento en el depósito de glucógeno en el molusco, así como su fácil y rápido metabolismo en otros componentes como lípidos por medio de lipogénesis, lo que le permite cubrir sus necesidades energéticas básicas para la reproducción. Situaciones similares han sido reportadas para otros bivalvos donde el glucógeno se metaboliza en otros componentes para promover la reproducción de adultos de *C. virginica* (Dupuy *et al.*, 1977), *C. gigas* (Baltazar *et al.*, 1999) y *Mytilus galloprovincialis* (Pirini *et al.*, 2007).

Por otro lado, también se ha visto un incremento notable en el crecimiento de larvas y para juveniles tempranos de otras especies de bivalvos, cuando la dieta microalgal ha sido complementada con productos artificiales como cereales. Esto es cierto para *R. decussatus* alimentado con harina de trigo (Fernández-Reiriz *et al.*, 1998; Albentosa *et al.*, 1998), *R. philippinarum* complementado con harina de trigo (Albentosa *et al.*, 2002), *N. subnodosus* provisto de fécula de maíz (Mazón-Suástegui *et al.*, 2008) y *C. corteziensis* suplementado con harina de maíz (Mazón-Suástegui *et al.*, 2009).

En este estudio los grupos experimentales se mantuvieron a una temperatura constante de 23 °C para todos los tratamientos, ya que se ha reportado que *P. sterna* se reproduce durante los meses fríos de invierno, cuando la temperatura disminuye y se encuentra entre 23 y 20 °C (Saucedo y Monteforte, 1997; Hernández-Olalde *et al.*, 2007). Esta condición de temperatura constante y justo en el límite superior del rango térmico de invierno, no parece haber favorecido el desarrollo gonádico de los reproductores, ya que Mazón-Suástegui (2008) obtuvo resultados positivos a temperaturas de 19-20 y 20-24 °C. Desde otro enfoque, probablemente hubiese sido conveniente incluir algún tipo de variación térmica (ciclo descendente u oscilante) que refleje lo que sucede en el ambiente natural,

donde llegan a ocurrir variaciones térmicas entre 0.5 y 8°C en un solo día (Sicard *et al.*, 2008; Granados-Amores, 2012). Una temperatura constante pudo ocasionar que no se alcanzara un determinado “umbral térmico” requerido e indispensable para que los reproductores iniciaran sus procesos reproductivos clave, como la diferenciación de las células germinales, su multiplicación y crecimiento continuo en gametos masculinos y femeninos, con especial interés en la vitelogénesis.

En cuanto al tiempo de experimentación, Mazón-Suástegui (1988) realizó sus experimentos de acondicionamiento gonádico, maduración y desove de *P. sterna* en periodos de 60, 90 y 120 días, mientras que Avilés-Quevedo y Mazón-Suástegui (1989) lo hicieron en periodos de 110 días con la misma especie. En ambos casos se reportan desoves en diferentes meses del año (abril, septiembre, octubre y noviembre) y una eficiencia del 40 al 100%, considerando número de individuos desovados de ambos sexos.

Para el presente estudio no se pretendía la maduración y desove de los organismos, por lo que se considera que 30 días es un periodo razonable para detectar cambios mínimos en el desarrollo y la composición bioquímica de la gónada y otros tejidos. Esto concuerda con los tiempos sugeridos para otros bivalvos madurados en cautiverio, como *A. purpuratus* (Avendaño y Le Pennec 1996, 1997), *A. ventricosus* (Luna-González 1997), y *C. gigas* (Baltazar *et al.*, 1999), en donde ha sido posible obtener organismos con gónadas en estadios de madurez en periodos de tiempo relativamente cortos.

Bajo las condiciones del experimento, la concentración de nitrógeno amoniacal en el agua de los contenedores, puede tener una relación directa con la acumulación de desechos orgánicos como restos de alimento no ingerido y asimilado por los organismos en cultivo. Durante el desarrollo del presente estudio se registraron concentraciones iniciales de amonio de 0.316 a 0.446 mg/L⁻¹ (relativamente altas), y disminuyeron hacia la mitad del experimento, lo que pudo deberse a una mayor adaptación de los organismos al nuevo régimen alimenticio. Sin embargo, hacia el final del periodo, no se registraron valores claramente definidos o tendencias asociadas a ninguna dieta (anexo B, tabla III).

8.2. Evidencia de los índices de condición y análisis histológicos, histoquímicos y bioquímicos

Para el estudio de la reproducción de moluscos bivalvos, los índices calculados a partir del peso de la biomasa seca y húmeda han demostrado ser una herramienta útil para inferir su condición fisiológica y predecir de forma indirecta su actividad reproductiva (Lucas y Beninger, 1985). En el presente estudio los índices calculados (IC e IRM) no mostraron una tendencia claramente definida e incluso fueron imprecisos, por lo que no fueron de utilidad para inferir una relación con el desarrollo y composición de la gónada y tejidos somáticos de *P. sterna*. De manera coincidente, Del Río Portilla (1992) observó para esta especie tendencias erráticas e imprecisiones de los índices de condición y muscular calculados para estudiar la respuesta de juveniles mantenidos en el laboratorio bajo diferentes condiciones de temperatura (20, 25 y 30°C) y de alimentación (2, 4 y 8% del PS de masa visceral) microalgal con *Chaetoceros* sp. Este autor atribuye estas variaciones en los índices a algún esfuerzo biológico por el consumo de energía por condiciones desfavorables (temperatura, salinidad, etc.), a la existencia de algún proceso patológico, e incluso a la producción precoz de gametos.

De acuerdo con Pirini *et al.* (2007), el aumento en el IC es un reflejo de la adaptación de los moluscos a condiciones inusuales de alimentación, ya que un grupo de mejillones (*M. galloprovincialis*) que fueron alimentados con una dieta artificial (100% harina de trigo) incrementaron su IC con respecto a otro grupo que recibió una dieta monoalgal (*Thalassiosira weissflogii*). A partir de estos resultados, los autores asumen que la especie hace un uso eficiente de las dietas ricas en carbohidratos.

Reportes previos sobre la reproducción de *P. sterna* en la Bahía de La Paz, México, sugieren que la talla de primera madurez de la especie se alcanza a partir de los 40 mm de altura de la concha (Saucedo y Monteforte, 1997) y a los 49 mm en machos y 56 mm en hembras en la Bahía de Acapulco (Serna-Gallo, 2011). Durante el desarrollo del presente estudio se tuvo poca disponibilidad de organismos, así que se trabajó con un 50% de organismos preadultos, pero se aseguró la disponibilidad de tallas superiores a los 40 mm. Sin embargo, al final del experimento se observó un alto porcentaje de atresias y una baja

presencia de hembras, lo cual sugiere que en este tipo de estudios, e independientemente de la dieta proporcionada, parece ser necesario utilizar adultos en plena actividad reproductiva. De esta manera se podría incrementar significativamente la probabilidad de tener éxito en el acondicionamiento gonádico y la maduración sexual y desove de los reproductores, para obtener gametos viables y asegurar la producción de semilla. Este razonamiento se apoya en el hecho de que la concha nácar *P. sterna* presenta un marcado hermafroditismo protándrico (Saucedo y Monteforte, 1997; Saucedo y Southgate, 2008).

La atresia ovocitaria es un fenómeno comúnmente observado en diferentes especies de moluscos bivalvos cuando los organismos se encuentran en talla/edad de primera madurez (Com. pers. Rodríguez-Jaramillo, CIBNOR) y se atribuye también a condiciones desfavorables de manejo en cautiverio, causantes de estrés. La atresia ha sido relacionada también con una reducida viabilidad de los óvulos liberados durante el desove y posteriormente con altos porcentajes de larvas anormales con baja supervivencia, obtenidas en cultivos de *A. purpuratus* (Avendaño *et al.*, 2001).

Al final del experimento se detectaron por histología ejemplares machos en etapa de postdesove y signos de reabsorción de gametos residuales en los organismos de todos los tratamientos evaluados (Anexo E; figuras 20 y 21). Ello fue particularmente claro en el tratamiento complementado con GAM al 2%, que fue el único que tuvo presencia de hembras con características de postdesove, lo que sugiere una de dos posibles rutas: (1) la ocurrencia de desoves incipientes que no fueron detectados en las unidades experimentales de acondicionamiento; o (2) una reabsorción directa de gametos dentro de la gónada, lo que suele ocurrir cuando los organismos se encuentran estresados o cuando las condiciones ambientales no son favorables.

Las laminillas histológicas mostraron la presencia de hemocitos, independientemente del tratamiento evaluado (Anexo F, figuras 22 y 23), estos grupos celulares son parte del sistema inmunológico de los moluscos bivalvos e intervienen en la fagocitosis, digestión y almacenamiento de sustancias de reserva, defensa interna y reparación de heridas por aglutinación (Galstoff, 1964; y Beninger y Le Penec, 1991). La evidencia histológica e

histoquímica permitió también observar la presencia de lipofuscinas (Anexo G; figuras 24 y 25). Estas sustancias son lipo-pigmentos que se forman en el citoplasma de las células (gametos en este caso) en proporción creciente con la edad y están consideradas como uno de los indicadores más claros del envejecimiento por deterioro celular y exposición de los organismos a agentes estresantes. (Nandy, 1985). Sin embargo, tanto la presencia de hemocitos como de lipofuscinas no fueron evaluados en el presente estudio.

Con respecto al diámetro teórico de los ovocitos, se detectaron diferentes grados de desarrollo en un reducido intervalo de medidas, con una tendencia a estandarizarse hacia el final del experimento, cuando finalmente fue posible encontrar algunas hembras maduras. Las medidas encontradas en el tratamiento 2% GAM (media 40 μ m), están por encima de la talla máxima reportada para la especie (31 μ m) por Vite-García y Saucedo (2008).

Aunque el contenido de ácidos grasos no se analizó en este estudio, existe evidencia clara de su efecto en la mayoría de procesos biológicos de los organismos, como el crecimiento y la reproducción (Caers *et al.*, 2003). Los porcentajes de cobertura del tejido gonadal (ITG) fueron superiores en las hembras que en los machos durante todo el experimento. Ello fue particularmente claro en los organismos cuya dieta fue complementada con GAM al 1%, donde los valores de ITG fueron máximos en el muestreo intermedio y final. Se asume que este mayor grado de desarrollo del tejido gonádico en los organismos posiblemente se debió al alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga del producto (30% de ácido docosahexaenoico o DHA, según datos del proveedor).

Desde hace décadas se demostró que aunque la microalga *Dunaliella tertiolecta* carece de ácidos grasos de cadena larga mayores a C18, su complemento con DHA microencapsulado al 20% del PS incrementa significativamente el crecimiento de los juveniles del ostión *C. gigas* (Langdon y Waldock, 1981). En *C. corteziensis* también se demostró que los organismos alimentados por tres semanas únicamente con la microalga *I. galbana* mantuvieron una menor cobertura gonádica que aquellos que recibieron un suplemento de ARA (Hurtado *et al.*, 2009), aunque se presentó un amplio intervalo (dispersión) de valores de ITG debido a la heterogeneidad de los estadios. Sin embargo, un

alto valor de ITG no implica necesariamente madurez gonádica. En *R. decussatus*, Delgado y Pérez-Camacho (2002) determinaron que el ITG evoluciona paralelamente con el porcentaje de ovocitos maduros, hecho que no pudo comprobarse para *P. sterna* en el presente estudio, debido a la baja cantidad de hembras disponible.

Parte esencial de los análisis histoquímicos es la posibilidad de obtener una distribución de los compuestos de interés (carbohidratos y lípidos) en cada tejido, mostrando así un amplio panorama de la acumulación de reservas por el organismo (Rodríguez-Jaramillo *et al.*, 2008). En lo que respecta a la gónada, el IG mostró valores muy similares en casi todas las dietas evaluadas, manteniéndose alrededor del 16% en promedio. Por el contrario, el IL varió considerablemente entre tratamientos y generó altas desviaciones estándar que no se reflejaron en diferencias significativas entre dietas ($P > 0.05$). Debe tomarse en cuenta que esta variabilidad probablemente ocurrió debido a que en la mayoría de los tratamientos se observaron diversas etapas de desarrollo gonádico. No obstante, el incremento de IL en el tratamiento 2% GAM puede deberse a la mayor presencia de ovocitos que de espermatozoides, donde suele ocurrir una mayor acumulación de lípidos por la formación natural del vitelo. A su vez, los valores del IG del tejido conjuntivo fueron similares en todos los tratamientos, resaltando los del suplementado al 2% con Maizena[®], donde los valores fueron más bajos.

El tejido conjuntivo es una matriz de sostén de la gónada que se ubica en la periferia de la glándula digestiva y en los moluscos puede tener una función de almacén de reservas. A diferencia de otras especies de bivalvos cuyo músculo aductor es el principal sitio de almacenamiento de reservas para la gametogénesis (Román *et al.*, 2002; Chantler, 2006), en *P. sterna* la glándula digestiva juega un papel más relevante en el almacenamiento y transferencia de nutrientes hacia la gónada, particularmente de lípidos (Vite-García y Saucedo, 2008; Cáceres-Puig *et al.*, 2009).

En glándula digestiva, IG e IL no mostraron tendencias muy definidas, y aun cuando se presentaron diferencias significativas entre tratamientos, no mostraron con claridad un efecto directo de la dieta en la composición de carbohidratos o lípidos en este tejido. Los

lípidos y carbohidratos aumentaron en los organismos cuya dieta control (microalgas) fue complementada con MAZ (1%) y GAM (1% y 2%) a la mitad del experimento, lo que sugiere que no fueron utilizados para promover el desarrollo de la gónada, sino que fueron almacenados para cubrir posiblemente otro tipo de necesidades fisiológicas. Sin embargo, al final del experimento se observó que las medias del IL se homogenizaron y disminuyeron sus valores, lo cual podría reflejar una mayor incorporación de lípidos en ovocitos en rápido crecimiento, como los vitelogénicos. Esta incorporación diferencial de lípidos en los ovocitos en desarrollo ha sido reportada para reproductores de *A. maura* acondicionados en el laboratorio (Rodríguez-Jaramillo, 2004) y recolectados-madurados del medio (Ángel-Dapa *et al.*, 2010).

Es sabido que para lograr una mayor variación en la composición bioquímica de los organismos estudiados, es necesario suministrar una dieta con una alta proporción de un elemento en particular, ya sean carbohidratos, lípidos o proteínas (Pérez-Camacho, 1998). En este sentido, en lo que respecta a la composición bioquímica de los tejidos, algunas de las variaciones en los tejidos de *P. sterna* coincidieron con la composición de las dietas, especialmente del complemento alimenticio, es así como en ocasiones se registraron mayores niveles de carbohidratos en gónada, músculo y manto de los organismos alimentados con complemento de Maizena®, y una mayor cantidad de lípidos en glándula digestiva, músculo y manto de los alimentados con GAM. Otras investigaciones (Epifanio, 1979 y Rivero-Rodríguez *et al.*, 2007), han mostrado que el crecimiento de juveniles de *Mercenaria mercenaria* y *C. corteziensis* está relacionado con la presencia o ausencia de alguna especie de microalga en las dietas y los nutrientes que ella pueda suministrar al ser asimilada. Otros reportes indican un reflejo fiel de la composición de la dieta en los tejidos de *C. gigas* (Brown *et al.*, 1998; Flores-Vergara *et al.*, 2004) y *N. subnodosus* (Cerón-Ortíz *et al.*, 2009).

Independientemente del perfil nutricional del tratamiento evaluado, los carbohidratos de la gónada disminuyeron durante el curso del experimento, aunque en menor proporción en las dietas que fueron adicionadas con Maizena® (rica en almidón), lo cual parece lógico. Por el contrario, los carbohidratos mostraron una tendencia al incremento en glándula digestiva,

aunque en este caso el patrón no fue del todo claro para ningún tratamiento en particular. Estos resultados sugieren que los sustratos glucídicos, lejos de utilizarse para el sustento de la gametogénesis, se almacenaron en uno de los principales tejidos de reserva (glándula digestiva), posiblemente para cubrir otro tipo de necesidades energéticas no necesariamente relacionadas directamente con la reproducción. Nuevamente, esta situación apunta hacia la hipótesis del estrés alimenticio y al uso preferencial de la energía disponible para la supervivencia o el mantenimiento de la maquinaria enzimática de los organismos.

Escenarios similares donde los carbohidratos de la gónada se movilizan a la glándula digestiva para su almacenamiento, de forma independiente al avance de la gametogénesis, se han reportado previamente para *P. sterna* (Vite-García y Saucedo, 2008) y *P. mazatlanica* (Saucedo *et al.*, 2002), así como para algunas almejas de la familia Pectinidae (Barber y Blake, 1981; Martínez, 1991; Pazos *et al.*, 1996) y Veneridae (Lomovasky *et al.*, 2004). Esta tendencia de que los carbohidratos sean fácilmente catabolizados en otros compuestos parece ser común en la mayoría de los bivalvos, particularmente por su importancia en el balance de nutrientes para la síntesis de tejido vivo y el ahorro de energía (Whyte *et al.*, 1987).

A diferencia de la gónada, la glándula digestiva es un tejido somático que almacena energía mayormente en forma de sustratos lipídicos y protéicos y lo hace durante periodos cortos que suelen coincidir con los picos de maduración de las especies (Barber y Blake, 1991; Racotta *et al.*, 1998; Saucedo *et al.*, 2002; Arellano-Martínez *et al.*, 2004; Román *et al.*, 2002). Esto se confirmó en el presente bioensayo por tres razones. Primero porque los lípidos, efectivamente, se incrementaron en la gónada de los organismos en todos los tratamientos, particularmente en aquellos donde la dieta fue suplementada con GAM al 1 y 2% (por su alto contenido de ácidos grasos), así como en organismos en estadios de madurez y postdesove; las proteínas no mostraron una tendencia clara. Segundo, porque en la glándula digestiva los lípidos mostraron una clara tendencia a disminuir en el tiempo en casi todos los tratamientos, siendo nuevamente la única excepción la dieta adicionada con GAM al 2%; nuevamente la tendencia de las proteínas no fue clara. Tercero, porque los

lípidos fueron más abundantes en la glándula digestiva que en el músculo y el manto. Esto es importante, porque en la concha nácar *P. sterna* la glándula digestiva ha sido reportada como el mayor reservorio de energía (lípidos en especial) para la reproducción, pues aporta en promedio 23 kJ/g para este fin, en comparación con el músculo aductor y el manto que aportan, respectivamente, 18 y 13 kJ/g (Vite-García y Saucedo, 2008; Cáceres-Puig *et al.*, 2009). De hecho, para la mayoría de las especies de bivalvos, los lípidos juegan un papel clave en la regulación de diversos procesos biológicos, ya que son relativamente fáciles de asimilar y rápidamente acumulados cuando el alimento es rico en este metabolito (Narváez *et al.*, 2008). Ello ha permitido a los organismos aprovecharlo al máximo del medio natural, ya que el fitoplancton es la principal fuente de alimento, además de servir como la principal fuente de ácido linoleico (18:2 n-6), linolénico (18:3 n-3) y de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga o HUFAs (Fernández-Reiriz *et al.*, 1989); esto ha sido base también para quienes han decidido adicionar las dietas directamente con ácidos grasos en diversas especies como *A. purpuratus* (Caers *et al.*, 2003) *M. galloprovincialis* (Freites *et al.*, 2002) *C. gigas* y *R. philippinarum* (Delaporte *et al.*, 2005).

Es muy importante que en la alimentación de los bivalvos se encuentren el EPA (ácido eicosapentaenoico) y/o el DHA (ácido docosahexaenoico), ya que estos dos ácidos grasos no pueden ser sintetizados de novo (Chu y Greaves, 1991) se acumulan selectivamente en las diversas especies de bivalvos (Soudant *et al.*, 1996; Caers *et al.*, 1998, 1999b, 2000b), además de ser los principales ácidos grasos altamente insaturados en los tejidos de los bivalvos y las dietas de algas en el medio natural (Pollero *et al.*, 1979; Ackman, 1983); y ya se ha demostrado su relevancia para el éxito de maduración de los reproductores y posterior el desarrollo embrionario, larval y juvenil (Utting y Millican, 1997, 1998). En este caso el suministro de una dieta microalgal en las mismas proporciones para todos los tratamientos les otorga aproximadamente un 14.86% de DHA del total de lípidos (Rivero-Rodríguez *et al.*, 2007), a esto se le agregan el 30% de DHA del aceite de orbital de atún proveniente de las microcápsulas (GAM), lo que probablemente explica que una mayor concentración de este ácido graso esencial generó un mayor desarrollo gonádico tanto de hembras como de machos con respecto a los tratamientos que solo recibieron microalgas o

microalgas complementadas con almidón de maíz (Maizena[®]). Otras investigaciones han comprobado la bondad de la complementación lipídica (emulsiones) como una herramienta para aumentar el nivel de ácidos grasos poliinsaturados, tales como DHA, en la gónada femenina, incorporándose en los huevos y mejorando significativamente su calidad (Caers *et al.*, 1999b, Caers *et al.*, 2002).

A diferencia de la glándula digestiva de *P. sterna*, en la mayoría de los bivalvos el músculo aductor es el principal sitio de almacenamiento de energía para cubrir las necesidades de la reproducción (ver revisiones de Bayne, 1976 para la familia Mytilidae, Andrews, 1979, Román *et al.*, 2002 y Chantler, 2006 para la familia Pectinidae). Sin embargo, en este bioensayo no se vio una relación muy clara entre los niveles de proteínas y carbohidratos y el desarrollo de los gametos. En *P. sterna* y *P. mazatlanica* se ha observado que cuanto más avanza el desarrollo gonadal, hay una disminución del contenido de proteínas (Vite-García y Saucedo, 2008), siendo que durante el tiempo de experimentación en un principio los organismos mostraron poco desarrollo, hacia el final alcanzaron estadios de madurez avanzados, llegando incluso a desovar parcialmente. Esta misma situación ha sido observada en otras especies de bivalvos, como *Argopecten irradians* (Barber y Blake, 1985), *P. magellanicus* (Couturier y Newkirk, 1991), *P. maximus* (Pazos *et al.*, 1997) y *A. ventricosus* (Racotta *et al.*, 2003).

El manto es un tejido somático que parece no tener mucha importancia para fines de la reproducción en especies como *A. ventricosus* (Racotta *et al.*, 1998), *P. mazatlanica* (Saucedo *et al.*, 2002) y *P. sterna* (Vite-García y Saucedo, 2008). Esto mismo se confirmó en este bioensayo, donde ninguno de los combustibles metabólicos de este tejido mostró una tendencia clara (incremento o disminución) en el tiempo, así como ninguna relación aparente con el desarrollo gonadal. Sin embargo, para los miembros de la familia Mytilidae (e.g. *Mytilus edulis* y *M. galloprovincialis*) la gametogénesis ocurre físicamente en la matriz de tejido conjuntivo del manto, por lo que este tejido es de vital importancia para el desarrollo gonadal (Lowe *et al.*, 1982; Gabbott y Peek, 1991). Igualmente, en la almeja mano de león *N. subnodosus* se ha reportado un ciclo de almacenamiento y movilización

de reservas, principalmente de carbohidratos y proteínas, desde el manto a la gónada para el desarrollo de los gametos (Arellano-Martínez *et al.*, 2004).

Hoy en día, existen muy pocos estudios que han analizado los requerimientos nutricionales en laboratorio de las ostras perleras (Mazón-Suástegui, 1988 en *P. sterna*; Ehteshami *et al.*, 2011 en *P. margaritifera*). Sin embargo, si se toma en cuenta que en la gran mayoría de las especies de bivalvos la información existente en torno a estos requerimientos varía notablemente e incluso llegan a ser contradictoria, queda claro que no existe todavía una dieta óptima para lograr la maduración de reproductores en condiciones de cautiverio. Dada la naturaleza de este estudio, los resultados generados son preliminares, pero proporcionan información valiosa para identificar los tratamientos que fueron más viables para promover el desarrollo de gametos de esta especie. *A priori*, la dieta complementada con GAM al 2% parece haber proporcionado más nutrientes para este proceso, aunque se sugiere evaluar raciones alimenticias superiores al 2% de PS de la biomasa (e.g. 3 a 6%) para confirmar estos resultados. Finalmente, este estudio sienta las bases para futuros trabajos sobre acondicionamiento y maduración en laboratorio, en donde se evalúen otras combinaciones de microalgas sinérgicas (binarias, ternarias), regímenes alimenticios (complementación vs. sustitución de la biomasa algal), así como otro tipo de indicadores de desarrollo y composición de tejidos (e.g. neurosecreciones, enzimas).

9. Conclusiones

- El uso de complementos artificiales (Maizena[®] y el aceite de orbital de atún Omega-Mex DHA30[®]) tiene un efecto sinérgico con la dieta natural por excelencia (microalgas), pues favorece el desarrollo gonádico y propicia una mejor condición general en los organismos.
- Bajo las condiciones experimentales, la dieta microalgal suministrada (2% de peso seco de molusco), resultó ser insuficiente para promover desarrollo y la maduración de la gónada.
- El complemento artificial GAM (particularmente al 2%) favoreció el desarrollo más activo de los gametos femeninos y una mayor acumulación de lípidos en la glándula digestiva.
- Al usar el complemento artificial rico en almidón (Maizena[®]), se presentó una mayor acumulación de carbohidratos en glándula digestiva, músculo aductor y manto.
- Un periodo de 30 días de acondicionamiento es suficiente para detectar cambios en el desarrollo y composición de la gónada y tejidos somáticos, no así para maduración sexual.
- Considerando costo/beneficio y tiempo/esfuerzo, es más fácil y económica la elaboración de complementos dietéticos de cereales cocinados, que la preparación de microcápsulas.

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.
- 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.
- Ackman, R.G. 1983. Fatty acid metabolism of bivalves. In: Pruder, G.D., Langdon, C., Conklin, D. (Eds.), *Biochemical and Physiological Approaches to Shellfish Nutrition. Proceedings of the 2nd Conference on Aquaculture Nutrition.* Louisiana State University Press, Baton Rouge, LA, pp. 358– 376.
- Albentosa, M., A. Pérez-Camacho, U. Labarta, R. Beiras, M.J. Fernández-Reiriz. 1996. Evaluation of live microalgal diets for the seed culture of *Ruditapes decussatus* using physiological and biochemical parameters. *Aquaculture* 148: 11-23.
- Albentosa, M., M.J. Fernández-Reiriz, A. Pérez-Camacho, U. Labarta. 1999. Growth performance and biochemical composition of *Ruditapes decussatus* spat fed on microalgal and wheatgerm flour diets. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 232: 23-37.
- Albentosa, M., A. Pérez-Camacho, M.J. Fernández-Reiriz, U. Labarta. 2002. Wheatgerm flour in diets for manila clam, *Ruditapes philippinarum* spat, *Aquaculture* 212: 335-345.
- Andrews, J.D. 1979. Pelecypoda: Ostreidae. En: Giese, C., Pearse, J.S. (Eds.), *Reproduction of Marine Invertebrates.* Academic Press, New York, Pp. 293-341.
- Angel-Dapa, M.A., M.C. Rodríguez-Jaramillo, C. Cáceres-Martínez, P.E. Saucedo. 2010. Changes in lipid content of oocytes of the penshell *Atrina maura* as a criterion of gamete development and quality: A study of histochemistry and digital image analysis. *J. Shellfish Res.* 29: 409–413.
- Arcos, F.G., A.M. Ibarra, M.C. Rodríguez-Jaramillo, E.A. García-La Torre, C. Vázquez-Boucard. 2009. Quantification of vitellin/vitellogenin-like proteins in the oyster *Crassostrea corteziensis* (Hertlein 1951) as a tool to predict the degree of gonad maturity. *Aqua. Res.* 40:644–655.
- Arellano-Martínez, M., I.S. Racotta, B.P. Ceballos-Vázquez, J.F. Elourdy-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.
- Arjarasirikoon, U., M. Kruatrachue, P. Sretarugsa, Y. Chitramvong, S. Jantataeme. 2004. Gametogenic processes in the pearl oyster, *Pteria penguin* (Roding, 1798) (Bivalvia, Mollusca). *J. Shellfish Res.* 23: 403-410.

- Avendaño, M., M. Le Pennec. 1996. Contribución al conocimiento reproductivo de *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819), en dos poblaciones de la II Región-Chile. *Estud. Oceanol.* 15: 1-10.
- Avendaño, M., M. Le Pennec. 1997. Intraspecific variation in gametogenesis in two populations of the Chilean mollusc bivalve, *Argopecten purpuratus* (Lamarck). *Aquacul. Res.* 28: 175-183.
- Avendaño, M., M. Le Pennec, M. Cantillanez. 2001. Abnormalities in larvae of *Argopecten purpuratus*, (Lamarck, 1819) (mollusca: pectinidae), one of the problems in the artificial spat production. *Estud. Oceanol.* 20: 33-42.
- Avilés Quevedo, A., L. Muciño Díaz, 1988, acondicionamiento gonádico y desove de *Argopecten circularis* (Sowerby, 1835) en condiciones de laboratorio. *Rev. Lat. Acui. Lima-Perú*, No. 38-21-120.
- 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. Pp. 71-77.
- Bakan, J., 1973. Microencapsulation of foods and related products. *Food Technology* November. Pp. 34-44.
- Balassa, L., J. Brody. 1968. Microencapsulation. *Food engineering*, November. 88-91.
- Baltazar P., D. Bermúdez, W. Rivera. 1999. Cultivo de la ostra *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1795) en un vivero artesanal, la arena, Casma. *Revista Peruana de Biología.* (6) 2:Pp. 4.
- 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. 1985. Intra-organ biochemical transformations associated with oogenesis in the bay scallop *Argopecten irradians concentricus* (Say) as indicated by ¹⁴C incorporation. *Biol. Bull.* 168, 39-49.
- Barber, B.J., N.J. Blake. 1991. Reproductive physiology. En: Shumway, S.E. Ed., *Scallops: Biology Ecology and Aquaculture.* 1a Edición, Elsevier, Amsterdam. Pp. 378-428.
- Barber, B.J., N.J. Blake. 2006. Reproductive physiology. In: Shumway, S.E., Parsons, G.J. (Eds.), *Scallops: Biology, Ecology and Aquaculture.* Elsevier 2nd Edition, Amsterdam, The Netherlands, Pp. 357-416.
- Bayne, B. 1975. Reproduction in bivalve molluscs under environmental stress. En: *Physiological ecology of estuarine organism.* F. J. Verberg (ed.) University of South Carolina Press. Columbia (Carolina del Sur), EE UU. Pp. 259-277.

- Bayne, B.L. 1976. Aspects of reproduction in bivalve mollusks. En: Wiley, M. (Ed.), Estuarine Processes, Academic Press, Londres (1): 432-448.
- Bayne, B., R.C. Newell. 1983. Physiological energetics of marine molluscs. En: The Mollusca. K. M. Wilbur y A. S. M. Saleuddin (eds.) Academic Press. Nueva York. 4: 407-499.
- Beninger, P., G. Le Pennec. 1991. Reproductive physiology. En: S.E. Shumway (ed.). Scallops: biology, ecology and aquaculture. Elsevier science, New York. Pp. 377-428.
- Benita, S. 1999. Microparticulate drug delivery systems: release kinetic models. In: Arshady R, ed. Microspheres, Microcapsules & Liposomes. Medical & Biotechnology Applications. (2):155–181.
- Bligh, E.G., W.J. Dyer. 1959. A rapid method for total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol. 37: 911-917.
- Bonaldo, A., A. Badiani, S. Testi, G. Corso, A.L. Mordenti, P.P. Gatta. 2005. Use of centrifuged and preserved microalgae for feeding juvenile Manila clam (*Tapes philippinarum*): effects on growth and fatty acid composition. Ital. J. Anim. Sci., (4): 375-384.
- Briarty, L.G. 1975. Stereology methods for quantitative light and electron microscopy. Sci. Prog. 62:1-32.
- Brown, M.R., S.W. Jeffrey, C.D. Garland, 1989. Nutritional Aspects of Microalgae used in Mariculture: a Literature Review. CSIRO Division of Fisheries. Department of Agricultural Science, Hobart, Australia. 25: 21.
- Brown, M.R., S.W. Jeffrey, J.K. Volkman, G.A. Dunstan. 1997. Nutritional properties of microalgae for mariculture. Aquaculture 151: 315-331.
- Brown, M.R., M.A. McCausland, K. Kowalski. 1998. The nutritional value of four Australian microalgal strains fed to Pacific oyster *Crassostrea gigas* spat. Aquaculture 165: 281–29.
- Cáceres-Puig, J.I., F. Abasolo-Pacheco, J.M. Mazón-Suastegui, A.N. Maeda-Martínez, P.E. Saucedo. 2007. Effect of temperature on growth and survival of *Crassostrea corteziensis* spat during late-nursery culturing at the hatchery. 272 (26): 417–422.
- 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 Journal of Research 28(3): 471-476.
- Caers, M., P. Coutteau, P. Lombeida, P. Sorgeloos. 1998. The effect of lipid supplementation on the growth and fatty acid composition of *Tapes philippinarum* (L.) spat. Aquaculture 162, 287-299.

- Caers, M., P. Coutteau, P. Sorgeloos. 1999a. Dietary impact of algal and artificial diets, fed at different feeding rations, on the growth and fatty acid composition of *Tapes philippinarum* (L.) spat. *Aquaculture* 170: 307–322.
- Caers, M., P. Coutteau, K. Cure, V. Morales, G. Gajardo, P. Sorgeloos. 1999b. The Chilean scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819): II. Manipulation of the fatty acid composition and lipid content of the eggs via lipid supplementation of the broodstock diet. *Comp. Biochem. Physiol.* 123B, 97-103.
- Caers, M., P. Coutteau, P. Sorgeloos. 2000. Incorporation of different fatty acids, supplied as emulsions or liposomes, in the polar and neutral lipids of *Crassostrea gigas* spat. *Aquaculture* 186: 157– 171.
- Caers, M., S.D. Utting, P. Coutteau, P.F. Millican, P. Sorgeloos. 2002. Impact of the supplementation of a docosahexaenoic acid-rich emulsion on the productive output of oyster broodstock, *Crassostrea gigas*. *Mar. Biol.*, 140 (6) 1157-1166.
- Caers, M., P. Coutteau, P. Sorgeloos, G. Gajardo. 2003. Impact of algal diets and emulsions on the fatty acid composition and content of selected tissues of adult broodstock of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). *Aquaculture* 213: 437-452.
- Cariño, M., M. Monteforte. 1995. History of pearling in the Bay of La Paz, South Baja California, Mexico (1553-1914). *Gems & Gemology* 31: 88-108.
- Cerón-Ortiz, A.N., B. Cordero, B.O. Arredondo-Vega, D. Voltolina. 2009. Effect of algal diet and temperature on survival, growth and biochemical composition of spat of the lion's paw scallop *Nodipecten subnodosus*. *Aquaculture* 298: 64–69.
- Chantler, P.D. 2006. Scallop adductor muscles: structure and function. In: S.E. Shumway y G.J. Parsons, editors. *Scallops: Biology, Ecology and Aquaculture*. 2nd edition, Elsevier, The Netherlands, pp. 229–316.
- Chellam, A. 1987. Biology of pearl oyster pp. 13-21. In: K. Alargawasami (ed). *Pearl culture*. Bulletin 39, Central Marine Fisheries Research Institute, Cochin, India.
- Chien, Y.U., W.H. Hsu. 2006. Effects of diets, their concentrations and clam size on filtration rate of hard clams (*Meretrix lusoria*). *J. Shellfish Res.* (25): 15–22.
- Chu, F.E., J. Greaves. 1991. Metabolism of palmitic, linoleic and linolenic acids in adult oysters, *Crassostrea virginica*. *Mar. Biol.* 110, 229-236.
- Coutteau, P., P. Sorgeloos. 1992. The use of algal substitutes and the requirement for live algae in the hatchery and nursery rearing of bivalve mollusks: an international survey. *J. Shellfish Res.* (11): 467-476.

- Coutteau, P., N.H. Hadley, J.J. Manzi, P. Sorgeloos. 1994. Effect of algal ration and substitution of algae by manipulated yeast diets on the growth of juvenile *Mercenaria mercenaria*. *Aquaculture*. (120): 135-150.
- Coutteau, P., J.D. Castell, R.G. Ackman, P. Sorgeloos. 1996. The use of lipid emulsions as carriers for essential fatty acids in bivalves: a test case with juvenile *Placopecten magellanicus*. *J. Shellfish Res.* (15): 259-264.
- Couturier, C.Y., G. F. Newkirk. 1991. Biochemical and gametogenic cycles in scallops, *placopecten magellanicus* Gmelin, 1971, held in suspension culture.. En: Shumway, S. E., Sandifer, P. A. Eds., *An International Compendium of scallops biology and culture*, world aquaculture society, Baton Rouge. Pp. 107-117.
- Del Rio-Portilla M.A., A.D. Re-Araujo, D. Voltolina. 1992. Growth of the pearl oyster *Pteria sterna* under different thermic and feeding conditions. *Marine ecology progress series mar. Ecol. Prog. Ser.* 89: 221-227.
- Delaporte, M. 2005. Modulation des paramètres hématocytaires par la nutrition chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Implication dans les mortalités estivales. PhD dissertation, Université of Rennes 1 (Rennes, France). Pp.421.
- Delaporte M, Chu F-L, C. Langdon, J-F Samain, P. Soudant, J. Moal, C. Lambert. 2007. Changes in biochemical and hemocyte parameters of the Pacific oysters *Crassostrea gigas* fed T-Iso supplemented with lipid emulsions rich in eicosapentaenoic acid. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. (15): 261-275
- Delgado, M., A. Pérez-Camacho, M. Albentosa. 2002. Balance energético en la almeja *Ruditapes decussatus* (Linnaeus, 1758); *bol inst esp oceanogr.* 18 (1-4) 301-306.
- Doroudi, M.S., P.C. Southgate, R.J. Mayer. 2002. Evaluation of partial substitution of live algae with dried *Tetraselmis* for larval rearing of black-lip pearl oyster, *Pinctada margaritifera* (L.). *Aquaculture International*. 10: 265–277.
- Dunathan J.P., R.M. Ingle, W.K. Havens. 1969. Effects of artificial foods upon oyster fattening with potential commercial applications. *Technical series marine research laboratory. Florida dept. nat res, St. Petesburg, Fla.* Pp. 58.
- Dupuy, J. L., N. T. Windsor, C. E. Sutton. 1977. Manual for design and operation of an oyster seed hatchery for the American Oyster *Crassostrea virginica*. Virginia Institute of Marine Science, Special report (142) pp.104.
- Ehteshami, F., A.Christianus, H. Rameshi, S. Azni, C.R. Saad. 2011. Proximate and fatty acid composition of the gonads of wild vs. hatchery-conditioned *Pinctada margaritifera* broodstock. *Aqua. Nutr.* 17: 675–682.
- Epifanio, C.E. 1975. Culture of bivalve in recirculating systems: nutritional requirements, *proceedings of the first international conference on aquaculture nutrition*. Pp.173-194.

- Epifanio, C.E., 1979. Comparison of yeast and algal diets for bivalve molluscs. *Aquaculture* (16) 187–192.
- 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.
- Espinosa, E.P., B. Allam. 2006. Comparative growth and survival of juvenile hard clams, *Mercenaria mercenaria*, fed commercially available diets. *Zoo Biology.* (25): 513–525.
- FAO. 2003-2011. Aquaculture topics and activities. Acuicultura. In: Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO [en línea]. Roma. Actualizado 27 September 2001. (Citado 31 julio 2011). http://www.fao.org/fishery/countrysector/naso_mexico/es.
- FAO. 2006-2011. Visión general del sector acuícola nacional. México. National Aquaculture Sector Overview Fact Sheets. Texto de Montero Rodríguez, M. In: Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO [en línea]. Roma. Actualizado 1 February 2005. (Citado 31 julio 2011). http://www.fao.org/fishery/countrysector/naso_mexico/es.
- Farías, A., I. Uriarte. 2001. Effect of microalgae protein on the gonad development and physiological parameters for the scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). *J. Shellfish Res.*, (20): 97-105.
- Farías, A., J.G. Bell, I. Uriarte, J.R. Sargent. 2003. Polyunsaturated fatty acids in total lipid and phospholipids of Chilean scallop *Argopecten purpuratus* (L.) larvae: effects of diet and temperature. *Aquaculture.* (228): 289-305.
- Farías, A., I. Uriarte. 2006. Nutrition in Pectinids. En: SE Shumway and GJ Parsons (Eds). *Scallops: Biology, Ecology and Aquaculture.* Elsevier B.V. Pp. 521-542.
- Farías, A. 2008. Nutrición y alimentación en moluscos bivalvos. En A. Lovatelli, A. Farías e I. Uriarte (eds). Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en America Latina. Taller Tecnico Regional de la FAO. Agosto de 2007, Puerto Montt, Chile. FAO Actas de Pesca y Acuicultura. No. 12. Roma, FAO. pp. 297-308.
- Fassler, R.C. 1991. Farming jewels: the aquaculture of pearls. *Aquac. Mag.* (sep/oct): 34-52.
- Fernández-Reiriz, M.J.; A. Pérez-Camacho, M.J. Ferreiro, J. Blanco, M. Planas, M.J. Campos, U. Labarta. 1989. Biomass production and variation in the biochemical profile (total protein, carbohydrates, RNA, lipids and fatty acids) of seven species of marine microalgae. *Aquaculture* 83:17-37.
- Fernández-Reiriz, M.J., U. Labarta, M. Albentosa, A. Pérez-Camacho. 1998. Effect of Microalgal Diets and Commercial Wheatgerm Flours on the Lipid Profile of *Ruditapes decussatus* Spat. *Comp. Biochem. Physiol.* 119A, (1) Pp. 369-377.

- Flores-Vergara, C.B., A.N. Cordero-Esquivel, C. Cerón-Ortiz, B.O. Arredondo-Vega. 2004. Combined effects of temperature and diet on growth and biochemical composition of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) spat. *Aqua. Res.* 35: 1131-1140.
- Luis Freites, M.J., Fernández-Reiriz, U. Labarta. 2002. Fatty acid profiles of *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck) mussel of subtidal and rocky shore origin. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 132: 453-461.
- Gabbot P.A. K. Peek. 1991. Celular Biochemistry of the mantle tissue of the mussel *Mytilus edulis* L. *Aquaculture.* 94: 165-176.
- 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.
- Galtsoff, P.S. 1964. The american oyster , fish bull U.S., 64: 480.
- García-Dominguez, F., B. Cevallos-Vazquez, A. Tripp. 1996. Spawing cycle of the pearl oyster, *Pinctada mazatlanica* (Hanley, 1856), (Pteriidae) at Isla Espiritu Santo, Baja California Sur, México. *J. Shellfish Res.*, 15 (2): 297-303.
- Gauld, D.T. 1953. Diurnal variations in the grazing of plancktonic copepods; journal of the marine biological Association of the United Kingdom. 31 (3): 461-474.
- Gervis, M., Sims. 1992. Biology and culture of pearl oysters (Bivalvia: Pteriidae). Overseas Development administration of the United Kingdom. International Center of living Aquatic Resources Managemnt, Manila, Philippines. Pp. 49.
- Gibas, B.F., S. Kermasha, I. Alli, C.N. Mulligan. 1999. Encapsulation in the food industry: A review. *International J. Food Sciences and Nutrition* 50 (3): 213-224.
- 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, M.E., P.E. Saucedo. 2008. Ultraestructure of tissues and cells of pearl oyster, *pinctada mazatlanica* (Hanley 1856) associated with reproduction. En: int. Workshop phys., Reprod. And Nutr. In Molluscs., 6-9 Nov., La Paz, BCS, México. Pearl Oyster Inf. Bull. 18. Pp. 20.
- González Estrada, F. 2001. Estudio de los efectos agudos y crónicos del amonio sobre la supervivencia, metabolismo y crecimiento de la almeja catarina (*Argopecten ventricosus* Sowerby II, 1842), en relación a la temperatura. Tesis de licenciatura. Universidad Autonoma de Nayarit. Facultad d Ingeniería pesquera. San Blas Nayarit, México. Pp. 42.
- Gosling, E. 2003. Bivalve Molluscs: Biology, Ecology, and Culture. Fishing New Books, Blackwell Science, New York. Pp. 443.

- Haven, D. E. 1965. Supplemental feeding oyster with starch. Chesapeake Science 6 (1): 43-51.
- Haws, M. 2002. The basics of pearl farming: A Layma's Manual. Center of Tropical and Subtropical Aquaculture. Hawaii, Estados Unidos. Publicación especial. Pp.127.
- Heasman, M., J.Diemar, W. O'Connor, T.Sushames, L. Foulkes. 2000. Development of extended shelf-life microalgae concentrate diets harvested by centrifugation for bivalve mollusks- a summary. Aquaculture Research. (31): 637-659.
- Helm, M.M.; N. Bourne, A. Lovatelli, (comp./ed.) 2006. Cultivo de bivalvos en criadero. Un manual práctico.FAO Documento Técnico de Pesca. No. 471. Roma, FAO. Pp. 184.
- 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., Mexico. J. Shellfish Res. 26:543-548.
- Hurtado M.A., M. Reza, A.M. Ibarra, M. Wille, P. Sorgeloos, P. Soudant, E. Palacios. 2009. Arachidonic acid (20:4n-6) effect on reproduction, immunology, and prostaglandin E2 levels in *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1951) Aquaculture. 294: 300-305.
- Kiefert, L., D. McLaurin-Moreno, E. Arizmendi-Castillo, H.A. Hänni, S. Elen. 2004. Cultured pearls from the Gulf of California, Mexico. Gems & Gemology. 40:26-38.
- King, A., 1995. Encapsulation of food ingredients. En: Encapsulation and controlled release of food ingredients (ed. por S. Risch and G. Reyneccius), ACS Symposium Series 590, American Chemical Society, Washington D.C. Pp. 26-39.
- Knauer, J., P.C. Southgate. 1997a. Evaluation of microencapsulated squid oil as substitute for live microalga fed to Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) spat. J. Shellfish Res. 16: 137-141.
- Knauer, J., P.C. Southgate. 1997b. Growth and fatty acid composition of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) spat fed a microalgae and microcapsules containing varying amounts of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid. J. Shellfish Res.16: 447-454.
- Knauer, J., P.C. Southgate. 1997c. Assimilation of gelatin-acacia microcapsulated lipid by Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) spat. Aquaculture. 153: 291-300.
- Knauer, J., P. C. Southgate. 1999. A review of the nutritional requirements of bivalves and the development of alternative and artificial diets for bivalves aquaculture; Reviews in fisheries science. 7(3 y 4):241-280.
- Kuwatani, Y., T. Nishi. 1968. On the rice powder as a diet of the pearl oyster. Bull. Of the Japanese Soc. of Scient. Fish. 34 (3): 191-203.
- Laing, I., P.F. Millican. 1986. Relative growth and growth efficiency of *Ostrea edulis* L. spat fed various algal diets. Aquaculture. 54: 245-262

- Langdon, C. J., M. J. Waldock. 1981. The effect of algal and artificial diets on the growth and fatty acid composition of *Crassostrea gigas* spat. J. Marine Biological Association of the United Kingdom 61:431-438.
- Langdon, C.J., C.A. Siegfried. 1984. Progress in the development of artificial diets for bivalve filter feeders. Aquaculture. 39: 135-153.
- Langdon, C.J., D.M. Levine, D.A. Jones. 1985. Microparticulate feeds for marine suspension-feeders. J. Microencapsul., (2): 1-11.
- Lango-Reynoso F., J. Chávez-Villalba, J.C. Cochard, M. Le Pennec. 2000. Oocyte size, a means to evaluate the gametogénico development of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg) Aquaculture 190: 183-199.
- Laruelle, F., J. Guillou, Y.M. Paulet. 1994. Reproductive pattern of the clams, *Ruditapes decussatus* and *R. philippinarum* on intertidal flats in Brittany. J. Mar. Biol. Assoc. U. K. 74: 351-366.
- Lomovasky, B. J., G. Malanga, J. Calvo. 2004. Seasonal changes in biochemical composition of the clam *Eurhomalea exalbida* (Bivalvia, Veneridae) from Ushuaia Bay (54[degrees] 50'S), Beagle Channel (Argentina). J. Shellfish Res. 23:81-87.
- Lora Vilchis, M.C. 2004. Evaluación de la calidad dietética de microalgas mediante el estudio del balance energético de *Artemia franciscana*. Tesis doctorado. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. Pp. 149.
- Lowe, D.M., M.N. Moore, B.L. Bayne, 1982. Aspects of gametogenesis in the marine mussels *Mytilus edulis*. J. Mar. Biol. Ass. 62: 133-145.
- Lubet, P. 1981. Action de la temperature sur le cycle de reproduction des lamellibranches. Bull. Soc. Zool. France 106: 283-292.
- Lucas, A., P.G. Beninger. 1985. The use of physiological condition index in marine bivalve aquaculture. Aquaculture 44: 187-200.
- Luna-González, A. 1997. Ciclo reproductivo de la almeja catarina *Argopecten ventricosus* (Sowerby II, 1842), cultivada en la rada del Puerto de Pichiligüe, B.C.S., y su relación con el medio. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Baja California Sur, México.
- Luzzi, L., 1970. Microencapsulation. J. Pharmaceutical Sci. 59 (10): 1367-1376.
- Mackie, G.L. 1984. Bivalves. In: Wilburg, K.M. (Ed.), The Mollusca Reproduction. Academic Press, New York , (7) Pp. 351-417 .
- Martínez, G. 1991. Seasonal variation in biochemical composition of three size classes of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus* Lamarck, 1819. Veliger 34: 335-343.

- Mazón-Suástegui, J.M. 1988. Acondicionamiento y desove de cuatro especies de moluscos bivalvos alimentados con dietas artificiales. *Rev. Latinoam. Acuic.* 38: 4-12.
- Mazón-Suástegui, J.M., M.A. Avilés-Quevedo. 1988. Ensayo preliminar sobre la alimentación de bivalvos juveniles con dietas artificiales. *Rev. Lat. Acui.* No. 36: 56-62
- Mazón-Suástegui, J.M., K.M. Ruíz-Ruíz, A. Parres-Haro, P.E. Saucedo. 2008. Combined effects of diet and stocking density on growth and biochemical composition of spat of the Cortez oyster *Crassostrea corteziensis* during hatchery culturing. *Aquaculture.* 284: 98-105.
- Mazón-Suástegui, J.M., M. Osuna, P. Ormart, P.E. Saucedo. 2009a. Positive results of enriching microalgae diets with cornstarch and wheat meal during hatchery-rearing of lions's paw scallop *Nodipecten subnodosus*. 17th International Pectinid Workshop. Santiago de Compostela; Galicia, España. 22-28 Abril/2009. Poster.
- Mazón-Suástegui J.M., P. Saucedo, K. Ruíz-Ruíz, A. Parres-Haro, C. Rodríguez-Jaramillo. 2009. Artificial diets reduce nursery costs for the Cortez oyster *Crassostrea corteziensis*, with good spat/juvenile growth, biochemical composition, and physiological condition for field culture. *World Aquaculture 2009.* Veracruz, México; Mayo 25-29, 2009. Poster.
- Milke, L.M., V.M. Bricelj, C.C. Parrish. 2004. Growth of postlarval sea scallops, *Placopecten magellanicus*, on microalgal diets, with emphasis on the nutritional role of lipids and fatty acids. *Aquaculture.* (234): 293-317.
- Milke, L.M., V.M. Bricelj, C.C. Parrish. 2006. Comparison of early life history stages of the bay scallop, *Argopecten irradians*: Effects of microalgal diets on growth and biochemical composition. *Aquaculture.* (260): 272-289.
- Monteforte M., H. Bervera-León, J.J. Ramírez-Rosas, P.E. Saucedo. 2005. Effect of stocking density on growth and survival of the rainbow pearl oyster *Pteria sterna* (Gould 1852) during nursery and late culture in Bahía de La Paz, Baja California Sur, México. *Aquac. Int.* 14 13: 391-407.
- Monteforte, M. 1990. Ostras perleras y perlicultura: situación actual en los principales países productores y perspectivas para México. *Serie Cient. UABCS.* (Núm. Esp. AMAC) 1: 13-18.
- Monteforte, M. 1996. Cultivo de ostras perleras y perlicultura En: Estudio de potencial pesquero y acuícola de Baja California Sur. FAO-UABCS-CIBNOR-CICIMAR-CRIP (Eds.), La Paz, Baja California Sur, México. Pp. 571-613.
- Nandy, K., 1985. Lipofuscin as a marker of impaired homeostasis in aging organisme. In B.B. Davis and W.G. Wood (eds). *Homeostasis function ang aging.* Raven Press, New York: 139-148.

- Napolitano, G.E., R.G. Ackman, M.A. Silva, 1994. Incorporation of dietary sterols by the sea scallop *Placopecten magellanicus* (Gmelin) fed on microalgae. *Mar. Biol.* (117): 647–654.
- Mirle Narváez, L. Freites, M. Guevara, J. Mendoza, H. Guderley, C.J. Lodeiros, G. Salazar, 2008. Food availability and reproduction affects lipid and fatty acid composition of the brown mussel, *Perna perna*, raised in suspension culture. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 149: 293-302.
- Navarro, J.M., G. E. Leiva, G. Martínez, C. Aguilera. 2000. Interactive effects of diet and temperature on the scope for growth of the scallop *Argopecten purpuratus* during reproductive conditioning. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, (247): 67-83.
- Navarro, J.M. 2001. Fisiología energética de pectínidos americanos. Maeda-Martínez A.N. 2001. En: Los moluscos pectínidos de Iberoamérica: ciencia y acuicultura; cap. 3. Pp. 61-76.
- Nevejan, N, I. Saez, G. Gajardo, P. Sorgeloos. 2003. Energy vs. Essential fatty acids: what do scallop larvae (*Argopecten purpuratus*) need most? *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* (134): 599-613.
- O'Connor, W.A. 2002. Latitudinal variation in reproductive behavior in the pearl oyster, *Pinctada albino sugillata*. *Aquaculture* 209: 333-345.
- O'Connor, W.A., N.F. Lawler. 2004. Reproductive condition of the pearl oyster, *Pinctada imbricata*, Roding, in Port Stephens, New South Wales, Australia. *Aquat. Res.* 35, 385-396.
- 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. *Aqua. Res.* 39: 18-23.
- Osuna Martínez, C.C. 2003. Toxicidad del amonio en juveniles de almeja mano de león (*Nodipecten subnodosus* Sowerby, 1835), en relación con la temperatura y el pH. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de Sinaloa. Facultad de ciencias del Mar. Mazatlán, Sin., México. Pp. 36.
- Pazos, A.J., G. Román, C.P. Acosta, M. Abad, J.L. Sánchez. 1996. Influence of the gametogenic cycle on the biochemical composition of the ovary of the great scallop. *Aquacult. Int.* 4: 201-213.
- Pazos, A.J., G. Román, C.P. Acosta, M. Abad, J.L. Sánchez. 1997. Seasonal changes in condition and biochemical composition of the scallop *Pecten maximus* L. from suspended culture in the Ría de Arousa (Galicia, N.W. Spain) in relation to environmental conditions. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 211:169- 193.

- Pazos, A.J., A. Silva, V. Vázquez, M.L. Pérez, J.L. Sánchez, M. Abad. 2005. Differences in sterol composition of clams (*Ruditapes decussatus*) from three rias in Galicia (NWSpain). *Mar. Biol.*, (147): 663–670.
- Pedroza-Islas, R., 2002. Alimentos Microencapsulados: Particularidades de los procesos para la microencapsulación de alimentos para larvas de especies acuícolas. In: Cruz-Suárez, L. E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Gaxiola-Cortés, M. G., Simoes, N. (Eds.). *Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 3 al 6 de Septiembre del 2002.* Cancún, Quintana Roo, México.
- Pérez-Camacho, A., M. Albentosa, M.J. Fernández-Reiriz, U. Labarta. 1998. Effect of microalgal and inert (cornmeal and Cornstarch) diets on growth performance and biochemical composition of *Ruditapes decussatus* seed, *Aquaculture* 160: 89-102.
- Pernet, F., R. Tremblay. 2004. Effect of varying levels of dietary essential fatty acid during early ontogeny of the sea scallop *Placopecten magellanicus*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, (310): 73–86.
- Pernet, F., V.M. Bricelj, C.C. Parrish, 2005. Effect of varying dietary levels of $\omega 6$ polyunsaturated fatty acids during the early ontogeny of the sea scallop, *Placopecten magellanicus*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, (327): 115–133.
- Persoone, G., C. Claus. 1980, Mass culture of algae: A bottleneck in the nursery culturing of mollusks.- In: G. Shelef & C.J. Soeder (eds.): *Algae Biomass.* Elsevier/North-Holland Biomedical Press. Pp. 265-285.
- Pollero, R.J., M.E. Re´, R.R. Brenner. 1979. Seasonal changes of the lipids of the mollusc *Chlamys tehuelcha*. *Comp. Biochem. Physiol.* 64A, 257-263.
- Pirini, M., M.P. Manuzzi, A. Pagliarani, F. Trombetti, A.R. Borgatti. 2007. Changes in fatty acid composition of *Mytilus galloprovincialis* (Lmk) fed on microalgal and wheat germ diets Vittoria Ventrella *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 147: 616-626.
- Racotta, I., J. Ramirez, A.M. Ibarra, M. Rodríguez, D. Carreño, E. Palacios. 2003. Growth and gametogenesis in the lion-paw scallop *Nodipecten (Lyropecten) subnodosus*. *Aquaculture*, 217 (1-4): 335-349.
- Racotta, I.S., J.L. Ramírez, S. Ávila, A.M. Ibarra. 1998. Biochemical composition of gonad and muscle in the catarina scallop, *Argopecten ventricosus*, after reproductive conditioning under two feeding systems. *Aquaculture* 163: 111-122.
- Redziniak, G., P. Perrier. 1996. Cosmetic applications of liposomes. En: *Microencapsulation.* (ed. por S. Benita), Marcel Dekker, Inc. N.Y., EUA. Pp. 577-585.

- Rivero-Rodríguez, S., A.R. Beaumont, M.C. Lora-Vilchis. 2007. The effect of microalgal diets on growth, biochemical composition, and fatty acid profile of *Crassostrea corteziensis* (Hertlein) juveniles. *Aquaculture*. 263, 199-210.
- 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, Instituto Politécnico Nacional, Centro Interdisciplinario de ciencias Marinas.
- Rodríguez-Jaramillo, M.C., M.A. Hurtado, E. Romero-Vivas, J.L. Ramírez, M. Manzano, E. Palacios. 2008. Gonadal development and histochemistry of the tropical oyster, *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1951) during an Annual reproductive cycle. *J. Shellfish Res.* 27 (5): 1129-1141.
- Rodríguez-Jaramillo, M.C., A.N. Maeda-Martínez, M.E. Valdez, T. Reynoso-Granados, P. Monsalvo-Spencer, D. Prado-Ancona, F. Cardoza-Velasco, M. Robles-Mungaray, M.T. Sicard. 2001. The effect of temperature on the reproductive maturity of the penshell. *Atrina maura* (Sowerby, 1835) (Bivalvia: Pinnidae). *J. Shellfish Res.* 20(1): 39-47.
- Román, G., G.Martínez, O. García, L. Freitas. 2002. Reproduction. En: Maeda-Martínez, A.N. (Ed.), los Moluscos Pectínidos de Iberoamérica: Ciencia y Acuicultura. Editorial Limusa, México. Pp. 27-60.
- 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 breast (France). *Aquaculture*. 172: 301-314.
- Sastry, A.N. 1979. Pelecypoda (Excluding Ostreidae) en: Giese A.C. and J. S. Pearse (edit). *Reproduction of marine invertebrates. Molluscs: Pelecypods and lesser classes.* Academic Press. USA. 5:113-265.
- Saucedo, P.E. 1995. Crecimiento relaciones alométricas y reproducción de las ostras perleras *Pinctada mazatlanica* y *Pteria sterna* (Bivalvia:Pteriidae) bajo condiciones de repoblamiento en El Merito, Bahía de La Paz, Baja California Sur, México. Tesis de Maestría. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, La Paz, Baja California Sur, México.
- Saucedo, P.E., M. Monteforte. 1997. Breeding cycle of pearl oyster *Pinctada mazatlanica* and *Pteria sterna* (Bivalvia:Pteriidae) at Bahía de La Paz, Baja California Sur, México. *J. Shellfish Res.* 16: 103-110.
- Saucedo, P. E. 2001. Investigación aplicada al acondicionamiento gonadal y reproducción de la madreperla de calafia, *Pinctada mazatlanica* (Hanley, 1856) en el laboratorio. Tesis doctoral. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, Baja California Sur, México.
- Saucedo, P.E., I. 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.C. Southgate. 2008. Reproduction, Development, and growth. En Southgate P.C., J.S. Lucas (Eds.). The Pearl Oyster: Biology and Culture. Cap. 5. Elsevier Science Publishers, Australia. Primera edición. Pp. 131-186.

Seed, R. 1976. Ecology. In: Bayne, B.L. (Ed.), Marine Mussels: Their Ecology and Physiology. Cambridge University Press, Cambridge. Pp. 13-65.

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.

Sevilla, M.L. 1969. Contribución al conocimiento de la madreperla *Pinctada mazatlanica* (Hanley, 1845). Rev Soc. Mex. Hist. Nat., 30: 223-262.

Sicard, M.T., A.N. Maeda-Martínez, S.E. Lluch-Cota, C. Lodeiros-Seijo, L.M. Roldán-Carrilo, R.Mendoza-Alfaro. 2006. Sicard Frequent monitoring of temperature: an essential requirement for site selection in bivalve aquaculture in tropical-temperate transition zones. Aqua. Res. 37, 1040-1049.

Sokal, R.R., F.J. Rohlf .1981. Biometry. The principles and practices of statistics, 2nd ed. W. H. Freeman & Co., San Francisco, CA. Pp. 110.

Solano-López, Y., J. Cabrera-Pena, J.A. Palacios, R.A. Cruz. 1997. Madurez sexual, índice de condición y rendimiento de *Pinctada mazatlanica* (Pterioida: Pteriidae), Golfo de Nicoya, Costa Rica . Rev. Biol. Trop. 45, 1049-1054.

Soudant, P., Y. Marty, J. Moal, R. Robert, C. Quere, J.R. Le Coz, J.F. Samain. 1996. Effect of food fatty acid and sterol quality on *Pecten maximus* gonad composition and reproduction process. Aquaculture 143, 361-378.

Soudant P., J. Moal, Y. Marty, J.F. Samain. 1997. Composition of polar lipid classes in male gonads of *Pecten maximus* (L.): Effect of nutrition, journal of experimental marine biology and ecology. 215(1): 103-114.

Southgate, P.C., D.C. Lou. 1995. Improving the n-3 HUFA composition of Artemia using microcapsules containing marine oils. Aquaculture. 134: 91-99.

Toba, M., Y. Natsume, H. Yamakawa. 1993. Reproductive cycles of Manila clam collected from Funabashi Water, Tokyo Bay. Nippon Suisan Gakkaishi. 59, 15-22.

Tranter, D.J. 1958. Reproduction in Australian pearl oysters (Lamellibranchia). Ill. Pinctadaalbino (Lamarck): breeding season and sexuality. Aust. J. Mar. Freshwat. Res. 9(1): 144-158.

Tremblay, R., S. Cartir, P. Miner, F. Pernet, C. Quére, J. Moal, M.L. Muzellec, M. Mazuret, J.F. Samain, 2007. Effect of *Rhodomonas salina* addition to a standard hatchery

- diet during the early ontogeny of the scallop *Pecten maximus*. *Aquaculture*. (262): 410-418.
- Turgeon K, D.E. Haven. 1978. Effects of cornstarch and dextrose on oyster. *Veliger* 20 (4): 352-358.
- Uriarte, I., A. Farías. 1999. The effect of dietary protein on growth and biochemical composition of Chilean scallop *Argopecten purpuratus* (L.) postlarvae and spat. *Aquaculture*. (180): 119-127.
- Uriarte, I., G.Rupp, A. Abarca. 2001. Producción de juveniles de Pectínidos iberoamericanos bajo condiciones controladas. En: "Los moluscos pectínidos de Iberoamérica: ciencia y acuicultura" A. Maeda. Limusa, Pp. 147-171.
- Uriarte, I., A. Farías, J.M. Navarro, J.M. Cancino, G. Gajardo, N. Nevejan. 2003. The effects of lipid emulsions and temperature on the hatchery performance of Chilean scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819) larvae. *Aquaculture Research*. (34): 899-902.
- Uriarte, I., A. Farías, J. Hernández, C. Schäfer, P. Sorgeloos. 2004. Reproductive conditioning of Chilean scallop (*Argopecten purpuratus*) and the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*): effects of enriched diets. *Aquaculture*. (230): 349-357.
- Utting, S.D., P.F. Millican. 1997. Techniques for the hatchery conditioning of bivalve broodstock and the subsequent effect on egg quality and larval viability. *Aquaculture*. 155, 45-54.
- Utting, S.D., P.F. Millican. 1998. The role of diet in hatchery conditioning of *Pecten maximus* L.: a review. *Aquaculture* 165, 167-178.
- Van Handel, E. 1965. Estimation of glycogen in small amounts of tissue. *Anal. Biochem.* 11 (2): 256-265.
- Vite-García, M.N., Saucedo P.E. 2008. Energy storage and allocation during reproduction of Pacific winged pearl oyster *Pteria sterna* (Gould, 1851) at Bahía de La Paz, Baja California Sur, Mexico. *J. Shellfish Res.* 27: 375-383.
- Wada, K.T. 1973. Growth of Japanese pearl oyster larvae fed with three species of microalgae. *Bull. Natl. Pearl. Res. Lab.* 17: 2075-2083.
- Whyte, J. N. 1987. Biochemical composition and energy content of six species of phytoplankton used in mariculture of bivalves. *Aquaculture*. 60: 231-241.

11. Anexos

A. Técnicas histológicas e histoquímicas

A.1. Técnica de inclusión en parafina

Fijación: Los tejidos se fijaron en solución Davidson para organismos marinos, durante 48 h. cambiar a alcohol etílico al 70%, transcurridas las 48 h.

Deshidratación

1. -Alcohol etílico 70% I y II (mínimo una hora c/u)
2. -Alcohol etílico 80° (1 hora para tejidos grandes) (larvas y huevos 30 min.)
3. -Alcohol etílico 90° (1 hora) (larvas y huevos 30 min.)
4. -Alcohol etílico 96° (1 hora) (larvas y huevos 30 min.)
5. -Alcohol etílico 100 I, II, III (1 hora en c/u) (larvas y huevos 30 min.)
6. -Mezcla de alcohol etílico absoluto-xilol (1:1) 20 min. (tiempo crítico)
7. -Xilol absoluto (100 %) 5-10 min. (tiempo crítico)

Infiltración en parafina:

1. -Parafina-xilol (1:1) 25 minutos (tiempo crítico, no dejar más tiempo)
2. -Parafina (Paraplast) I (1 h.)
3. -Parafina (Paraplast) II (1-2 h.)
4. -Parafina (Paraplast) III (1-2 h.)
5. -Parafina (Paraplast) IV (1-2 h. para tejidos muy grandes)

A.2. Técnica de tinción hematoxilina-eosina (de Harris)

- 1.-Xilol I, II y III-(5-10 m. en cada uno).
- 2.-Alcohol etílico 96%- 2 min.
- 3.- Alcohol etílico 70% I y 70% II- 2 min. c/u
- 4.-Agua destilada 5 min.
- 5.-Hematoxilina de Harris 4 min. (dependiendo del tipo de hematoxilina y del tiempo de uso del colorante).
- 6.-Agua corriente 5 min. y agua destilada 5 min. (no requiere necesariamente recambios a chorro).
- 7.-Alcohol ácido 10-15 segundos (1 l de alcohol al 96% con 5 gotas de ácido clorhídrico).
- 8.- Agua destilada 5 min.
- 9.- Agua amoniacal (hidróxido de amonio, 5 gotas por caja de tinción) 10-15 segundos.
- 10.-Agua destilada 5 min.
- 11.-Alcohol etílico 50% 2 min.
- 12.- Alcohol etílico al 70% 2 min.
- 13.- Eosina-Floxina alcohólica- 3 min. (dependiendo del tiempo del colorante)
- 14.- Alcohol 96% I y II, 1-2 min. c/u
- 15.- Alcohol 100% I y II, 1 min. c/u
- 16.- Citrisolv I I, II, III (sustituto de xileno ó Hemo-De) 5 min. c/u.
- 17.- Montar en resina sintética o Entellan.

A.3. Azul alciano pas

- 1.- Desparafinar e hidratar en agua
- 2.- Oxidar en solución de ácido periódico por 5 min.
- 3.- Enjuagar en agua destilada 5min.
- 4.- Colocar en la solución de Schiff de Coleman por 15 –30 min.
- 5.- Enjuagar en agua corriente por 10 min.
- 6.- Contrateñir con hematoxilina de Mayer's por 15 min. o de Harris por 6 min.
- 7.- Enjuagar en agua de la llave por 15 minutos
- 8.- Deshidratar en 2 cambios de ROH 95% y ROH 100% 2 min. c/u
- 9.- Aclarar en Xileno o sustituto de xileno 2 min. c/u
- 10.- Montar en resina sintética o entellan

Resultados:

Glucógeno, mucinas - rojo a púrpura

Y algunas membranas basales

Hongos - rojo a púrpura

Núcleos - azul

A.4. Sudán negro B

Fijación: Cortes por congelación y una postfijación breve de una hora en formol-calcio o material fijado en formol al 10% amortiguado ó postfijación en dicromato de potasio. También se puede en cortes de gónadas fijados con Davidson.

Soluciones: Solución de Sudán negro a saturación, en alcohol etílico al 70%

Procedimiento:

1. -Desparafinar e hidratar hasta agua destilada en caso de cortes en parafina.
2. -Colocar los cortes en alcohol al 70%
3. -Teñirlos por 15 min. a 30 min. en la solución de Sudán negro Filtrarla antes de usar
4. -Diferenciar en alcohol al 70%.
5. -Contrastar los núcleos con carmalum o rojo rápido nuclear o hematoxilina Harris.
6. -Lavar bien en agua corriente.
7. -Lavar en agua destilada.
8. -Montar en gelatina glicerinada.

Resultados

Esteres de colesterol	azul a negro.
Triglicérido	azul a negro.
Fosfolípidos	gris.
Mielina	bronce.

Nota: la brominación aumenta la reacción para estos lípidos y además permite la tinción de lectinas, ácidos grasos libres y colesterol libre.

A.5. Método para lipofuscinas afip

- 1.- Desparafinar e hidratar las laminillas hasta agua destilada.
- 2.- Teñir con solución Carbol Fucsina Kinyoun por una hora.
- 3.- Enjuagar en varios cambios de agua destilada.
- 4.- Diferenciar en la solución de alcohol ácido, 5 a 6 gotas o hasta que las secciones se vean rosa pálido.
- 5.- Enjuague en agua corriente durante 5 minutos, y luego enjuague en agua destilada.
- 6.- Contraste con la solución de ácido pícrico aproximadamente por 1 minuto.
- 7.- Deshidrate en alcohol etílico al 96%, luego en alcohol etílico al 100 %.
- 8.- Aclare en Xilol, 2 cambios de 2 minutos cada uno
- 9.- Monte en resina sintética o Entellan.

RESULTADOS

Lipofuscinas- rojas

Fondo, otros tejidos- amarillo

B. Análisis químico de agua

Se realizaron análisis químico de agua a los cinco tratamientos en tres tiempos experimentales (5, 15 y 30 días), en el Laboratorio de Diagnóstico Químico de Agua del CIBNOR y consisten en procesos certificados por la NOM, determinando: Nitritos (MPT-LAN101-04) basado en el método de Bendschneider y Robinson (1952); Nitratos (MPT-LAN101-05) Basado en el método de Morris y Riley (1963); Amonio (MPT-LAN101-04) Basado en el método de Solórzano (1969); además de Sólidos Suspendedos Totales con el método gravimétrico indicado por la NOM-AA-34-2001 y Sólidos Disueltos Totales con un medidor de SDT marca ORION modelo 135 A.

Tabla III. Concentraciones promedio (μM) de nitritos (NO_2) nitratos (NO_3) amonio (NH_4), sólidos disueltos totales (SDT) y sólidos suspendidos totales (SST) de agua por tratamiento experimental de organismos de *P. sterna* alimentados con diferentes dietas naturales y artificiales en el laboratorio en diferentes tiempos experimentales, 5, 15 y 30 días. BC= blanco, agua de mar filtrada sin organismos ni alimento, A= Control; B= 1% MAZ; C= 2% MAZ; D= 1% GAM; E= 2% GAM.

Tiempo (días)	Tratamiento	Nitritos mg/L^{-1}	Nitratos mg/L^{-1}	Amonio mg/L^{-1}	SDT mg/L^{-1}	SST mg/L^{-1}
5	BC	0.012	0.004	0.095	34386	0.16
	A	0.081	4.589	0.446	34485	2.41
	B	0.060	2.689	0.316	34815	0.47
	C	0.041	2.636	0.329	32604	1.12
	D	0.081	2.459	0.432	33000	0.76
15	E	0.085	2.949	0.323	34584	0.66
	BC	0.010	0.021	0.071	35574	1.41
	A	0.084	6.896	0.307	35409	1.76
	B	0.067	8.513	0.294	36333	0.64
	C	0.037	1.534	0.161	35079	6.91
30	D	0.053	2.339	0.231	36036	7.62
	E	0.094	1.497	0.257	36531	2.96
	BC	0.023	0.048	0.041	35772	68
	A	0.558	5.309	0.294	35112	2.63
	B	0.236	5.700	0.518	35508	3.03
30	C	0.271	5.459	0.392	34716	69.1
	D	0.860	3.775	0.296	36564	57.7
	E	0.412	5.350	0.230	34782	2.55

C. Determinación de peso seco (PS) de los organismos y alimentos

Tabla IV. Porcentajes de peso seco de organismos de *P. sterna* alimentos con una dieta microalgal complementada con alimentos artificiales para la determinación de las raciones.

Muestra	% de peso seco
Organismos	16.26%
GAM	98%
Maizena [®]	89%

Tabla V. Peso seco de tres especies de microalgas a utilizar en experimento de dietas con organismos de *P. sterna* durante 30 días (modificado de Helm, 2006).

Especie	Peso seco ($\mu\text{g } 10^{-6}$ células)
<i>Isochrysis</i> (T-ISO)	} 19-24
<i>Pavlova lutherii</i>	
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	35

D. Contenido energético de los alimentos

Tabla VI. Contenido energético de las dietas suministradas a organismos de *P. sterna* durante 30 días. Se expresan en peso seco (PS). A= Control; B= 1% MAZ; C= 2% MAZ; D= 1% GAM; E= 2% GAM. Mazón-Suástegui *et al.*, 2008; Lora-Vilchis, 2004.

Dieta	Biomasa <i>P. sterna</i> g/PS	Alimento	Ración g/PS/día	Contenido energético alimento (KJ/g)	Equivalente energético alimento (KJ/día)	Energía total por dieta KJ/g PS
A	37.34	<i>Isochrysis galbana</i>	0.25	21.10	5.25	0.37
		<i>Pavlova</i> sp.	0.25	21.10	5.25	
		<i>Chaetoceros calcitrans</i>	0.25	14.00	3.49	
		Total	0.75		13.99	
B	42.47	<i>Isochrysis galbana</i>	0.28	21.10	5.97	0.30
		<i>Pavlova</i> sp.	0.28	21.10	5.97	
		<i>Chaetoceros calcitrans</i>	0.28	14.00	3.96	
		1% MAZ	0.42	6.19	2.63	
		Total	0.99		12.57	
C	40.91	<i>Isochrysis galbana</i>	0.27	21.10	5.75	0.36
		<i>Pavlova</i> sp.	0.27	21.10	5.75	
		<i>Chaetoceros calcitrans</i>	0.27	14.00	3.82	
		2% MAZ	0.82	6.19	5.08	
		Total	1.37		14.65	
D	48.58	<i>Isochrysis galbana</i>	0.32	21.10	6.83	0.56
		<i>Pavlova</i> sp.	0.32	21.10	6.83	
		<i>Chaetoceros calcitrans</i>	0.32	14.00	4.53	
		1% GAM	0.49	32.50	15.79	
		Total	1.13		27.16	
E	40.65	<i>Isochrysis galbana</i>	0.27	21.10	5.72	0.88
		<i>Pavlova</i> sp.	0.27	21.10	5.72	
		<i>Chaetoceros calcitrans</i>	0.27	14.00	3.79	
		2% GAM	0.81	32.50	26.33	
		Total	1.35		35.84	

E. Reabsorción y atresia de gametos

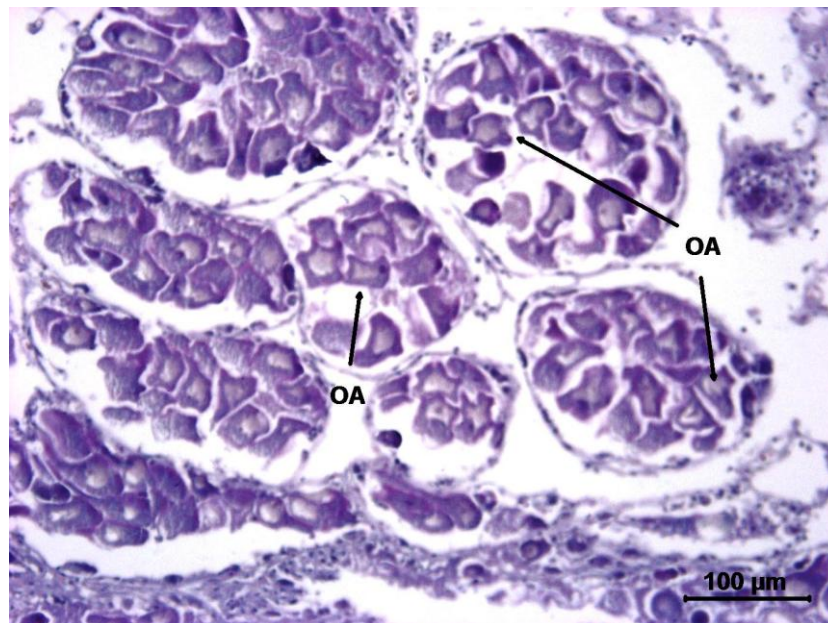


Figura 20. Microfotografía (20X) se muestra la reabsorción de gametos femeninos en *P. sterna*. OA= ovocitos atrésicos. Tinción azul alciano pas.

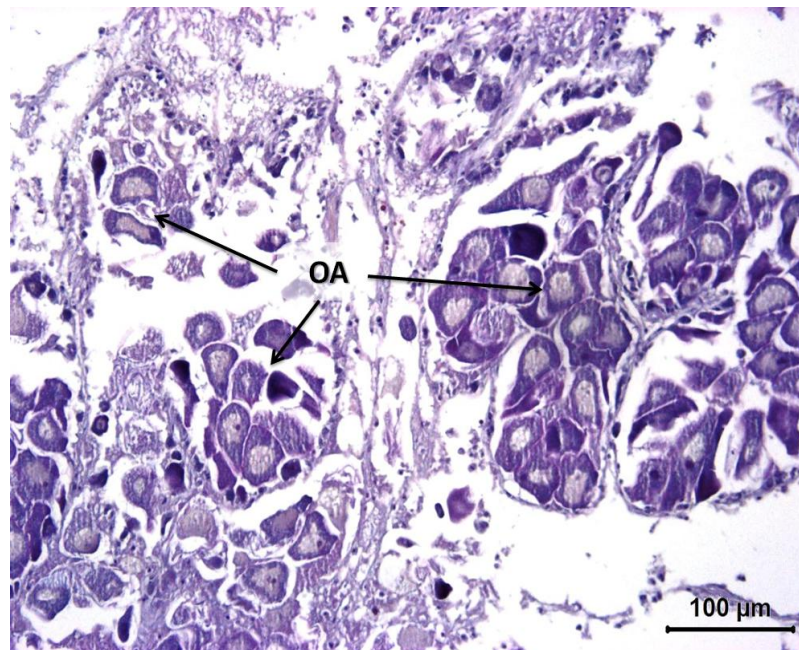


Figura 21. Microfotografía (20X) se muestra la reabsorción de gametos masculinos en *P. sterna*. OA= ovocitos atrésicos. Tinción azul alciano pas.

F. Presencia de hemocitos

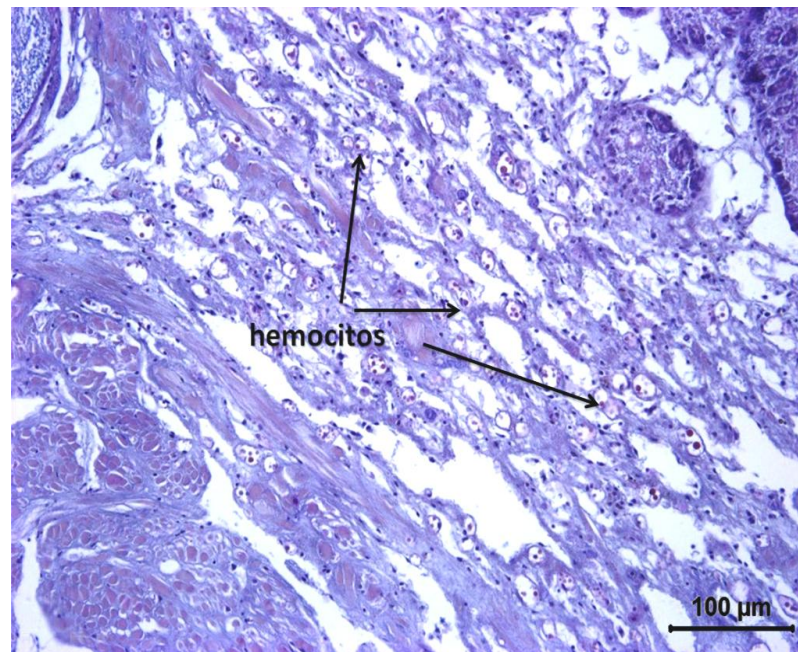


Figura 22. Microfotografía (20X) donde se indica la presencia de hemocitos en tejido conjuntivo de *P. sterna*. Tinción azul alciano pas.

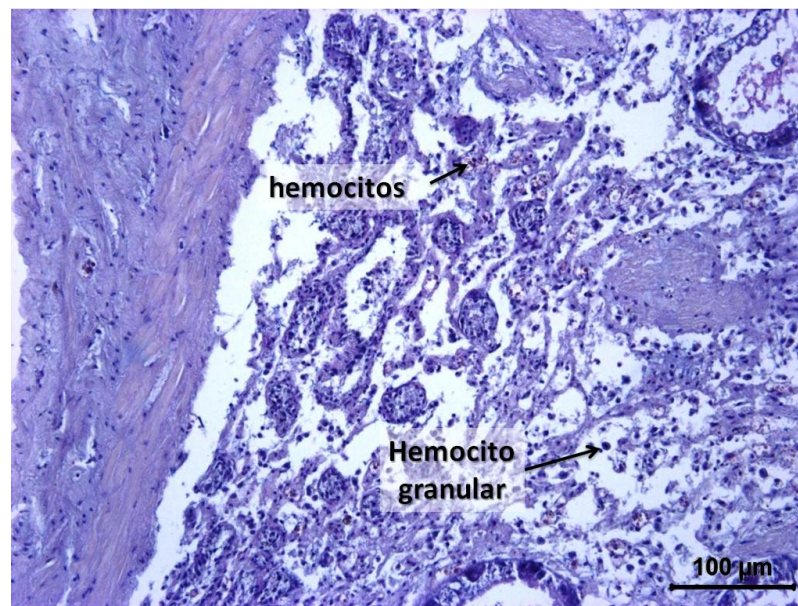


Figura 23. Microfotografía (20X) donde se indica la presencia de hemocitos en tejido conjuntivo de *P. sterna*. Tinción azul alciano pas.

G. Presencia de lipofuscinas

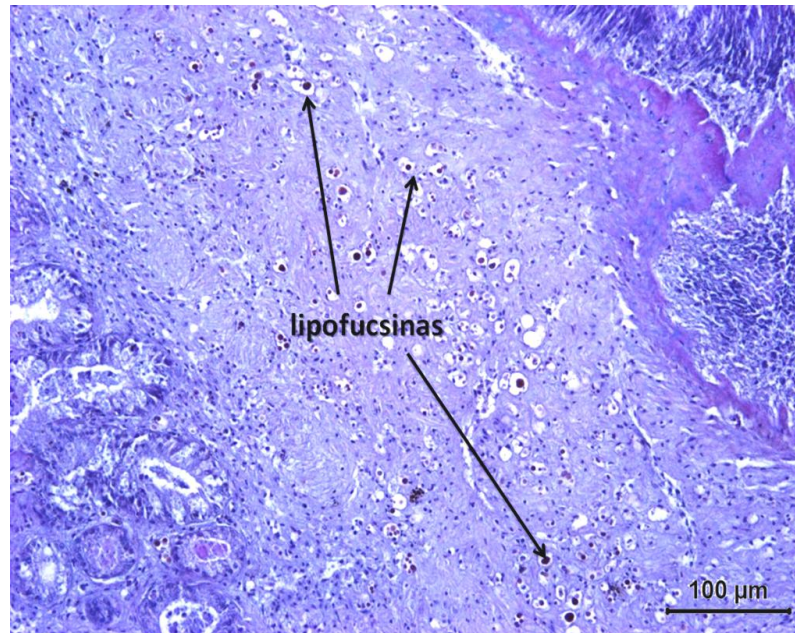


Figura 24. Microfotografía (20X) donde se muestran las lipofuscinas presentes en tejido conjuntivo de *P. sterna*. Tinción azul alciano pas.

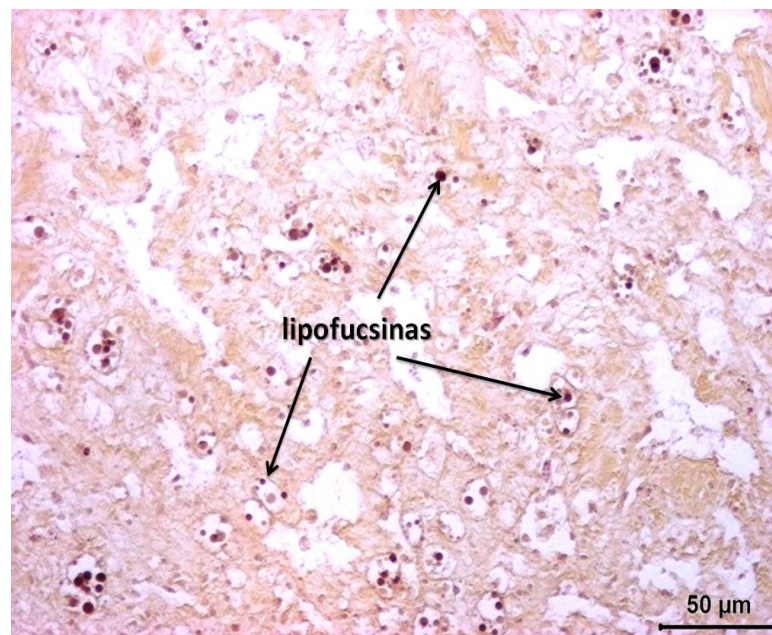


Figura 25. Microfotografía (20X) donde se muestran las lipofuscinas presentes en tejido conjuntivo de *P. sterna*. Tinción afp para lipofuscinas.