



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS  
DEL NOROESTE, S.C.

---

Programa de Estudios de Posgrado

**Efecto de la temperatura y alimentación en la  
maduración sexual del mejillón *Modiolus capax*  
(Conrad,1837) en condiciones de laboratorio**

**TESIS**

Que para obtener el grado de

**Maestro en Ciencias**

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

P r e s e n t a

**Jesús Antonio López Carvallo**

La Paz, Baja California Sur, Septiembre del 2015

## ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 11:20 horas del día 7 del Mes de Septiembre del 2015, 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 temperatura y alimentación en la maduración sexual, del mejillón *Modiolus capax* (Conrad,1837), en condiciones de laboratorio"**

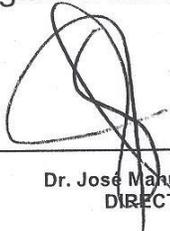
Presentada por el alumno:

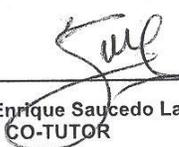
**Jesús Antonio López Carvalho**

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

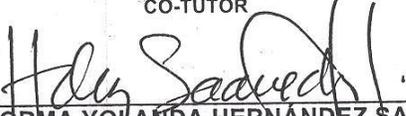
Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA

  
Dr. José Manuel Mazón Suástegui  
DIRECTOR DE TESIS

  
Dr. Pedro Enrique Saucedo Lastra  
CO-TUTOR

  
Dr. Angel Isidro Campa Córdova  
CO-TUTOR

  
DRA. NORMA YOLANDA HERNÁNDEZ SAAVEDRA,  
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO Y FORMACIÓN DE RECURSOS HUMANOS

## **Conformación de Comité**

### **Comité Tutorial**

**Dr. José Manuel Mazón Suástegui**

Director de tesis

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C

**Dr. Pedro Enrique Saucedo Lastra**

Co-Tutor

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C

**Dr. Ángel Isidro Campa Córdova**

Co-Tutor

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C

### **Comité Revisor de Tesis**

Dr. José Manuel Mazón Suástegui

Dr. Pedro Enrique Saucedo Lastra

Dr. Ángel Isidro Campa Córdova

### **Jurado de Examen de Grado**

Dr. José Manuel Mazón Suástegui

Dr. Pedro Enrique Saucedo Lastra

Dr. Ángel Isidro Campa Córdova

### **Suplente**

Dr. Dariel Tovar Ramírez

## Resumen

*Modiolus capax* es un mejillón nativo de Bahía de La Paz, B.C.S, México, con una amplia distribución geográfica y potencial de cultivo en áreas no aptas para otras especies de moluscos bivalvos comerciales como *Crassostrea gigas* y *Nodipecten subnodosus*. La recolecta de semilla silvestre no es suficiente para sostener una producción acuícola a futuro, por lo que es indispensable producirla en laboratorio, y para ello se requiere conocer su biología reproductiva y su adaptabilidad al manejo zootécnico bajo condiciones controladas. Desafortunadamente, se sabe muy poco sobre el manejo de reproductores de *M. capax* en laboratorio. El presente estudio ha sido enfocado a generar nuevo conocimiento básico, aplicable al desarrollo de procedimientos y tecnología para el acondicionamiento gonádico y maduración sexual de la especie en ambiente controlado. Se evaluaron una dieta natural y dos dietas artificiales complementarias (1) Micro-100: Mezcla de microalgas (*Tisochrysis lutea* antes *Isochrysis galbana* y *Chaetoceros calcitrans*), (2) Micro-Trigo: Dieta Micro-100 complementada Harina de Trigo (Espuma de Chapala<sup>®</sup>) y (3) Micro-Maíz: Dieta Micro-100 complementada con Fécula de Maíz (Maizena<sup>®</sup>). Estas dietas se suministraron a organismos acondicionados a tres temperaturas experimentales: 22, 24 y 26°C aplicando un diseño experimental de nueve tratamientos Dieta/Temperatura. Se observó que los animales correspondientes a temperaturas de 24°C y 26°C presentaron una alta frecuencia de desoves parciales, lo que indicó una maduración anticipada al primer muestreo (60 días). El mayor desarrollo gonádico correspondió a los organismos del tratamiento Mirco-Maíz/26°C por presentar la mayor frecuencia de organismos desovados parcialmente y la menor área de cobertura gonádica, mientras que la menor frecuencia de organismos en desove parcial y la mayor área de cobertura gonádica se registraron en organismos de los tratamientos Micro-100 y Micro-Trigo a 22°C. El menor contenido de carbohidratos en tejido somático se observó en los organismos acondicionados a 26°C y el mayor en organismos acondicionados a 22°C. Un bajo contenido de carbohidratos en tejido somático se asoció a un gasto energético en consecuencia a etapas más avanzadas de madurez. El mayor contenido de lípidos en gónada estuvo presente en los organismos sometidos al tratamiento Micro-Maíz/26°C y en menor en Micro-100/24°C. Esto supone una mayor acumulación de lípidos en gónada por efecto de lipogénesis a partir de una dieta rica en carbohidratos. De acuerdo a estos resultados se plantea que una dieta natural complementada con una fuente rica en carbohidratos como lo son las harinas de cereales ayuda a soportar de una manera eficiente tanto el proceso de gametogénesis como la maduración sexual total en *M. capax*. Por otro lado, a una temperatura de 26°C se pueden obtener organismos maduros en un menor tiempo que a 22°C.

**Palabras clave:** *Modiolus capax*, Acondicionamiento, Dietas artificiales, Temperatura

## Abstract

“Effect of temperature and diet on sexual maturation of the mussel *Modiolus capax* (Conrad, 1837) under laboratory conditions”.

*Modiolus capax* is a native mussel from Bahía de La Paz, B.C.S, Mexico with a wide distribution area and a great potential to be cultured in a non-suitable area for other commercial species, such as *Crassostrea gigas* and *Nodipecten subnodosus*. Seed harvest from the field cannot support aquaculture production in the future, so it becomes necessary to start hatchery production of seeds. Therefore, it is essential to fully understand the reproductive biology and organism's adaptability to laboratory management. Unfortunately laboratory management and conditioning it is not well known in *M. capax*. The present study aimed to generate new zootechnical basic knowledge for conditioning and sexual maturation of the species under controlled laboratory conditions. We assessed one natural diet and two combined natural/artificial diets (1) Micro-100: microalgae mix (*Tisochrysis lutea* before *Isochrysis galbana* and *Chaetoceros calcitrans*), (2) Micro-Trigo: Micro-100 diet complemented with wheat flour (Espuma de Chapala<sup>®</sup>) and (3) Micro-Maíz: Micro-100 diet complemented with cornstarch (Maizena<sup>®</sup>). These diets were supplied in mussels conditioned at 22°C, 24°C and 26°C employing a total of nine Diet/Temperature treatments. Results indicate high partial spawning frequency in mussels at the middle of the experiment (day 60) when using a temperature 24°C and 26°C, which reflects an early maturation. Higher gonadal development was observed in mussels from the Micro-Maíz treatment at 26°C, with the highest prevalence of partial spawning and the less gonadal coverage area. In contrast, the Micro-100 and Micro-Trigo treatments at 22°C had the least prevalence of partial spawning mussels and the highest gonadal coverage area. Lower carbohydrate content in somatic tissue occurred in mussels conditioned at 26°C and the highest content at 22°C. Low carbohydrate content was associated with increased energy expenditure accordingly to advanced maturity stages. Higher lipid content in gonad occurred in mussels fed Micro-Maíz at 26°C and the lowest in Micro-100 at 24°C, which implies a greater accumulation of lipids in gonad by lipogenesis supported by carbohydrate rich diets. Based on these results, we suggest that a natural diet supplemented with a rich source of carbohydrates such as cereal flours can help support efficiently the process of gametogenesis to achieve full maturation in *M. capax*. On the other hand, breeders attain at 26°C full maturation in less time than those conditioned at 22°C.

**Keywords:** *Modiolus capax*, Conditioning, Artificial diets, Temperature

## *Dedicatoria*

*Esta tesis va dedicada a los grandes eslabones de mi vida, quienes me ayudaron a emprender mi vida académica, la cual hoy en día disfruto mucho.*

*Este logro en mi vida va dedicado a mis padres María Gisela Carvallo Ruiz y José Antonio López Elías, quienes siempre se han caracterizado por brindarme un apoyo incondicional, que vas más allá de lo posible.*

*Me permito ampliar esta dedicatoria a mi hermana, abuelos, primos y tíos, quienes son una familia llena de una alegría contagiosa, la cual me permite visualizar el camino de la vida de una manera positiva y llena de oportunidades.*

## **Agradecimientos**

Agradezco a CONACYT por la beca otorgada (301921), con la cual pude llevar a cabo mis estudios de Maestría, permitiéndome crecer académicamente.

Al CIBNOR por apoyar como institución en diversos aspectos en la realización del presente trabajo.

A mi tutor Dr. José Manuel Mazón Suástegui quien me apoyo en la elaboración de esta tesis y siempre estuvo dispuesto a mejorar el trabajo y dar horas extras de su tiempo.

A mis cotutores el Dr. Ángel Isidro Campa Córdova y el Dr. Pedro Enrique Saucedo Lastra, siempre en la mejor disposición posible y con las puertas abiertas a resolver cualquier duda.

A Miguel Robles Mungaray (Acuacultura Robles S.P.R. de R.I.) quien facilitó todos los organismos requeridos para el experimental y realizó las coletas de campo durante un año.

A la Dra. Carmen Rodríguez Jaramillo y a María Eulalia Meza del Laboratorio de Histología, quienes me ayudaron, capacitaron y entrenaron en el procesamiento, manejo e interpretación de las muestras. Siempre dispuestas a ayudar con una sonrisa en su rostro.

A Roberto Hernández Herrera y Víctor M. Moyrón Ibarra del Laboratorio de Bioquímica, quienes siempre apoyaron en las diversas actividades del laboratorio y se encontraron dispuestos a ayudar en cualquier duda.

A María Dolores Rondero Astroga y Sindi Areli Juan Antunes del Laboratorio de Bromatología, quienes estuvieron dispuestas a apoyar esta investigación, facilitándonos instalaciones y equipos.

A Julián A. Garzón Favela, Cynthia E. Aldana Avilés, Adriana Greene Yee y Gabriela Mendoza Carrión del Laboratorio de Microalgas, quienes siempre proporcionaron alimento para llevar a cabo el experimental, sin importar el día de la semana durante 4 meses continuos.

A Pablo Ormart Castro y José Delfino Barajas del Laboratorio de Moluscos, quienes me apoyaron con el manejo de los organismos en laboratorio y en el montaje de todos los sistemas, estando presentes durante la realización del experimento.

A Horacio Sandoval Gómez, Lic. Tania Nuñez Valdez, Lic. Claudia E. Olachea, Lic. Osvelia Ibarra Morales, Leticia González Rubio Rivera, Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra e integrantes de posgrado quienes hacen una experiencia grata en la maestría del CIBNOR, estando siempre dispuestos a ayudar a los alumnos que pasamos por esta institución.

A todas aquellas personas que apoyaron esta investigación de manera directa o indirecta.

A todos aquellos buenos amigos de la generación, CIBNOR y La Paz, quienes ayudaron a tener una estancia muy agradable y placentera en la maestría.

A mis padres José Antonio López Elías y María Gisela Carvallo Ruíz por darme un apoyo excepcional tanto en mi formación académica como en mi formación personal, siempre impulsándome a ir hacia adelante.

A mi familia, quienes en todo momento están dispuestos a apoyarme y aconsejarme, siempre con la mejor intención.

A Ana Caroli Ibarra, quien me alienta a seguir haciendo lo que me gusta, trabajar con aspectos de la reproducción de organismos marinos, un área sorprendente que ofrece una cantidad inmensa de preguntas por contestar.

Gracias a todos y cada uno de ustedes.

## Contenido

1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. ANTECEDENTES .....	5
2.1. Taxonomía .....	5
2.2. Distribución geográfica .....	5
2.3. Morfología externa (Ochoa-Báez, 1987) .....	6
2.4. Morfología interna (Ochoa-Báez, 1987) .....	7
2.5. Biología reproductiva del mejillón <i>M. capax</i> .....	8
2.6. Acondicionamiento gonádico de reproductores .....	10
2.7. Estudios sobre el uso de dietas naturales en moluscos bivalvos durante el acondicionamiento gonádico en laboratorio .....	13
2.8. Estudios sobre requerimientos nutricionales de moluscos .....	16
2.9. Estudios sobre el uso de cereales como alimento en moluscos bivalvos ...	20
2.10. Estudios sobre el empleo de temperaturas en moluscos bivalvos .....	22
3. JUSTIFICACIÓN .....	24
4. HIPÓTESIS .....	25
5. OBJETIVOS .....	26
5.1. General .....	26
5.2. Particulares .....	26
6. METODOLOGÍA .....	27
6.1. Obtención y manejo inicial de reproductores .....	27
6.2. Diseño experimental .....	28
6.3. Composición proximal de las dietas naturales y artificiales utilizadas .....	30
6.4. Estimación de la ración alimenticia .....	31
6.5. Cultivo de microalgas y preparación de dietas artificiales .....	31
6.6. Muestreo de organismos en laboratorio y campo .....	32
6.7. Biometría .....	33
6.8. Índice de condición .....	34
6.9. Análisis Histológico .....	34

6.10. Análisis Histoquímico.....	38
6.11. Análisis bioquímico proximal.....	39
6.11.1. Proteínas .....	40
6.11.2. Lípidos .....	40
6.11.3. Carbohidratos .....	40
6.12. Análisis estadístico .....	41
7. RESULTADOS.....	42
7.1. Biometría inicial.....	42
7.2. Índice de condición (IC) .....	42
7.3. Análisis Histológico .....	43
7.3.1. Estadios de desarrollo .....	43
7.3.2. Área de cobertura gonádica (ACG) .....	49
7.3.3. Diámetro teórico de ovocitos .....	51
7.4. Análisis histoquímico .....	52
7.4.1. Índice lipídico (IL) en tejido gonádico.....	52
7.4.2. Índice lipídico en ovocitos (IL <sub>o</sub> ) .....	53
7.4.3. Índice glucídico (IG) en tejido gonádico.....	54
7.4.4. Índice glucídico en ovocitos (IG <sub>o</sub> ) .....	55
7.5. Análisis Bioquímico.....	55
7.5.1. Gónada.....	55
7.5.2. Glándula digestiva .....	58
7.5.3. Manto.....	60
7.5.4. Músculo .....	62
8. DISCUSIÓN .....	64
9. CONCLUSIONES .....	82
10. LITERATURA CITADA.....	84
11. ANEXOS .....	101

## Lista de Figuras

- Figura 1.** Distribución geográfica de *M. capax* (imagen obtenida de Google Earth Pro, 2015).. ..... 6
- Figura 2.** Morfología externa (A) y talla máxima (B) del mejillón *M. capax*..... 7
- Figura 3.** Morfología interna del mejillón *M. capax* (Izquierda). GD: Glándula digestiva; G: Gónada; MS: Músculo; M: Manto. Esquema de la morfología interna de un mejillón (Derecha), donde se señalan principales estructuras (imagen obtenida de @asturnatura.com)..... 8
- Figura 4.** Ejemplares de mejillón *M. capax*, en estado de madurez; hembra (Izquierda) y macho (Derecha)..... 9
- Figura 5.** Unidad experimental termo-regulada de fibra de vidrio, utilizada para el acondicionamiento gonádico de reproductores de mejillón *M. capax* en laboratorio. .... 29
- Figura 6.** Medidas tomadas para realizar biometría inicial del mejillón *M. capax* (imágenes obtenida de Google™ image)..... 33
- Figura 7.** Variaciones en el índice de condición (IC) promedio de reproductores de *M. capax* sometidos en laboratorio a diferentes tratamientos combinados de temperatura y dieta durante 120 días. Las barras muestran la media  $\pm$  error estándar. Las letras distintas muestran diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA  $P < 0.05$ )..... 43
- Figura 8.** Estadios de desarrollo gonádico de hembras de *M. capax* sometidos a diferentes tratamientos combinados de temperatura y dieta durante 120 días. (A). Indiferenciado. (B) Previtelogénesis. (C). Vitelogénesis. (D). Postvitelogénesis (madurez). (E). Desove parcial hembra. (F). Postdesove hembra. OVT. Ovocito vitelogénico temprano. OVG. Ovogonia. TC. Tejido conjuntivo. GD. Gonoducto. HM. Hemocitos. OV. Ovocito vitelogénico. A. Acino. n. Núcleo. c. Citoplasma. OVP. Ovocito postvitelogénico. OVA. Ovocito atrésicos. OVR. Ovocito residual.. 45
- Figura 9.** Estadios de desarrollo gonádico de machos de *M. capax* sometidos a diferentes tratamientos combinados de temperatura y dieta durante 120 días. (A). Indiferenciado. (B). Espermatogénesis temprana. (C). Espermatogénesis avanzada. (D). Macho en estadio de Madurez. (E). Desove parcial macho. (F). Postdesove macho. TC. Tejido conjuntivo. GD. Gonoducto. HM. Hemocitos. OV. Ovocito vitelogénico. ESPR. Espermátidas. ESP. Espermatozoides. CA. Caudas de espermatozoides. AT. Acino testicular. ER. Espermatozoides residuales. .... 46
- Figura 10.** Variaciones en los estadios de desarrollo gonádico en machos (A) y hembras (B) de reproductores de *M. capax* sometidos a diferentes tratamientos combinados de temperatura y dieta durante 120 días. Ind: Indiferenciado. Est: Espermatogénesis temprana. Esa: Espermatogénesis avanzada. Mad: Madurez.

Dp: Desove parcial. Pos: Postdesove Pre: Previtelogénesis. Vit: Vitelogénesis. Posv: Postvitelogénesis (madurez).....	48
<b>Figura 11.</b> Variaciones en el área de cobertura gonádica (ACG) promedio de reproductores hembras (A) y machos (B) de <i>M. capax</i> sometidos a diferentes tratamientos combinados de temperatura y dieta durante 120 días. Las barras muestran la media $\pm$ error estándar. Las letras distintas muestran diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA $P < 0.05$ ).....	50
<b>Figura 12.</b> Variaciones en el diámetro teórico de ovocitos en reproductores de <i>M. capax</i> sometidos a diferentes tratamientos combinados de temperatura y dieta durante 120 días. Las barras muestran la media $\pm$ error estándar. Las letras distintas muestran diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA $P < 0.05$ ). .....	51
<b>Figura 13.</b> Variaciones en el índice glucídico (IG) (A) y lípidico (IL) promedio (B) en tejido gonádico de reproductores hembra de <i>M. capax</i> sometidos a diferentes tratamientos combinados de temperatura y dieta durante 120 días. Las barras muestran la media $\pm$ error estándar. Las letras distintas muestran diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA $P < 0.05$ ).....	52
<b>Figura 14.</b> Variaciones en el índice glucídico promedio de ovocitos (IG <sub>o</sub> ) (A) y en el índice lípidico de ovocitos (IL <sub>o</sub> ) (B) de reproductores hembra de <i>M. capax</i> sometidos a diferentes tratamientos combinados de temperatura y dieta durante 120 días. Las barras muestran la media $\pm$ error estándar. Las letras distintas muestran diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA $P < 0.05$ ).....	54
<b>Figura 15.</b> Variaciones en el contenido promedio de carbohidratos (A), proteínas (B) y lípidos (C) en gónada de reproductores de <i>M. capax</i> sometidos a diferentes tratamientos combinados de temperatura y dieta durante 120 días. Las barras muestran la media $\pm$ error estándar. Las letras distintas muestran diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA $P < 0.05$ ).....	57
<b>Figura 16.</b> Variaciones en el contenido promedio de carbohidratos (A), proteínas (B) y lípidos (C) en glándula digestiva de reproductores de <i>M. capax</i> sometidos a diferentes tratamientos combinados de temperatura y dieta durante 120 días. Las barras muestran la media $\pm$ error estándar. Las letras distintas muestran diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA $P < 0.05$ ). .....	59
<b>Figura 17.</b> Variaciones en el contenido promedio de carbohidratos (A), proteínas (B) y lípidos (C) en manto de reproductores de <i>M. capax</i> sometidos a diferentes tratamientos combinados de temperatura y dieta durante 120 días. Las barras muestran la media $\pm$ error estándar. Las letras distintas muestran diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA $P < 0.05$ ).....	61
<b>Figura 18.</b> Variaciones en el contenido promedio de carbohidratos (A), proteínas (B) y lípidos (C) en músculo de reproductores de <i>M. capax</i> sometidos a	

diferentes tratamientos combinados de temperatura y dieta durante 120 días. Las barras muestran la media  $\pm$  error estándar. Las letras distintas muestran diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA  $P < 0.05$ ). ..... 63

## **Lista de Tablas**

<b>Tabla I.</b> Condiciones experimentales aplicadas para el acondicionamiento gonádico de reproductores de <i>M. capax</i> bajo diferentes condiciones de temperatura y alimentación.....	30
<b>Tabla II.</b> Composición bioquímica del alimento proporcionado.....	30
<b>Tabla III.</b> Cantidad de organismos muestreados en relación al análisis llevado a cabo (Histológico, Bioquímico, IC) en campo y en laboratorio.....	33
<b>Tabla IV.</b> Descripción de estadios empleados para clasificar el desarrollo gonádico de hembras. ....	35
<b>Tabla V.</b> Descripción de estadios empleados para clasificar el desarrollo gonádico de machos.....	36
<b>Tabla VI.</b> Prueba de normalidad y homocedasticidad de las variables longitud, ancho, grosor y peso húmedo total de reproductores de mejillón <i>M. capax</i> al inicio del experimento.....	42

## 1. INTRODUCCIÓN

La acuicultura hoy en día destaca por su gran dinamismo y continuo crecimiento entre otras actividades productivas del sector agropecuario y pesquero. Los productos acuícolas de origen marino como algas, peces, crustáceos y moluscos son una fuente muy valiosa de proteínas, lípidos y nutrientes esenciales, que contribuyen a lograr una nutrición equilibrada en diversas poblaciones humanas alrededor del mundo, por aportar el 40.3% de la producción total de peces y mariscos a nivel mundial (FAO, 2012). Debido a que las pesquerías han sobrepasado sus niveles máximos de captura en diversas zonas, la acuicultura brinda una oportunidad de incrementar la producción de peces y mariscos (FAO, 2012).

En la producción acuícola mundial 2010 de aguas marinas, destacan en primer lugar los moluscos con el mayor porcentaje (75.5%), seguidos por los peces de escama (18.7%), crustáceos marinos (3.8%) y otros animales acuáticos (2.1%) (FAO, 2012). El cultivo de moluscos es una actividad que no utiliza dietas balanceadas que ocupen una serie de materias primas para su elaboración, ya que son organismos que se alimentan mediante filtración. Esto le confiere a dicha actividad una gran ventaja al no requerir de insumos que aumenten el costo de sus productos, así como independencia de productos provenientes de la pesquería. Esto no sucede, con el cultivo de peces y crustáceos, por lo que, los moluscos presentan un gran potencial para la acuicultura.

En América Latina, México ocupa el cuarto lugar en la producción de moluscos, después de Chile, Brasil y Perú. En México la producción acuícola de moluscos bivalvos es una actividad casi exclusiva de las costas del Pacífico de Baja California y el Golfo de California, destacando la producción del ostión Japonés o del Pacífico (*Crassostrea gigas*) y, en menor grado, el ostión de Placer

(*Crassostrea corteziensis*), el mejillón (*Mytilus galloprovincialis*), la almeja catarina (*Argopecten ventricosus*) y la ostra perlera (*Pteria sterna*). Aunque también existe una actividad denominada pesquería acuacultural, la cual se lleva a cabo en el Golfo de México con el ostión *Crassostrea virginica* (Maeda-Martínez, 2008).

En cuanto a la producción de mejillón en México, la Carta Nacional Pesquera menciona que se explotan dos especies: *Mytilus californianus* que se extrae del medio silvestre (pesquería) en la costa occidental de Baja California, y *Mytilus galloprovincialis* el cual es cultivado en la Bahía de Todos Santos Baja California, por la empresa Acuacultura Oceánica, S. de R.L., mediante el sistema de líneas largas sumergidas (Carta Nacional de Pesca, Diario Oficial de la Federación, 2012).

Las estadísticas de producción de mejillón en México, por medio de acuicultura, inician en 1994 con 18 toneladas aproximadamente, produciendo por más de 100 toneladas en 2010. La extracción del recurso aporta el 62.1 % de la producción nacional mientras que al cultivo le corresponde un 37.9% (Carta Nacional de Pesca, Diario Oficial de la Federación, 2012).

Debido al potencial que presenta la acuicultura de los mejillones como fuente de proteína animal, existe interés en asegurar la disponibilidad de larvas y juveniles (“semillas”) mediante el desarrollo, adaptación e innovación de tecnologías. Las alternativas posibles son la recolecta de semilla silvestre en campo o su producción en condiciones de laboratorio. Tanto el estudio del ciclo reproductivo natural de estos organismos, como el desarrollo de métodos para el acondicionamiento gonádico (maduración sexual controlada) son aspectos muy importantes para la acuicultura. El acondicionamiento de los reproductores es fundamental si se quiere contar con larvas para producir semillas y promover el cultivo a talla comercial para mercados establecidos (Helm *et al.*, 2006).

El acondicionamiento gonádico es un procedimiento a través del cual, los laboratorios productores de semilla de moluscos pueden ampliar su ciclo reproductivo sin tener que depender del período, relativamente corto, durante el cual los adultos de la especie de interés se encuentran maduros en el mar (Mazón-Suástegui, 1988; 2005). Acosta *et al.* (2011) plantea que la reproducción es uno de los aspectos principales que deben manejarse en la acuicultura ya que es determinante en la rentabilidad del cultivo del mejillón. Igualmente, menciona que el éxito se basa en la reproducción de especies por medio de un mejor conocimiento biológico, empleando innovaciones tecnológicas y desarrollando productos alimenticios de alta calidad.

Para desarrollar una metodología para el acondicionamiento gonádico de bivalvos reproductores es necesario conocer los factores que estimulan el desarrollo gonádico. La maduración sexual en los bivalvos es producto de una compleja interacción de factores exógenos (temperatura, salinidad, luz, alimento) y de factores endógenos (neuronal, hormonal) que es necesario controlar (Mackie, 1984; Román *et al.*, 2001; Barber & Blake, 2006).

Los factores exógenos son manipulables en condiciones de laboratorio y son los responsables de desencadenar procesos netamente biológicos relacionados con los factores endógenos, que promueven la maduración en moluscos bivalvos. El control de factores exógenos permite el acondicionamiento de moluscos bivalvos, siendo la temperatura y la disponibilidad del alimento los factores principales que rigen la maduración sexual en estos organismos (Saucedo *et al.*, 2001; Román *et al.*, 2001; Fernández-Reiriz *et al.*, 2003; Chávez-Villalba *et al.*, 2007; Acosta *et al.*, 2011).

La temperatura del agua es de suma importancia en el acondicionamiento de moluscos bivalvos ya que actúa como un disparador o regulador de eventos

reproductivos, además de que es capaz de influenciar la velocidad en la que se lleva a cabo la gametogénesis (Fearman & Moltschaniwskyj, 2010). Sin embargo, aun cuando el aumento de temperatura detona y promueve el proceso de gametogénesis, es necesario contar con un alimento que cubra los requerimientos nutricionales de un reproductor para que alcance la madurez sexual en el laboratorio (Ahn *et al.*, 2003). La calidad y la cantidad de alimento disponible para los reproductores tiene una marcada influencia en la calidad de los ovocitos (Wilson *et al.*, 1996; Cannuel & Beninger, 2005), y puede reflejarse en la cantidad y calidad del vitelo, así como en la calidad ovocitaria y larvaria (Gómez-Robles *et al.*, 2013); por ello es un factor determinante en la producción de juveniles (Semilla) en laboratorio.

La dieta por excelencia empleada en el acondicionamiento de moluscos bivalvos a nivel mundial son las microalgas, por encontrarse relacionadas con la fecundidad (Pronker *et al.*, 2008) y dar buenos resultados en la maduración de los organismos, especialmente cuando se emplea más de una sola especie de microalga como alimento (Wilson *et al.*, 1996; Berntsson *et al.*, 1997; González-Araya *et al.*, 2012). Por otra parte, la producción de microalgas es costosa y requiere infraestructura especializada, por lo que se ha buscado sustituirlas parcialmente empleado dietas artificiales. Las dietas artificiales han demostrado contribuir con los requerimientos nutricionales de moluscos bivalvos, sin embargo, no logran remplazar en un su totalidad a las microalgas. Entre los diversos tipos de dietas artificiales, podemos mencionar: nutrientes disueltos en agua, microalgas secas pulverizadas, levaduras, bacterias, emulsiones lipídicas, microencapsulados y alimentos microparticulados, como las harinas de cereal (Knauer & Southgate, 1999). Debido a que las dietas artificiales y en particular las harinas de cereales son fáciles de preparar y presentan un bajo costo, se optó por emplearlos a manera de complementos en la presente investigación. Las harinas de cereales ricas en carbohidratos han demostrado cubrir en buena medida los requerimientos nutricionales de moluscos bivalvos en juveniles (Pérez-Camacho *et*

*al.*, 1998; Fernández-Reiriz *et al.*, 1999; Knauer & Southgate, 1999; Albentosa *et al.*, 2002; Parres-Haro, 2008; Mazón-Suástegui *et al.*, 2009) y pueden apoyar el proceso de maduración en adultos reproductores (Mazón-Suástegui, 1988; 2005). Debido a que se sabe muy poco sobre los efectos de dietas y temperaturas en la biología reproductiva del mejillón *M. capax* en condiciones de laboratorio, el presente estudio pretende generar antecedentes en el aprovechamiento de dietas ricas en carbohidratos en el acondicionamiento de reproductores del mejillón *M. capax*, así como el efecto que tiene la temperatura sobre el proceso de gametogénesis, cuando se suministran distintas dietas de distinta composición bioquímica a diferentes temperaturas.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1. Taxonomía**

Reino: Animalia

Filo: Mollusca

Clase: Bivalvia

Orden: Mytiloidea

Familia: Mytilidae

Género: *Modiolus*

Especie: *Modiolus capax* (Conrad, 1837)

### **2.2. Distribución geográfica**

La distribución latitudinal de *M. capax* es amplia a lo largo de las costas del Océano Pacífico, abarcando desde Santa Cruz CA, Estados Unidos hasta Paita, Perú, incluyendo las islas Galápagos y el Golfo de California donde es

especialmente abundante (García-Cubas & Reguero,1987; Farfán *et al.*, 2007) (Figura 1).

La especie presenta un comportamiento gregario, habita en altas densidades y su distribución batimétrica abarca entre la zona intermareal y submareal (Farfán *et al.*, 2007). En La Paz, Baja California Sur, *M. capax* forma bancos silvestres por medio de filamentos bísales en aguas con abundante materia orgánica en suspensión. Se encuentran distribuidos entre los 2 a 6 metros de profundidad. Es considerado un organismo bentónico en su etapa adulta y habita fondos pedregosos con abundante limo, pero pueden encontrarse comunidades sobre muelles o estructuras hundidas (Ochoa-Báez, 1987).

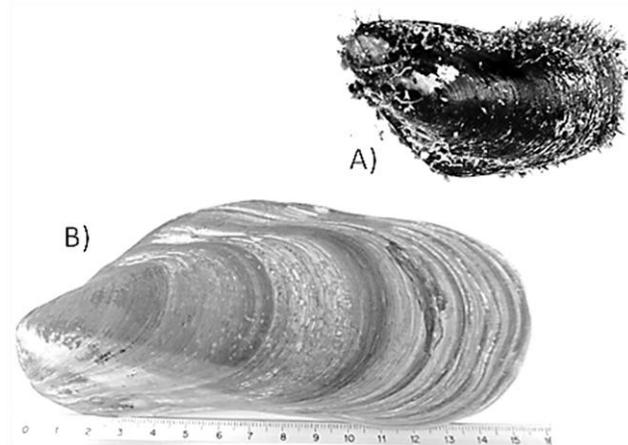


**Figura 1.** Distribución geográfica de *M. capax* (imagen obtenida de Google Earth Pro, 2015).

### **2.3. Morfología externa (Ochoa-Báez, 1987)**

*M. capax* presenta una concha color café violáceo oscuro con prolongaciones coriáceas del periostraco dispuestos a manera de pelos, cubriendo desde la parte baja del umbo hasta el borde de la concha, que presenta una forma globosa alargada y un ensanchamiento cerca del umbo. La longitud máxima

reportada para esta especie es de 13.2 cm (Ochoa-Báez, 1987), (Figura 2), aunque se han obtenido ejemplares de hasta 15.5 cm de pescadores que mencionan que proceden de la Bahía de La Paz.



**Figura 2.** Morfología externa (A) y talla máxima (B) del mejillón *M. capax*.

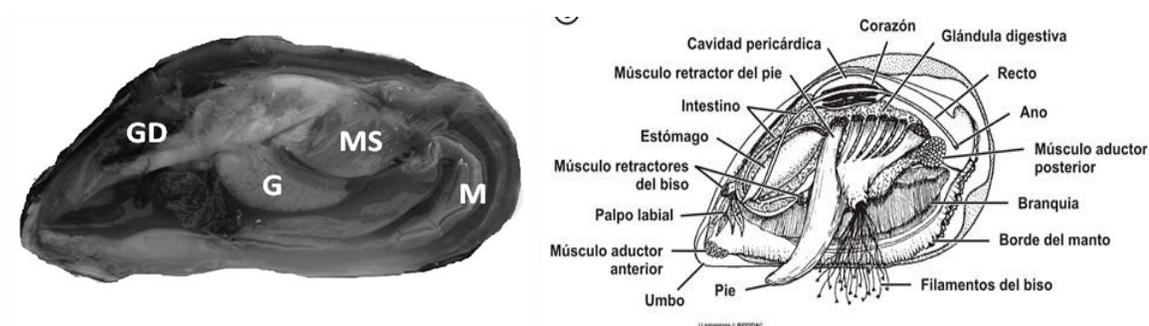
#### **2.4. Morfología interna (Ochoa-Báez, 1987)**

El cuerpo de *M. capax* presenta una simetría bilateral y en su región dorsal se localizan los órganos del sistema circulatorio. Posee dos músculos aductores desiguales, uno ubicado en la región anterior y otro en la región posterior. En la región antero-ventral se localiza la boca rodeada por los palpos labiales y la gónada (Figura 3), y hacia la región posterior (cerca del nefridioporo) se encuentra localizado el ano.

El tubo digestivo se inicia por la boca, la cual se encuentra rodeada por los palpos labiales, que le permiten al organismo la selección de partículas al momento de filtrar. Los palpos labiales forman una estructura a manera de

embudo, que pasa por la boca y forma un esófago corto que a su vez desemboca en el estómago, donde se lleva a cabo la digestión del alimento ingerido.

El alimento disponible en el agua llega al estómago por medio de movimientos ciliares producidos por las branquias, los cuales generan un flujo de materia en dirección a los palpos labiales. Las branquias, además de esta actividad nutricional, también cumplen la función de respiración, indispensable para el organismo. La región del estómago se encuentra rodeada en su totalidad por la glándula digestiva y el tejido gonádico. El intestino forma un asa que se dirige en posición dorsal, pasa por encima del músculo aductor y desemboca por el ano a la cavidad paleal posterior (Ochoa-Báez, 1987).



**Figura 3.** Morfología interna del mejillón *M. capax* (Izquierda). GD: Glándula digestiva; G: Gónada; MS: Músculo; M: Manto. Esquema de la morfología interna de un mejillón (Derecha), donde se señalan principales estructuras (imagen obtenida de ©asturnatura.com).

### 2.5. *Biología reproductiva del mejillón M. capax*

*M. capax* es un organismo gonocórico, protándrico, que no presenta dimorfismo sexual. A diferencia de la mayoría de los mitílidos *M. capax* no presentan desarrollo de gametos en manto. La mayor parte de la gónada llena el espacio entre el músculo aductor posterior, los músculos retractores del pie, el

biso y la glándula del biso (Figura 3). En la región ventral se forma un lóbulo entre el músculo aductor posterior y la glándula del biso, el cual puede llegar a ser muy voluminoso y prominente en organismos completamente maduros, o muy delgado y flácido en individuos con escaso desarrollo gonádico (Bückle-Ramírez & Garza-Aguirre, 1989) (Figura 4).



**Figura 4.** Ejemplares de mejillón *M. capax*, en estado de madurez; hembra (Izquierda) y macho (Derecha).

En Bahía de los Ángeles, *M. capax* presenta una reproducción continua y libera gametos durante todo el año, siendo el desove más intenso en los meses de Julio y Agosto, (Bückle-Ramírez & Garza-Aguirre, 1989), seguidos por una fase de reabsorción y reposo cuya duración es de tres a cuatro meses, abarcando el periodo de Octubre a Diciembre (Farfán *et al.*, 1998). Un comportamiento reproductivo similar fue reportado para la especie por Ochoa-Báez (1987) en la Bahía de la Paz B.C.S., reportando un pico máximo de desove durante Julio y Agosto (90% de organismos maduros) y un segundo pico de desove menos pronunciado durante los meses de Febrero y Marzo (20% de organismos maduros).

Con respecto a la talla mínima de reproducción de *M. capax*, se reporta que los organismos con tallas inferiores a los 40 mm aun no alcanzan la madurez sexual (Bückle-Ramírez & Garza-Aguirre, 1989; Ochoa-Báez, 1987). Esto debe tenerse en cuenta para definir una talla mínima de potenciales reproductores,

cuando se requiere realizar investigación sobre el acondicionamiento gonádico de la especie en laboratorio.

Farfán *et al.* (1998) reportaron cinco estadios de desarrollo gonádico (cinco etapas y cuatro sub-etapas), las cuales comprenden reposo, crecimiento, madurez, liberación de gametos (inicial media y final) y post-liberación (inicial y media). Lo anterior concuerda en gran medida con la clasificación de Ochoa-Báez (1987) quien menciona siete estadios de desarrollo: indiferenciado (0), gametogénesis inicial (I), gametogénesis intermedia (II), gametogénesis avanzada (III), madurez y desove (IV), recuperación y postdesove (V) y postdesove y reabsorción (VI). Por último, existe una clasificación de estadios de desarrollo gonádico descrita por Bückle-Ramírez & Garza-Aguirre (1989), la cual presenta un mayor número de estadios, ya que incluyen estadios combinados. La clasificación de estos autores es la siguiente: reposo, cinco etapas de crecimiento, cuatro etapas en la liberación de gametos y cuatro etapas combinadas.

La variación entre las diversas clasificaciones de desarrollo gonádico de *M. capax* se debe principalmente a que algunos autores seccionan estadios y hacen una descripción más a fondo. Sin embargo, todos los autores concuerdan en que hay etapas de reposo, de crecimiento o desarrollo, de madurez, de desove y de postdesove.

## **2.6. Acondicionamiento gonádico de reproductores de moluscos bivalvos**

El acondicionamiento gonádico es una zootecnia que permite acelerar, mantener o retrasar el proceso de maduración sexual en reproductores de moluscos en condiciones de laboratorio, mediante la manipulación y control de los factores exógenos, principalmente alimento y temperatura, ya que presentan mayor relevancia como moduladores del proceso de gametogénesis (Fabioux *et*

*al.*, 2005; Mazón-Suástegui, 2005). Mediante el acondicionamiento gonádico se ha observado que la cantidad de ovocitos, producidos por reproductores del ostión Japonés *C. gigas*, depende de la cantidad y de la calidad del alimento proporcionado (Chávez-Villalba *et al.*, 2003). Por ello es de suma importancia acondicionar a los reproductores antes de ser desovados, ofreciéndoles una dieta de alta calidad nutricional para asegurar una mejor progenie. Rodríguez-Jaramillo (2004) hace énfasis en que el coeficiente de heterogeneidad en reproductores de *Atrina maura* demuestra que el índice lipídico es mucho más variable en la gónada de hembras provenientes del medio natural, que en hembras que han sido acondicionadas y maduras en el laboratorio. Este resultado es importante cuando se seleccionan los reproductores para la obtención de larvas, ya que es posible que se obtengan malos resultados cuando se utilizan organismos sin haberse madurado en laboratorio. Bajo condiciones controladas de dieta y temperatura se puede sincronizar los estadios de madurez ovocitaria y mejorar la calidad de los gametos. Al igual que en la ostra plana *Ostrea edulis*, se ha observado una correlación positiva entre el diámetro del huevo y el contenido de lípidos, proteínas y carbohidratos. Las hembras que desarrollaron un mayor diámetro en sus ovocitos presentaron a su vez una mejor calidad de progenie (Wilson *et al.*, 1996). Por otro lado, los juveniles que provienen de hembras en inanición presentan menores tasas de crecimiento y supervivencia en comparación a las hembras que son alimentadas. Estos autores infieren que las reservas almacenadas, por si solas, son inadecuadas para asegurar la producción de gametos viables, por lo que es necesario alimentar a los reproductores durante el proceso de acondicionamiento gonádico para asegurar una fuente complementaria de energía disponible que permita obtener finalmente, una mejor calidad ovocitaria en los ostiones acondicionados.

Una vez que se obtiene una dieta de calidad, capaz de madurar sexualmente a los organismos, se hace indispensable la incorporación del manejo térmico, ya que este permite la producción continua de semilla mediante la manipulación de la

velocidad en la que se lleva el proceso de gametogénesis (Farfán *et al.*, 1998; Utting & Millican, 1998; Fabioux *et al.*, 2005; Mazón-Suástegui 2005; Ojea *et al.*, 2008; Domínguez *et al.*, 2010; Kamermans *et al.*, 2013). En el acondicionamiento gonádico de especies como *Pecten maximus* se ha registrado un avance en su madurez cuando se incrementa la temperatura de 12.6 a 13.5°C (0.2°C/día) y el fotoperiodo de 14 a 16 horas de luz al día (2 min/día). Sin embargo, la gónada tiene un menor desarrollo cuando se reduce la temperatura de 12.6 a 8 °C (0.2°C/día) y el fotoperiodo de 8.27 a 8 horas (Saout *et al.*, 1999). En cuanto a *Pinctada mazatlanica*, se sugiere a la temperatura como una de las variables más importantes durante acondicionamiento gonádico ya que se reporta gran actividad reproductiva a las temperaturas de 24 y 28°C con respecto a 20°C (Saucedo *et al.*, 2001). Lo anterior enfatiza la importancia del manejo térmico, ya que permite modular la detonación del proceso de gametogénesis y el tiempo en que se pueden obtener organismos sexualmente maduros. El hecho de que un incremento en la temperatura del agua tiene un impacto significativo en la aceleración del proceso de maduración de los reproductores y sus eventos de desove, se encuentra ampliamente relacionado con diversos procesos de la gametogénesis, tales como como su activación y aceleración, maduración de células germinales, regulación en el proceso de mitosis gonial, crecimiento y producción de ovocitos (Saout *et al.*, 1999; Chávez-Villalba *et al.*, 2002; Fabioux *et al.*, 2005; Ojea *et al.*, 2008; Lagos *et al.*, 2012; Castillo-Durán *et al.*, 2013; Rathansreedevi *et al.*, 2014).

Cabe mencionar que al control térmico pueden añadirse otras variables como el fotoperiodo (Fabioux *et al.*, 2005), el cual se ha relacionado con la tasa de crecimiento de los ovocitos (Paulet & Boucher, 1991) y puede contribuir a la remaduración temprana de la gónada (Duinker *et al.*, 1999).

## **2.7. Estudios sobre el uso de dietas naturales en moluscos bivalvos durante el acondicionamiento gonádico en laboratorio**

Los moluscos bivalvos son organismos filtradores herbívoros, y por ello durante su acondicionamiento gonádico suelen emplearse como principal alimento diversas especies de microalgas marinas cultivadas. Sin embargo, su sistema de filtración no selectivo hacia las microalgas, ya que también se alimentan de materia orgánica particulada en suspensión, por lo que se han empleado fuentes alternativas en la alimentación, como el fitoplancton natural que prolifera de forma extensiva en tanques o estanques en el exterior y la biomasa microalgal cultivada, procesada en forma de pastas que desde hace tiempo se encuentran disponibles en el mercado (Helm *et al.*, 2006).

Las microalgas producidas en acuicultura, son por mucho, la dieta viva natural más utilizada para moluscos. La mayor cantidad de microalgas cultivadas a nivel mundial es destinada al cultivo de moluscos y las especies más comúnmente utilizadas para su alimentación en cautiverio son *I. galbana* (*T. lutea* según Bendif *et al.*, 2013), *Skeletonema costatum*, *Pavlova lutheri* y *C. calcitrans*. (Muller-Feuga, 2000).

Los costos de mantenimiento de reproductores durante su acondicionamiento gonádico con fines de maduración sexual y posterior desove, son muy altos debido a que consumen grandes cantidades de alimento vivo, generalmente entre el 3 y 6 % del peso seco del tejido blando del organismo por día (Utting & Millican, 1997). Debido a la gran demanda de reproductores y semillas, la producción de microalgas comprende del 15 al 85 % del costo total de operación en los laboratorios comerciales que producen semilla de bivalvos (Bolton, 1982; Urban & Langdon, 1984). Por esa razón se hace necesario evitar el desperdicio de alimento vivo y desarrollar dietas que impliquen un menor costo en la producción.

A pesar que el cultivo de microalgas implica uno de los mayores gastos de producción, su aplicación en técnicas de acondicionamiento gonádico para reproductores en el laboratorio ha dado resultados favorables, permitiendo llevar a cabo desoves programados y obtener gametos viables y larvas saludables. Esto se relaciona con una mayor calidad y homogeneidad en los productos sexuales obtenidos en el laboratorio (Rodríguez-Jaramillo, 2004), que finalmente permiten obtener mayor cantidad y calidad de semillas.

Para la ostra plana *O. edulis*, y en general para otras especies de bivalvos, se obtiene un mejor desarrollo larval cuando los reproductores son alimentados con una mezcla de microalgas flagelado-diatomea, como podría ser la dieta combinada de *I. galbana* (*T. lutea* según Bendif *et al.*, 2013) y *Chaetoceros gracilis*, que si se otorgan de manera separada, es decir como dietas monoespecíficas (González-Araya *et al.*, 2012). Lo anterior remarca la importancia la importancia de tener una dieta microalgal variada. Wilson *et al.* (1996) reportan para *Ostrea chilensis*, que el diámetro de los ovocitos en hembras provenientes de un ambiente estuarino es mayor al diámetro de los ovocitos producidas por reproductores alimentados en el laboratorio con monodietas microalgales. Los mismos autores reportan una mayor calidad de nutrientes en los ovocitos de mayor diámetro, lo cual puede estar asociado a que en el medio natural los animales consumen una dieta más diversa que en el laboratorio, por lo que asumen que las dietas a base de mezclas de microalgas representan una mejor opción alimentaria durante el proceso de acondicionamiento gonádico. González-Araya *et al.* (2012), también hacen referencia a que una dieta basada en una mezcla de microalgas (*Rhodomonas salina* y *Thalassiosira weissflogii*) en reproductores de *O. edulis*, da como resultado una mayor fecundidad, que cuando estas mismas microalgas son empleadas por separado. Lo anterior se ve respaldado por la investigación de Pronker *et al.* (2008), quienes emplearon 3 tipos de dietas mixtas a base de microalgas, para el acondicionamiento gonádico

de reproductores de mejillón azul (*Mytilus edulis*); en todos los tratamientos se obtuvieron desoves pero la fecundidad varió según los tratamientos, siendo la mejor dieta, una combinación del flagelado *P. lutherii* con las diatomeas *C. calcitrans* y *S. costatum*. Mazón-Suástegui (1987) reporta que los reproductores del mejillón *M. capax* pueden alcanzar la madurez total y un 100% de desove cuando son acondicionados en el laboratorio con una dieta combinada de dos flagelados desnudos: *I. galbana* (*T. lutea* según Bendif *et al.*, 2013) y *Tetrasemlis chui*. No obstante, se asume que para el acondicionamiento gonádico de bivalvos es preferible la combinación de un flagelado y una diatomea (Helm *et al.*, 2006).

Por otra parte otros estudios confirman que más que la diversidad de especies microalgales, lo más importante es su composición bioquímica. Este hecho ha sido corroborado por Sühnel *et al.* (2012), quienes reportaron que una dieta a base de una microalga rica en ácido docosahexaenoico (22:6n3) o DHA, *I. galbana* (*T. lutea*) complementada con ácido eicosapentaenoico (20:5n3) o EPA, promueve una mayor supervivencia de larvas y semillas provenientes de reproductores alimentados con esta dieta y un efecto positivo en la maduración de reproductores de *Nodipecten nodosus*. Estos autores llegaron a la conclusión de que una dieta rica en los ácidos grasos esenciales EPA y DHA, es suma importancia en la maduración del molusco bivalvo *N. nodosus*. Con esto se remarca la importancia de las dietas mixtas que involucran a más de una especie de microalga, ya que la composición de EPA y DHA es distinta entre las diferentes especies cultivadas de microalgas empleadas en la acuicultura (Volkman *et al.* 1989).

En general, la importancia de las microalgas como alimento natural en el acondicionamiento gonádico de reproductores, reside en el hecho de que con su empleo se puede asegurar una producción controlada de semilla en laboratorio fuera de temporada, dando una mayor posibilidad de éxito comercial a los productores de semilla.

## **2.8. Estudios sobre requerimientos nutricionales de moluscos**

La calidad y cantidad del alimento así como la estrategia reproductiva tienen una gran influencia en la acumulación de reservas en moluscos bivalvos. Chávez-Villalba *et al.* (2003) mencionan que según la localidad en la que se encuentren los reproductores de *C. gigas* presentarán una estrategia diferente en el aprovechamiento de nutrientes. Según estos autores, los organismos de Baie des Veys utilizan carbohidratos como principal fuente de soporte para la gametogénesis mientras que los de La Tremblade utilizan proteínas, argumentando que durante el invierno los organismos de La Tremblade pierden glucógeno debido a la falta de alimento. Con esto se puede apreciar la importancia del alimento en las estrategias de reserva y empleo de nutrientes para el desarrollo de gametos. Es importante mencionar que además del alimento disponible en el medio ambiente, los bivalvos disponen de otra fuente de nutrientes para la gametogénesis, como es la reabsorción de los gametos residuales del ciclo reproductivo anterior (Chávez-Villalba *et al.*, 2003). Esto confirma que es importante el estudio de las dietas y la utilización de reservas metabólicas en los moluscos bivalvos, para tener mayores elementos e información básica aplicables al desarrollo de tecnologías de maduración sexual.

En cuanto a la movilización de reservas, se ha reportado que existe un patrón marcado en el almacenamiento y utilización de energía que varía según la temporada del año y la correspondiente variación en los parámetros ambientales, principalmente la temperatura del agua y la disponibilidad de alimento (Gabbott, 1976; Barber & Blake, 2006). Estas variaciones tienen relación directa con el crecimiento y la reproducción. Como ejemplo podemos citar al mejillón *M. edulis*, el cual tiene un periodo de gametogénesis de Marzo a Diciembre, sustentado por alimento del medio natural y por reservas del tejido germinal y somático,

provenientes del alimento ingerido durante primavera y verano, lo que le permite cubrir (al menos parcialmente) sus requerimientos reproductivos, independientemente de los nutrientes disponibles en el ambiente (Hawkins *et al.*, 1985). Lo anterior depende en gran medida de la estrategia reproductiva que apliquen los organismos. Los moluscos bivalvos presentan principalmente dos estrategias reproductivas según el ambiente en el que se desarrolla, pudiéndose clasificar como: 1) oportunistas, cuando la energía obtenida a partir del alimento se invierte directamente en la reproducción, y 2) conservadores, estrategia que se adopta cuando el alimento es insuficiente y es necesario recurrir a la movilización de reservas (Shumway & Newell, 1984; Racotta *et al.*, 2003; Gómez-Robles *et al.*, 2005; Arellano-Martínez *et al.*, 2011); incluso se puede presentar en una misma especie una estrategia combinada (conservadora y oportunista) dependiendo de la variabilidad anual del alimento (Gómez-Robles, 2013). Por lo anterior, se podría decir que es de suma importancia entender las estrategias reproductivas, requerimientos nutricionales y cantidad de alimento disponible, ya que esto se encuentra ampliamente ligado al proceso de maduración sexual, la buena calidad ovocitaria de las hembras y el empleo de reservas metabólicas como lo son los carbohidratos, proteínas y lípidos.

Los carbohidratos han sido estudiados ampliamente en los ciclos reproductivos de moluscos bivalvos y se encuentran relacionados íntimamente al proceso de gametogénesis. El glucógeno es un carbohidrato considerado una reserva metabólica de gran importancia para moluscos bivalvos. La acumulación de glucógeno se encuentra sustentada por la glucogénesis, y los niveles de glucosa se mantienen a través de la utilización del glucógeno acumulado mediante la glucogenólisis (Farías-Molina, 2001). Por ser herbívoros y presentar enzimas digestivas tipo carbohidrasas (Langton 1977; Huvet *et al.*, 2003), se podría asumir que los bivalvos son más demandantes de carbohidratos que de lípidos durante su ciclo de vida bentónico (Farías-Molina, 2001). La acumulación de reservas de glucógeno en manto, y su posterior transferencia y utilización para la maduración

sexual, ha sido demostrada en mitílidos, y se sabe que el aumento de la ración alimenticia se relaciona con un incremento en el contenido de carbohidratos en gónada (Zwann & Zandee, 1972; Gabbott, 1976). En los mejillones *M. galloprovincialis*, *Modiolus barbatus* y *M. edulis* se ha observado una marcada acumulación de glucógeno que coincide con un incremento en el alimento disponible en el medio ambiente y una marcada reducción por efecto del proceso de gametogénesis (Zwann & Zandee, 1972; Mladineo *et al.*, 2007; Martínez-Pita *et al.*, 2012), ya que estos son empleados en rutas catabólicas para obtención de energía y/o transformados en lípidos por medio del proceso de lipogénesis (Gabbott, 1976). Lo anterior demuestra la importancia que tienen los carbohidratos en la demanda energética del proceso de gametogénesis, por lo que deben de incluirse en toda dieta de reproductores de moluscos bivalvos.

Al igual que el glucógeno, en moluscos bivalvos las proteínas pueden servir como una fuente de energía que ayuda en el proceso de la gametogénesis. Estudios realizados en *C. gigas* demuestran que una dieta para reproductores con alto contenido de proteína, da como resultado ovocitos con mayor contenido de lípidos, una mayor tasa de eclosión y una mayor supervivencia larvaria (Uriarte *et al.*, 2004), demostrando que las proteínas en la dieta de acondicionamiento presentan un rol importante en la maduración sexual de la especie. En apoyo a lo anterior en el mejillón *Mytilus trossulus* se ha reportado un mayor requerimiento de proteínas durante las primeras etapas de la gametogénesis (Kreeger, 1993), lo que significa que para esta especie las proteínas juegan un papel importante en el proceso de la maduración sexual. Sin embargo, el implemento de proteínas también ha sido relacionado en situaciones de estrés e inanición en moluscos bivalvos (Widdows, 1978; Shumway & Newell 1984; Navarro, 2001; Dridi-Salwa *et al.* 2007; Yan *et al.* 2010). Por lo tanto, el gasto de proteínas en tejidos de reserva debe ser analizado a detalle, teniendo en cuenta que, la energía necesaria para llevar a cabo el proceso de la gametogénesis proviene de las reservas de glucógeno, pero en algunos casos puede provenir de manera importante de las

proteínas almacenadas. Por ello, el empleo de dietas naturales o artificiales con diferentes niveles de proteína puede propiciar una respuesta diferente y dependiente de la especie de molusco con la cual se trabaje.

Por otra parte, los lípidos son considerados de gran importancia por ser una fuente de energía de reserva, proporcionan estructura a los diversos tejidos y ser precursores de los eicosanoides. En mejillones, los lípidos presentan una función nutricional de gran importancia. De acuerdo con Alkanani *et al.* (2007) el omega 3 en *M. edulis* representa del 48 al 50% del total de sus ácidos grasos. Estos autores encuentran que el ácido graso eicosapentaenoico (20:4w6) está asociado a eventos reproductivos, lo que destaca la importancia de los lípidos contenidos en las dietas de acondicionamiento gonádico de reproductores de moluscos bivalvos. Su importancia reside en que los ovocitos presentan una gran cantidad de lípidos los cuales nutrirán a la progenie durante la etapa embrionaria. Incluso los lípidos se han encontrado asociados a incrementar la tasa de filtración (Navarro *et al.*, 2000). Estos autores utilizaron dietas enriquecidas con emulsiones lipídicas en *A. purpuratus* y registraron una mayor tasa de filtración, argumentando que los organismos encontraron más atractivo ese tipo de alimento, observando que los organismos alimentados a base de dietas complementadas con lípidos, tuvieron un mejor desarrollo de gónada comparado con aquellos que fueron alimentados únicamente con microalgas o microalgas enriquecidas con carbohidratos. Cabe mencionar que los lípidos, en particular HUFAS, son precursores de eicosanoides los cuales son de gran relevancia ya que intervienen en aspectos fisiológicos en la biología reproductiva de invertebrados y se han relacionado a eventos de desove, maduración ovocitaria, sistema nervioso y sistema inmune (Stanley-Samuelson, 1994), por lo que los ácidos grasos altamente poliinsaturados deben estar presentes en toda dieta de molusco bivalvo.

En resumen, los lípidos no solo son importantes para cubrir un gasto energético y regular aspectos fisiológicos en reproductores de moluscos bivalvos,

sino que también son transmitidos hacia la progenie por medio de la incorporación en los ovocitos. Los lípidos contenidos en ovocitos confieren flotabilidad y permiten cubrir gastos energéticos durante el desarrollo embrionario de los organismos, por lo que deben de ser incorporados dentro de las dietas de acondicionamiento.

## **2.9. Estudios sobre el uso de cereales como alimento en moluscos bivalvos**

Los productos de bajo costo que permiten reemplazar en gran medida a las microalgas en la alimentación de reproductores de moluscos bivalvos, sin repercutir en el balance nutrimental de su dieta, son escasos. Algunos autores (Pérez-Camacho *et al.*, 1998; Fernández-Reiriz *et al.*, 1999; Knauer & Southgate, 1999; Albentosa *et al.*, 2002; Mazón-Suástegui *et al.*, 2009) reportan que los cereales como el arroz, trigo, avena y maíz son poco costosos poseen un alto contenido energético y son fáciles de asimilar, lo que sugiere que pueden ser utilizados como dietas eficaces que satisfacen o complementan algunos de los requerimientos nutricionales básicos de los moluscos bivalvos.

Las dietas artificiales a base de cereales se han utilizado para el acondicionamiento gonádico de reproductores de moluscos bivalvos con resultados satisfactorios. Reproductores de *A. ventricosus*, *M. capax*, *P. mazatlánica* y *P. sterna* han sido acondicionados y desovados en el laboratorio utilizando como alimento fécula de maíz, harinas de arroz, trigo y sorgo, así como las macroalgas *Codium fragile* y *Sagassum sinicola* como dietas unitarias o combinadas (Mazón-Suástegui, 1988). Los mejores resultados fueron obtenidos al utilizar fécula de maíz y harinas de arroz y de trigo. El estudio incluye una serie de experimentos en los cuales el autor comprobó mediante disección y evaluación al microscopio, que los reproductores de las especies estudiadas presentaron al inicio del estudio una madurez parcial. Después de aplicar los tratamientos en sistema abierto, cerrado o recirculante, se obtuvieron desoves de *A. ventricosus*

en Febrero, de *M. capax* en Agosto y Noviembre, de *P. mazatlanica* en Julio, Agosto, Septiembre, Octubre y Noviembre, y de *P. sterna* en Abril, Septiembre, Octubre y Noviembre. De igual manera, durante la preengorda de juveniles (semilla) de bivalvos se han obtenido buenos resultados en crecimiento mediante el suministro de dietas artificiales a base de cereales. En especies como el ostión *C. corteziensis* se ha reportado que con microalgas y dietas artificiales complementarias se obtienen buenos resultados en términos de talla, peso, volumen y composición bioquímica de semilla de esta especie (Mazón-Suástegui *et al.*, 2008). Aunque puede presentarse mayor dispersión de valores en su contenido bioquímico y energético, las diferencias no son significativas y la ración diaria de microalgas puede reducirse en un 50%, con la consiguiente disminución de costos durante la preengorda de semillas (Mazón-Suástegui *et al.*, 2008). Para la almeja *Ruditapes philippinarum* se ha logrado el mismo crecimiento en juveniles, empleando una dieta constituida por un 50% de microalga y un 50% de harina de trigo, obteniendo una reducción del 50% en los costos de producción del alimento vivo (Albentosa *et al.*, 2002). Mazón-Suástegui *et al.* (2009) reporta un rápido crecimiento y una reducción crítica en los costos de producción durante la preengorda de semillas de *N. subnodosus* utilizando cereales como alimento, concluyendo que esta dieta complementaria podría ser aplicada a nivel comercial. En *A. ventricosus* la fécula de maíz ha sido utilizada como complemento artificial, obteniendo una mayor ganancia de carbohidratos, glucógeno y lípidos en comparación con los individuos alimentados con una dieta 100% a base de microalga, lo que confirma su potencial como dieta artificial complementaria que puede sustituir parcialmente a la dieta natural por excelencia que son las microalgas cultivadas, reduciendo costos de producción (Mazón-Suástegui, 2005).

La eficiencia de las dietas microalgales complementadas con harinas de cereales podría explicarse en función a que estos son ricos en carbohidratos y aportan materia prima para la acumulación de reservas de glucógeno. El glucógeno puede ser empleado para generar otros compuestos químicos que son

utilizados durante la gametogénesis y también para cubrir las demandas energéticas fisiológicas del animal (Berthelin *et al.*, 2001; Barber & Blake, 2006).

### **2.10. Estudios sobre el empleo de temperaturas en moluscos bivalvos**

La temperatura del agua en los océanos es uno de los factores exógenos más importantes que rigen la actividad gametogénica en las poblaciones naturales de moluscos bivalvos y es de suma relevancia para el crecimiento. Saucedo *et al.* (2009) reportan que la temperatura tiene un efecto mayor que la dieta, en el crecimiento y condición de juveniles de *P. mazatlatica*. La temperatura promueve también el desarrollo gonádico y la maduración de los moluscos bivalvos (Ochoa-Báez, 1987), particularmente en el mejillón *M. capax* en la Bahía de La Paz, México. Para esta especie se observa una relación entre el incremento de la temperatura del agua (23 a 28°C) y el inicio de la actividad gametogénica.

En las costas de Sonora, México, la maduración sexual de los reproductores de ostión Japonés *C. gigas* se inicia en primavera y se acelera durante el verano, lo cual es atribuido al incremento en la temperatura y a la mayor disponibilidad de materia orgánica particulada (Chávez-Villalba *et al.*, 2007). Lagos *et al.* (2012) reportan que el mejillón *Mytilus chilensis* presenta ciclos reproductivos diferentes en diferentes localidades y que éstos varían según la latitud a la que se encuentre el organismo. Los autores atribuyen esa diferencia a un efecto de la temperatura del agua, ya que la especie presenta una amplia distribución latitudinal pero una reducida diferenciación genética debido a su gran potencial de dispersión y adaptabilidad térmica.

El gran potencial que presenta el manejo controlado de la temperatura en la maduración de los moluscos bivalvos como promotora del ciclo gametogénico, genera un gran interés para ser utilizada durante el acondicionamiento de

reproductores en condiciones de laboratorio. De acuerdo con Chávez-Villalba *et al.* (2002) la tasa de crecimiento de ovocitos en *C. gigas* es mayor a temperaturas altas (22°C) que a temperaturas bajas (16°C). Fearman & Moltschaniwskyj (2010) encuentran que la temperatura influencia la velocidad en la que se lleva a cabo la gametogénesis en las hembras del mejillón *M. galloprovincialis*, pero no tiene un mayor efecto en la calidad de los huevos y en la fecundidad. Martínez *et al.* (2000) obtuvieron pobres resultados en el desove de reproductores de *A. purpuratus* madurados a 20°C, con una dieta a base de microalgas, en comparación con organismos acondicionados con la misma dieta, a una temperatura de 16°C. Sin embargo los aumentos de temperatura en la maduración de moluscos bivalvos pueden repercutir en la calidad de ovocitos dependiendo de las temperaturas críticas de las especies a estudiar. Rodríguez-Jaramillo (2004) señala que a pesar de lograr una aceleración del crecimiento de gametos en reproductores de *A. maura* durante su acondicionamiento a temperaturas de 25 y 30°C, hay cambios desfavorables en el volumen celular. Estos cambios se reflejan en la talla y forma de los ovocitos, y en su contenido de triglicéridos, pero se presenta además, una mayor frecuencia de ovocitos atrésicos en reproductores acondicionados a 25 y 30°C que en reproductores acondicionados a 20°C. Lo anterior debe tomarse en consideración cuando se pretende reducir el tiempo de acondicionamiento de los organismos mediante el incremento de temperatura.

Tomando en cuenta lo mencionado con anterioridad se puede decir que los cambios en la temperatura permiten activar, detener o manter el proceso de gametogénesis. Durante este proceso, es importante evaluar la calidad de los gametos, ya que estos pueden ser afectados cuando los organismos son sometidos a temperaturas cercanas a su límite de tolerancia térmico.

### 3. JUSTIFICACIÓN

Se estima que para el año 2030 en el mundo se requerirán 23 millones de toneladas adicionales de proteína animal provenientes de pescados y mariscos (FAO, 2012). Partiendo del hecho de que los moluscos bivalvos marinos (almejas, berberechos, pectínidos, mejillones y ostras), representan la mayor producción de productos marinos provenientes de la acuicultura a nivel mundial (FAO, 2012), se puede adelantar que la demanda de estos organismos aumentará en el futuro, por lo que el cultivo y el desarrollo de nuevas biotecnias para reproducir nuevas especies de moluscos bivalvos es de suma importancia para lograr la autosuficiencia alimentaria.

En México, el mejillón nativo *M. capax* es un candidato para expandir la zona de cultivo de mitílidos y aparece dentro de las especies de moluscos de interés alimenticio de la zona costera del Golfo de California. En el proyecto de Norma Mexicana PROY-NMX-FF-056-SCFI-2009 está registrado como producto de pesca-Moluscos-especies comestibles de importancia comercial (Castillo-Rodríguez, 2009). Por lo anterior *M. capax* es un organismo potencial para la acuicultura y puede contribuir al abastecimiento futuro de proteína animal de origen marino.

Sin embargo, para generar una industria que permita la explotación acuícola de este mejillón, se requiere de una producción estable de semilla. Uno de los métodos empleados a nivel mundial para obtener semilla de bivalvos es su recolecta del medio natural. Sin embargo, estudios previos con *M. capax* reportan pobres resultados en la captación de semilla silvestre (Aguirre-Hinojosa & Bückle-Ramirez, 1992), demostrando la incapacidad de tener una fuente natural y suficiente y consistente de semillas para dar soporte a proyectos comerciales de cultivo. Esto sugiere que es necesario generar conocimientos y tecnología para

asegurar una producción estable de semilla en laboratorio mediante el manejo y acondicionamiento de reproductores, como una primera etapa en dicho proceso productivo. Esto debido a que la producción de semilla en laboratorio proporciona una mayor certidumbre con respecto a la cantidad de larvas que pueden ser obtenidas, y esto ha sido reportado para otras especies con anterioridad.

Desafortunadamente, se sabe muy poco sobre el manejo de *M. capax* en condiciones controladas de laboratorio que permita asegurar la disponibilidad de reproductores sexualmente maduros con fines de desove, cultivo larvario, fijación, preengorda y obtención de semillas. El presente estudio generará nuevo conocimiento sobre la biología reproductiva de esta especie en condiciones controladas de laboratorio, con el fin de desarrollar las zootecias de manejo indispensables para obtener reproductores aptos para el desove, que es el primer paso para asegurar una producción estable de semilla. Se ha propuesto por lo tanto, una investigación sobre el efecto de la temperatura y la alimentación durante el acondicionamiento gonádico de reproductores, utilizando dietas naturales y artificiales.

#### **4. HIPÓTESIS**

El acondicionamiento gonádico de reproductores de mejillón *Modiolus capax*, con dietas artificiales ricas en carbohidratos (fécula de maíz y harina de trigo), utilizadas como complemento de una dieta natural a base de microalgas cultivadas, así como el manejo térmico, pueden reducir el tiempo mínimo requerido para alcanzar su madurez sexual y desove.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1. General

Evaluar experimentalmente el efecto de tres dietas y tres temperaturas de acondicionamiento gonádico, en la maduración sexual de reproductores de *M. capax* bajo condiciones controladas de laboratorio.

### 5.2. Particulares

- Determinar las variaciones en el índice de condición en reproductores de *M. capax* sometidos a un proceso de acondicionamiento gonádico para su maduración sexual en el laboratorio con diferentes dietas y temperaturas
- Determinar las variaciones en los estadios de desarrollo gonádico, área de cobertura gonádica y diámetro teórico de los ovocitos de *M. capax* sometidos a un proceso de acondicionamiento gonádico para su maduración sexual en el laboratorio con diferentes dietas y temperaturas.
- Determinar las variaciones en el índice lipídico e índice glucídico en gónada y ovocitos de hembras de *M. capax* sometidos a un proceso de acondicionamiento gonádico para su maduración sexual en el laboratorio con diferentes dietas y temperaturas.
- Determinar las variaciones en la composición de lípidos, proteínas y carbohidratos de la gónada, glándula digestiva, manto y músculo aductor de *M. capax* sometidos a un proceso de acondicionamiento gonádico para su maduración sexual en el laboratorio con diferentes dietas y temperaturas.

## 6. METODOLOGÍA

### 6.1. *Obtención y manejo inicial de reproductores*

Se recolectaron 1,080 reproductores del mejillón nativo (*M. capax*) de bancos naturales ubicados en Bahía de La Paz, Baja California Sur frente a las instalaciones Acuicultura Robles (24°13'38.92''N, 110°18'44.91''O), mediante buceo libre. Se seleccionaron organismos con una talla de 6 a 7 cm de longitud de la concha con el fin de obtener organismos reproductivamente activos y con mayor potencial reproductivo.

La recolección de los organismos se llevó a cabo durante el mes de Febrero, es decir, al inicio del ciclo de desarrollo gonádico de la especie en Bahía de La Paz (Ochoa-Báez, 1987), con el objeto de asegurar la mayor uniformidad inicial posible en el grado de madurez de todos los organismos.

Los organismos se transportaron al Laboratorio de Moluscos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) en hieleras a temperatura ambiente, procurando conservar la humedad para evitar la muerte por desecación durante el transporte. Al llegar al laboratorio, se llevó a cabo una limpieza exterior de los organismos eliminando suciedad y epibiontes, utilizando agua a presión, espátulas y jergas, lo que evito la presencia de otros organismos que pudieran alterar el desarrollo del trabajo experimental.

Durante este proceso, los organismos se colocaron en un tanque de fibra de vidrio con capacidad de 1,000 L, con agua de mar tratada con filtros rápidos de arena sílica, filtros de bolsa de una micra, carbón activado y esterilización por medio de luz ultravioleta, a una temperatura similar a la de campo (19°C) para evitar un estrés por shock térmico. Una vez limpios, los organismos se colocaron

en 18 taras plásticas de 50 L cada una (60 organismos por tara), sobre una malla plástica en la que los organismos se fijaron por medio del biso, facilitando la limpieza del fondo por medio de sifoneo durante el trabajo experimental en los dispositivos correspondientes.

## **6.2. Diseño experimental**

Se llevó a cabo el acondicionamiento gonádico de reproductores del mejillón *M. capax* en condiciones controladas de laboratorio, durante un periodo de 4 meses (120 días), dando seguimiento simultáneo a la población de campo donde fueron recolectados los organismos, para tener un punto de referencia. Durante la investigación se llevaron a cabo en total tres muestreos: inicial (día 0), intermedio (día 60) y final (día 120), llevando a cabo las biometrías y muestreos necesarios para los análisis requeridos en las variables de respuesta establecidas.

El experimento de acondicionamiento se llevó a cabo en cilindros de fibra de vidrio con tapa, de 80 L de capacidad, dispuestos por paquetes de seis en unidades rectangulares selladas, del mismo material, termo-reguladas mediante un sistema de baño María con flujo re-circulante de agua potable. En cada uno de los 18 cilindros se colocaron 60 mejillones adultos con una talla media de  $6.9 \pm 0.5$  cm y un peso seco de carne promedio de  $2.2 \pm 0.4$  g., que fueron previamente fijados en una malla plástica tipo Vexar<sup>®</sup> para facilitar su manejo en grupo (Figura 5).

Durante el proceso de acondicionamiento gonádico, los reproductores se mantuvieron recibiendo flujo abierto de agua de mar filtrada a  $1 \mu\text{m}$  y esterilizada con luz ultravioleta, salinidad de 37 a 38 UPS, aireación constante y flujo continuo de agua y alimento. El suministro de agua y alimento en cada cilindro se reguló por medio de válvulas de paso, asegurando un flujo abierto de al menos 0.5 L/min

(Mazón-Suástegui, 1987) y un recambio total del agua en un tiempo no menor a 90 min, para asegurar el consumo de 60 a 80 % del alimento proporcionado (Helm *et al.*, 2006). Diariamente se drenaron las heces de los reproductores acumuladas en el fondo de los cilindros experimentales, mediante un sifón hecho con manguera flexible, procurando no reducir el nivel del agua más del 60% para evitar cambios bruscos en la temperatura y posibles desoves al reiniciar el flujo de agua y alimento (Mazón-Suástegui, 2005).



**Figura 5.** Unidad experimental termo-regulada de fibra de vidrio, utilizada para el acondicionamiento gonádico de reproductores de mejillón *M. capax* en laboratorio.

Se sometió a los organismos a tres tratamientos combinados de dieta/temperatura, cada uno con dos réplicas y cada réplica con 60 reproductores. Se evaluaron tres tipos de alimento, uno, constituido 100% por las microalgas cultivadas *I. galbana* (*T. lutea* según Bendif *et al.*, 2013) y *C. calcitrans* en proporción 1:1 y dos complementos artificiales constituidos por cereales con alto contenido de carbohidratos (harina de trigo, Espuma de Chapala<sup>®</sup> y fécula de maíz, Maizena<sup>®</sup>). La dieta 100% microalgal se denominó Micro-100 y sus combinaciones con Harina de Trigo y Fécula de Maíz se denominaron respectivamente Micro-Trigo y Micro-Maíz. Estas tres dietas (Micro-100, Micro-Trigo y Micro-Maíz) se combinaron cada una con tres temperaturas diferentes de

acondicionamiento: 22°C, 24°C y 26°C para obtener en total nueve tratamientos Dieta/Temperatura (Tabla I) más un referente que fueron los organismos de campo.

**Tabla I.** Condiciones experimentales aplicadas para el acondicionamiento gonádico de reproductores de *M. capax* bajo diferentes condiciones de temperatura y alimentación.

Tratamiento	Dieta (Natural/Artificial)	Temperatura (°C)	Ración diaria de Alimento (en % de peso seco)	Organismos (N)
Micro-100 22°C	Microalgas 100%	22	4	120
Micro-Maíz 22°C	Microalgas/Maizena	22	4/3.5	120
Micro-Trigo 22°C	Microalgas/H. Trigo	22	4/3.5	120
Micro-100 24°C	Microalgas 100%	24	4	120
Micro-Maíz 24°C	Microalgas/Maizena	24	4/3.5	120
Micro-Trigo 24°C	Microalgas/H. Trigo	24	4/3.5	120
Micro-100 26°C	Microalgas 100%	26	4	120
Micro-Maíz 26°C	Microalgas/Maizena	26	4/3.5	120
Micro-Trigo 26°C	Microalgas/H. Trigo	26	4/3.5	120

### 6.3. Composición proximal de las dietas naturales y artificiales utilizadas

La composición proximal de ambos tipos de alimento utilizados en la presente investigación se presenta en la tabla II.

**Tabla II.** Composición bioquímica del alimento proporcionado.

	% Carbohidratos	%Proteínas	%Lípidos	Referencia
<i>I. galbana</i> ( <i>T. lutea</i> )	12.3	32.1	22.6	Mazón-Suástegui <i>et al.</i> (2008)
<i>C. calcitrans</i>	6.9	25.6	34.3	Mazón-Suástegui <i>et al.</i> (2008)
Maizena®	94	0	0	Etiqueta del Producto
Espuma de Chapala®	65-70	8-13	.8-1.5	Etiqueta del Producto

#### **6.4. Estimación de la ración alimenticia**

Para determinar la ración alimenticia de los reproductores, se estimó el peso seco promedio de carne, a partir del análisis de dieciocho de ellos escogidos de manera aleatoria. La masa visceral de cada mejillón fue extraída mediante desconche y disección, y secada en una mufla a 75°C durante 48 h, y a partir de estos datos individuales se calculó el peso seco promedio. La ración de alimento natural (*T. lutea* y *C. calcitrans*), correspondió al 4% del peso seco promedio/organismo/día, de acuerdo con Mazón-Suástegui (1987).

La ración alimenticia diaria se determinó empleando la siguiente formula:

$$\text{Ración diaria de alimento} = \frac{\% \text{ de alimento a suministrar} * \text{peso seco medio de la carne (gr.)}}{100} \dots (1)$$

La ración diaria de alimento para las dietas artificiales complementarias Fécula de maíz Maizena® y Harina de trigo Espuma de Chapala®, fue calculada de la misma manera que para la dieta natural (microalgas), pero en este caso se suministró a razón del 3.5% del peso seco/organismo/día. Esta cantidad resultó equivalente al 0.13% del peso total en vivo/organismo/día. Se optó por suministrar esta cantidad de alimento, ya que la literatura sugiere el 0.12% del peso vivo para maduración del mejillón *M. capax* (Mazón-Suástegui, 1988) y para *A. ventricosus* (Mazón-Suástegui, 2005).

#### **6.5. Cultivo de microalgas y preparación de dietas artificiales**

Para el cultivo de microalgas se contó con el apoyo del Laboratorio en Producción de Alimento Vivo del CIBNOR. Se utilizaron en promedio 650 L diarios

del flagelado *T. lutea* (2,273,904 cel/ml) y 650 L diarios de la diatomea *C. calcitrans* (1,431,047 cel/ml).

Las dietas complementarias artificiales fueron preparadas siguiendo el método empleado por Mazón-Suástegui (2005). Brevemente, el material fue disuelto en agua potable fría y agregado en agua dulce a temperatura de ebullición, dejando cocinar durante 5 min y agitando para evitar sedimentación. Una vez terminado el paso anterior, la suspensión resultante se diluyó en agua de mar fría, en un tanque de fibra de vidrio con capacidad de 1500 L interconectado a un tanque de la misma capacidad, con una mezcla de microalgas y agua de mar filtrada.

#### **6.6. Muestreo de organismos en laboratorio y campo**

Se realizaron tres muestreos: inicial (día 0), intermedio (día 60) y final (día 120). Al inicio del muestreo se determinó la longitud y el peso de los organismos para asegurar una homogeneidad entre tratamientos. Se realizó una única evaluación inicial de tallas y peso húmedo total de los organismos, con el fin de homogenizar el tamaño y peso de los organismos contenidos en los diferentes tratamientos aplicados. En cada muestreo se evaluó el índice de condición (IC) de 15 organismos, se fijaron 28 organismos con solución Davidson para los análisis de histología y se ultracongelaron ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) 14 organismos para los análisis bioquímicos. En el caso de campo se midió el IC de 15 organismos, se recolectaron 30 organismos para análisis histológicos y 15 organismos para análisis bioquímicos (Tabla III).

El IC se determinó para evaluar la condición general de los organismos. Por medio del análisis histológico de las muestras de gónada se evaluó el área de cobertura gonádica, diámetro teórico de los ovocitos y estadio de desarrollo prevaleciente (ver sección 6.9). Mediante análisis histoquímico de gónada se

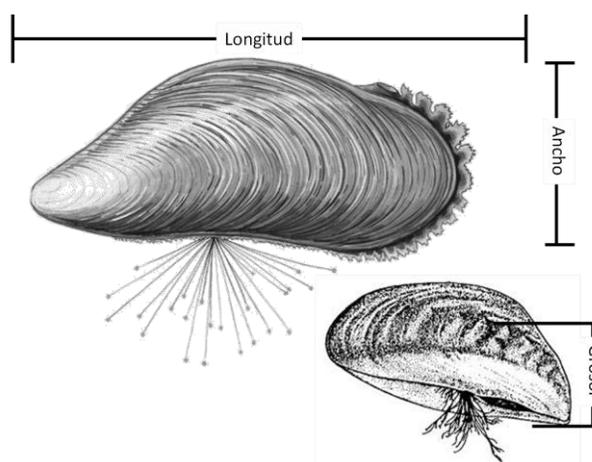
evaluó el índice lípidico y glucídico de tejido gonádico y de ovocitos. Para llevar a cabo el análisis bioquímico se extrajo tejido de manto, glándula digestiva, gónada y músculo, para realizar una determinación bioquímica general de carbohidratos, lípidos y proteínas.

**Tabla III.** Cantidad de organismos muestreados en relación al análisis llevado a cabo (Histológico, Bioquímico, IC) en campo y en laboratorio.

Muestreo	Campo			Laboratorio (Muestras por tratamiento)		
	Histología (Org.)	Bioquímica (Org.)	IC	Histología (Org.)	Bioquímica (Org.)	IC
Inicial	30	15	15	28	14	15
Intermedio	30	15	15	28	14	15
Final	30	15	15	28	14	15

### 6.7. Biometría

Se realizó una biometría inicial de los organismos, evaluando peso húmedo total, longitud, ancho y grosor, con el fin de homogenizar tallas y pesos de los organismos en los diferentes tratamientos dieta-temperatura aplicados en la presente investigación (Figura 6).



**Figura 6.** Medidas tomadas para realizar biometría inicial del mejillón *M. capax* (imágenes obtenidas de Google™ image).

### **6.8. Índice de condición**

Se evaluó el IC por ser considerado un parámetro clave y fácil de emplear, para evaluar el proceso reproductivo de los moluscos bivalvos (Matias *et al.*, 2009; Fonseca-Rodríguez *et al.*, 2011). El primer paso que se llevó a cabo fue la disección de los organismos y se extrajo el tejido en su totalidad. El tejido y la concha se pesaron por separado y se obtuvo el IC por medio de la fórmula empleada por Gabbott & Walker (1971):

$$IC \% = \left( \frac{\text{peso húmedo de la masa visceral (g)}}{\text{peso húmedo de la masa visceral (g)} + \text{peso húmedo de la concha (g)}} \right) * 100 \dots \dots \dots (2)$$

### **6.9. Análisis Histológico**

Estos trabajos se realizaron en el Laboratorio de Histología e Histoquímica del CIBNOR tanto en organismos de campo como en laboratorio. Se realizó una disección para separar la gónada del resto del cuerpo blando de cada uno de los organismos muestreados y se fijó en solución Davidson, al igual que otros tejidos de interés. Cada sección se colocó en casetes de plástico, para posteriormente deshidratar el tejido, pasando por una serie de alcoholes de menor a mayor concentración. Se empleó xileno para aclarar las secciones de gónada y por último se realizó una inclusión en parafina.

Una vez que se obtuvieron los tejidos en parafina, se realizaron cortes en secciones de 4 µm de espesor con ayuda de un micrótopo (Leica RM2155). Los cortes de parafina se pasaron a laminillas y se tiñeron con hematoxilina-eosina, siguiendo el principio del método descrito por Humanson (1962). Para el análisis de laminillas teñidas, se empleó un microscopio óptico compuesto (Olympus-BX-

50) y se digitalizaron secciones de la gónada a diferentes aumentos (4X, 10X y 20X según lo requirió el método), por medio de una cámara digital empotrada en el microscopio, para su posterior análisis en computadora con ayuda del programa Image Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics, E.U.A.). Se llevó a cabo el análisis e interpretación de imágenes de la gónada tomando como referencia la información de características citológicas que se presenta en las tablas IV y V. Con base a ello, se determinó el grado de desarrollo gonádico en cada organismo muestreado.

**Tabla IV.** Descripción de estadios empleados para clasificar el desarrollo gonádico de hembras.

<b>Estadio de desarrollo</b>	<b>Tinción Hematoxilina-Eosina 10X-20X</b>	<b>Referencias</b>
<b>Estadio 0 Indiferenciado</b>	Sin presencia de folículos o estos apenas comienzan a formarse. En este estadio no es posible distinguir entre hembras y machos.	Equivalente al estadio 0 (Rodríguez-Jaramillo <i>et al.</i> , 2008); Etapa 0 (Bückle-Ramírez & Garza-Aguirre, 1989).
<b>Estadio I Previtelogénesis</b>	El tejido conectivo es abundante y rodea los acinos. Los acinos presentan oogonias y presencia de ovocitos previtelogénicos. Cuando se trata de una recuperación pueden existir ovocitos residuales.	Equivalente a estadio I (Rodríguez-Jaramillo <i>et al.</i> , 2008); Etapa C1 y D1/C (Bückle-Ramírez & Garza-Aguirre, 1989).
<b>Estadio II Vitelogénesis</b>	Los acinos aumentan su tamaño y presentan ovocitos vitelogénicos pedunculados que se encuentran conectados a las paredes del acino. Pueden observarse ovocitos previtelogénicos y postvitelogénicos.	Equivalente a estadio II (Rodríguez-Jaramillo <i>et al.</i> , 2008); Etapa C2, C3 (Bückle-Ramírez & Garza-Aguirre, 1989).
<b>Estadio III Postvitelogénesis</b>	Los ovocitos presentan una mayor cantidad de ovocitos postvitelogénicos y no se encuentran pegados a las paredes del acino. Se pueden observar algunos ovocitos vitelogénicos y previtelogénicos pegados a la pared del acino. Existe una reducción considerable del tejido conectivo.	Equivalente a estadio III (Rodríguez-Jaramillo <i>et al.</i> , 2008); Etapa C4 y C5 (Bückle-Ramírez & Garza-Aguirre, 1989).
<b>Estadio IV Desove parcial</b>	Se observan espacios vacíos dentro de los acinos dejados por los ovocitos desovados. Se pueden observar Ovocitos previtelogenico y vitelogenicos pegados a las paredes del acino. Se pueden observar cilios en el epitelio de los gonoductos y ovocitos residuales.	Equivalente a estadio IV (Rodríguez-Jaramillo <i>et al.</i> , 2008); Etapa D2, D3, D4, C4/D y C3/D (Bückle-Ramírez & Garza-Aguirre, 1989).
<b>Estadio V Postdesove</b>	Acinos vacíos con presencia de escasos ovocitos residuales. Hemocitos abundantes. Proceso citolítico de ovocitos.	Equivalente a Etapa D1 (Bückle-Ramírez & Garza-Aguirre, 1989).

**Tabla V.** Descripción de estadios empleados para clasificar el desarrollo gonádico de machos.

<b>Estadio de desarrollo</b>	<b>Tinción Hematoxilina-Eosina 10X-20X</b>	<b>Referencias</b>
<b>Estadio 0 Indiferenciado</b>	Sin presencia de folículos o estos apenas comienzan a formarse. En este estadio no es posible distinguir entre hembras y machos.	Equivalente al estadio 0 (Rodríguez-Jaramillo <i>et al.</i> , 2008); Etapa 0 (Bückle-Ramírez & Garza-Aguirre, 1989).
<b>Estadio I Espermatogénesis temprana</b>	Espermatogonias unidas a las paredes del folículo. Tejido conectivo abundante. Presencia de espermatoцитos.	Equivalente a estadio I (Rodríguez-Jaramillo <i>et al.</i> , 2008); Etapa C1 (Bückle-Ramírez & Garza-Aguirre, 1989).
<b>Estadio II Espermatogénesis avanzada</b>	Folículos se encuentran llenos con células sexuales, incluyendo espermatozoos. El tejido vesicular se reduce.	<i>Equivalente a estadio II</i> (Rodríguez-Jaramillo <i>et al.</i> , 2008); <i>Etapa C2, C3</i> (Bückle-Ramírez & Garza-Aguirre, 1989).
<b>Estadio III Madurez</b>	Los folículos son grandes y se encuentran llenos de espermatozoos con las caudas orientadas hacia el lumen. Se pueden observar espermatoцитos. Se observa escaso tejido conectivo entre folículos.	<i>Equivalente a estadio III</i> (Rodríguez-Jaramillo <i>et al.</i> , 2008); <i>Etapa C4 y C5</i> (Bückle-Ramírez & Garza-Aguirre, 1989).
<b>Estadio IV Desove parcial</b>	Los folículos llenos de espermatozoos presentan liberación de esperma hacia el gonoducto. Se pueden observar espermatozoos residuales en folículos vacíos. Se pierde arreglo radial de los espermatozoos.	<i>Equivalente a estadio IV</i> (Rodríguez-Jaramillo <i>et al.</i> , 2008); <i>Etapa D2, D3, D4, C4/D y C3/D</i> (Bückle-Ramírez & Garza-Aguirre, 1989).
<b>Estadio V Postdesove</b>	Acinos vacíos con presencia de escasos espermatozoos residuales. Hemocitos abundantes. Proceso citolítico de gametos formando matrices de color amarillo o café.	Equivalente a Etapa D1 (Bückle-Ramírez & Garza-Aguirre, 1989).

Además de la interpretación basada en imagenología, se determinó el área de cobertura gonádica y el diámetro teórico de los ovocitos.

Para la medición del área de cobertura de la gónada, tanto en hembras como en machos, se empleó el procedimiento descrito por Rodríguez-Jaramillo (2008), analizando tres imágenes fotográficas a 4X con el mismo programa Image Pro, seleccionando con el cursor el área ocupada por el tejido gonádico, y calculando el área de cobertura gonádica (ACG) por medio de la siguiente fórmula:

$$ACG \% = \frac{\text{área que ocupa la gónada}}{\text{área total}} * 100 \dots \dots \dots (3)$$

Para la medición del diámetro teórico del ovocito se utilizaron tres imágenes fotográficas a 20X por muestra. De cada imagen se seleccionaron 30 ovocitos con nucleoplasma bien definido y con el cursor se delimitó el perímetro de cada uno de ellos. El software Image Pro Plus 6.0 calculó automáticamente el área de cada ovocito y se determinó el diámetro teórico (DT) de acuerdo con la siguiente fórmula propuesta por Saout *et al.* (1999):

$$DT (\mu m) = \sqrt{4A/\pi} \dots \dots \dots (4)$$

donde:

A= área,  $\pi = 3.1416$ .

### 6.10. Análisis Histoquímico

Para llevar a cabo el análisis histoquímico de los organismos en campo y laboratorio, se empleó la misma metodología que se siguió para obtener las laminillas en el análisis histológico, modificando en este caso las técnicas de tinción de tejidos: Sudan para determinar lípidos y Azul Alciano PAS para la determinación de carbohidratos. El sistema de análisis de imágenes se llevó a cabo con el mismo programa anteriormente mencionado.

Con la información obtenida de este análisis, los índices lipídico (IL) e índices glucídicos (IG) fueron determinados en tejido gonádico de hembras exclusivamente. Para ello se empleó la metodología de Rodríguez-Jaramillo (2004), analizando tres imágenes digitales a 20X, por tinción. Mediante el programa Image Pro se seleccionó en cada imagen, el área ocupada por tonalidades negro y azul oscuro, correspondientes a lípidos (triglicéridos), calculando el índice lipídico (IL) del tejido gonádico de hembras mediante la siguiente fórmula:

$$IL \% = \frac{\text{área que ocupan los lípidos}}{\text{área total}} * 100 \dots (5)$$

Para el cálculo del IG en tejido gonádico de hembras, se seleccionó el área ocupada por píxeles de un tono magenta, correspondiente a carbohidratos de reserva, y se aplicó la siguiente fórmula:

$$IG \% = \frac{\text{área que ocupan los carbohidratos}}{\text{área total}} * 100 \dots (6)$$

Para la obtención del índice lipídico de los ovocitos ( $IL_o$ ) se empleó la metodología de Rodríguez-Jaramillo (2004), analizando tres imágenes digitales a 20X, previamente teñidas con Sudan. De cada imagen se seleccionaron 30 ovocitos con nucleoplasma bien definido y se determinó el porcentaje de área que los carbohidratos abarcaban en el ovocito empleando la siguiente fórmula:

$$ILO \% = \frac{\text{área que ocupan lípidos en el ovocito}}{\text{área del ovocito}} * 100 \dots (7)$$

Para la obtención del índice glucídico de los ovocitos ( $IG_o$ ) se empleó la siguiente fórmula:

$$IGo \% = \frac{\text{área que ocupan los carbohidratos en el ovocito}}{\text{área del ovocito}} * 100 \dots (8)$$

### **6.11. Análisis bioquímico proximal**

Para el análisis bioquímico se tomaron muestras de glándula digestiva, manto, músculo y gónada en organismos de campo y laboratorio, con el fin de evaluar la composición de lípidos, carbohidratos y proteínas. Estos tejidos fueron almacenados en ultra congelación ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) para posteriormente ser pesados, liofilizados, rehidratados y homogenizados en agua destilada, para la obtención de extractos que fueron analizados mediante metodologías específicas en el laboratorio de Bioquímica Fisiológica del CIBNOR.

### **6.11.1. Proteínas**

Para el análisis de proteínas totales se utilizó el protocolo establecido del ácido bicinónico (BCA) establecido por el laboratorio de Bioquímica Fisiológica del CIBNOR siguiendo el método de Smith *et al.* (1985). Se tomó una muestra de 10  $\mu$ l del homogenizado y se le añadió 500  $\mu$ l de hidróxido de sodio para llevar a cabo la digestión de proteínas, dejando reposar durante 2 horas. Enseguida, las muestras se sembraron en micro placa y se les agregó 200  $\mu$ L del reactivo BCA, dejando incubar durante 15 minutos a 60°C para lograr una tinción de un color morado y proceder a su lectura en un espectrofotómetro (Thermo Scientific, Multiskan Spectrum) a 562 nanómetros. Como curva de calibración se utilizó un estándar de albumina de bovino.

### **6.11.2. Lípidos**

Para determinar la cantidad de lípidos totales se utilizó el método de sulfofosfo vainillina, siguiendo el método de Barnes & Blackstock (1973). Se tomaron 25  $\mu$ L del homogenizado, se agregaron 250 $\mu$ L de ácido sulfúrico concentrado, dejando reposar por 10 minutos en baño maría a 90°C. Enseguida se procedió a enfriar en baño de hielo para sembrar 20 $\mu$ L de la alícuota en una microplaca y se adicionaron 200 $\mu$ L de vainillina. Las muestras fueron incubadas durante 40 minutos y se procedió a leer a una absorbancia de 540 nanómetros.

### **6.11.3. Carbohidratos**

Para determinar la concentración de carbohidratos presente en los tejidos se empleó el método basado de Roe *et al.* (1961).

Se tomó una alícuota de 100  $\mu$ L del homogenizado de la muestra, adicionando 100  $\mu$ L de ácido tricloroacético para después centrifugar (Eppendor 5810 R, NY-USA) a 3600 rpm durante 10 minutos a 5°C. Enseguida se tomó una

alícuota de 25  $\mu\text{L}$  del sobrenadante para la determinación carbohidratos. Al sobrenadante se adicionaron 250  $\mu\text{L}$  de antrona diluida en ácido sulfúrico al 96% calentando a 85°C durante 10 minutos y las muestras tomaron un color azul. Posteriormente las muestras se pasaron a un baño de hielo para ser enfriados y se recuperaron 200  $\mu\text{L}$  en una microplaca para ser leída a una absorbancia de 630 nanómetros.

### **6.12. Análisis estadístico**

Se realizó la prueba de normalidad y homocedasticidad para los datos de longitud, ancho, grosor y peso húmedo al inicio del experimento para comprobar normalidad (Kolmogorov-Smirnoff) y homogeneidad de varianzas (Levene). Los datos fueron analizados estadísticamente mediante análisis de varianza ANOVA de dos vías para comprobar la existencia de diferencias significativas en valores del IC, índices histológicos, índices histoquímicos y composición bioquímica de los tejidos en función de los diversos tratamientos de dieta y temperatura. Los tratamientos se compararon entre sí en cada tiempo del muestreo, mitad (día 60) y final (día 120). Si los datos presentaron diferencias significativas entre sí, se realizó una prueba *a posteriori* de Tukey con el fin de jerarquizar los grupos de medias entre tratamientos. El análisis estadístico fue realizado con el software STATISTICA 10 (StatSoft, E.U.A). El nivel de significancia de todas las pruebas se fijó a una  $P \leq 0.05$ .

## 7. RESULTADOS

### 7.1. *Biometría inicial*

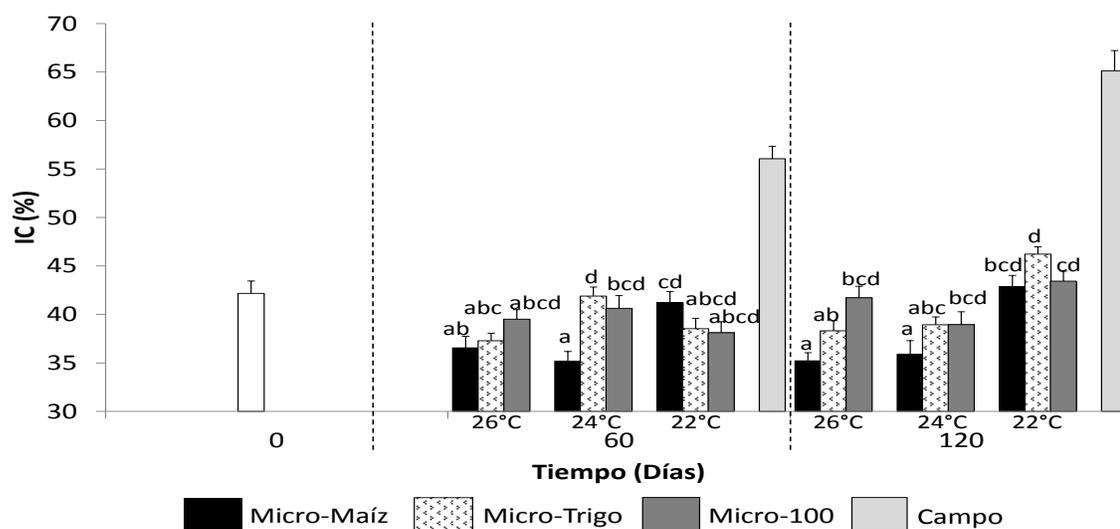
Se realizó una biometría inicial de los reproductores para comprobar normalidad y homocedasticidad en los datos. En base a esto se tomó la decisión del método estadístico a emplear en el análisis de los datos obtenidos durante el experimento. Los resultados se muestran en la tabla VI.

**Tabla VI.** Prueba de normalidad y homocedasticidad de las variables longitud, ancho, grosor y peso húmedo total de reproductores de mejillón *M. capax* al inicio del experimento.

Variable	Media	K-S	Levene
Longitud (cm)	6.97	$p>.20$	$p>.20$
Ancho (cm)	3.60	$p>.20$	$p>.20$
Grosor (cm)	2.85	$p>.20$	$p>.20$
Peso húmedo (g)	41.18	$p>.20$	$p>.20$

### 7.2. *Índice de condición (IC)*

El índice de condición (IC) correspondiente a la población inicialmente recolectada en campo correspondió al 42%. Durante la primera mitad del experimento (60 días) el IC fue significativamente mayor ( $P< 0.05$ ) en el tratamiento Micro-Trigo 24°C (41%) y Micro-100 24°C (40%) comparado con Micro-Maíz 24°C (35.1 %). Al final del experimento (120 días) el IC fue significativamente mayor ( $P<0.05$ ) con Micro-Trigo 22°C (46.2%), que con Micro-Maíz 26°C y 24°C (35.2 y 35.9%, respectivamente). En Campo, el IC se incrementó significativamente ( $P<0.05$ ) de 42% a 56% durante la primera mitad del experimento (60 días) y al 65% al finalizar el experimento (120 días) (Figura 7).



**Figura 7.** Variaciones en el índice de condición (IC) promedio de reproductores de *M. capax* sometidos en laboratorio a diferentes tratamientos combinados de temperatura y dieta durante 120 días. Las barras muestran la media  $\pm$  error estándar. Las letras distintas muestran diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA  $P < 0.05$ ).

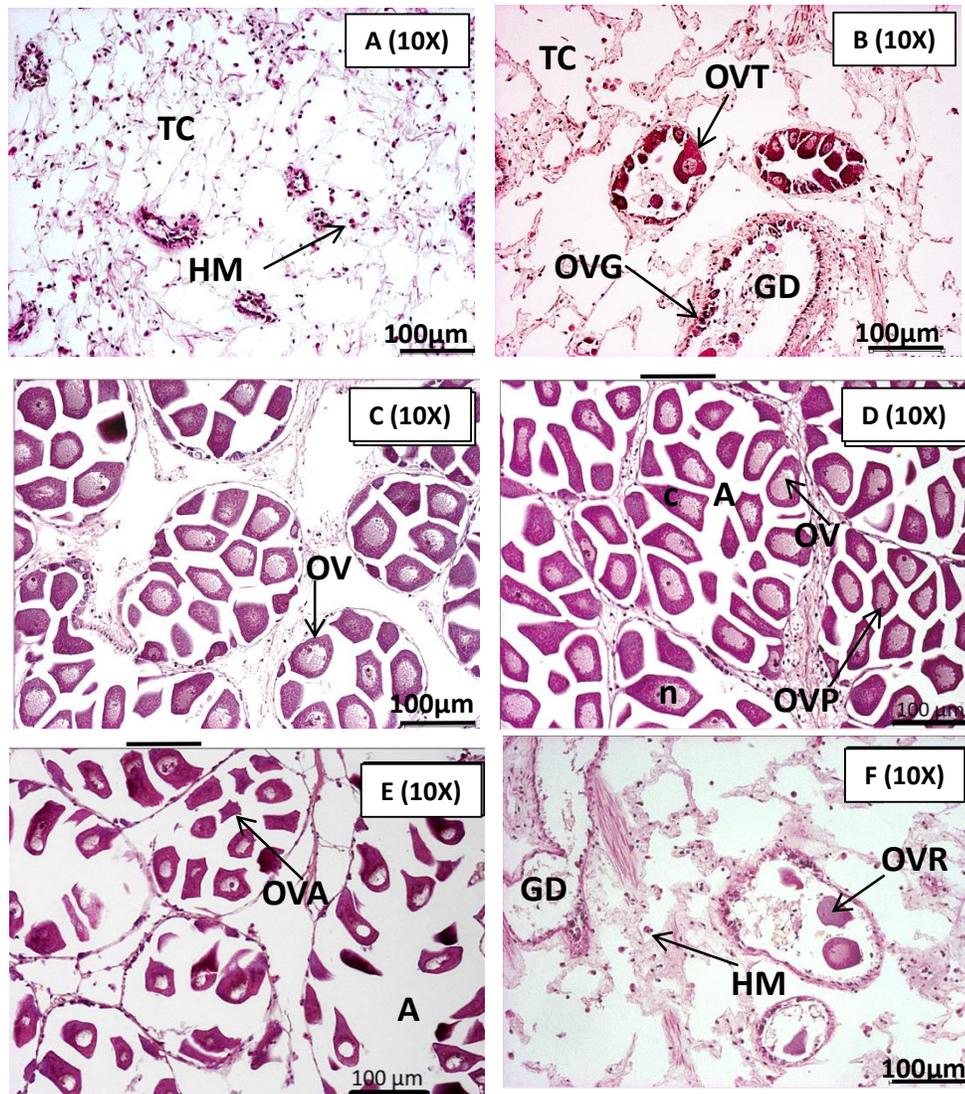
### 7.3. Análisis Histológico

#### 7.3.1. Estadios de desarrollo

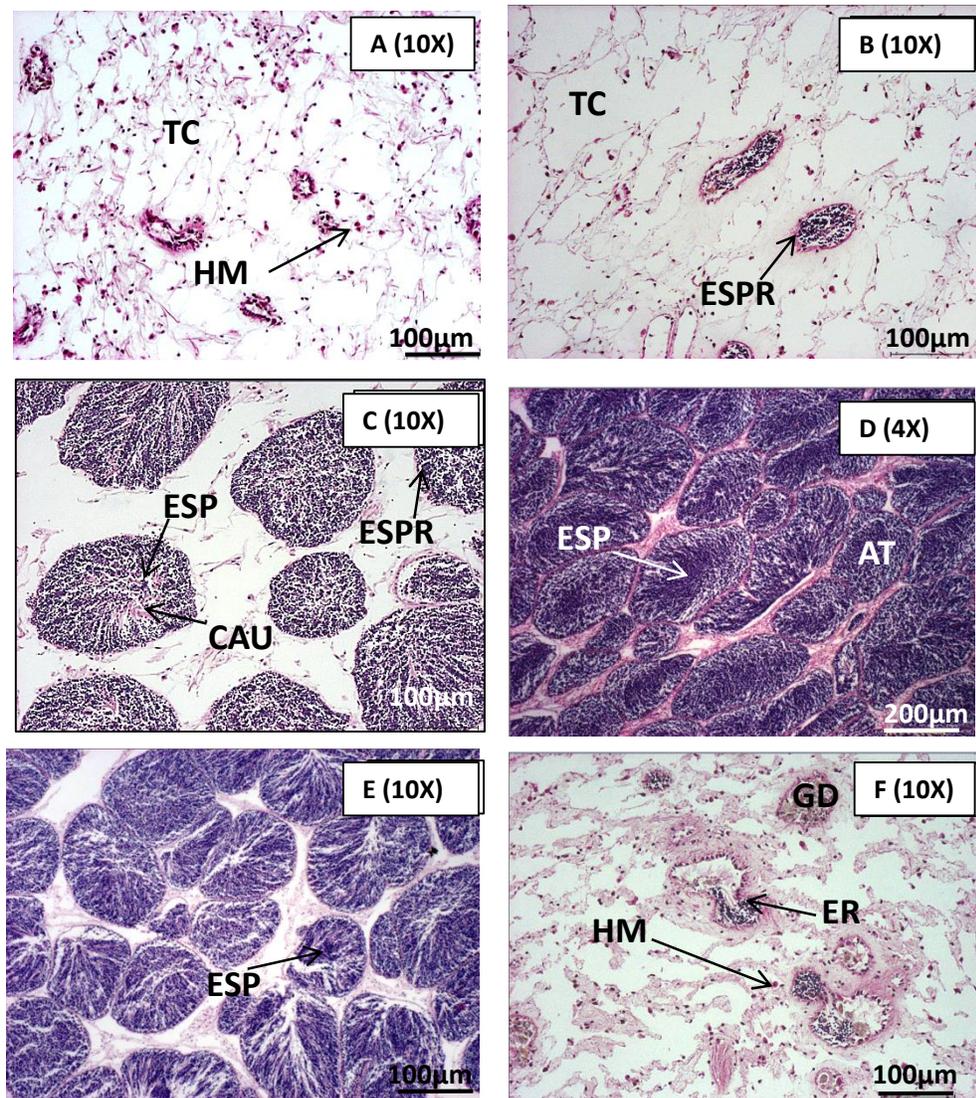
Los estadios de desarrollo gonádico representativos para cada grupo fueron asignados conforme al estadio dominante. En algunos tratamientos se observó que una mayor frecuencia de organismos en estadio indiferenciado se acompañó con la presencia de organismos con indicios de un re-inicio en el proceso de gametogénesis y presencia de organismos en postdesove. En otros tratamientos el estadio dominante correspondió a vitelogénesis o espermatogénesis avanzada (hembras y machos, respectivamente) con remanentes de desove parcial (Figuras 8 y 9).

Al inicio del experimento el desarrollo gonádico en hembras fue escaso para todos los tratamientos, con una gran cantidad de organismos indiferenciados

(50%), en postdesove (16%) y en previtelogénesis (16%) (Figura 10). A mitad del experimento se observó la presencia de organismos indiferenciados en los tratamientos Micro-100 y Micro-Maíz a 26°C (19% y 7%), Micro-Trigo y Micro-100 a 24°C (8% y 6%) y Micro-Maíz y Micro-100 a 22°C (9% y 6%) (Figura 10). El estadio de desove parcial fue dominante en los tratamientos Micro-Maíz (73%) y Micro-Trigo a 26°C (75%) seguido por Micro-Maíz y Micro-Trigo a 24°C (50%, 50%). Independientemente de la temperatura, la mayor proporción de hembras maduras se registró para Micro-100 22°C, 24°C y 26°C (47%, 59%, 31%), seguida por Micro-Trigo 22°C y 24°C (47% y 42%). La menor proporción de hembras maduras se registró con Micro-Maíz a 26°C, 24°C y 22°C (13%, 13%, 9%). El mayor número de organismos en postdesove correspondió a Micro-Maíz 24°C (25%), Micro-100 (13%) y Micro-Maíz 26°C y 22°C (7%, 9%). Con la dieta Micro-Trigo no se detectaron organismos en postdesove, independientemente de la temperatura (Figura 10).



**Figura 8.** Estadios de desarrollo gonádico de hembras de *M. capax* sometidos a diferentes tratamientos combinados de temperatura y dieta durante 120 días. (A). Indiferenciado. (B) Previtelogénesis. (C). Vitelogénesis. (D). Postvitelogénesis (madurez). (E). Desove parcial hembra. (F). Postdesove hembra. OVT. Ovocito vitelogénico temprano. OVG. Ovogonia. TC. Tejido conjuntivo. GD. Gonoducto. HM. Hemocitos. OV. Ovocito vitelogénico. A. Acino. n. Núcleo. c. Citoplasma. OVP. Ovocito postvitelogénico. OVA. Ovocito atrésicos. OVR. Ovocito residual.

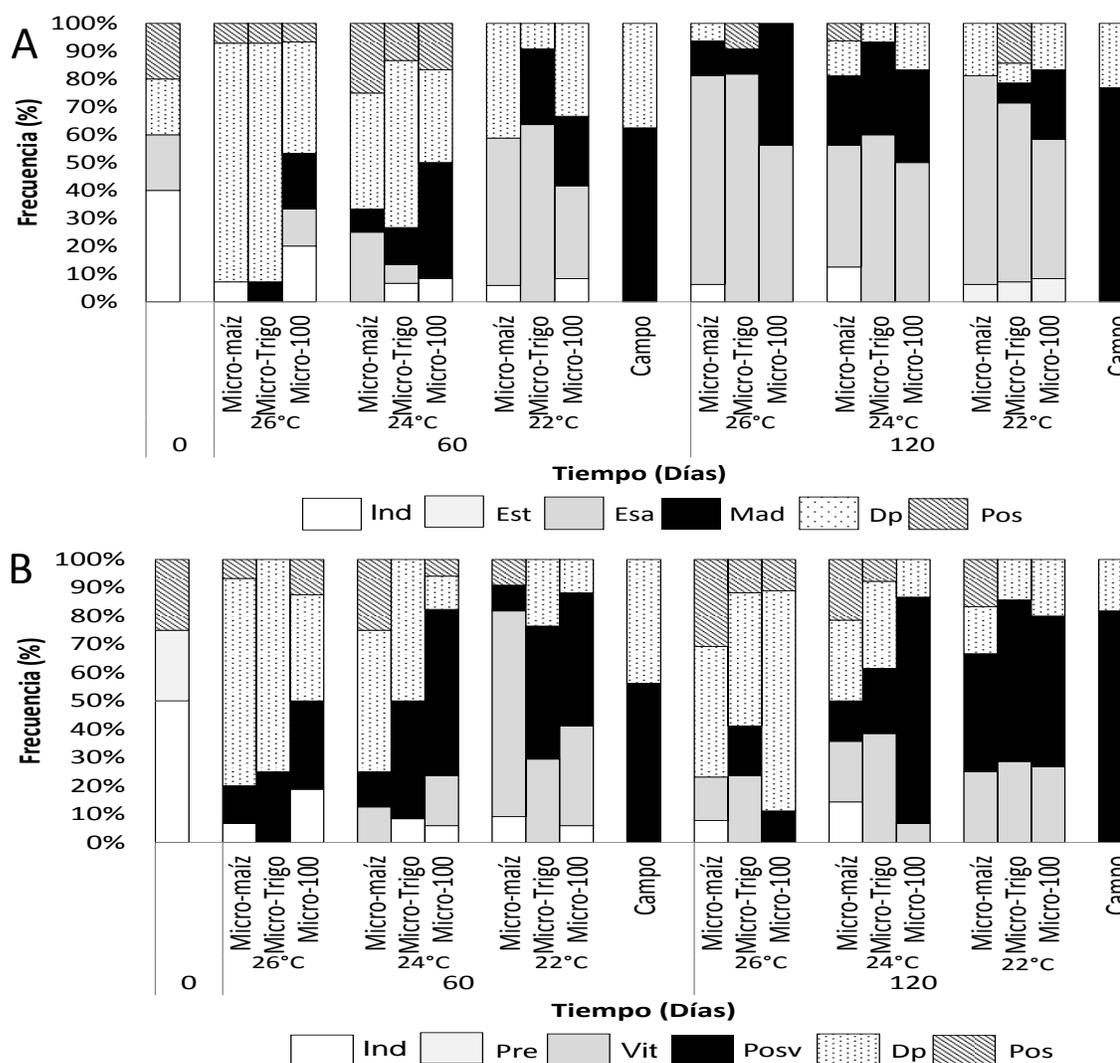


**Figura 9.** Estadios de desarrollo gonádico de machos de *M. capax* sometidos a diferentes tratamientos combinados de temperatura y dieta durante 120 días. (A). Indiferenciado. (B). Espermatogénesis temprana. (C). Espermatogénesis avanzada. (D). Macho en estadio de Madurez. (E). Desove parcial macho. (F). Postdesove macho. TC. Tejido conjuntivo. GD. Gonoducto. HM. Hemocitos. OV. Ovocito vitelogénico. ESPR. Espermátidas. ESP. Espermatozoides. CA. Caudas de espermatozoides. AT. Acino testicular. ER. Espermatozoides residuales.

Al final del experimento (120 días), se observaron organismos indiferenciados para los tratamientos Micro-Maíz 26°C y 24°C (8%, 14%). La mayor proporción de hembras maduras correspondió a Micro-100 24°C (80%), Micro-Maíz, Micro-Trigo y Micro-100 a 22°C (42%, 57% y 53%). Las hembras parcialmente desovadas predominaron en los tratamientos Micro-100, Micro-Trigo y Micro-Maíz a 26°C (78%, 47%, 46%), seguida por Micro-Maíz y Micro-Trigo a 24°C (29%, 31%). En ningún tratamiento se encontraron organismos con reinicio de gametogénesis. Sin embargo la mayor cantidad de organismos en postdesove correspondió a los tratamientos Micro-Maíz 26°C, 24°C y 22°C (31%, 21%, 17%).

En machos, al inicio del experimento, se encontró una mayor cantidad de estadios de desarrollo en comparación a las hembras, con un 40% de organismos indiferenciados y la presencia de los estadios de espermatogénesis avanzada, desove parcial y postdesove (20%).

A mitad del experimento (60 días) se observó una alta frecuencia de organismos desovados en los tratamientos Micro-Maíz y Micro-Trigo a 26°C (86%), a comparación de los tratamientos Micro-Trigo y Micro-100 a 22°C (9%, 33%). El mayor número de machos maduros correspondió a Micro-100 26°C, 24°C y 22°C (20%, 42%, 25%) y a Micro-Trigo 22°C (27%). No se registraron organismos maduros para Micro-Maíz a 26°C y 22°C. La mayor cantidad de organismos en estadios de espermatogénesis avanzada se registró en Micro-Maíz, Micro-Trigo y Micro-100 a 22°C (53%, 64%, 33%) y fueron los únicos tratamientos que no presentaron organismos en postdesove.



**Figura 10.** Variaciones en los estadios de desarrollo gonádico en machos (A) y hembras (B) de reproductores de *M. capax* sometidos a diferentes tratamientos combinados de temperatura y dieta durante 120 días. Ind: Indiferenciado. Est: Espermatogénesis temprana. Esa: Espermatogénesis avanzada. Mad: Madurez. Dp: Desove parcial. Pos: Postdesove Pre: Previtelogénesis. Vit: Vitelogénesis. Posv: Postvitelogénesis (madurez).

Al final del experimento (120 días) solo se observó la presencia de organismos indiferenciados en Micro-Maíz 26°C y 24°C (6%, 13 %). El estadio de espermatogénesis avanzada aumentó en todos los tratamientos, siendo mayor en Micro-Maíz a 26°C y 22°C (75%) y Micro-Trigo (82%) y menor en Micro-100 26°C,

24°C y 22°C (56%, 50%, 50%, respectivamente) y Micro-Maíz 24°C (44%), donde la mayor cantidad de organismos maduros correspondió a Micro-100 a 26°C, 24°C y 22°C (44%, 33%, 25%). Solo se observaron organismos en estadio de postdesove en Micro-Trigo 26°C y 22°C (9%,14%) y Micro-Maíz 24°C (6%). Los únicos tratamientos que presentaron organismos en etapas tempranas de espermatogénesis fueron Micro-Maíz, Micro-Trigo y Micro-100 a 22°C (6%, 7%, 8%) (Figura 10).

En campo, tanto en el caso de hembras como de machos, se observó una mayor cantidad de organismos maduros que en laboratorio, alcanzando su máximo hacia el final del experimento (77% en machos y 82% en hembras).

### **7.3.2. Área de cobertura gonádica (ACG)**

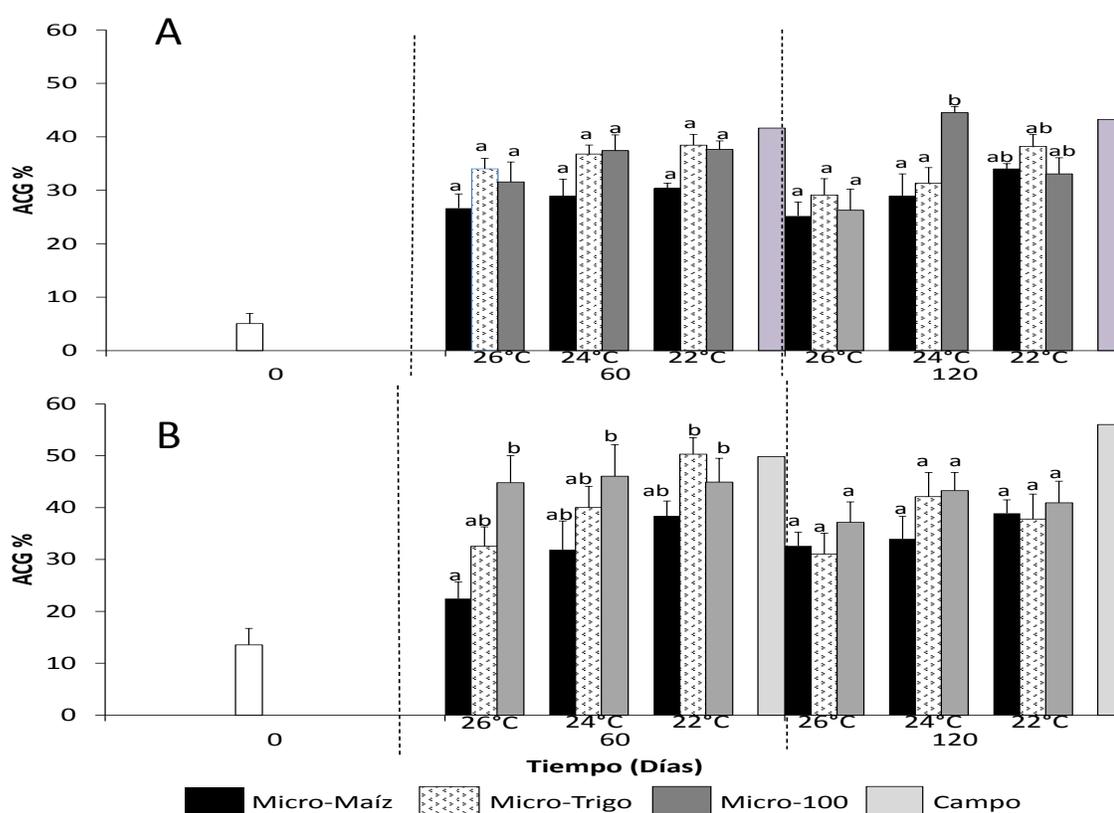
A mitad del experimento, el ACG promedio tendió a aumentar para ambos sexos en todos los tratamientos, con respecto al dato inicial obtenido de organismos de Campo (5% para hembras y 13% para machos). En hembras no se observaron diferencias significativas entre tratamientos ( $P>0.05$ ) a mitad del experimento en la ACG, sin embargo el mayor valor promedio para hembras se observó en Micro-Trigo y Micro-100 a 22°C (38% y 37%).

Al final del experimento, el valor máximo de ACG (44%) se obtuvo con el tratamiento Micro-100 24°C, siendo significativamente mayor ( $P<0.05$ ) que en Micro-Maíz 26°C y 24°C (25%, 28%), Micro-Trigo 26° y 24° (29%, 31%) y Micro-100 26°C (26%). En campo el ACG de hembras fue mayor ( $P<0.05$ ) a la mitad (41%) y al final (43%) del experimento comparado con el inicio (5%).

Para el caso de los machos, a mitad del experimento se registraron diferencias significativas en el ACG entre tratamientos ( $P<0.05$ ). Los mayores

valores correspondieron a Micro-Trigo 22°C (50%) y los menores en Micro-Maíz 26°C (22%) (Figura 11).

Al final del experimento no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ( $P>0.05$ ). Sin embargo, los valores promedio correspondientes a Micro-100 26°C, 24°C y 22°C (37%, 43%, 40%) fueron mayores a los obtenidos con Micro-Maíz 26°C, 24°C y 22°C (32%, 33%, 38%). Al igual que en hembras, el ACG de machos fue menor ( $P<0.05$ ) a la mitad (49%) y al final (56%) del experimento en comparación al inicio (13%) (Figura 11).

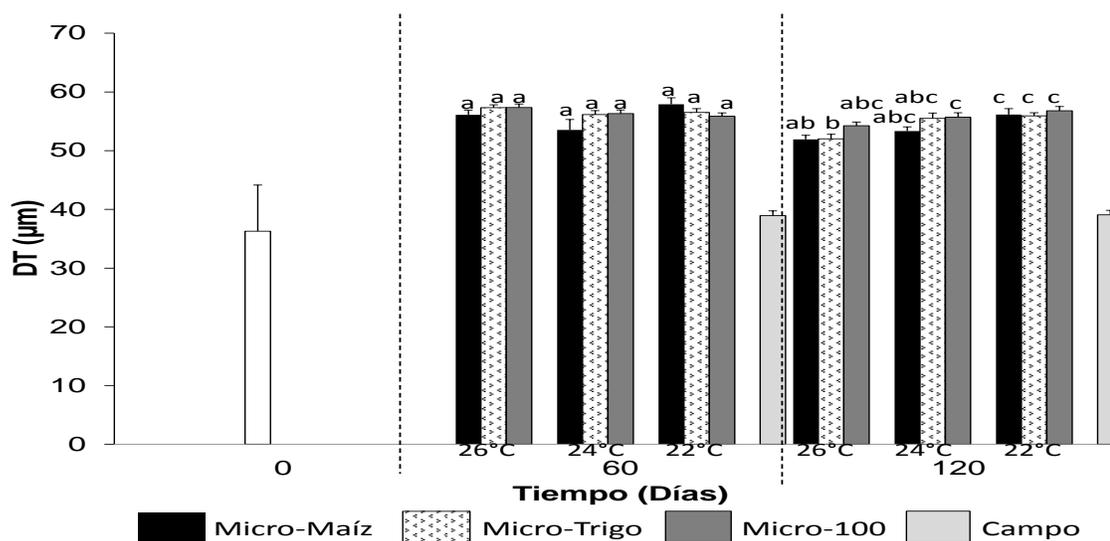


**Figura 11.** Variaciones en el área de cobertura gonádica (ACG) promedio de reproductores hembras (A) y machos (B) de *M. capax* sometidos a diferentes tratamientos combinados de temperatura y dieta durante 120 días. Las barras muestran la media  $\pm$  error estándar. Las letras distintas muestran diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA  $P<0.05$ ).

### 7.3.3. Diámetro teórico de ovocitos

El diámetro teórico de ovocitos (DT) al inicio del experimento (36  $\mu\text{m}$ ) fue el valor promedio más bajo observado durante todo el experimento. A mitad, el DT presentó una tendencia al incremento, sin presentar diferencias significativas entre tratamientos ( $P>0.05$ ). En organismos de campo se observó un diámetro teórico de 39  $\mu\text{m}$ , menor a los valores promedios registrados en laboratorio (Figura 12).

Al final del experimento el valor mayor en el DT de los ovocitos ( $P<0.05$ ) correspondió a los organismos acondicionados en los tratamientos Micro-100 24°C (55  $\mu\text{m}$ ) y Micro-Maíz, Micro-Trigo y Micro-100 a 22°C (55  $\mu\text{m}$ , 56  $\mu\text{m}$  y 56  $\mu\text{m}$ , respectivamente) y el menor valor a Micro-Trigo y Micro-Maíz a 26°C (52  $\mu\text{m}$ , para ambos casos).

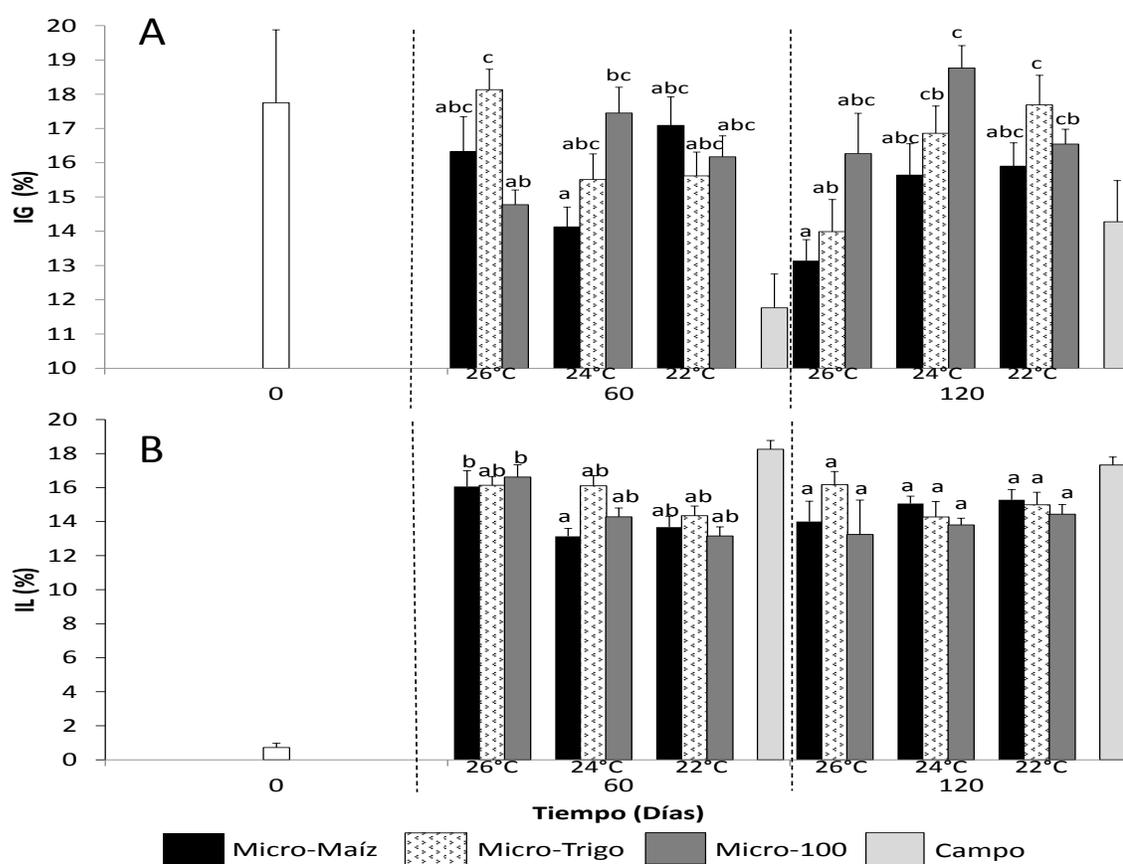


**Figura 12.** Variaciones en el diámetro teórico de ovocitos en reproductores de *M. capax* sometidos a diferentes tratamientos combinados de temperatura y dieta durante 120 días. Las barras muestran la media  $\pm$  error estándar. Las letras distintas muestran diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA  $P<0.05$ ).

## 7.4. Análisis histoquímico

### 7.4.1. Índice lipídico (IL) en tejido gonádico

Al inicio del experimento el porcentaje de lípidos en el tejido gonádico fue muy bajo ( $\approx 1\%$ ). A mitad del experimento (60 días) los organismos de los tratamientos Micro-Trigo 26°C (16%) y Micro-Maíz 26°C (13%) presentaron el IL significativamente mayor ( $P < 0.05$ ), comparado con Micro-100 22°C (13%).



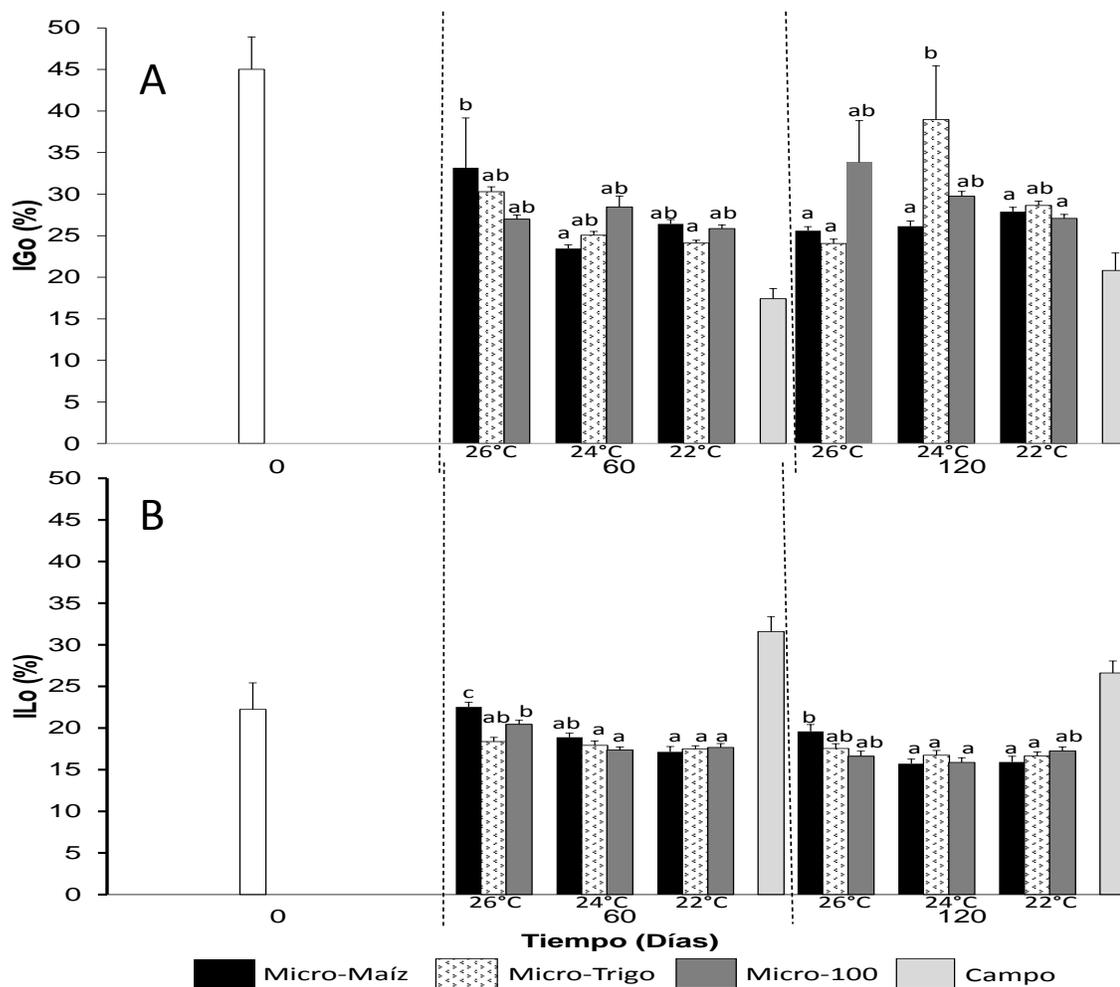
**Figura 13.** Variaciones en el índice glucídico (IG) (A) y lípidico (IL) promedio (B) en tejido gonádico de reproductores hembra de *M. capax* sometidos a diferentes tratamientos combinados de temperatura y dieta durante 120 días. Las barras muestran la media  $\pm$  error estándar. Las letras distintas muestran diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA  $P < 0.05$ ).

Por otra parte en campo se registró un porcentaje promedio del 18 %. Al final del experimento (120 días) los valores promedio se mantuvieron iguales al tiempo medio (13 al 15 %) y no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos de laboratorio ( $P>0.05$ ). El valor observado en campo al final del experimento correspondió al 17 % (Figura 13).

#### **7.4.2. Índice lipídico en ovocitos ( $IL_o$ )**

El contenido significativamente mayor de lípidos ( $P<0.05$ ) en los ovocitos ( $IL_o$ ) a la mitad y al final del experimento correspondió a Micro-Maíz 26°C ( 22, 19%) y el menor a Micro-Maíz 22°C, Micro-Trigo-22°C y Micro-100 22°C ( 20-16,17-15 y 17-17%, respectivamente) (Figura 14).

En campo, los valores del  $IL_o$  a la mitad (31%) y al final (26%) del experimento fueron mayores ( $P<0.05$ ) al inicial (45%) (Figura 13).



**Figura 14.** Variaciones en el índice glucídico promedio de ovocitos (IG<sub>o</sub>) (A) y en el índice lipídico de ovocitos (IL<sub>o</sub>) (B) de reproductores hembra de *M. capax* sometidos a diferentes tratamientos combinados de temperatura y dieta durante 120 días. Las barras muestran la media  $\pm$  error estándar. Las letras distintas muestran diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA  $P < 0.05$ ).

### 7.4.3. Índice glucídico (IG) en tejido gonádico

Al inicio del experimento, se registró un valor promedio del 17% en el IG en gónada de hembras. A mitad del experimento se observaron valores por arriba y por abajo del IG inicial. El IG significativamente mayor ( $P > 0.05$ ) correspondió a

Micro-Trigo 26°C (18%) y el menor a Micro-Maíz 24°C y a Micro-100 26°C (14%). Al final del experimento, el IG promedio significativamente mayor ( $P<0.05$ ) correspondió a Micro-100 24°C y el menor a Micro-Maíz y Micro-Trigo 26°C (13%). En campo, se registraron valores de IG del 11% y 14%, a la mitad y al final del experimento respectivamente (Figura 13).

#### **7.4.4. Índice glucídico en ovocitos ( $IG_o$ )**

Con respecto al IG en ovocitos ( $IG_o$ ), a mitad del experimento se registró un contenido mayor de carbohidratos ( $P<0.05$ ) en el tratamiento Micro-Maíz 26°C (33%) con respecto a Micro-Maíz 24°C (23%) y a Micro-Trigo 22°C (24%). Al final del experimento el  $IG_o$  fue significativamente mayor ( $P<0.05$ ) en Micro-Trigo 24°C (38%) con respecto a Micro-Maíz 26°C, 24°C y 22°C (25,26 y 27%), Micro-Trigo 26°C (24%) y Micro-100 22°C (27%) (Figura 14).

En campo, el  $IG_o$  a la mitad del experimento (15%) fue menor ( $P<0.05$ ) al inicial (22%). Al final del experimento el  $IG_o$  (18 %) no presentó diferencias significativas a los valores obtenidos al inicio y a la mitad (45%) (Figura 14).

### **7.5. Análisis Bioquímico**

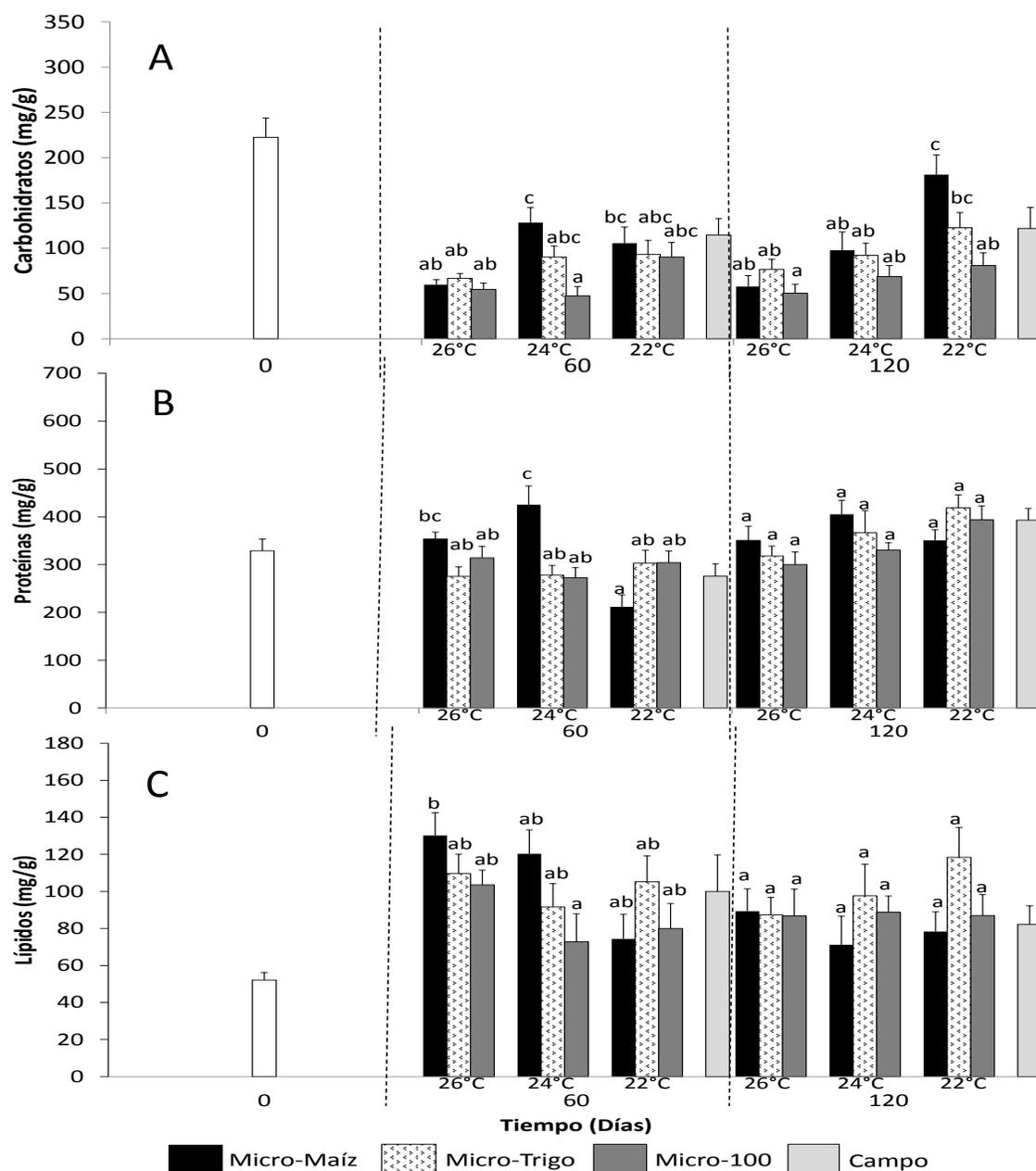
#### **7.5.1. Gónada**

A mitad del experimento (día 60), se observó una tendencia a disminuir la concentración inicial de carbohidratos en gónada ( $222 \text{ mg g}^{-1}$ ) en todos los tratamientos. La concentración significativamente mayor de carbohidratos ( $P<0.05$ ) se observó en los tratamientos Micro-Maíz 24°C y 22°C ( $128 \text{ mg g}^{-1}$ ,  $105 \text{ mg g}^{-1}$ ) y las menores en Micro-100 24°C y 26°C ( $47 \text{ mg g}^{-1}$ ,  $54 \text{ mg g}^{-1}$ ). Al final del experimento (día 120) nuevamente se registró la mayor concentración ( $181 \text{ mg g}^{-1}$ )

<sup>1</sup>) en Micro-Maíz 22°C ( $P<0.05$ ) y las menores (50 mg g<sup>-1</sup> y 68 mg g<sup>-1</sup>, respectivamente) en Micro-100 24°C y 26°C (Figura 15). En campo también se observó un menor contenido de carbohidratos ( $P<0.05$ ) a mitad (114 mg g<sup>-1</sup>) y final (121 mg g<sup>-1</sup>) del experimento en comparación a la concentración inicial de carbohidratos (222 mg g<sup>-1</sup>).

Para el caso de las proteínas, a mitad del experimento se observó una tendencia a incrementar el contenido inicial de proteínas en gónada (329 mg g<sup>-1</sup>) en los tratamientos Micro-Maíz 24°C y 26°C (425 mg g<sup>-1</sup>, 353 mg g<sup>-1</sup>) los cuales presentaron las concentraciones significativamente más altas ( $P<0.05$ ) respecto a Micro-Maíz 22°C (211 mg g<sup>-1</sup>). En campo se registró una concentración de 275 mg g<sup>-1</sup> de proteína. Al final del experimento no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos de laboratorio ( $P>0.05$ ) y en campo se observó una concentración de 393 mg g<sup>-1</sup> (Figura 15).

Por otra parte, la concentración inicial de lípidos en gónada (52 mg g<sup>-1</sup>) presentó una tendencia a incrementar a mitad del experimento. La concentración significativamente mayor ( $P<0.05$ ) se obtuvo con Micro-Maíz 26°C (130 mg g<sup>-1</sup>) y la menor con Micro-100 24°C (72 mg g<sup>-1</sup>). Al final del experimento no se observaron diferencias significativas ( $P>0.05$ ) entre tratamientos (Figura 15). En campo la concentración de lípidos fue mayor a la mitad (99 mg g<sup>-1</sup>) y al final (82 mg g<sup>-1</sup>) del experimento en comparación al inicio (52 mg g<sup>-1</sup>).



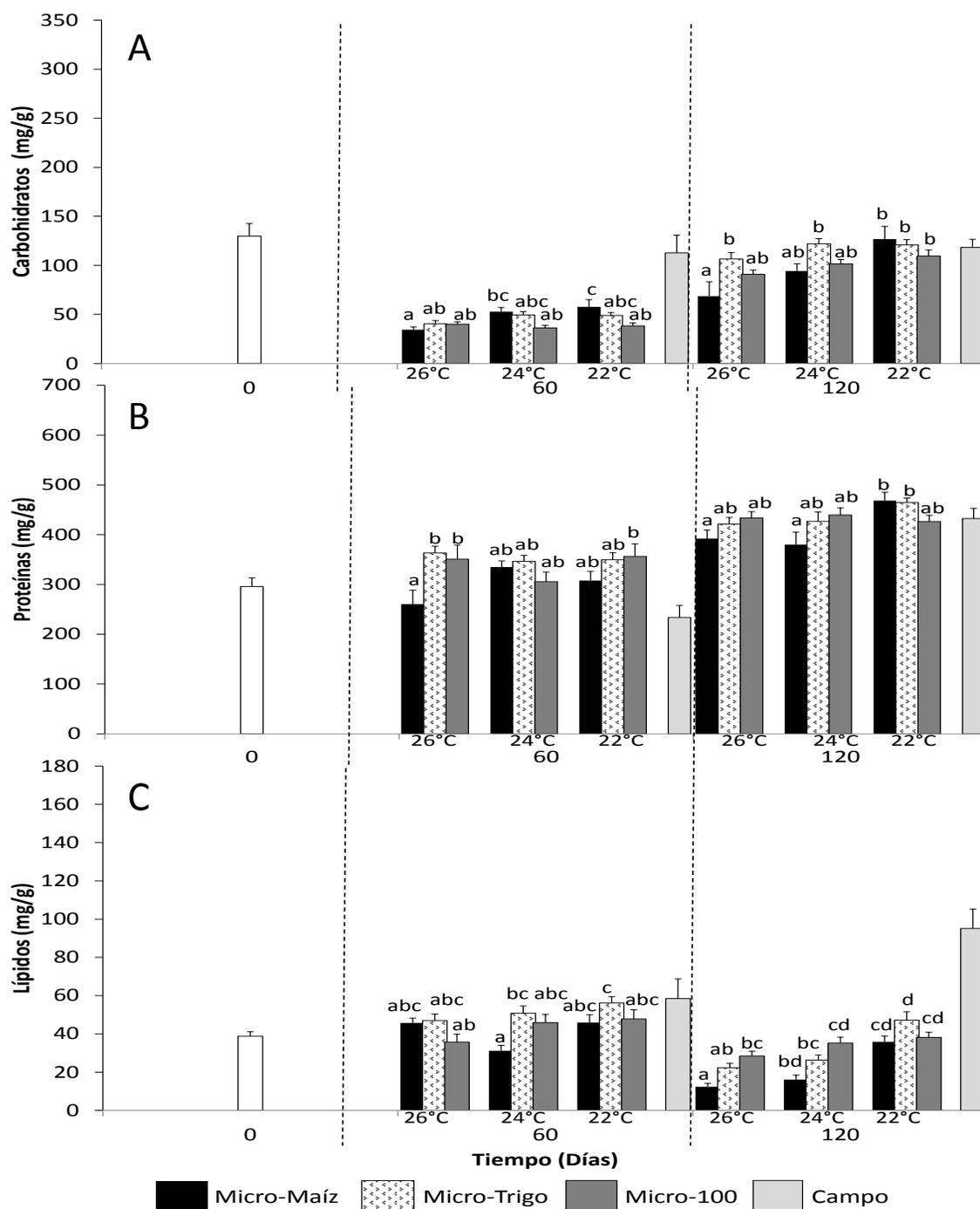
**Figura 15.** Variaciones en el contenido promedio de carbohidratos (A), proteínas (B) y lípidos (C) en gónada de reproductores de *M. capax* sometidos a diferentes tratamientos combinados de temperatura y dieta durante 120 días. Las barras muestran la media  $\pm$  error estándar. Las letras distintas muestran diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA  $P < 0.05$ ).

### **7.5.2. Glándula digestiva**

La concentración inicial de carbohidratos en glándula digestiva ( $129 \text{ mg g}^{-1}$ ) se encontró por encima de los valores observados a mitad del experimento ( $34 \text{ mg g}^{-1}$  a  $57 \text{ mg g}^{-1}$ ). A la mitad se observó la mayor concentración de carbohidratos en el tratamiento Micro-Maíz  $22^{\circ}\text{C}$  ( $57 \text{ mg g}^{-1}$ ), que fue significativamente mayor ( $P < 0.05$ ) a Micro-Maíz  $26^{\circ}\text{C}$  ( $34 \text{ mg g}^{-1}$ ). En campo la concentración de carbohidratos fue de  $112 \text{ mg g}^{-1}$  a mitad del experimento. Al final la concentración significativamente mayor ( $P < 0.05$ ) de carbohidratos correspondió a Micro-Maíz  $22^{\circ}\text{C}$  ( $126 \text{ mg g}^{-1}$ ) y la menor a Micro-Maíz  $26^{\circ}\text{C}$  ( $68 \text{ mg g}^{-1}$ ), encontrado una concentración intermedia de  $118 \text{ mg g}^{-1}$  en campo (Figura 16).

La concentración inicial de proteínas en glándula digestiva ( $295 \text{ mg g}^{-1}$ ) mostró una tendencia general al incremento para la mitad del experimento. La concentración en los tratamientos Micro-Trigo  $26^{\circ}\text{C}$  ( $363 \text{ mg g}^{-1}$ ) y Micro-100  $26^{\circ}\text{C}$  y  $22^{\circ}\text{C}$  ( $356 \text{ mg g}^{-1}$ ,  $350 \text{ mg g}^{-1}$ ) fue significativamente mayor ( $P < 0.05$ ) que la correspondiente a Micro-Maíz  $26^{\circ}\text{C}$  ( $259 \text{ mg g}^{-1}$ ). Al final del experimento se obtuvieron las concentraciones significativamente mayores ( $P < 0.05$ ), con las dietas Micro-Trigo y Micro-Maíz a  $22^{\circ}\text{C}$  ( $468 \text{ mg g}^{-1}$ ,  $464 \text{ mg g}^{-1}$ ), y las menores con Micro-Trigo  $26^{\circ}\text{C}$  y  $24^{\circ}\text{C}$  ( $391 \text{ mg g}^{-1}$ ,  $380 \text{ mg g}^{-1}$ ) (Figura 16).

Al final del experimento, los organismos de campo presentaron una concentración de  $432 \text{ mg g}^{-1}$ , que fue significativamente mayor ( $P < 0.05$ ) a la concentración registrada al inicio ( $295 \text{ mg g}^{-1}$ ) y mitad ( $233 \text{ mg g}^{-1}$ ) del experimento.



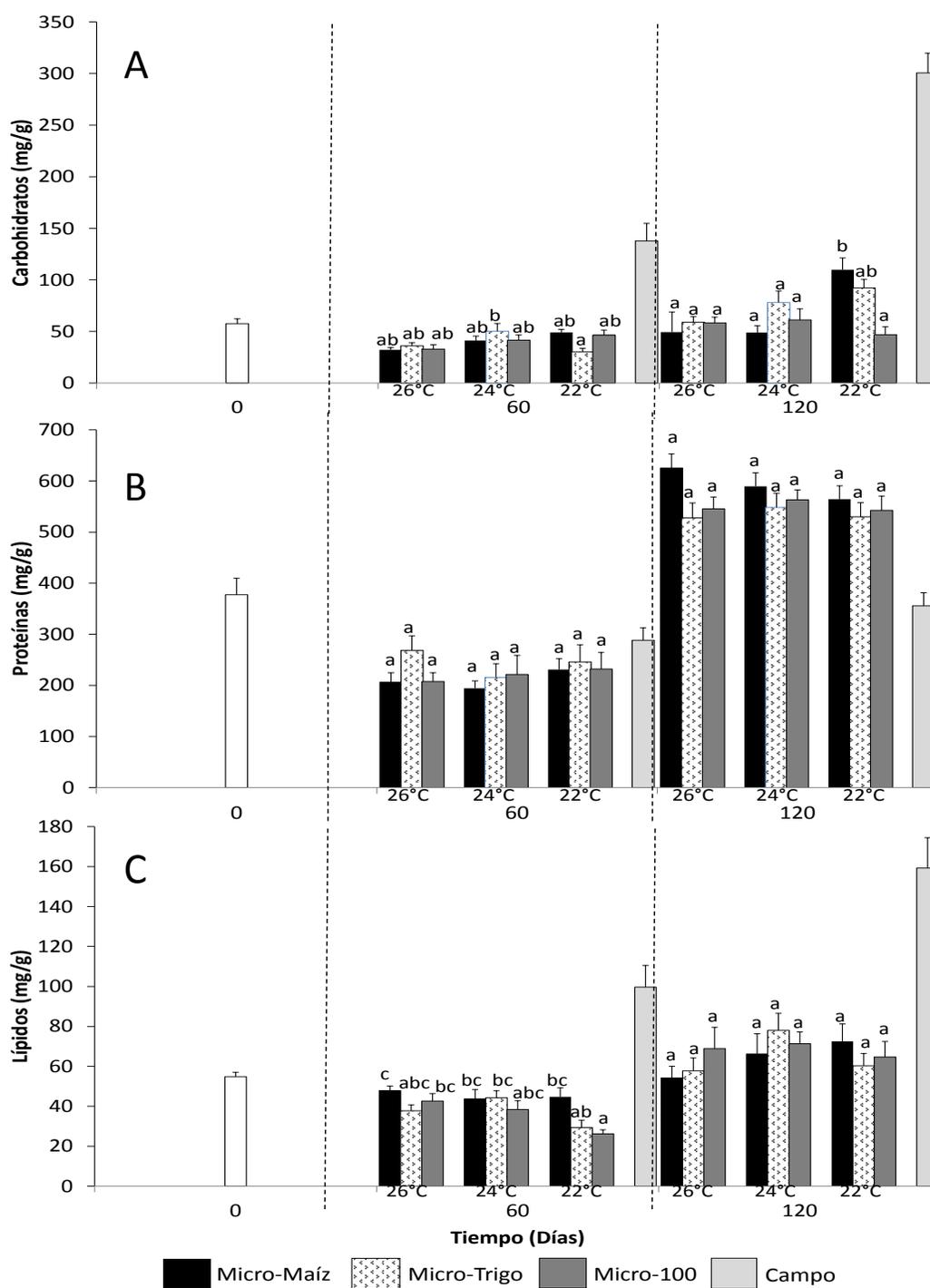
**Figura 16.** Variaciones en el contenido promedio de carbohidratos (A), proteínas (B) y lípidos (C) en glándula digestiva de reproductores de *M. capax* sometidos a diferentes tratamientos combinados de temperatura y dieta durante 120 días. Las barras muestran la media  $\pm$  error estándar. Las letras distintas muestran diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA  $P < 0.05$ ).

La concentración inicial de lípidos en glándula digestiva ( $38 \text{ mg g}^{-1}$ ) presento una tendencia a incrementar a mitad del experimento en los tratamientos Micro-Trigo  $22^{\circ}\text{C}$  y  $24^{\circ}\text{C}$  ( $56 \text{ mg g}^{-1}$ ,  $50 \text{ mg g}^{-1}$ ), los cuales presentaron una mayor concentración ( $P < 0.05$ ) de lípidos en comparación a Micro-Maíz  $24^{\circ}\text{C}$  ( $31 \text{ mg g}^{-1}$ ). Al final del experimento Micro-Trigo, Micro-Maíz y Micro-100 a  $22^{\circ}\text{C}$  ( $47 \text{ mg g}^{-1}$ ,  $35 \text{ mg g}^{-1}$ ,  $38 \text{ mg g}^{-1}$ ) presentaron la mayor concentración de lípidos en comparación con Micro-Maíz  $26^{\circ}\text{C}$  y  $24^{\circ}\text{C}$  ( $12 \text{ mg g}^{-1}$ ,  $16 \text{ mg g}^{-1}$ ) (Figura 16). Como contraparte, en campo la concentración de lípidos aumento significativamente ( $P < 0.05$ ) a través del tiempo alcanzando una concentración mayor al final del experimento ( $95 \text{ mg g}^{-1}$ ) en comparación a la mitad ( $58 \text{ mg g}^{-1}$ ) y al inicio ( $38 \text{ mg g}^{-1}$ ) del experimento.

### **7.5.3. Manto**

El contenido inicial de carbohidratos en manto ( $57 \text{ mg g}^{-1}$ ) muestra una tendencia general a la reducción a la mitad del experimento. La mayor concentración de carbohidratos a mitad del experimento ( $P < 0.05$ ) se registró en Micro-Trigo  $24^{\circ}\text{C}$  ( $50 \text{ mg g}^{-1}$ ) y la menor en Micro-Trigo  $22^{\circ}\text{C}$  ( $30 \text{ mg g}^{-1}$ ). Al final Micro-Maíz  $22^{\circ}\text{C}$  ( $109 \text{ mg g}^{-1}$ ) tuvo la concentración significativamente mayor ( $P < 0.05$ ) comparado con Micro-100  $22^{\circ}\text{C}$  ( $46 \text{ mg g}^{-1}$ ) y Micro-Maíz  $24^{\circ}\text{C}$  y  $26^{\circ}\text{C}$  ( $49 \text{ mg g}^{-1}$ ) (Figura 17). En campo la concentración de carbohidratos aumento significativamente ( $P < 0.05$ ) de  $137 \text{ mg g}^{-1}$  a la mitad del experimento a  $300 \text{ mg g}^{-1}$  para el final.

Por otra parte la concentración promedio de proteínas en manto al inicio del experimento ( $377 \text{ mg g}^{-1}$ ) fue mayor a la concentración promedio de proteínas de todos los tratamientos observada a la mitad del experimento. Sin embargo no se observaron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) entre tratamientos a la mitad y al final del experimento (Figura 17). En campo no se observaron diferencias significativas entre la concentración de proteínas durante todo el experimento.

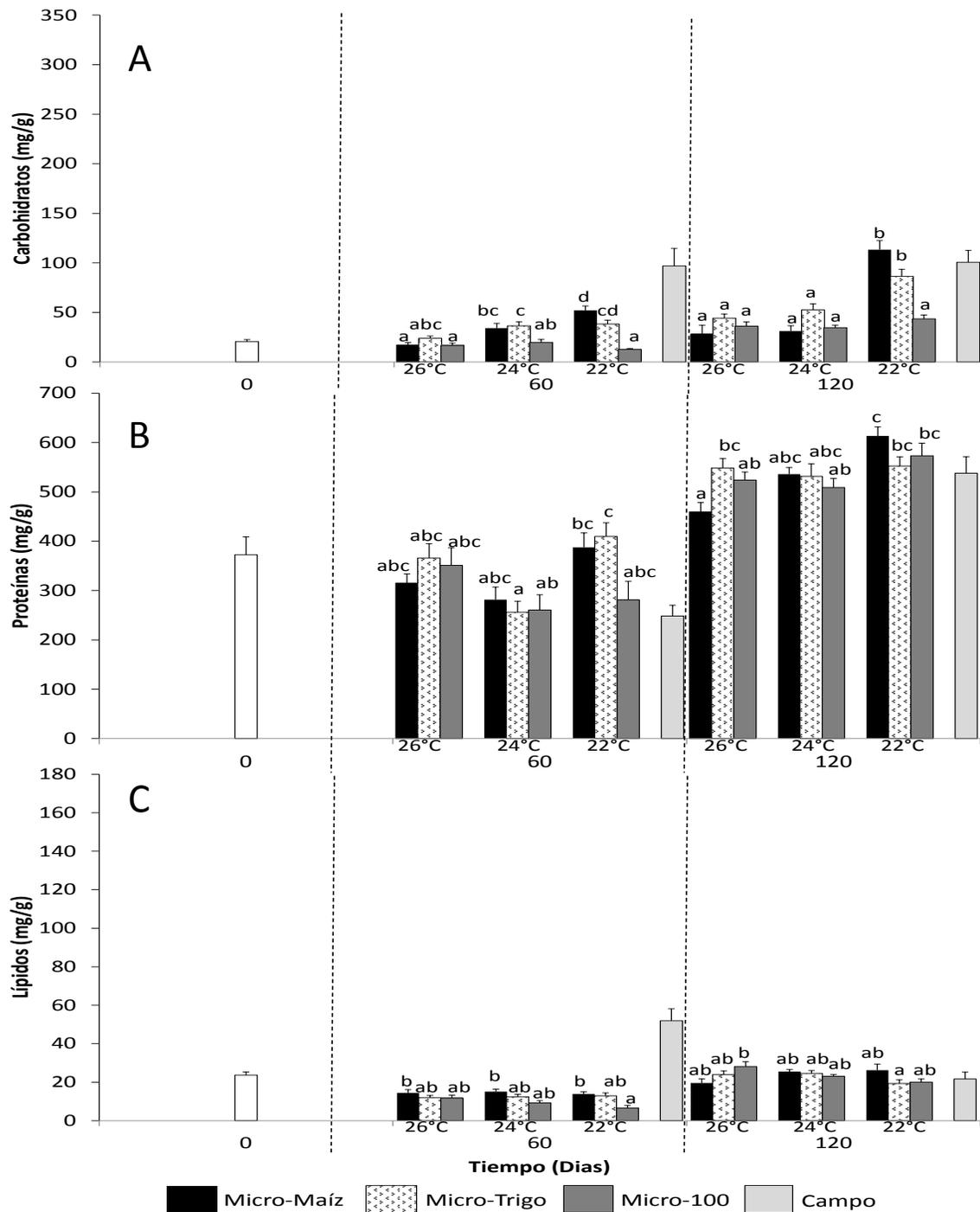


**Figura 17.** Variaciones en el contenido promedio de carbohidratos (A), proteínas (B) y lípidos (C) en manto de reproductores de *M. capax* sometidos a diferentes tratamientos combinados de temperatura y dieta durante 120 días. Las barras muestran la media  $\pm$  error estándar. Las letras distintas muestran diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA  $P < 0.05$ ).

La concentración inicial promedio de lípidos en manto ( $54 \text{ mg g}^{-1}$ ) fue menor a las concentraciones promedio registradas en la mitad del experimento (60 días) en todos los tratamientos. La concentración significativamente más alta ( $P < 0.05$ ) correspondió a Micro-Maíz  $26^{\circ}\text{C}$  ( $47 \text{ mg g}^{-1}$ ) y la menor a Micro-100  $22^{\circ}\text{C}$  ( $26 \text{ mg g}^{-1}$ ) y Micro-Trigo  $22^{\circ}\text{C}$  ( $29 \text{ mg g}^{-1}$ ). Para el final del experimento no se encontraron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) entre tratamientos del laboratorio (Figura 17). En campo la concentración de lípidos al final del experimento ( $159 \text{ mg g}^{-1}$ ) fue mayor ( $P < 0.05$ ) a la concentración que se observó al inicio ( $54 \text{ mg g}^{-1}$ ) y a la mitad ( $99 \text{ mg g}^{-1}$ ) del experimento.

#### **7.5.4. Músculo**

En músculo la concentración inicial de carbohidratos fue de  $20 \text{ mg g}^{-1}$ . La mayor concentración de carbohidratos en músculo ( $P < 0.05$ ) tanto para la mitad como el final del experimento se observó en Micro-Maíz  $22^{\circ}\text{C}$  ( $52 \text{ mg g}^{-1}$ ,  $113 \text{ mg g}^{-1}$ ). La menor concentración de carbohidratos ( $P < 0.05$ ) a mitad del experimento correspondió a Micro-100  $22^{\circ}\text{C}$  y  $26^{\circ}\text{C}$  ( $12 \text{ mg g}^{-1}$ ,  $16 \text{ mg g}^{-1}$ ), mientras que al final la menor concentración correspondió a Micro-Maíz  $26^{\circ}\text{C}$  y  $24^{\circ}\text{C}$  ( $27 \text{ mg g}^{-1}$ ,  $31 \text{ mg g}^{-1}$ ) (Figura 18). En campo la concentración de carbohidratos a la mitad ( $97 \text{ mg g}^{-1}$ ) y final ( $100 \text{ mg g}^{-1}$ ) del experimento no presentó diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) entre sí.



**Figura 18.** Variaciones en el contenido promedio de carbohidratos (A), proteínas (B) y lípidos (C) en músculo de reproductores de *M. capax* sometidos a diferentes tratamientos combinados de temperatura y dieta durante 120 días. Las barras muestran la media  $\pm$  error estándar. Las letras distintas muestran diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA  $P < 0.05$ ).

En cuanto a la concentración de proteínas en músculo, se reportó un valor inicial de  $372 \text{ mg g}^{-1}$ . Para la mitad del experimento la mayor concentración de proteínas en músculo ( $P < 0.05$ ) se observó en Micro-Maíz y Micro-Trigo a  $22^\circ\text{C}$  ( $387 \text{ mg g}^{-1}$ ,  $409 \text{ mg g}^{-1}$ ) y la menor en Micro-Trigo  $26^\circ\text{C}$  ( $256 \text{ mg g}^{-1}$ ). Al final del experimento la concentración de proteínas en Micro-Maíz  $22^\circ\text{C}$  ( $613 \text{ mg g}^{-1}$ ) fue significativamente mayor ( $P < 0.05$ ) a Micro-Maíz  $26^\circ\text{C}$  ( $459 \text{ mg g}^{-1}$ ) y Micro-100  $24^\circ\text{C}$  y  $26^\circ\text{C}$  ( $509 \text{ mg g}^{-1}$ ,  $523 \text{ mg g}^{-1}$ ) (Figura 18). En campo la concentración final de proteínas ( $537 \text{ mg g}^{-1}$ ) fue mayor ( $P < 0.05$ ) que a la mitad del experimento ( $248 \text{ mg g}^{-1}$ ).

Por otra parte, la concentración promedio inicial de lípidos en músculo ( $23 \text{ mg g}^{-1}$ ) tendió a incrementar en todos los tratamientos a la mitad del experimento. Los tratamientos que presentaron la concentración mayor ( $P < 0.05$ ) de lípidos fueron Micro-Maíz  $24^\circ\text{C}$ ,  $26^\circ\text{C}$  y  $22^\circ\text{C}$  ( $15 \text{ mg g}^{-1}$ ,  $14 \text{ mg g}^{-1}$ ,  $13 \text{ mg g}^{-1}$ ) y Micro-Trigo  $22^\circ\text{C}$  ( $12 \text{ mg g}^{-1}$ ) comparado con Micro-100  $22^\circ\text{C}$  ( $6 \text{ mg g}^{-1}$ ). Para el final del experimento Micro-100  $26^\circ\text{C}$  ( $28 \text{ mg g}^{-1}$ ) presentó la concentración significativamente mayor ( $P < 0.05$ ) y la menor correspondió a Micro-Trigo  $22^\circ\text{C}$  ( $19 \text{ mg g}^{-1}$ ) (Figura 18). Para campo se observó una concentración final de lípidos ( $21 \text{ mg g}^{-1}$ ) menor ( $P < 0.05$ ) a la mitad ( $51 \text{ mg g}^{-1}$ ) del experimento.

## 8. DISCUSIÓN

En el acondicionamiento gonádico, las dietas naturales (fitoplancton natural y microalgas cultivadas), son ampliamente utilizadas en los laboratorios de moluscos bivalvos (Muller-Feuga, 2000; Volkman & Brown, 2005; Helm *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2008; Fearman *et al.*, 2009; Argüello-Guevara *et al.*, 2013) y han demostrado su efectividad en la maduración de reproductores y preengorda de semilla de algunas especies. Sin embargo, existen también referencias importantes sobre el uso de algunas dietas artificiales que permiten reducir costos y obtener buenos resultados en la nutrición y reproducción de moluscos de

bivalvos (Pérez-Camacho *et al.*, 1998; Fernández-Reiriz *et al.*, 1999; Knauer & Southgate, 1999; Albentosa *et al.*, 2002; Mazón-Suástegui, 2005; 2008; 2009).

Así pues, además de la alimentación, el control y manejo de la temperatura permite la manipulación del ciclo gametogénico de los reproductores particularmente fuera de temporada reproductiva (Farfán *et al.*, 1998; Utting & Millican, 1998; Fabioux *et al.*, 2005; Mazón-Suástegui, 2005; Ojea *et al.*, 2008; Domínguez *et al.*, 2010; Kamermans *et al.*, 2013). Es importante remarcar que el resultado obtenido en el acondicionamiento gonádico de moluscos bivalvos también dependerá en gran medida de una serie de variables dependientes de la especie a trabajar como: (1) El estadio inicial en que se encuentran los reproductores (Lannan *et al.*, 1980; Gallager & Mann 1986; Matias *et al.*, 2009; Sühnel *et al.*, 2014). (2) La cantidad y calidad del alimento proporcionado (Laing & López-Alvarado *et al.*, 1994; Utting & Millican, 1997). (3) La temperatura de acondicionamiento (Utting & Millican, 1998; Muranaka & Lannan, 1984), y (4) el lugar de procedencia de los reproductores (Chávez-Villalba *et al.*, 2002; 2003; Angel-Dapa *et al.*, 2015).

Los resultados de la presente investigación demuestran que los reproductores de *M. capax* pueden ser acondicionados en el laboratorio con dietas naturales y artificiales, alcanzar su madurez sexual y desovar en periodos menores a dos meses. Trabajos previos reportan haber logrado la madurez total de *M. capax* en un periodo de acondicionamiento de 50 días, habiendo iniciado con reproductores en etapa intermedia de maduración y logrando el desove del 100% de los organismos acondicionados (Mazón-Suástegui, 1987). Este autor utilizó una temperatura de 23.5 °C, una dieta a base de dos microalgas (*I. galbana* y *T. chui*) y una ración diaria de alimento igual a la utilizada en el presente estudio ( $2 \times 10^9$  células/organismo/día equivalente a una ración alimenticia del 4% del peso seco/organismo/día). Con ese antecedente, y por haber iniciado el presente estudio con una alta frecuencia de organismos indiferenciados y en postdesove,

se esperaba no tener mejillones maduros en un período menor a dos meses de acondicionamiento, ya que organismos en etapas avanzadas en el proceso de gametogénesis tardan menos tiempo en alcanzar la madurez en comparación a organismos en estados incipientes. Esto se ve respaldado por el estudio de Gallagher & Mann (1986), quienes observaron que el tiempo de acondicionamiento para las especies *Mercenaria mercenaria* y *Crassostrea virginica* es dependiente de la condición inicial de los organismos; aquellos en etapas de reposo tardan más en alcanzar la madurez en comparación a organismos que se encuentran en etapas avanzadas de desarrollo gonádico. Sin embargo, en el presente estudio los organismos alcanzaron la madurez antes de lo esperado, con altas frecuencias de organismos parcialmente desovados, así como maduros en las temperaturas de 26 y 24 °C. La diferencia encontrada con lo reportado por Mazón-Suástegui (1987) puede atribuirse al efecto combinado dieta/temperatura. En la presente investigación se trabajó en un rango térmico mayor (3°C, 5°C y 7°C), se incluyó en la dieta una diatomea (*C. calcitrans*) que sustituyó al flagelado *T. chuii* y además se proporcionaron dietas artificiales complementarias con alto contenido de carbohidratos (fécula de maíz y harina de trigo), lo que permitió obtener organismos maduros en un tiempo relativamente corto, si se considera el estadio inicial de los organismos.

Los mejillones acondicionados a las mayores temperaturas (26°C y 24°C) presentaron un mayor desarrollo gonádico cuando recibieron una dieta natural complementada con una dieta artificial en comparación a cuando se suministró una dieta natural (solo a base de microalgas). Ambas dietas (naturales y artificiales) fueron capaces de promover una remaduración gonádica al final del experimento (120 días), lo que demuestra que las harinas de cereales pueden contribuir a cubrir requerimientos nutricionales durante el proceso de maduración en esta especie. Al respecto se tiene evidencia de que los cereales empleados, con alto contenido de carbohidratos, y particularmente la fécula de maíz, pueden ayudar a cubrir el gasto energético que demanda el proceso de gametogénesis en

moluscos bivalvos promoviendo su maduración sexual (Mazón-Suástegui, 1987; 1988; 2005). Cabe mencionar que aunque los cereales han demostrado tener un buen impacto en el índice de condición de algunas especies, no son una buena fuente de ácidos grasos esenciales para moluscos marinos (Pirini *et al.*, 2007), por lo que se recomienda utilizarlos como sustitutos parciales o como complementos para enriquecer una dieta natural (microalgas). El éxito que se ha tenido en la nutrición de moluscos bivalvos mediante la sustitución parcial de las microalgas con dietas artificiales elaboradas a base de cereales (Pérez-Camacho *et al.*, 1998; Fernández-Reiriz *et al.*, 1998; 1999; Albentosa *et al.*, 2002; Pirini *et al.*, 2007; Mazón-Suástegui *et al.*, 2008; 2009) puede deberse a que contribuyen a incrementar las reservas de glucógeno en diversos tejidos. Estas reservas son empleadas en rutas catabólicas para proveer una fuente rápida e instantánea de energía en moluscos bivalvos, además que el glucógeno es una fuente de energía utilizable en los procesos de gametogénesis (Gabbott, 1976; Taylor & Venn, 1979; Barber & Blake 1981; Racotta *et al.*, 2003; Pogoda *et al.*, 2013). Lo anterior concuerda con lo observado en este estudio, debido a que los organismos alimentados con la dieta Micro-Maíz presentaron un mayor grado de desarrollo de la gónada.

Por otra parte la combinación flagelado-diatomea en la dieta natural utilizada en este estudio, promueve un mayor contenido de ácido eicosapentanoico (EPA) (Volkman *et al.* 1989; Zhukova & Aizdaicher, 1995; Velasco, 2007) que la combinación flagelado-flagelado empleada por Mazón-Suástegui (1987). En moluscos bivalvos el EPA se ha relacionado al incremento de la tasa de crecimiento (Alkanani *et al.*, 2007), la regulación de la fluidez de membranas celulares (Knauer *et al.*, 1999; Hall *et al.*, 2002), al incremento en la sobrevivencia (Sühnel *et al.*, 2012), la estimulación en la producción de hemocitos (Delaporte *et al.*, 2003) y la maduración sexual de reproductores (Sühnel *et al.*, 2012). Un déficit de EPA puede dificultar la maduración sexual en moluscos bivalvos, por ser un ácido graso esencial (Farías-Molina, 2001), que se ha encontrado ligado al

desempeño reproductivo (Utting & Millican, 1998; Wacker & Elert, 2003). Algunos autores han sugerido que el EPA puede ser empleado como fuente de energía durante el proceso de gametogénesis de machos y hembras y/o ser incorporado en los ovocitos para el caso de hembras (Palacios *et al.*, 2005; Martínez-Pita *et al.*, 2012).

En cuanto al efecto de la temperatura, se sugiere que un aumento de 5 y 7°C con respecto a la temperatura inicial del agua en campo (19°C), podría estar relacionado con una reducción del tiempo requerido para obtener organismos maduros en el laboratorio. Lo anterior concuerda con lo observado en otras especies como la almeja rey *P. maximus*, especie que lleva a cabo el proceso de vitelogénesis solo cuando existe un incremento en el umbral de temperatura entre 9 a 16°C, siempre y cuando el organismo disponga de las reservas necesarias para llevar a cabo el proceso (Utting & Millican, 1998). Chávez-Villalba *et al.* (2002) mencionan que el crecimiento de los ovocitos en el ostión *C. gigas* se incrementa significativamente cuando se aumenta la temperatura de 16°C a 22°C; sin embargo, ese crecimiento disminuye cuando se alcanzan temperaturas de 25°C. Kamermans *et al.* (2013) reportan que los mejillones *M. edulis* y *M. galloprovincialis* pueden ser madurados sexualmente en el laboratorio, incrementando la temperatura del agua durante la estación invierno-primavera. Mediante este manejo zootécnico, los reproductores acondicionados en laboratorio pueden adelantar su proceso de maduración en comparación con organismos en campo que se encuentran a temperaturas más bajas. Esto confirma la importancia de la temperatura en el proceso de maduración sexual de *M. capax*.

Por otra parte, la menor ACG que se determinó para hembras y machos se relacionó al acondicionamiento a 26°C y una alimentación con Micro-Maíz, debido posiblemente a un efecto sinérgico dieta/temperatura (anexo 1). Bajos valores en el ACG se asociaron a grupos experimentales que maduraron y desovaron antes del primer muestreo realizado a los 60 días, debido a una maduración

anticipada. Como contraparte, los grupos que presentaron valores más elevados de ACG fueron los acondicionados a 22°C (Anexo 1), y de manera relevante el tratamiento Micro-100 a 22°C, dejando claro que la temperatura de 26°C fue capaz de acelerar el desarrollo gametogénico.

El índice de condición (IC) siguió un patrón muy similar al ACG, tanto a mitad del experimento como al final del mismo. Los valores más altos del IC se obtuvieron a mitad del experimento con las dietas complementadas con harinas de cereales a la temperatura más baja (22°C). Esto sugiere un retraso en la maduración de esos grupos debido a que presentaron una mayor cantidad de individuos en gametogénesis avanzada, presencia de gametos (masculinos y femeninos) maduros que aún no habían sido expulsados y un mayor contenido de reservas, a diferencia de los organismos que ya habían madurado y desovado gametos, reduciendo el contenido de reservas en sus tejidos, así como el IC. Esto ha sido observado en otros moluscos bivalvos en los que se han registrado valores bajos en el IC cuando existen eventos de indiferenciación, desove o post-desove (Peharda *et al.*, 2006; Abdel-Razek *et al.*, 2014; Bhabhy *et al.*, 2014). En campo los mejillones siempre presentaron un IC mayor en comparación a los cultivados en el laboratorio, lo que sugiere que el evento reproductivo fue más lento en campo, al parecer por efecto de la temperatura (Febrero a Julio, 22.5°C) y de la alimentación. Al respecto, se reportaron afloramientos de fitoplancton durante los meses de muestreo y se presume que los organismos tuvieron suficiente disponibilidad de alimento natural (García-Corona, 2014). Las bajas temperaturas disminuyen la velocidad con la que se lleva a cabo el proceso de gametogénesis, dando como resultado un aumento lento en el IC. Se ha reportado una maduración lenta de *M. capax* en bahía de los Ángeles, con aumento progresivo en el IC conforme se incrementa la temperatura de 14.8°C en Febrero a 25°C en Junio (Bückle-Ramírez & Garza-Aguirre, 1989). Estos mismos autores reportan un proceso de re-maduración rápida a temperatura de 29.3°C en Agosto y de 26.5°C en Septiembre, lo cual da soporte al resultado obtenido en la presente

investigación, en lo que respecta a la capacidad de re-maduración de *M. capax*, principalmente en los tratamientos de 26 °C, con suministro de dietas artificiales complementarias.

El diámetro teórico de los ovocitos es, además del IC, un importante indicador para evaluar el estadio de desarrollo gonádico en el que se encuentran los organismos (Lango-Reynoso *et al.*, 2000). Sin embargo, a mitad del experimento no se obtuvieron diferencias significativas entre tratamientos con respecto a este indicador, debido posiblemente a la gran variabilidad observada, incluso en los ovocitos de un mismo individuo, así como la alta frecuencia de organismos en desove parcial y re-maduración. Resultados similares se reportan para la almeja *Tapes philippinarum*, los cuales sugieren que no existe una relación directa entre el DT y el estadio de madurez de los organismos (Meneghetii *et al.*, 2004). Al final del experimento (120 días), las diferencias en el DT entre tratamientos si fueron significativas y se observó que el menor DT de los ovocitos correspondió a las hembras acondicionadas en los tratamientos complementados con dietas artificiales (fécula de maíz y harina de trigo) a la mayor temperatura (26°C). Esto se podría asociar a una alta frecuencia de organismos en desove parcial y postdesove con reinicio de maduración, por lo que se supone una reducción en el DT promedio por presencia de ovocitos tempranos y evacuación previa al muestreo de ovocitos maduros de mayor tamaño. En contraste, el mayor DT de los ovocitos observado a 22°C se asoció a una mayor frecuencia de organismos maduros, ya que aún no desovaban los ovocitos maduros.

En general, la talla promedio de los ovocitos fue menor en campo en comparación a laboratorio, lo que demuestra que el manejo dieta/temperatura fue favorable para todos los tratamientos y tiene potencial para ser aplicado en el desarrollo de tecnología en la reproducción controlada para la producción de semilla de *M. capax*. A pesar de ello, el DT tiene que ser valorado con detalle, ya que un diámetro mayor se puede encontrar en ovocitos “*sobre-madurados*” que se

encuentran en proceso de reabsorción, como se ha reportado en el caso de la almeja dura *Chione fluctifraga* (Castillo-Durán *et al.*, 2013), el pectínido *A. ventricosus* (Mazón-Suasteguí, 2005), el hacha China *A. maura* (Angel-Dapa *et al.*, 2010) y la ostra perlera *P. sterna* (Gómez-Robles *et al.*, 2013). Existe también la posibilidad de que una disminución en el DT puede deberse a bajas concentraciones de alimento en el ambiente (Martínez-Pita *et al.*, 2011), lo cual no es posible afirmar que sucedió en campo, porque no se llevó a cabo un registro preciso de este parámetro y pudiese haber otro u otros factores implicados. Al respecto, García-Corona (2014) reporta para *M. capax* en bahía de La Paz, un alto contenido de atresias en gónada femenina, y argumenta que eso podría ser debido posiblemente a contaminación ambiental u alguna causa desfavorable para los organismos, asociada al sitio donde se localiza el banco natural.

Por otro lado, el índice lipídico (IL) en gónada de hembras, se evaluó por ser un índice que reflejar el contenido de lípidos neutros presentes en los ovocitos a manera de reservas (Rodríguez-Jaramillo, 2004). Estas reservas son utilizadas para ayudar al proceso del desarrollo de la progenie (Whyte *et al.*, 1990; 1991; Ben-Kheder *et al.*, 2010; Gonzales-Araya *et al.*, 2012). Aunque el IL no presentó un patrón claro entre la magnitud del IL y la dieta suministrada a *M. capax* en el laboratorio, si se observó una tendencia en la acumulación de lípidos por efecto de la temperatura. A mayor temperatura (26°C) se obtuvo un mayor contenido de lípidos, el cual estuvo acompañado de una alta frecuencia de organismos parcialmente desovados. Lo anterior no concuerda con lo mencionado con otros moluscos bivalvos (Gabbott, 1976; Barber & Blake, 2006) y lo reportado por Bhaby *et al.* (2014), quienes observaron una disminución de lípidos en el mejillón *M. galloprovincialis* por efecto del desove. Esto lleva a suponer que un mayor IL en gónada puede estar reflejando un elevado  $IL_0$  y el contenido de ovocitos remanentes elevan el promedio del IL. En el presente estudio, los mayores valores del  $IL_0$  correspondieron a los tratamientos que presentaron una temperatura

elevada (26°C). Debido a que los organismos a la temperatura de 26°C fueron los primeros en madurar, es posible que el alto contenido de lípidos en IL<sub>o</sub> se deba a ovocitos maduros que no alcanzaron a ser desovados.

En campo el IL promedio fue mayor al registrado en laboratorio, lo que puede atribuirse a una alta frecuencia de organismos maduros y a una muy baja frecuencia de organismos con desove parcial con presencia de ovocitos con un mayor IL<sub>o</sub> que en laboratorio. Aunque se sabe que los lípidos contenidos en los ovocitos son utilizados para ayudar al proceso del desarrollo de la progenie (Whyte *et al.*, 1990; 1991; Ben-Kheder *et al.*, 2010; Gonzales-Araya *et al.*, 2012), no implica que un elevado contenido de lípidos totales en ovocitos promuevan un buen desarrollo larvario (Gallager & Mann, 1986). Además, en campo se registró una alta frecuencia de ovocitos atrésicos, lo cual podría indicar que un alto contenido de lípidos en campo no necesariamente se encuentre reflejando una mayor calidad ovocitaria.

Respecto al IG se presume que los individuos en reposo o en estadios tempranos de desarrollo pueden haber contribuido a un aumento en el IG promedio del tratamiento respectivo, ya que un alto contenido de carbohidratos en tejidos de reserva hace referencia a un menor gasto energético en procesos de gametogénesis, coincidiendo con un menor desarrollo gonádico (Taylor & Venn, 1979; Zandee *et al.*, 1980; Dridi *et al.*, 2007; Rodríguez-Astudillo *et al.*, 2007; Fearman *et al.*, 2009; Martínez-Pita *et al.*, 2012). Mientras que una menor acumulación de reservas a temperaturas elevadas se asoció a organismos en etapas avanzadas de madurez, los cuales posiblemente ya han empleado estas reserva metabólica, contribuyendo en el gasto energético (Chávez-Villalba *et al.*, 2003) y en la síntesis de lípidos (Gabbott & Peek, 1991; Zandee *et al.*, 1980; Barber & Blake, 2006; Berthelin *et al.*, 2000; De la Parra *et al.*, 2005; Pogoda *et al.*, 2013). Rodríguez-Jaramillo *et al.* (2008) reportan una disminución del IG en gónada conforme maduran los reproductores de *C. corteziensis*, posiblemente empleados en el proceso de lipogénesis. En base a lo anterior podría asumirse

que los organismos que presentaron un menor IG tuvieron una reducción en el tiempo de acondicionamiento, en comparación a los organismos que presentaron un mayor IG. Como contraparte, se asume que hubo una mayor acumulación de reservas en temperaturas bajas, en particular para el caso de los organismos alimentados con dietas ricas en carbohidratos, por una posible disminución en el metabolismo y en el gasto energético de los organismos. Lo anterior concuerda con lo observado en el ostión japonés *C. gigas* el cual presenta una disminución en la velocidad a la que se lleva a cabo el desarrollo gonádico cuando disminuye la temperatura del agua (Fabioux *et al.*, 2005), así como un incremento en las reservas metabólicas (Ojea *et al.*, 2008). En cuanto al IG<sub>0</sub>, se presume un alto de contenido de carbohidratos contenidos en ovocitos de hembras acondicionadas con el tratamiento Micro-Maíz 26°C debido al alto contenido de carbohidratos en la dieta. Sin embargo, no se logró distinguir una tendencia clara por efecto de la temperatura o el alimento tanto a la mitad como al final del experimento.

La concentración de carbohidratos en tejido gonádico de *M. capax* evaluado por el método bioquímico, siguió un patrón diferente al observado mediante análisis histoquímico. Estas diferencias pueden atribuirse a la diferencias bioquímicas entre machos y hembras (Yan *et al.*, 2010; Martínez-Pita, 2012), ya que para el análisis bioquímico se evaluaron mezclas de hembras y machos de *M. capax*, y para histoquímica solo se analizaron cortes histológicos de hembras. Por otra parte esta diferencia también puede ser atribuida al método empleado, ya que para el análisis bioquímico se considera todo el tejido procesado que puede incluir además de gónada otros tejidos como mucopolisacáridos, fibras de tejido muscular, células auxiliares, células adipogranulares y células vesiculares de tejido conectivo.

Se presume que la gónada de *M. capax* podría estar actuando como un tejido de reserva, ya que los máximos valores de carbohidratos se registraron al inicio del experimento, cuando se registró la mayor frecuencia de organismos en

estadio de indiferenciación. Las concentraciones más bajas de carbohidratos en gónada de *M. capax* coincidieron con una alta frecuencia de organismos en estadio de desove parcial. Las concentraciones más altas se registraron al inicio del experimento, con una alta frecuencia de organismos en reposo. Lo anterior ha sido observado en otras especies de moluscos bivalvos como *M. barabtus*, *O. edulis* y *C. gigas*, las cuales presentan una acumulación de carbohidratos en los primeros estadios de gametogénesis y una posterior reducción conforme avanza el proceso de maduración gonádica (Mladineo *et al.*, 2007; Pogoda *et al.*, 2013). Esto remarca la importancia de las reservas de carbohidratos localizadas en gónada, debido a que pueden ser empleadas directamente en el proceso de maduración sexual y el proceso de lipogénesis para formación de lípidos de reserva (Zandee *et al.*, 1980; Barber & Blake, 2006; Berthelin *et al.*, 2000; De la Parra *et al.*, 2005; Pogoda *et al.*, 2013).

El contenido de carbohidratos en tejido gonádico y en tejidos somáticos presento un comportamiento muy similar, por lo que se les manejo como tejidos de reserva. La composición bioquímica de los tejidos de reserva en moluscos bivalvos, se han relacionado con la composición bioquímica de la dieta y ración alimenticia, tal es el caso del pectínido *A. purpuratus*, el cual presenta un incremento en la concentración de carbohidratos en tejidos de reserva atribuido a la ración alimenticia proporcionada (Martínez *et al.*, 2000). En base a lo anterior, se asume que una temperatura baja (22°C) puede promover la acumulación de reservas de carbohidratos en *M. capax* después de haber cubierto todas sus necesidades energéticas (mantenimiento, reproducción). En ese contexto, parece lógico que los organismos del tratamiento Micro-Maíz 22°C hayan tenido la mayor concentración de carbohidratos al final del experimento, ya que la fécula de maíz tiene un alto contenido de carbohidratos (94% según etiqueta del producto Maizena®), mayor que la harina de trigo (65-70% etiqueta Espuma de Chapala®) y que las microalgas (12.3% *I. galbana*, *T. lutea* según Bendif *et al.*, 2013 y 6.9% *C. calcitrans* según Mazón-Suástegui *et al.*, 2008). Una baja temperatura puede

favorecer el almacenamiento de carbohidratos en tejidos somáticos. Lo anterior es respaldado por Delgado & Pérez-Camacho (2007) quienes observaron en la almeja *R. philippinarum* una acumulación de reservas cuando se acondiciona a bajas temperaturas.

Por otra parte, cuando se suministraron las dietas a la mayor temperatura (26°C), se observó una cantidad muy baja de reservas de carbohidratos en tejidos de reserva, incluyendo los organismos acondicionados con dietas ricas en carbohidratos. Los bajos contenidos de carbohidratos en una dieta rica en carbohidratos (Micro-Maíz) a una temperatura de 26°C se atribuyó a que un mayor gasto energético, que puede ser producto de un aumento del metabolismo (Muranaka & Lannan, 1984), el cual pudo estar subsidiado por el complemento a base de fécula de maíz (Maizena®). Un incremento en la temperatura del agua genera un aumento en el metabolismo de los organismos (Muranaka & Lannan, 1984), por lo que las reservas de carbohidratos a menores temperaturas podrían no estar siendo ocupadas con la misma demanda que a mayores temperaturas. Delgado & Pérez-Camacho (2007) reportaron para reproductores de la almeja *R. philippinarum*, un peso seco similar entre organismos acondicionados a una temperatura de 14°C con baja ración alimenticia y organismos acondicionados a 22°C con alta ración alimenticia. Esto sugiere que los organismos acondicionados a la mayor temperatura debieron consumir más alimento para cubrir una alta demanda energética. Cuando ocurre un incremento en la temperatura del agua el proceso de gametogénesis es acelerado y al mismo tiempo la capacidad de aclimatación de los organismos se ve limitada (Bayne *et al.*, 1976). Esto sugiere que el incremento en la temperatura ayuda acelerar la velocidad en la que maduran los organismos a expensas de un mayor gasto energético y una depleción de las reservas metabólicas.

En campo se observó un mayor contenido de carbohidratos en tejidos somáticos (glándula digestiva, manto y músculo) durante todo el experimento, lo

que se atribuyó a un menor gasto energético y un proceso de madurez retardado en comparación al laboratorio. En campo (Bahía de La Paz), *M. capax* aplica una estrategia reproductiva conservadora (García-Corona, 2014), lo que puede retardar el proceso de gametogénesis.

Cabe mencionar que los Mitílidos en general, almacenan el glucógeno principalmente en el tejido del manto (Zwann & Zandee, 1972), el cual es utilizado para cubrir gastos energéticos del proceso de gametogénesis (Hawkins *et al.*, 1985; Acosta *et al.*, 2010; Martínez-Pita, 2012). En *M. capax* se observó un mayor contenido de carbohidratos en este tejido, en comparación con glándula digestiva y músculo. Lo anterior fue particularmente sobresaliente en campo, donde se asume que hubo una menor disponibilidad de alimento que en el laboratorio y confirma que *M. capax* aplica una estrategia conservadora en campo. Lo anterior remarca la importancia del manto como tejido de reserva en el proceso de maduración en las poblaciones naturales de mejillón.

El contenido de lípidos en gónada, fue mayor en dietas ricas en carbohidratos (Micro-Maíz) y temperaturas elevadas (26°), soportando la idea, de que una dieta rica en carbohidratos ayuda a cubrir eficientemente procesos como la lipogénesis, mediante el cual se sintetizan lípidos neutros a partir de carbohidratos (Gabbott, 1976; Zandee *et al.*, 1980; Barber & Blake, 2006; Berthelin *et al.*, 2000; De la Parra *et al.*, 2005; Pogoda *et al.*, 2013), los cuales se encontraron gastados en todos los tejidos de reserva.

Algo importante a destacar, es que la concentración mayor de lípidos en gónada asociada a una alta frecuencia de organismos en desove parcial y la menor concentración de lípidos se encontró asociada a una alta frecuencia de organismos maduros. Esto contrasta con lo reportado por Rodríguez-Jaramillo *et al.* (2008), quienes mencionan una reducción de lípidos en gónada posterior al desove en hembras de *C. corteziensis* y con lo reportado por Angel-Dapa *et al.*

(2010), quienes observaron un aumento en el contenido de lípidos en gónada en el bivalvo *A. maura* cuando los organismos se encontraban en estadio de madurez. Una posible explicación para nuestro caso es que las mayores concentraciones de lípidos pudieron estar asociadas a gametos no expulsados, o una mayor cantidad de lípidos en tejido gonádico. Esto último requiere de un análisis más detallado sobre el tejido conjuntivo localizado en gónada, ya que con la información obtenida en el presente trabajo no se puede afirmar que el mejillón *M. capax* presente un tejido adipogranular en gónada, capaz de almacenar un alto contenido de lípidos.

No se pudo determinar un patrón definido en el comportamiento de la concentración de lípidos en glándula digestiva. Sin embargo, al final del experimento se observó un mayor consumo de las reservas de lípidos en todos los tratamientos Micro-Maíz, los cuales presentaron organismos en etapas más avanzadas en la madurez. Se presume que los lípidos en glándula digestiva fueron movilizados o empleados para llevar a cabo procesos de gametogénesis. Esto sucede en diversos bivalvos, incluida la almeja *Laternula elliptica*, la cual presenta un gasto en sus reservas de lípidos almacenados en glándula digestiva durante el periodo de maduración y desove (Ahn *et al.*, 2003).

En cuanto al resto de los tejidos somáticos (manto y músculo) se observó una mayor concentración de lípidos en los tratamientos alimentados con una dieta complementada con fécula de maíz. Esto puede deberse al elevado contenido de carbohidratos de la fécula de maíz, y a que ésta es materia prima para el proceso de lipogénesis, el cual se encuentra ligado a la síntesis de lípidos. Lo anterior se ha observado en otras especies de moluscos bivalvos como la almeja catarina *A. ventricosus*, la cual presenta una mayor ganancia en lípidos cuando se emplea fécula de maíz como complemento artificial en comparación a una dieta basada 100% en microalgas (Mazón-Suástegui, 2005). Incluso en juveniles de la almeja *R. philippinarum* se acumula una mayor cantidad de lípidos al utilizar como

alimento una mezcla de microalgas y harina de trigo al 50%; observando una alta tasa de crecimiento, en comparación a una dieta del 100% de microalgas (Albentosa *et al.*, 2002). Lo anterior apoya los resultados obtenidos en el presente estudio, ya que las dietas ricas en carbohidratos pueden favorecer la síntesis y acumulación de lípidos.

En laboratorio la acumulación de lípidos en tejidos somáticos fue menor que en campo, debido posiblemente a que fueron transferidos a los ovocitos y éstos fueron liberados en más de una ocasión, mediante desoves naturales no inducidos, mientras que en campo el proceso de maduración fue más lento y se registró una menor proporción de organismos desovados con anticipación al pico reproductivo natural, lo que normalmente sucede en Bahía de La Paz entre los meses de Abril y Agosto (García-Corona, 2014).

Con relación al contenido de proteínas en gónada, se observó un mayor contenido en los organismos acondicionados con dietas ricas en carbohidratos (Micro-Maíz) a temperaturas elevadas (26°C y 24°C). Incrementos en el contenido de proteínas en gónada de moluscos bivalvos como *A. irradians* se han observado conforme maduran los organismos (Barber & Blake, 1981). De igual modo la almeja *Ensis arcuatus* presenta altos contenidos de proteína en gónada cuando los organismos se encuentran maduros, atribuyendo esto a la presencia de proteínas estructurales en gametos en ambos sexos y a la presencia de proteínas contenidas en los ovocitos (Darriba *et al.*, 2005). Lo anterior se ve respaldado por Gómez-Robles *et al.* (2005) quienes mencionan que las proteínas son empleadas para el crecimiento de los ovocitos. Esto podría sugerir que un mayor contenido de proteínas en gónada pudiera estar relacionado con el grado de madurez en reproductores de *M. capax*, ya que en los tratamientos en etapas más avanzadas de madurez se registraron un mayor contenido de proteínas. Sin embargo Fernández *et al.* (2015) mencionan una pérdida de proteínas por efecto de desove, lo que contrasta con nuestros resultados, ya que los organismos en

etapas más avanzadas de madurez y con un mayor contenido de proteínas en gónada, se encontraban parcialmente desovados. Cabe mencionar que presentaron un alto contenido de ovocitos residuales. Lo anterior sugiere la necesidad de un examen más a detalle del contenido de proteínas en gónada y su relación con el proceso de maduración sexual de los organismos en investigaciones futuras.

Para el caso particular de glándula digestiva, a mitad del experimento se observó una concentración mayor de proteínas en organismos acondicionados con las dietas Micro-Trigo y Micro-100. Una posible explicación podría ser que los organismos acondicionados con la dieta Micro-Maíz presentaron organismos en etapas más avanzadas de madurez y con ello se pudo haber tenido una depleción de reservas como es el caso del molusco bivalvo *A. irradians*, en el cual, el contenido de proteínas se asocia con el mantenimiento de la demanda energética que implica el proceso de gametogénesis (Barber & Blake, 1981; Utting & Millican, 1998). Por otra parte el contenido de proteínas posiblemente se encontró asociado a la composición de la dieta, ya que Micro-Trigo y Micro-100 presentaron un mayor contenido de proteínas.

En manto no se observaron diferencias significativas entre tratamientos con respecto al contenido de proteínas. Pero si una disminución general a mitad del experimento y un aumento al final del mismo, que fue mayor que en campo. La disminución en el contenido de proteínas en campo a mitad del experimento, se relacionó con un incremento en el contenido de carbohidratos. Los bivalvos *Actinonaias ligamentina* y *Amblema plicata* presentan bajos contenidos de proteínas en manto, en coincidencia con altos valores de carbohidratos, lo cual está ligado a su proceso de desarrollo gonádico (Baker & Hornbach, 2001). Un comportamiento similar ha sido reportado en musculo abductor para *A. purpuratus* (Martínez *et al.*, 2000), lo que supone un desplazamiento de proteínas por parte de los carbohidratos, cuando estos son almacenados en un mismo órgano. Lo

anterior puede explicar por qué en el caso del mejillón *M. capax*, el contenido de proteínas es más bajo en campo y los carbohidratos más altos, a diferencia de los tratamientos de laboratorio.

El alto contenido de proteínas en manto para el final del experimento, podría indicar que las dietas suministradas satisfacen directa o indirectamente las necesidades respectivas de los reproductores de *M. capax*. Lo anterior se sustenta en lo observado por Shumway & Newell (1984), quienes mencionan que un bajo contenido de proteínas en la almeja *Mulinia lateralis* se asocia a un déficit de energía consumida y a periodos de inanición. Por otra parte Yan *et al.* (2010) mencionan una disminución en la concentración de proteínas en el manto de la almeja *Cyclina sinensis* cuando las reservas de carbohidratos se encuentran agotadas. Otros autores reportan por igual la utilización de proteínas cuando las reservas metabólicas de carbohidratos y lípidos han sido gastadas o disminuidas por eventos de desove y/o inanición (Widdows, 1978; Barber & Blake, 1985) o incluso por situaciones de estrés (Widdows, 1978; Navarro, 2001). Sin embargo, en el caso de *M. capax*, se requiere de un análisis bioquímico más detallado del ciclo reproductivo completo de la especie, así como nuevos experimentos reduciendo el tiempo de acondicionamiento, para poder entender el reacomodo de las reservas y el momento preciso en el que son utilizadas en procesos de gametogénesis.

Por otra parte, las proteínas en músculo presentaron un aumento gradual conforme al paso del tiempo; no se detectaron tendencias asociadas a temperatura o dieta y se observó en lo general un comportamiento muy similar en campo y en laboratorio. Lo anterior se ha observado en otras especies de moluscos bivalvos como *Hyotissa hyotis*, la cual no presenta una relación entre la acumulación de proteínas en músculo y ciclo reproductivo (Rodríguez-Astudillo *et al.*, 2007). De igual modo las especies *O. edulis* y *C. gigas*, no muestran un comportamiento significativo entre el contenido de proteínas y el ciclo reproductivo

anual (Pogoda *et al.*, 2013), por lo que posiblemente tienen una función estructural. En el caso de las proteínas en músculo de *M. capax*, es posible que también estén siendo utilizadas con funciones estructurales, más que como sustrato energético para la gametogénesis.

En base a todo lo anterior podemos decir que el proceso de gametogénesis a temperaturas elevadas implica una alta demanda energética que es soportada con reservas metabólicas y alimento disponible. Se podría asumir que el mayor grado de madurez alcanzado por *M. capax* en los tratamientos complementados con dietas artificiales ricas en carbohidratos, puede ser debido al efecto de una alta temperatura y a la composición bioquímica del alimento y/o a la cantidad de alimento proporcionado que puede ser aprovechado por los organismos.

En moluscos bivalvos de campo, la fuente principal de glucosa son los carbohidratos contenidos en el fitoplancton natural disponible (Chu *et al.*, 1982; Brown, 1991). Sin embargo, este azúcar (glucosa) también puede ser obtenido a partir de la hidrólisis del almidón contenido en los cereales (Timberlake, 2011). A parte los moluscos bivalvos presentan actividad enzimática de amilasa (Langton, 1977; Huvet *et al.*, 2003), por lo que se puede asumir que son capaces de asimilar almidón, que puede ser degradado a unidades de glucosa (Timberlake, 2011). La glucosa es una fuente de energía fácil de movilizar (Melo-Ruiz & Cuamatzi, 2006) y puede ser incorporada en forma de reservas metabólicas por los moluscos bivalvos, o ser utilizada de para cubrir demandas energéticas y contribuir a la maduración sexual de los organismos, lo que explica el éxito obtenido en el implemento de cereales en el acondicionamiento de *M. capax*.

Los cereales evaluados constituyen una fuente alternativa y económica de alimento artificial de fácil elaboración y suministro, y pueden contribuir o cubrir, de manera directa o indirecta, los requerimientos nutricionales básicos para una adecuada maduración sexual de reproductores de mejillón *M. capax*.

## 9. CONCLUSIONES

- Los reproductores de mejillón *M. capax* pueden ser acondicionados en el laboratorio con una dieta natural a base de microalgas cultivadas, madurar sexualmente y desovar en periodos menores a dos meses a temperatura de 26°C y 24°C.
- Independientemente de la dieta, a una temperatura de acondicionamiento de 26°C se acelera el proceso de gametogénesis y a 22°C se retrasa.
- Si la dieta natural (microalgas) se complementa con dietas artificiales con alto contenido de carbohidratos (fécula de maíz y harina de trigo), los reproductores maduran sexualmente, desovan, e inician de nuevo un proceso de maduración sexual a las temperaturas de 26°C y 24°C en un tiempo menor a 60 días.
- La dieta artificial complementaria a base de Maizena® promueve una mayor grado de madurez en reproductores de *M. capax*, a temperaturas de 26°C y 24°C.
- Los organismos acondicionados a temperatura de 22°C y alimentados con dietas artificiales complementarias (fécula de maíz y harina de trigo) presentaron un IC alto, debido a un menor desgaste de reservas metabólicas y baja frecuencia de organismos desovados parcialmente.
- Los organismos acondicionados a temperatura de 26°C y alimentados con dietas artificiales (fécula de maíz y harina de trigo) presentaron una ACG menor, asociada a organismos que han sobrepasado la madurez y han desovado con anterioridad, mientras que organismos con un ACG mayor se asociaron a organismos sexualmente maduros.

- Un DT menor demostró estar relacionado con organismos desovados parcialmente.
- El contenido de lípidos en gónada es mayor en reproductores acondicionados con una dieta mixta natural/artificial, principalmente a temperatura de 26°C.
- Las dietas artificiales (fécula de maíz y harina de trigo) evaluadas, favorecen la acumulación de carbohidratos en tejidos de reserva cuando los reproductores son acondicionados a temperatura de 22°C.
- Las dietas artificiales evaluadas ricas en carbohidratos complementan la dieta microalgal y proporcionan energía adicional, sin comprometer costos operativos durante el acondicionamiento gonádico de reproductores de *M. capax*, y los mejores resultados se obtienen con fécula de maíz, *versus* la harina de trigo.

Para efectos de producción de semillas, evitar desoves no programados y entender mejor la movilización y uso de reservas metabólicas, se recomienda reducir el tiempo de acondicionamiento gonádico a 4-6 semanas, en función de la temperatura y de la dieta natural/artificial suministrada.

## 10. LITERATURA CITADA

- Abdel-Razek, F.A., S.E. Abdel-Gaid, M.M. Abu-Zais. 2014. Aspects on the reproduction of eared horse mussel, *Modiolus auriculatus* (Krauss, 1848) in Red Sea, Egypt. Egypt. J. Aquat. Res. 40:191-198.
- Acosta, V., A. Prieto, B. Licett, Y. Longart, M. Montes. 2011. Rendimiento, índice de condición y esfuerzo reproductivo del mejillón verde *Perna viridis* en cultivo de fondo en el Golfo de Cariaco, estado Sucre, Venezuela. Zootecnia Trop. 29: 399-410.
- Acosta, V., Y. Natera, C. Lodeiros, L. Freitas, A. Vásquez. 2010. Componentes bioquímicos de los tejidos de *Perna perna* y *P. viridis* (Lineo, 1758) (Bivalvia:Mytilidae), en relación al crecimiento en condiciones de cultivo suspendido. Lat. Am. J. Aquat. Res. 38:37-46.
- Aguirre-Hinojosa, E., L. F. Bückle-Ramírez. 1992. Fijación y crecimiento del mejillón *Modiolus capax* (Conrad) (Bivalvia-Mytilidae) sobre sustratos artificiales en la Bahía de los Angeles, Baja California, México. Cienc. Mar. 18:33-48.
- Ahn, I., J. Surh, Y. Park, H. Kwon, K. Choi, S. Kang, H. Choi, K. Kim, H. Chung. 2003. Growth and seasonal energetics of the Antarctic bivalve *Laternula elliptica* from King George Island, Antarctica. Mar. Ecol. Prog. Ser. 257: 99–110.
- 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.
- Alkanani, T., C.C. Parrish, R.J. Thompson, C.H. Mckenzie. 2007. Role of fatty acids in cultured mussels, *Mytilus edulis*, grown in Notre Dame Bay, Newfoundland. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 348:33–45.

- Angel-Dapa, M.A., C. Rodríguez-Jaramillo, C.J. Cáceres-Martínez, P.E. Saucedo. 2010. Changes in lipid of oocytes of the pen shell *Atrina maura* as criterion of gamete development and quality: a study histochemistry and digital image analysis. *J. Shellfish Res.* 29:407-413.
- Angel-Dapa, M.A., M. Arellano-Martínez, B.P. Ceballos-Vázquez, M. Robles-Mungaray, E. Robles-Rocha, M. Camacho-Mondragón, P.E. Saucedo. 2015. Reproductive and larval performance of the pen shell *Atrina maura* in relation to the origin and condition of broodstock. *J. Shellfish Res.* 2:401-408.
- Argüello-Guevara, W., A. Loor, S. Sonnenholzner. 2013. Broodstock conditioning, spawning induction, and early larval development of the tropical rock oyster *Striostrea prismatica* (Gray 1825). *J. Shellfish Res.* 32:665-670.
- Baker, S.M., D.J. Hornbach. 2001. Seasonal metabolism and biochemical composition of two mussels, *Actinonaias ligamentina* and *Amblema plicata*. *J. Moll. Stud.* 67:407-416.
- Barber, B.J., N.J. Blake. 1981. Energy and utilization in relation to gametogenesis in *Argopecten irradians concentricus* (say). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 52:121-134.
- Barber, B.J., N.J. Blake. 2006. Reproductive Physiology. Shumway, S.E., Parsons, G.J. (ed.). *Scallops: Biology, Ecology and Aquaculture*. Elsevier. USA. Vol. 35. 1460 p.
- Barnes, H., J. Blackstock. 1973. Estimation of lipids in marine animals and tissues detailed investigation of the sulphophosphovanillin method for 'total' lipids. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 12:103-118.
- Bayne, B.L., R.J. Thompson., J. Widdows. Marine. 1976. Bayne, B.L. (ed). *Physiology: I. Mussels: their ecology and physiology*. Cambridge University Press. Grand Britain. 121-206 pp.

- Ben-Kheder, R., C. Quéré, J. Moal, R. Robert. 2010. Effect of nutrition on *Crassostrea gigas* larval development and the evolution of physiological indices: Part B: Effects of temporary food deprivation. *Aquaculture* 308:174-182.
- Bendif, E.M., I. Probert, D.C. Schroeder, C. de Vargas. 2013. On the description of *Tisochrysis lutea* gen. nov. sp. nov. and *Isochrysis nuda* sp. nov. in the Isochrysidales, and transfer of Dicrateria to the Prymnesiales (Haptophyta). *J. App. Phycol.* 25:1763-1776.
- Berntsson, K.M., P.R. Jonsson, S.A. Wängberg, A.S. Carlsson. 1997. Effects of broodstock diets on fatty acid composition, survival and growth rates in larvae of European flat oyster, *Ostrea edulis*. *Aquaculture* 154:139-153.
- Berthelin, C., K. Kellner, M. Mathieu. 2000. Storage metabolism in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in relation to summer mortalities and reproductive cycle (West Coast of France). *Comp. Biochem. Physiol.* 125:359-369.
- Berthelin, C.H., J. Lainsey, J. Espinosa, O. Martin, G. Hernandez, M. Mathieu, K. Kellner. 2001. Storage and reproductive strategy in *Crassostrea gigas* from two different growing areas (Normandy and the Atlantic coast, France). *Invertebr. Reprod. Dev.* 40:79-86.
- Bhaby, S., B.O. Kelthoum, A. Errhif. 2014. *Mytilus galloprovincialis*; Reproduction activity and mantle structure in a zone located in the northwest of the Atlantic ocean (Imessouane, Morocco). *J. Mar. Biol. Oceanogr.* 3:1-8.
- Brown, M.R. 1991. The amino-acid and sugar composition of 16 species of microalgae used in mariculture. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 145:79-99.
- Bückle-Ramírez, L.F., M. C. Garza-Aguirre. 1989. Ciclo reproductivo del mejillón *Modiolus capax* (Conrad, 1837) (Bivalvia, Mytilidae, Anisomyra) en la Bahía de los Ángeles, Baja California, México. *Anales del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología - UNAM* 16:157-170.

- Cannuel, R., P.G. Beninger. 2005. Is oyster broodstock feeding always necessary? A study using oocyte quality predictors and validators in *Crassostrea gigas*. *Aquat. Living Resour.* 18:35–43.
- Castillo-Durán, A., A. Castro-Acedo, J.A. Arreola-Lizárraga, F. Hoyos-Chairez, C. Cáceres-Martínez, R. Mendoza-Salgado, L. Martínez-Córdova, J. Chávez-Villalba. 2013. Ciclo gametogénico e índice de condición de la almeja *Chione fluctifraga* en Bahía San Jorge, Golfo de California, México. *Rev. Biol. Mar. Oceanogr.* 48:59-72.
- Castillo-Rodríguez, Z.G. 2009. Moluscos de interés alimenticio en México. *Noticiario de la Sociedad Española de Malacología* 53:39-41.
- Chávez-Villalba, J., J. Barret, C. Mingant, J.C. Cochard, M. Le Pennec. 2002. Autumn conditioning of the oyster *Crassostrea gigas*: A new approach. *Aquaculture* 210:171–186.
- Chávez-Villalba, J., J. Pommier, J. Andriamiseza, S. Pouvreau, J. Barret, J.C. Cochard, M. Le Pennec. 2002. Broodstock conditioning of the oyster *Crassostrea gigas*: origin and temperature effect. *Aquaculture* 214:115-130.
- Chávez-Villalba, J., J. Cochard, M. Le Pennec, J. Barret, M. Enríquez-Díaz, C. Cáceres-Martínez. 2003. Effects of the temperature and feeding regimes on gametogenesis and larval production in the oyster *Crassostrea gigas*. *J. Shellfish Res.* 22:721-731.
- Chávez-Villalba, J., J. Barret, C. Mingant, J. Cochard, M. Le Pennec. 2003. Influence of timing of broodstock collection on conditioning, oocyte production, and larval rearing of the oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), at six production sites in France. *J. Shellfish Res.* 22:465-474.
- Chávez-Villalba, J., R. Villelas-Ávila, C. Cáceres-Martínez. 2007. Reproduction, condition and mortality of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) in Sonora, México. *Aquac. Res.* 38:268-278.

- Chu, F.E., J. L. Dupuy, K. L. Webb. 1982. Polysaccharide composition of five algal species used as food larvae of the American oyster, *Crassostrea virginica*. *Aquaculture* 29:241-252.
- Darriba, S., J.F. San, A. Guerra. 2005. Energy storage and utilization in relation to the reproductive cycle in the razor clam *Ensis arcuatus* (Jeffreys, 1865). *ICES J. Mar. Sci.* 62:886-896.
- De la Parra, A.M., O. García, F. San Juan. 2005. Seasonal Variations on the biochemical composition and lipids classes of the gonadal and storage tissues of *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1794) in relation to the gametogenic cycle. *J. Shellfish Res.* 24:457-467.
- Delaporte, M., P. Soudant, J. Moal, C. Lambert, C. Quéré, P. Miner, G. Choquet, C. Paillard, J. F. Samain. 2003. Effect of a mono-specific algal diet on immune function in two bivalves species - *Crassostrea gigas* and *Ruditapes philippinarum*. *J. Exp. Biol.* 206:3053-3064.
- Delgado, M., A. Pérez-Camacho. 2007. Influence of temperature on gonadal development of *Ruditapes philippinarum* (Adams and Reeve, 1850) with special reference to ingested food and energy balance. *Aquaculture* 264:398-407.
- Domínguez, L., A. Villalba, J. Fuentes. 2010. Effects of photoperiod and the duration of conditioning on gametogenesis and spawning of the mussel *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck). *Aquac. Res.* 41:e807-e818.
- Dridi, S., M.S. Romdhane, M. Elcafsi. 2007. Seasonal variation in weight and biochemical composition of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* in relation to the gametogenic cycle and environmental conditions of the Bizert lagoon, Tunisia. *Aquaculture* 263:238-248.
- Duinker, A., C. Saout, Y.M. Paulet. 1999. Effect of photoperiod on conditioning of the great scallop. *Aquacult. Int.* 7:449-457.

- Fabioux, C., A. Huvet, P. Le Souchu, M. Le Pennec, S. Pouvreau. 2005. Temperature and photoperiod drive *Crassostrea gigas* reproductive internal clock. *Aquaculture* 250:458-470.
- FAO. 2012. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2012. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura - Departamento de pesca y acuicultura de la FAO. Italia, Roma. 231 p.
- Farfán, C., A.M. Espinoza-Peralta, O. Tapia-Vázquez. 1998. Dilación del desove *Modiolus capax* (Bivalvia:Mytilidae). *Rev. Biol. Trop.* 46:633-641.
- Farfán, C., M. Robles-Mungaray, S.J. Serrano-Guzmán. 2007. Seed production and growth on *Modiolus capax* CONRAD (Bivalvia: Mytilidae) in laboratory conditions. *J. Shellfish Res.* 26:1075–1080.
- Farías-Molina, A. 2001. Capítulo 5: Nutrición en moluscos pectínidos. Maeda-Martínez, A.N. (ed.). *Los Moluscos Pectínidos de Iberoamérica: Ciencia y Acuicultura*. LIMUSA. México. 89-104 pp.
- Fearman, J., C.J.S. Bolch, N.A. Moltschaniwskyj. 2009. Energy storage and reproduction in mussels, *Mytilus galloprovincialis*: The influence of diet quality. *J. Shellfish Res.* 28:305-312.
- Fearman, J., N.A. Moltschaniwskyj. 2010. Warmer temperatures reduce rates of gametogenesis in temperate mussels, *Mytilus galloprovincialis*. *Aquaculture* 305:20–25.
- Fernández, A., U. Grienke, A. Soler-Vila, F. Guihéneuf, D. B. Stengel, D. Tasdemir. 2015. Seasonal and geographical variation in the biochemical composition of the blue mussel (*Mytilus edulis* L.) from Ireland. *Food Chem.* 177:43-52.
- Fernández-Reiriz, M.J., U. Labarta, M. Albentosa, A. Pérez-Camacho. 1998. Effect of microalga diet and commercial wheatgerm flours on the lipid profile of *Ruditapes decussatus* spat. *Comp. Biochem. Physiol.* 229:369-377.

- Fernández-Reiriz, M.J., U. Labarta, M. Albentosa, A. Pérez-Camacho. 1999. Lipid profile and growth of the clam spat, *Ruditapes decussatus* (L), fed with microalgal diets and cornstarch. *Comp. Biochem. Physiol.* 14:309-318.
- Fernández-Reiriz, M.J., L. Freites, U. Labarta. 2003. Biochemical composition and energy content of the mussel *Mytilus galloprovincialis* of subtidal and rocky shore origin: Influence of environmental variables and source of mussel seed. *Cienc. Mar.* 29: 603–619.
- Figueras, A. 2007. *Biología y Cultivo del Mejillón (Mytilus galloprovincialis) en Galicia*. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. España, Madrid. 284 pp.
- Fonseca-Rodríguez, C., C. Marín-Vindas, F. Chavarría-Solera, R.A. Cruz, P. Toledo-Agüero. 2011. Variación estacional de la composición proximal del mejillón *Tagelus peruvianus* (Bivalvia: Solecurtidae) del Golfo de Nicoya, Puntarenas, Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* 59:1517-1523.
- Gabbott, P.A., A.J.M. Walker. 1971. Changes in the condition index and biochemical content of adult oyster (*Ostrea edulis* L.) maintained under hatchery conditions. *J. Cons. int. Explor. Mer.* 34:99-106.
- Gabbott, P.A. 1976. Chapter 8: Energy metabolism. Bayne B.L. (ed.). *Marine mussels: their ecology and physiology*. CAMBRIDGE. Great Britain. 293-357 pp.
- Gabbott, P.A., K. Peek. 1991. Cellular biochemistry of the mantle tissue of the mussel *Mytilus edulis* L. *Aquaculture* 94:165-176.
- Gallager, S.M., R. Mann. 1986. Growth and survival of larvae *Mercenaria mercenaria* (L.) and *Crassostrea virginica* (Gmelin) relative to broodstock conditioning and lipid content of eggs. *Aquaculture* 56:105-121.

- García-Corona, J.L. 2014. Dinámica anual de la estrategia, esfuerzo reproductivo y calidad ovocitaria del mejillón *Modiolus capax* (Bivalvia: Mytilidae; Conrad 1837) en bahía de La Paz, B.C.S., México. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Baja California Sur. 128 p.
- Gómez-Robles, E., C. Rodríguez-Jaramillo, P.E. Saucedo. 2005. Digital image analysis of lipid and protein histochemical markers for measuring oocyte development and quality in pearl oyster *Pinctada mazatlanica* (Hanley, 1856). J. Shellfish Res. 24:1197-1202.
- Gómez-Robles, E., J.M. Mazón-Suástegui, H. Acosta-Salmón, M. Hawkyns-Martínez, P.E. Saucedo. 2013. Internal nutrient management associated with gonad quality and successful reproduction in the winged pearl oyster *Pteria sterna*. Aquaculture 412-413:45-51.
- Gómez-Robles, M. E. 2013. Evaluación de la calidad gonádica de la concha nácar *Pteria sterna* (Gould, 1851) y su influencia en la viabilidad larvaria. Tesis de maestría. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. La Paz, Baja California Sur. 97p.
- Gonzales-Araya, R., C. Mingant, B. Petton, R. Robert. 2012. Influence of diet assemblage on *Ostrea edulis* broodstock conditioning and subsequent larval development. Aquaculture 364-365:272-280.
- Hall, J. M., C.C. Parrish, R.J. Thompson. 2002. Eicosapentaenoic Acid Regulates Scallop (*Placopecten magellanicus*) Membrane Fluidity in Response to Cold. Biol. Bull. 202:201-203.
- Hatcher, A., J. Grant, B. Schofield. 1997. Seasonal changes in the metabolism of cultured mussels (*Mytilus edulis* L.) from Nova Scotia inlet: the effects of winter ice cover and nutritive stress. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 217:63-78.

- Hawkins, A.J.S., P.N. Salkeld, B.L. Bayne, E. Gnaiger, D.M. Lowe. 1985. Feeding and resource allocation in the mussel *Mytilus edulis*: evidence for time-averaged optimization. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 20:273-287.
- Helm, M.M., N. Bourne. 2006. Cultivo de bivalvos en criadero. Un manual práctico. FAO Documento Técnico de Pesca. No. 417. Roma, FAO. 184 p.
- Humason, G.L. 1962. *Animal Tissue Techniques*. W.H. Freeman and Company. United States of America. 468 p.
- Huvet, A., J.Y. Daniel, C. Quéré, S. Dubois, M. Prudence, A. Van Wormhoudt, D. Sellos, J.F. Samain, J. Moal. 2003. Tissue expression of two  $\alpha$ -amylase genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Effects of two different food rations. *Aquaculture* 228:321-333.
- Kamermans, P., T. Galley, P. Boudry, J. Fuentes, H. McCombir, F.M. Batista, A. Blanco, L. Dominguez, F. Cornette, L. Pincot, A. Beaumont. 2013. Chapter 11: Blue mussel technology in Europe. Allan Geoff & Burnell Gavin (ed.). *Advances in aquaculture hatchery technology*. Woodhead Publishing Series in Food Science, Tech. Nutr. 339-373 pp.
- Knauer, J., P.C. Southgate. 1999. A Review of the Nutritional Requirements of Bivalves and the Development of Alternative and Artificial Diets for Bivalve Aquaculture. *Rev. Fish. Sci.* 7:241-280.
- Kreeger, D.A. 1993. Seasonal patterns in utilization of dietary protein by the mussel *Mytilus trossulus*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 95:215-232.
- Lagos, L., I. Uriarte, G. Yanyc. 2012. Evaluación del potencial reproductivo del chorito (*Mytilus chilensis*) de dos poblaciones naturales sometidas a diferentes temperaturas de acondicionamiento. *Lat. Am. J. Aquat. Res.* 40:389-397.

- Laing, I., J. López-Alvarado. 1994. Effect of dried algae diets on conditioning and fecundity of Manila clam, *Tapes philippinarum* ( Adams and Reeve ). *Aquacult. fish. manage.* 25:157–166.
- Lango-Reynoso, F., J. Chávez-Villalba, J. Claude-Cochard, M. Le-Pennec. 2000. Oocyte size, mean to evaluate the gametogenic development of the pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture* 190:183-199.
- Langton, R.W. 1977. Digestive rhythms in the mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.* 41:53-58.
- Lannan, J.E., A. Robinson, W.P. Breese. 1980. Broodstock management of *Crassostrea gigas* II. Broodstock conditioning to maximize larval survival. *Aquaculture* 21:337-345.
- Liu, W., A.O. Alabi, C.M. Pearce. 2008. Broodstock conditioning in the basket cockle, *Clinocardium nutallii*. *J. Shellfish Res.* 27:399-404.
- Mackie, G.L. 1984. Bivalves. Wilbur-Karl, M., Tompa, A.S., Verdonk, N.H., Van Den-Biggelaar, J.A.M. (ed.). *The Mollusca volume 7: Reproduction*. ACADEMIC PRESS, Orlando, Florida. 7:351-402.
- Maeda-Martínez, A.N. 2008. Estado actual del cultivo de bivalvos en México. En Lovatelli, A., Farías, A., Uriarte, I. (eds). *Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina*. Taller Técnico Regional de la FAO. 20–24 de Agosto de 2007, Puerto Montt, Chile. *FAO Actas de Pesca y Acuicultura*. No. 12. Roma, FAO. 91–100 pp.
- Martínez, G., C. Aguilera, L. Mettifogo. 2000. Interactive effects of diet and temperature on reproductive conditioning of *Argopecten purpuratus* broodstock. *Aquaculture* 183:149–159.

- Martínez, G., K. Brokordt, C. Aguilera, V. Soto, H. Guderley. 2000. Effect of the diet and temperature upon muscle metabolic capacities and biochemical composition of gonad and muscle in *Argopecten purpuratus* (Lamarck 1819). J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 247: 29-49.
- Martínez-Pita, I., C. Sánchez-Lazo, E. Prieto, O. Moreno. 2011. The effect of diet on gonadal development of the smooth venus clam *Callista chione* (Mollusca:Bivalvia). J. Shellfish Res. 30:295-301.
- Martínez-Pita, I., C. Sánchez-Lazo, I. Ruíz-Jarabo, M. Herrera, J.M. Mancera. 2012. Biochemical composition, lipid classes, fatty acids and sexual hormones in the mussel *Mytilus galloprovincialis* from cultivated populations in south Spain. Aquaculture 358–359:274–283.
- Matias, D., S. Joaquim, A. Leitao, C. Massapina. 2009. Effect of geographic origin, temperature and timing of broodstock collection on conditioning, spawning success and larval viability of *Ruditapes decussatus* (Linné, 1758). Aquacult. Int. 17:257-271.
- Mazón-Suástegui, J.M., 1987. Evaluación de cinco dietas microalgales en el crecimiento larval de *Modiolus capax* (CONRAD, 1837) y *Pinctada mazatlanica* (HANLEY, 1845) (MOLLUSCA BIVALVIA). Tesis de Maestría. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, Instituto Politécnico Nacional, México. 70 p.
- Mazón-Suástegui, J.M. 1988. Acondicionamiento y desove de cuatro especies de moluscos bivalvos, alimentados con dietas artificiales. Rev. Lat. Acuic. 38:4-13.
- Mazón-Suástegui, J.M., 2005. Biología y cultivo de la almeja catarina *Argopecten ventricosus* (Sowerby II, 1842). Tesis Doctoral. Universidad de Barcelona. Barcelona, España. 217 p.

- Mazón-Suástegui, J.M., K.M. Ruíz-Ruíz, A. Parres-Haro, P.E. Saucedo. 2008. Combined effect of diet and stocking density on growth and biochemical composition of spat of the cortex oyster *Crassostrea corteziensis* at the hatchery. *Aquaculture* 284:98-105.
- Mazón-Suástegui, J.M., A. Parres-Haro, K.M. Ruíz-Ruíz, C. Rodríguez-Jaramillo, P.E. Saucedo. 2009. Influence of hatchery diets on early grow-out of the Cortex oyster *Crassostrea corteziensis* in Sinaloa, México. *Aquac. Res.* 40:1908-1914.
- Mazón-Suástegui, J.M., M. Osuna, P. Ormart, P.E. Saucedo. 2009. 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 .Poster.
- Melo-Ruíz, V., O. Cuamatzi. 2006. *Bioquímica de los Procesos Metabólicos*. Editorial REVERTÉ EDICIONES, S.A. DE C.V. México. 365 p.
- Mladineo, I., M. Peharda, S. Orhanovic, J. Bolotin, M. Pavela-Vranc, B. Treursic. 2007. The reproductive cycle, condition index and biochemical composition of the horse-bearded mussel *Modiolus barbatus*. *Helgol. Mar. Res.* 61:183–192.
- Muller-Feuga, A. 2000. The role of microalgae in aquaculture: situation and trends. *J. Appl. Phycol.* 12:527-534.
- Meneghetti, F., V. Moschino, L. Da Ros. 2004. Gametogenic cycle and variation in oocyte size of *Tapes philippinarum* from the lagoon of venice. *Aquaculture* 240:473-488.
- Muranaka, S.M., J.E. Lannan.1984. Broodstock management of *Crassostrea gigas*: enviromental influences on broodstock conditioning. *Aquaculture* 39:217-228.
- Navarro, J.M., G.E. Leiva, G. Martinez, 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. Capítulo 3: Fisiología energética de pectínidos iberoamericanos. Maeda-Martínez, A.N. (ed.). Los Moluscos Pectínidos de Iberoamérica: Ciencia y Acuicultura. LIMUSA. México. 61-76 pp.
- Ochoa-Báez, R.I. 1987. Aspecto de la Biología del mejillón *Modiolus capax* (Conrad, 1837), en la bahía de La Paz, B.C. Sur, México. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional. México. 173 p.
- Ojea-Ramírez, J., J.I. Cáceres-Piug, 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. *Aquac. Res.* 39:18-23.
- Palacios, E., I.S. Racotta, E. Kraffe, Y. Marty, J. Moal, J.F. Samain. 2005. Lipid composition of the giant lion's-paw scallop (*Nodipecten subnodosus*) in relation to gametogenesis I. Fatty acids. *Aquaculture* 250:270-282.
- Parres-Haro, M.A. 2008. Evaluación en campo del crecimiento y condición de semilla de ostión de placer *Crassostrea corteziensis* (Hertlein 1951) alimentada con diferentes dietas naturales y artificiales en laboratorio. Tesis de licenciatura. Instituto Tecnológico de los Mochis. México. 86 p.
- Paulet, Y.M., J. Boucher. 1991. Is reproduction mainly regulated by temperature or photoperiod in *Pecten maximus*? *Invertebr. Reprod. Dev.* 19:61-70.
- Peharda, M., I. Mladineo, J. Bolotin, L. Kekez, B. Skaramuca. 2006. The reproductive cycle and potential protandric development of the Noah's shell, *Arca noae* L.: Implication for aquaculture. *Aquaculture* 252:317-327.
- 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.

- Pirini, M., M.P. Manuzzi, A. Pagliarani, F. Trombetti, A. R. Borgatti, V. Ventrella. 2007. Changes in fatty acid composition of *Mytilus galloprovincialis* (Lmk) fed on microalgal and wheat germ diets. *Comp. Biochem. Phys.* 147:616-626.
- Pogoda, B., B.H. Buck, R. Saborowski, W. Hagen. 2013. Biochemical and elemental composition of the offshore-cultivated oyster *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas*. *Aquaculture* 400-401:53-60
- Pronker, A.E., N.M. Nevejan, F. Peene, P. Geijssen, P. Sorgeloos. 2008. Hatchery broodstock conditioning of the blue mussel *Mytilus edulis* (Linnaeus 1758). Part I. Impact of different micro-algae mixtures on broodstock performance. *Aquacult. Int.* 16:297–307.
- Racotta, I.S., J.L. Ramirez, A.M. Ibarra, C. Rodríguez-Jaramillo, D. Carreño, E. Palacios. 2003. Growth and gametogenesis in the lion-paw scallop *Nodipecten* (*Lyropecten*) *subnodosus*. *Aquaculture* 217:335-349.
- Rathan-Sreedevi, P., V. Uthayakumar, R. Jayakumar, V. Ramasubramanian. 2014. Influence of rearing water temperature on induced gonadal development and spawning behaviour of tropical green mussel, *Perna viridis*. *Asian Pac. J. Reprod.* 3:204-209.
- Rodríguez-Astudillo, S., M. Villalejo-Fuerte, F. García-Dominguez, R. Guerrero-Caballero, R. Ramírez-Sevilla. 2007. Composición bioquímica del ostión *Hytotissa hyotis* (Linnaeus, 1758) durante La Niña 1998-1999 y El Niño 1997-1998 en el golfo de california. *Rev. Biol. Mar. Oceanogr.* 42:393-402.
- Rodríguez-Jaramillo, C. 2004. Efecto de la temperatura sobre la gametonénesis en el callo de hacha *Atrina maura* (Sowerby, 1835) (Bivalvia:Pinnidae). Tesis de Maestría. Instituto Politecnico Nacional. México. 74p.

- Rodríguez-Jaramillo, 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.* 27:1129-1141.
- Roe, J.H., J.M. Bailey, R.R. Gray, J.N. Robinson. 1961. Complete removal of glycogen from tissues by extraction with cold trichloroacetic acid solution. *The J. Biol. Chem.* 236:1244-1246.
- Román, G., G. Martínez, O. García, L. Freitas. 2001. Capítulo 2: Reproducción. Maeda-Martínez, A.N. (ed.). *Los Moluscos Pectínidos de Iberoamérica: Ciencia y Acuicultura*. LIMUSA. México. 27-59 pp.
- SAGARPA-INAPESCA. 2012. Carta Nacional de Pesca 2012. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Instituto Nacional de Pesca. Diario Oficial de la Federación. México, D.F. Agosto. 2: 59-60.
- Saout, C., C. Quéré, A. Donval, Y. Paulet, J. Samain. 1999. An experimental study of the combined effects of temperature and photoperiod on reproductive physiology of *Pecten maximus* from the Bay of Brest (France). *Aquaculture* 172:301-314.
- Saucedo, P.E., C. Rodríguez-Jaramillo, C. Aldana-Avilés, P. Monsalvo-Spencer, T. Reynoso-Granados, H. Villarreal, M. Monteforte. 2001. Gonadic conditioning of the calafia mother-of-pearl oyster, *Pinctada mazatlanica* (Hanley, 1856), under two temperature regimes. *Aquaculture* 195:103-119.
- Saucedo, P.E., A. Martínez-López, J. Cáceres-Piug. 2009. Interactive effects of temperature and diet on the growth and biochemical composition of juveniles of the pearl oyster *Pinctada mazatlanica*. *Aquac. Res.* 40:1301-1309.
- Shumway, S.E., R.C. Newell. 1984. Energy resource allocation in *Mulinia lateralis* (Say), an opportunistic bivalve from shallow water sediments. *OPHELIA* 23:101-118.

- Smith, P.K., R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goeke, B.J. Olson, D.C. Klenk. 1985. Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. *Anal. Biochem.* 150:76-85.
- Stanley-Samuelson, D.W. 1994. The Biological Significance of Prostaglandins and Related Eicosanoids in Invertebrates. *Amer. Zool.* 34:589-598.
- Sühnel, S., F. Lagrese, G. Zanette, A.R.M. Magalhães, J.F. Ferreira. 2012. Effect of the fatty acid EPA and DHA in the conditioning of the scallop *Nodipecten nodosus* (Linné, 1758). *Aquaculture* 330-333:167-171.
- Sühnel, S., F. Lagreze, A. Pereira, F.C. Da Silva, H. Gurney-Smith, M. Bercht, M. Maraschin, A.R.M. Magalhaes, J.F. Ferreira. 2014. Effects of astaxanthin on reproductive success in the tropical scallop *Nodipecten nodosus* (Linnaeus, 1758). *J. Shellfish Res.* 33:89-98.
- Taylor, A.C., T.J Venn. 1979. Seasonal variation in weight and biochemical composition of the tissues of the queen scallop, *Chamys opercularis*, from the clyde sea area. *J. Mar. Biol. Ass. U. K.* 59:605-621.
- Timberlake, K.C. 2011. Química Una introducción a la Química General Orgánica y Biológica. PEARSON. Decima edición. Madrid. España. 760 p.
- Urban, E.R., C.J. Langdon. 1984. Reduction in costs of diets for the american oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin), by the use of non-algal supplements. *Aquaculture* 38:277-291.
- Uriarte, I., A. Farías, J. Hernandez, 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 broodstocks and the subsequent effect on egg quality and larval viability. *Aquaculture* 155:45-54.

- Utting, S.D., P.F. Millican. 1998. The role of the diet in hatchery conditioning of *Pecten maximus* L.: a review. *Aquaculture* 165:167-178.
- Velasco, L.A. 2007. Energetic physiology of the caribbean scallops *Argopecten nucleus* and *Nidopecten nodosus* fed with different microalgal diets. *Aquaculture* 299-311.
- Volkman, J.K., S.W. Jeffrey, P.D. Nichols, G.I. Rogers, C.D. Garland. 1989. Fatty acid and lipid composition of 10 species of microalgae used in mariculture. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 128: 219-240.
- Volkman, J.K., M.R. Brown. 2005. Nutritional value of microalgae and applications. Subba-Rao, D.V. (ed.). *Algal Cultures, Analogues of Blooms and Applications* (ed. by D.V. Subba-Rao). Science Publishers, Enfield, USA. 407-457 pp.
- Wacker, A., E. Elert. 2003. Food quality controls reproduction of the *zebra mussel* (*Dreissena polymorpha*). *Oceanología* 135:332-338.
- Widdows, J. 1978. Physiological indices of stress in *Mytilus edulis*. *J. Mar. Biol. Ass. U. K.* 58:125-142.
- Whyte, J.N.C., N. Bourne, N.G. Ginther. 1990. Biochemical and energy changes embryogenesis in the rock scallop *Crassadoma gigantea*. *Mar. Biol.* 106:239-244.
- Whyte, J.N.C., N. Bourne, N.G. Ginther. 1991. Depletion of nutrient reserves during embryogenesis in the scallop *Patiopecten yessoensis* (Jay). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 149:67-79.
- Wilson, J.A, O.R. Chaparro, R.J. Thompson. 1996. The importance of broodstock nutrition on the viability of larvae and spat in the Chilean oyster *Ostrea chilensis*. *Aquaculture* 139:63-75.
- Yan, H., Q. Li, R. Yu, L. Kong. 2010. Seasonal variations in biochemical composition and reproductive activity of venus clam *Cyclina sinensis* (Gmelin) from the yellow

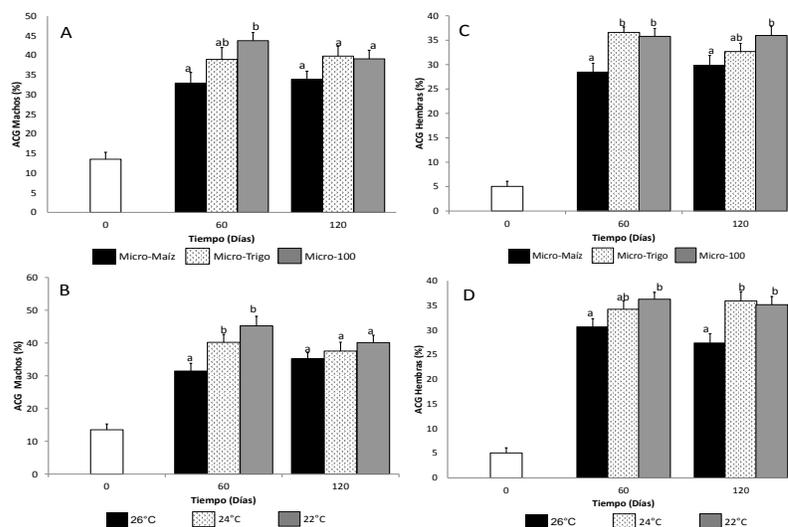
river delta in northern China in relation to environmental factors. J. shellfish Res. 29:91-99.

Zhukova, N.V., N.A. Aizdaicher. 1995. Fatty acid composition of 15 species of marine microalgae. Phytochemistry. 39:351-356.

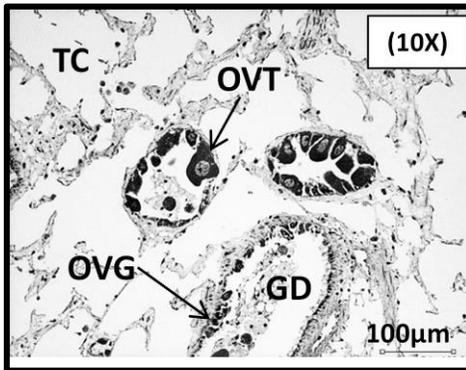
Zandee, D.I., J.H. Kluytmans, W. Zurburg. 1980. Seasonal variation in biochemical composition of *Mytilus edulis* with reference to energy metabolism and gametogenesis. Neth. J. Sea Res. 14:1-29.

Zwaan, A., D.I. Zandee. 1972. Body distribution and seasonal changes in the glycogen content of common sea mussel *Mytilus edulis*. Comp. Biochem. Physiol. 43:53-58.

## 11. ANEXOS



Anexo.1. Variaciones en el área de cobertura gonádica (ACG) promedio de reproductores machos por efecto de alimento (A) y temperatura (B) y hembras por efecto de alimento (C) y temperatura (D) de *M. capax*. Las barras muestran la media  $\pm$  error estándar. Las letras muestran diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA  $P < 0.05$ ).



Anexo 2. Reproductor hembra del mejillón *M. capax* en estadio de postdesove con presencia de escuelas de ovogonias. OVT. Ovovitelogénico temprano. OVG. Ovogonia. TC. Tejido conjuntivo. GD. Gonoducto.