



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS  
DEL NOROESTE, S.C.

---

Programa de Estudios de Posgrado

**Efecto de los ácidos grasos altamente insaturados (HUFA)  
en la reproducción del ostión de placer**

*Crassostrea corteziensis*  
(Hertlein, 1951)

**T E S I S**

Que para obtener el grado de

**Doctor en Ciencias**

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

P r e s e n t a

Miguel Ángel Hurtado Oliva

La Paz, Baja California Sur, a 1 de Diciembre del 2008

## ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 12 horas del día 24 del Mes de Noviembre del 2008, 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 los ácidos grasos altamente insaturados (HUFA) en la reproducción del ostión de Placer *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1951)**

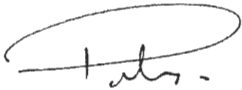
Presentada por el alumno:

Miguel Ángel Hurtado Oliva

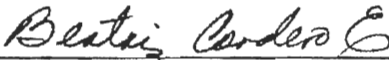
Aspirante al Grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN Acuacultura

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



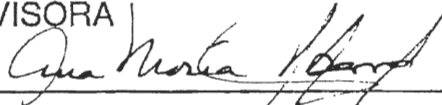
Dra. Elena Palacios Mechetnov  
DIRECTORA DE TESIS



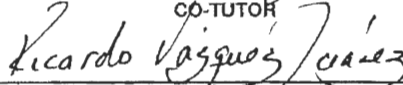
Dra. Beatriz Cordero Esquivel  
CO-TUTOR



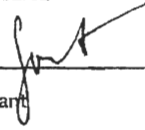
Dr. Ilie Racotta Dimitrov  
REVISOR



Dra. Ana María Ibarra Humpries  
CO-TUTOR



Dr. Ricardo Vázquez Juárez  
CO-TUTOR



Dr. Philippe Soudant  
CO-TUTOR



DRA. THELMA ROSA CASTELLANOS CERVANTES  
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

## **COMITÉ TUTORIAL**

Dra. Elena Palacios Mechetnov  
Dra. Ana María Ibarra Humpries  
Dra. Beatriz Cordero Esquivel  
Dr. Philippe Soudant  
Dr. Ricardo Vázquez Juárez

## **COMITÉ REVISOR DE TESIS**

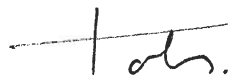
Dra. Elena Palacios Mechetnov  
Dra. Ana María Ibarra Humpries  
Dr. Ilie Racotta Dimitrov  
Dr. Philippe Soudant  
Dr. Ricardo Vázquez Juárez

## **JURADO DE EXAMEN DE GRADO**

Dra. Elena Palacios Mechetnov  
Dra. Ana María Ibarra Humpries  
Dr. Ilie Racotta Dimitrov  
Dr. Philippe Soudant  
Dr. Jorge Eduardo Chávez Villalba  
Dr. Marcial Arellano (suplente)

El ostión de placer *Crassostrea corteziensis* es una especie endémica de los litorales del Pacífico de México, adaptado a temperaturas altas de ambientes semi-tropicales, en contraste con el ostión *C. gigas*, introducido en México de climas templados. Actualmente, el cultivo de *C. corteziensis* se sustenta en la captura de semilla del medio natural y se desconoce la forma de madurar a los ostiones durante el cautiverio. En un ciclo reproductivo (Abr-05 a Abr-06) de hembras de *C. corteziensis* provenientes de Laguna de Ceuta, Sinaloa, observamos ovocitos en vitelogénesis durante 11 meses del año, con la mayor proporción de organismos inmaduros en invierno del 2005. Los principales desoves ocurrieron en Junio y Septiembre del 2005, cuando la temperatura superficial del mar alcanzó los 25 y 30°C, respectivamente. La mayor concentración de ácidos grasos altamente insaturados en los lípidos de reserva se encontró en Abril-Mayo del 2005 y de Enero a Abril del 2006, lo cual concuerda con la mayor frecuencia de hembras maduras. El análisis de componentes principales revela que los ovocitos postvitelogénicos de *C. corteziensis* están correlacionados con la proporción de 20:5n-3 en las reservas, con los lípidos totales y con los esteroides esterificados. La correlación positiva entre lípidos totales y carbohidratos y su mayor acumulación durante la maduración en primavera-verano del 2005 sugiere que los ostiones son parcialmente oportunistas. La correlación entre la proporción de 18:4n-3 y los carotenoides en el invierno sugiere que en este periodo los ostiones se alimentan principalmente de dinoflagelados; mientras que la variación en la composición de 14:0 y 20:5n-3 durante la maduración sugiere que los ostiones se alimentan principalmente de diatomeas. Por otro lado, se realizaron cuatro experimentos de maduración en cautiverio utilizando diferentes dietas de microalgas y emulsiones de lípidos. El acondicionamiento se realizó entre los 24 y 28°C en base a los resultados del ciclo reproductivo y se ensayaron distintas cantidades de alimento ( $2$  a  $4 \times 10^9$  células/ostión/día) encontrándose los mejores resultados con la mayor densidad celular (5% de biomasa de algas en relación al peso inicial de los ostiones, ambos en peso seco). Se observó que la gametogénesis y vitelogénesis de ostiones en cautiverio fue estimulada cuando se alimentaron con diatomeas, principalmente con *C. gracilis*, la cual contiene importantes cantidades de carbohidratos, colesterol y 20:5n-3. En un experimento se comparó dos sistemas de alimentación, uno continuo por goteo y otro administrando alimento en una sola ración al día, encontrándose que éste último favoreció el desempeño reproductivo de ostiones. El suplementar ácido araquidónico (20:4n-6) a través de emulsiones de lípidos al 10% de la biomasa junto con la dieta de microalgas promovió estadios de maduración más avanzados de *C. corteziensis*, sin embargo, los niveles altos de 20:4n-6 pueden comprometer la capacidad de respuesta del sistema inmune y con ello incrementar la susceptibilidad e inducir la mortalidad de los ostiones.

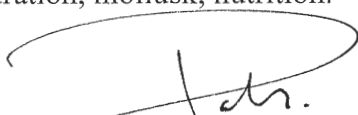
Palabras clave: ARA, EPA, Maduración, Molusco, Nutrición.



Dra. Elena Palacios Mechetnov  
Directora

The pleasure oyster *Crassostrea corteziensis* is an endemic sub-tropical species of the east Pacific coast of Mexico and it is well adapted to high temperatures, in contrast to *C. gigas*, which was introduced in Mexico from temperate climates. The pleasure oyster production is sustained from spat collected from natural beads and the knowledge to mature this species in captivity is lacking. In a reproductive cycle (Apr-05 to Apr-06) in females of *C. corteziensis* from Laguna de Ceuta, Sinaloa, we observed vitellogenic oocytes over 11 months of the year, with higher number of immature oyster in winter of 2005. Spawning were observed in June and September 2005, when temperature reached 25 and 30°C, respectively. A higher concentration of highly unsaturated fatty acids in reserves was found in April-May 2005 and from January to April 2006, when there was a higher frequency of mature females. A principal component analysis showed that higher frequency of postvitellogenic oocytes is correlated with the proportion of 20:5n-3 in reserves, with total lipids and with esterified sterols. A positive correlation between total lipids and carbohydrates, and their accumulation during maturation in spring and summer, suggests a partial opportunistic strategy of *C. corteziensis* in this lagoon. The positive correlation between 18:4n-3 and carotenoids suggest that during winter oyster feed mainly on dinoflagellates; while the seasonal composition of 14:0 and 20:5n-3 suggests that oysters feed mainly on diatoms during maturation. In addition to the cycle, four maturation experiments were done using different microalgae diets and lipid emulsions. Conditioning temperature was maintained between 24 and 28°C, based on the reproductive cycle results, and different food rations were used (2 and  $4 \times 10^9$  cells/oyster/day), with better performance of oyster with a higher cellular density (5% of algal biomass in relation to initial oyster weight, both in dry weight). We observed that gametogenesis and vitellogenesis was promoted when oysters were fed with diatoms, probably as a result of their high content of carbohydrates, cholesterol, and 20:5n-3. We compared two feeding systems, a continuous by dripping and a batch system, in which the microalgae were supplied once daily and we found a better reproductive performance with the later. The supplementation of arachidonic acid (20:4n-6) as lipid emulsion at 10% of oyster biomass with microalgae promoted a more advanced stage of maturation of *C. corteziensis*, however higher values of 20:4n-6 in diet can compromise the immune response, and probably, promote higher mortality rates.

Keywords: ARA, EPA, maturation, mollusk, nutrition.



Dr. Elena Palacios Mechetnov  
Director

## **DEDICATORIA**

A mis **PADRES, MIGUEL y YOLANDA**, su motivación y cariño son indispensables para lograr cualquier meta, sin ustedes esto no hubiera sido posible. **GRACIAS POR DARME SIEMPRE SU APOYO.**

A mi hermano **GABRIEL**, cuñada **NANCY** y sobrino **LALO**, aunque en la distancia siempre los tengo presentes y les guardo mucho cariño.

A mis abuelos **FRANCISCO y PETRA** (q.e.p.d) gracias por permanecer siempre en mi memoria.

A mi esposa **MARLENNE**, siempre has sido un ejemplo y mi mayor motivación, gracias por permanecer siempre a mi lado. Sabes bien que este logro es compartido y que tu gran apoyo fue parte del éxito de este trabajo, el cual te dedico con mucho cariño, gracias por todo.

A mi **FAMILIA ZAMBRANO-SARABIA**, que tanto me han apoyado, principalmente a **EVELYN y ARIADNA “PACHITA”**, la cual espero conocer pronto.

Una especial dedicatoria a la Maestra **PILAR TORRES**, que siempre nos ha hecho llegar su enorme apoyo y cariño, gracias por estar siempre con **NOSOTROS**.

A **OLIVIA ARJONA**, han sido 7 años de duro trabajo, sin embargo siempre disfrutamos hacerlo. Agradezco mucho tu paciencia y apoyo, tanto dentro como fuera del laboratorio. Aprendí mucho de ti en todo este tiempo. Te dedico la culminación de esta investigación, y muchas gracias por tu amistad.

A las chicas de laboratorio, a **APOLINAR** con sus ocurrencias tan peculiares y que **ROSY** con su creatividad e ingenio plasmó en sus dibujos, logrando con ello amenizar la jornada. Así como a las chicas serias del grupo **VERÓNICA, MÓNICA y ATZÍN**.

A todos mis viejos amigos, **JAVIER, CLAUDIA, LULÚ, PAMELA, PAOLA, JENNY, RICARDO, RAÚL, GEORGINA, EVELYN, CHELINO, DAVID y ENRIQUE**; así como a todos mis amigos que aún se encuentran cerca: **ARTURO, GLORIA, LAURA**

**CELIS, AZUCENA, VOLKER, KARINA, GISELA, MIGUEL, FRANCISCO  
MADRIÑAN, MANUEL LOBATO, SCARRY, RAFA, PONCHO, LAURA RIVERA,  
HERVEY, MIRELLA, MARCOS y EDOUARD.**

**LAURANCE y LUÍS, gracias por estar siempre cerca.**

## **AGRADECIMIENTOS**

A los proyectos que financiaron el desarrollo y conclusión de esta tesis:

Desarrollo de una biotecnología alterna para la producción de ostión *C. corteziensis*: Domesticación y conformación de pie de cría, producción de triploides y tetraploides – **SAGARPA–CONACYT 2003–02–035**, a cargo de la **DRA. ANA MARIA IBARRA**.

Niveles de prostaglandinas en relación al suplemento nutricional de HUFA y su efecto sobre la reproducción y la respuesta inmunológica en dos modelos biológicos: ostiones y peces **SEP-CONACYT 24333–CB–2005–01–49191**, a cargo de la **DRA. ELENA PALACIOS**.

Al proyecto para apoyo a congresos internacionales de **CONACYT 2008**, “Physiological aspects of reproduction, nutrition and growth: Marine molluscs in a changing environment” responsable **E. PALACIOS**, por el apoyo para la transportación aérea a Brest, Francia.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACYT**) por el apoyo económico otorgado a través de la beca no. 166359.

A la Dirección de Posgrado a cargo de la **DRA. THELMA R. CASTELLANOS C.** por las facilidades otorgadas para la conclusión de este trabajo, así como por los apoyos otorgados para asistir a los congresos internacionales de World Aquaculture Society en Florencia, Italia 2006 y Physiomar en Brest, Francia 2008. También por el apoyo otorgado para la reunión de los integrantes de mi comité tutorial para la defensa de tesis. Y muy especialmente a **OSVELIA IBARRA, LETICIA GONZÁLEZ, BEATRIZ GÁLVEZ, CLAUDIA OLACHEA, GUADALUPE SÁNCHEZ, HORACIO SANDOVAL** y **MANUEL MELERO** parte fundamental del buen funcionamiento de este departamento, por sus atenciones, Muchas Gracias.

A MIS ASESORES, **DRA. ELENA PALACIOS, DRA. ANA MARÍA IBARRA, DRA. BEATRIZ CORDERO, DR. RICARDO VÁZQUEZ** y **DR. PHILIPPE SOUDANT**,



por su esfuerzo, dedicación y gran entusiasmo que mostraron durante todo el proceso que llevó culminar éste trabajo. También quiero agradecerles todos los comentarios y sugerencias que fortalecieron mi formación como profesionalista, pero particularmente por aquellos que me hicieron mejor persona. **ELENA**, sin duda aprendí muchas cosas de ti. Agradezco el entusiasmo y profesionalismo que has puesto durante todos estos años, después de todo lo logramos. **GRACIAS POR TODO**.

Agradezco particularmente al **DR. PHILIPPE SOUDANT** todas sus atenciones desde nuestro primer encuentro en Brest, Francia, las cuales se mantuvieron a pesar de la distancia. Todos sus comentarios siempre enriquecieron los resultados de esta investigación y la cual culmina en este documento. Espero que podamos trabajar juntos en el futuro. Fue fascinante conocerte **PHILIPPE**.

Agradezco las facilidades otorgadas por el **INSTITUT UNIVERSITAIRE EUROPÉEN DE LA MER** de la **UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE**, y particularmente al personal del **LABORATOIRE DES SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT MARIN** por todas sus atenciones y facilidades otorgadas durante mi estancia en **BREST, FRANCIA**.

Un agradecimiento muy especial al **DR. ILIE RACOTTA** por revisar minuciosamente este documento, así como por todas las sugerencias e ideas que aportó para mejorar mi tesis.

A los **DRS. JORGE CHÁVEZ VILLALBA, CONCEPCIÓN LORA** y **MARCIAL ARRELLANO** quienes aportaron sus comentarios durante mi examen predoctoral y ahora participan como sinodales en mi defensa de tesis.

Al ingeniero **JORGE GUEVARA** de Ostrícola Guevara por la donación de los ostiones utilizados para la evaluación del ciclo del ciclo reproductivo del ostión. Así mismo quiero agradecer la hospitalidad a los pescadores de las cooperativas de Boca de Camichín, Nayarit, particularmente al biólogo **MARCOS LOZA**.

Al Comité de Sanidad Acuícola del Estado de Nayarit (**CESANAY**), y particularmente a la oceanóloga **GLORIA PADILLA** por su disponibilidad y comentarios.

Quiero agradecer especialmente a **JOSÉ LUÍS RAMÍREZ, GABRIEL GONZÁLEZ y J. MANUEL MACKLIZ**, por su apoyo en la parte experimental y cultivo de microalgas. También quiero agradecer a todas aquellas personas que me apoyaron en el muestreo, preparación y análisis de muestras: **OLIVIA ARJONA, LAURANCE MERCIER, MONICA REZA, FABIOLA ARCOS, CYNTHIA NAYELLI BECERRA VALDÉZ y FRANK URIEL PÉREZ BANDERAS** *NO SE ME OLVIDA SU EXTRAORDINARIO APOYO.*

A todos los técnicos de cada uno de los múltiples laboratorios del CIBNOR en que me permitieron hacer parte de mi tesis: **JOSÉ LUÍS RAMÍREZ, SUSANA ÁVILA, OLIVIA ARJONA, ROBERTO HERNÁNDEZ, DIANA CARREÑO, LAURA CARREÓN, BAUDILIO ACOSTA y LILIA IBARRA.**

Particularmente quiero agradecer a **CARMEN RODRÍGUEZ JARAMILLO**, aprendí muchas cosas tanto dentro como fuera del laboratorio de histología, siempre voy a estar sumamente agradecido por tu entusiasta apoyo.

A la especialista en análisis de imágenes, **MARLENNE MANZANO**, por la elaboración de los mapas contenidos en esta tesis y por las series de tiempo de temperatura y clorofila *a*, sin ellas no hubiera podido explicar muchas cosas.

A **MINERVA CERRO** por su apoyo, el cual siempre me brindo con mucho entusiasmo.

Al **DR. CESAR SALINAS**, por el apoyo y facilidades brindadas cuando nos vimos en aprietos.

Al **CIBNOR** por todas las facilidades para realizar mis estudios de **POSGRADO** y la realización de esta tesis.

# ÍNDICE

	Páginas
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	8
1. Biología general	8
2. Anatomía	9
3. Reproducción	13
3.1 Factores endógenos y exógenos en el control de la reproducción	13
3.2 Ciclos reproductivos	17
3.2.1 Ciclo reproductivo de poblaciones de ostión de zonas templadas	17
3.2.2 Ciclo reproductivo de <i>C. corteziensis</i> en comparación con otras especies	18
4. Nutrición: generalidades	28
4.1 Nutrición acondicionamiento reproductivo	28
5. Nutrición y sistema inmunológico	32
6. Mortalidades masivas de verano	36
III. JUSTIFICACIÓN	39
IV. HIPÓTESIS	40
V. OBJETIVOS	41
Objetivo general	41
Objetivos particulares	41
VI. MATERIAL Y MÉTODOS	42
1. Descripción de las áreas de muestreo	42
1.1 Laguna de Ceuta	42
1.2 Cuautla	44
1.3 Estero de Camichín	45
2. Cultivo de las microalgas utilizadas como alimento para reproductores	46
3. Mediciones morfométricas de los ostiones	47
4. Disección de los ostiones y muestreo de tejidos	48
5. Análisis histológicos	49
5.1 Procesamiento de tejidos	49
5.2 Captura y análisis de imágenes digitales	49
5.3 Identificación de estadios reproductivos	50
5.4 Histología cuantitativa	50

5.4.1	Área de cobertura gonadal (ACG)	50
5.4.2	Frecuencia de ovocitos	51
1.	<b>ANÁLISIS BIOQUÍMICOS</b>	51
6.1	Preparación de muestras en tejidos	51
6.1.1	Proteínas	52
6.1.2	Aminoácidos	52
6.1.3	Carbohidratos	53
6.1.4	Lípidos totales	53
6.1.5	Carotenoides en tejidos de ostión	54
6.1.6	Pigmentos en microalgas	54
6.1.7	Ácidos grasos	55
6.1.8	Esteroles libres y esterificados	56
6.2	Preparación de muestras en hemolinfa	57
6.2.1	Proteína, glucosa y triacilglicéridos	57
6.2.2	Hemocianina	58
6.2.3	Anión superóxido	59
6.2.4	Conteo total y diferencial de hemocitos	59
VII.	<b>RESULTADOS</b>	60
1.	<b>PRIMER CAPÍTULO</b> (Ciclo reproductivo y acumulación de reservas en hembras)	
1.1	Análisis estadísticos	61
1.2	Morfometría	61
1.3	Frecuencia de estadios reproductivos	63
1.4	Área de cobertura gonadal (ACG)	64
1.5	Frecuencia de ovocitos	65
1.6	Composición bioquímica en tejidos	66
1.6.1	Materia seca (%)	66
1.6.2	Concentración de proteínas	67
1.6.3	Concentración de carbohidratos	68
1.6.4	Concentración de lípidos totales	69
1.6.5	Proporción de ácidos grasos de la fracción neutra en relación a ácidos grasos totales (reservas y fosfolípidos)	70
1.6.6	Concentración de carotenoides	71
1.6.7	Esteroles libres y esterificados	72
1.6.8	Ácidos grasos	75
1.6.8.1	Proporción de ácidos grasos fracción lípidos neutros	75
1.6.8.2	Proporción de ácidos grasos fracción lípidos polares	77
1.6.9	Análisis de componentes principales (ACP)	79
1.7	Discusión	81
	A. Efecto de la temperatura y abundancia de alimento en la acumulación y utilización de reservas	84

	B. Efecto de la calidad del alimento en la acumulación y utilización de reservas	97
	C. Análisis de componentes principales	102
1.8	Conclusiones	108
<b>2.</b>	<b>SEGUNDO CAPÍTULO</b> (Alimentación con tres dietas monoalgales y tres mixtas)	109
2.1	Diseño experimental	110
2.2	Análisis estadísticos	112
2.3	Resultados	114
2.3.1	Supervivencia y morfometría	114
2.3.2	Área de cobertura gonadal (ACG)	116
2.3.3	Frecuencia de estadios de maduración en hembras y machos	117
2.3.4	Frecuencia de ovocitos	119
2.3.5	Desempeño reproductivo	119
2.4	Composición bioquímica en tejidos	120
2.5	Discusión	121
2.6	Conclusiones	129
<b>3.</b>	<b>TERCER CAPÍTULO</b> Alimentación bi-algal con diferentes proporciones de <i>C. gracilis</i> e <i>I. galabana</i> (T-ISO) con base a su contenido particular de DHA y EPA	
3.1	Diseño experimental	131
3.2	Dietas experimentales	131
3.3	Análisis estadísticos	133
3.4	Resultados	134
3.4.1	Supervivencia y morfometría	134
3.4.2	Área de cobertura gonadal (ACG)	135
3.5	Composición bioquímica en tejidos	135
3.6	Discusión	138
3.7	Conclusiones	144
<b>4.</b>	<b>CUARTO CAPÍTULO</b> (Efecto del sistema de alimentación en la maduración, composición bioquímica y sistema inmunológico de <i>C. corteziensis</i> )	145
4.1	Diseño experimental	146
4.2	Análisis estadísticos	148
4.3	Resultados	149
4.3.1	Supervivencia y morfometría	149
4.3.2	Área de cobertura gonadal (ACG)	149
4.3.3	Proporción de células reproductivas	150
4.4	Composición bioquímica en tejidos	151
4.5	Composición bioquímica en hemolinfa	152
4.6	Proporción de ácidos grasos en la fracción de lípidos neutros y polares en tejidos	152
4.7	Sistema inmunológico	153

4.7.1	Conteo total de hemocitos (CTH) y proporción de granulocitos	153
4.7.2	Producción basal y estimulada de anión superóxido (PAS) en hemocitos	154
4.8	Discusión	156
4.9	Conclusiones	162
<b>5.</b>	<b>QUINTO CAPÍTULO</b> (Efecto del 20:4 $n$ -6 en la maduración y sistema inmunológico de <i>C. corteziensis</i> )	163
5.1	Diseño experimental	164
5.2	Análisis estadísticos	165
5.3	Resultados	166
5.3.1	Supervivencia y morfometría	166
5.3.2	Área de cobertura gonadal (ACG)	166
5.3.3	Proporción de células reproductivas	167
5.4	Composición bioquímica en tejidos	168
5.5	Composición bioquímica en hemolinfa	169
5.6	Concentración de ácidos grasos en la fracción de lípidos neutros y polares en tejidos	169
5.7	Sistema inmunológico	170
5.7.1	Conteo total de hemocitos (CTH) y proporción de granulocitos	170
5.7.2	Producción de anión superóxido (PAS) en hemocitos totales	172
5.8	Discusión	174
5.9	Conclusiones	178
<b>VIII.</b>	<b>DISCUSIÓN GENERAL</b>	179
<b>IX.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	185
<b>X.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	187
<b>XI.</b>	<b>ANEXOS</b>	218
A.	Temperatura y clorofila <i>a</i> en Laguna de Ceuta (valores mensuales y estacionales)	218
B.	Tablas de esteroles y ácidos grasos <b>PRIMER CAPÍTULO</b>	220
C.	Microalgas en el tracto digestivo de ostiones silvestres <i>C. corteziensis</i>	225
D.	Composición bioquímica de microalgas	227
E.	Tabla de ácidos grasos de las emulsiones de lípidos ICES	228
F.	Artículo publicado <b>CUARTO CAPÍTULO</b>	229
G.	Artículo sometido <b>QUINTO CAPÍTULO</b>	247

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Titulo	Página
Figura 1	Producción total (t × 1000) de moluscos y ostiones en México (FIGIS, 2008).	2
Figura 2	Producción (t ×1000) de ostiones en México (FIGIS, 2008). Nótese la diferencia de escalas entre especies.	3
Figura 3	Producción (t) de <i>C. corteziensis</i> en Boca de Camichín, Nayarit (CESANAY, 2008).	4
Figura 4	Anatomía general interna de los ostiones (i.e. <i>C. virginica</i> ). (Tomado de Galtsoff, 1964).	9
Figura 5	Factores que controlan el ciclo reproductivo de los invertebrados marinos (Giese y Pearse, 1974; Citado en: Thompson et al., 1996).	14
Figura 6	Esquema de la interacción de factores endógenos y exógenos en el ciclo reproductivo de <i>Argopecten irradians</i> (Sastry, 1975. Citado en: Barber y Blake 1991).	15
Figura 7	Regulación endógena de los procesos de reproducción de moluscos, particularmente pectínidos (Tomado de: Arellano, 2005).	17
Figura 8	Representación esquemática de la movilización de reservas de los tejidos de reserva (manto-gónada) y su relación con el ciclo reproductivo de <i>Crassostrea gigas</i> (Tomado de Delaporte, 2005).	18
Figura 9	Representación del proceso de degradación intracelular después de la fagocitosis de una partícula extraña por los hemocitos. NADPH (nicotiamida adenina dinucleotido fosfato oxidasa), SOD (superóxido dismutasa) y NOS (nítrico óxido sintetasa). (Tomado de Delaporte, 2005).	35
Figura 10	Laguna de Ceuta, Sinaloa, México.	43
Figura 11	Cuautla, Nayarit, México.	44
Figura 12	Estero de Camichín, Nayarit, México.	46
Figura 13	Extracción de hemolinfa	48
Figura 14	Determinación de la morfometría general de los ostiones	48
Figura 15	Diseción de los ostiones	49

Figura 16	Corte transversal del ostión (A) en que se muestra la relación que guarda la gónada (recuadros en rojo) con respecto al resto de los tejidos. Imagen del corte histológico a 4× de <i>C. corteziensis</i> en que se muestra las diferencias en la intensidad del color de la gónada (área en rojo) con respecto al tejido visceral (B). G= gonada, TVC= tejido vesicular conectivo, GD= glandula digestiva, I= intestino, E= estómago, y M= manto.	51
Figura 17	Peso total (triángulos) y biomasa (círculos) en hembras de <i>Crassostrea corteziensis</i> muestreadas en Laguna de Ceuta, Sinaloa de abril de 2005 a abril de 2006.	62
Figura 18	Longitud (triángulos) y ancho (rombos) de las conchas de las hembras de <i>Crassostrea corteziensis</i> muestreadas en Laguna de Ceuta, Sinaloa de abril de 2005 a abril de 2006.	63
Figura 19	Frecuencia de estadios de maduración en hembras de <i>Crassostrea corteziensis</i> muestreadas en Laguna de Ceuta, Sinaloa de abril de 2005 a abril de 2006.	64
Figura 20	Área de cobertura gonadal (ACG) (puntos negros) en hembras de <i>C. corteziensis</i> muestreadas en Laguna de Ceuta, Sinaloa de abril de 2005 a abril de 2006. TSM (°C) (cuadros grises) y clorofila <i>a</i> (mg m <sup>-3</sup> ) (rombos) en la boca artificial de la laguna costera de Laguna de Ceuta, Sinaloa.	65
Figura 21	Frecuencia de ovocitos en hembras de <i>C. corteziensis</i> muestreadas en Laguna de Ceuta, Sinaloa de abril de 2005 a abril de 2006. Los tipos de ovocitos se encuentran distribuidos en la figura de la sig. manera : En barras blancas= previtelogenicos; barras grises= vitelogenicos; barras negras= postvitelogenicos; barras achuradas= atresias.	66
Figura 22	Materia seca (%) en hembras de <i>C. corteziensis</i> muestreadas en Laguna de Ceuta, Sinaloa de abril de 2005 a abril de 2006.	67
Figura 23	Concentración de proteínas (mg g <sup>-1</sup> en peso seco) en hembras de <i>C. corteziensis</i> muestreadas en Laguna de Ceuta, Sinaloa de abril de 2005 a abril de 2006.	68
Figura 24	Concentración de carbohidratos (mg g <sup>-1</sup> en peso seco) en hembras de <i>C. corteziensis</i> muestreadas en Laguna de Ceuta, Sinaloa de abril de 2005 a abril de 2006.	69
Figura 25	Concentración de lípidos totales (mg g <sup>-1</sup> en peso seco) en hembras de <i>C. corteziensis</i> muestreadas en Laguna de Ceuta, Sinaloa de abril de 2005 a abril de 2006.	70
Figura 26	Proporción (% de la suma de las fracciones de neutros y polares) de ácidos grasos de la fracción de lípidos neutros en hembras de <i>C. corteziensis</i> muestreadas en Laguna de Ceuta, Sinaloa de abril de 2005 a abril de 2006.	71



Figura 27	Concentración de carotenoides ( $\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ en peso húmedo) y proporción de 18:4n-3 (%) en hembras de <i>C. corteziensis</i> muestreadas en Laguna de Ceuta, Sinaloa de abril de 2005 a abril de 2006.	72
Figura 28	Proporción de esteroides esterificados (%) del total de esteroides en hembras de <i>C. corteziensis</i> muestreadas en Laguna de Ceuta, Sinaloa de abril de 2005 a abril de 2006.	73
Figura 29	Proporción de los ácidos grasos 22:6n-3 (A), 20:5n-3 (B) y 20:4n-6 (C) de la fracción de lípidos neutros en hembras de <i>C. corteziensis</i> muestreadas en Laguna de Ceuta, Sinaloa de abril de 2005 a abril de 2006.	76
Figura 30	Proporción de los ácidos grasos 22:6n-3(A), 20:5n-3 (B) y 20:4n-6 (C) de la fracción de lípidos polares en hembras de <i>C. corteziensis</i> muestreadas en Laguna de Ceuta, Sinaloa de abril de 2005 a abril de 2006.	78
Figura 31	Factores de peso (factor loadings) del análisis de componentes principales realizado con las variables de ácidos grasos (fracción neutra), variables bioquímicas, morfométricas y reproductivas de las hembras de <i>C. corteziensis</i> muestreadas en Laguna de Ceuta, Sinaloa de abril de 2005 a abril de 2006.	80
Figura 32	Sistemas de alimentación por goteo utilizados en la maduración de reproductores de <i>C. corteziensis</i> .	111
Figura 33	Dietas monoalgales y mixtas utilizadas la maduración de <i>C. corteziensis</i> . Cg= <i>Chaetoceros gracilis</i> ; Pl= <i>Pavlova lutheri</i> ; Cc= <i>Chaetoceros calcitrans</i> , Cc-Pl= <i>Chaetoceros gracilis</i> + <i>Pavlova lutheri</i> , Mx-Ac= <i>C. gracilis</i> + <i>P. lutheri</i> + <i>C. calcitrans</i> + <i>D. tertiolecta</i> ; Mx-2= Mx-Ac + <i>I. galbana</i> (T-ISO).	111
Figura 34	Supervivencia (%) de los ostiones <i>C. corteziensis</i> alimentados durante la maduración con distintas dietas mono-algales y mixtas. Cg= <i>C. gracilis</i> ; Pl= <i>P. lutheri</i> ; Cc= <i>C. calcitrans</i> , Cc+Pl= <i>C. calcitrans</i> + <i>P. lutheri</i> , Mx-Ac= <i>C. gracilis</i> + <i>P. lutheri</i> + <i>C. calcitrans</i> + <i>D. tertiolecta</i> ; Mx-2= Mx-Ac + <i>I. galbana</i> (T-ISO). Los resultados están expresados en media $\pm$ error estándar y fueron analizados por ANOVA unifactorial (dieta), $P < 0.05$ .	114
Figura 35	Biomasa (g) de los ostiones <i>C. corteziensis</i> alimentados durante la maduración con distintas dietas mono-algales y mixtas. Cg= <i>Chaetoceros gracilis</i> ; Pl= <i>Pavlova lutheri</i> ; Cc= <i>Chaetoceros calcitrans</i> , Cc-Pl= <i>Chaetoceros gracilis</i> + <i>Pavlova lutheri</i> , Mx-Ac= <i>C. gracilis</i> + <i>P. lutheri</i> + <i>C. calcitrans</i> + <i>D. tertiolecta</i> ; Mx-2= Mx-Ac + <i>I. galbana</i> (T-ISO). Los resultados están expresados en media $\pm$ error estándar y fueron analizados por ANOVA unifactorial (D=dieta), $P < 0.05$ . Las medias se compararon por análisis de	115

- Tukey, las letras indican diferencias significativas. Número de datos (*n*) en las dietas (6, 7, 10, 8, 7 y 8).
- Figura 36 Área de cobertura gonádica (%) (ACG) de hembras y machos de *C. corteziensis* alimentados durante la maduración con distintas dietas mono-algales y mixtas. Cg=*Chaetoceros gracilis*; Pl= *Pavlova lutheri*; Cc= *Chaetoceros calcitrans*, Bi-A= *Chaetoceros gracilis* + *Pavlova lutheri*, Mx-Ac= *C. gracilis* + *P. lutheri* + *C. calcitrans* + *D. tertiolecta*; Mx-2= Mx-Ac + *I. galbana* (T-ISO). Los resultados están expresados en media ± error estándar. Ver Fig. 3 para análisis estadísticos. Número de datos (*n*) IH= 10, IM=5, hembras en las dietas (3, 1, 3, 2, 2 y 3) y machos (2, 2, 1, 2, 1 y 2). 116
- Figura 37 Frecuencia de estadios de madurez en hembras (A) y machos (B) de *C. corteziensis* alimentados durante la maduración con distintas dietas mono-algales y mixtas. Cg=*Chaetoceros gracilis*; Pl= *Pavlova lutheri*; Cc= *Chaetoceros calcitrans*, Cc-Pl= *Chaetoceros gracilis* + *Pavlova lutheri*, Mx-Ac= *C. gracilis* + *P. lutheri* + *C. calcitrans* + *D. tertiolecta*; Mx-2= Mx-Ac + *I. galbana* (T-ISO) 117
- Figura 38 Cortes histológicos (4×) de hembras de *C. corteziensis* alimentadas durante la maduración con distintas dietas mono-algales y mixtas. Cg=*Chaetoceros gracilis* (A); Pl= *Pavlova lutheri* (B); Cc= *Chaetoceros calcitrans* (C), Cc-Pl= *Chaetoceros gracilis* + *Pavlova lutheri* (D), Mx-Ac= *C. gracilis* + *P. lutheri* + *C. calcitrans* + *D. tertiolecta* (E); Mx-2= Mx-Ac + *I. galbana* (T-ISO) (F). G= gonada, GD= glándula digestiva, I= intestino. 118
- Figura 39 Frecuencia de ovocitos por hembra de *C. corteziensis* alimentadas durante la maduración con distintas dietas mono-algales y mixtas. Cg=*Chaetoceros gracilis*; Pl= *Pavlova lutheri*; Cc= *Chaetoceros calcitrans*, Cc-Pl= *Chaetoceros gracilis* + *Pavlova lutheri*, Mx-Ac= *C. gracilis* + *P. lutheri* + *C. calcitrans* + *D. tertiolecta*; Mx-2= Mx-Ac + *I. galbana* (T-ISO). 119
- Figura 40 Sistemas utilizados en el experimento. En cada uno de los sistemas (tambos azules) se colocó diariamente el alimento de cada una de las dietas, el cual se suministró por goteo a cada una de las 3 réplicas (30 ostiones × dieta). 132
- Figura 41 Área de cobertura gonadal (%) de los ostiones alimentados con 3 diferentes proporciones de *C. gracilis* y T-ISO. Los resultados están expresados en media ± error estándar. El ACG se analizó con una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y una prueba de comparaciones múltiple no paramétrica de Tukey, las letras indican diferencias significativas. 135

Figura 42	Concentración de proteínas, carbohidratos y lípidos totales ( $\text{mg g}^{-1}$ peso seco) en los tejidos de los ostiones alimentados con 3 diferentes proporciones de <i>C. gracilis</i> y T-ISO. Los resultados están expresados en media $\pm$ error estándar. Ver tabla VII para análisis estadísticos.	136
Figura 43	Imágenes de los cortes histológicos de las gónadas de los ostiones alimentados con 3 diferentes proporciones de <i>C. gracilis</i> y T-ISO.	137
Figura 44	Área de cobertura gonadal (ACG) de los ostiones alimentados con <i>I. galbana</i> (ISO) y emulsiones de lípidos con dos sistemas (continuo vs. pulsos). Los resultados están expresados en media $\pm$ error estándar. Ver tabla IX para análisis estadísticos.	150
Figura 45	Proporción (%) de células reproductivas de los ostiones alimentados con <i>I. galbana</i> (ISO) y emulsiones de lípidos con dos sistemas (continuo vs. pulsos). La proporción de células reproductivas se compararon usando tablas de contingencia (90/10, 90/9 y 80/20, para los ostiones al inicio, continuo y pulsos, respectivamente; de gonias vs. células diferenciadas). Las letras indican las diferencias significativas ( $X_2=69.3$ , $P<0.001$ ).	151
Figura 46	Conteo total de hemocitos ( $\times 10^3$ ) (A) y proporción de granulocitos (%) (B) los ostiones alimentados con <i>I. galbana</i> (ISO) y emulsiones de lípidos con dos sistemas (continuo vs. pulsos). Los resultados están expresados en media $\pm$ error estándar. Ver tabla XVII para análisis estadísticos.	154
Figura 47	Producción de anión superóxido (PAS) en hemocitos basales (A) y estimulados (B) en los ostiones alimentados con <i>I. galbana</i> (ISO) y emulsiones de lípidos con dos sistemas (continuo vs. pulsos). Los resultados están expresados en media $\pm$ error estándar. Ver tabla XVII para análisis estadísticos.	155
Figura 48	Área de cobertura gonadal (ACG) (%) de los ostiones <i>C. corteziensis</i> alimentados con <i>I. galbana</i> (T-ISO) y tres emulsiones con diferentes proporciones (0, 1 y 9%) de ARA. Los resultados están expresados en media $\pm$ error estándar y se analizó con una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y una prueba de comparaciones múltiple no paramétrica de Tukey, las letras indican las diferencias significativas.	167
Figura 49	Proporción de células reproductivas (%) de los ostiones <i>C. corteziensis</i> alimentados con <i>I. galbana</i> (T-ISO) y tres emulsiones con diferentes proporciones (0, 1 y 9%) de ARA. La proporción de células reproductivas se compararon usando tablas de contingencia (40/60, 37/63 y 13/87 para ARA 0, 1 y 9%, respectivamente; de gonias, vs. células diferenciadas). Las letras indican las diferencias significativas ( $X_2= 23.3$ , $P<0.001$ ).	168

Figura 50	Conteo total de hemocitos ( $\times 10^5$ células mL <sup>-1</sup> ) (A) y proporción de granulocitos (%) B) en los ostiones <i>C. corteziensis</i> alimentados con <i>I. galbana</i> (T-ISO) y tres emulsiones con diferentes proporciones (0, 1 y 9%) de ARA. Los resultados están expresados en media $\pm$ error estándar. Ver tabla XVII para análisis estadísticos.	171
Figura 51	PAS en hemocitos basales (A) y estimulados (B) de los ostiones <i>C. corteziensis</i> alimentados con <i>I. galbana</i> (T-ISO) y tres emulsiones con diferentes proporciones (0, 1 y 9%) de ARA. Los resultados están expresados en media $\pm$ error estándar. Ver tabla XVII para análisis estadísticos.	172
Figura 52	Producción de anión superóxido (PAS) en relación al conteo total de hemocitos ( $\times 10^6$ ) en los ostiones <i>C. corteziensis</i> alimentados con <i>I. galbana</i> (T-ISO) y 3 emulsiones con diferentes proporciones (0, 1 y 9%) de araquidónico (ARA). Los resultados están expresados en media $\pm$ error estándar. Ver tabla XVII para análisis estadísticos.	173
Figura 53	Valores de temperatura superficial del mar mensual (Ene-05 a May-06) y estacional promedio (2002-2006) de la zona adyacente a la boca artificial de Laguna de Ceuta, Sinaloa.	219
Figura 54	Concentración de clorofila a (mg m <sup>-3</sup> ) mensual (Ene-05 a May-06) y estacional promedio (1997-2006) de la zona adyacente a la boca artificial de Laguna de Ceuta, Sinaloa.	219

## LISTA DE TABLAS

Tablas	Título	Páginas
Tabla I	Principales trabajos que describen algunos aspectos de la biología y el cultivo de <i>Crassostrea corteziensis</i> .	6
Tabla II	Proporción (%) de cada esteroles en relación al total de esteroides en cada fracción (libre y esterificada) en hembras de <i>C. corteziensis</i> muestreadas en Laguna de Ceuta, Sinaloa de abril de 2005 a abril de 2006.	74
Tabla III	Composición de esteroides (%) de algunas especies de diatomeas y dinoflagelados.	101
Tabla IV	Composición bioquímica general (% de la materia orgánica total), y proporción de HUFA (% del total de ácidos grasos) y colesterol (% del total de esteroides) de las microalgas cosechadas en el tercer día de cultivo y que fueron utilizadas para la maduración de <i>C. corteziensis</i> .	112
Tabla V	Morfometría y supervivencia (%) de los ostiones <i>C. corteziensis</i> alimentados durante la maduración con distintas dietas de mono-algales y mixtas.	115
Tabla VI	Desempeño reproductivo de las hembras desovadas.	120
Tabla VII	Concentración de proteínas, carbohidratos, lípidos totales ( $\text{mg g}^{-1}$ peso seco) y carotenoides ( $\mu\text{g g}^{-1}$ peso húmedo) de los ostiones <i>C. corteziensis</i> alimentados durante la maduración con distintas dietas mono-algales y mixtas.	120
Tabla VIII	Proporción de HUFA en las microalgas cosechadas durante la fase exponencial (3er día de cultivo).	131
Tabla IX	Relación de microalgas y DHA/EPA ( $\mu\text{g g}^{-1}$ peso húmedo) en las dietas utilizadas en la maduración de <i>C. corteziensis</i> .	132
Tabla X	Supervivencia, y morfometría de los ostiones alimentados con 3 diferentes relaciones de DHA/EPA.	134
Tabla XI	Composición de ácidos de la emulsión para la maduración de <i>C. corteziensis</i> .	147
Tabla XII	Supervivencia y morfometría de los ostiones <i>C. corteziensis</i> alimentados con <i>I. galbana</i> (ISO) y emulsiones de lípidos con dos sistemas (continuo vs. pulsos).	149
Tabla XIII	Concentración de proteínas, carbohidratos y lípidos totales ( $\text{mg g}^{-1}$ peso seco) de los tejidos de los ostiones <i>C. corteziensis</i> alimentados con <i>I. galbana</i> (ISO) y emulsiones de lípidos con dos con sistemas (continuo vs. pulsos).	151

Tabla XIV	Concentración de proteínas, glucosa, triacilglicéridos y hemocianina en la hemolinfa de los ostiones <i>C. corteziensis</i> alimentados con <i>I. galbana</i> (ISO) y emulsiones de lípidos con dos con sistemas (continuo vs. pulsos).	152
Tabla XV	Proporción (%) y concentración total (mg 100 g <sup>-1</sup> peso húmedo) de ácidos de las fracciones de lípidos neutros y polares de los ostiones <i>C. corteziensis</i> alimentados con <i>I. galbana</i> (ISO) y emulsiones de lípidos con dos con sistemas (continuo vs. pulsos).	153
Tabla XVI	Ácidos grasos (% del total) y composición bioquímica de <i>Isochrysis galbana</i> (T-ISO) y tres emulsiones con diferente proporción de ARA	165
Tabla XVII	Supervivencia y morfometría de los ostiones <i>C. corteziensis</i> alimentados con <i>I. galbana</i> (T-ISO) y tres emulsiones con diferentes proporciones (0, 1 y 9%) de ARA.	166
Tabla XVIII	Concentración de proteína, carbohidratos y lípidos totales (mg g <sup>-1</sup> peso seco) en los tejidos de los ostiones <i>C. corteziensis</i> alimentados con <i>I. galbana</i> (T-ISO) y tres emulsiones con diferentes proporciones (0, 1 y 9%) de ARA.	168
Tabla XIX	Composición bioquímica en la hemolinfa de los ostiones <i>C. corteziensis</i> alimentados con <i>I. galbana</i> (T-ISO) y tres emulsiones con diferentes proporciones (0, 1 y 9%) de ARA.	169
Tabla XX	Concentración de ácidos grasos (mg 100g <sup>-1</sup> peso húmedo) en la fracción de lípidos neutros y polares de los ostiones <i>C. corteziensis</i> alimentados con <i>I. galbana</i> (T-ISO) y tres emulsiones con diferentes proporciones (0, 1 y 9%) de ARA.	170
Tabla XXI	Sitio de recolecta de ostiones, época en la que se realizaron los experimentos, dietas y sistemas utilizados en la reproducción de <i>C. corteziensis</i> en los capítulos de esta tesis.	180
Tabla XXII	Concentración (mg g <sup>-1</sup> ) de esteroides de la suma de las fracciones libre y esterificada de esteroides en hembras de <i>C. corteziensis</i> muestreadas en Laguna de Ceuta, Sinaloa de abril de 2005 a abril de 2006.	220
Tabla XXIII	Concentración de ácidos grasos (mg 100g <sup>-1</sup> ) de la fracción de lípidos neutros en hembras de <i>Crassostrea corteziensis</i> muestreadas de abril de 2005 a abril 2006 en Laguna de Ceuta, Sinaloa, México.	221

Tabla XXIV	Concentración de ácidos grasos ( $\text{mg } 100\text{g}^{-1}$ ) de la fracción de lípidos polares en hembras de <i>Crassostrea corteziensis</i> muestreadas de abril de 2005 a abril 2006 en Laguna de Ceuta, Sinaloa, México.	222
Tabla XXV	Proporción de ácidos grasos (%) de la fracción de lípidos neutros en hembras de <i>Crassostrea corteziensis</i> muestreadas de abril de 2005 a abril 2006 en Laguna de Ceuta, Sinaloa, México.	223
Tabla XXVI	Proporción de ácidos grasos (%) de la fracción de lípidos polares en hembras de <i>Crassostrea corteziensis</i> muestreadas de abril de 2005 a abril 2006 en Laguna de Ceuta, Sinaloa, México.	224
Tabla XXVII	Especies de microalgas identificadas en el tracto digestivo de <i>C.corteziensis</i> .	225
Tabla XXVIII	Composición bioquímica (%) y concentración de aminoácidos ( $\mu\text{g } \text{mg}^{-1}$ ) en microalgas cosechadas durante el tercer día de cultivo.	227
Tabla XXIX	Ácidos grasos (% del total) de las tres emulsiones utilizadas en los capítulos cuarto y quinto como suplemento de las microalgas para inducir la maduración de <i>C. corteziensis</i> .	228

## I. INTRODUCCIÓN

El consumo y cultivo de moluscos bivalvos se remonta a culturas tan antiguas como los romanos y griegos, los cuales se ubican como los primeros europeos en practicar y establecer los principios del cultivo de ostiones (del latín *Ostrea*); así mismo mostraron también un particular gusto por elaborar diversos platillos y recetas con estos moluscos (Gunther, 1897; Andrews, 1948). Estas culturas preferían los ostiones que crecían en zonas salobres como las desembocaduras de ríos y lagunas, en comparación de aquellos que se desarrollaban en zonas rocosas y playas arenosas (Andrews, 1948). Al parecer preferían consumirlos maduros, ya que los recolectaban en primavera y verano, cuando se encontraban “gordos, de sabor dulce-salado, de color blanco y de los cuales se desprendía un jugo lechoso” (Andrews, 1948). Los romanos practicaron con éxito el trasplante de bancos de ostiones entre diferentes zonas; también desarrollaron eficientes técnicas para almacenar y transportar ostiones vivos por tiempos prolongados (Andrews, 1948).

En Norteamérica, y particularmente en Estados Unidos, se tienen registros históricos de la comercialización de ostiones desde finales del siglo XVIII, mientras que los primeros cultivos se realizaron en los años de 1930s.

La producción de ostiones en México está compuesta principalmente por tres especies, *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791) en el Golfo de México, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) y *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1951) en el litoral del Pacífico y Golfo de California (CNP, 2006). La producción total de moluscos en México en los últimos 20 años muestra dos periodos de producción máxima, en los años 1996–1997 y 2002, con valores entre las 202–208 mil toneladas (Fig. 1) (FIGIS, 2008). Sin embargo, la producción total de ostiones se ha mantenido relativamente constante, con una máxima de



52.8 mil toneladas para 2001 (Fig. 1) (FIGIS, 2008), lo cual representa un 31% de la producción total de moluscos para ese año.

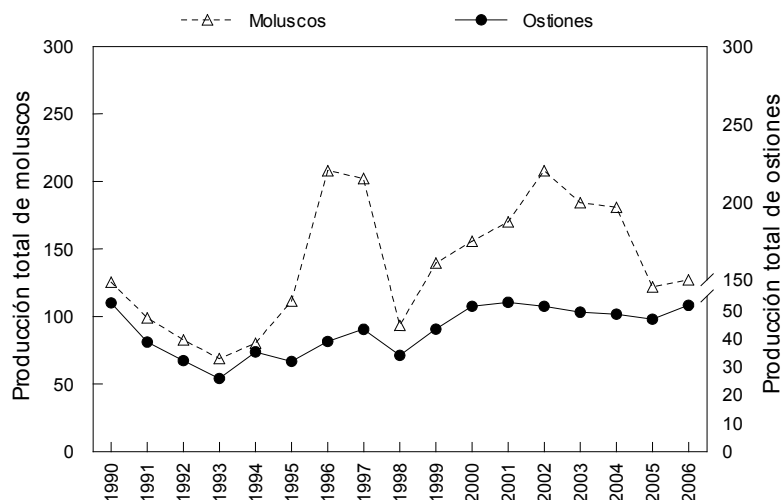


Fig. 1 Producción total (t × 1000) de moluscos y ostiones en México (FIGIS, 2008).

La mayor parte de la producción de ostión está representada por la captura de *C. virginica*, la cual estima en 46,905 toneladas en promedio (2000 al 2006), mientras que la producción de *C. gigas* se ha mantenido en las 1,128 toneladas en promedio (Fig. 2) (FIGIS, 2008). Así, *C. virginica* representa aproximadamente el 93% de la producción total de ostiones en México, seguido de *C. gigas* y *C. corteziensis* con el 1.6–2.9% y 0.4–1.3%, respectivamente (FIGIS, 2008). La producción acuícola de México para el año 2002 fue aproximadamente 50,000 toneladas con valor próximo a los 150 millones de pesos (CNP, 2006). La producción de *C. gigas* en México desde los años 1990s ha registrado importantes fluctuaciones, con un máximo histórico en 1997, cuya producción alcanzó las 2,831 toneladas (Fig. 2). Sin embargo, a partir de 1998 la producción de *C. gigas*

disminuyó de manera importante durante los años siguientes hasta alcanzar en el 2005 una disminución del 41.3% (Fig. 2).

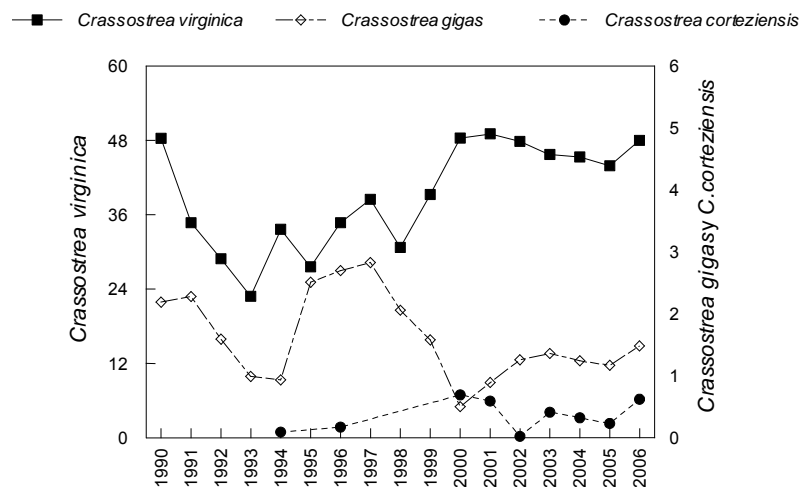


Fig. 2 Producción (t × 1000) de ostiones en México (FIGIS, 2008). Nótese la diferencia de escalas entre especies.

En contraste, la producción estimada de *C. corteziensis* ha aumentado en los últimos años, en particular en la laguna costera de Boca de Camichín, Nayarit, hasta alcanzar en el 2008 aproximadamente 1290 toneladas, las cuales se esperan que incrementen dado que aún no termina la producción de este año (Comité Estatal de Sanidad Acuícola de Nayarit, CESANAY) (Fig. 3).

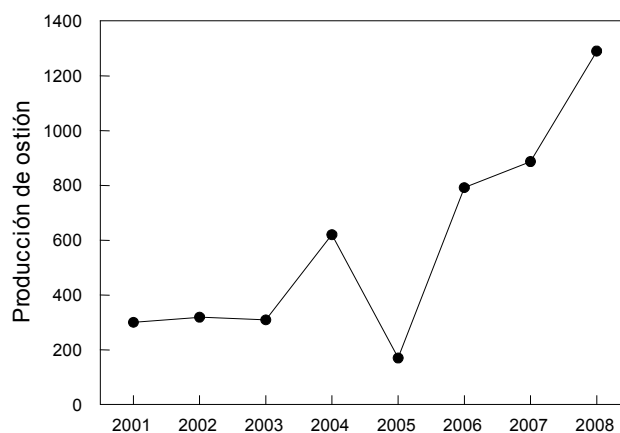


Fig. 3 Producción (t) de *C. corteziensis* en Boca de Camichín, Nayarit (CESANAY, 2008).

Los decrementos en la producción de *C. gigas* que se han observado en México, también se han observado en otros países donde se cultiva esta especie, tales como E.U.A. y Francia (FIGIS, 2008). Dicha disminución puede deberse a las mortalidades masivas de ostiones adultos que se han observado principalmente en el verano. Se ha propuesto distintas causas para explicar este fenómeno, tales como factores ambientales, genéticos, fisiológicos, patológicos, prácticas de manejo y técnicas de cultivo (Samain et al., 2007). En México estas mortalidades se ha observado tanto en poblaciones de *C. gigas* que se cultivan en zonas templadas (Cáceres-Martínez et al., 2004) como en poblaciones en zonas semi-tropicales (Chávez-Villalba et al., 2007).

Es necesario especificar que el ostión del Pacífico *Crassostrea gigas*, no es un ostión nativo de América, sino que fue introducido en Estados Unidos de Norteamérica para su cultivo a inicios del siglo XIX, el cual se realizó al principio a través de semilla adquirida en Japón hasta el descubrimiento de bancos naturales en Estados Unidos. Esto propició que la importación de semilla de Japón terminara en los años de 1960s (Lavoie, 2005). De la misma manera, el ostión del Pacífico *C. gigas* fue introducido en Bahía de

San Quintín, B.C., México, en el año 1973 con semilla producida en Estados Unidos de Norteamérica (Islas-Olivares en 1975), y gradualmente su cultivo fue extendiéndose en los estados de Baja California, Baja California Sur y Sonora (Islas-Olivares, 1982; Islas-Olivares et al., 1982; Lavoie, 2005). Actualmente *C. gigas* se distribuye en diferentes partes del mundo, esto debido a su gran capacidad de adaptación al ambiente, principalmente a las variaciones de la temperatura y turbidez del agua. A pesar de ello, esta especie se cultiva principalmente en zonas templadas (i.e. China, Canadá, E.U.A., Francia, etc.), lo cual favorece su rápido crecimiento (FAO, 2002).

Sin embargo, a pesar de lo anterior y tomando en cuenta el incremento de la susceptibilidad de *C. gigas* a las condiciones de cultivo, rápidamente se retomó el interés por cultivar especies endémicas de las costas de México, particularmente por la especie *C. corteziensis*. Ramírez-Granados y Sevilla (1965) hacen mención a esta especie en un extenso trabajo sobre la biología y planeación de cultivo de las ostras en México, pero es a partir de los años 1970s que se intensificaron los estudios sobre esta especie (Tabla I), principalmente en relación a su biología en general (Stuardo y Martínez, 1975), ciclo reproductivo (Ruíz-Durá, 1974; Frías-Espéricueta et al., 1997) y composición bioquímica proximal (Páez-Osuna et al., 1991; 1993).

Tabla I. Principales trabajos que describen algunos aspectos de la biología y el cultivo de de *Crassostrea corteziensis*.

	<b>Tema</b>	<b>Autor (es)</b>
1	Análisis del potencial acuícola de las ostras de México	Ramírez-Granados y Sevilla, 1965
2	Descripción del ciclo gonádico y reproductivo	Ruíz-Durá, 1974; Frías-Espericueta et al., 1997
3	Descripción de la biología y ecología	Stuardo y Martínez, 1975
4	Caracterización de cariotipo y comparación entre especies de ostras	Rodríguez-Romero et al., 1979a; 1979b
5	Identificación y descripción de larvas	Cortés-Guzmán y Martínez-Guerrero, 1979
6	Evaluación de tasas de crecimiento y potencial de cultivo	Angell, 1986
7	Evaluación de patrones electroforéticos de dos poblaciones	Rodríguez-Romero et al., 1988
8	Evaluación del periodo de fijación de larvas	Bush-Medina y Castro-Castro, 1990
9	Composición bioquímica proximal	Páez-Osuna et al., 1991; 1993
10	Evaluación de metales traza y maduración	Frías-Espericueta et al., 1999
11	Nutrición de juveniles	Leyva-Miranda, 2005; Rivero-Rodríguez et al., 2007; Ojeda-Ramírez et al., 2008
12	Evaluación del desempeño bajo condiciones de cultivo	Chávez-Villalba et al., 2005
13	Evaluación de la temperatura en el crecimiento y supervivencia de juveniles	Cáceres-Puig et al., 2007
14	Evaluación del ciclo reproductivo e histoquímica	Rodríguez-Jaramillo et al., 2008; Chávez-Villalba et al., 2008
15	Evaluación patológica de poblaciones silvestres	Cáceres-Martínez et al., 2008

Recientemente se han realizado trabajos con mayor enfoque a la acuicultura, como la evaluación de las tasas de crecimiento y el potencial de cultivo (Angell, 1986), la nutrición de juveniles de *C. corteziensis* (Leyva-Miranda, 2005; Rivero-Rodríguez et al., 2007) y la evaluación de la temperatura óptima de crecimiento y de supervivencia (Cáceres-Puig et al., 2007). Sin embargo, resulta evidente la falta de estudios en relación a la maduración y reproducción de esta especie. El primer enfoque de esta tesis fue caracterizar la acumulación de reservas energéticas (proteínas, carbohidratos y lípidos

totales), con énfasis en la clase de lípidos (esteroles esterificados y libres, triacilglicéridos, fosfolípidos totales, carotenoides y ácidos grasos), en relación al ciclo reproductivo de una población silvestre de hembras de *C. corteziensis*. Dicho enfoque nos permitió definir la comparación de criterios nutricionales para acondicionamiento reproductivo de ostiones adultos de *C. corteziensis*, con la finalidad de lograr la maduración gonádica en cautiverio, y en el futuro la producción de larvas y semillas que permita disminuir su captura del medio natural como se ha hecho hasta el momento.

El segundo enfoque fue la maduración en cautiverio para lo cual se evaluó en primer lugar el efecto de la composición bioquímica, particularmente de ácidos grasos, esteroles, pigmentos y aminoácidos, de distintas especies de microalgas en la maduración gonádica de *C. corteziensis*. Asimismo, se evaluó el efecto de la sustitución parcial de alimento vivo (i.e. microalgas) con emulsiones de lípidos en la maduración y respuesta inmunológica de *C. corteziensis*.

## II. ANTECEDENTES

### 1. Biología general

La familia Ostreidae está compuesta por varios géneros, entre ellos los más representativos son el *Ostrea* y *Crassostrea* por contener un número considerable de especies comestibles, como lo es *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1951), la cual se distribuye desde el Golfo de California hasta Panamá (Keen, 1971). Esta especie no se encuentra en costas expuestas al mar abierto, por lo que su distribución se encuentra asociada casi exclusivamente a zonas de manglar, en estuarios relativamente estables y tranquilos. Los aspectos básicos de la biología de las ostras que se distribuyen en los litorales de México, así como la evaluación de las especies como recurso acuícola esta ampliamente descrito en el trabajo de Ramírez-Granados y Sevilla (1965). Y es a partir de este que Stuardo y Martínez (1975) describen algunos aspectos biológicos de la población de *C. corteziensis* del estado de Nayarit, México, donde se hace referencia que la madurez gonádica, desoves y presencia de larvas están asociados a los cambios de temperatura, mientras que la salinidad parece tener menos efectos, no obstante a la fuerte disminución que se da durante la época de lluvias en algunas zonas alejadas de las bocas de los esteros. *C. corteziensis* es una especie de crecimiento rápido, alcanzando los 70–75 mm de longitud durante los primeros siete meses de vida. Se estima un crecimiento de 40 mm mensuales durante los dos primeros meses de vida, el cual disminuye a 10 mm en ostiones de 100–110 mm de longitud (Stuardo y Martínez, 1975). A continuación se describen las características anatómicas y funcionales, así como de la biología en general (i.e. acumulación de reservas,

reproducción, ontogenia, inmunología, etc.) que comparte *C. corteziensis* con otras especies de ostras, evidencia de la falta de información específica para esta especie.

## 2. Anatomía

Los ostiones, como otro molusco bivalvo, presentan dos valvas asimétricas calcificadas, la que se adhiere al sustrato se considera como izquierda, mientras que la superpuesta es considerada como la derecha (Eble y Scro, 1996). Ambas valvas están unidas por un músculo abductor y por una charnela, ligamento proteico y ligeramente calcificado que se encuentra sobre la línea media dorsal (Fig. 4). Los ostiones son organismos sésiles, comprimidos lateralmente y elongados en su parte dorso-ventral. Las conchas varían en su forma y coloración entre especies y hábitat, tanto externa como internamente.

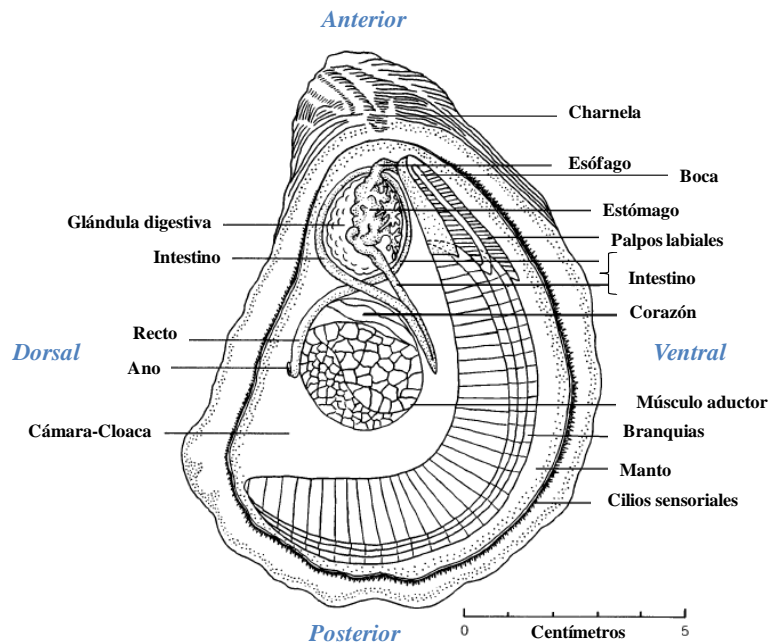


Fig. 4 Anatomía general interna de los ostiones (i.e. *C. virginica*). (Tomado de Galtsoff, 1964).



Los órganos internos están cubiertos por el manto, el cual está compuesto por tejido conectivo, vasos sanguíneos y nervios, el cual está cubierto en ambos lados por un epitelio unicelular. En la parte anterior, el manto forma un capuchón cefálico que cubre los palpos labiales y la boca. El manto tiene principalmente funciones sensoriales, mecánicas y de protección. Y es a través de los tentáculos del manto y el pliegue del velo que los ostiones pueden detectar la presencia y características del alimento y direccionarlo a través del control del flujo de agua (Eble y Scro, 1996). Además, el manto proporciona cierta protección del medio externo y de la depredación (Galtsoff, 1964). En *Crassostrea gigas* se ha demostrado a nivel molecular que el manto tiene otras funciones, como lo son la síntesis de proteínas, soporte intra- y extra celular, transducción de señales, soporte metabólico, formación y calcificación de la concha, etc. (Miyamoto et al., 2002).

El sistema digestivo está formado por boca, esófago, estómago, glándula digestiva, intestino, recto y ano (Fig. 4). La boca es una abertura horizontal cubierta por los palpos labiales que llega al estómago atravesando el esófago. El estómago, de forma alargada, se encuentra inmerso en la glándula digestiva y continúa hacia el intestino donde se encuentra el estilete cristalino, estructura de textura gelatinosa en donde se encuentran las enzimas digestivas (e.i. amilasa, celulasa, quitinasa, lipasa, proteasa, etc.) (Morton, 1952; van Well, 1961; Alyakrinskaya, 2001). La secreción de estas enzimas a lo largo del tracto digestivo de *C. gigas* ha permitido identificar los sitios de digestión y absorción del alimento, particularmente de proteínas y carbohidratos (Boucad-Camou et al., 1983). El intestino recorre un gran número de órganos, partiendo de la proximidad del corazón, para rodear la glándula digestiva hacia el recto y el ano y por último, termina a un costado del músculo

abductor. El desplazamiento del alimento se lleva a cabo con la ayuda de cilios que recubren el epitelio interno del intestino (Eble y Scro, 1996).

El sistema de excreción está constituido por el riñón y la glándula pericardial, los cuales se encuentran de manera ventral al corazón y al músculo abductor (Eble y Scro, 1996).

Las branquias se extienden desde la boca hasta la proximidad del ano (Fig. 4). Los ostiones tienen dos pares de branquias en cada lado, izquierdo y derecho. Estas ocupan una considerable porción de la cavidad del manto en la parte ventral y ventral-posterior. Las branquias tienen la doble función de encargarse de la alimentación y del intercambio gaseoso en el proceso de la respiración (Eble y Scro, 1996). Se ha observado que las branquias también intervienen en separar los huevos durante el desove lo cual favorece la fecundación (Eble y Scro, 1996). Estructuralmente, las branquias son lamelas compuestas de filamentos branquiales, los cuales a su vez están constituidos de cilios anteriores y laterales, los cuales permiten la circulación del agua y un aporte continuo de oxígeno y partículas de alimento (Eble y Scro, 1996). Las branquias secretan un mucopolisacárido al que se adhieren las partículas de alimento, las cuales son dirigidas por los cilios hacia los palpos labiales antes de ser ingeridas (Ward et al., 1994).

El músculo abductor está situado en la región posterior del cuerpo y consiste en dos partes. Una de aproximadamente de 2/3 del total del músculo, translucido y de forma ovalada cuya función es motriz. La otra, de menor tamaño, en forma de semi-luna y de color blanco opaco. Las fibras musculares de esta porción son mucho más densas que en la porción traslucida (Galtsoff, 1964). La parte traslucida puede contraerse rápidamente para cerrar las valvas por periodos cortos de tiempo, en cambio la parte opaca puede mantener

cerradas las valvas por tiempos prolongados aunque su tiempo de reacción es más lento (Millman, 1964). Se ha descrito en algunas especies de moluscos que la parte opaca y traslúcida están compuestas por células de músculo liso y estriado respectivamente (Matsuna y Kuga, 1989; Dore, 1991). La contracción de las fibras del músculo permite cerrar las valvas (Fig. 4), mientras que la relajación del músculo abductor permite a las valvas permanecer abiertas, esto debido a la elasticidad y resistencia del ligamento de las valvas o charnela. El músculo abductor está rodeado del corazón, branquias, intestino y ano que desemboca en la cloaca (Eble y Scro, 1996).

El sistema circulatorio de los ostiones es abierto: la hemolinfa es bombeada por el corazón a través de arterias, las cuales se bifurcan en vasos en el seno de los tejidos irrigados por la hemolinfa. Estructuralmente, el corazón está compuesto de un ventrículo y de dos aurículas y las fibras musculares que lo componen son estriadas. El corazón se encuentra dentro de la cavidad del pericardio, situado entre la masa visceral y el músculo abductor (Eble, 1996). Los hemocitos son las células que se encuentran circulando en la hemolinfa, y tienen una función de defensa como parte del sistema inmunológico de los ostiones (Cheng, 1981; Bachère et al., 1995).

El sistema nervioso en moluscos bivalvos está compuesto por ganglios cerebrales, viscerales y motores, organizados en varios pares de nervios (Galtsoff, 1964). El sistema nervioso y la secreción de neurotransmisores/neurohormonas (e.g. serotonina) controlan los movimientos de las branquias (Carroll y Capatane, 2007), los latidos del corazón (Kuwasawa y Hill, 1997), los movimientos de los sifones (Ram et al., 1999), así como los procesos de maduración de las gónadas y los mecanismos de desove (Siniscalchi et al., 2004; Tanabe et al., 2006).

### 3. Reproducción

En los ostiones, las gónadas desarrolladas se localizan en la masa visceral entre la glándula digestiva y el manto. Estas se originan a partir de células germinales en la región del esófago, desarrollándose a lo largo de la masa visceral y el pericardio, donde se bifurcan en un lóbulo dorsal que se extiende hacia el recto y un lóbulo ventral que se extiende hacia la parte posterior de la masa visceral (Eble y Scro, 1996). La identificación de la expresión de un gen específico en *C. gigas* ha permitido utilizarlo como un marcador para identificar las células germinales que dan origen a la gónada en adultos (Fabioux et al., 2004a). Se ha descrito que este gen se expresa durante el desarrollo embrionario y ontogénico de la misma especie de ostión (Fabioux et al., 2004b). Así mismo, se demostró a través de la expresión de este gen que las células germinales son transmitidas maternalmente a través de los ovocitos hacia los embriones y larvas (Fabioux et al., 2004b).

#### 3.1 Factores endógenos y exógenos en el control de la reproducción

Los ciclos reproductivos de moluscos en general se encuentran regulados por varios factores, los cuales han sido clasificados en algunos trabajos como endógenos y exógenos (Giese, 1959; Lubet y Mann, 1987). Dentro de los factores endógenos o internos se encuentran los neuroendocrinos y hormonales, los cuales controlan la acumulación de reservas energéticas y su movilización para el crecimiento somático y la gonadogenesis (Mathieu y Lubet, 1993). Los factores exógenos o externos, como la temperatura, disponibilidad de alimento, salinidad, fotoperiodo, etc., controlan en la gonadogenesis, los desoves y el desarrollo de larvas (Giese, 1959; Lubet y Mann, 1987) (Fig. 5).

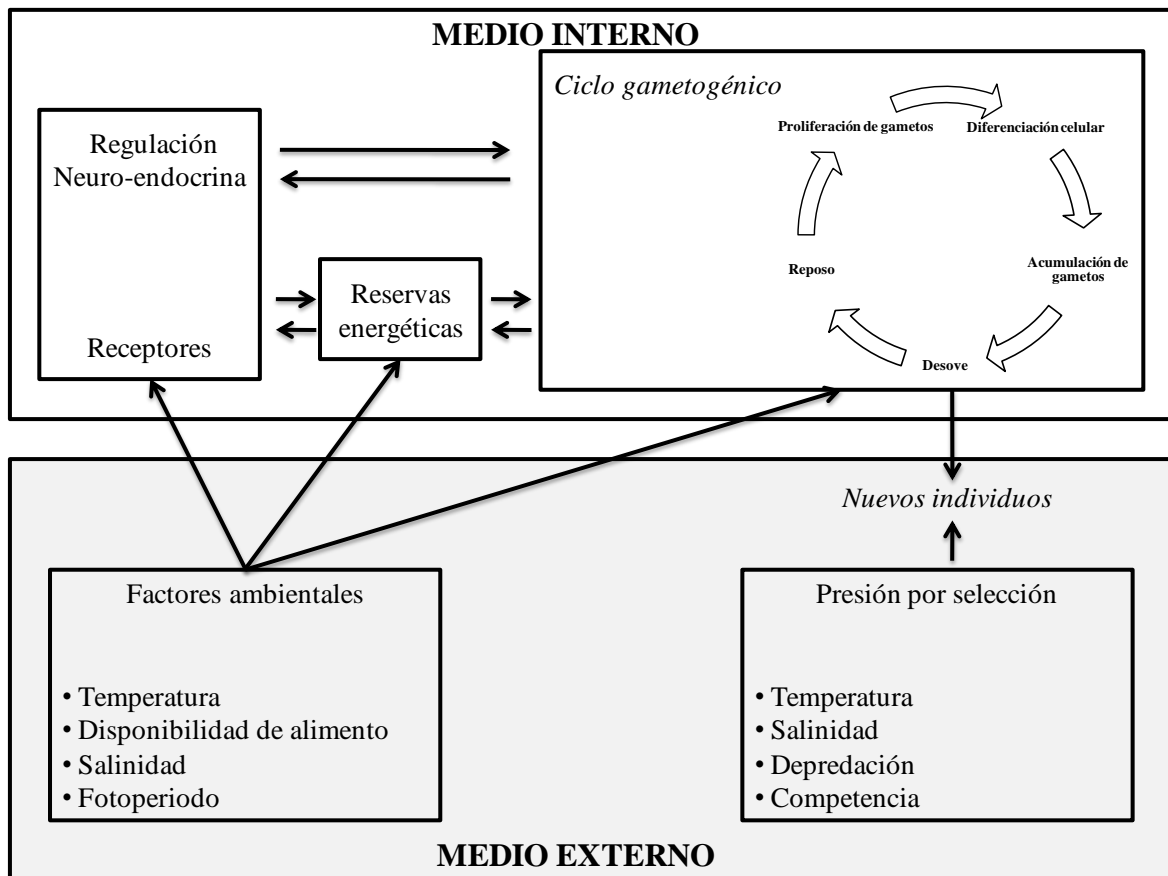


Fig. 5 Factores que controlan el ciclo reproductivo de los invertebrados marinos (Giese y Pearse, 1974; Citado en: Thompson et al., 1996).

La reproducción de moluscos bivalvos es una respuesta genética a la compleja interacción de los factores endógenos y exógenos, dentro de los cuales la temperatura, el fotoperiodo y la disponibilidad de alimento estimulan los factores endógenos, principalmente la actividad neuroendócrina. El ciclo reproductivo de *Argopecten irradians* está caracterizado por 5 estados neuroendócrinos, los cuales fueron determinados a través de histología en que se observaron las variaciones en el tamaño, la textura y vascularización de las células de los ganglios nerviosos (Fig. 6). El estadio neuroendócrino I favorece la acumulación de nutrientes, mientras que los estadios II y III controlan la transferencia de

nutrientes. El estadio IV corresponde al proceso de vitelogenénesis hasta la maduración, mientras que el estadio V al proceso de desove (Barber y Blake 1991) (Fig.6).

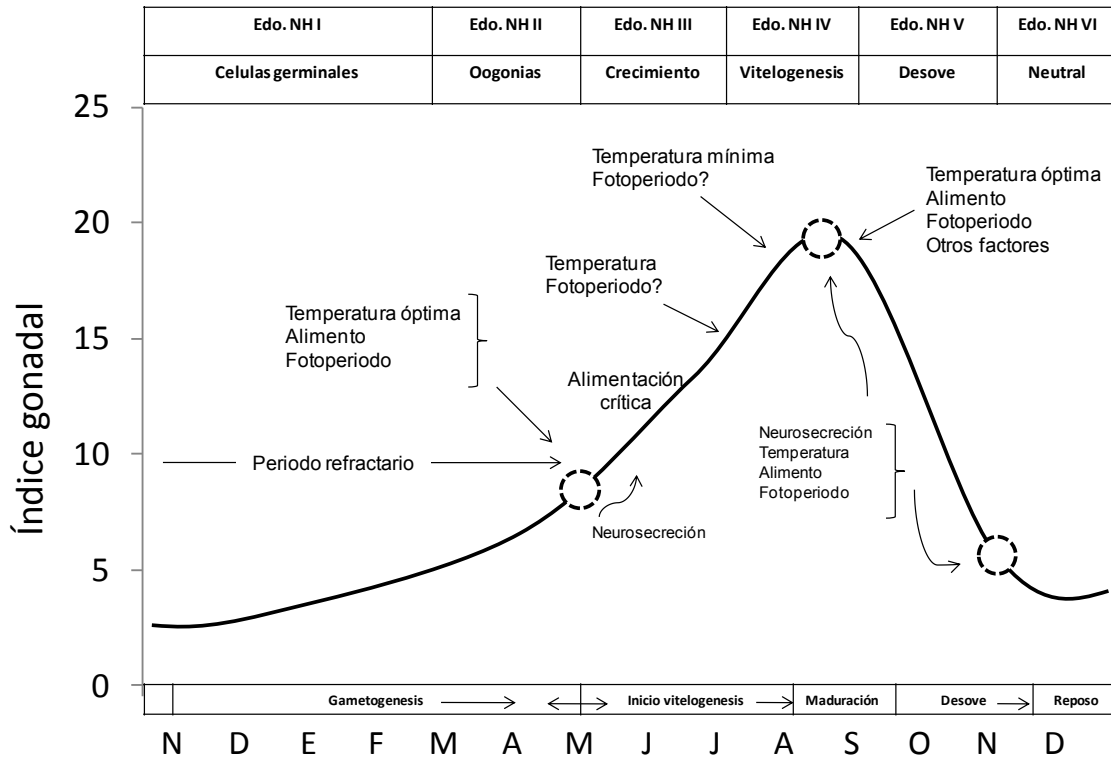


Fig. 6 Esquema de la interacción de factores endógenos y exógenos en el ciclo reproductivo de *Argopecten irradians* (Sastry, 1975. Citado en: Barber y Blake 1991).

De manera similar a lo que se ha observado en *A. irradians*, se ha descrito que el proceso reproductivo de otras especies de moluscos bivalvos está asociado a cambios en los niveles de neurosecreciones del tejido nervioso y gonádico (Osada et al., 1987; Matsutani, 1990; Martínez et al., 1996; Siniscalchi et al., 2004; Tanabe et al., 2006).

Entre estas neurosecreciones se encuentran algunas aminas como la serotonina, dopamina, noradrenalina y adrenalina, las cual son secretadas por las células nerviosas (Khotimenchenko y Deridovich, 1991; Deridovich y Reunova, 1993; Tanabe et al., 2006).

Se ha descrito en algunos trabajos con moluscos bivalvos los efectos de las neurosecreciones, principalmente de la serotonina, en la inducción del desove (Gibbons y Castagna, 1984), localización y cuantificación de niveles durante la gonadogenesis y desove (Matsutani y Nomura, 1986; Masseur et al., 2002), así como sus efectos en el desove y maduración de ovocitos (Alvarado-Álvarez et al., 1996). Sin embargo se ha demostrado en algunas especies que la serotonina es más efectiva en la inducción al desove en machos que en hembras (i.e. espermatozoides vs. ovocitos) (Matsutani y Nomura, 1982; Gibbons y Castagna, 1984; Matsutani, 1990). Por lo tanto, se sugiere que existen diferentes mecanismos en los moluscos bivalvos que controlan la liberación de los gametos femeninos y masculinos, probablemente la serotonina induce la liberación de los espermatozoides, mientras que las catecolaminas la liberación de los ovocitos (Osada et al., 1987; Matsutani, 1990; Pani y Croll, 2000). Por otro lado, se ha demostrado que los efectos de la serotonina en los mecanismos del desove pueden ser inhibidos por la dopamina (Fong et al., 1993), por lo tanto es de esperarse que los niveles de dopamina disminuyan durante el desove, tal y como se observó en *P. magellanicus* (Pani y Croll, 2000). Finalmente, las prostaglandinas también tienen un papel importante modulando el mecanismo de acción de las monoaminas y por lo tanto la reproducción de los moluscos bivalvos (Khotimenchenko y Deridovich, 1991, Deridovich y Reunova, 1993; Martínez et al., 1996; 2000). La interacción de las distintas secreciones neurohormonales y de prostaglandinas, y los efectos de estas en la reproducción de los moluscos bivalvos se sintetiza brevemente en la figura 7.

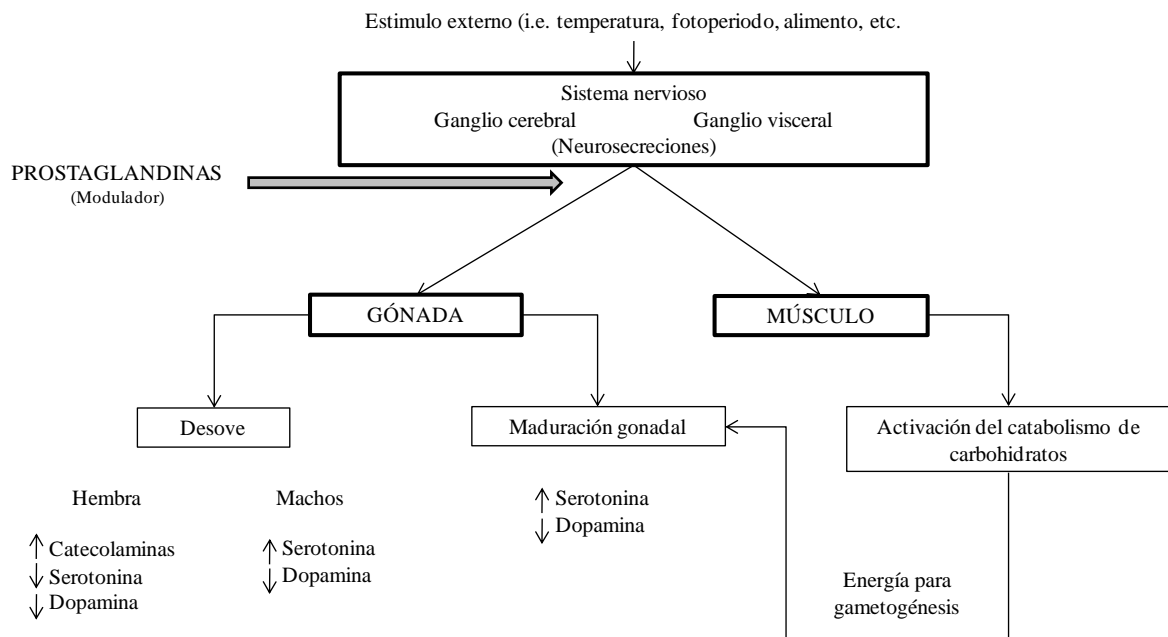


Fig. 7 Regulación endógena de los procesos de reproducción de moluscos, particularmente pectínidos (Tomado de: Arellano, 2005).

### 3.2 Ciclos reproductivos

#### 3.2.1 Ciclo reproductivo de poblaciones de ostión de zonas templadas

Los ciclos reproductivos de algunas especies de moluscos bivalvos, incluidos entre ellos *C. gigas* (Lango-Reynoso et al., 2006) y *C. virginica* (Heffernan et al., 1989), presentan una fase de reposo sexual, una de gametogénesis que termina con la emisión de los gametos (desove) y por último una fase de reabsorción de los restos de la gónada (Fig. 8). En *C. gigas*, la gametogénesis disminuye (“reposo sexual”) en el otoño para iniciar lentamente su desarrollo durante principios de invierno. A finales de este periodo las células germinales se desarrollan rápidamente hasta el inicio de la gametogénesis activa en primavera y el desarrollo de gametos maduros en el verano, periodo en el que normalmente



ocurre un sólo desove para su fecundación (Chávez-Villalba et al., 2001; Lango-Reynoso et al., 2006) (Fig. 8).

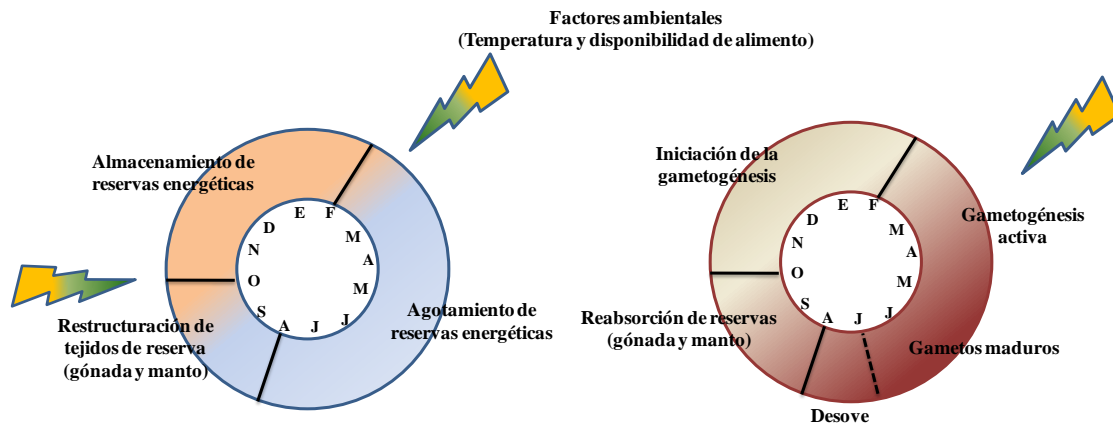


Fig. 8 Representación esquemática de la movilización de reservas de los tejidos de reserva (manto-gónada) y su relación con el ciclo reproductivo de *Crassostrea gigas* (Tomado de Delaporte, 2005).

Como se había mencionado en las figuras 5 y 6, los ciclos reproductivos de diversos invertebrados están controlados por las complejas interacciones de distintos factores, principalmente ambientales. La variabilidad ambiental y la distribución espacial de las especies en distintas áreas geográficas les permiten tener diferentes estrategias reproductivas, controladas principalmente por la estacionalidad de la temperatura y la disponibilidad de alimento (Lubet y Mann, 1987), tal y como se ejemplificará a continuación.

### 3.2.2 Ciclo reproductivo de *C. corteziensis* en comparación con otras especies

El ostión *C. corteziensis* es una especie que habita ambientes de semitropicales a tropicales, caracterizados por temperaturas del agua próximas a los 30°C (Rodríguez-Jaramillo et al., 2008). Los ostiones nativos de ambientes tropicales generalmente presentan

ciclos reproductivos más extensos (Rogers y García-Cubas, 1981; George-Zamora et al., 2003; Baqueiro-Cárdenas y Aldana-Arana, 2007). Para *C. corteziensis* se ha reportado un ciclo reproductivo activo de mayo a noviembre (Cuevas-Guevara y Martínez-Guerrero, 1979) o de abril a diciembre en Nayarit (Stuardo y Martínez, 1975). Mientras que en el estado de Sinaloa, se ha descrito la mayor actividad reproductiva de marzo a noviembre (Rodríguez-Jaramillo et al., 2008). Más al norte, en Sonora, también se reportó que el periodo de mayor actividad fue de marzo a noviembre (Chávez-Villalba et al., 2008), otros trabajos han reportado periodos reproductivos más cortos, de marzo a octubre (Ruíz-Durá, 1974) y de abril a septiembre (Ramírez y Sevilla, 1965).

Por otro lado, en el ostión americano *Crassostrea virginica*, especie que se distribuye desde la costa atlántica de Canadá hasta Venezuela (Morse, 1971), se ha observado que las poblaciones que se distribuyen en zonas más cálidas (p.ej. Golfo de México) tienen un periodo reproductivo más amplio (George-Zamora et al., 2003) y la gametogénesis y desoves ocurren con antelación en comparación con las poblaciones de ostiones que se distribuyen en zonas templadas como Canadá (Thompson et al., 1996). Resultados similares se han reportado para las poblaciones de *C. gigas* que se cultivan en la costa de Francia, donde se ha observado que las poblaciones del sur de la costa del Atlántico desovan con un mes de antelación con respecto a las poblaciones que se encuentran en el norte (Lango-Reynoso et al., 2006). Sin embargo, y de manera recientemente, también se ha observado un mayor crecimiento y capacidad reproductiva de *C. gigas* en zonas más al norte como Holanda, en donde los ostiones mostraron un mejor desempeño reproductivo que las poblaciones que se distribuyen en Francia (Cardoso et al., 2007), posiblemente debido a mejores condiciones de temperatura, disponibilidad de

alimento, presión por depredación, seston, etc. Por otra parte, también se ha observado que los ostiones de una variedad de *C. gigas* (spp. *angulata*) que se distribuye en Portugal alcanza la madurez prematuramente e inicia los desoves en abril-mayo, los cuales continúan hasta finales de agosto (Massapina et al., 1999). Estas diferencias son atribuidas a diferencias entre subespecies (spp. *angulata*), pero también a las diferencias en la temperatura y a la disponibilidad del alimento entre ambas localidades.

La disponibilidad de alimento es uno de los principales factores exógenos que regulan la reproducción debido a que durante el ciclo reproductivo de los moluscos bivalvos se acumulan reservas energéticas, principalmente glucógeno, las cuales son utilizadas durante la gametogénesis (Sastry, 1979; Gabbott, 1983; Mathieu y Lubet, 1993) (Fig. 8). La acumulación de reservas energéticas en órganos y células especializadas, así como su transferencia entre tejidos durante la gametogénesis varía también en función de la especie (Mathieu y Lubet, 1993). En la familia Ostreidae el principal tejido de reserva de glucógeno son las células vesiculares del tejido conectivo (CVT), las cuales se encuentran localizadas principalmente en el manto y palpos labiales, contiguas a la gónada y a la glándula digestiva (Mathieu y Lubet, 1993; Berthelin et al., 2000b). El glucógeno es la principal reserva energética que sustenta la gametogénesis en *C. gigas* (Mann, 1979; Berthelin et al., 2000a; Li et al., 2000; Ren et al. 2003; Matus de la Parra et al., 2005; Dridi et al., 2007) y *C. virginica* (Sidwell et al., 1979; Barber et al., 1988a; 1988b). En *C. gigas* y *C. virginica* se ha reportado que las reservas de glucógeno son utilizadas durante la primavera en los periodos de mayor actividad reproductiva o gametogénesis, hasta alcanzar valores mínimos durante el verano cuando ocurren los desoves, y posteriormente las reservas de glucógeno se incrementan de nuevo a partir del verano hasta inicios del

invierno (Chipman, 1948; Engle, 1951; Galtsoff, 1964; Deslous-Paoli y Héral, 1988), cuando en algunas zonas geográficas normalmente ocurre el principal florecimiento de fitoplancton (Lubet y Mann, 1987; Mathieu y Lubet, 1993). Durante el periodo de postdesove, los ostiones registran una disminución considerable que coincide además con las condiciones ambientales adversas (p.ej. disminución de la temperatura, disponibilidad de alimento, etc.) lo cual provoca una disminución de hasta el 75% del glucógeno almacenado (Deslous-Paoli y Héral, 1988).

Se ha descrito que la acumulación y utilización de glucógeno varía entre poblaciones de la misma especie, lo cual es atribuido a la estacionalidad de la temperatura, y por ende a la disponibilidad de alimento, que son los principales factores que controlan la gametogénesis (Chipman, 1948; Engle, 1951). Esto se ha observado en la distribución latitudinal de algunas poblaciones del ostión *C. virginica*, en que la temperatura de latitudes bajas (p.ej. en el Golfo de México) favorece la alimentación continua incluso durante el invierno, esto en contraste con poblaciones de ostiones de la misma especie que se distribuyen en latitudes altas cuyas bajas temperaturas detienen la alimentación, y por lo tanto la síntesis de glucógeno (Thompson et al., 1996). Resultados similares se han observado en la alimentación y síntesis de glucógeno de *C. virginica* bajo diferentes condiciones de temperatura, las cuales fueron más altas en ostiones cultivados entre los 14–19°C, en comparación con los que mantuvieron entre 2–7°C, temperatura en que la alimentación ceso por completo, así como la síntesis de glucógeno (Ruddy et al., 1975).

En *C. corteziensis* se determinó el contenido de carbohidratos en relación al estadio de desarrollo gonádico (Rodríguez-Jaramillo et al., 2008), o bien a lo largo del año en relación al índice gonadosomático (Páez-Osuna et al., 1991; 1993); si bien dicho índice no

es confiable dada la dispersión de la gónada en el tejido circundante (Páez-Osuna et al., 1991), las variaciones estacionales en la acumulación de glucógeno en *C. corteziensis* descritas en estos trabajos (Páez-Osuna et al., 1991; 1993) son similares a las que se han observado en otras especies de ostiones (i.e. *C. gigas* y *C. virginica*).

El metabolismo del glucógeno en diferentes grupos de animales está regulado por dos enzimas, la glucógeno-fosforilasa y la glucógeno-sintetasa, las cuales realizan los procesos de glucolisis y glucogénesis, respectivamente (Bollen et al., 1998). En moluscos bivalvos dichas enzimas han sido caracterizadas para *C. gigas* (Hata et al., 1993), *C. virginica* (Swift et al., 1988), *Mytilus galloprovincialis* (San Juan Serrano et al., 1991), *Mytilus edulis* (Gabbott y Whittle, 1986) y *Patinopecten yesoensis* (Hata et al., 1987). La glucógeno-sintetasa se encuentra de dos formas o isoenzimas, la forma *I*, es una enzima activa e independiente de la molécula glucosa-6-fosfato, mientras que la forma *D* es una enzima inactiva y dependiente de la molécula glucosa-6-fosfato. Estas enzimas se han identificado tanto en el músculo abductor y glándula digestiva de *C. virginica* (Swift et al., 1988) como en el manto de *M. edulis* (Cook y Gabbott, 1978). Se ha demostrado que la acumulación de glucógeno en *M. edulis* durante el verano está controlada por la conversión de la enzima glucógeno-sintetasa *D* a la forma *I* (Gabbott y Whittle, 1986), de la misma manera se pudo demostrar que la inter-conversión de formas de la enzima es dependiente de la cantidad de glucosa circulante en tejidos (Gabbott y Whittle, 1986). En *C. gigas* se ha descrito que la expresión de estas enzimas es particularmente alta en las células especializadas de los palpos labiales y gónada (Bacca et al., 2005), órganos en los que se acumulan y utilizan importantes cantidades de glucógeno, respectivamente (Berthelin et al., 2000a; 2000b). La actividad estacional de las enzimas glucógeno-fosforilasa y glucógeno-

sintetasa muestran una estrecha relación con la acumulación y utilización del glucógeno en los tejidos lo largo del ciclo reproductivo de *C. gigas* (Bacca et al., 2005; Kong et al., 2007). Por otra parte, se han observado diferencias en el metabolismo del glucógeno y la actividad de estas enzimas entre ostiones diploides y triploides de *C. gigas*. Las reservas de glucógeno son utilizadas por los ostiones diploides hasta en un 85.7% como sustrato metabólico durante la gametogénesis, pero en ostiones triploides las reservas de glucógeno prácticamente no son usadas durante el ciclo reproductivo: aparentemente en diploides la actividad de la enzima glucógeno-fosforilasa disminuye hasta en un 55% durante la gametogénesis activa, mientras que en triploides esta se mantiene relativamente constante (Kong et al., 2007). Lo anterior podría ser un motivo por el cual los ostiones triploides parcialmente estériles (Allen y Downing, 1986) no transfieren glucógeno hacia la gónada, por lo que los tejidos somáticos por lo general son de mayor tamaño (Allen y Downing, 1990). Además, la actividad de la enzima glucógeno-sintetasa en ostiones diploides ha mostrado tener un patrón similar al contenido de glucógeno en la gónada; por lo que sus valores aumentan en los tejidos de ostiones con los estadios más avanzados de la gónada, posteriormente los valores disminuyen durante el desove, e incrementan de nuevo durante el post-desove (Bacca et al., 2005; Kong et al., 2007), mientras que en los ostiones triploides se ha observado un patrón inverso, donde la actividad de la glucógeno-sintetasa incrementa durante el periodo en que se presentan los desoves de los ostiones diploides (Kong et al., 2007).

Es bien conocido que en diferentes especies de moluscos bivalvos (Gabbott, 1975; Lubet, 1976), los carbohidratos son transferidos y acumulados en las gónadas en forma de lípidos (Barber y Blake, 1985; Pazos et al., 1997; Martínez y Mettifogo, 1998; Racotta et

al., 1998; Ruíz-Verdugo et al., 2001; Racotta et al., 2003). Sin embargo, a diferencia de lo que sucede en pectínidos, en que el mayor aporte de glucógeno proviene del prominente músculo abductor, en ostiones la fuente de glucógeno es principalmente el manto y los palpos labiales (Berthelin et al., 2000a; 2000b).

Además de la utilización de las reservas de glucógeno para la síntesis de lípidos o lipogénesis, los moluscos bivalvos tanto pectínidos como ostiones, almacenan y transfieren lípidos desde la glándula digestiva hacia las gónadas durante la maduración (Barber y Blake, 1981; Allen y Conley, 1982; Epp et al., 1988; Pazos et al., 1997; Berthelin et al., 2000b; Matus de la Parra et al., 2005; Dridi et al., 2007). Lo anterior concuerda con los altos valores energéticos en gónadas de *C. gigas*, atribuidos al alto contenido de lípidos, en particular en hembras (17–23%) y en menor contenido en machos (5.9–12.3%) (Deslous y Héral, 1988). En invertebrados, las reservas energéticas de los ovocitos son adquiridas de los tejidos adyacentes a la gónada así como de las células foliculares que se encuentra próximas a los ovocitos; además de que algunas de las reservas pueden también ser auto-sintetizadas por los ovocitos (Raven, 1961). Los lípidos neutros que principalmente se acumulan en las gónadas durante la maduración son triglicéridos y esteroides esterificados (Swift et al., 1980; Matus de la Parra et al., 2005), los cuales se transfieren a los huevos de los moluscos bivalvos, alcanzando en el caso de los triglicéridos valores de 14 a 21% del peso seco, dependiendo de la especie (Lee y Heffernan, 1991). La acumulación de lípidos y algunos ácidos grasos en huevos están estrechamente relacionados con el desarrollo ontogénico y desempeño larvario de diversas especies de moluscos bivalvos, entre ellas *Pecten maximus* (Marty et al., 1992; Delaunay et al., 1992; Soudant et al., 1996b; Soudant et al., 1998), *Argopecten purpuratus* (Caers et al., 1999; Nevejan et al., 2003) *Mytilus sp.*

(Pernet et al., 2004), *C. virginica* (Chu y Webb, 1984; Gallager y Mann, 1986; Gallager et al., 1986) y *C. gigas* (Robinson, 1992a; 1992b; Massapina et al., 1999; Uriarte et al., 2004; Cannuel y Beninger, 2005). Aunado a lo anterior, se han observado importantes diferencias en la acumulación y la composición de lípidos y de ácidos grasos en las gónadas de *C. gigas* entre ostiones madurados en cautiverio y organismos silvestres (Soudant et al., 1999). Estas diferencias permiten evidenciar la importancia de la acumulación estacional de reservas y sus efectos en la reproducción, así como la necesidad de caracterizar cuantitativa- y cualitativamente los lípidos que están condicionando el desempeño reproductivo de cada especie.

En *C. corteziensis* se ha observado una disminución de lípidos durante el invierno y un incremento durante la primavera-verano, periodos que coinciden con el reposo sexual y la mayor actividad reproductiva de la especie, respectivamente (Páez-Osuna et al., 1993). Rodríguez-Jaramillo y colaboradores (2008) encontraron que la cantidad de lípidos incrementó en hembras y machos conforme al estadio de maduración de las gónadas, mientras que en la glándula digestiva la cantidad de lípidos se mantuvo constante. Aunado a las variaciones estacionales, también se ha observado que la posición en la que se encuentran adheridos los ostiones de *C. corteziensis* a las raíces de los mangles afecta significativamente la acumulación de lípidos, la cual es mayor en los ostiones que se encuentran en la parte inferior de las raíces, por debajo de la línea de bajamar promedio (Páez-Osuna et al., 1993).

Los lípidos son transportados hacia la gónada a través de la hemolinfa; en donde se observa un incremento durante la reproducción y en el ayuno en *C. gigas*, y que está dado por los lípidos en los hemocitos y las lipoproteínas plasmáticas (Allen y Conley, 1982). Las



lipoproteínas plasmáticas transportan principalmente fosfolípidos (70–80%), y en menor proporción lípidos neutros como triglicéridos (2.6–5.5%), esteroides libres (0.5–1.2%), esteroides esterificados (0.2–2.1%) y ácidos grasos libres (0.8–3.8%) (Allen y Conley, 1982).

Las lipoproteínas plasmáticas que transportan lípidos a la gónada son vitelogeninas, y al proceso de transporte y acumulación en gónadas se le conoce como vitelogénesis. Las vitelogeninas además de transportar lípidos, transportan otros nutrientes, como proteínas, carbohidratos y pigmentos hacia los ovocitos que se encuentran en las gónadas durante la maduración. Cuando las vitelogeninas entran en los ovocitos por endocitosis, se acumulan en forma de vitelo. En el caso particular de los moluscos bivalvos, se han identificado las lipoproteínas del vitelo, o vitelinas en los ovocitos de *C. virginica* y *Mercenaria mercenaria* (Lee y Heffernan, 1991). Dado que se ha reportado presencia de vitelina en el ovario y ovocitos de *C. gigas*, se ha sugerido a éstos como únicos sitios de síntesis de estas proteínas (Susuki et al., 1992). Posteriormente, se identificó un gen en el ovario de *C. gigas* que codifica a una proteína de características similares a la vitelina y cuya expresión *in situ* es exclusiva de las células foliculares del ovario (Matsumoto et al., 2003).

El  $17\beta$ -estradiol controla la acumulación de vitelo y por lo tanto, favorece el crecimiento de los ovocitos durante la maduración de *C. gigas* (Li et al., 1998) y *P. yessoensis* (Osada y Nomura, 1990). La transferencia de lípidos de la glándula digestiva hacia la gónada es de suma importancia ya que algunas clases de lípidos, como los ácidos grasos altamente insaturados (HUFA, por sus siglas en inglés), de 20 ó más carbonos y con más de tres insaturaciones no pueden ser sintetizados por diversas especies de moluscos (Ackman y Kean-Howie, 1995), entre las que se encuentran *C. gigas* (Waldock y Holland,

1984) y *C. virginica* (Chu y Greaves, 1991). En consecuencia, los HUFA se consideran esenciales para el crecimiento y supervivencia de ostiones (Trider y Castell, 1980; Langdon y Waldock, 1981; Waldock y Holland, 1984). Además, se ha descrito que otros ácidos grasos poliinsaturados (PUFA, por sus siglas en inglés), de 16 ó más carbonos y con dos o más dobles enlaces, son componentes estructurales de las gónadas, así como importantes reservas energéticas que sustentan la reproducción de diversas especies como *Placopecten magellanicus* (Napolitano y Ackman, 1993), *Pecten maximus* (Soudant et al., 1996a, 1996b), *C. gigas* (Soudant et al., 1999), *Argopecten purpuratus* (Caers et al., 2003) y *Nodipecten subnodosus* (Palacios et al., 2005).

Durante la acumulación de reservas en los ovocitos de invertebrados, primero se acumulan carbohidratos, posiblemente para ser utilizados como fuente de energía; posteriormente se acumulan principalmente lípidos, mientras que las proteínas son las últimas en incorporarse en los ovocitos (Raven, 1961). Lo anterior concuerda con lo observado en algunas especies de moluscos bivalvos, en que se describe que la acumulación estacional de proteínas sostiene de manera importante el proceso final de la gametogénesis (Gabbott y Bayne, 1973; Barber y Blake, 1981; Ruíz et al., 1992). En *C. gigas* se ha observado que la concentración de proteínas aumenta durante los estadios más avanzados de maduración, para luego disminuir durante los desoves en el verano e incrementar de nueva cuenta en el invierno (Deslous-Paoli y Héral, 1988; Li et al., 2000; Ren et al., 2003; Dridi et al., 2007). Este patrón también se observó en *C. corteziensis* (Páez-Osuna et al., 1991; 1993). Por otra parte, las proteínas son componentes mayoritarios (peso seco) tanto en los tejidos de reproductores de *C. gigas* (29–52%) (Deslous-Paoli y Héral, 1988), como en los huevos de *C. virginica* (50%) (Lee y Heffernan, 1991) y *C. gigas*

(spp. *angulata*) (44–74%), por lo tanto son un nutrimento importante en la dieta de los reproductores que influyen sobre la maduración y eventualmente sobre la calidad de los desoves y el desarrollo larvario (Massapina et al., 1999).

#### 4. Nutrición: generalidades

Aún si se han realizado una gran cantidad de trabajos de nutrición con diferentes especies de moluscos bivalvos, hasta el momento se desconoce de manera precisa la cantidad de microalgas que consume un individuo en el medio natural. Una aproximación fue realizada por Enríquez-Díaz (2004) en que a partir de valores de clorofila *a* (5 y 15  $\mu\text{g} \times \text{l}^{-1}$ ) de dos regiones de Francia estableció sus correspondientes valores de biomasa con tres especies de microalgas cultivadas en el laboratorio (*T-Isochrysis*, *Chaetoceros calcitrans* y *Tetraselmis chui*), las cuales se ofrecieron a los ostiones en experimentación al 4 y 12% de la biomasa en peso seco. Lo anterior con finalidad de evaluar entre otras cosas, la influencia de la cantidad de alimento en el comportamiento reproductivo de *C. gigas*, así como determinar si los ostiones siguen alguna estrategia reproductiva que esté condicionada al entorno ambiental (i.e. disponibilidad de alimento) (Enríquez-Díaz, 2004).

##### 4.1 Nutrición: acondicionamiento reproductivo

Existen un gran número de trabajos que describen la cantidad de microalgas utilizadas para diversas especies de moluscos bivalvos bajo condiciones experimentales o de cautiverio (Utting y Millican, 1997). En el caso particular de *C. gigas*, las raciones promedio de microalgas varían entre 3 a 6% de la biomasa al día, considerando peso seco tanto de microalgas como de tejido de ostión (Berntsson et al., 1997; Parrish et al., 1998; Soudant et al., 1999; Chávez-Villalba et al., 2002; Delaporte et al., 2003; Enríquez-Díaz,

2004; Hégaret et al., 2004). Se ha estimado una ración promedio de 6% de la biomasa para reproductores en acondicionamiento a temperaturas de 20–22°C en la mayoría de las especies de moluscos bivalvos, mientras que a temperaturas de acondicionamiento más bajas (~16°C) una ración del 3% resulta suficiente para algunas especies (Utting y Millacan, 1997). En adultos de *C. corteziensis* se desconocen las raciones de microalgas necesarias para cubrir los requerimientos de energía para el crecimiento y la reproducción, pero en juveniles se ha evaluado el crecimiento y supervivencia de distintas dietas mono- y bi-algales a una ración constante de 1.5% de la biomasa de los ostiones (Rivero-Rodríguez et al., 2007). Por otra parte, se estableció que la temperatura de 28–30°C es la óptima para el crecimiento y supervivencia de juveniles de *C. corteziensis* alimentados con una ración de  $80\text{--}100 \times 10^3$  células mL<sup>-1</sup> × organismo × día con una dieta bi-algal (Cáceres-Puig et al., 2007).

Por otro lado, el alimento puede proporcionarse a los moluscos bivalvos de manera continua a través de bombas (i.e. peristálticas o sumergibles); o puede proporcionarse en pulsos, dividida en una o varias cantidades por día. Los sistemas continuos son comúnmente utilizados para la maduración de diferentes especies de moluscos, entre ellas *C. gigas* (Robinson, 1992a; Uriarte et al., 2004), *Argopecten ventricosus* (Racotta et al., 1998; Ramírez et al., 1999) y en *C. corteziensis* (Chávez-Villalba et al., 2005). Ambos sistemas ofrecen ventajas, ya que el continuo maximiza la utilización del alimento, lo cual reduce los altos costos de producción de microalgas (Duerr et al., 1998); mientras que el segundo sistema de alimentación evita la compra y utilización de sistemas de goteo, así como de bombas especiales.

En relación a la calidad del alimento, existen una gran variedad de trabajos que describen las variaciones en la composición bioquímica (i.e. proteínas, carbohidratos, lípidos, aminoácidos, azúcares, polisacáridos, ácidos grasos y esteroides) de distintas especies microalgas que regularmente son utilizadas como alimento para moluscos bivalvos (Fernández-Reiriz et al., 1989; Volkman et al., 1989; Tsitsa-Tzardis et al., 1993; Viso y Marty, 1993; Barret et al., 1995; Brown et al., 1991; 2002; Renaud et al., 1999; 2002; Jo et al., 2004; Roncarati et al., 2004; Pratoomyot et al., 2005; Martínez-Fernández et al., 2006). Sin embargo, se considera que los nutrientes más importantes de las microalgas son HUFA (i.e.  $20:4n-6$ ,  $20:5n-3$  y  $22:6n-3$ ) y los esteroides (i.e. colesterol), puesto que la mayoría de los moluscos bivalvos tienen una limitada capacidad de sintetizar ambos grupos (Voogt, 1975; Teshimma y Patterson, 1981; Waldock y Holland, 1984; Chu y Greaves, 1991; Ackman y Kean-Howie, 1995), por lo tanto son nutrientes esenciales tanto para el crecimiento, supervivencia (Chu y Dupuy, 1980; Trider y Castell, 1980; Langdon y Waldock, 1981; Waldock y Holland, 1984; Thompson et al., 1996; Brown et al., 1998; Piveteau et al., 1999; Caers et al., 2000; Flores-Vergara et al., 2004) y reproducción de distintas especies de moluscos bivalvos (Besnard et al., 1989; 1991; Soudant et al., 1996a; 1996b; 1996c; Samain et al., 2000; Caers et al., 2003; Racotta et al., 2003; Palacios et al., 2005).

Sin embargo, el cultivo de microalgas tiene altos costos de producción (Duerr et al., 1998), una limitada capacidad de almacenamiento por periodos prolongados (Heasman et al., 2000), así como una fuerte variación en composición bioquímica en relación a las condiciones y edad del cultivo (Lourenço et al., 1997; Ottero et al., 1997; Zhu et al., 1997; Pernet et al., 2003), así como entre cepas (Robert et al., 2004). Dicha variabilidad afecta de

forma particular el contenido de ácidos grasos durante las distintas fases de crecimiento (Fernández-Reiriz et al., 1989; Dunstan et al., 1993; Saoudis-Helis et al., 1994; Tonon et al., 2002; Mansour et al., 2003), así como en relación a parámetros fisicoquímicos durante su cultivo (Guckert y Cooskey, 1990; Renaud et al., 1991; Thompson et al., 1992; Thompson et al., 1996). Las desventajas anteriores han impulsado la investigación de alimentos alternos para la producción de larvas de moluscos (Nell, 1993). Algunas de las dietas alternas que se han estudiado son microalgas preservadas (Knauer y Southgate, 1997b; Brown y McCausland, 2000; Babarro et al., 2001), levaduras (Brown y McCausland, 2000), harinas de cereales (Mazón-Suástegui y Avilés-Quevedo, 1988; Fernández-Reiriz et al., 1998; Albentosa et al., 1999) y microencapsulados hidrosolubles o liposolubles (Langdon y Waldock, 1981; Rodríguez et al., 1992; Kreeger y Langdon, 1993; Coutteau et al., 1996; Knauer y Southgate, 1997a; 1997b; Caers et al., 2000; Langdon et al., 2000; Pernet et al., 2004).

Tal y como ya se mencionó, la cantidad y calidad del alimento, así como la temperatura, son factores es determinantes en la maduración de moluscos (Barber y Blake, 1991). Los ostiones comúnmente son sometidos a un proceso de acondicionamiento para estimular la acumulación de reservas en los ovocitos o vitelogénesis, el cual consiste en incrementar la temperatura y el alimento paulatinamente, simulando las condiciones de primavera en el medio natural (Massapina et al., 1997; Gallager y Mann, 1999; Saout et al., 1999a; Chavez-Villalba et al., 2002; Uriarte et al., 2004). Un periodo de pre-acondicionamiento a baja temperatura y abundante disponibilidad de microalgas favorece la acumulación de reservas energéticas en reproductores de *Ostrea edulis* (Utting y Millican, 1997), mientras que en *Crassostrea gigas* estimula la proliferación celular por mitosis o

gametogénesis (Samain et al., 2000; 2001). Incluso se ha observado que la alimentación durante el acondicionamiento de reproductores de *C. gigas* puede tener efectos mínimos en la calidad de los huevos y en el desempeño de las larvas cuando la disponibilidad de alimento permite que la principal acumulación de reservas se realice durante el invierno (Chávez-Villalba et al., 2003b; Cannuel y Beninger, 2005).

### 5. Nutrición y sistema inmunológico

La susceptibilidad de *C. gigas* a las mortalidades masivas que se han observado en países como E.U.A y Francia está asociada a la disminución en la capacidad de respuesta del sistema inmunológico (Samain et al., 2007), aunque también el estrés ambiental (Song et al., 2007) y por manipulación (Lacoste et al., 2002), así como al esfuerzo reproductivo (Cho y Jeong, 2005) pueden tener efectos en el sistema inmune, los cuales puede repercutir en la supervivencia de los ostiones.

La respuesta inmunológica en moluscos bivalvos ocurre tanto a nivel celular como humoral (Bachère et al., 1995; 2004). Sin embargo, la respuesta celular o de los hemocitos constituye la primera línea de defensa contra los microorganismos patógenos (Bachère et al., 1995; 2004). Los hemocitos también participan además en otros eventos fisiológicos, como en la reparación de heridas y de la concha, transporte y digestión de nutrientes, excreción, y en la fagocitosis de los ovocitos residuales que no fueron expulsados en los desoves (Cheng, 1981; Bachère et al., 2004). En general, se acepta que existen dos tipos de hemocitos en los moluscos bivalvos, los agranulares y granulares; o hialinocitos y granulocitos, respectivamente (Cheng, 1981). Sin embargo, se ha propuesto una clasificación más extensa y detallada de los tipos hemocitos de moluscos bivalvos, en que

los granulocitos se han dividido en basófilos y acidófilos con capacidad de fagocitosis (Hine, 1999). Los hialinocitos se han dividido en tres categorías en función de su tamaño y del nulo o poco contenido de gránulos (Hine, 1999). Se cree que los hialinocitos forman parte de la misma serie continua de células en desarrollo, las cuales comparten características morfológicas y funcionales similares (Bachère et al., 2004). De acuerdo con su desarrollo y actividad inmune, las células pequeñas con alta relación núcleo/citoplasma pueden desarrollarse en hemocitos más grandes con menor relación núcleo/citoplasma y con gran contenido de vesículas o gránulos (Bachère et al., 2004).

Se reconoce que la mayoría de los hemocitos de los moluscos bivalvos son fagocitos, y a pesar de que tanto hialinocitos como granulocitos tienen la capacidad de fagocitar, se reconoce que los granulocitos son los más activos (Cheng, 1981). Los fagocitos tienen la capacidad de reconocimiento a través de lectinas y quimiotaxis de partículas no propias o extrañas, principalmente de microorganismos como bacterias y virus (patógenos o no), así como de partículas inorgánicas (Cheng, 1980; Lambert et al., 2003; Bachère et al., 2004; Delaporte, 2005). Las partículas no propias o extrañas son encapsuladas o enrolladas por las membranas de los fagocitos, las cuales una vez ingeridas forman el fagosoma, el cual se une a los lisosomas para su digestión a través de las enzimas lisosomales o la producción de especies reactivas de oxígeno (Chu, 2000; Delaporte, 2005). Este último mecanismo es dependiente de oxígeno, y se le conoce como capacidad oxidativa o respiratory o oxidative burst, en inglés (Chu, 2000). El otro mecanismo es independiente de oxígeno y depende de la capacidad y actividad de las enzimas lisosomales, principalmente hidrolasas. Además de estas enzimas, los ácidos y proteínas



catiónicas pueden actuar también en la degradación de las partículas fagocitadas (Delaporte, 2005).

La producción de especies reactivas de oxígeno comprende la generación de diferentes iones de alta capacidad oxidativa, como:  $^1\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^-$ ,  $\text{OH}^-$ ,  $\text{NO}$ ,  $\text{OCl}^-$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$ . La producción de estos iones inicia con la adhesión de las partículas extrañas a la membrana citoplasmática de los hemocitos. La reacción inicia con la reducción de una molécula de oxígeno en anión superóxido por la coenzima NADPH (nicotiamida adenina dinucleotido fosfato oxidasa) e implica cierto consumo de oxígeno por los hemocitos (Chu, 2000). El anión superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) es transformado en peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) por la enzima superóxido dismutasa para formar eventualmente radicales hidroxilos ( $\text{OH}^-$ ) (Fig. 9). Algunas especies de moluscos pueden producir óxido nítrico ( $\text{NO}$ ), el cual es catalizado a través de la enzima nítrico óxido sintetasa (NOS) (Fig. 9). El  $\text{NO}$  participa en algunos procesos fisiológicos y patológicos (Moncada et al., 2001), y se ha demostrado que los hemocitos de *C. gigas* son capaces de producir  $\text{NO}$  tras ser estimulados artificialmente con acetato de forbol miristato (PMA) (Nakayama y Muruyama, 1998; Arumugan et al., 2000).

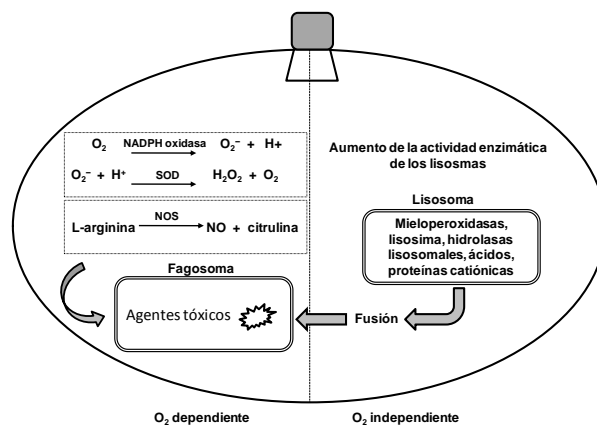


Fig. 9 Representación del proceso de degradación intracelular después de la fagocitosis de una partícula extraña por los hemocitos. NADPH (nicotiamida adenina dinucleotido fosfato oxidasa), SOD (superóxido dismutasa) y NOS (nítrico óxido sintetasa). (Tomado de Delaporte, 2005).

La respuesta humoral es la producción intermediaria de moléculas solubles por los hemocitos. Principalmente se ha detectado actividad antimicrobiana en el plasma en *C. virginica* (Anderson y Beaven, 2001); mientras que en *C. gigas*, se han descrito proteínas de adhesión, como las que se encuentran involucradas en los procesos de reconocimiento, opsonización y encapsulación (Bachère et al., 2004); actividad antiviral (Olicard et al., 2005) así como de la enzima fenol oxidasa, la cual se produce cuando es activado el sistema profenol oxidasa por los  $\beta$ -glucanos y lipopolisacáridos de las paredes de las bacterias gram-negativas (Luna-González et al., 2003).

La respuesta inmunológica de *C. gigas* durante el desarrollo ontogénico ha mostrado tener un origen maternal, puesto que la expresión de los genes involucrados se ha detectado tanto en los ovocitos como en los embriones durante las primeras divisiones celulares (Tirapé et al., 2007). La expresión de algunos genes sugiere también que los hemocitos en *C. gigas* se originan a partir de la metamorfosis de gástrula a larva trocófora, además de que las hematopoyéticas se originan a partir de las células del endotelio de vasos y/o arterias (Tirapé et al., 2007).

El efecto de los ácidos grasos de la dieta (microalgas y emulsiones) sobre la respuesta inmunológica, en particular sobre los fagocitos, conteo de hemocitos y su agregación, ha sido descrita en *C. gigas* (Delaporte et al., 2003; 2004; 2006a; 2006b; 2007; Hégaret et al., 2004). En este sentido, es bien conocido en vertebrados que la respuesta inmunológica puede ser modulado por la dieta y en particular por los HUFAs (ver revisiones; Johnston, 1985; Das, 1991; Calder, 1997; Arala-Chaves y Sequeira, 2000; Kelley, 2001; Serhan y Oliw, 2001; Harbige, 2003; Roland et al., 2004). Uno de los

mecanismos por los cuales los HUFA afectan el sistema inmunológico es a través de la síntesis de prostaglandinas (Wander et al., 1997; Watkins et al., 1997; Sammon, 1999; de Pablo et al., 2002). Las prostaglandinas y eicosanoides en general, se encuentran tanto en vertebrados como invertebrados y son metabolitos oxigenados de ácidos grasos de 20 carbonos, específicamente de los ácidos grasos  $20:4n-6$  y el  $20:5n-3$  (Foegh y Ramwell, 1983; Oliw et al., 1983; Stanley-Samuelson, 1987; 1994). Las prostaglandinas están involucradas en los procesos de la reproducción, particularmente la ovogénesis, vitelogénesis y liberación de gametos en moluscos (Morse et al., 1977; Matsutani y Nomura, 1987; Stanley-Samuelson, 1987; Osada y Nomura, 1990; Venkatesh et al., 1992; Ackman y Kean-Howie, 1995; Martínez et al., 1996; 1999; 2000; Rowley et al., 2005). Las prostaglandinas también afectan el sistema inmunológico de insectos (Stanley y Miller, 2006) y peces (Stacey y Goetz, 1982; Bell et al., 1985; Rowley et al., 1995). Sin embargo, no se ha evaluado la relación entre los niveles de prostaglandinas en ostiones y la respuesta del sistema inmunológica.

## 6. Mortalidades masivas de verano

Como se describió anteriormente, el incremento de la temperatura durante el verano y la disponibilidad de alimento inducen la maduración y el desove en ostiones; sin embargo, también se ha reportado que estas condiciones favorecen la susceptibilidad del ostión japonés incrementando la mortalidad durante el verano (Cheney et al., 2000; Delaporte et al., 2003a; Hégaret et al., 2003a; 2003b; Mathieu et al., 2003; Moal et al., 2003; Pouvreau et al., 2003; Cho y Jeon, 2005). Algunos autores han atribuido dichas mortalidades de verano a los incrementos de temperatura, lo cual produce un estrés en el

organismo y disminuye la respuesta del sistema inmunológico, principalmente en relación al número de hemocitos y estabilidad de los lisosomas (Cho y Jeong, 2005). Otros han propuesto que durante el verano ocurre un agotamiento de las reservas energéticas, específicamente, de los niveles de glucógeno producidas por el proceso de desove (Perdue et al., 1981), lo cual produce un agotamiento energético que repercute sobre la supervivencia (Pouvreau et al., 2003) y que también podría estar afectando el sistema inmunológico (Lacoste et al., 2002; Hégaret et al., 2003b). Variaciones en los parámetros fisicoquímicos del agua durante el verano también pueden afectar la resistencia de los ostiones (Cáceres-Martínez et al., 1998; Cheney et al., 2000), así como proliferaciones de microorganismos o microalgas (Cheney et al., 2000). Estos episodios de mortalidades masivas de *C. gigas* de verano se reportaron por vez primera en las costas de Japón en 1945, y desde entonces se concluyó que estos eventos están relacionados con desórdenes fisiológicos y metabólicos de los ostiones derivados del excesivo desarrollo de la gónada, provocando desoves masivos bajo condiciones ambientales de alta temperatura y eutroficación (Mori, 1979). Los estudios más recientes de las mortalidades masivas que se han observado en Francia concluyen de igual forma que estos episodios son el resultado de una combinación de factores ambientales y biológicos, en los que no se ha podido asociar sistemáticamente algún patógeno en particular. Sin embargo, se logró determinar en base a sus características fisiológicas que la resistencia a estos eventos de mortalidad masiva está estrechamente ligada a diferencias genéticas entre familias de ostiones, las cuales las hacen resistentes o susceptibles a estos episodios (Samain et al., 2007). Las familias de ostiones que son susceptibles muestran un mayor esfuerzo reproductivo cuando hay mayor disponibilidad de alimento, desoves parciales, tardíos y/o asincrónicos, altas tasas de

respiración, mayor adhesión y producción de especies reactivas de oxígeno en sus hemocitos (Samain et al., 2007). Posterior al evento de mortalidad, los ostiones de las familias susceptibles muestran un particular aumento de hemocitos hialinos, y disminución de la expresión genética de las enzimas reguladoras del metabolismo del glucógeno en los palpos labiales (Samain et al., 2007). Durante el incremento de la temperatura de 13 a 19°C, los ostiones susceptibles aumentan la síntesis de proteínas relacionadas con el estrés (HSP70 y catalasa), lo cual es aún más evidente bajo condiciones de hipoxia. Estos resultados sugieren que existe una relación entre el alto esfuerzo reproductivo de los ostiones susceptibles con su respuesta metabólica, fisiológica, e inmunológica a condiciones de estrés ocasionado por el incremento de la temperatura (Samain et al., 2007). Dado que la vulnerabilidad de *C. gigas* está relacionada con el incremento de la temperatura, es de esperarse que esta incremente en zonas más cálidas como en el noroeste de México, donde se han observado mortalidades en el verano con características similares (i.e. alta temperatura, disponibilidad de alimento, esfuerzo reproductivo y condición fisiológica, etc.) a las observadas en otras partes de mundo (Chávez-Villalba et al., 2007).

### III. JUSTIFICACIÓN

El cultivo de ostiones es una importante actividad económica en México, sin embargo en años recientes la producción de ostión ha disminuido paulatinamente. Las fluctuaciones en la producción pueden estar asociadas en parte a las mortalidades masivas estacionales del ostión del Pacífico *Crassostrea gigas*, las cuales se han observado tanto en México como en otros países. Esto ofrece una oportunidad para el cultivo de especies endémicas con potencial para la acuicultura como lo es *Crassostrea corteziensis*, la cual a diferencia de *C. gigas*, está bien adaptada a las variaciones estacionales de la temperatura, particularmente al incremento, que se registran en algunas zonas de las costas del Pacífico. Sin embargo, no se ha evaluado la factibilidad de su maduración en cautiverio y se desconocen aspectos básicos de la nutrición de reproductores, los efectos de la temperatura en el acondicionamiento reproductivo y en el desove, así como la acumulación y movilización de reservas energéticas, particularmente de lípidos durante el ciclo reproductivo de la especie. Lo expuesto con anterioridad, evidencia la necesidad de evaluar los efectos de la temperatura y la composición nutrimental de distintas especies de microalgas, así como emulsiones de lípidos en la maduración en cautiverio y sistema inmune de *C. corteziensis*, así como establecer la variación en la acumulación de reservas energéticas, particularmente de clases de lípidos, esteroides y ácidos grasos, en relación al ciclo reproductivo de *C. corteziensis*. La acumulación y utilización de las fuentes de energía durante la maduración, así como la nutrición de reproductores, permitirán establecer protocolos de maduración en cautiverio con la finalidad de producir larvas y semillas.

#### IV. HIPÓTESIS

- Existe un incremento estacional de lípidos de reserva en los tejidos de hembras silvestres de *C. corteziensis* que se correlaciona positivamente con el grado de madurez sexual durante el ciclo reproductivo.
- Las dietas de microalgas mixtas, a diferencia de las mono-algales, favorecerán principalmente la acumulación de reservas energéticas así como la maduración de las gónadas de los reproductores del ostión de placer *C. corteziensis*, principalmente al disminuir la relación de los ácidos grasos  $22:6n-3/20:5n-3$  de la composición de las microalgas.
- El enriquecimiento de una dieta monoalgal con una emulsión abundante en lípidos de reserva (triacilglicéridos) favorecerá la acumulación de reservas y la maduración gonádica del ostión de placer *C. corteziensis*.
- La constante disponibilidad de alimento parece favorecer la continua maduración de *C. corteziensis* en su medio natural, por lo tanto un sistema de alimentación que provea una cantidad constante de microalgas favorecerá preferentemente la maduración en cautiverio en comparación de un sistema de alimentación por pulsos (una ración al día).
- El enriquecimiento de una dieta monoalgal con una emulsión rica en  $20:4n-6$  favorecerá el desove y la respuesta inmunológica del ostión de placer *C. corteziensis*.

## V.OBJETIVOS

### *OBJETIVO GENERAL*

Evaluar el efecto de la acumulación de reservas energéticas, principalmente de ácidos grasos altamente insaturados (HUFA) sobre la maduración del ostión de placer *C. corteziensis*.

### *OBJETIVOS PARTICULARES*

- Evaluar la acumulación de reservas energéticas, principalmente de las clases de lípidos, esteroides y ácidos grasos, con la maduración de las gónadas durante un ciclo reproductivo del ostión de placer, *C. corteziensis*.
- Determinar el efecto de la composición bioquímica, particularmente de lípidos, de distintas especies de microalgas ofrecidas en combinaciones mono-algales y mixtas durante en el acondicionamiento y maduración del ostión de placer *C. corteziensis*.
- Evaluar la factibilidad de sustituir parcialmente las dietas microalgales con emulsiones de lípidos durante la maduración del ostión de placer *C. corteziensis*.
- Evaluar el efecto del ácido graso araquidónico 20:4 $n-6$  en la maduración y respuesta inmunológica de *C. corteziensis*.



## VI. MATERIAL Y MÉTODOS

### 1. Descripción de las áreas de muestreo

La disponibilidad de los organismos estuvo limitada a la distribución espacial y temporal del ostión *C. corteziensis*, por lo que se utilizaron poblaciones silvestres de ostiones provenientes de 3 distintas áreas. El sitio de recolecta para cada experimento se especifica en el diseño experimental de cada capítulo.

#### 1.1 Laguna de Ceuta

Esta laguna costera se localiza al sur del estado de Sinaloa, en el Noroeste de México (Fig. 10). Se caracteriza por contar con barras arenosas externas cuya forma y batimetría se deben a la acción de las mareas, las cuales son de baja energía. Esta laguna tiene una extensión aproximada de 7300 hectáreas y un ancho promedio de 1.1 km. El sistema se encuentra delimitado al norte por su principal afluente, el río San Lorenzo y en el sur por el río Elota. La laguna se comunica en los límites del Golfo de California y el Océano Pacífico por dos aperturas, la más extensa es una boca artificial de aproximadamente 500 metros de longitud situada en la parte sur del sistema (Alonso-Pérez et al., 2003; Ibarguen-Zamudio, 2006). La temperatura del agua varía de los 22 a 31°C, con un promedio anual de 28.6°C (Ibarguen-Zamudio, 2006). Mientras que la salinidad varía de 7.5 a 31.1 ups, con un promedio de 28.3 ups (Ibarguen-Zamudio, 2006). Ceuta tiene un clima seco y cálido, cuya temperatura ambiental fluctúa de los 17–30°C de enero a julio, con precipitaciones máximas en agosto y septiembre (Coss-Tirado y Chávez-Cortés, 1976).

Los datos de temperatura superficial de mar (TSM) y clorofila *a* utilizados en la caracterización del ciclo reproductivo del ostión *C. corteziensis* de Laguna de Ceuta,

Sinaloa, fueron estimados a partir de imágenes mensuales de alta resolución de 1 km proporcionadas por el Dr. Mati Kahru de Scripps Institution of Oceanography, UCSD (E.U.A). Las imágenes fueron obtenidas de los sensores SeaWiFS y MODIS-Aqua 2002–2006 para clorofila *a*; mientras que para TSM de los sensores MODIS-Aqua y MODIS-Terra 2002–2006. Las series de tiempo se extrajeron del área costera próxima a la boca artificial de la laguna costera (Fig. 10). Se compararon datos *in situ* vs. percepción remota de algunos meses del año 2007 para establecer si las variaciones costeras tienen algún efecto en la dinámica interna de la laguna, así como establecer el error entre ambas series de datos.

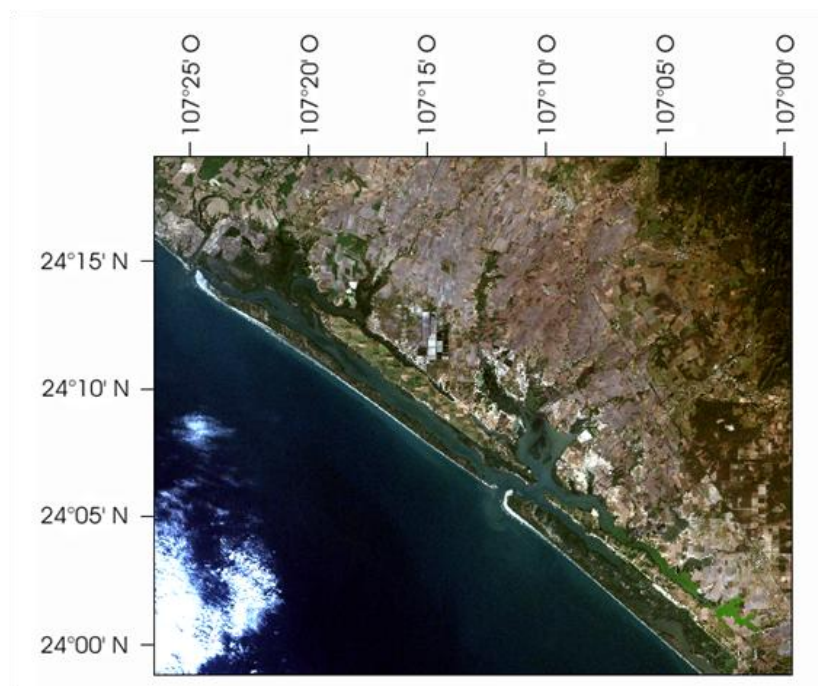


Fig. 10 Laguna de Ceuta, Sinaloa, México.

## 1.2 Cuautla

Esta zona forma parte del sistema lagunar Teacapán-Agua Brava, el cual se localiza en el estado de Nayarit, en el Noroeste de México (Fig. 11) (Sánchez-Martínez, 1994, En: de La Lanza-Espino et al., 1994).

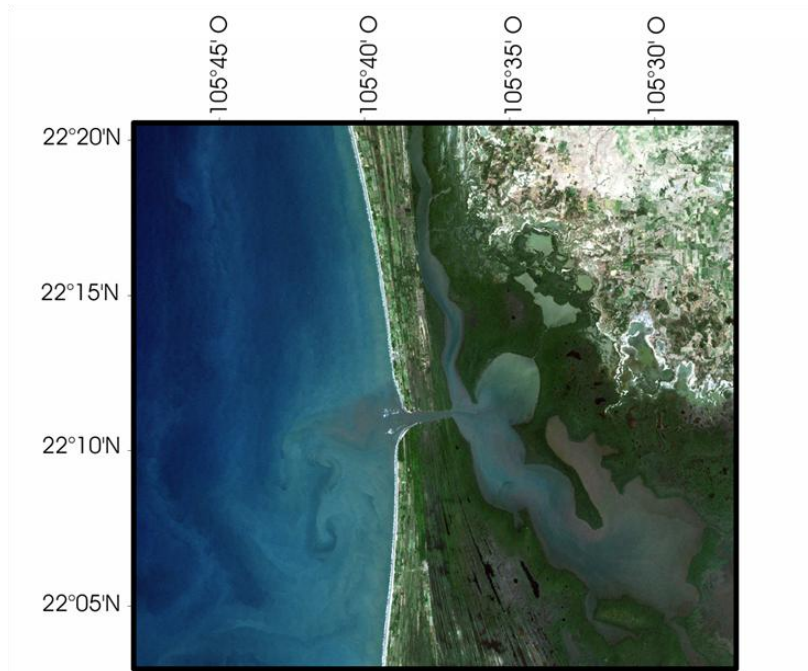


Fig. 11 Cuautla, Nayarit, México.

Agua Brava es el sistema lagunar más grande del estado de Nayarit, el cual tiene un área de 40 mil hectáreas y 1500 km<sup>2</sup> de canales de marea y manglar. Este sistema se comunica al Océano Pacífico a través de la boca de Teacapán y el canal artificial Palmar de Cuautla. La boca de Teacapán tiene 1.6 km de ancho y una profundidad de 3 a 9 metros, y se encuentra localizada al noroeste en el municipio de Acaponeta, zona limítrofe con el estado de Sinaloa. El canal artificial Palmar de Cuautla se construyó en 1976, aproximadamente a unos 40 km al sur de la boca de Teacapán. El clima de este sistema es

cálido sub-húmedo con lluvias en el verano (mayo-noviembre). La temperatura del agua en este sistema lagunar se encuentra entre los 22.5 a 34°C, mientras que la salinidad de 13 a 35 ups. (Sánchez-Martínez, 1994, En: de La Lanza-Espino et al., 1994). Sin embargo La temperatura ambiental es de 21 a 31°C. Las mareas son de mixto diurno y semidiurno, los niveles mínimos se registran en marzo, mientras que los máximos son en septiembre.

### **1.3 Estero de Camichín**

El estero de Camichín se localiza en la parte sur del estado de Nayarit, en el Noroeste de México (Fig. 12). El principal afluente de agua dulce proviene del río San Pedro, mientras que el intercambio de agua marina se realiza a través de la boca de Camichín y de La Talega (Bojórquez-Serrano et al., 2004). Esta zona es altamente dinámica que involucra el cuerpo del estuario, la cuenca hidrológica y el ambiente marino adyacente, por lo que cualquier variación ambiental provoca sensibles fluctuaciones físicas, químicas, y biológicas del sistema (Bojórquez-Serrano et al., 2004). La temperatura del agua varía entre 21 y 28°C, con escasa diferencia a la temperatura ambiental. La salinidad varía considerablemente de <1.0 a 35 ups de la boca del río San Pedro a las bocas que conectan el estero con el Océano Pacífico (De La Lanza, 1986, En: Bojórquez-Serrano et al., 2004). Por otra parte, durante el resto de las estaciones (primavera, verano y otoño) la temperatura fluctúa considerablemente de la boca a la cabeza del sistema, en la cual se registran los valores máximos; mientras que en la parte media del estero muestra la mayor estabilidad térmica (Bojórquez-Serrano et al., 2004).

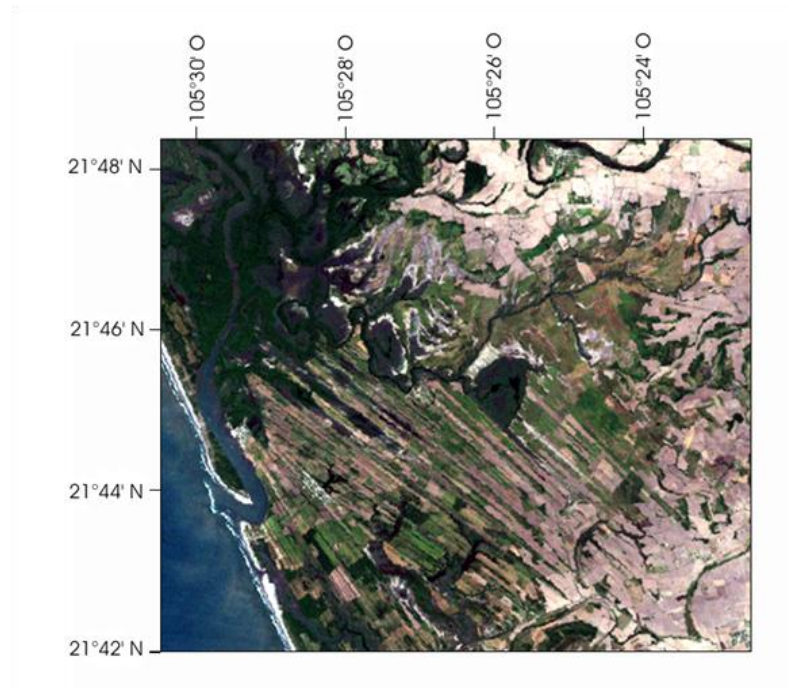


Fig. 12 Estero de Camichín, Nayarit, México.

## 2. Cultivo de las microalgas utilizadas como alimento para reproductores

Las 5 especies de microalgas que se utilizaron en esta tesis como alimento para los reproductores de *C. corteziensis* de los experimentos de acondicionamiento reproductivo fueron las siguientes:

- 1) *Chaetoceros gracilis* (clase: Coscinodiscophyceae)
- 2) *Chaetoceros calcitrans* (clase: Coscinodiscophyceae)
- 3) *Isochrysis galbana* T-ISO (clase: Prymnesiophyceae)
- 4) *Pavlova lutheri* (clase: Prymnesiophyceae)
- 5) *Dunaniela tertiolecta* (clase: Chlorophyceae)

Las microalgas fueron inculadas de matraces de 250 mL hasta llevarlas a tanques de 90 L donde fueron cultivadas de manera semi-continua en agua filtrada y esterilizada de mar, enriquecida con el medio f/2 (Guillard y Ryther, 1962) a una salinidad de  $37\pm 1$  ups, temperatura de  $21\pm 1^\circ\text{C}$ , e iluminación constante de  $135 \pm 10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . A las diatomeas se les agregó una solución de silicato ( $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ) a una concentración de  $30 \text{ g L}^{-1}$  de agua. Las microalgas fueron cosechadas durante la fase exponencial (3er ó 4to día de cultivo), mientras que la densidad celular se evaluó diariamente antes de la cosecha.

Un volumen conocido de cultivo de cada una de las especies de microalgas fueron centrifugadas a  $1200 \times g$  por 10 minutos a  $4^\circ\text{C}$  hasta obtener un cantidad de 1 g aproximadamente. Una muestra de 100 mg de tejido fresco fueron colocados en una solución de cloroformo: metanol (2:1) para la extracción de lípidos y 100 mg en acetona para la extracción de pigmentos. El resto de las muestras fueron liofilizadas por 36 horas para la determinación de carbohidratos, lípidos totales, proteínas y aminoácidos. Los detalles de los análisis se encuentran más adelante en la sección de análisis bioquímicos.

### 3. Mediciones morfométricas de los ostiones

Los ostiones se recolectaron y fueron enviados en un lapso menor de 24 hrs por transporte aéreo al laboratorio del CIBNOR, en la ciudad de La Paz, B.C.S., para lo cual fueron empacados en hieleras de “unicel”, con papel húmedo y hielo artificial (blue ice). Una vez en el laboratorio, los ostiones se lavaron con agua corriente dulce, y se limpiaron de epibiontes (i.e. micro- y macroalgas, moluscos, crustáceos, etc.). Antes de abrirlos, se determinó la longitud y ancho de la concha con la ayuda de un vernier, así como el peso total de cada ostión. Cuando fue necesario, la hemolinfa se extrajo del músculo abductor

con la ayuda de una jeringa de plástico de 1 mL tras abrir un pequeño orificio (Fig. 13) con unas pinzas en las conchas de los ostiones. La hemolinfa se dividió en tres porciones para los diferentes análisis bioquímicos, inmunológicos y conteo celular. Una vez abiertos, se determinó el peso de tejido húmedo o biomasa de cada organismo (Fig.14).



Fig. 13 Extracción de hemolinfa



Fig. 14 Determinación de la morfometría general de los ostiones

#### 4. Disección de los ostiones y muestreo de tejidos

Una porción transversal de aprox. 2mm de grosor de la gónada y glándula digestiva fue disectada en la parte anterior de cada ostión y colocadas en “cassetes” (Leica Jet II) para

la fijación de los tejidos en solución de Davidson (Shaw y Batle, 1957) (Fig. 15). El resto de los tejidos de cada ostión fueron etiquetados, empacados y almacenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  para análisis posteriores.

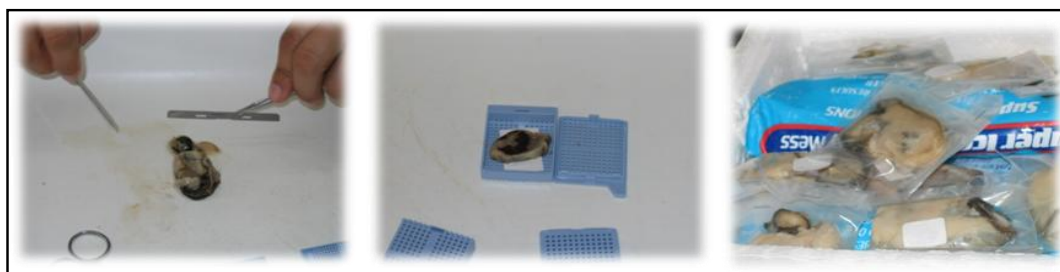


Fig. 15 Disección de los ostiones

## 5. Análisis histológicos

### 5.1. Procesamiento de tejidos

Al término de la fijación de los tejidos por 48 hrs., cada una de las muestras se deshidrato en una serie sucesiva de frascos con alcohol etílico a diferentes concentraciones (70, 80, 90 y 100%). Posteriormente, los tejidos fueron aclarados en xileno e incluidos en parafina (Howard y Smith, 1983), seccionados en cortes semi-finos ( $3-4\ \mu\text{m}$ ) con la ayuda del micrótopo (Leica RM 2155), montados en portaobjetos de vidrio a manera de preparaciones fijas, y teñidos con hematoxilina-eosina (Humanson, 1979).

### 5.2 Captura y análisis de imágenes digitales

Las imágenes digitales de las preparaciones fijas fueron obtenidas a través de una cámara digital Cool-SNAP-Pro ensamblada en un microscopio Olympus BX41. El análisis de las imágenes se realizó a través del software Image Pro Plus (v. 4.5.1) (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, U.S.A).



### 5.3 Identificación de estadios reproductivos

Se utilizó la escala propuesta y modificada por Rodríguez-Jaramillo y colaboradores (2008), sustentada en la observación y descripción de las gónadas y ovocitos, a través de cortes histológicos en parafina (40×) y resina (100×). Los estadios utilizados en esta escala son los siguientes:

0–Inmaduro

I–Previtelogénesis

II–Vitelogénesis

III–Postvitelogénesis

IV–Desove

### 5.4 Histología cuantitativa

#### 5.4.1 Área de cobertura gonadal (ACG)

El área que ocupa la gónada con respecto a la masa visceral se calculó de acuerdo a lo descrito por Rodríguez-Jaramillo et al. (2008). Con el analizador de imágenes (Image Pro Plus v. 4.5.1), se calculó el área promedio de 3 secciones de la gónada en imágenes digitales a 4× (7.9 mm<sup>2</sup>) de las preparaciones fijas hechas a partir de los cortes histológicos (Fig. 16A). La diferencia en la intensidad del color entre distintos tejidos (Fig. 16B) permite calcular el área en píxeles, los cuales se transforman en unidades de área (μm<sup>2</sup>).

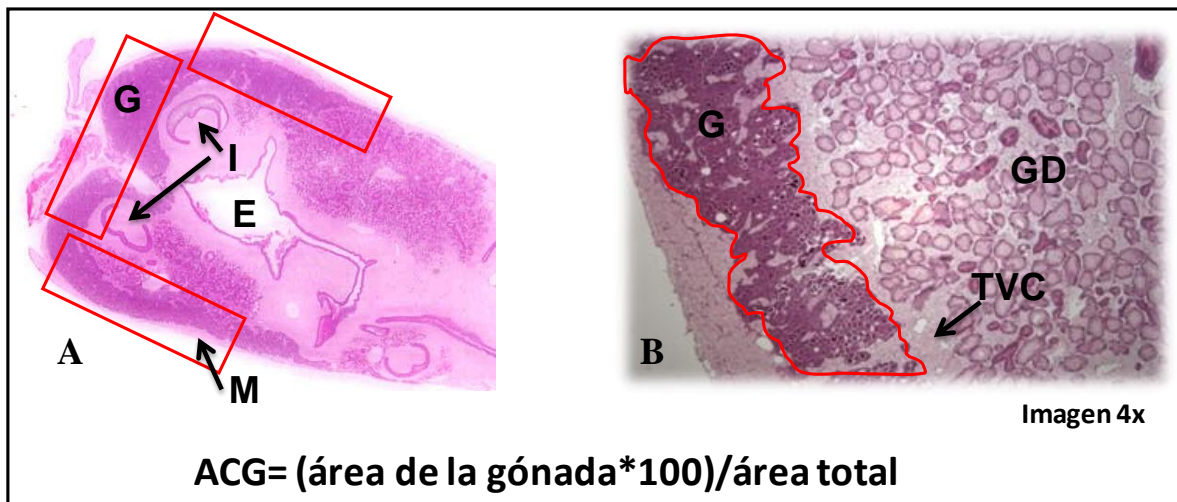


Fig. 16 Corte transversal del ostión (A) en que se muestra la relación que guarda la gónada (recuadros en rojo) con respecto al resto de los tejidos. Imagen del corte histológico a 4× de *C. corteziensis* en que se muestra las diferencias en la intensidad del color de la gónada (área en rojo) con respecto al tejido visceral (B). G= gonada, TVC= tejido vesicular conectivo, GD= glándula digestiva, I= intestino, E= estómago, y M= manto.

#### 5.4.2 Frecuencia de ovocitos

La frecuencia de cada tipo de ovocito se cuantificó en 3 regiones de la gónada de cada hembra en imágenes digitales a 20× con un área de 1.44 mm<sup>2</sup> (Rodríguez-Jaramillo et al., 2008).

## 6. ANÁLISIS BIOQUÍMICOS

### 6.1 Preparación de muestras en tejidos

Las muestras de tejido congelado de cada ostión fueron picadas en trozos pequeños sobre una plancha fría. El tejido picado de ostión y las microalgas fueron liofilizadas por 36 horas. Posteriormente, las muestras de tejidos de ostión fueron pulverizadas en un mortero de porcelana. A continuación se tomaron 100 mg de microalgas y 20 mg de tejido de

osti3n, y se homogenizaron c/u en 1 mL de soluci3n salina al 35%. Estos extractos crudos fueron utilizados para los an3lisis de prote3nas, carbohidratos y l3pidos totales acorde a lo descrito por Racotta y colaboradores (2003).

Para el an3lisis de l3pidos se pesaron 100 mg de microalgas y 1 g de tejido fresco de osti3n y se les agreg3 6 mL de cloroformo: metanol (2:1) y 10  $\mu\text{L}$  de BHT (0.5 mg  $\text{mL}^{-1}$ ) (butylated hydroxytoluene) (B-1378, Sigma, St. Louis, MO, E.U.A) y 10  $\mu\text{L}$  del 3cido graso 23:0 (2 mg  $\text{mL}^{-1}$ ) (T-6543, Sigma, St. Louis, MO, E.U.A) como est3ndar interno. Las muestras se guardaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  por lo menos 24 horas para la extracci3n de l3pidos.

#### 6.1.1 Prote3nas

Las prote3nas totales se cuantificaron por el m3todo descrito por Bradford (1976). Se tomaron 10  $\mu\text{l}$  del extracto crudo y se agregaron 100  $\mu\text{l}$  de NaOH 0.1 N y se dejaron reposar las muestras por 1 hora. A continuaci3n, se tomaron 100  $\mu\text{l}$  del extracto digerido y se les agreg3 1 mL de soluci3n reactiva de Bradford (B-6919, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, E.U.A). La absorbancia se determin3 a 595 nm con un espectrof3tometro. Se utiliz3 como est3ndar una soluci3n de alb3mina s3rica bovina (A-2153, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, E.U.A), con concentraciones en el intervalo de 0.15625 a 5 mg  $\text{mL}^{-1}$ .

#### 6.1.2 Amino3cidos

El perfil de los amino3cidos de las prote3nas de las microalgas se cuantificaron por el m3todo descrito por Hurtado y colaboradores (2007). Las microalgas liofilizadas se hidrolizaron con HCl 6N, a temperatura de  $150^{\circ}\text{C}$  durante 6 horas, posteriormente se evaporaron y resuspendieron en 1 mL de agua deionizada. Se inyectaron 20  $\mu\text{L}$  en un cromat3grafo de l3quidos de alta precisi3n (HPLC, Agilent, 1100) equipado con un detector

de arreglo de diodos a longitud de onda de 338 nm. Se uso una columna Microsorb 100–3 C 188 de 10 cm de longitud y 0.46 cm de diámetro interno. La identificación de los aminoácidos se realizó comparando los tiempos de retención de los estándares (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, E.U.A). La cuantificación se realizó a partir de curvas de calibración de los estándares con el intervalo de 50 a 300  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

### 6.1.3 Carbohidratos

Los carbohidratos totales se cuantificaron por el método de la antrona descrito por Roe (1955). Se precipitaron las proteínas con ácido tricloracético (TCA) al 20% haciendo una dilución 1:2 con el homogenado de los tejidos de ostión. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 1200  $\times g$  (3500 rpm) a 5°C por 10 minutos y se tomaron 10  $\mu\text{l}$  del sobrenadante que se mezclaron con 1 mL de antrona (A–1631, Sigma, St. Louis, MO, E.U.A) al 0.1% disuelta en ácido sulfúrico al 76%. Las muestras fueron incubadas en baño de agua a 90°C por 5 minutos y posteriormente se colocaron en baño de hielo para detener la reacción. La absorbancia se determinó a 620 nm con un espectrofotómetro. Se utilizó como estándar una solución de glucosa, con concentraciones en el intervalo de 0.078125 a 5  $\text{mg mL}^{-1}$ .

### 6.1.4 Lípidos totales

Los lípidos totales se cuantificaron por el método de la sulfo-fosfovainillina descrito por Barnes y Blackstock (1973). Del extracto crudo se tomaron 25  $\mu\text{l}$  a los cuales se les agregó 250  $\mu\text{l}$  de ácido sulfúrico concentrado, posteriormente las muestras fueron incubadas a 90°C por 10 minutos. Transcurrido el tiempo de incubación, se colocaron en un

baño frío a 4°C. A continuación se colocaron 25 µl de la mezcla extracto-ácido en los pozos de microplacas de fondo plano a las cuales se les agregó 200 µl del reactivo de vainillina (VX0045-1, EM Science) y se incubaron por 40 minutos. La absorbancia fue determinada en un fotocolorímetro (Bio-Rad 550) a 540 nm. Se utilizó como estándar el kit comercial Randox TL-100 (Randox Laboratories LTD, Reino Unido), con concentraciones en el intervalo 0.078125 a 5 mg mL<sup>-1</sup>.

#### 6.1.5 Carotenoides totales en tejidos de ostión

Los carotenoides fueron cuantificados por el método descrito por Hantlen y colaboradores (1998). Del extracto crudo de las muestras que se colocaron en cloroformo: metanol (2:1) se tomaron 500 µl, los cuales se evaporaron a sequedad con nitrógeno gaseoso (N<sub>2</sub>), y se resuspendieron en 300 µl de acetona y se dejaron reposar por 24 horas en la obscuridad. Posteriormente, se tomaron 100 µl de este extracto y se les agregó 1 mL de acetona, y se agitaron. La absorbancia se determinó en celdas de cuarzo de 1 cm y con la ayuda de un espectrofotómetro a 475 nm. La concentración se determinó con el siguiente coeficiente de extinción:  $A_{1\%, 1\text{ cm}} = 0.19$ .

#### 6.1.6 Pigmentos en microalgas

Los pigmentos fueron determinados de acuerdo al método descrito por Vidussi y colaboradores (1996). La extracción se realizó en la obscuridad por 24 horas a -20°C con acetona grado HPLC al 100%. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 1200 ×g por 15 minutos a 5°C. El extracto se pasó a través de un filtró de fibra de vidrio de 0.45 mm. Se inyectaron 20 µL en un cromatógrafo de líquidos de alta precisión (HPLC, Hewlett

Packard, 1100) equipado con un detector de arreglo de diodos con un intervalo de longitud de onda de 190–900 nm con capacidad de detección de 5 longitudes de onda fijas. Se usó una columna Hypersil MOS C8 (Agilent, E.U.A), de 10 cm de longitud, 0.45 cm de diámetro y 5 mm de espesor de película de sílice. La identificación de los pigmentos se realizó considerando su espectro de absorción luminosa (350–750 nm) y comparando los tiempos de retención de los estándares (DHI Lab. Products, Hoersholm, Dinamarca). La cuantificación se realizó a partir de curvas de calibración de los estándares con el intervalo de 20 a 100 ng mL<sup>-1</sup>.

#### 6.1.7 Ácidos grasos

Los ácidos grasos se analizaron por el método descrito por Palacios y colaboradores (2005). Las muestras se sonicaron por 10 minutos en un baño frío y se disgregaron usando un homogenizador de vidrio. Los restantes 5.1 mL de los extractos que fueron colocados en cloroformo: metanol (2:1) se evaporaron a aproximadamente 0.5 mL con nitrógeno gaseoso (N<sub>2</sub>), posteriormente fueron colocados en microcolumnas preparadas con pipetas Pasteur rellenas de fibra de vidrio y sílice hidratado con agua al 6%. Los lípidos estructurales y de reserva fueron separados eluyendo en las microcolumnas 10 mL de cloroformo: metanol (98:2) y 15 mL de metanol, respectivamente. La mitad de las fracciones obtenidas (5 y 7.5 mL de lípidos de reserva y estructurales, respectivamente) de cada muestra fueron evaporadas a sequedad y derivatizadas con trifloruro de boro metanol (BF<sub>3</sub>) (Supelco, Bellefonte, PA, E.U.A) por 15 minutos a 95°C. La extracción de los metil-ésteres de los ácidos grasos se realizó con hexano y lavados de agua. Los metil-ésteres fueron analizados en un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard (CG 6890–N) equipado con una columna

capilar de sílice fundida DB-23 (J & W Scientific, Folsom, CA, E.U.A) (30 m de largo  $\times$  0.25 mm de diámetro interno  $\times$  0.25  $\mu$ m de espesor de película) y un detector de ionización de flama (FID) a una temperatura de 280°C. La rampa de temperatura del horno para la separación de los ácidos grasos fue de 110–220°C a una tasa de incremento de 3°C min<sup>-1</sup>. Se utilizó como gas acarreador helio. La identificación de los metil-ésteres de los ácidos grasos se realizó comparando los tiempos de retención de una mezcla de ácidos grasos como estándar (47885-U, Supelco, Bellefonte, PA, E.U.A) y la cuantificación usando el ácido graso 23:0.

#### 6.1.8 Esteroles libres y esterificados

Los esteroles libres y esterificados fueron analizados por el método descrito por Palacios y colaboradores (2007). La mitad del extracto después de separar los lípidos estructurales (5 mL) se evaporó a sequedad con nitrógeno gaseoso (N<sub>2</sub>) y se concentró en 400  $\mu$ L. De estos, 100  $\mu$ L se evaporaron a sequedad y resuspendieron en hexano. La décima parte (10  $\mu$ L) fueron inyectados en un cromatógrafo de líquidos de alta precisión (HPLC, Agilent 1100), equipado con un detector ultravioleta-visible (UV-VIS) (Soudant et al., 1998b) para separar las fracciones de esteroles libres y esterificados. A cada fracción se le agregó 10  $\mu$ L de colestano (C-8003, Sigma, St. Louis, MO, E.U.A) como estándar interno (1mg mL<sup>-1</sup>). Posteriormente, ambas fracciones de cada muestra fueron evaporadas a sequedad y derivatizadas con metóxido de sodio (40306-7, Sigma, St. Louis, MO, E.U.A) por 90 minutos a temperatura ambiente. La extracción de los esteroles fue hecha con hexano y lavados de agua. Los esteroles fueron analizados en un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard (CG 6890-N) equipado con una columna capilar de sílice fundido SAC-5

(30 m de largo  $\times$  0.25 mm de diámetro interno  $\times$  0.25  $\mu\text{m}$  de espesor de película) y un detector de ionización de flama (FID), a una temperatura de 300°C. La rampa de temperatura del horno para separar los esteroides fue de 50–260°C a una tasa de incremento de 3°C  $\text{min}^{-1}$  y se utilizó helio como gas acarreador. La identificación de los esteroides se realizó comparando los tiempos de retención de una mezcla de estándares la cual contenía los siguientes esteroides: Colesterol (C-8667, Sigma, St. Louis, MO, E.U.A), dihidrocolesterol (D-6128, Sigma, St. Louis, MO, E.U.A), brasicasterol (2359, Alltech), campesterol (3072, Alltech), b-sitosterol (S-1270, Sigma, St. Louis, MO, E.U.A), ergoesterol (E-6510, Sigma, St. Louis, MO, E.U.A), estigmasterol (S-2424, Sigma, St. Louis, MO, E.U.A) y fucosterol (6291, Alltech), y la cuantificación usando el colestano. La cuantificación del resto de los esteroides se realizó a través de la intercalibración del método en el IFREMER, Brest, FRANCIA.

## 6.2 Preparación de muestras en hemolinfa

Las muestras de hemolinfa fueron divididas en sub-muestras para realizar los análisis bioquímicos e inmunológicos. De cada muestra de hemolinfa (1–4 mL por ostión) se tomaron 0.3 mL, se centrifugaron a 1350  $\times g$  por 10 minutos a 4°C, y el plasma se guardó a –80°C para realizar posteriormente los análisis bioquímicos. El resto de la hemolinfa se utilizó para la cuantificación de anión superóxido y para los conteos totales y diferenciales de hemocitos.

### 6.2.1 Proteína, glucosa y triacilglicéridos

La concentración de proteínas se determinó haciendo una dilución 1:5 del plasma con una solución de NaCl 35%. A partir de esta dilución se tomaron 10  $\mu\text{L}$  y 200  $\mu\text{L}$  de



solución de Bradford, las cuales se dejaron reposar por 10 minutos. Posteriormente las placas se colocaron en un fotolorímetro BioRad 550 para determinar su absorbancia a una longitud de onda de 595 nm. Se utilizó albúmina sérica bovina como estándar (A-2153, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, E.U.A), cuyas concentraciones se encontraron en el intervalo de 0.03125 a 1 mg mL<sup>-1</sup>.

La concentración de glucosa se determinó con el kit comercial GOD-PAP (Boehringer-Mannheim, Alemania). Se tomaron 20 µL de plasma y 200 µL de la solución reactiva, las cuales se dejaron reposar por 30 minutos. Posteriormente las placas se colocaron en un fotolorímetro BioRad 550 para determinar su absorbancia a una longitud de onda de 490 nm. Con la solución estándar del kit se preparó una curva tipo a un intervalo de concentración de 1.56 a 100 mg dL<sup>-1</sup>. La concentración de triacilglicéridos se determinó con el kit comercial GPO-PAP (Randox, Crumlin, Reino Unido). Se tomaron 20 µL de plasma y 200 µL de la solución reactiva, las cuales se dejaron reposar por 20 minutos. Posteriormente las placas se colocaron en un fotolorímetro BioRad 550 para determinar su absorbancia a una longitud de onda de 490 nm. Con la solución estándar del kit se preparó una curva tipo a un intervalo de concentración de 6.25 a 200 mg dL<sup>-1</sup>.

### 6.2.2 Hemocianina

La hemocianina se determinó directamente en 10 µL de hemolinfa, la cual se diluyó 1:10 en solución salina al 35%. La absorbancia se determinó con un espectrofotómetro a una longitud de onda de 335 nm. La concentración se calculó usando el coeficiente de extinción ( $E^{1\%}$ ) de 2.83 (Hagerman, 1986).

### 6.2.3 Anión superóxido

La producción de anión superóxido (PAS) se determinó de acuerdo a lo descrito por Mercier et al. (2006). La técnica de detección de PAS se basa en la reducción de nitroazul de tetrazolio a azul de formazán, la cual forma un cromógeno cuya absorbancia se midió en un fotocolorímetro (BioRad 550) a una longitud de onda de 650 nm. Los resultados se expresaron como basales, estimulados, la razón entre ambos y en relación al conteo total de hemocitos.

### 6.2.4 Conteo total y diferencial de hemocitos

El conteo total de hemocitos se realizó por triplicado en cada muestra de hemolinfa (100  $\mu$ L) sin dilución con un hematocitómetro y un microscopio de fase. Dos tipos de hemocitos (hialinos y granulocitos) fueron identificados, según la descripción de Bachère et al. (1988). Se reporta la proporción diferencial de hemocitos.

## VII. RESULTADOS

### 1. PRIMER CAPÍTULO

Acumulación de reservas durante un ciclo reproductivo en hembras de *C. corteziensis*

El objetivo en este primer capítulo fue evaluar la acumulación de reservas bioquímicas, particularmente de clases de lípidos, ácidos grasos y esteroides, en hembras del ostión *Crassostrea corteziensis* durante un ciclo reproductivo en Laguna de Ceuta, Sinaloa.

### 1.1 Análisis estadísticos

Los resultados se procesaron por un análisis de varianza unifactorial (ANOVA), utilizando como variable independiente el mes de muestreo (12 niveles) y como dependientes las variables morfométricas (largo, ancho, peso total y biomasa), área de cobertura gonadal (ACG), frecuencia de ovocitos, y composición bioquímica (proteínas, carotenoides, carbohidratos, lípidos totales, clases de lípidos, ácidos grasos y esteroides libres y esterificados). Cuando se encontraron diferencias significativas, se realizaron pruebas post hoc de Tukey para establecer las diferencias entre medias de los meses muestreados. Los valores de porcentaje fueron transformados a arcoseno (Zar, 1999) antes del ANOVA, pero sólo se muestran los resultados en sus valores originales. Se realizaron correlaciones de Pearson entre las variables morfométricas, ambientales y bioquímicas. Todos los resultados están expresados como media  $\pm$  error estándar. Todos los análisis se hicieron con un nivel de significancia del 95% ( $\alpha=0.05$ ) y con la ayuda del programa Statistica<sup>TM</sup> v. 5.5 (StatSoft, Tulsa, OK, EUA).

### 1.2 Morfometría

El peso total, peso de la biomasa, longitud y ancho de las conchas de las hembras de *C. corteziensis* fueron significativamente diferentes ( $P<0.01$ ) en relación a la fecha de muestreo. El valor más alto de peso de la biomasa fue en el mes abril de 2006 ( $29.2\pm 1.7$  g),

mientras que los valores mínimos se encontraron a partir de septiembre y hasta diciembre de 2005 ( $12.4 \pm 3.2$  a  $9.1 \pm 0.4$  g) (Fig. 17). El peso total siguió un patrón similar al observado con la biomasa, con un valor máximo en abril de 2006 ( $124 \pm 3$  g), pero el menor valor se observó en diciembre de 2005 ( $64 \pm 4$  g). Se encontró una correlación positiva entre ambas variables ( $r = 0.68$ ,  $P < 0.05$ ) (Fig. 17).

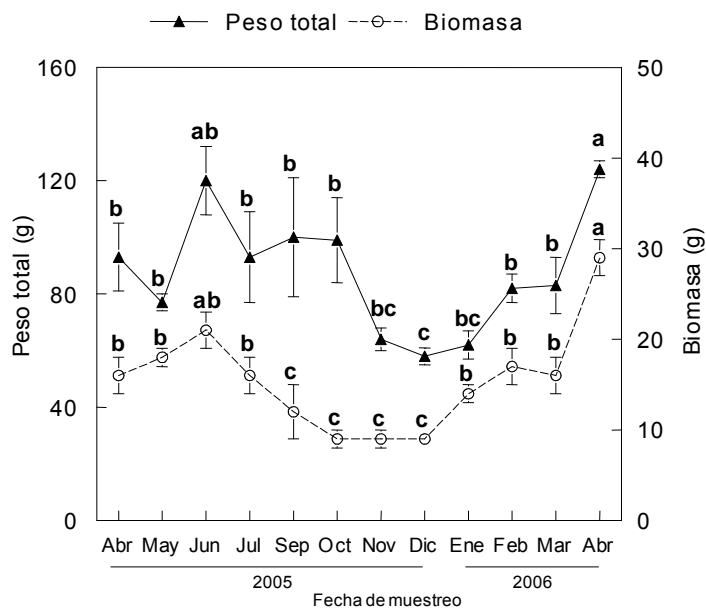


Fig. 17 Peso total (triángulos) y biomasa (círculos) en hembras de *Crassostrea corteziensis* muestreadas en Laguna de Ceuta, Sinaloa de abril de 2005 a abril de 2006.

La longitud máxima de la concha de los ostiones se encontró en abril de 2006 ( $10.5 \pm 0.6$  cm), mientras que los valores mínimos se observaron en los meses de noviembre y diciembre de 2005 y en marzo del 2006 ( $8.0 \pm 0.2$ ,  $7.4 \pm 0.3$  y  $7.4 \pm 0.6$  cm, respectivamente,  $P < 0.01$ ) (Fig. 18). El ancho de la concha de los ostiones mostró menos variaciones, con valores máximos en el mes de junio de 2005 ( $6.4 \pm 0.3$  cm) y los mínimos entre los meses de noviembre de 2005 y marzo del 2006 ( $5.0 \pm 0.2$  a  $5.5 \pm 0.2$  cm,  $P < 0.01$ ) (Fig. 18). La longitud

y ancho de la conchas se correlacionaron positivamente con el peso total de los ostiones ( $r = 0.83$  y  $0.82$ , respectivamente,  $P < 0.05$ ).

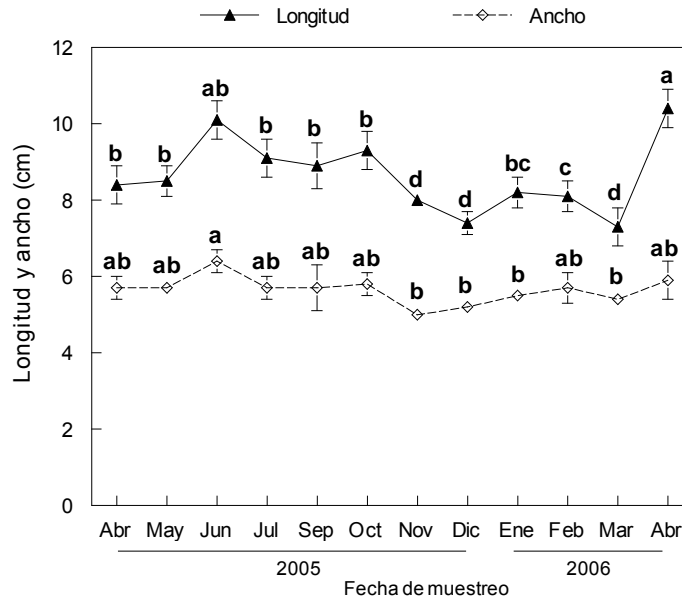


Fig. 18 Longitud (triángulos) y ancho (rombos) de las conchas de las hembras de *Crassostrea corteziensis* muestreadas en Laguna de Ceuta, Sinaloa de abril de 2005 a abril de 2006.

### 1.3 Frecuencia de estadios reproductivos

Se observaron hembras en vitelogenesis y posvitelogenesis en la mayor parte del año, excepto en los meses de enero y febrero de 2006 (Fig. 19). Sin embargo el mayor número de hembras maduras (postvitelogenesis) se observaron en los meses de abril, mayo y julio de 2005, y abril de 2006. Se observaron hembras con desoves parciales la mayor parte del año, sin embargo la mayor proporción de hembras en desove se observaron en septiembre y noviembre de 2005 (Fig. 19). El mayor número de hembras inmaduras se observaron de diciembre de 2005 a febrero de 2006 (Fig. 19).

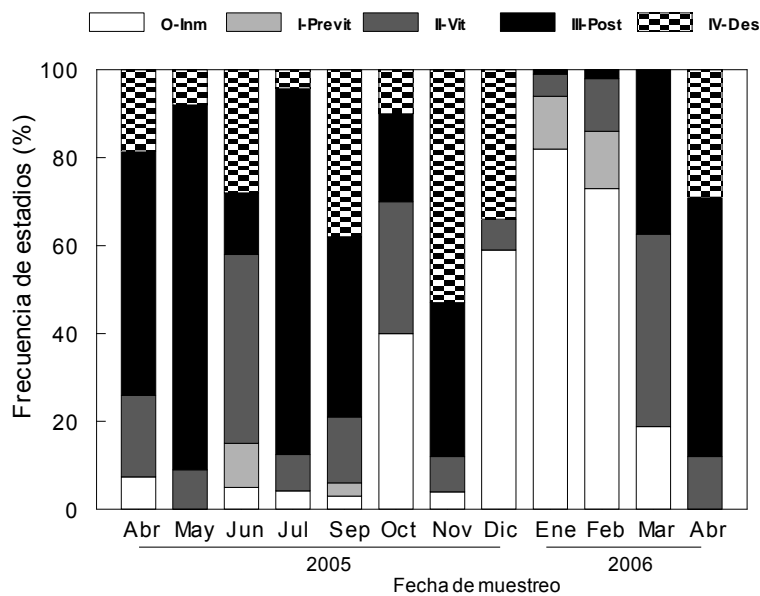


Fig. 19 Frecuencia de estadios de maduración en hembras de *Crassostrea corteziensis* muestreadas en Laguna de Ceuta, Sinaloa de abril de 2005 a abril de 2006.

#### 1.4 Área de cobertura gonadal (ACG)

Se observó un pico reproductivo principal en términos del área de cobertura gonadal (ACG) en los meses de abril-mayo de 2005 ( $26.5 \pm 0.7\%$ ), así como picos secundarios en julio de 2005 y abril de 2006 (17.1-17.5%) (Fig. 20). La disminución del ACG sugiere desoves, los cuales ocurrieron en los meses de junio de 2005 y septiembre-octubre de 2005. El primero de los desoves fue más intenso y ocurrió durante el incremento de la temperatura superficial del mar (TSM) de 25 a 30°C, mientras que el segundo cuando la temperatura se encontró aproximadamente en 30°C (Fig. 20). Los menores valores de ACG se observaron en los meses de enero a marzo de 2006 (1.1–2.4%), los cuales corresponden a los valores más altos de clorofila *a* ( $12.5\text{--}15.5 \text{ mg m}^{-3}$ ) (Fig. 20). La TSM se correlacionó inversamente con la concentración de clorofila *a* ( $r = -0.82$ ,  $P < 0.01$ ).

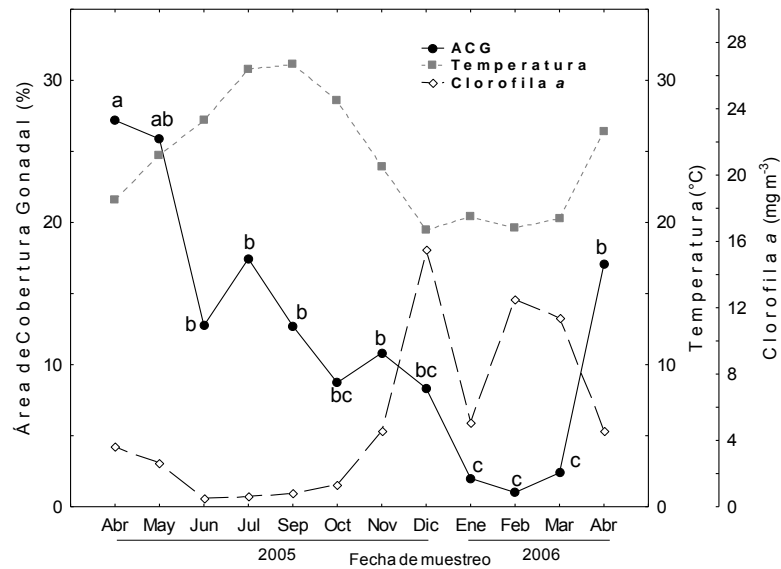


Fig. 20 Área de cobertura gonadal (ACG) (puntos negros) en hembras de *C. corteziensis* muestreadas en Laguna de Ceuta, Sinaloa de abril de 2005 a abril de 2006. TSM (°C) (cuadros grises) y clorofila *a* (mg m<sup>-3</sup>) (rombos) en la boca artificial de la laguna costera de Laguna de Ceuta, Sinaloa.

### 1.5 Frecuencia de ovocitos

El número total de ovocitos fue significativamente diferente ( $P < 0.01$ ) entre los meses muestreados (Fig. 21). El mayor número de ovocitos totales se observó en el mes de abril de 2005 ( $207 \pm 14$ ), los cuales fueron en su mayoría postvitelogenicos (Fig. 21). En el mes de junio se observó una disminución de más del 50% en el número total de ovocitos, de los cuales solo el 28% corresponden al estadio postvitelogenico (Fig. 21). En julio de 2005, el número de ovocitos incrementó de nuevo, particularmente el de ovocitos postvitelogenicos (71%), para disminuir posteriormente en los meses de octubre y noviembre de 2005, hasta quedar tan solo unos pocos en el mes de diciembre de 2005, y a partir de enero se incrementó de nuevo (Fig. 21). Se observaron ovocitos atrésicos desde junio a diciembre, con valores máximos en noviembre de 2005 (Fig. 21). Se encontró una



correlación positiva significativa ( $r= 0.60$ ,  $P<0.05$ ) entre el porcentaje de ovocitos postvitelogenicos y la relación biomasa/peso total.

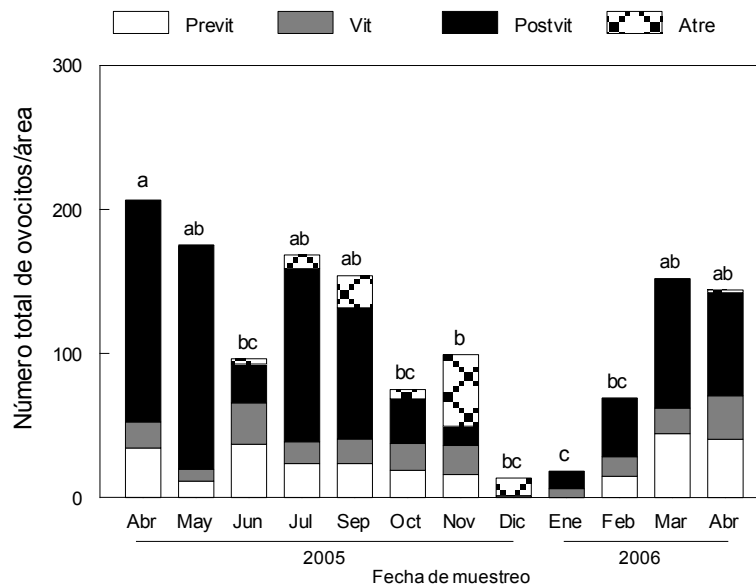


Fig. 21 Frecuencia de ovocitos en hembras de *C. corteziensis* muestreadas en Laguna de Ceuta, Sinaloa de abril de 2005 a abril de 2006. Los tipos de ovocitos se encuentran distribuidos en la figura de la siguiente manera: En barras blancas= previtelogénicos; barras grises= vitelogénicos; barras negras= postvitelogénicos; barras achuradas= atresias.

## 1.6 Composición bioquímica en tejidos

### 1.6.1 Materia seca (%)

La materia seca (%) en los tejidos (biomasa) de las hembras de *C. corteziensis* varió significativamente ( $P<0.01$ ) en relación a la fecha de muestreo (Fig. 22). El valor máximo se encontró en el mes de abril de 2005 ( $28\pm 1\%$ ), mientras que los valores mínimos de septiembre a noviembre de 2005 ( $15\pm 3$  a  $15\pm 2\%$ ). La materia seca (%) se correlacionó positivamente con el peso de la biomasa ( $r= 0.56$ ,  $P<0.05$ ), la concentración de proteínas ( $r= -0.61$ ,  $P<0.05$ ), carbohidratos ( $r= 0.94$ ,  $P<0.05$ ) y lípidos ( $r= 0.91$ ,  $P<0.05$ ).

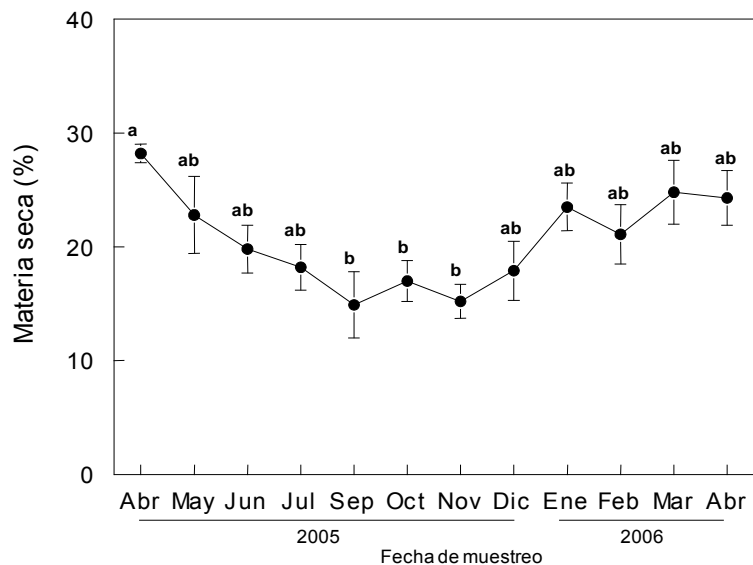


Fig. 22 Materia seca (%) en hembras de *C. corteziensis* muestreadas en Laguna de Ceuta, Sinaloa de abril de 2005 a abril de 2006.

### 1.6.2 Concentración de proteínas

La concentración de proteínas ( $\text{mg g}^{-1}$  en peso seco), en los tejidos de las hembras de *C. corteziensis* varió significativamente ( $P < 0.01$ ) en relación a la fecha de muestreo (Fig. 23). El valor máximo de proteína se encontró en octubre de 2005 ( $550 \pm 23 \text{ mg g}^{-1}$ ), mientras que los mínimos se encontraron en los meses de abril y mayo de 2005 ( $346 \pm 16$  y  $335 \pm 16 \text{ mg g}^{-1}$ , respectivamente) (Fig. 23). Las proteínas se correlacionaron significativamente y de manera inversa con el número de ovocitos postvitelogénicos, biomasa, materia seca, carbohidratos y lípidos totales ( $r = -0.77, -0.61, -0.78, -0.84$  y  $-0.78$ , respectivamente,  $P < 0.05$ ).

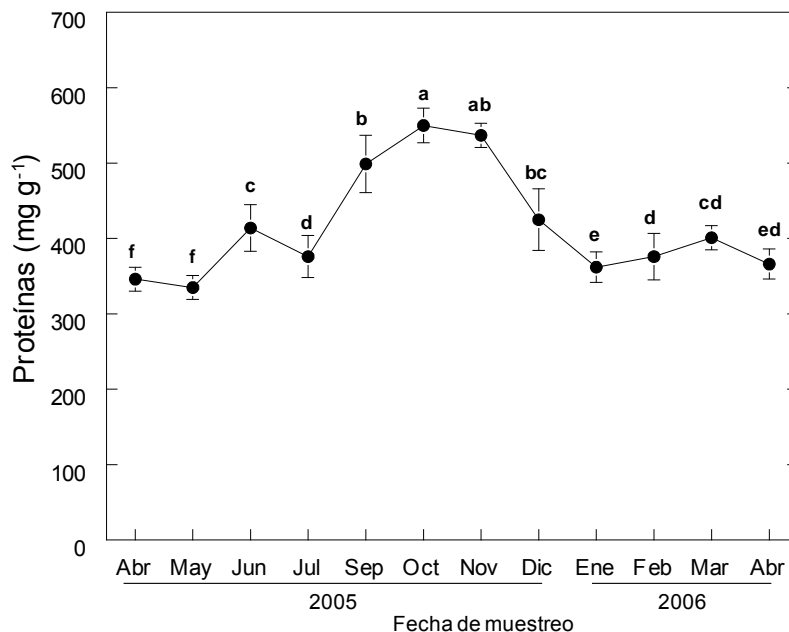


Fig. 23 Concentración de proteínas (mg g<sup>-1</sup> en peso seco) en hembras de *C. corteziensis* muestreadas en Laguna de Ceuta, Sinaloa de abril de 2005 a abril de 2006.

### 1.6.3 Concentración de carbohidratos

La concentración de carbohidratos (mg g<sup>-1</sup> en peso seco) en los tejidos de las hembras varió significativamente ( $P < 0.01$ ) en relación a los meses de muestreo (Fig. 24). El valor más alto de carbohidratos se encontró en los meses de abril a mayo de 2005 ( $278 \pm 13$  a  $320 \pm 5$  mg g<sup>-1</sup>) y de febrero a abril de 2006 ( $270 \pm 6$  a  $318 \pm 14$  mientras que los valores más bajos se encontraron de octubre a noviembre de 2005 ( $137 \pm 7$  a  $148 \pm 13$  mg g<sup>-1</sup>) (Fig. 24). La concentración de carbohidratos se correlacionó positivamente con el número de ovocitos postvitelogenicos, biomasa, materia seca y lípidos totales ( $r = 0.71, 0.81, 0.80$  y  $0.86$ , respectivamente,  $P < 0.05$ ).

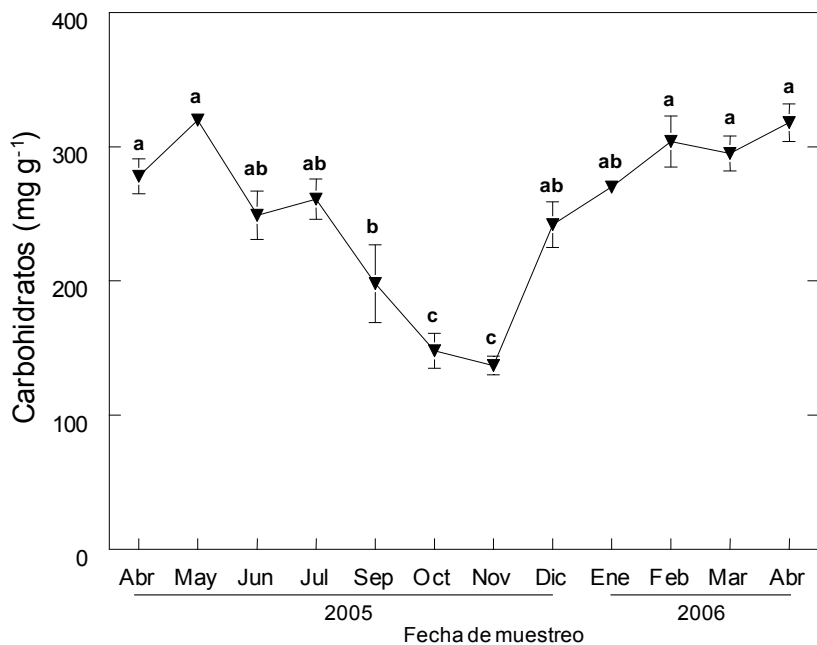


Fig. 24 Concentración de carbohidratos (mg g<sup>-1</sup> en peso seco) en hembras de *C. corteziensis* muestreadas en Laguna de Ceuta, Sinaloa de abril de 2005 a abril de 2006.

#### 1.6.4 Concentración de lípidos totales

La concentración de lípidos (mg g<sup>-1</sup> en peso seco) en los tejidos de las hembras varió significativamente ( $P < 0.01$ ) en relación a los meses de muestreo (Fig. 25). El valor más de lípidos se encontró en el mes de mayo de 2005 ( $107.4 \pm 7.1$  mg g<sup>-1</sup>), el cual disminuyó significativamente hasta octubre de 2005 ( $52.2 \pm 4.8$  mg g<sup>-1</sup>, respectivamente) (Fig. 25). La concentración de lípidos se correlacionó positivamente con el número de ovocitos postvitelogenicos, biomasa, materia seca y carbohidratos ( $r = 0.70, 0.63, 0.59$  y  $0.86$ , respectivamente,  $P < 0.05$ ).

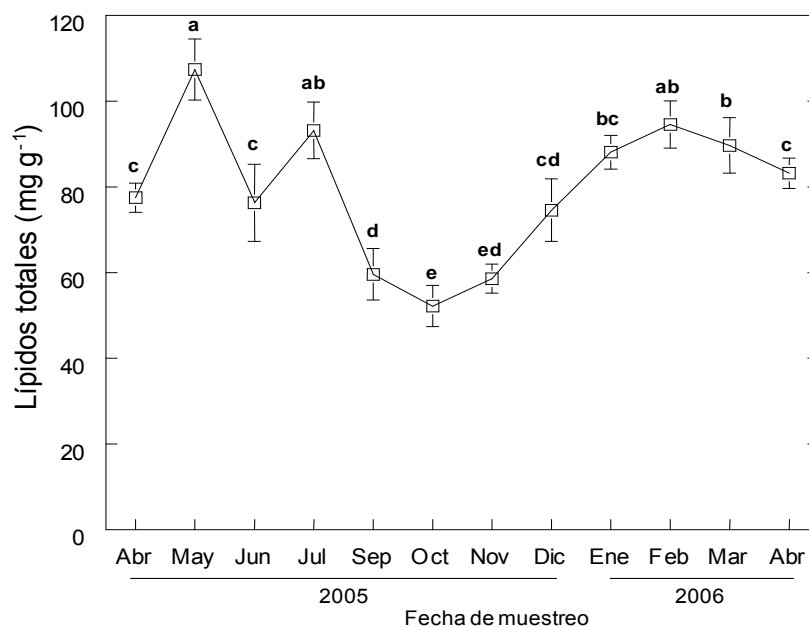
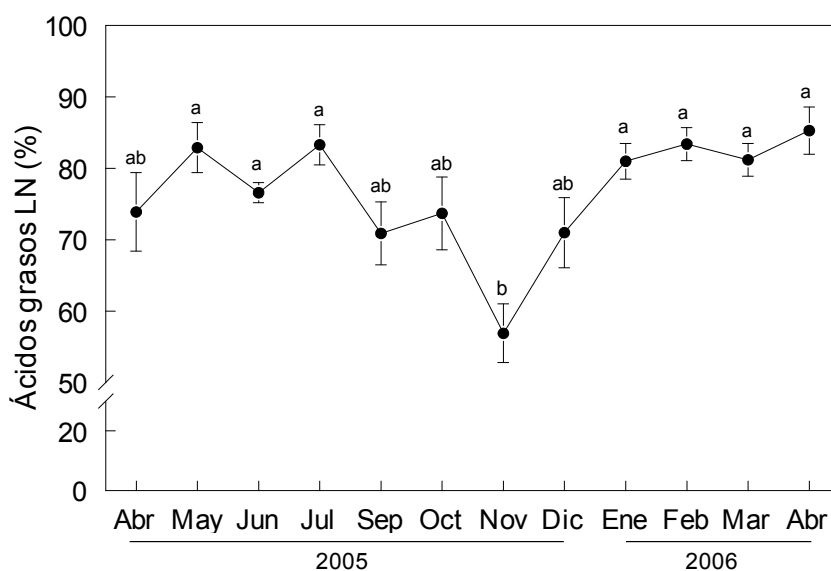


Fig. 25 Concentración de lípidos totales ( $\text{mg g}^{-1}$  en peso seco) en hembras de *C. corteziensis* muestreadas en Laguna de Ceuta, Sinaloa de abril de 2005 a abril de 2006.

#### 1.6.5 Proporción de ácidos grasos de la fracción neutra en relación a ácidos grasos totales (reservas y fosfolípidos)

Los proporción de ácidos grasos neutros o de reservas fue significativamente ( $P < 0.01$ ) afectado en relación a los meses de muestreo (Fig. 26). Los valores más altos se encontraron de mayo a julio de 2005 ( $83 \pm 2\%$  en promedio) y de enero a abril de 2006 ( $81 \pm 3$  a  $85 \pm 3\%$ ), mientras que el valor más bajo se encontró en el mes de noviembre de 2005 ( $57 \pm 4\%$ ). La proporción de lípidos de reserva en relación al total de ácidos grasos se correlacionó positivamente con la biomasa, la materia seca, la concentración de carbohidratos y lípidos ( $r = 0.79, 0.61, 0.85$  y  $0.83$ , respectivamente,  $P < 0.05$ ); mientras que fue significativa e inversa con la concentración de proteínas ( $r = -0.65, P < 0.05$ ).



26. Proporción (%) de ácidos grasos neutros en relación a ácidos grasos totales en hembras de *C. corteziensis* muestreadas en Laguna de Ceuta, Sinaloa de abril de 2005 a abril de 2006.

#### 1.6.6 Concentración de carotenoides

La concentración de carotenoides ( $\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$  en peso húmedo) en los tejidos de las hembras varió significativamente ( $P < 0.01$ ) en relación a los meses de muestreo (Fig. 27). Los valores más altos se encontraron en el invierno, particularmente en el mes de enero de 2006 ( $4.9 \pm 0.9 \mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$  ph), mientras que los valores más bajos se encontraron en el mes de abril, junio y julio de 2005 ( $0.8 \pm 0.2$ ,  $1.2 \pm 0.2$  y  $1.3 \pm 0.1 \mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ ) (Fig. 27). La concentración de carotenoides se correlacionó positivamente con clorofila a ( $r = 0.76$ ,  $P < 0.05$ ) y con la proporción de ácido graso  $18:4n-3$  de la fracción de lípidos neutros ( $r = 0.76$ ,  $P < 0.05$ ).

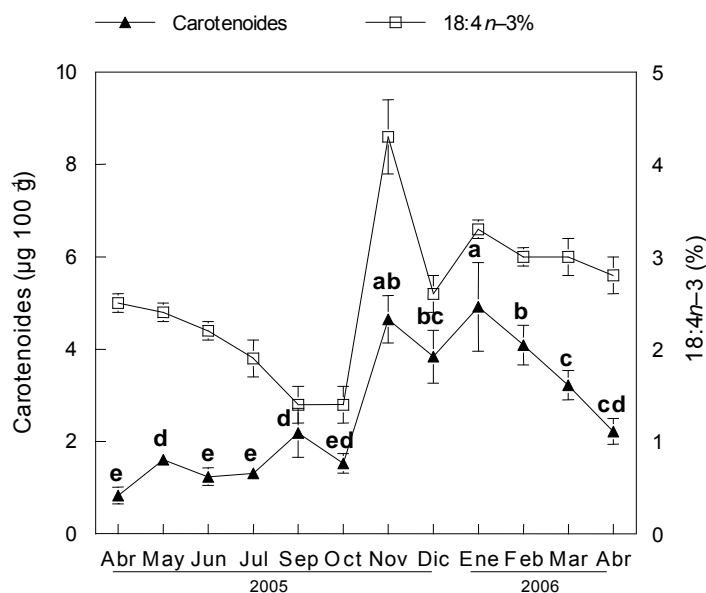


Fig. 27 Concentración de carotenoides ( $\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$  en peso húmedo) y proporción de 18:4n-3 (%) en hembras de *C. corteziensis* muestreadas en Laguna de Ceuta, Sinaloa de abril de 2005 a abril de 2006.

### 1.6.7 Esteroles libres y esterificados

La proporción de esteroles de la fracción esterificada en relación al total de esteroles fue significativamente ( $P < 0.01$ ) diferente entre los meses muestreados (Fig. 28). Los valores más altos se encontraron en los meses de marzo a abril de 2006 ( $45 \pm 5$  a  $48 \pm 1\%$ ) mientras que el valor mínimo en noviembre de 2005 ( $7 \pm 1\%$ ).

La mayoría de los esteroles se encontraron en mayor proporción en forma libre durante los meses muestreados, excepto el stigmasterol en que se observó un patrón inverso, mientras que el c-dehidrocolesterol y demosterol se encontraron en proporciones similares (Tabla II). El colesterol, brassicasterol y el isofucosterol fueron proporcionalmente los esteroles mayoritarios en los tejidos de los ostiones durante los meses muestreados (34 a 48, 12 a 16 y 9 a 14%, suma de fracción libre y esterificada,

respectivamente) (Tabla XXII ver anexo B). Los esteroides minoritarios (<10% del total de los esteroides, suma fracción libre y esterificada) fueron el campesterol (4–8%), 24-metilcolesterol (4–8%), estigmasterol (4–7%), ergosterol (4–5%), b-sitosterol+fucosterol (5–6%), t-dehidrocolesterol (4–6%), demosterol (1–3%) y c-dehidrocolesterol (1–2%). La proporción individual de cada esteroide mostró un patrón similar al observado al total de la fracción esterificada del total de esteroides (Fig. 28), por lo que se utilizó la fracción esterificada para determinar si las variaciones estacionales de esta fracción se correlacionan con la disponibilidad del fitoplancton y a su vez con la maduración de los ostiones a través del análisis de componentes principales, resultados que se discutirán más adelante. La concentración de esteroides se muestra en la tabla Tabla XXII (ver anexo B).

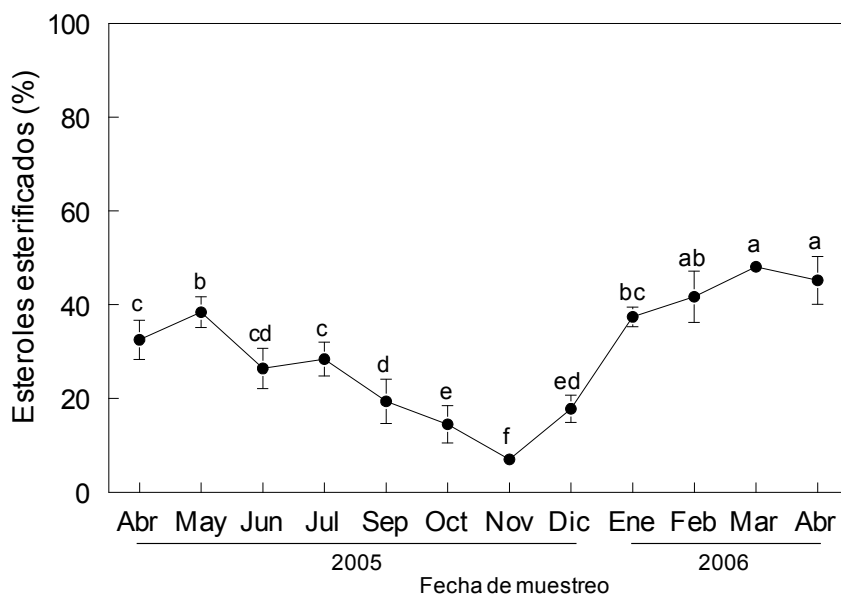


Fig. 28 Proporción de esteroides esterificados (%) en relación al total de esteroides en hembras de *C. corteziensis* muestreadas en Laguna de Ceuta, Sinaloa de abril de 2005 a abril de 2006.



Tabla II. Proporción (%) de cada esteroles en relación al total de esteroides en cada fracción (libre y esterificada) en hembras de *C. corteziensis* muestreadas en Laguna de Ceuta, Sinaloa de abril de 2005 a abril de 2006.

	2005								2006			
	Abril	Mayo	Junio	Julio	Septiembre	Octubre	Noviembre	Diciembre	Enero	Febrero	Marzo	Abril
<b>Fracción libre</b>												
Colesterol	22.3±2.3c	23.1±1.5c	27.1±2.9bc	31.9±4.1b	38.5±4.1ab	37.9±2.1ab	39.8±0.9a	31.9±1.9b	22.3±1.2c	23.4±5.8bc	19.0±1.2c	17.7±1.2c
Brassicasterol	9.9±0.8b	10.6±0.6b	12.1±0.7a	11.9±1.0ab	11.0±0.7ab	12.9±0.6a	13.0±0.3a	12.3±0.6a	11.7±0.6ab	7.5±0.8c	8.8±0.4bc	5.9±0.6d
Isofucosterol	4.5±1.0cd	5.4±0.6c	7.4±1.2bc	4.4±0.7cd	6.8±0.5bc	9.2±1.2b	10.9±1.4a	10.4±0.8ab	7.3±0.8bc	4.4±0.5cd	5.0±0.7cd	4.2±0.7d
Campesterol	3.6±0.5b	3.3±0.2bc	2.2±0.1d	1.9±0.2e	2.2±0.1d	2.4±0.1d	2.8±0.1cd	3.7±0.2b	4.2±0.2a	3.7±0.4b	4.0±0.1ab	3.1±0.4c
24-Metilenecolesterol	4.8±0.7bc	4.6±0.6c	4.3±0.6cd	3.5±0.5d	4.9±0.4b	5.7±0.2ab	6.0±0.1a	5.8±0.2ab	3.2±0.1ed	2.4±0.3ef	2.8±0.1e	2.2±0.2f
Stigmasterol	2.4±0.2b	2.6±0.2b	2.9±0.3ab	2.3±0.3b	2.5±0.2b	2.7±0.1ab	3.9±0.1a	4.2±0.2a	2.6±0.1b	1.9±0.2b	2.0±0.1b	1.7±0.2c
Ergosterol	2.8±0.3b	2.8±0.3b	2.8±0.3b	2.4±0.2b	2.6±0.2b	3.3±0.1ab	3.4±0.2a	3.3±0.3ab	2.5±0.1b	2.0±0.2c	1.9±0.2bc	2.3±0.2b
b-sito+fucosterol	3.1±0.3cd	4.1±0.4bc	4.8±0.3ab	4.1±0.4bc	3.7±0.3c	4.5±0.3b	6.1±0.1a	4.5±0.2b	3.6±0.1c	2.7±0.3d	3.3±0.2cd	2.5±0.2e
t-dehidrocolesterol	1.5±0.1bc	1.6±0.2bc	1.2±0.2cd	1.4±0.2c	1.0±0.2d	0.8±0.2ed	0.5±0.1e	1.0±0.2d	1.6±0.1bc	1.9±0.1b	2.4±0.3a	1.5±0.1ab
c-dehidrocolesterol	0.62±0.11bc	0.68±0.09b	0.55±0.09bc	0.62±0.09bc	0.47±0.09c	0.47±0.11c	0.25±0.02d	0.52±0.10bc	0.69±0.04ab	0.85±0.09ab	1.15±0.12a	0.95±0.13ab
Desmosterol	1.59±0.18a	1.37±0.08b	0.84±0.05cd	0.68±0.07e	0.77±0.06d	0.93±0.09cd	0.99±0.07c	1.38±0.19b	1.50±0.09ab	1.57±0.22ab	1.68±0.10a	1.30±0.10bc
<b>Fracción esterificada</b>												
Colesterol	10.7±1.7bc	13.4±0.3b	7.7±1.1cd	9.7±1.1c	5.9±1.4ed	3.9±1.0e	2.0±0.4f	6.7±1.0d	11.6±0.6b	14.1±1.8ab	16.0±0.7a	15.3±1.7a
Brassicasterol	4.5±0.6bc	4.6±0.5bc	3.4±0.7c	3.6±0.5c	2.1±0.7cd	1.4±0.6ed	0.4±0.1e	1.9±0.3d	5.4±0.3ab	5.3±0.6b	7.0±0.3a	5.9±0.7ab
Isofucosterol	4.3±0.4b	6.6±0.9a	4.0±0.7b	4.9±0.8b	2.9±0.9bc	2.0±0.6c	0.7±0.2d	1.8±0.3c	5.7±0.3ab	5.3±0.9b	6.9±0.8a	5.4±0.7ab
Campesterol	2.3±0.4b	2.3±0.2ab	1.3±0.2bc	1.2±0.3bc	0.7±0.2d	0.6±0.2d	0.4±0.1d	0.9±0.1c	2.6±0.5a	2.9±0.4a	3.4±0.2a	3.1±0.3a
24-Metilenecolesterol	2.2±0.3a	2.2±0.2ab	1.5±0.3bc	1.3±0.2c	1.1±0.2c	0.9±0.2cd	0.4±0.1d	1.0±0.3c	2.1±0.5b	1.8±0.3bc	1.9±0.2bc	1.8±0.3bc
Stigmasterol	3.1±0.4b	3.4±0.5b	2.7±0.4b	2.0±0.2c	2.1±0.7bc	1.8±0.5cd	0.6±0.1e	1.6±0.2d	4.3±0.4a	3.9±0.6b	4.0±0.4ab	3.4±0.6b
Ergosterol	1.0±0.2ab	2.1±0.2a	1.1±0.2ab	1.5±0.2ab	0.8±0.1b	1.0±0.2ab	0.9±0.2b	1.7±0.3ab	1.1±0.2ab	1.7±0.2ab	1.7±0.2ab	1.7±0.2ab
b-sito+fucosterol	1.5±0.3bc	1.8±0.2b	1.2±0.3cd	1.2±0.2c	0.9±0.3d	0.5±0.2ed	0.2±0.1e	0.7±0.2d	1.6±0.1b	2.1±0.3ab	2.6±0.3a	2.3±0.2ab
t-dehidrocolesterol	2.5±0.2c	3.1±0.2bc	3.5±0.4b	2.9±0.4bc	4.0±0.3ab	4.9±0.3a	5.2±0.1a	4.0±0.2ab	3.0±0.1bc	2.3±0.3c	2.6±0.1bc	2.2±0.2d
c-dehidrocolesterol	0.44±0.05d	0.65±0.03c	0.92±0.13ab	0.64±0.10c	0.88±0.07ab	1.07±0.07a	0.86±0.05ab	0.68±0.06bc	0.68±0.06b	0.54±0.06c	0.56±0.06c	0.61±0.05c
Desmosterol	1.62±0.44ab	1.59±0.26ab	1.32±0.36b	1.52±0.38ab	1.03±0.26bc	0.59±0.11c	0.68±0.12c	0.88±0.17bc	1.18±0.15bc	1.72±0.32ab	1.35±0.21b	2.08±0.32a

Los resultados están expresados en media± E.E., y fueron analizados por ANOVA unifactorial (mes). Las medias se compararon por análisis de Tukey, las letras en cada renglón indican las diferencias significativas ( $P<0.05$ ).

## 1.6.8 Ácidos Grasos

### 1.6.8.1 Proporción de ácidos grasos fracción lípidos neutros

La proporción de todos los ácidos grasos de la fracción de lípidos neutros o acilglicéridos fueron significativamente ( $P < 0.01$ ) diferentes entre los meses muestreados (Tabla XXV, anexo B). La proporción de 22:6 $n-3$  en relación al total de los ácidos grasos fue mayor ( $P < 0.01$ ; Fig. 29A) en el mes de enero de 2006 ( $27.5 \pm 0.2\%$ ), y menor en el mes de noviembre de 2005 ( $21.5 \pm 0.5\%$ ). El 20:5 $n-3$  fue mayor en los meses de abril 2005 y febrero de 2006 ( $18.1 \pm 0.5$  y  $17.9 \pm 0.3\%$ , respectivamente), mientras que el valor mínimo se encontró en septiembre y octubre de 2005 ( $11.7 \pm 1.0$  y  $11.2 \pm 0.9\%$ , respectivamente) (Fig. 28B). El 20:4 $n-6$  fue máximo en el mes de septiembre de 2005 ( $4.5 \pm 0.4\%$ ), mientras que el menor valor se encontró en mes de enero de 2006 ( $2.1 \pm 0.1\%$ ). El 20:4 $n-6$  mostro una correlación significativa e inversa ( $r = -0.87$ ,  $P < 0.05$ ) con la proporción de 20:5 $n-3$  (Fig. 29C).

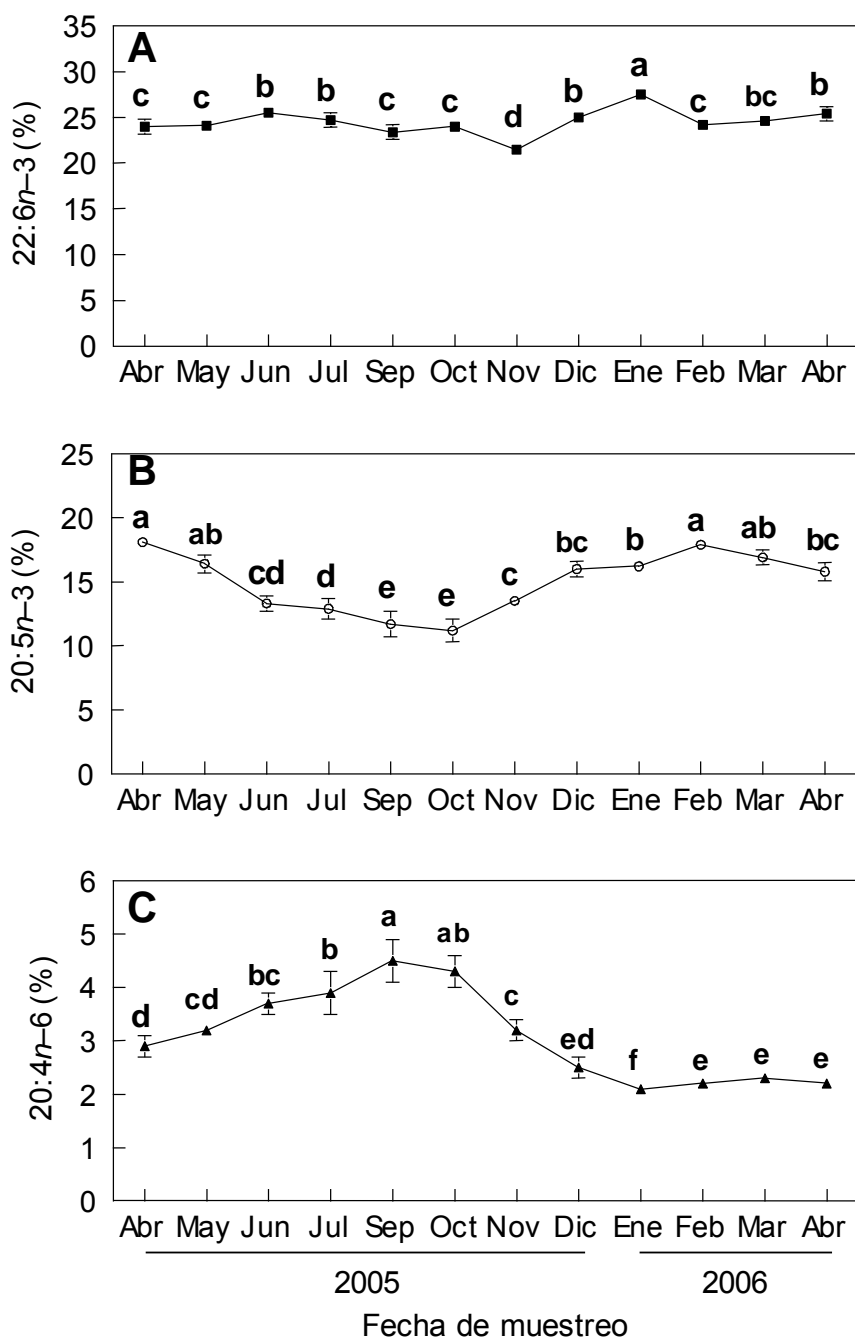


Fig. 29 Proporción de los ácidos grasos 22:6n-3 (A), 20:5n-3 (B) y 20:4n-6 (C) de la fracción de lípidos neutros en hembras de *C. corteziensis* muestreadas en Laguna de Ceuta, Sinaloa de abril de 2005 a abril de 2006.

### 1.6.8.2 Proporción de ácidos grasos fracción lípidos polares

La proporción de todos los ácidos grasos de la fracción de lípidos polares o fosfolípidos fueron significativamente ( $P < 0.01$ ) diferentes entre los meses muestreados (Tabla XXVI, anexo B). Los mayores porcentajes del total de los ácidos grasos correspondieron al  $20:5n-3$  y  $22:6n-3$ . El porcentaje de  $22:6n-3$  fue mayor al porcentaje de  $20:5n-3$  durante todos los meses muestreados, y particularmente los valores máximos se encontraron en abril de 2006 ( $25.0 \pm 0.4\%$ ), mientras que el mínimo se encontró en el mes de noviembre de 2005 ( $17.6 \pm 0.6\%$ ) (Fig. 30A). La proporción de  $20:5n-3$  fue mayor durante la primavera, particularmente en el mes de febrero de 2006 ( $18.3 \pm 0.6\%$ ), mientras que los valores mínimos se encontraron durante el verano y parte del otoño, particularmente de junio a septiembre de 2005 ( $10.6 \pm 0.4$  a  $10.7 \pm 0.7\%$ ) (Fig. 30B). Posteriormente, la proporción de  $20:5n-3$  se incrementó durante la parte final del otoño y principio del invierno hasta alcanzar valores más altos en la primavera de 2006 (Fig. 30B). El porcentaje de  $20:4n-6$  fue mayor en los meses de septiembre y octubre de 2005 ( $7.5 \pm 0.4$  y  $7.6 \pm 0.4\%$ , respectivamente), mientras que los valores mínimos se encontraron en los meses de febrero a abril de 2006 ( $4.1 \pm 0.2$  a  $4.1 \pm 0.2\%$ ) (Fig. 30C).

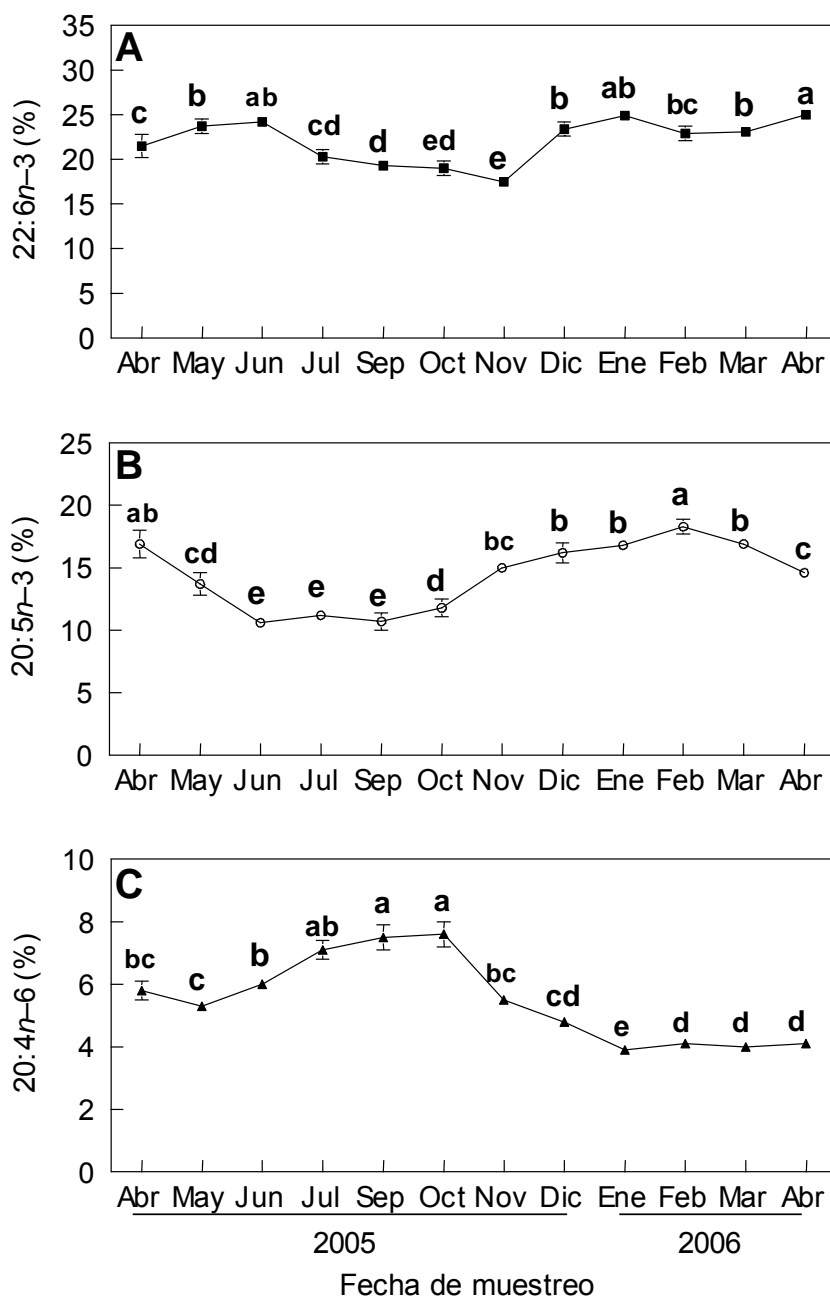


Fig. 30 Proporción de los ácidos grasos 22:6n-3(A), 20:5n-3 (B) y 20:4n-6 (C) de la fracción de lípidos polares en hembras de *C. corteziensis* muestreadas en Laguna de Ceuta, Sinaloa de abril de 2005 a abril de 2006.

### 1.6.9 Análisis de componentes principales (ACP)

Se realizó un análisis de componentes principales (matriz de correlación) para determinar la relación de la composición bioquímica de los tejidos de los ostiones con los cambios en biomasa e indicadores histológicos de reproducción (Fig. 31). La acumulación de reservas energéticas fue independiente de temperatura, mientras que mostró una correlación positiva con la disponibilidad de fitoplancton (clorofila *a*). Se encontró que el porcentaje de ovocitos postvitelogenicos, y en menor medida el incremento en biomasa se correlacionaron significativamente ( $P < 0.05$ ) con la concentración de carbohidratos, lípidos totales y el porcentaje de esteroides esterificados del total de esteroides. También se observó que los ovocitos postvitelogénicos se correlacionaron significativamente con la proporción de ácidos grasos de reservas, y particularmente con 14:0 y 20:5 $n-3$ . La correlación del índice de insaturación con los ovocitos postvitelogénicos puede deberse precisamente a las variaciones de 20:5 $n-3$ . La concentración de proteínas no mostró correlación con la variación de la biomasa o con las variables reproductivas, sino con el porcentaje de humedad, indicando acumulación durante el invierno, cuando el resto de las reservas energéticas disminuyen. La acumulación general de las reservas energéticas se correlacionó de manera inversa con el contenido de humedad en los tejidos de los ostiones, mientras que el ácido graso 18:4 $n-3$  se correlacionó positivamente con el contenido de carotenoides en los tejidos de los ostiones y la clorofila *a*. Por otra parte, los ácidos grasos 22:5 $n-3$ , 22:2i y 22:2j de la fracción de lípidos neutros se correlacionaron positivamente con el contenido de humedad en los tejidos de los ostiones, mientras que los ácidos grasos 16:0, 18:0 y 20:4 $n-6$  se correlacionaron positivamente con la temperatura. Los ácidos grasos 18:2 $n-6$  y 18:3 $n-3$ , precursores de ácidos grasos altamente insaturados, no mostraron correlaciones con otras

variables alguna. El área de cobertura gonádica (ACG) mostro correlación con el total de ovocitos pre-, vit- y postvitelogenicos (Fig. 31).

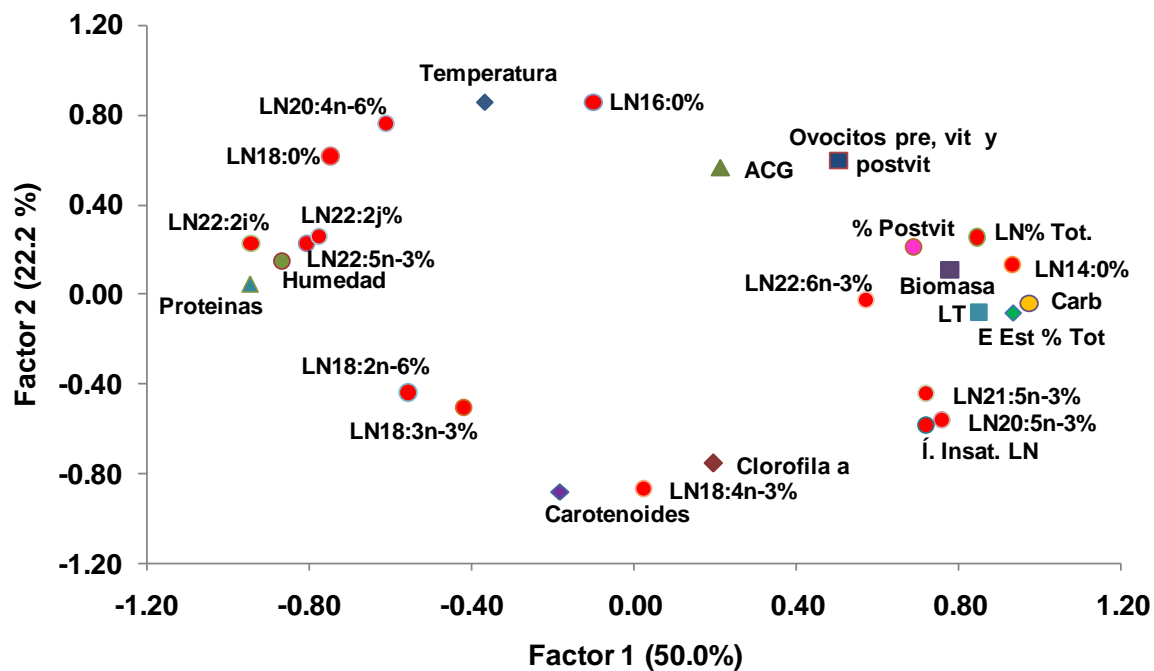


Fig. 31 Factores de peso (factor loadings) del análisis de componentes principales realizado con las variables de ácidos grasos (fracción neutra), variables bioquímicas, morfométricas y reproductivas de las hembras de *C. corteziensis* muestreadas en Laguna de Ceuta, Sinaloa de abril de 2005 a abril de 2006.

### 1.7 Discusión.

Las hembras de *C. corteziensis* de mayor talla concuerdan con los estadios de maduración más avanzados (Rodríguez-Jaramillo et al., 2008), ya que se observó una correlación positiva significativa ( $r= 0.60$ ,  $P<0.05$ ) entre el porcentaje de ovocitos postvitelogenicos y la relación biomasa/peso total. Los ostiones, como especies protándricas, primero funcionan como machos durante su primera maduración, los cuales al cabo de su primer periodo reproductivo y cuando se encuentran indiferenciados, ocurre la reversión sexual a hembras (Thompson et al., 1996). Por lo tanto, es de esperarse que la proporción de hembras funcionales aumente con la talla y edad de los ostiones (Galtsoff, 1964). Sin embargo, se ha observado que el estrés ambiental como la falta de alimento y la reparación de las conchas, puede propiciar la reversión sexual de hembras a machos (Egami, 1953, citado en Thompson et al., 1996; Bahr y Hillman, 1967; Davis y Hillman, 1971).

La longitud y el ancho de las conchas de los ostiones mostraron menos variaciones estacionales, con menores tallas durante los meses de invierno, lo cual concuerda con la disminución de la biomasa, el peso total y la mayor frecuencia de hembras inmaduras. Sin embargo, la estructura de tallas de los ostiones también puede ser modificada artificialmente por la recolección de los organismos más grandes para consumo humano (Rodríguez-Jaramillo et al., 2008).

A diferencia de que lo sucede con las especies de ostiones que se distribuyen en aguas templadas como *C. gigas* y *C. virginica*, en el ostión subtropical *C. corteziensis* se encuentran ovocitos maduros la mayor parte del año con excepción de diciembre de 2005, donde no se encontraron ovocitos postvitelogenicos (Rodríguez-Jaramillo et al., 2008;



presente trabajo), lo cual indica un periodo muy corto de reposo sexual o quiescencia. En una población de Nayarit muestreada de 1971 a 1973, se determinó a través de la frecuencia de estadios reproductivos, que la gametogénesis ocurrió de enero a diciembre, aunque la mayor proporción de organismos maduros y/o desovados se observaron en los meses de abril a diciembre (Stuardo y Martínez, 1975), en concordancia con la ausencia de ovocitos postvelogénicos en el invierno. Para la misma localidad de Nayarit muestreada de 1989 a 1990, fueron identificados dos picos reproductivos a través del cálculo de un índice gonadal en los meses de abril y julio (Frías-Espericueta et al., 1997). En contraste, en una población de Guaymas, Sonora, al norte de la población estudiada en el presente trabajo, se detectaron periodos reproductivos más cortos, con organismos desovados durante los meses de julio a septiembre (Ramírez y Sevilla, 1965) y de julio a octubre (Ruíz-Durá, 1974). Recientemente, se evaluó la factibilidad de cultivo de un lote de semillas de ostión proveniente de reproductores de *C. corteziensis* de Laguna de Ceuta, Sinaloa, en una localidad que se encuentra más al norte, Guaymas, Sonora (Chávez-Villalba et al., 2008). El cultivo de esta población a distintas condiciones ambientales disminuyó su periodo reproductivo de marzo a noviembre, dos meses en comparación a lo que se observó en Ceuta, Sinaloa (Rodríguez-Jaramillo et al., 2008; presente trabajo). La prolongación del periodo reproductivo de *C. corteziensis* en el presente estudio coincide con lo observado en otras poblaciones de distintas especies de ostiones tropicales, tales como *C. virginica* (George-Zamora et al., 2003), *C. madrasensis* (Joseph y Madhyastha, 1984) y *C. rhizophorae* (Angell, 1986). La prolongación del ciclo reproductivo durante todo el año también se ha observado con ostiones de otros géneros, como en una población de *Ostrea edulis* que habita en una laguna costera de España (Cano et al., 1997). Esto contrasta con lo

observado en especies de ostiones de zonas templadas, en que los periodos reproductivos son relativamente más cortos y en los que normalmente ocurre un solo desove (febrero a agosto) como en *C. gigas* (Lango-Reynoso et al., 2000) y *C. virginica* (febrero-julio) (Heffernan et al., 1989). Sin embargo, se han observado algunas diferencias en los periodos reproductivos entre las poblaciones del ostión *C. gigas* que se distribuye a largo de las costas de Francia, principalmente en relación al desove, el cual ocurre un mes antes en las poblaciones sureñas en comparación con norteñas (Lango-Reynoso et al., 2006). El efecto latitudinal de la distribución de las poblaciones de ostiones en la reproducción es particularmente evidente en *C. virginica*, puesto que se ha observado que las poblaciones que se distribuyen en el Golfo de México tienen un periodo reproductivo más amplio, con desoves durante todo el año excepto en julio y agosto (George-Zamora et al., 2003), mientras que en las poblaciones de la misma especie que se distribuyen en Canadá los desoves ocurren de junio a agosto (Thompson et al., 1996). Incluso se ha observado que bajo ciertas condiciones hidrológicas en Laguna de Términos, Campeche, una población de *C. virginica* puede reproducirse continuamente durante dos años seguidos, por lo que no se aprecia una clara estacionalidad de las fases gonádicas, principalmente la fase indiferenciada o de “reposo sexual” (Rogers y García-Cubas, 1981). Estas diferencias en la vitelogénesis de las poblaciones de distintas especies de ostiones en diferentes regiones geográficas está probablemente regulada por complejas interacciones de distintos factores, principalmente ambientales (Giese y Pearse, 1974; En: Thompson et al., 1996), de las cuales la estacionalidad de la temperatura y la disponibilidad del alimento parecen controlar principalmente los ciclos reproductivos de los moluscos bivalvos (Sastry, 1968; Lubet y Mann, 1987). Es de esperarse que existan diferencias en la acumulación y movilización de

las reservas energéticas durante la reproducción en poblaciones de ostiones de distinta distribución geográfica (i.e. zonas templadas vs. sub-tropicales).

#### A. EFECTO DE LA TEMPERATURA Y ABUNDANCIA DE ALIMENTO EN LA ACUMULACIÓN Y UTILIZACIÓN DE RESEVAS

La reproducción en *C. gigas* está regulada por las variaciones estacionales de la temperatura: se ha observado que la vitelogénesis ocurre cuando incremento la temperatura, en un periodo de aproximadamente cinco meses (Li et al., 2000; Ren et al., 2003; Matus de la Parra et al., 2005). En contraste, la amplitud de la estacionalidad de la temperatura en Laguna de Ceuta permite a *C. corteziensis* tener un extenso periodo de maduración o vitelogénesis, el cual ocurrió casi durante todo el año, excepto en diciembre en que no se observaron ovocitos postvitelogenicos (Rodríguez-Jaramillo et al., 2008). Esto concuerda con lo descrito por Chávez-Villalba et al. (2008) en que sugiere que la amplitud en la estacionalidad de la temperatura en Sonora favorece la gametogenesis continua (9 meses) de *C. corteziensis*. La vitelogénesis ocurrió con el incremento de la temperatura a partir de los 20°C, mientras que los dos principales desoves ocurrieron en verano y otoño, cuando la temperatura alcanzó los 25°C y 30°C (Rodríguez-Jaramillo et al., 2008). Mientras que en los ostiones de *C. corteziensis* provenientes de reproductores de Sinaloa y cultivados en Sonora el principal desove ocurrió en agosto (Chávez-Villalba et al., 2008); aunque en ambos trabajos se observaron desoves parciales a lo largo del año. Estas diferencias pueden deberse a la menor estacionalidad de la temperatura, ya que mientras en Sinaloa esta se mantuvo en 20°C de diciembre de 2005 a marzo de 2006; en Sonora, la temperatura se incrementó rápidamente de los 15°C en diciembre de 2003, a valores por arriba de los 25°C

en marzo de 2004. Por otro lado, en las poblaciones de ostiones de *C. corteziensis* provenientes de reproductores de Sinaloa y cultivados en Sonora, se observó una asincronía en la maduración de los machos con respecto a la primera maduración de las hembras (Chávez-Villalba et al., 2008), lo cual contrasta con lo descrito para las poblaciones de ostiones de Laguna de Ceuta en que ambos sexos maduran de manera sincrónica (Rodríguez-Jaramillo et al., 2008).

Aunado al efecto de la temperatura sobre la vitelogénesis y el desove, la clorofila *a* (una aproximación de la disponibilidad de alimento) en Laguna de Ceuta se correlacionó con la concentración de carotenoides ( $r= 0.73$ ,  $P<0.05$ ). Por otro lado, se encontró una correlación inversa significativa entre la concentración de carotenoides con el área de cobertura gonadal (ACG) ( $r= -0.76$ ,  $P<0.05$ ) y una tendencia estadística con el número ovocitos postvitelogenicos ( $r= -0.50$ ,  $P=0.098$ ). Aparentemente, las variaciones estacionales en la concentración de carotenoides en los tejidos de las hembras de *C. corteziensis* corresponden a las variaciones en la disponibilidad de fitoplancton, y no a su acumulación en relación al ciclo reproductivo. Esto contrasta con lo descrito para *M. edulis* en que la maduración está contralada por la disponibilidad de fitoplancton y particularmente la acumulación de carotenoides en los tejidos (Campbell, 1969). Por otra parte, el particular incremento de carotenoides en los tejidos de las hembras de *C. corteziensis* y la concentración de clorofila *a* en el mar durante los meses de invierno y primavera reflejan un incremento substancial en la disponibilidad de fitoplancton, ya que los carotenos son adquiridos estrictamente a través de la dieta, puesto que los animales en general no pueden sintetizarlos *de novo* (Fraser y Bramley, 2004). Por lo tanto, esto sugiere que a pesar de que los pigmentos (i.e. carotenoides y clorofila *a*) se correlacionaron de

manera inversa con ACG, la vitelogénesis en *C. corteziensis* está sustentada en las variaciones estacionales de la abundancia de fitoplancton de Laguna de Ceuta, la cual a pesar de que es mayor en el invierno y primavera, y menor en el verano, los ostiones mostraron el mismo desempeño reproductivo (i.e. ovocitos postvitelogenicos) durante ambos periodos. La particular amplitud e intensidad de la gametogénesis en especies tropicales como *Pinctada imbricata* (Urban, 2000) y *C. corteziensis* (Chávez-Villalba et al., 2008) está estrechamente ligada a la continua y abundante disponibilidad de fitoplancton; sin embargo en esta última especie, la vitelogénesis de los ostiones está sustentada en la disponibilidad de la materia orgánica particulada, puesto que esta mostró un patrón inverso a la concentración de clorofilas *a*, *b* y *c*; aunque el principal desove ocurrido en agosto concuerda con los mayores valores de concentración de clorofilas (Chávez-Villalba et al., 2008). En el caso de las poblaciones de ostiones de zonas templadas como *C. gigas* (Deslous-Paoli y Héral, 1988; Ren et al., 2003; Matus de la Parra et al., 2005) y *C. virginica* (Sidwell et al., 1979; Barber et al., 1988a; 1988b) la vitelogénesis está sustentada por los florecimientos de fitoplancton de invierno y primavera, la cual termina con un sólo desove en el verano, probablemente controlado por la estacionalidad de la temperatura. Así, a partir del florecimiento de invierno, aunado a la reabsorción de los ovocitos residuales tras el desove (Lango-Reynoso et al., 2006), los ostiones acumulan de nuevo importantes cantidades de glucógeno para reiniciar la gametogénesis.

El ciclo reproductivo de algunas poblaciones de *C. gigas* (Mann, 1979; Berthelin et al., 2000a; Ren et al., 2003; Li et al., 2000; Matus de la Parra et al., 2005; Dridi et al., 2007) y de *C. virginica* (Sidwell et al., 1979; Barber et al., 1988a; 1988b) de zonas templadas se caracteriza por la variación estacional de la composición bioquímica, donde el glucógeno

acumulado durante el otoño y el invierno (Engle, 1951; Galtsoff, 1964; Deslous-Paoli y Héral, 1988) es parcialmente utilizado como fuente de energía, así como para la síntesis de lípidos (i.e. triacilglicéridos y fosfolípidos) para sustentar la vitelogénesis y espermatogénesis en hembras y machos, respectivamente (Matus de la Parra et al., 2005). Sin embargo, la acumulación de reservas energéticas responde al ciclo gametogénico que concluye normalmente en un solo desove en el verano (Heffernan et al., 1989; Lango-Reynoso et al., 2000; 2006). En una población de *C. corteziensis* de Mazatlán, Sinaloa se han descrito variaciones estacionales de la acumulación de glucógeno en relación ciclo reproductivo (Páez-Osuna et al., 1993) y aunado a la profundidad en que se encuentran adheridos los ostiones al mangle (Páez-Osuna et al., 1991). En ambos trabajos se observó que los ostiones utilizaron el glucógeno de manera similar a lo descrito para especies de zonas templadas (i.e. *C. gigas*), es decir, las reservas acumuladas durante el invierno son movilizadas al inicio de la primavera para sustentar la vitelogénesis. Posteriormente se alcanzan valores mínimos durante el verano cuando los desoves ocurren, para volver al final a incrementar de nuevo durante el otoño y el invierno. En el mismo trabajo, se observó que los carbohidratos se correlacionaron de manera inversa con las proteínas y los lípidos a lo largo del ciclo reproductivo (Páez-Osuna et al., 1993). En contraste, en el presente trabajo no se encontró acumulación de carbohidratos en los tejidos de las hembras de *C. corteziensis* previo al inicio de la gametogénesis durante el invierno, sino que tanto los valores de carbohidratos como de lípidos incrementaron con el desarrollo de las gónadas. Asimismo, las diferencias estacionales de la biomasa están ligadas a los cambios en el crecimiento somático de los ostiones, así como del crecimiento y desarrollo de las gónadas, ya que los valores de la relación biomasa/peso total se correlacionaron con el porcentaje de

ovocitos postvitelogenicos ( $r= 0.60$ ,  $P<0.05$ ); mientras que los valores más bajos en el ACG y mayor frecuencia de hembras desovadas e inmaduras concuerdan con los valores mínimos de biomasa. Se calcula en ostiones adultos de *C. virginica* con un peso en biomasa entre los 14.2 y 23.2 g y completamente maduros, que las gónadas constituyen entre el 31.2 y 40.7% del peso de la biomasa (sin concha) (Galtsoff, 1964).

En el presente trabajo los análisis bioquímicos se hicieron en una muestra representativa de todos los tejidos, por lo tanto no es posible determinar transferencia de reservas entre ellos. Sin embargo, en un trabajo anterior se encontró una correlación inversa entre el contenido de carbohidratos del tejido conectivo vesicular (TCV) y la gónada en hembras durante el ciclo reproductivo de *C. corteziensis* (Rodríguez-Jaramillo et al., 2008), lo que sugiere una transferencia de carbohidratos del TCV hacia las gónadas, como se ha descrito para *M. edulis* (Mathiue y Lubet, 1993) y *C. gigas* (Berthelin et al., 2000b). La concentración de proteínas mostró un patrón similar al observado con carbohidratos y lípidos durante la primavera-verano, con una tendencia a acumularse durante el invierno, probablemente como una respuesta a la disminución de carbohidratos y lípidos. En contraste, en *C. gigas*, se ha reportado que la concentración de proteína incrementa en relación al aumento del diámetro de los ovocitos durante la maduración (Ren et al., 2003), probablemente como parte de las reservas del vitelo de los ovocitos (Raven, 1961).

La acumulación de reservas energéticas en las hembras de *C. corteziensis* está asociada con las variaciones observadas en la biomasa, ya que esta se correlacionó positivamente con la concentración de carbohidratos ( $r= 0.81$ ,  $P<0.05$ ) y lípidos ( $r= 0.63$ ,  $P<0.05$ ), e inversamente con la concentración de proteínas ( $r= -0.61$ ,  $P<0.05$ ). Es necesario especificar que los análisis bioquímicos se realizaron en una muestra homogénea de todos

los tejidos. Sin embargo, se propone que las variaciones estacionales en el contenido de lípidos se deben a la acumulación de estos en las gónadas, ya que la cantidad de lípidos en la glándula digestiva y en el tejido conectivo vesicular (TCV) se mantiene constante durante el ciclo reproductivo de *C. corteziensis* (Rodríguez-Jaramillo et al., 2008). Lo anterior contrasta con lo descrito para *C. gigas*, en que la glándula digestiva tiene un papel importante en el almacenamiento de lípidos (Matus de la Parra et al., 2005).

Los esteroides mayoritarios en los tejidos de las hembras de *C. corteziensis* fueron el colesterol, brassicasterol e isofucoesterol, mientras el resto se encontraron en menor proporción (<10%). Los valores promedio del colesterol y el brassicasterol en *C. corteziensis* son ligeramente mayores a los reportados para *C. virginica* (39 vs. 35% y 14 vs. 12, respectivamente) (Swift et al., 1980), mientras que los valores promedio del 24-metilencolesterol y del campesterol fueron menor y mayor (respectivamente) en *C. corteziensis* en comparación a *C. virginica* (6 vs. 27%, 6 vs. 3%, respectivamente) (Swift et al., 1980). Por otra parte, el valor del colesterol es menor en *C. gigas* en comparación de *C. corteziensis* (28 vs. 39%, respectivamente), mientras que el brassicasterol y 24-metilencolesterol son mayores en *C. gigas* (15 y 16%, respectivamente) (Gordon y Collins, 1982).

Se ha propuesto que las variaciones estacionales de esteroides están relacionadas con el proceso de gametogénesis y desoves en *C. gigas* (Matus de la Parra et al., 2005) y *C. virginica* (Swift et al., 1980). El colesterol es el principal esteroide que se moviliza en la formación de membranas celulares durante la proliferación de gametos (Soudant et al., 1996a; Pazos et al., 2003), además de que ha mostrado tener un papel importante en la embriogénesis y durante las primeras etapas del desarrollo larvario de moluscos bivalvos



(Soudant et al., 1998; 2000), así como su importante papel como precursor de hormonas esteroideas las cuales son sintetizadas en las gónadas y glándula digestiva de hembras (i.e.  $17\beta$ -estradiol, estrona y estriol) y machos (i.e. testosterona, 11-ceto-testosterona,  $5\alpha$ -dihidrotestosterona, androesterona, etc.) para regular la reproducción en diferentes especies de moluscos bivalvos (Croll y Wang, 2007). De los 14 esteroides identificados, únicamente la concentración de colesterol (suma de ambas fracciones) en los tejidos de las hembras de *C. corteziensis* mostró variaciones estacionales en relación al ciclo reproductivo, con valores máximos durante la mayor frecuencia de hembras maduras (abril, julio y septiembre de 2005), y mínimos durante los desoves (junio y sept-oct de 2005) y mayor frecuencia de hembras inmaduras (noviembre de 2005 y enero de 2006). La concentración de esteroides totales muestra un patrón similar al descrito con anterioridad, el cual es de esperarse ya que el colesterol fue el esteroide mayoritario (34–48%). Sin embargo, en algunos meses de muestro las variaciones no son tan evidentes en relación a la gametogénesis, principalmente durante los meses muestreados durante 2006; esto puede deberse a la reproducción continua de *C. corteziensis*, o a la alta disponibilidad de fitoplancton que hay en Laguna de Ceuta (Ibarguen-Zamudio, 2006). La alta disponibilidad de fitoplancton se observó en la proporción de la suma de los esteroides esterificados, la cual es máxima en los tejidos de las hembras durante la primavera-verano de 2005, y principalmente durante la primavera de 2006, mientras la mínima disponibilidad de fitoplancton se reflejó a finales del otoño y principalmente durante el inicio del invierno (Fig. 28). Estas variaciones en la concentración de esteroides esterificados, son similares a las observadas en la concentración de clorofila *a* en el mar, cuyos valores máximos se observan en la primavera y parte de

verano, pero sobre todo en el invierno; mientras que los mínimos durante la parte final del verano y el otoño.

Todos los ácidos grasos de las muestras de los tejidos de las hembras de *C. corteziensis* mostraron variaciones estacionales en relación a los meses muestreados, sin embargo los ácidos grasos más importantes para los moluscos bivalvos son los altamente insaturados (HUFA, por sus siglas en inglés). Esto se debe a que los moluscos bivalvos, como otros grupos de animales marinos, tienen una limitada capacidad de sintetizar estos ácidos grasos (Waldock y Holland, 1984; Chu y Greaves, 1991; Ackman y Kean-Howie, 1995), por lo tanto, son nutrientes esenciales para el crecimiento y supervivencia (Chu y Dupuy, 1980; Trider y Castell, 1980; Langdon y Waldock, 1981; Waldock y Holland, 1984; Thompson et al., 1996; Piveteau et al., 1999; Caers et al., 2000; Flores-Vergara et al., 2004), así como para la reproducción de distintas especies de moluscos bivalvos (Besnard et al., 1989; 1991; Soudant et al., 1996a; 1996b; 1996c; 1999; Samain et al., 2000; Caers et al., 2003; Racotta et al., 2003; Palacios et al., 2005; 2007). Por lo anterior, la discusión se centra en las variaciones estacionales en la composición de los ácidos grasos araquidónico ( $20:4n-6$ ), eicosapentaenoico ( $20:5n-3$ ) y docosahexaenoico ( $22:6n-3$ ).

En *C. gigas*, la mayor acumulación de ácidos grasos durante el ciclo reproductivo se observa en el otoño y la menor durante el verano (Dridi et al., 2007). En contraste, en las hembras de *C. corteziensis* la proporción de ácidos grasos de reservas en relación a los ácidos grasos totales se observaron en mayo de 2005, y disminuyeron durante verano-otoño hasta alcanzar valores mínimos en noviembre de 2005, aunque aumentaron desde el mes siguiente hasta alcanzar valores altos a partir de enero de 2006 y hasta el final del muestreo. Las variaciones estacionales en la concentración de ácidos grasos totales en acilglicéridos

(Tabla XXIII, anexo B) se correlacionaron con la frecuencia de ovocitos postvitelogenicos ( $r= 0.67$ ,  $P<0.05$ ), que fue mayor en primavera-verano y menor en invierno. La acumulación de ácidos grasos durante el ciclo reproductivo de *C. gigas* está asociada a la disponibilidad de fitoplancton, lo cual se refleja en la concentración de clorofila *a* (Dridi et al., 2007). Lo anterior concuerda con lo observado en las hembras de *C. corteziensis* en que los ácidos grasos 14:0, 21:5 $n-3$  y 20:5 $n-5$  de la fracción de lípidos neutros se correlacionaron con la concentración de clorofila *a*. Las variaciones estacionales de estos ácidos están relacionados no solo con la abundancia del fitoplancton, sino posiblemente, con los cambios en la estructura de las especies de microalgas que componen el fitoplancton, tal y como se discutirá más adelante.

La proporción de ovocitos postvitelogenicos se correlacionó positivamente con la concentración de 20:5 $n-3$  ( $r= 0.81$ ,  $P<0.05$ ) y en menor grado con el 22:6 $n-3$  ( $r= 0.59$ ,  $P<0.05$ ), ambos de la fracción de lípidos neutros de los tejidos de las hembras de *C. corteziensis*. Sin embargo, la concentración de 20:5 $n-3$  mostró una mayor variación estacional que el 22:6 $n-3$  (26.9 vs. 20.8%, respectivamente) a lo largo del ciclo reproductivo, lo que sugiere una mayor disponibilidad de 22:6 $n-3$  en comparación al 20:5 $n-3$  a lo largo del año, los cuales se ha demostrado provienen de la composición de ácidos grasos del fitoplancton (Soudant et al., 1996a; Delaunay et al., 2003), y como se discutirá más adelante.

En contraste, y a diferencia de lo que se observó en concentración, únicamente la proporción de 20:5 $n-3$  se correlacionó positivamente con la frecuencia de ovocitos postvitelogenicos ( $r= 0.69$ ,  $P<0.05$ ). Los valores máximos de 20:5 $n-3$  se observaron en primavera-verano, mientras que las principales disminuciones concuerdan con los desoves

y con la finalización del ciclo reproductivo. En contraste, la proporción de 22:6n-3 de la fracción de lípidos neutros fue mayor en enero de 2006 y la menor en noviembre de 2005. El incremento del 22:6n-3 concuerda con la finalización del ciclo reproductivo de las hembras de *C. corteziensis* y con el incremento general de las reservas energéticas (i.e. lípidos totales y carbohidratos, respectivamente). Estos a su vez concuerdan con el incremento en la concentración de clorofila a y carotenoides en los tejidos de los ostiones, sugiriendo mayor disponibilidad de alimento, probablemente relacionado con el florecimiento de fitoplancton de primavera. Estos resultados concuerdan con lo descrito para la almeja mano de león, *Nodipecten subnodosus*, en que se observó una mayor acumulación de 20:5n-3 de ambas fracciones (neutros y polares) en las gónadas, mientras que la proporción de 22:6n-3 se mantuvo relativamente constante (Palacios et al., 2005). Resultados similares a lo descrito con anterioridad se obtuvieron al comparar organismos diploides y triploides de *N. subnodosus*, aunque los últimos mostraron menor acumulación de 20:5n-3 de acuerdo con la esterilidad parcial de estos organismos por la poliploidia (Racotta et al., 2008). Sin embargo, ambos resultados contrastan con lo observado en *C. gigas*, en que las principales variaciones estacionales en relación el ciclo reproductivo se observaron para el 22:6n-3, mientras que 20:5n-3 se mantuvo constante, tanto en la gónada-tejido visceral (Dridi et al., 2007), como en la gónada-manto, glándula digestiva y músculo (Soudant et al., 1999). La estabilidad en los niveles de 22:6n-3 durante el ciclo reproductivo de hembras de *C. corteziensis* podría deberse a los altos valores de este ácido graso en los tejidos (22–28%, con una variación de 5.7%), valores similares a los reportados para *N. subnodosus* (20–30%) en un sitio de alta productividad primaria (Palacios et al., 2005). Es probable que la alta disponibilidad de 22:6n-3 en el medio

reduzca su papel como ácido graso limitante para la gametogénesis. En contraste, las mayores variaciones de  $20:5n-3$  (11 a 18%, con una variación de 15.7%) están correlacionadas con la proporción de ovocitos de postvitelogenicos, lo que confirma su importancia en la reproducción de *C. corteziensis*.

Por su parte, la proporción del  $20:5n-3$  de la fracción de lípidos polares mostró un patrón similar al encontrado en la fracción de lípidos neutros, pero los valores mínimos se alcanzaron dos meses antes (junio 2005) que en la fracción de lípidos neutros. Durante los meses de julio y septiembre se observó una segunda maduración y desove de los ostiones de *C. corteziensis*, respectivamente. La incorporación del  $20:5n-3$  en las membranas celulares y los desoves pueden explicar la disminución de la proporción del  $20:5n-3$  de ambas fracciones de lípidos. Se ha descrito que el  $20:5n-3$  puede ser utilizado como fuente de energía por los moluscos bivalvos durante la embriogénesis, sin embargo este ácido graso está ligado en su mayoría a funciones específicas reguladas por algunas clases de fosfolípidos en las membranas celulares (Soudant et al., 1996; Hall et al., 2002). La disminución en la proporción del  $20:5n-3$  de ambas fracciones de lípidos coincide con la disminución en concentración de la clorofila *a* y de carotenoides (ver anexo A), lo cual sugiere una menor disponibilidad de alimento en el verano. A pesar de ello se observó que no hubo efectos en la maduración de las hembras de *C. corteziensis*, ya que observó un número similar de ovocitos postvitelogenicos, lo cual probablemente represente el mismo desempeño reproductivo que se observó en la primavera. La proporción de  $22:6n-3$  de la fracción de lípidos polares mostró incrementos durante la primavera y valores mínimos durante el verano hasta inicios del invierno. Los incrementos en la proporción de este ácido graso parecen estar ligados a los florecimientos de fitoplancton de primavera y al

abatimiento de la disponibilidad de alimento durante el verano y el otoño (ver anexo A). Se ha reportado previamente la estabilidad en la proporción de 22:6 $n$ -3 en relación a la calidad del alimento en *P. maximus* (Soudant et al., 1996a) y durante un ciclo reproductivo de *N. subnodosus* (Palacios et al., 2005). Además del papel estructural que tiene el 22:6 $n$ -3 en las membranas celulares (Ackman y Kean-Howie, 1995), este ácido graso está más oxidado en comparación a ácidos grasos saturados de la misma longitud de cadena de carbonos, por lo que resulta un sustrato poco favorable para la generación de energía (Sargent et al., 1999).

La proporción del 20:4 $n$ -6 de la fracción de lípidos neutros mostró una relación inversa al 20:5 $n$ -3, con valores mínimos durante la primavera y máximos en el otoño, estos últimos concuerdan con el segundo desove de los ostiones y con las mayores temperaturas en Laguna de Ceuta (30°C). También se aprecian diferencias en la proporción del 20:4 $n$ -6 entre la primavera de 2005 y 2006. Las diferencias entre ambos años en la proporción del 20:4 $n$ -6 pueden estar ligadas a un estrés ambiental, ya que la temperatura fue menor durante el 2006 en aproximadamente 2°C con respecto a la media estacional del periodo 2002-2006 (ver anexo A). La variación estacional del 20:4 $n$ -6 (en ambas fracciones) se correlacionó positivamente con las variaciones en la temperatura (lípidos neutros y polares,  $r= 0.76$  y  $0.75$ , respectivamente,  $P<0.05$ ). Lo anterior coincide con lo observado en el ciclo reproductivo de *C. gigas*, en que la proporción del 20:4 $n$ -6 de lípidos totales fue mayor durante el verano y el otoño, cuando se registraron las mayores temperaturas (~25°C) (Dridi et al., 2007). La importancia de este ácido graso radica en que es el precursor de la síntesis de eicosanoides, particularmente las prostaglandinas de las serie II, PGE2 (Morse et al., 1977; Rowley et al., 2005). La síntesis de prostaglandinas está asociada a situaciones de estrés en peces (Koven et al., 2001; Bell y Sargent, 2003), así como en los procesos de

gametogénesis, vitelogénesis y liberación de gametos (desoves) de distintas especies de moluscos bivalvos (Ono et al., 1982; Matsutani y Nomura, 1987; Osada y Nomura, 1990; Martínez et al., 1996; 1999; 2000). El 20:4 $n-6$  se acumula preferencialmente fosfatidilinositol, por lo tanto es de esperarse que se encuentre en mayor cantidad en los lípidos polares, tal y como se ha observado en *C. gigas* (Soudant et al., 1999) y *N. subnodosus* (Palacios et al., 2005). Lo anterior concuerda con lo observado durante el ciclo reproductivo de las hembras de *C. corteziensis*, ya que se observó una mayor acumulación en la proporción de 20:4 $n-6$  en la fracción de lípidos polares en comparación a la fracción de lípidos neutros. Sin embargo, la concentración de 20:4 $n-6$  en la fracción de lípidos neutros (Tabla XXIII, anexo B) mostró un patrón inverso, ya que se observó el doble de cantidad en esta fracción en comparación a la polar (Tabla XXIV, anexo B). Esto podría deberse al papel de reserva de este ácido graso en acilglicéridos durante el ciclo reproductivo de las hembras de *C. corteziensis*, como se ha sugerido para *N. subnodosus* (Palacios et al., 2005; Racotta et al., 2008). Los acilglicéridos han mostrado ser un importante reservorio de ácidos grasos PUFA en el desarrollo larvario de *O. edulis* (Napolitano et al., 1988). Por otro lado, se ha propuesto que las prostaglandinas regulan también la respuesta inmune en *C. gigas*, dado que esta se modula por la cantidad de 20:4 $n-6$  presente en los tejidos (Delaporte et al., 2006b). El incremento del ácido graso 20:4 $n-6$ , particularmente en la fracción de lípidos polares, durante el segundo pico reproductivo de *C. corteziensis* pudiera estar relacionado con la actividad del sistema inmune, ya que durante esta parte del ciclo reproductivo se incrementa el número y la actividad de los hemocitos (Rodríguez-Jaramillo et al., 2008), los cuales se encargan de

fagocitar los ovocitos residuales que no fueron expulsados durante el desove (Bachère et al., 2004).

## B. EFECTO DE LA CALIDAD DE ALIMENTO EN LA ACUMULACIÓN Y UTILIZACIÓN DE RESEVAS

El incremento en la concentración de algunos pigmentos como la peridinina, carotenos y clorofila *a* están asociadas a florecimientos de dinoflagelados, mientras que la disminución de estos aunado al incremento de algunos otros carotenos como las fucoxantinas, las cuales marcan la finalización del florecimiento de dinoflagelados por el incremento y dominancia de diatomeas (Kwan Wong y Kim Wong, 2003). Aunado a lo anterior, Ibarguen-Zamudio (2006) describió la sucesión fitoplanctónica en Laguna Ceuta durante 2004–2005, en la cual encontró que el grupo de las diatomeas domina el sistema lagunar durante parte de la primavera, verano y parte del otoño (70% del total de las especies del fitoplancton); mientras que durante el invierno y parte de la primavera los dinoflagelados son dominantes (90% del total de las especies del fitoplancton). Lo anterior concuerda con las variaciones estacionales de los pigmentos analizados en Laguna de Ceuta y de los cuales se puede deducir que la maduración o producción de ovocitos postvitelogenicos concuerda con la mayor abundancia de diatomeas, mientras que la mayor frecuencia de hembras inmaduras en proceso de vitelogénesis temprana concuerda con una mayor abundancia de fitoplancton compuesto principalmente por dinoflagelados. Cabe mencionar que este incremento en la abundancia de fitoplancton durante el invierno de 2005 y primavera de 2006 fue un evento particular ocasionado por la disminución de la temperatura de aproximadamente 2°C durante este periodo. Esto se deduce del análisis de



la temperatura estacional promedio del periodo 2002–2006 y de la clorofila *a* estacional promedio del periodo 1997–2006 (ver anexo A).

Las especies dominantes de diatomeas en Laguna de Ceuta son: *Coscinodiscus* spp., *Skeletonema costatum*, *Pleurosigma* spp., *Leptocylindrus* spp. *Thalassionema nitzschioides*, *Chaetoceros* spp., *Paralia sulcata*, *Nitzschia* spp., y *Navicula* spp.; mientras que los dinoflagelados son: *Prorocentrum mexicanum*, *Prorocentrum micans*, *Gymnodinium catenatum*, *Alexandrium* sp., *Scrippsiella* sp., y *Polikrikos kofoidii* (Ibarguen-Zamudio, 2006). Laguna de Ceuta está considerada como un ambiente eutrófico, no contaminado y altamente diverso en cuanto especies de microalgas que compone el fitoplancton (74 géneros y 189 especies), de las cuales 6 géneros ocupan el 80% del total del fitoplancton: *Prorocentrum* (52.8%), *Scrippsiella* (11.1%), *Polykrikos* (5.6%), *Chattonella* (3.3%), *Pleurosigma* (2.8%), *Thalassiosira* (2.4%) y *Coscinodiscus* (2.0%) (Ibarguen-Zamudio, 2006). En un estudio preliminar (anexo C) en que se identificaron y cuantificaron las microalgas del tracto digestivo y conchas de los ostiones de *C. corteziensis* provenientes de Boca de Camichín, Nayarit; se encontró que el 88% de las especies pertenecen al grupo de las diatomeas, mientras que el resto de las microalgas al grupo de los dinoflagelados. Dentro de las especies de diatomeas las más comunes que se encontraron fueron los géneros: *Amphora* sp., *Navicula* sp., *Nitzschia* sp., y *Thalassiosira* sp. Mientras que dentro de las especies de dinoflagelados el género más abundante fue *Prorocentrum* sp.

La composición de los lípidos observadas en las hembras de *C. corteziensis* pudiera estar relacionada con la alta disponibilidad de fitoplancton en Laguna de Ceuta. Algunas especies de microalgas que componen el fitoplancton están compuestas principalmente por lípidos polares o estructurales (68–99%) (i.e. fosfolípidos, glucolípidos, clorofilas, etc.)

(Volkman et al., 1989). Sin embargo, en algunas especies de diatomeas (*Chaetoceros gracilis*) y dinoflagelados (*Gymnodinium* sp.) el contenido de triacilglicéridos puede alcanzar el 30% del total lípidos (Volkman et al., 1989; Mansour et al., 2003). El fitoplancton en Laguna de Ceuta está compuesto principalmente por diatomeas durante gran parte de año, excepto durante el invierno-primavera en que disminuyen e incrementan los dinoflagelados hasta ser el grupo de microalgas dominante (Ibarguen-Zamudio, 2006).

Se ha observado en trabajos previos con *Pecten maximus* (Soudant et al., 1996c), *C. virginica* (Trider y Castel, 1980) y *C. gigas* (Soudant et al., 1999) que los fosfolípidos se mantienen relativamente sin cambios e independientes de factores externos y nutricionales. Sin embargo, se ha observado en *P. maximus* que las proporciones relativas de las clases de lípidos pueden variar en función del sexo, con mayores porcentajes en machos de glicolípidos, PC y PE y menores porcentajes de PI, en comparación con hembras (Soudant et al., 1996c; 1997). Lo anterior refleja que los fosfolípidos realizan funciones estructurales específicas en los gametos de ambos sexos, probablemente determinado por la especificidad en la composición de ácidos grasos de las clases de lípidos (Soudant et al., 1997). Aunado a lo anterior, se ha observado que algunas fracciones de los fosfolípidos de las gónadas femeninas pueden ser transferidas a los lípidos almacenados en los huevos durante la maduración, posiblemente en forma de lipoproteínas (Lee y Heffernan, 1991).

Los esteroides libres son componentes estructurales de las membranas celulares (Nes, 1974), mientras que los esteroides esterificados son pequeñas reservas de esteroides que se considera son movilizados para formar parte de las membranas celulares (Pazos et al., 2003). En las hembras de *C. corteziensis* la mayoría de los esteroides se encontraron en forma libre, como se ha observado en otra especie de ostiones como en *C. gigas* (Matus de

la Parra et al., 2005) y *C. virginica* (Swift et al., 1980; Teshima et al., 1980). El estigmaesterol fue el único esterol que mostró un patrón inverso, mientras que el c-dehidrocolesterol y demosterol se encontraron proporciones iguales en ambas fracciones (i.e. libre y esterificada).

Los moluscos bivalvos poseen una nula o baja capacidad de biosíntesis de colesterol, incluso bio-conversión a partir de fito-esteroles (Voogt, 1975; Teshima y Patterson, 1981; Holden y Patterson, 1991; Kanazawa, 2001), por lo tanto, los esteroles son nutrientes esenciales que se almacenan a través del consumo de fitoplancton. Por otro lado, la composición de esteroles es específica y diferente entre distintas especies de microalgas que componen el fitoplancton (Marlowe et al., 1984). Por lo tanto es de esperarse que la composición de esteroles del fitoplancton se refleje en los tejidos de los moluscos bivalvos (Idler y Wiseman, 1972; Napolitano et al., 1993; Soudant et al. 1996a; 1998b).

El colesterol, el 24-metilcolesterol, fucoesterol, campesterol, isofucoesterol y brassicasterol son los esteroles más abundantes en las microalgas de la clase Coscinodiscophyceae (diatomeas), especies que son comúnmente utilizadas en la acuicultura, tales como *Chaetoceros* sp., *Skeletonema* sp. y *Thalassiosira* sp. (Yamaguchi et al., 1986; Tsitsa-Tzardis et al., 1993; Mohammady, 2004) (Tabla III). Mientras que en la clase Dinophyceae (dinoflagelados), particularmente en las especies del género *Prorocentrum* sp., el esterol mayoritario es el colesterol, además de que contienen dinosterol, es cual es un esterol particular de este grupo de microalgas (Yamaguchi et al., 1986; Volkman et al., 1999) (Tabla III).

Tabla III. Composición de esteroides (%) de algunas especies de diatomeas y dinoflagelados.

	Colesterol	Brassicasterol	Isofucosterol	Campesterol	24-metilcolesterol	b-sitosterol	Fucosterol	Desmosterol	Dinosterol
<b>Diatomeas</b>									
<i>Chaetoceros</i> spp.	47		3	3	7		37		
<i>Chaetoceros gracilis</i>	49		3		6		33		
<i>Skeletonema costatum</i>	71	12	1	3	8				
<i>Skeletonema costatum</i>	17.5				52.3	6.7		17.1	
<i>Skeletonema costatum</i>		18L 10E							
<i>Thalassiosira decipiens</i>	6.1			62.3		13.9			
<b>Dinoflagelados</b>									
<i>Prorocentrum micans</i>	28.8								14.5
<i>Prorocentrum micans</i>	29-44								14.5
<i>Prorocentrum mexicanum</i>	48								7.1

L=fracción libre; E= fracción esterificada. Las diatomeas y los dinoflagelados pertenecen a la clase Coscinodiscophyceae y los Dinophyceae, respectivamente.

La composición de esteroides en las hembras de *C. corteziensis* coincide con las observaciones realizadas por Ibarquén-Zamudio (2006) en que el mayor grupo de microalgas que componen el fitoplancton en Laguna de Ceuta son las diatomeas, ya que los esteroides más abundantes encontrados en los tejidos de ostiones son los que se encuentran en este grupo de microalgas (colesterol, brassicasterol, isofucosterol, campesterol, y demosterol), de los cuales los tres primeros fueron los más abundantes en relación al total de esteroides. Por otro lado, la fracción esterificada mostró un patrón similar a los cambios estacionales observados en la sucesión fitoplanctónica descrita Ibarquén-Zamudio (2006), ya que los valores mínimos de estos esteroides coincidieron con la disminución del grupo de diatomeas en el invierno. Por otro lado, Ibarquén-Zamudio (2006) describió que durante los meses de invierno las microalgas dominantes en Laguna de Ceuta son los dinoflagelados, los cuales contienen importantes cantidades de colesterol. Por lo tanto, es probable que el

incremento de colesterol esterificado en los tejidos de las hembras de ostión durante los meses de 2006 se haya debido a un florecimiento de fitoplancton compuesto en parte por dinoflagelados.

### C. ANALISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES

El análisis de componentes principales engloba de manera general como las variables ambientales, reproductivas, morfométricas y bioquímicas se correlacionan entre ellas, para de esta manera identificar las variables que están determinando la reproducción de las hembras de *C. corteziensis* en Laguna de Ceuta. La amplitud en la estacionalidad de la temperatura favoreció la acumulación de reservas energéticas, la cual ocurrió de manera independiente a los cambios estacionales de temperatura, ya que los ostiones de *C. corteziensis* acumularon importantes cantidades de reservas durante el invierno, y en menor magnitud durante la primavera-verano, cuando la temperatura se encontró aproximadamente en 20 y 30°C, respectivamente. Por otra parte, se observó (Fig. 31) que la temperatura mostró una relación inversa con la utilización de las reservas energéticas (i.e. glucógeno) durante la gametogénesis de las hembras de *C. corteziensis*, ya que éstas disminuyen durante la vitelogénesis y desoves mientras la temperatura incrementa. Esto mismo patrón se ha observado con el glucógeno durante la maduración y desoves de *C. gigas* y *C. virginica* (Chipman, 1948; Engle, 1951; Galtsoff, 1964; Deslous-Paoli y Héral, 1988, Ren et al., 2003; Matus de la Parra et al., 2005; Dridi et al., 2007). La acumulación y movilización de reservas en las hembras de *C. corteziensis* está positivamente correlacionado con la disponibilidad de fitoplancton (clorofila *a*) ( $r= 0.60$  para carbohidratos,  $P<0.05$ ), la cual es particularmente abundante durante los florecimientos de

primavera e invierno, mientras que durante el verano la disponibilidad de fitoplancton es menos abundante. Lo anterior concuerda con lo descrito para *C. gigas* y *C. virginica* en que la mayor acumulación de reservas energéticas, principalmente glucógeno se correlaciona positivamente con la mayor disponibilidad de alimento (clorofila *a*) (Chipman, 1948; Engle, 1951; Galtsoff, 1964; Deslous-Paoli y Héral, 1988; Ren et al., 2003; Matus de la Parra et al., 2005; Dridi et al., 2007). Aún así los ostiones de zonas templadas (i.e. *C. gigas* y *C. virginica*) acumulan reservas energéticas inmediatamente después del desove durante el verano hasta parte del invierno, así como del florecimiento de fitoplancton de primavera del siguiente año, es de notar que el desove en algunas poblaciones de ostiones no ocurra en la primavera, sino hasta el verano, cuando la temperatura ha alcanzado al menos los 20°C de temperatura. Por lo tanto, es de esperarse que de manera similar los ostiones en cautiverio durante el pre-acondicionamiento a baja temperatura y relativa abundancia de fitoplancton favorezca la acumulación de reservas (i.e. glucógeno) y con ello la estimulación de la proliferación celular por mitosis o gametogénesis (Samain et al., 2000; 2001; Fabioux et al., 2005). Sin embargo se ha descrito en poblaciones de *C. virginica* en E.U. que los ostiones dejan de acumular glucógeno durante los meses más fríos (Chipman, 1948), lo cual pudiera estar relacionado con los efectos de la temperatura en la capacidad de filtración y captura de fitoplancton por parte de los ostiones, ya que se ha observado que a baja temperatura menor es la tasa de bombeo de agua que pasa a través de las branquias de los ostiones, los cuales además producen mayor cantidad de pseudoheces (alimento no ingerido) (Loosanoff, 1958). Por el contrario, la tasa de bombeo incrementa de manera dependiente con el aumento de la temperatura hasta cierto límite, que en el caso de *C. virginica* fue de 34.1°C, ya que después de esta temperatura la tasa de bombeo disminuyó,

además de que los ostiones mostraron movimientos erráticos de las valvas (Loosanoff, 1958). En contraste, en este trabajo se encontró que los ostiones de *C. corteziensis* incrementan sus reservas energéticas a partir del invierno hasta la primavera, lo cual les permite madurar rápidamente y tener los primeros desoves a partir de la primavera hasta finales de otoño. Por otro lado, la frecuencia e intensidad de los desoves coincide normalmente con la mayor abundancia de fitoplancton (o clorofila *a*) (Matus de la Parra et al., 2005; Ren et al., 2003; Dridi et al., 2007), lo cual permite el crecimiento y supervivencia de los juveniles tras la eclosión de los huevos. La población de *C. corteziensis* en Laguna de Ceuta presenta ovocitos maduros durante gran parte del año, en el cual se identifican dos picos reproductivos, en verano y otoño. La primera maduración coincide con el florecimiento de fitoplancton de primavera (ver anexo A), mientras que la segunda maduración coincide con el pico de carotenoides en tejidos. De acuerdo con Kahru et al. (2000), los valores de clorofila *a* durante la primavera y verano ( $2.94$  y  $1.37$   $\text{mg m}^{-3}$ , respectivamente) en la boca de Laguna de Ceuta corresponden a condiciones eutróficas del medido (valores de clorofila  $>1$   $\text{mg m}^{-3}$ ), mientras que durante el otoño ( $0.93$   $\text{mg m}^{-3}$ ) corresponden a condiciones mesotróficas ( $>0.2 < 1$   $\text{mg m}^{-3}$ ). Por su parte, Ibarguen-Zamudio (2006) describe a Laguna de Ceuta en función del número de las especies de fitoplancton como un ambiente altamente diverso, no contaminado y utroficado, esto último a partir de la observación de especies particulares indicadoras (i.e. *Dyctiocha californica*) de ambientes de este tipo. Estos resultados sugieren que la alta capacidad reproductiva de *C. corteziensis* está sustentada, y probablemente controlada, por las variaciones en la abundancia de fitoplancton de Laguna de Ceuta.

La disponibilidad en la abundancia de fitoplancton en Laguna de Ceuta se reflejó en las reservas energéticas en general, las cuales no se almacenan de manera previa a la gametogenesis, sino que estas incrementan a la par con los estados más avanzados de maduración de las hembras de *C. corteziensis*. Por ende, esta especie presenta características de oportunista (Barber y Blake, 1991), ya que aprovecha la disponibilidad de fitoplancton durante el ciclo reproductivo. Esto se reflejó en ACP (Fig. 31), en que la mayoría de las reservas energéticas (i.e. carbohidratos, lípidos totales, esteroides esterificados y ácidos grasos de la fracción de lípidos neutros; excepto proteínas) se correlacionaron positivamente con la proporción de ovocitos postvitelogenicos, y en menor medida con la biomasa, lo cual sugiere que las variaciones observadas en el peso de tejido húmedo están correlacionadas con los cambios en el contenido de reservas energéticas. Las variaciones estacionales en la biomasa pudieran deberse al contenido de humedad, sin embargo se observó una correlación inversa entre ambas variables, lo que sugiere que las variaciones estacionales de la biomasa se deben al contenido de materia seca, así como a cambios en la composición bioquímica de los tejidos de las hembras. Lo anterior se ha observado durante el ciclo reproductivo de *C. gigas* (Deslous-Paoli y Héral, 1988; Ren et al., 2003).

Dentro de las reservas más importantes que parecen estar contralando la reproducción de *C. corteziensis* están los ácidos grasos de la fracción de lípidos neutros, en particular el 20:5 $n$ -3 y en menor medida el 22:6 $n$ -3. Lo anterior contrasta con lo observado en *C. gigas*, en que las principales variaciones estacionales durante el ciclo reproductivo de este ostión están relacionadas con el 22:6 $n$ -3 (Soudant et al., 1999; Dridi et la., 2007). Los ácidos grasos 14:0 y 20:5 $n$ -3 son particularmente abundantes en el grupo de las diatomeas



(Volkman et al., 1989; Cohen et al., 1995; Renaud et al., 1999; Pratoomyot et al., 2005, Patil et al., 2007), las cuales a su vez son el grupo dominante del fitoplancton en Laguna de Ceuta durante gran parte del año, excepto durante el invierno, cuando disminuyen y los dinoflagelados se vuelven el grupo dominante del fitoplancton (Ibarguen-Zamudio, 2006). Así, se sugiere que las diatomeas, y en particular su composición de ácidos grasos, esté favoreciendo la maduración de las hembras de *C. corteziensis*.

Por otro lado, el incremento del ácido graso 18:4 $n$ -3 en los tejidos de los ostiones durante el invierno, es particularmente abundante en algunas especies de dinoflagelados (Cohen et al., 1995; Mansour et al., 1999). Este ácido graso se correlacionó positivamente con la clorofila *a* y la concentración de carotenoides ( $r= 0.76$  y  $0.76$ , respectivamente,  $P<0.05$ ). El incremento significativo de los pigmentos durante el invierno concuerda con las observaciones de Ibarguen-Zamudio (2006), por lo que es probable que el florecimiento de fitoplancton observado durante el invierno de 2005–2006 haya estado compuesto en parte por dinoflagelados.

Por otro lado, los ácidos grasos 18:2 $n$ -6 y 18:3 $n$ -3, precursores de los HUFA (20:4 $n$ -6, 20:5 $n$ -3 y 22:6 $n$ -3), no mostraron correlación con las variables reproductivas. Lo anterior confirma el poco valor nutricional de estos ácidos grasos, debido a la limitada capacidad de elongación e insaturación de estos ácidos grasos a HUFA en ostiones (Chu y Greaves, 1991).

La síntesis *de novo* de algunos ácidos grasos, como los no interrumpidos por un grupo metilen (NMID, por sus siglas en inglés) (22:2i y 22:2j) están relacionados con la disminución de los ácidos grasos altamente insaturados, particularmente durante los procesos de reproducción en moluscos bivalvos (Soudant et al., 1999; Ojea et al., 2004;

Palacios et al., 2005; Dridi et al., 2007). Los ácidos grasos 22:2i y 22:2j se correlacionaron de manera inversa con la proporción de ovocitos postvitelogenicos y con la acumulación general de reservas, lo que sugiere que estos aumentaron durante el invierno, lo cual concuerda con la disminución significativa de 20:5n-3 y 22:6n-3.

El ácido graso 20:4n-6 de ambas fracciones de lípidos (neutros y polares) incrementó en el segundo pico reproductivo de los ostiones, durante mayor incremento de la temperatura en el otoño. Por otro lado, en la figura del ACP se observó que la temperatura se correlacionó con los ácidos grasos 16:0, 18:0 y 20:4n-6, los cuales son abundantes en los lípidos polares, específicamente en el fosfatidilinositol (Soudant et al. 1996c). Este resultado sugiere que la acumulación de estos ácidos grasos está relacionado con el estrés ambiental y probablemente con la activación del sistema inmune de *C. corteziensis*, tal y como se discutió previamente.

## 1.8 Conclusiones

- Los ostiones *C. corteziensis* presentan ovocitos maduros la mayor parte **del año muestreado**, con la mayor proporción de hembras en desove en Noviembre, pero con hembras en desoves mas completos en Junio y Septiembre, así como un periodo muy corto de reposo sexual en el invierno. Lo anterior probablemente favorecido por la amplitud de la variación estacional de **temperatura** y la alta disponibilidad de alimento en Laguna de Ceuta.
- La amplitud del ciclo reproductivo de *C. corteziensis* sugieren que esta especie puede **madurarse en cautiverio durante gran parte el año**.
- Los carbohidratos y lípidos disminuyeron en los periodos del desove e incrementaron durante el reposo sexual y se mantuvieron altos durante la vitelogenesis.
- El 20:5n-3, a diferencia del 22:6n-3, fue el ácido graso que mostró mayores variaciones estacionales en relación al estadio de maduración de hembras de *C. corteziensis*. Esto indica que en cautiverio, a niveles altos de 22:6n-3, el **20:5n-3 podría ser determinante para la maduración gonádica**. Asimismo, los altos niveles de 20:5n-3 en lípidos neutros, así como del colesterol y en menor grado el campesterol, sugieren que las **diatomeas son el principal grupo que favorece la maduración** de *C. corteziensis*.

## **2. SEGUNDO CAPÍTULO**

Alimentación con tres dietas monoalgales y tres mixtas

## 2.1 Diseño experimental

Los organismos utilizados en este experimento provenían de dos poblaciones de Nayarit, Boca de Camichín y Cuautla, colectados en las mismas fechas. Los ostiones fueron colocados en un estanque de 1000 L para su aclimatación a las condiciones de laboratorio por 22 días a 24°C, durante los cuales el alimento fue proporcionado en una exhibición con el recambio de agua con una ración diaria de 35% *Chaetoceros gracilis*, 35% *Chaetoceros calcitrans*, 25% *Pavlova lutheri* y 5% *Dunaliella tertiolecta* a una densidad celular de  $2 \times 10^9$  células  $\times$  ostión  $\times$  día (dieta mixta aclimatación, Mx-Ac).

Trascurrido el tiempo de aclimatación, los ostiones fueron colocados en acuarios de 20 L (8 ostiones en cada réplica, tres réplicas por dieta) para iniciar el periodo de maduración, durante el cual fueron alimentados por un sistema de goteo (Ramirez et al., 1999) (Fig. 32) con tres dietas mono algales:

Cg = 100% *C. gracilis*

Pl = 100% *P. lutheri*

Cc = 100% *C. calcitrans*

Y tres dietas mixtas (Fig. 33):

CC+Pl = 50% *P. lutheri* + 50% *C. calcitrans*

Mx-Ac = 35% *C. gracilis* + 25% *P. lutheri* + 35% *C. calcitrans* + 5% *D. tertiolecta*

Mx-2 = 45% *C. gracilis* + 20% *P. lutheri* + 20% *C. calcitrans* + 10% *D. tertiolecta*  
+ 5% *I. galbana* (T-ISO) Mx-2).

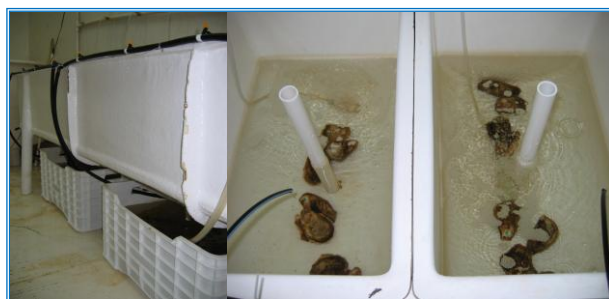


Fig. 32 Sistemas de alimentación por goteo utilizados en la maduración de reproductores de *C. corteziensis*.

La temperatura se incrementó  $1^{\circ}\text{C} \times \text{día}$  hasta los  $27\text{--}28^{\circ}\text{C}$ . La ración de microalgas se incrementó a  $3 \times 10^9$  células  $\times$  ostión  $\times$  día, un incremento del 50% de la ración inicial. Todas las microalgas fueron cosechadas en el tercer día de cultivo. La composición bioquímica general se muestra en la Tabla IV, mientras que la composición de esteroides, ácidos grasos, pigmentos y aminoácidos se describe en el anexo D. El fotoperiodo fue de 12:12 de luz: oscuridad y el tiempo de acondicionamiento fue de cinco semanas, después de las tres semanas de aclimatación.

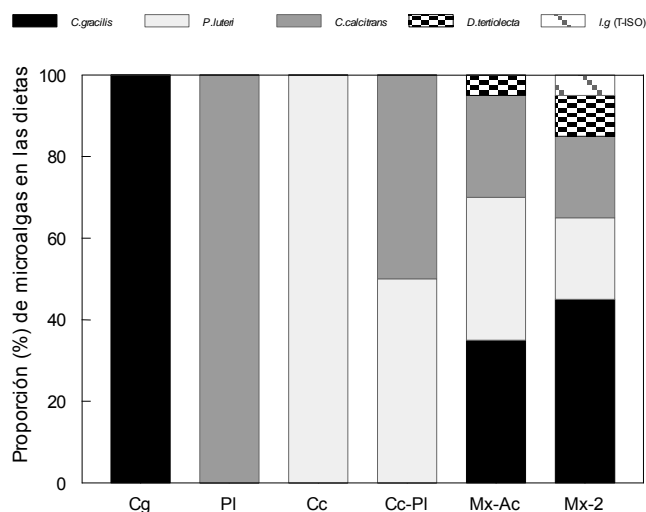


Fig. 33 Dietas monoalgales y mixtas utilizadas la maduración de *C. corteziensis*. Cg=*Chaetoceros gracilis*; Pl=*Pavlova lutheri*; Cc=*Chaetoceros calcitrans*, Cc-Pl=*Chaetoceros gracilis* + *Pavlova lutheri*, Mx-Ac=*C. gracilis* + *P. lutheri* + *C. calcitrans* + *D. tertiolecta*; Mx-2= Mx-Ac + *I. galbana* (T-ISO).

Tabla IV. Composición bioquímica general (% de la materia orgánica total), y proporción de HUFA (% del total de ácidos grasos) y colesterol (% del total de esteroides) de las microalgas cosechadas en el tercer día de cultivo y que fueron utilizadas para la maduración de *C. corteziensis*.

	<i>C. gracilis</i>	<i>C. calcitrans</i>	<i>P. lutheri</i>	<i>I. galbana</i> T-ISO	<i>D. tertiolecta</i>
Proteínas	59.2	37.7	35.5	73.1	64.9
Carbohidratos	21.7	4.8	14.0	4.8	7.4
Lípidos totales	19.1	57.5	50.5	22.1	27.6
HUFA					
20:4 $n$ -6	4.97	8.55	0.18	0.22	N.D.
20:5 $n$ -3	12.01	18.24	31.87	1.08	N.D.
22:6 $n$ -3	1.15	1.86	16.30	28.11	N.D.
Colesterol	86.50	74.45	7.70	1.06	N.D.

N.D.=no detectado

Al final del acondicionamiento los ostiones de dos replicas se indujeron al desove por medio de cambios de temperatura. A los desoves obtenidos se siguió su desarrollo hasta larvas D.

## 2.2 Análisis estadísticos

Los resultados fueron analizados usando análisis de varianza unifactorial (ANOVA), utilizando como variable independiente la dieta (6 niveles) y como dependientes la supervivencia, las variables morfométricas (largo, ancho, peso total y biomasa) y composición bioquímica (proteínas, carbohidratos y lípidos totales). En caso de diferencias significativas, se realizaron pruebas *post hoc* de Tukey para establecer las diferencias entre las medias de las distintas dietas. Los datos de peso total, longitud y ancho de la concha (inicial y final) se compararon por análisis paramétricos de t-student con  $P=0.05$ . El área de cobertura gonadal (ACG) y la supervivencia se analizaron con una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y una prueba de comparaciones múltiple no paramétrica de Tukey. Todos los resultados están expresados como media  $\pm$  error estándar.

Todos los análisis se hicieron con un nivel de significancia del 95% ( $\alpha=0.05$ ) usando el programa Statistica<sup>TM</sup> v. 5.5 (StatSoft, Tulsa, OK, EUA).



## 2.3 Resultados

### 2.3.1 Supervivencia y morfometría

No se observaron diferencias significativas ( $P=0.24$ ) en la supervivencia de los ostiones en relación a la dieta (Fig. 34).

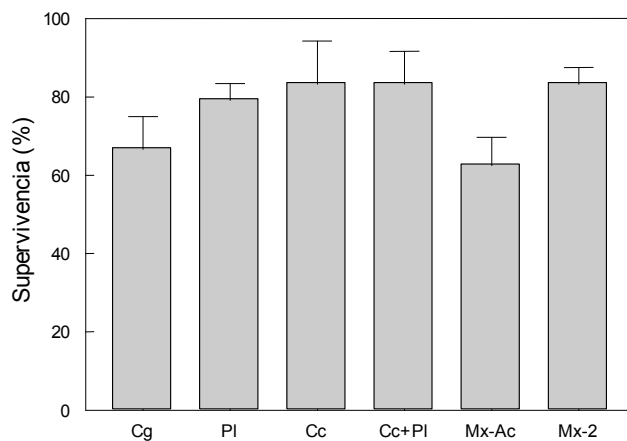


Fig. 34 Supervivencia (%) de los ostiones *C. corteziensis* alimentados durante la maduración con distintas dietas mono-algales y mixtas. Cg=*C. gracilis*; Pl= *P. lutheri*; Cc= *C. calcitrans*, Cc+Pl= *C. calcitrans* + *P. lutheri*, Mx-Ac= *C. gracilis* + *P. lutheri* + *C. calcitrans* + *D. tertiolecta*; Mx-2= Mx-Ac + *I. galbana* (T-ISO). Los resultados están expresados en media  $\pm$  error estándar y fueron analizados por ANOVA unifactorial (dieta),  $P<0.05$ .

Al inicio del experimento los ostiones se distribuyeron en los acuarios de tal manera que la talla promedio del peso total, longitud y ancho de las conchas de los ostiones entre las dietas fuera la misma, como se aprecia en la Tabla V. Al término del acondicionamiento reproductivo se observó una ganancia significativa en el peso total con las dietas Cg, Cc y Cc-Pl ( $9.7\pm 0.9$ ,  $9.4\pm 0.7$  y  $9.1\pm 0.7\%$ , respectivamente) y el valor mínimo se encontró en la dieta Pl ( $6.7\pm 0.4\%$ ) (Tabla V).

Tabla V. Morfometría y supervivencia (%) de los ostiones *C. corteziensis* alimentados durante la maduración con distintas dietas de mono-algales y mixtas.

		Dietas						P
		Cg	Pl	Cc	Cc+Pl	Mx-Ac	Mx-2	
Inicial	Peso total (g)	49.7±3.3	50.0±2.2	51.9±2.1	55.1±2.3	52.9±2.1	54.8±3.5	0.758
	Longitud (cm)	7.4±0.3	7.2±0.2	7.7±0.2	7.8±0.2	7.8±0.1	8.0±0.2	0.283
	Ancho (cm)	4.8±0.2	4.8±0.1	4.9±0.2	4.9±0.1	4.7±0.2	4.9±0.2	0.935
Final	Peso total (g)	54.3±3.6	53.3±2.3	57.4±2.4	59.4±2.4	56.6±2.0	59.4±3.6	0.514
	Longitud (cm)	7.5±0.3	7.3±0.2	7.8±0.2	7.9±0.2	7.9±0.1	8.0±0.1	0.169
	Ancho (cm)	4.8±0.2	4.8±0.1	4.8±0.2	4.8±0.1	4.7±0.2	4.8±0.2	0.963
	Ganancia de peso total (%)	9.7±0.9a	6.7±0.4b	9.4±0.7a	9.1±0.7a	8.0±0.8ab	7.8±0.7ab	<b>0.027</b>

Los resultados están expresados en media ± error estándar, los cuales fueron analizados por ANOVA unifactorial (Dieta),  $P < 0.05$ . Las medias se compararon por análisis de Tukey, las letras indican las diferencias significativas. La supervivencia se analizó con ANOVA no paramétrico de Kruskal-Wallis y una prueba de comparaciones múltiple no paramétrica de Tukey. Los datos de peso total, longitud y ancho de la concha y ganancia de peso se compararon por ANOVA unifactorial (inicial vs. final),  $P < 0.05$ . Las medias se compararon por análisis de Tukey, las letras indican las diferencias significativas. Cg=*C. gracilis*; Pl=*P. lutheri*; Cc=*C. calcitrans*, Cc+Pl=*C. calcitrans* + *P. lutheri*, Mx-Ac=*C. gracilis* + *P. lutheri* + *C. calcitrans* + *D. tertiolecta*; Mx-2=*Mx-Ac* + *I. galbana* (T-ISO).

Se observaron diferencias significativas en el peso de la biomasa en relación a la dieta (Fig. 35), con valores más altos en la dieta bi-algal Cc-Pl y mixta Mx-Ac ( $11.0 \pm 0.7$  y  $11.02 \pm 0.8$ , respectivamente), mientras que los menores valores se obtuvieron para la dieta mono-algal Cg ( $7.8 \pm 0.3$  g).

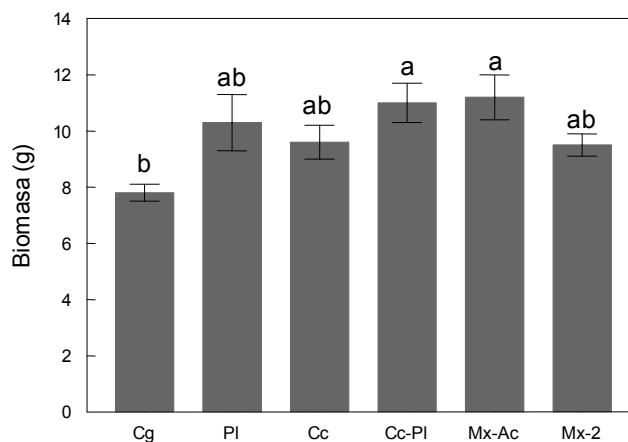


Fig. 35 Biomasa (g) de los ostiones *C. corteziensis* alimentados durante la maduración con distintas dietas mono-algales y mixtas. Cg=*Chaetoceros gracilis*; Pl=*Pavlova lutheri*; Cc=*Chaetoceros calcitrans*, Cc-Pl=*Chaetoceros gracilis* + *Pavlova lutheri*, Mx-Ac=*C. gracilis* + *P. lutheri* + *C. calcitrans* + *D. tertiolecta*; Mx-2=*Mx-Ac* + *I. galbana* (T-ISO). Los resultados están expresados en media ± error estándar y fueron analizados por ANOVA unifactorial (dieta),  $P < 0.05$ . Las medias se compararon por análisis de Tukey, las letras indican diferencias significativas. Número de datos ( $n$ ) en las dietas (6, 7, 10, 8, 7 y 8, respectivamente).

El peso total, longitud y ancho de las conchas de los ostiones no fueron diferentes entre las dietas al término del acondicionamiento (Tabla V).

### 2.3.2 Área de cobertura gonadal (ACG)

Las dietas mono-algales y mixtas afectaron de manera diferencial el crecimiento de la gónada de hembras y machos (Fig. 36). Se encontraron diferencias significativas en el ACG entre las hembras en relación a la dieta, la cual fue significativamente ( $P<0.05$ ) mayor en las alimentadas con Cg. Mientras que con el resto de las dietas, y en contraste con lo que se observa en machos, las hembras mostraron valores similares a los iniciales. En machos no fue posible hacer una comparación estadística por el número limitado de organismos, sin embargo se observó valores mayores en los alimentados con la dieta de Cg. Tanto en hembras y machos alimentados con PI se observó una disminución del ACG. (Fig. 36).

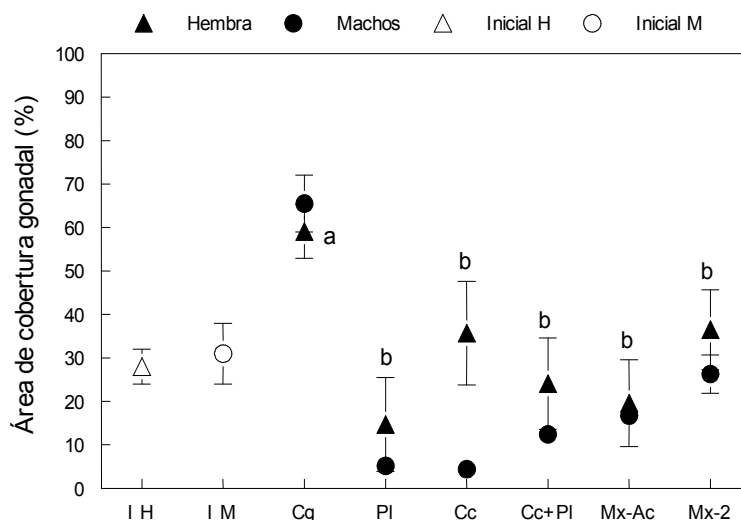


Fig. 36 Área de cobertura gonádica (%) (ACG) de hembras y machos de *C. corteziensis* alimentados durante la maduración con distintas dietas mono-algales y mixtas. Cg=*Chaetoceros gracilis*; PI= *Pavlova lutheri*; Cc= *Chaetoceros calcitrans*, Bi-A= *Chaetoceros gracilis* + *Pavlova lutheri*, Mx-Ac= *C. gracilis* + *P. lutheri* + *C. calcitrans* + *D. tertiolecta*; Mx-2= Mx-Ac + *I. galbana* (T-ISO). Los resultados están expresados en media  $\pm$  error estándar. Ver Fig. 35 para análisis estadísticos. Número de datos (n) IH= 10, IM=5, hembras en las dietas (3, 2, 3, 2, 2 y 3) y machos (2, 3, 1, 2, 1 y 2).

### 2.3.3 Frecuencia de estadios de maduración en hembras y machos

Se encontró un mayor número de hembras (2 de 3) en vitelogénesis en los ostiones alimentados con la dieta Mx-2, mientras que con la dieta de PI se observó una hembra en desove parcial, otra en vitelogénico y otra inmadura. (Fig. 37A). No se observaron hembras en vitelogénesis con la dieta Mix-Ac. En machos, el mayor número de organismos maduros se encontraron con las dietas Cg y Mx-2, mientras que con las dietas PI y Cc se encontraron 1 y 3 organismos desovados, respectivamente (Fig. 37B). La frecuencia de estadios se realizó con los cortes histológicos (Fig. 38) y los estadios de maduración propuestos por Rodríguez-Jaramillo et al. (2008).

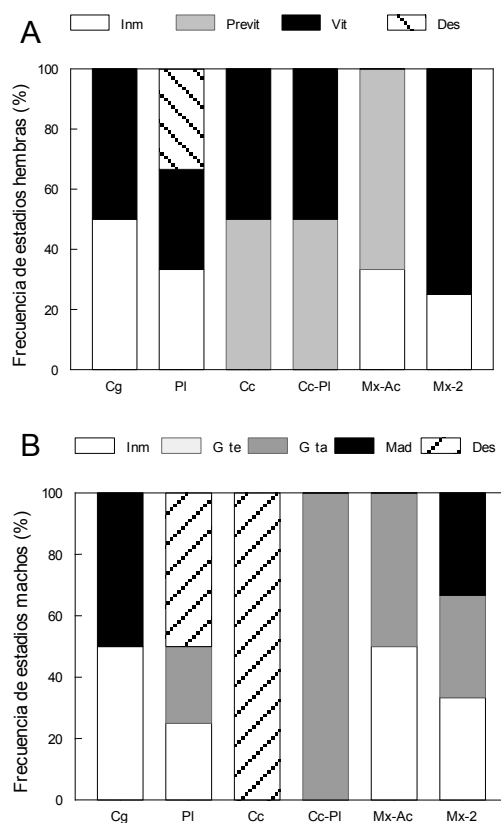


Fig. 37 Frecuencia de estadios de madurez en hembras (A) y machos (B) de *C. corteziensis* alimentados durante la maduración con distintas dietas mono-algales y mixtas. Cg=*Chaetoceros gracilis*; PI= *Pavlova lutheri*; Cc= *Chaetoceros calcitrans*, Cc-PI= *Chaetoceros gracilis* + *Pavlova lutheri*, Mx-Ac= *C. gracilis* + *P. lutheri* + *C. calcitrans* + *D. tertiolecta*; Mx-2= Mx-Ac + *I. galbana* (T-ISO)

Se observó un mayor desarrollo de las gónadas con las dietas Cg, Cc y Mx-2, y menor con las dietas CC-Pl y Mx-Ac, así como desoves parciales en la dieta Pl (Fig. 38).

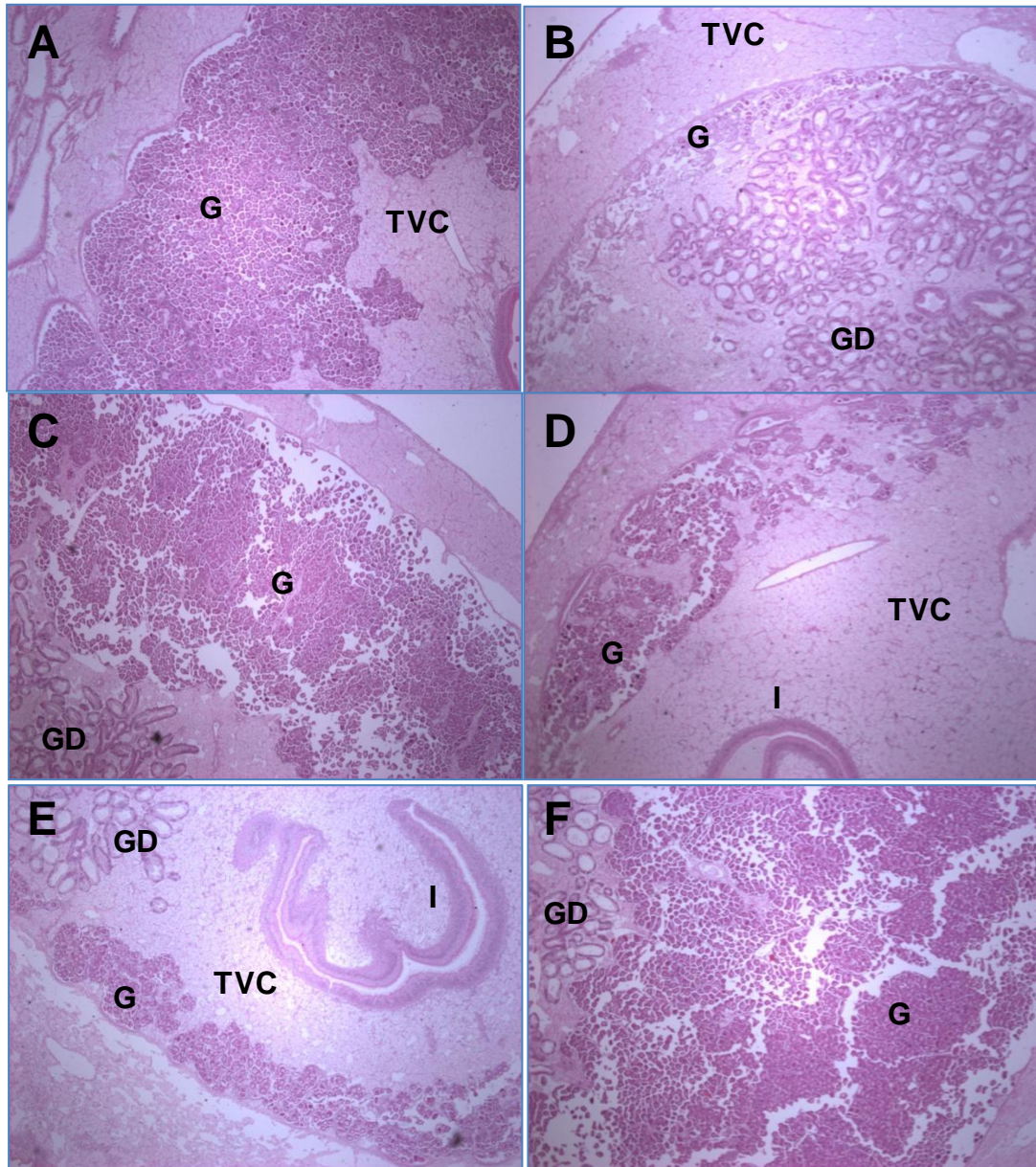


Fig. 38 Cortes histológicos (4×) de hembras de *C. corteziensis* alimentadas durante la maduración con distintas dietas mono-algales y mixtas. Cg=*Chaetoceros gracilis* (A); Pl=*Pavlova lutheri* (B); Cc= *Chaetoceros calcitrans* (C), Cc-Pl= *Chaetoceros gracilis* + *Pavlova lutheri* (D), Mx-Ac= *C. gracilis* + *P. lutheri* + *C. calcitrans* + *D. tertiolecta* (E); Mx-2= Mx-Ac + *I. galbana* (T-ISO) (F). G= gonada, GD= glándula digestiva, I= intestino.

### 2.3.4 Frecuencia de ovocitos

No se observaron diferencias significativas en el número de ovocitos postvitelogénicos entre las dietas. Solo se observaron ovocitos atrésicos en una hembra alimentada con PI, la cual desovó parcialmente (Fig. 39).

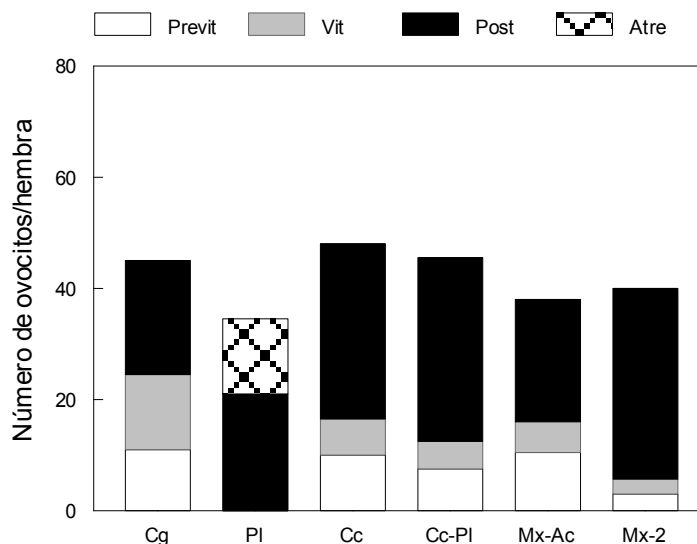


Fig. 39 Frecuencia de ovocitos por hembra de *C. corteziensis* alimentadas durante la maduración con distintas dietas mono-algales y mixtas. Cg=*Chaetoceros gracilis*; PI=*Pavlova lutheri*; Cc=*Chaetoceros calcitrans*, Cc-PI= *Chaetoceros gracilis* + *Pavlova lutheri*, Mx-Ac= *C. gracilis* + *P. lutheri* + *C. calcitrans* + *D. tertiolecta*; Mx-2= Mx-Ac + *I. galbana* (T-ISO).

### 2.3.5 Desempeño reproductivo

Los ostiones alimentados con las dietas monoalgales y mixtas desovarón, y la mayor cantidad de larvas en estadio “D” se obtuvieron de las hembras alimentadas con las dietas monoalgales Cc, Cg y Mx-2, mientras que para las dietas Bi-A se obtuvieron valores menores de larvas. No se obtuvieron desoves de los ostiones acondicionados con la monoalgal PI (Tabla VI).

Tabla VI. Desempeño reproductivo de las hembras desovadas.

Dieta	Producción de larvas D/hembra
<b>Cg</b>	2,352,000
<b>Pl</b>	No se cuantificó
<b>Cc</b>	3,024,000
<b>Cc+Pl</b>	896,000
<b>Mx-Ac</b>	952,000
<b>Mx-2</b>	3,080,000

Cg=*Chaetoceros gracilis*; Pl=*Pavlova lutheri*; Cc=*Chaetoceros calcitrans*, Cc+Pl=*Chaetoceros gracilis* + *Pavlova lutheri*, Mx-Ac= *C. gracilis* + *P. lutheri* + *C. calcitrans* + *D. tertiolecta*; Mx-2= Mx-Ac + *I. galbana* (T-ISO).

#### 2.4 Composición bioquímica en tejidos

La concentración de carotenoides fue mayor para dieta Cc+Pl ( $9.4 \pm 1.2$ ,  $P < 0.05$ ) y menor para las dietas Pl y Mx-2 ( $1.5 \pm 0.5$  y  $2.6 \pm 0.9$ , respectivamente). No se observaron diferencias significativas para la concentración de proteínas, carbohidratos y lípidos totales entre las seis dietas (Tabla VII).

Tabla VII. Concentración de proteínas, carbohidratos, lípidos totales ( $\text{mg g}^{-1}$  peso seco) y carotenoides ( $\mu\text{g g}^{-1}$  peso húmedo) de los ostiones *C. corteziensis* alimentados durante la maduración con distintas dietas mono-algales y mixtas.

	Dietas						P
	Cg	Pl	Cc	Cc-Pl	Mx-Ac	Mx-2	
Proteínas	601±40	589±63	528±35	612±51	534±57	557±46	0.786
Carbohidratos	277±35	294±34	265±22	324±40	287±34	320±34	0.750
Lípidos	104±13	111±5	106±13	102±8	106±8	107±6	0.995
Carotenoides	6.3±1.7ab	1.5±0.5b	8.9±3.3a	9.1±1.4a	3.0±1.0b	2.4±1.0b	<b>0.020</b>

Los resultados están expresados en media  $\pm$  error estándar. Ver Fig. 35 para análisis estadísticos. Número ( $n$ ) de datos para proteínas en cada dieta= 4, 7 8, 7, 7 y 8. Para carbohidratos, lípidos totales y carotenoides= 6, 7 9, 7, 7 y 8.

## 2.5 Discusión

Las especies de microalgas utilizadas en el acondicionamiento reproductivo de *C. corteziensis* fueron seleccionadas debido: 1) a la presencia de microalgas similares en el tracto digestivo de ostiones silvestres (anexo C) y 2) a su uso en la acuicultura de moluscos bivalvos (Brown, 2002). La gran variedad de especies de microalgas identificadas en los tractos digestivos y conchas de los ostiones, así como muchas otras especies de microalgas que se han identificado como parte de la comunidad fitoplactónica de otras lagunas (i.e. Ceuta) y esteros donde habita *C. corteziensis*, invita a proponer su producción en condiciones de laboratorio para probarlas como alimento de ostiones en cautiverio. Al menos 24 especies (e.g. *Thalassiosira* sp., *Nitzchia* sp., *Navicula* sp., etc.) se encuentran tanto en ceparios de centros de investigación en México, como en ceparios comerciales (The Provasoli-Guillard National Center for Culture of Marine Phytoplankton). Incluso para *C. gigas*, la especie más cultivada de ostión en el mundo y para la que se pudiera considerar que se conocen muchos aspectos de su nutrición que han permitido controlar su reproducción en cautiverio, continuamente se están identificando nuevas especies de fitoplancton para evaluar el crecimiento de larvas (Ponis et al., 2006) y juveniles (Brown et al., 1998; Knuckey et al., 2002). Actualmente también se ha podido identificar algunas cepas de microalgas tropicales para alimentar especies de moluscos tropicales como larvas de *P. margaritifera* (Martínez-Fernández et al., 2004; 2006).

Hasta ahora, no se había intentado alimentar y madurar a *C. corteziensis* en cautiverio, principalmente porque se desconocen varios aspectos biológicos y fisiológicos de la especie, entre ellos la capacidad de filtración de fitoplancton, capacidad de digestión y de asimilación de nutrientes, requerimientos nutricionales (cuantitativos y cualitativos),



temperatura de acondicionamiento, etc. En relación a la calidad del alimento, se seleccionaron las diatomeas *C. gracilis* y *C. calcitrans* para evaluar su efecto como dieta monoalgal sobre la maduración dado que fueron identificadas como parte del fitoplancton del alimento natural en lagunas y estuarios donde se distribuye *C. corteziensis*. Mientras que *P. lutheri* por su composición bioquímica, aunque presenta algunos problemas en su cultivo cuando alcanza altas densidades celulares (Ramírez, J.L. comunicación personal). Las especies de microalgas seleccionadas se cultivan rutinariamente en el laboratorio de selección de semilla del CIBNOR. Se usaron mezclas de microalgas dado que se consideró que los nutrientes de especies distintas se podrían complementar.

En relación a la cantidad de alimento, una aproximación para determinar la cantidad de alimento necesaria por ostión, es calcular la cantidad de clorofila *a* disponible en las lagunas costeras donde habita *C. corteziensis*, para posteriormente calcular la biomasa fitoplanctónica en términos del peso seco de los ostiones, tal y como se realizó para *C. gigas* (Enríquez-Díaz, 2004). Sin embargo, en el presente estudio se consideraron los antecedentes existentes para otras especies de ostiones en los cuales ya se ha implementado el cultivo y la maduración. Así, en relación a cantidad de alimento, el intervalo que se ha descrito para la maduración de otras especies de ostiones es muy amplio, desde valores relativamente altos en *C. gigas* ( $10 \times 10^9$  células  $\times$  ostión  $\times$  día) (Chavez-Villalba et al., 2003a; 2003b), hasta valores de  $1.74 \times 10^9$  células  $\times$  ostión  $\times$  día en la maduración *C. angulata* en Portugal (Massapina et al., 1995). En el presente trabajo se utilizó la cantidad de alimento de  $3 \times 10^9$  células  $\times$  ostión  $\times$  día para la maduración de *C. corteziensis*, con la cual se obtuvieron supervivencias mayores al 70% e incremento de la biomasa y el peso total final de los ostiones. Sin embargo, aun hacen falta estudios para identificar la cantidad

de alimento óptima y las especies de microalgas adecuadas para la maduración de *C. corteziensis*.

En relación a la maduración, se observó que los valores más altos en el ACG se obtuvieron con las dietas monoalgales, particularmente con la dieta Cg tanto en hembras como en machos, aunque con estos últimos no fue posible hacer una comparación estadística. En contraste, en las otras dietas monoalgales se observó un ACG menor al de que se obtuvo con Cg y similar al inicial (Fig. 36). Sin embargo, al evaluar el estadio de maduración por histología, se observó que una hembra alimentada con Pl presentó un desove parcial y un macho alimentado con Pl y los tres machos analizados alimentados con Cc presentaron desoves (Fig. 37). Como consecuencia, en el caso de hembras alimentadas con Pl y machos alimentados con Pl y Cc, los valores menores de ACG pueden ser resultado de gónadas desovadas o parcialmente desovadas. Sin embargo, en las hembras alimentadas con Cg se observaron gónadas con un grado de desarrollo más uniforme (Fig. 38) y con un gran número de ovocitos postvitelogénicos, similares a las observadas en el ciclo reproductivo de *C. corteziensis* descrito en el primer capítulo. En contraste, por el análisis histológico se observa que el desove de Pl en hembras fue parcial y similar a lo que se observa en moluscos sometidos a estrés (Fig. 38). Las dietas mixtas (Cc+Pl y Mx-2) solo favorecieron el desarrollo de hembras, mientras que con la dieta de aclimatación (Mx-Ac) el desarrollo de las gónadas se mantuvo similar al inicial durante el tiempo de experimentación. Como consecuencia, la dieta de Pl aparentemente favoreció una maduración más rápida pero de menor intensidad, en relación a la cantidad de ovocitos reclutados y desovados. Por otro lado la dieta de Cg favoreció una maduración más

uniforme de la gónada con mayor reclutamiento en el número de ovocitos totales, similar a lo que ocurre en condiciones naturales.

A partir de los resultados de los desoves, se observó que las diatomeas (Cg, Cc y Mx-2 con 65% de las primeras dos especies) favorecen el desempeño reproductivo de *C. corteziensis*. Es necesario especificar que los desoves parciales previos con la dieta Pl haya evitado el observar hembras desovadas al momento de la inducción, y en consecuencia la obtención de larvas. Este efecto fue contrareestado en la dieta de Pl con cantidades iguales de Cc, ya que se observaron hembras maduras las cuales se obtuvieron desoves y larvas.

Es posible que aunado al efecto particular del tipo de dietas, los ostiones hayan experimentado cierto estrés por los cambios en la forma en que se suministraron las microalgas, ya que durante la aclimatación la ración total del día se dio en una sola exhibición con el recambio de agua, mientras que durante la maduración el alimento se suministró a través de un sistema de goteo descrito para la maduración de almejas (Ramirez et al., 1999), lo cual podría favorecer los desoves parciales con dos de las dietas (Pl y Cc). Esto sugiere la necesidad de evaluar el sistema de alimentación (pulsos vs. continuo), ya que es probable que la forma en que son suministradas las microalgas afecté la maduración y el desempeño general de *C. corteziensis*. Al menos en *C. virginca*, se ha descrito que el crecimiento puede verse afectado por la cantidad y la forma en que se suministra el alimento (continua vs. discontinua), ya que ambas modifican la capacidad de filtración de los ostiones y producción de pseudoheces (alimento no digerido) (Epifanio, 1977).

En relación al desempeño general de los ostiones durante el cultivo, se observaron diferencias entre las dietas para cada parámetro analizado. Así, los ostiones alimentados con la dieta Cc+Pl y Mx-Ac presentaron los valores mas altos de biomasa, mientras que los

alimentados con Cg presentaron los valores de biomasa más bajos. Si bien no hubo diferencias significativas para la supervivencia de los ostiones, se observaron valores mayores al 80% en los ostiones alimentados con Cc, Cc+Pl y Mx-2 y menores al 70% para Cg y Mx-Ac. Sin embargo, la dieta de aclimatación presentó los valores más altos de biomasa aún cuando este grupo de ostiones presentó la menor supervivencia. Los ostiones alimentados con las seis distintas dietas mostraron ganancia de peso total al final del experimento, pero fueron mayores con las dietas Cg, Cc y Cc+Pl, y menores con Pl. Aparentemente, el crecimiento, acumulación de reservas (biomasa) y supervivencia son afectados diferencialmente por distintas microalgas, pero no son mejores con una dieta mixta, que era el resultado esperado. En concordancia, se ha reportado que el crecimiento en *C. virginica* (biomasa y tamaño de la concha) no está correlacionado con la composición bioquímica de las microalgas, sino por la presencia o ausencia particular de las especies de microalgas en la dieta; así por ejemplo, el mayor crecimiento de *C. virginica* se observó con dieta compuesta por *I. galbana* (T-ISO) y *Thalassiosira pseudonana* (Epifanio, 1979). Además, el desempeño general (supervivencia, crecimiento) y la maduración fueron afectados de forma diferencial en relación al tipo de microalga ofrecida. Los efectos de las distintas dietas pueden ser atribuidos a las diferencias en la composición bioquímica de las microalgas (ver anexo D). Basándonos en la diferencias de la composición bioquímica, puede sugerirse que *C. calcitrans* tiene un mayor valor nutrimental que *C. gracilis*, ya que contiene mayor concentración de colesterol, 20:5n-3, lípidos totales, carbohidratos y proteínas, los cuales fueron identificados como las principales reservas energéticas en el ciclo reproductivo en las hembras de *C. corteziensis* de Laguna de Ceuta (primer capítulo). Por lo tanto, la composición bioquímica de *C. calcitrans* pudo haber favorecido el

incremento en la biomasa de los ostiones alimentados con las dietas Cc+Pl y Mx-Ac. Algo similar se observó con el peso total final de los ostiones que se alimentaron mayoritariamente con *C. calcitrans*, aunque las diferencias entre las dietas no fueron significativas. Resultados similares se obtuvieron en la tasa de crecimiento de juveniles de *C. corteziensis*, la cual fue mayor cuando fueron alimentados con *C. calcitrans* que con otras especies de microalgas, incluyendo *C. gracilis* (Rivero-Rodríguez et al., 2007).

En contraste con los resultados favorables de *C. calcitrans* en el crecimiento de los ostiones, esta microalga no favoreció el desarrollo de las gónadas de las hembras, en particular cuando se compara con *C. gracilis*. Sin embargo, *C. gracilis* tiene un menor valor nutricional que *C. calcitrans*, principalmente en el contenido de lípidos totales y HUFA (Tabla IV). La baja concentración de reservas bioquímicas de *C. gracilis* no estimula el crecimiento somático, pero aparentemente sí induce a la maduración. La ausencia de inducción a la maduración de machos con *C. calcitrans* contrasta con el uso de esta microalga para la alimentación de reproductores (Chávez-Villalba et al., 2003a; 2003b), juveniles (Ponis et al., 2003) y larvas de *C. gigas* (Helm y Laing, 1987; Ponis et al., 2003). Por otra parte, en el ostión *C. virginica* se ha observado que el crecimiento y la asimilación de nutrientes es mayor con una dieta bi-algal (*I. galbana* T-ISO y *T. pseudonana*), en comparación con una dieta monoalgal (*Platymonas suecica*), mientras que con dietas mixtas se obtuvieron valores intermedios de crecimiento (Romberger y Epifanio, 1981). Aparentemente, en ostiones de *C. corteziensis*, una vez iniciada la maduración, como se observa por los valores iniciales de ACG, no es necesario ofrecer microalgas ricas en reservas. Esto concuerda con resultados reportados para ostiones de *C. gigas*, que no necesitan tanto consumo y acumulación de reservas durante la maduración y en particular

para la vitelogénesis (Utting y Millican, 1997; Chavez et al., 2002; Cannuel y Beninger, 2005).

En el presente estudio, no se analizó la composición bioquímica de cada tejido por separado, por lo que no es posible establecer si hubo transferencias de reservas bioquímicas desde otros tejidos hacia la gónada. Aunque las reservas energéticas acumuladas antes del acondicionamiento en cautiverio pudieron afectar la maduración, no explica las diferencias obtenidas en relación a las dietas. Se puede proponer que dichas diferencias se debieron a la proporción de materia orgánica entre *C. gracilis* y *C. calcitrans*, la cual es mucha mayor en la primera ( $30$  vs.  $7 \mu\text{g} \times 10^{-6}$  cel) (Helm y Bourne, 2004), afectando su valor nutrimental por su contenido de cenizas. El mayor contenido de carotenoides se observó en los ostiones alimentados con las dietas Cc y Cc+Pl, lo cual puede explicarse a través del mayor contenido de fucoxantina en *C. calcitrans* (ver anexo D) y en menor grado con el contenido de pigmentos de *P. lutheri*, ya que los ostiones alimentados únicamente con esta microalga tuvieron la menor concentración de carotenoides. Lo anterior sugiere que a pesar del valor nutritivo de *P. lutheri*, principalmente de DHA y EPA (Tabla IV), probablemente esta microalga fue poco aceptada y/o digerida por los ostiones, lo cual se reflejó tanto en la inducción de desoves parciales y un menor desempeño reproductivo en general, así como en la menor ganancia de peso total de los ostiones en relación al resto de las dietas. Alternativamente, su disminución pudiera explicarse a que posiblemente los carotenoides fueron utilizados como antioxidantes (Khanta, 1989; Miki, 1991) ante un posible estrés ocasionado por el cautiverio o la alimentación. Por otro lado, algunos carotenoides como el  $\beta$ -caroteno son utilizados parcialmente en la síntesis de vitaminas (i.e. pro-vitamina A) (Fraser y Bramley, 2004), de las cuales algunas de ellas han mostrado variaciones durante

la reproducción de *Pecten maximus* (Seguineau et al., 2001a) y *C. gigas* (Seguineau et al., 2001b). Aunque por otro lado, se ha descrito que la principal función de los carotenoides en los tejidos de los órganos no reproductivos de los moluscos bivalvos es dar estabilidad en la fluidez de las membranas celulares (Vershinin, 1996). Lo anterior concuerda con lo observado en el ciclo reproductivo de *C. corteziensis* en la población de Laguna de Ceuta (primer capítulo), en que las variaciones en la concentración de carotenoides estuvieron relacionadas con la disponibilidad del fitoplancton, y no influyeron de manera directa entre los picos reproductivos, tal y como se ha observado con otras especies de moluscos, como *M. edulis* (Campbell, 1969).

En base a los resultados de la frecuencia de especies de microalgas identificadas en el tracto digestivo y conchas de los ostiones silvestres, y de los efectos en el desempeño de algunas de estas especies de microalgas en el presente experimento, se sugiere ofrecer una dieta compuesta principalmente de diatomeas y en particular de *C. gracilis* para inducir la maduración de los ostiones. Considerando la importancia del EPA para la maduración en el ciclo reproductivo, se sugiere usar distintas proporciones de EPA y DHA para analizar su efecto sobre la maduración de *C. corteziensis*.

## 2.6 Conclusiones

- Se logró la maduración y desove de *C. corteziensis* en cautiverio, observándose que dietas compuestas de una mezcla de microalgas o dietas monoalgales producen distintos resultados sobre la biomasa y la maduración diferencial entre machos y hembras en relación a la dieta, mientras que la supervivencia de los ostiones fue similar entre las dietas.
- Los mejores resultados en términos de área de cobertura gonádica sobre la maduración se obtuvieron con la dieta monoalgal de *C. gracilis*, sin embargo, este resultado puede estar sesgado por la ocurrencia previa de desoves en ostiones alimentados con *P. lutheri* y *C. calcitrans*.



### **3. TERCER CAPÍTULO**

Alimentación bi-algal con diferentes proporciones de *C. gracilis* e *I. galabana* (T-ISO) con base a su contenido particular de DHA y EPA

### 3.1 Diseño experimental

En este experimento se utilizaron ostiones provenientes de Boca de Camichín, Nayarit, los cuales fueron transportados al CIBNOR como se indica en métodos. Los ostiones fueron distribuidos en acuarios de 20 L en tres grupos cuya talla en longitud fue homogénea ( $6.3\pm 0.2$ ,  $6.5\pm 0.1$  y  $6.5\pm 0.1$ ; para las dietas 1, 2 y 3, respectivamente). La temperatura inicial de acondicionamiento fue de 22°C, la cual se fue incrementado 1°C cada 15 días, hasta alcanzar la temperatura final de 27°C. La salinidad del agua se mantuvo a  $37\pm 1$  ups, con recambios del 90% de agua cada 24 horas. El fotoperiodo fue de 12:12, luz:obscuridad.

### 3.2 Dietas experimentales

Se determinó la composición bioquímica general, pigmentos, ácidos grasos y aminoácidos de las especies de microalgas durante el tercer día de cultivo en las condiciones descritas en métodos y los resultados se reportan en anexo D.

Basándonos en los resultados de la composición de HUFA (Tabla VIII) se diseñaron tres dietas con distintas relaciones de DHA/EPA, usando 3 distintas proporciones de las microalgas *Chaetoceros gracilis* e *Isochrysis galbana* (T-ISO) (Tabla IX).

Tabla VIII. Proporción de HUFA en las microalgas cosechadas durante la fase exponencial (3er día de cultivo).

<b>Especie</b>	<b>20:4n-6</b>	<b>20:5n-3</b>	<b>22:6n-3</b>
<i>Chaetoceros gracilis</i>	5.0	12.1	1.2
<i>I. galbana</i> (T-ISO)	0.2	1.1	28.1

Ac. Araquidónico (ARA, 20:4n-6), Eicosapentaenoico (EPA, 20:5n-3) y Docosahexaenoico (DHA, 22:6n-3). Los porcentajes de ácidos grasos se calcularon a partir del total de ácidos grasos de cada especie de microalga.

Tabla IX. Relación de microalgas y DHA/EPA ( $\mu\text{g g}^{-1}$  peso húmedo) en las dietas utilizadas en la maduración de *C. corteziensis*.

	Dieta		
	Cg>T-ISO	Cg=T-ISO	Cg<T-ISO
<i>C. gracilis</i>	90%	50%	10%
T-ISO	10%	50%	90%
DHA/EPA	0.3	0.8	1

Estas dietas se suministraron durante 106 días a los tres grupos de ostiones (con tres réplicas c/u,  $n=30$  por dieta) a una ración inicial de  $2 \times 10^9$  células $^{-1} \times$  organismo $^{-1} \times$  día $^{-1}$  a usando un sistema por goteo descrito por Ramírez et al. (1999) (Fig. 40).



Fig. 40 Sistemas utilizados en el experimento. En cada uno de los sistemas (tanques azules) se colocó diariamente el alimento de cada una de las dietas, el cual se suministró por goteo a cada una de las 3 réplicas (30 ostiones  $\times$  dieta).

Trascurrido el tiempo de experimentación de 106 días, los organismos se dejaron en ayuno por 24 horas, después de las cuales se procedió a su muestreo. A cada ostión se les determinó morfometría general (peso total, biomasa, longitud y ancho), sexo, madurez y área de cobertura gonádica (ACG), composición bioquímica en el ostión completo: proteínas, carbohidratos y lípidos totales como se describe en la sección general de métodos.

### 3.3 Análisis estadísticos

Los resultados se procesaron por un análisis de varianza unifactorial (ANOVA), utilizando como variable independiente la dieta (3 niveles) y como dependientes las variables morfométricas (largo, ancho, peso total y biomasa), y composición bioquímica (proteínas, carbohidratos y lípidos totales). En caso de haber diferencias significativas, se realizaron pruebas post hoc de Tukey para establecer las diferencias de medias entre las dietas. El ACG y la supervivencia se analizaron con una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y una prueba de comparaciones múltiple no paramétrica de Tukey. Los valores de porcentaje fueron transformados a arcoseno (Zar, 1999) antes del ANOVA, aunque sólo se muestran los resultados en sus valores originales. Todos los resultados están expresados como media  $\pm$  error estándar. Todos los análisis se hicieron con un nivel de significancia del 95% ( $\alpha=0.05$ ) y usando el programa Statistica™ v. 5.5 (StatSoft, Tulsa, OK, EUA).

### 3.4 Resultados

#### 3.4.1 Supervivencia y morfometría

La longitud de la concha fue significativamente menor en los ostiones alimentados con la dieta Cg<T-ISO (Tabla X). Se observaron diferencias significativas en la biomasa de los ostiones en relación a dieta, con mayores valores para la dieta con la Cg>T-ISO en comparación a las otras dos dietas. La proporción biomasa/peso total fue significativamente mayor en los ostiones alimentados con la dieta con menor relación de Cg>T-ISO. No se observaron diferencias significativas en la supervivencia, peso total y ancho de las conchas de los ostiones alimentados con las tres dietas con diferentes relaciones de Cg y T-ISO (Tabla X).

Tabla X. Supervivencia, y morfometría de los ostiones alimentados con 3 diferentes relaciones de DHA/EPA.

	Dieta			<i>P</i>
	Cg>T-ISO	Cg=T-ISO	Cg<T-ISO	
Supervivencia (%)	95.2±4.8	95.2±4.8	90.5±9.5	0.953
Peso total (g)	57.4±5.2	50.0±3.1	45.6±2.8	0.103
Ancho (cm)	5.3±0.2	4.9±0.1	4.8±0.1	0.169
Longitud (cm)	7.9±0.4a	7.7±0.3a	6.9±0.2b	<b>0.045</b>
Biomasa (g)	8.3±0.9a	4.9±0.6b	4.4±0.4b	<b>0.000</b>
Biomasa/peso total (%)	14.2±0.7a	9.8±0.6b	9.3±0.9b	<b>0.000</b>

Los resultados están expresados en media ± error estándar y fueron analizados por ANOVA unifactorial,  $P < 0.05$ . Las medias se compararon por análisis de Tukey, las letras diferentes en una misma fila indican diferencias significativas.

### 3.4.2 Área de cobertura gonadal (ACG)

El área de cobertura gonadal fue significativamente mayor ( $1.4 \pm 0.2\%$ ) en los ostiones alimentados con la dieta Cg>T-ISO, en comparación con las otras dos dietas ( $0.9 \pm 0.2$  y  $1.1 \pm 0.1$  para Cg=T-ISO y Cg<T-ISO, respectivamente) (Fig. 41).

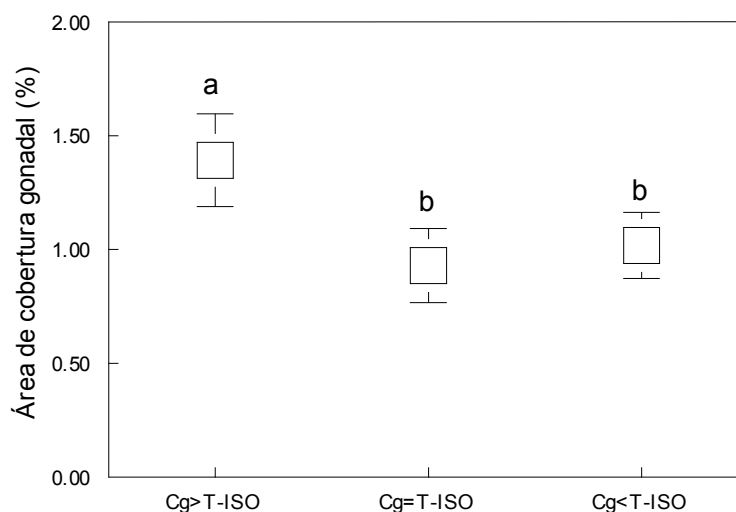


Fig. 41 Área de cobertura gonadal (%) de los ostiones alimentados con 3 diferentes proporciones de *C. gracilis* y T-ISO. Los resultados están expresados en media  $\pm$  error estándar. El ACG se analizó con una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y una prueba de comparaciones múltiple no paramétrica de Tukey, las letras indican diferencias significativas.

### 3.5 Composición bioquímica en tejidos

La concentración de proteínas, carbohidratos y lípidos totales en tejidos fueron significativamente diferentes en relación a la dieta (Fig. 42). La concentración de proteínas fue significativamente menor en los ostiones que fueron alimentados con la menor relación de T-ISO en la dieta ( $421 \pm 15$ ,  $455 \pm 14$ ,  $460 \pm 15$  mg g<sup>-1</sup> peso seco; para Cg>T-ISO, Cg=T-ISO y Cg<T-ISO respectivamente,  $P < 0.01$ ) (Fig. 42), mientras que la concentración de

lípidos totales fue significativamente mayor en los ostiones alimentados con la mayor proporción de *C. gracilis* en la dieta ( $48 \pm 2$ ,  $38 \pm 2$  y  $32 \pm 2$   $\text{mg g}^{-1}$  peso seco, para  $\text{Cg} > \text{T-ISO}$ ,  $\text{Cg} = \text{T-ISO}$  y  $\text{Cg} < \text{T-ISO}$ ; respectivamente,  $P < 0.01$ ). La concentración de carbohidratos disminuyó significativamente con el incremento en proporción de T-ISO en la dieta ( $272 \pm 14$ ,  $208 \pm 16$  y  $154 \pm 20$   $\text{mg g}^{-1}$  peso seco, para  $\text{Cg} > \text{T-ISO}$ ,  $\text{Cg} = \text{T-ISO}$  y  $\text{Cg} < \text{T-ISO}$ ; respectivamente,  $P < 0.01$ ) (Fig. 42).

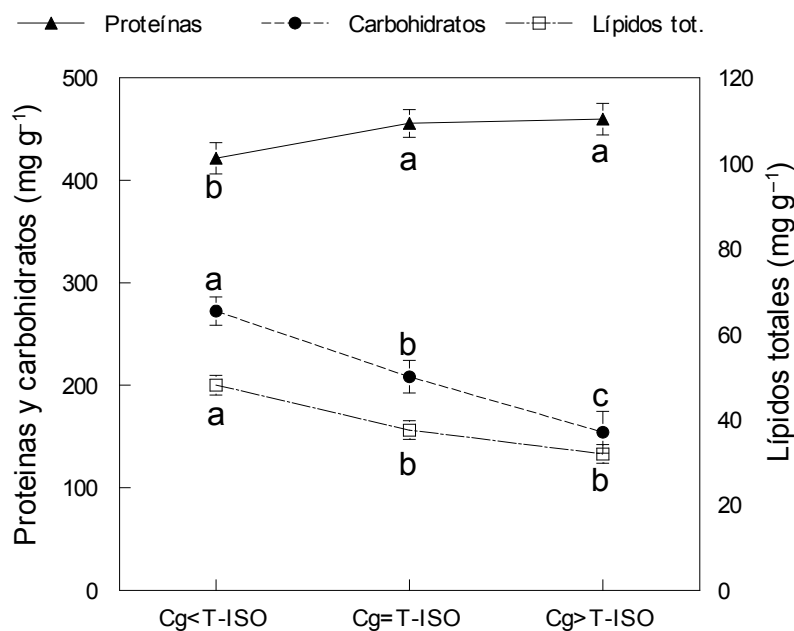


Fig. 42 Concentración de proteínas, carbohidratos y lípidos totales ( $\text{mg g}^{-1}$  peso seco) en los tejidos de los ostiones alimentados con 3 diferentes proporciones de *C. gracilis* y T-ISO. Los resultados están expresados en media  $\pm$  error estándar. Ver tabla VII para análisis estadísticos.

No se observaron ovocitos con ninguna de las tres dietas (Fig. 43), pero si un ligero incremento en el número de ovogonias y engrosamiento del tejido conectivo vesicular (TCV), particularmente en los ostiones alimentados con mayor proporción de *C. gracilis*.

Los ostiones se encontraban en estadio indiferenciado, de acuerdo a la escala propuesta por Rodríguez-Jaramillo et al. (2008).

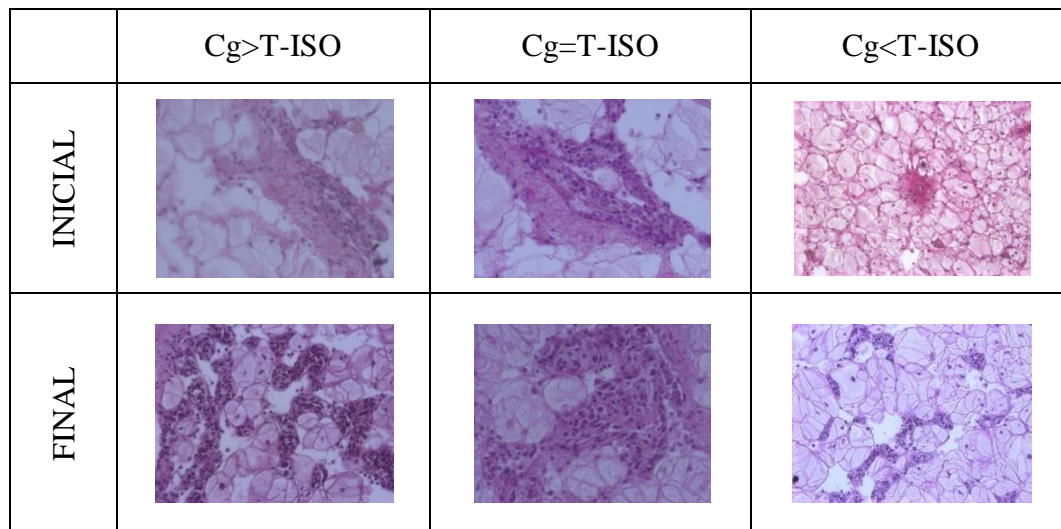


Fig. 43 Imágenes (40×) de los cortes histológicos de las gónadas de los ostiones alimentados con 3 diferentes proporciones de *C. gracilis* y T-ISO.



### 3.6 Discusión

El objetivo del presente experimento fue el de inducir la maduración de *C. corteziensis* en condiciones de laboratorio. En base en los resultados obtenidos en el primer capítulo en relación al ciclo reproductivo de esta especie, la temperatura se subió paulatinamente de 22 a 27°C, simulando las condiciones de primavera-verano del ciclo reproductivo, durante el cual la temperatura incremento de 22°C hasta 30°C.

Por otro lado y con base en los resultados obtenidos sobre la maduración en el experimento donde se probaron seis dietas, en este se ofreció a los ostiones una dieta basada en *C. gracilis* en distintas proporciones, usando *I. galbana* como dieta base. Tanto en el ciclo reproductivo como en el capítulo anterior se llegó a la conclusión que el EPA era el ácido graso que presentaba variaciones más fuertes asociadas a la maduración. En el ciclo reproductivo, se observó que las diferencias estacionales de las reservas energéticas están relacionadas con la disponibilidad del fitoplancton a largo del ciclo reproductivo, principalmente con el grupo de las diatomeas, caracterizadas principalmente por su bajo porcentaje del DHA y altas cantidades de EPA (Volkman et al., 1989; Cohen et al., 1995) así como de altos niveles de colesterol (Tsitsa-Tzardis et al., 1993).

Sin embargo, en el presente experimento no fue posible inducir la vitelogénesis después de 106 días de acondicionamiento reproductivo en los ostiones. Es necesario especificar que los ostiones usados en el presente capítulo no fueron muestreados en la misma localidad que los usados para establecer el ciclo reproductivo. Este experimento se realizó durante los meses de febrero y abril, mientras que el de las 6 dietas fue de julio a septiembre, y el ciclo reproductivo de abril de 2005 a abril de 2006.

Las observaciones realizadas en los cortes histológicos de cada organismo muestran grupos de gonias rodeadas de TCV, lo cual los clasifica como organismos inmaduros de acuerdo a la escala de maduración sugerida para *C. corteziensis* por Rodríguez-Jaramillo et al. (2008). Es de notar que sí se observaron diferencias significativas en el ACG, aún si los valores fueron muy bajos puesto que solo se calculó con los grupos de gonias. Así, el ACG fue mayor en los ostiones alimentados con la dieta que tuvo mayor proporción de *C. gracilis*. Dado que los ostiones alimentados con las tres distintas dietas estaban en estadios de maduración similares, el incremento de ACG sugiere que los ostiones alimentados con una mayor proporción de Cg tenían potencialmente mayor cantidad de gonias. No fue posible cuantificar la cantidad de gonias dado su tamaño, pero una mayor cantidad de gonias podría indicarnos un potencial efecto sobre la fecundidad en relación a la dieta. Mientras que en el capítulo anterior se observó un efecto de *C. gracilis* sobre la vitelogénesis, aquí el efecto que se observó fue sobre el inicio de la gametogénesis.

Los resultados de este experimento sugieren que la maduración y el crecimiento de *C. corteziensis* está relacionado con la menor proporción de DHA/EPA, o en su defecto con la menor proporción de *I. galbana* (T-ISO)/*C. gracilis* en la dieta. TRES bSe ha reportado que el suministro de una emulsión rica EPA estimula la maduración y desove de *C. gigas* (Delaporte et al., 2007). Por otro lado en el primer capítulo se observó que a diferencia del DHA, el EPA mostró mayores variaciones estacionales en relación a la reproducción de *C. corteziensis*, lo que sugiere que este ácido graso es determinante en la maduración gonádica de esta especie.

Aparentemente, la menor proporción de DHA/EPA no solo favoreció el inicio de la gametogénesis sino también el crecimiento de los ostiones. Un mayor crecimiento de las

conchas en relación a una dieta con menor relación de DHA/EPA concuerda con lo observado para larvas de *C. gigas* y *C. rhizophorae*, en que los mayores crecimientos de la concha se observaron con una dieta mixta de *I. galbana* (T-ISO) y *C. calcitrans* en una proporción 1: 2.6 y con una relación DHA/EPA de 0.5 (Helm y Laing, 1987).

Las microalgas utilizadas en este experimento se cosecharon durante la fase exponencial, en el tercer día de cultivo por guardar una buena relación entre la densidad celular y la composición bioquímica. Como se puede apreciar, (anexo D) la composición bioquímica cambia durante el crecimiento, además de ser distintas en relación a la especie. Como se muestra en la composición de ácidos de estas microalgas, *C. gracilis* contiene un mayor porcentaje de EPA en comparación con *I. galbana* (T-ISO) (12.1 vs. 1.1%, respectivamente), mientras que esta última contiene una mayor proporción de DHA (28.1 vs. 1.2%) (Anexo D). Estos resultados concuerdan con lo descrito en otros trabajos que evalúan la composición de ácidos grasos y donde se reportan mayores proporciones de EPA y menores de DHA para las diatomeas, y el DHA como ácido graso mayoritario en *I. galbana* (T-ISO) (Volkman et al., 1989; Cohen et al., 1995; Renaud et al., 1999; Patil et al., 2007).

Aún considerando las diferencias en su composición bioquímica, ambas especies de microalgas resultaron nutricionalmente favorables, ya que la supervivencia no resultó afectada y se promovió el crecimiento. En juveniles de *C. corteziensis* el mejor crecimiento se observó con dietas mono-algales, principalmente con las especies de diatomeas *C. calcitrans* y *C. muelleri*; sus efectos fueron atribuidas a la composición de HUFA mas que al contenido de proteínas, carbohidratos y lípidos totales (Rivero-Rodríguez et al., 2007). En el presente experimento, *Isochrysis galbana* (T-ISO), tuvo una mayor cantidad de

proteína (86.5%) pero menor cantidad de carbohidratos (25.1%), comparada con *C. gracilis* (68.5 y 25.1%, respectivamente) que representa el 90% de esta dieta. Esto pudiera explicar el incremento, casi linear, de carbohidratos en los tejidos de los ostiones al incrementar la proporción de *C. gracilis* en las dietas. En el caso de los lípidos totales, *I. galbana* (T-ISO) contiene una cantidad ligeramente mayor que *C. gracilis* (7.8 y 6.5%, respectivamente). Contrario a la composición de lípidos de las microalgas, la mayor acumulación de lípidos totales en los tejidos de ostiones se observó en la dieta con mayor proporción de *C. gracilis*. Es posible que los lípidos en particular, sean acumulados selectivamente e independientemente de la dieta, y más en relación al desarrollo gonádico más avanzado con esa dieta.

La acumulación de reservas a su vez favorece su movilización para el proceso de gametogénesis en moluscos bivalvos (Mathieu y Lubet, 1993). En el ciclo reproductivo de las hembras de *C. corteziensis*, el cual se discutió en el primer capítulo, los carbohidratos y lípidos totales resultaron las principales reservas de energía, las cuales se incrementan con la gametogénesis hasta lograr valores máximos cuando se completa la maduración. Por su parte, Rodríguez-Jaramillo et al. (2008) observaron una mayor acumulación de carbohidratos en la gónada de las hembras de *C. corteziensis* durante la previtelogenesis, la cual disminuye hasta la maduración (i.e. postvitelogenesis); mientras que en la glándula digestiva la cantidad de carbohidratos se mantuvo constante. La correlación inversa en el contenido de carbohidratos entre tejido conectivo vesicular (TCV) y la gónada en hembras de *C. corteziensis* durante el ciclo reproductivo (Rodríguez-Jaramillo et al. 2008), sugiere una transferencia de carbohidratos del TCV hacia las gónadas como se ha descrito para *M. edulis* (Mathiue and Lubet, 1993) y *C. gigas* (Berthelin et al., 2000b). En el presente

experimento se observó una mayor acumulación de carbohidratos y lípidos en los tejidos de *C. corteziensis* alimentados con una mayor proporción de *C. gracilis*, lo cual pudo favorecer tanto el incremento de la biomasa como el inicio de la gametogénesis.

Además de la composición de ácidos grasos, las dos microalgas usadas difieren en su composición de esteroides, principalmente en el contenido de colesterol (86.5% vs. 1.1%, para *C. gracilis* e *I. galbana* T-ISO, respectivamente). Estos resultados concuerdan con lo descrito en otros trabajos que evalúan la composición de esteroides en microalgas, donde se reporta una proporción de 61.9% de colesterol para esta especie (Tsitsa-Tzardis et al., 1993). En relación a la composición de otros fitoesteroides en *I. galbana* (T-ISO), los resultados varían cuantitativamente en relación al autor (Soudant et al., 1996; Veron et al., 1998; Bandara et al., 2003). Como se observó en el ciclo reproductivo de las hembras de *C. corteziensis* (capítulo 1 de esta tesis), el colesterol además de ser el esteroide más abundante (34–48%), fue el que presentó las mayores variaciones estacionales que concuerdan con la maduración y los desoves. Los esteroides son componentes estructurales importantes de las membranas celulares (Nes, 1974) y de reserva (Pazos et al., 2003) los cuales se movilizan durante la proliferación de gametos y desove de *C. gigas* (Soudant et al. 1996a; Matus de la Parra et al., 2005) y *C. virginica* (Swift et al., 1980). El colesterol es el principal esteroide que se moviliza en la embriogénesis y durante las primeras etapas del desarrollo larvario de moluscos bivalvos (Soudant et al. 1998; Soudant et al. 2000), además de que tiene un importante papel como precursor de hormonas esteroideas las cuales son sintetizadas en las gónadas y glándula digestiva de hembras (i.e.  $17\beta$ -estradiol, estrona y estriol) y machos (i.e.

testosterona, 11-ceto-testosterona, 5 $\alpha$ -dihidrotestosterona, androesterona, etc.) para regular la reproducción en diferentes especies de moluscos bivalvos (Croll y Wang, 2007).

Por otro lado, la diatomea *C. gracias* tiene una relación de ARA/EPA del doble (0.4) en comparación con *I. galbana* T-ISO (0.2), mientras que en *C. calcitrans* es mayor (0.5), otra diatomea con mayor cantidad de reservas pero con la cual no se indujo la maduración. El ARA es el precursor de la síntesis de prostaglandinas de la serie II, PGE2 (Morse et al., 1977; Rowley et al., 2005), las cuales están asociadas a la gametogénesis, vitelogénesis y desoves de distintas especies de moluscos (Ono et al., 1982; Matsutani y Nomura, 1987; Osada y Nomura, 1990; Martínez et al., 1996; 1999; 2000). Por lo anterior sería importante evaluar la influencia particular del ARA sobre la maduración de esta especie.

En el ciclo reproductivo de las hembras de *C. corteziensis* descrito en el primer capítulo, se observó que la maduración de los ostiones está acompañada por una mayor acumulación de reservas energéticas, principalmente de carbohidratos, lípidos totales, EPA y colesterol. Por lo tanto, es probable que las diferencias mencionadas entre las dietas, básicamente la composición de carbohidratos, lípidos, EPA, DHA y de colesterol, hayan favorecido el inicio de la maduración y crecimiento de *C. corteziensis* en este experimento. Por lo tanto, las observaciones hechas en las poblaciones silvestres de *C. corteziensis* durante la evaluación del ciclo reproductivo, concuerdan con las encontradas en esta primera inducción a la maduración de esta especie. Sin embargo, aun hace falta identificar los mecanismos que desencadenan el inicio de la movilización de reservas o vitelogénesis.

### 3.7 Conclusiones

- La alimentación con una mayor proporción de *Chaetoceros gracilis* (90%) que de *Isochrysis galbana* (T-ISO) (10%) favoreció el crecimiento de los ostiones adultos de *C. corteziensis*, sin afectar la supervivencia, en comparación con las dietas con 50% y 90% de *Isochrysis galbana* (T-ISO).
- La dieta con mayor proporción de *C. gracilis* favoreció la gametogénesis de hembras de *C. corteziensis*, probablemente por su mayor contenido de carbohidratos, lípidos totales y EPA.
- A diferencia del experimento anterior (capítulo 2), no se logró inducir la vitelogénesis en este experimento, probablemente por diferencias de época de captura de los ostiones en campo.

#### **4. CUARTO CAPÍTULO**

Efecto del sistema de alimentación en la maduración, composición bioquímica y sistema inmunológico de *C. corteziensis*



#### 4.1 Diseño experimental

Los ostiones que se utilizaron en este experimento fueron recolectados de las sartas de producción comercial de un grupo de acuicultores de Boca de Camichín, Nayarit. Los ostiones fueron empacados y enviados al CIBNOR y una vez recibidos limpiados bajo las mismas condiciones descritas en métodos. Posteriormente, y antes del experimento, se determinó su longitud, ancho y peso total inicial y un subgrupo (n=7) se procesó por histología para evaluar el estadio inicial de maduración. El resto de los ostiones fueron colocados en un sistema de agua cerrado a 22°C de temperatura, con una salinidad de 37±1 ups y un fotoperiodo de luz:oscuridad de 12:12. Se realizaron recambios de agua del 90% diario a la temperatura de cultivo a la que se encontraban los ostiones. Durante el periodo de aclimatación, los ostiones fueron alimentados con *Chaetoceros gracilis*, *Chaetoceros calcitrans* y *Dunaniella tertiolecta* en una proporción de 1:1:0.1 y a una ración de  $2 \times 10^9$  células × ostión × día.

Después de tres semanas de aclimatación, los ostiones fueron transferidos a acuarios más pequeños (0.16 m<sup>2</sup>, 0.5 m × 0.3 m y de 20 L) a una densidad de 4 ostiones por acuario en 6 réplicas por cada sistema de alimentación. El primero de ellos fue un sistema “continuo” por goteo, el cual suministró las microalgas contenidas en un reservorio a través de una bomba con un flujo de 0.3 L h<sup>-1</sup> (Ramírez et al., 1999). El segundo sistema consistió en dar la cantidad de microalgas del día por “pulsos”, es decir una sola ración diaria tras el recambio diario de agua. Esto con la finalidad de limitar la disponibilidad de alimento, como suele suceder durante las bajamareas.

Los ostiones en ambos sistemas fueron alimentados durante la maduración exclusivamente con *Isochrysis galbana* (T-ISO) a una ración de  $4 \times 10^9$  células  $\times$  ostión  $\times$  día, la cual equivale al 5% de biomasa de microalgas en peso seco en relación al peso inicial de los ostiones en peso seco. La temperatura se incrementó 1°C hasta alcanzar los  $27 \pm 1^\circ\text{C}$ . La salinidad y el fotoperiodo luz: oscuridad se mantuvo igual que durante la aclimatación, es decir en  $37 \pm 1$  ups y 12:12, respectivamente. Cada acuario se mantuvo con aireación constante, recambio de agua del 90% y sifoneo de residuos (heces) diario.

La ración diaria de microalga se complementó con una emulsión de lípidos, la cual se preparó mezclando las emulsiones **(A)** ICES 0/-/C y **(B)** ICES 30/0.6/C (Anexo E) en una relación **1A:½B**, con una composición de ácidos grasos como se muestra en la Tabla XI.

Tabla XI. Composición de ácidos grasos de la emulsión para la maduración de *C. corteziensis*.

Ácido graso	(%)
14:0	30
16:0	21
18:0	5
18:1 $n-9$	15
18:2 $n-6$	12
18:3 $n-3$	1.3
20:5 $n-3$	7
20:4 $n-6$	0.4
22:6 $n-3$	4

La emulsión de lípidos se preparó diariamente en 1 mL de agua destilada y se agregó directamente en cada uno de los sistemas en una relación al 10% de la biomasa de microalgas. Este nivel de suplementación fue seleccionado en resultados preliminares en

que cantidades superiores al 10% provocaban que los ostiones se cerraran y dejaran de comer.

Transcurridas tres semanas de acondicionamiento, los ostiones se mantuvieron 24 horas en ayuno antes del sacrificio y muestreo. Se determinó la morfometría general y se extrajo hemolinfa para los análisis bioquímicos, inmunológicos y conteo de hemocitos, como se describe en métodos. Se tomó una muestra para histología para determinar el sexo, área de cobertura gonádica (ACG) y conteo de células reproductivas como se describe en métodos.

#### 4.2 Análisis estadísticos

Los resultados entre sistemas de alimentación se compararon por medio de análisis paramétrico de t-sudent con un nivel de significancia de  $P < 0.05$ . La proporción de los estadios de maduración de las gónadas, donde se contabiliza el número de células reproductivas (gonias, ovogonias, ovocitos pre- y vitelogénicos) se compararon usando tablas de contingencia (<http://www.physics.csbsju.edu>). El área de cobertura gonadal (ACG) se analizó usando una prueba no paramétrico de Kruskal-Wallis y una prueba de comparaciones múltiple no paramétrica de Tukey. Los valores de porcentaje fueron transformados a arcoseno (Zar, 1999) antes de los análisis estadísticos, aunque sólo se muestran los resultados en sus valores originales. Todos los resultados están expresados como media  $\pm$  error estándar. Todos los análisis se hicieron con un nivel de significancia del 95% ( $\alpha=0.05$ ) y con la ayuda del programa Statistica<sup>TM</sup> v. 5.5 (StatSoft, Tulsa, OK, EUA).

### 4.3 Resultados

#### 4.3.1 Supervivencia y morfometría

La supervivencia, el peso total, el peso de la biomasa, longitud y ancho de las conchas de los ostiones no fueron significativamente diferentes entre los sistemas de alimentación (Tabla XII). Sin embargo, la baja supervivencia de los ostiones alimentados con el sistema continuo forzó a que el experimento se diera por terminado al cabo de tres semanas.

Tabla XII. Supervivencia y morfometría de los ostiones *C. corteziensis* alimentados con *I. galbana* (ISO) y emulsiones de lípidos con dos sistemas (continuo vs. pulsos).

	Continuo	Pulsos
Supervivencia (%)	50.0±9.73	70.8±7.68
Peso total (g)	63.9±3.26	64.6±5.61
Biomasa (g)	8.32±0.65	8.17±0.66
Longitud (cm)	7.41±0.31	7.66±0.60
Ancho (cm)	4.93±0.24	5.13±0.30

Los resultados están expresados en media  $\pm$  error estándar y fueron analizados por análisis paramétrico t-student entre sistemas de alimentación. Las diferencias significativas ( $P<0.05$ ) se muestran con asterisco. Los valores de porcentaje fueron transformados a arcoseno antes de los análisis estadísticos, aunque sólo se muestran los resultados en sus valores originales.

#### 4.3.2 Área de cobertura gonadal (ACG)

El ACG de los ostiones alimentados con el sistema de pulsos tendió a ser mayor en comparación con el sistema continuo, así como con el estado inicial, del ACG pero las diferencias no fueron significativas ( $P=0.35$ ) (Fig. 44).

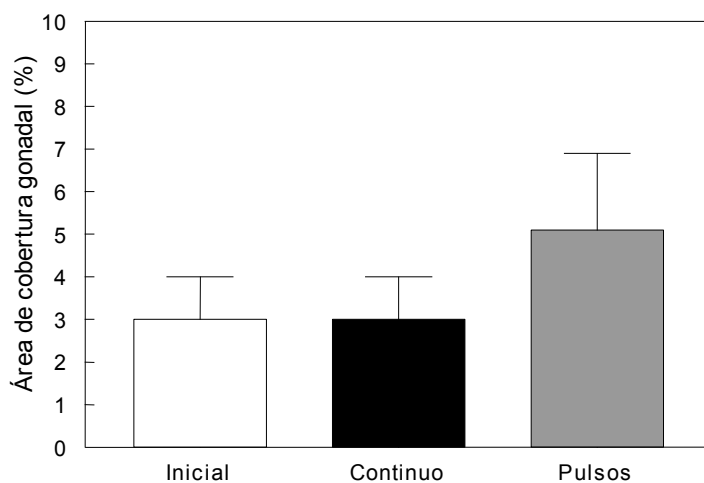


Fig. 44 Área de cobertura gonadal (ACG) de los ostiones alimentados con *I. galbana* (ISO) y emulsiones de lípidos con dos sistemas (continuo vs. pulsos). Los resultados están expresados en media  $\pm$  error estándar. Ver tabla XII para análisis estadísticos.

#### 4.3.3 Proporción de células reproductivas

La proporción de ovocitos varió significativamente entre ambos sistemas de alimentación ( $P < 0.01$ ). Únicamente en el sistema por pulsos se observaron ovocitos pre- y vitelogénicos, mientras que los ostiones alimentados con el sistema continuo presentaron una mayor proporción de gonias, los cuales fueron similares a la cantidad observada en los ostiones al inicio del experimento (Fig. 45).

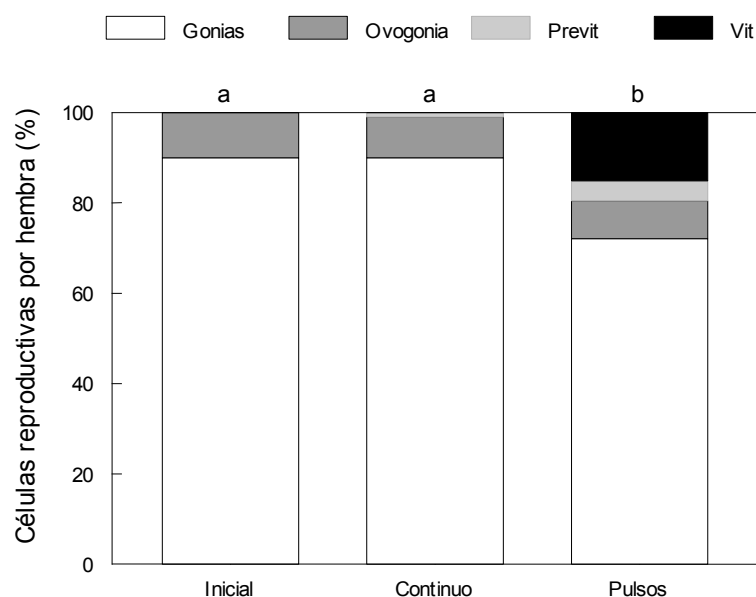


Fig. 45 Proporción (%) de células reproductivas de los ostiones alimentados con *I. galbana* (ISO) y emulsiones de lípidos con dos sistemas (continuo vs. pulsos). La proporción de células reproductivas se compararon usando tablas de contingencia (90/10, 90/9 y 80/20, para los ostiones al inicio, continuo y pulsos, respectivamente; de gonias vs. células diferenciadas). Las letras indican las diferencias significativas ( $X_2=69.3$ ,  $P<0.001$ ).

#### 4.4 Composición bioquímica en tejidos

No se observaron diferencias significativas en la composición bioquímica de los tejidos de los ostiones entre ambos sistemas de alimentación, excepto en la concentración de lípidos totales, la cual fue mayor en los ostiones alimentados por el sistema de pulsos (Tabla XIII).

Tabla XIII. Concentración de proteínas, carbohidratos y lípidos totales ( $\text{mg g}^{-1}$  peso seco) de los tejidos de los ostiones *C. corteziensis* alimentados con *I. galbana* (ISO) y emulsiones de lípidos con dos con sistemas (continuo vs. pulsos).

	Continuo	Pulsos
Proteínas	713±127	778±146
Carbohidratos	115±11.8	115±10.5
Lípidos totales	99.7±10.1	121±9.96*

Los resultados están expresados en media  $\pm$  error estándar. Ver tabla XII para análisis estadísticos.

#### 4.5 Composición bioquímica en hemolinfa

No se observaron diferencias significativas en la composición bioquímica de la hemolinfa de los ostiones entre ambos sistemas de alimentación (Tabla XIV).

Tabla XIV. Concentración de proteínas, glucosa, triacilglicéridos y hemocianina en la hemolinfa de los ostiones *C. corteziensis* alimentados con *I. galbana* (ISO) y emulsiones de lípidos con dos con sistemas (continuo vs. pulsos).

	Continuo	Pulsos
Proteínas (mg L <sup>-1</sup> )	1.44±0.14	1.31±0.11
Glucosa (mg dL <sup>-1</sup> )	9.53±2.22	8.23±1.10
Triacilglicéridos (mg dL <sup>-1</sup> )	15.93±4.4	11.56±1.1
Hemocianina (mg mL <sup>-1</sup> )	0.83±0.14	0.93±0.08

Los resultados están expresados en media ± error estándar. Ver tabla XII para análisis estadísticos.

#### 4.6 Proporción de ácidos grasos en la fracción de lípidos neutros y polares en tejidos

Únicamente el 18:1 $n$ -9 de la fracción de lípidos neutros fue mayor en los tejidos de los ostiones que fueron alimentados con la dieta por pulsos (Tabla XV). No se observaron otras diferencias significativas en la composición de ácidos grasos de ambas fracciones de lípidos (neutros o polares) en los tejidos de los ostiones de ambos sistemas de alimentación (Tabla XV).

Tabla XV. Proporción (%) y concentración total (mg 100 g<sup>-1</sup> peso húmedo) de ácidos de las fracciones de lípidos neutros y polares de los ostiones *C. corteziensis* alimentados con *I. galbana* (ISO) y emulsiones de lípidos con dos con sistemas (continuo vs. pulsos).

	Lípidos neutros		Lípidos polares	
	Continuo	Pulsos	Continuo	Pulsos
14:0	3.9±0.4	4.0±0.3	2.5±0.2	2.6±0.2
16:0	16.2±0.7	17.6±0.4	15.2±0.4	16.0±0.6
18:0	4.8±0.2	4.7±0.2	8.4±0.3	7.7±0.2
18:0DMA	3.7±0.8	3.9±0.6	5.8±0.4	5.8±0.4
16:1 $n-9$	5.8±0.7	4.7±0.3	4.4±0.3	4.0±0.2
16:1 $n-7$	5.4±0.6	5.2±0.7	2.8±0.2	2.9±0.2
18:1 $n-9$	2.6±0.1	3.2±0.2*	2.9±0.2	3.3±0.3
18:1 $n-7$	7.3±0.6	7.0±0.6	7.2±0.2	6.5±0.4
20:1 $n-9$	1.9±0.2	1.7±0.1	3.4±0.2	3.2±0.2
18:2 $n-6$	2.3±0.2	2.4±0.1	2.3±0.2	2.4±0.2
18:3 $n-3$	2.2±0.3	2.1±0.1	1.1±0.1	1.2±0.1
20:4 $n-6$	7.2±0.4	7.2±0.7	13.0±0.3	12.5±0.8
20:5 $n-3$	12.8±0.7	12.4±0.7	10.3±0.6	10.9±0.5
22:6 $n-3$	14.9±1.1	15.0±1.1	12.3±0.3	12.7±0.3
ΣSAT	31.0±0.8	32.8±0.7	34.8±0.5	34.9±0.5
ΣMONO	24.0±1.1	22.7±1.2	21.6±0.4	20.8±0.6
ΣPUFA	45.0±0.8	44.5±0.7	43.6±0.4	44.2±0.4
Total	826±109	1175±212	187±16.2	197±31.2

DMA= dimetilacetal; ΣSAT= suma de ácidos grasos saturados; ΣMONO= suma de ácidos grasos monoinsaturados; ΣPUFA= suma de ácidos grasos poli-insaturados. Los resultados están expresados en media ± error estándar. Ver tabla XII para análisis estadísticos.

#### 4.7 Sistema inmunológico

##### 4.7.1 Conteo total de hemocitos (CTH) y proporción de granulocitos

No se observaron diferencias significativas en el CTH (Fig. 46A) o en la proporción de granulocitos en relación al conteo total entre los sistemas de alimentación (Fig. 46B).



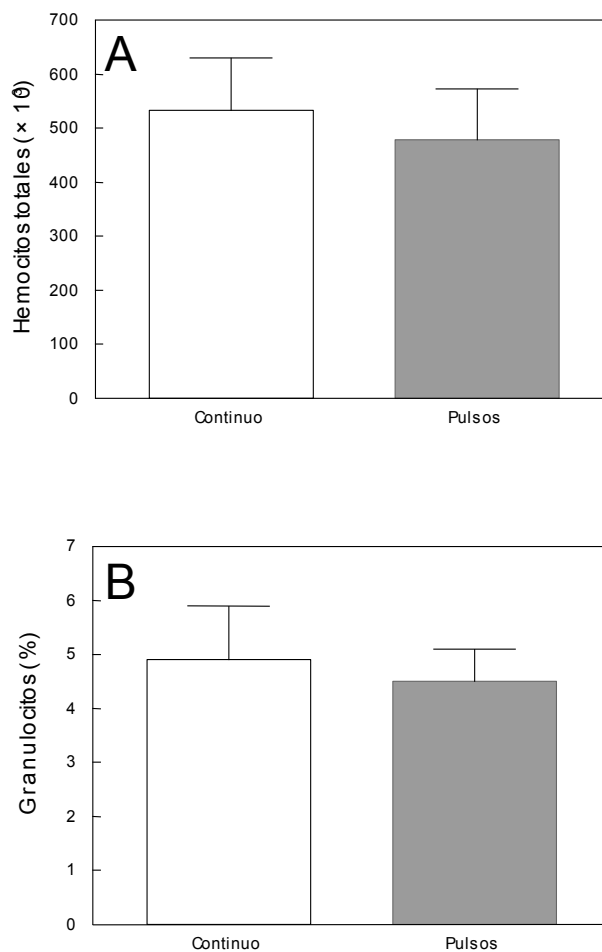


Fig. 46 Conteo total de hemocitos ( $\times 10^3$ ) (A) y proporción de granulocitos (%) (B) los ostiones alimentados con *I. galbana* (ISO) y emulsiones de lípidos con dos sistemas (continuo vs. pulsos). Los resultados están expresados en media  $\pm$  error estándar. Ver tabla XII para análisis estadísticos.

#### 4.7.2 Producción basal y estimulada de anión superóxido (PAS) en hemocitos

La producción basal (Fig. 47A) y estimulada (Fig. 47B) de anión superóxido (PAS) en los hemocitos fue mayor en los ostiones alimentados con el sistema por pulsos; sin embargo, solo se observaron diferencias significativas en los hemocitos estimulados (Fig. 47B). El índice de PAS (estimulados/basales) fue mayor en los hemocitos de los ostiones

alimentados por pulsos en comparación a los de los ostiones alimentados por el sistema continuo ( $4.9 \pm 0.3$  vs.  $3.9 \pm 0.2$ , para pulsos vs. continuo,  $P=0.01$ ).

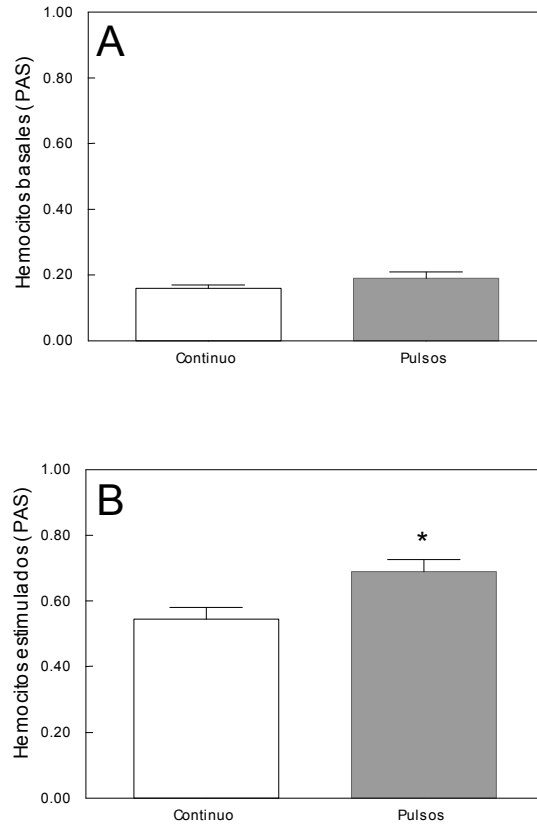


Fig. 47 Producción de anión superóxido (PAS) en hemocitos basales (A) y estimulados (B) en los ostiones alimentados con *I. galbana* (ISO) y emulsiones de lípidos con dos sistemas (continuo vs. pulsos). Los resultados están expresados en media  $\pm$  error estándar. Ver tabla XII para análisis estadísticos.

#### 4.8 Discusión

El ostión *C. corteziensis* presenta un prolongado periodo reproductivo, probablemente asociado a la alta disponibilidad de alimento en las lagunas costeras donde se distribuye (p.ej. Laguna de Ceuta, Sin.). Lo anterior se propone en vista de que este ostión no almacena reservas energéticas antes de la gametogénesis como lo hacen las especies de zonas templadas (i.e. *C. gigas*), sino que aprovecha la abundancia de fitoplancton de manera oportunista, favoreciendo con ella la producción continua de gametos (ver primer capítulo). La alta productividad de fitoplancton de las lagunas costeras (Ibarguen-Zamudio, 2006) que habita *C. corteziensis*, no solo favorece la capacidad de reproductiva de los ostiones adultos, sino que garantiza la disponibilidad de alimento de larvas y juveniles durante el ciclo reproductivo.

Lo anterior sugiere que esta especie de ostión necesita un suplemento constante de alimento para poder crecer y madurar. Por lo tanto, se probó como hipótesis si la forma de alimentación continua o por pulsos favorece la maduración y crecimiento de *C. corteziensis* en cautiverio. Por un lado, esperábamos que como especie oportunista utilizará al máximo la disponibilidad de microalgas administrada de forma continua, pero por otro, los ostiones son organismos que habitan en la zona intermareal, donde constantemente están expuestos a variaciones de disponibilidad de alimento por el ritmo de las mareas. Los resultados de este experimento muestran que el sistema de alimentación por pulsos favoreció la maduración de los ostiones, ya que sólo se obtuvieron ovocitos pre- y vitelogenicos y el ACG tendió a ser mayor en los ostiones alimentados por pulsos que con el sistema continuo. En contraste, los ostiones alimentados usando el sistema continuo no presentaron ovocitos vitelogenicos, pero sí abundantes gonias y ovogonias en comparación a los

ostiones alimentados por pulsos. Estos resultados fueron comprobados en un experimento posterior con una duración de dos meses, en el cual dos grupos de ostiones (n=50 por tratamiento) fueron alimentados por sistemas similares (continuo vs. por pulsos), y de los cuales solo se obtuvieron organismos maduros e incluso desoves en ostiones alimentados por pulsos (Ramírez, J.L. comunicación personal).

El incremento en el desarrollo de las gónadas de los ostiones alimentados por pulsos no afectó el crecimiento y la supervivencia durante el tiempo de experimentación. Esto sugiere que los ostiones no se encontraron en condiciones sub-óptimas de alimentación en que se vieran forzados a canalizar energía destinada al crecimiento para la maduración. Por el contrario, los ostiones alimentados por el sistema continuo no maduraron y mostraron la misma supervivencia.

Por otro lado, los ostiones alimentados con el sistema por pulsos acumularon mayor cantidad de lípidos que aquellos que fueron alimentados por el sistema continuo, incluso se encontró una tendencia no significativa a acumular mayor cantidad de ácidos grasos en la fracción de lípidos neutros (acilglicéridos). En un estudio similar, Robinson (1992b) no encontró diferencias significativas en la composición de ácidos grasos de los ostiones adultos de *C. gigas* alimentados de manera continua como o en pulsos. De la misma manera, no se observaron diferencias significativas en la cantidad de carbohidratos en ostiones alimentados con dichos sistemas (Robinson, 1992b), tal y como se observó en el presente experimento. En este experimento, ambos grupos de ostiones recibieron la misma cantidad y calidad de microalgas y emulsiones de lípidos. Por lo tanto, la mayor acumulación de lípidos en los tejidos de los ostiones alimentados por pulsos, sin que se observara movilización de carbohidratos que podrían ser usados para lipogénesis, sugiere

que estos ostiones utilizaron más eficientemente la energía contenida en la dieta que los ostiones alimentados con el sistema continuo.

El estímulo de la alimentación se activa con la disponibilidad de alimento, por lo que se ha observado que los ostiones que son alimentados de manera continua permanecen abiertos 94% del tiempo, mientras que cuando no son alimentados solo permanecen abiertos el 35% del tiempo y la actividad de las valvas se incrementa únicamente durante el periodo de alimentación (Higgins, 1981a). Así, cuando se suministra alimento (microalgas) durante todo el día pero en cantidades pequeñas, los ostiones incrementan su actividad de filtración durante largos periodos de tiempo, lo cual podría estar produciendo un desgaste energético. Epifanio y Ewart (1977) proponen que los ostiones de *C. virginica* deben ser alimentados con sistemas discontinuos que permitan periodos de reposo en la actividad de filtración. Por su parte, Langton y McKay (1976) concluyeron que los ostiones que son alimentados con sistemas discontinuos incrementan su actividad en general durante la alimentación, pero después del estímulo inicial el metabolismo y desgaste energético disminuye, lo cual posiblemente favorezca su crecimiento. Por lo tanto, un sistema de alimentación continuo con una baja concentración de microalgas puede estar forzando a *C. corteziensis* a alimentarse constantemente, lo cual puede incrementar la demanda de energía y con ello usar menos eficientemente la energía ingerida o acumulada en los tejidos. Lo anterior comprometería la acumulación de reservas en tejidos, entre ellos lípidos, que es necesario para la maduración en *Argopecten circularis* (Arjona et al., 2008) y *C. gigas* (Deslous y Héral, 1988; Li et al., 2000).

En relación al sistema inmunológico, se encontró que el número y tipo de hemocitos fue similar entre ambos sistemas de alimentación (continuo vs. pulsos). Sin embargo, la

producción de anión superóxido (PAS) fue mayor en los hemocitos de los ostiones que fueron alimentados con el sistema por pulsos, en comparación al continuo. El incremento en la respuesta inmune se presentó aún si los organismos alimentados con el sistema por pulsos estaban en mayor estado de maduración. Lo anterior concuerda con lo observado por Delaporte y colaboradores (2007), quienes reportaron mayor producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en ostiones *C. gigas* que mostraron mayor maduración.

En general se considera que cuando la capacidad oxidativa de los hemocitos es estimulada *in vitro* con agentes como la laminarina, la producción de PAS resultante representa el potencial total del sistema inmunológico (Song y Hsieh, 1994; Bachère et al., 1995). Por lo tanto, el incremento de la PAS en los hemocitos de los ostiones alimentados con el sistema por pulsos sugiere que probablemente estos se encontraban en mejores condiciones para enfrentar agentes patógenos. Lo anterior se ha observado en la mayor capacidad oxidativa de los hemocitos estimulados con zymosan en ostiones infectados con *Perkinsus marinus*, en comparación con ostiones no infectados (Anderson, 1999). Por otro lado, se ha especulado que la disminución de la capacidad oxidativa de los hemocitos disminuye en términos generales la resistencia, y con ello la susceptibilidad de los ostiones a las enfermedades (Boyd y Burnett, 1999).

Los mejores resultados se obtuvieron con la alimentación discontinua, la cual tiene importantes implicaciones prácticas para el acondicionamiento de reproductores de *C. corteziensis*, aunque es necesario confirmar estos resultados en un experimento más prolongado y donde se evalué la capacidad reproductiva.

#### 4.9 Conclusiones

- La maduración y acumulación de lípidos fue mayor en los ostiones *C. corteziensis* alimentados con el sistema por pulsos que con el sistema continuo. Dicha maduración no fue a expensas del crecimiento y supervivencia, indicando que los organismos no estaban estresados.
- La capacidad de respuesta inmune, expresada en términos de producción de anión superóxido, fue mayor en el sistema por pulsos, lo que a su vez es otro indicador de que los ostiones se encontraban en condiciones fisiológicas adecuadas.
- Las ventajas de la alimentación por pulsos se relacionan con la alimentación discontinua que ocurre en condiciones naturales e implican probablemente una mayor eficiencia para la obtención de energía a partir del alimento.

## 5. QUINTO CAPÍTULO

Efecto del ARA (20:4 $n$ -6) en la maduración y sistema inmunológico de *C. corteziensis*



## 5.1 Diseño experimental

Con base en los resultados del experimento anterior, las condiciones de aclimatación y maduración fueron las mismas, los ostiones fueron alimentados usando un solo pulso con el recambio de agua con *I. galbana* (T-ISO) a una ración de  $4 \times 10^9$  células  $\times$  ostión  $\times$  día, la cual equivale al 5% de biomasa de microalgas en peso seco en relación al peso inicial de lo ostiones en peso seco. En este experimento, la ración diaria de microalga se complementó con emulsiones de lípidos con tres diferentes proporciones de ácido araquidónico (ARA), las cuales se preparon mezclando las emulsiones (A: ICES 0/-/C, B: ICES 30/0.6/C, y C: emulsión rica-ARA; Anexo E) en una proporción (1A; 1A:1B; y 2B:1C) para obtener 3 emulsiones con diferentes proporciones (0, 1 y 9%) de ARA del total de ácidos grasos. La composición de ácidos grasos de las emulsiones y de la microalga *I. galbana* (T-ISO) se muestran en la Tabla XVI. El muestreo se realizó como en el capítulo anterior.

Tabla XVI. Ácidos grasos (% del total) y composición bioquímica de *Isochrysis galbana* (T-ISO) y tres emulsiones con diferente proporción de ARA

	<i>I.galbana</i> T-ISO	Emulsiones		
		0%	1%	9%
<i>Ácidos grasos</i>				
14:0	0.2	41.0	20.1	4.3
16:0	8.9	23.3	18.0	14.1
18:0	0.3	6.3	4.1	4.0
18:1 $n$ -9	11.0	15.4	15.0	18.0
18:1 $n$ -7	1.5	-	2.0	2.0
20:1 $n$ -9	2.4	0.1	1.0	1.0
18:2 $n$ -6	6.1	13.0	10.2	12.0
18:3 $n$ -3	8.7	1.2	1.4	2.0
20:4 $n$ -6	0.2	-	1.0	9.0
20:5 $n$ -3	1.1	-	13.0	15.0
22:6 $n$ -3	28.1	-	9.0	11.0
$\Sigma$ SAT.	10.0	70.3	43.3	24.0
$\Sigma$ MONO	18.0	16.0	22.1	26.3
$\Sigma$ PUFA	71.4	14.1	35.0	50.0
<i>Composición bioquímica</i>				
Proteínas (%)	73.9			
Carbohidratos (%)	4.7			
Lípidos (%)	21.5			

La composición de ácidos grasos de *I. galbana* (T-ISO) se obtuvo durante la fase estacionaria del cultivo (3er día). Los datos están expresados como media  $\pm$  error estándar.  $\Sigma$ Sat=total de ácidos grasos saturados,  $\Sigma$ MONO= total de ácidos grasos mono-insaturados,  $\Sigma$ PUFA=total de ácidos grasos poli-insaturados.

## 5.2 Análisis estadísticos

Los resultados se procesaron por un análisis de varianza unifactorial (ANOVA), utilizando como variable independiente el nivel de ARA en la dieta (3 niveles: 0, 1 y 9%).

El resto de los análisis se realizaron como en el capítulo anterior.

## 5.3 Resultados

### 5.3.1 Supervivencia y morfometría

Ni la supervivencia, ni ninguna de las variables morfométricas (peso total, peso de la biomasa, longitud y ancho) fueron significativamente diferentes en relación al contenido de araquidónico (ARA) en la dieta (Tabla XVII).

Tabla XVII. Supervivencia y morfometría de los ostiones *C. corteziensis* alimentados con *I. galbana* (T-ISO) y tres emulsiones con diferentes proporciones (0, 1 y 9%) de ARA.

	0%	1%	9%	P
Supervivencia (%)	75.0±14.4	66.7±8.3	75.0±14.4	0.990
Peso total (g)	66.3±7.8	57.6±3.1	53.3±3.2	0.792
Biomasa (g)	8.4±0.7	7.1±0.4	7.3±1.0	0.838
Longitud (cm)	7.9±0.6	6.7±0.3	6.9±0.3	0.828
Ancho (cm)	4.9±0.3	5.1±0.3	4.5±0.1	0.917

Los resultados están expresados en media ± error estándar y los cuales fueron analizados por ANOVA unifactorial por dieta,  $P < 0.05$ . Las medias se compararon por análisis de Tukey, las letras indican las diferencias significativas. La supervivencia se analizó con una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y una prueba de comparaciones múltiple no paramétrica de Tukey. Los valores de porcentaje fueron transformados a arcoseno antes de los análisis estadísticos, aunque sólo se muestran los resultados en sus valores originales.

### 5.3.2 Área de cobertura gonadal (ACG)

Se encontraron diferencias significativas en el ACG en relación al contenido de ARA en la dieta. Los ostiones alimentados con 1% de ARA tuvieron mayor ACG, seguido de los ostiones que fueron alimentados con el 9% de ARA en la dieta (Fig. 48).

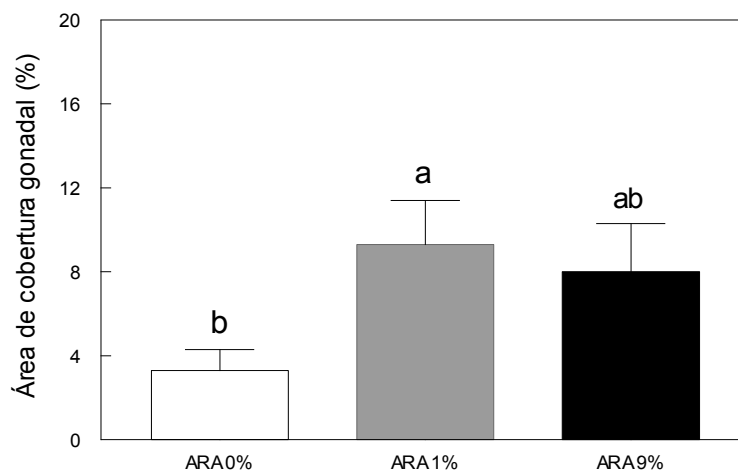


Fig. 48 Área de cobertura gonadal (ACG) (%) de los ostiones *C. corteziensis* alimentados con *I. galbana* (T-ISO) y tres emulsiones con diferentes proporciones (0, 1 y 9%) de ARA. Los resultados están expresados en media  $\pm$  error estandar y se analizó con una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y una prueba de comparaciones múltiple no paramétrica de Tukey, las letras indican las diferencias significativas.

### 5.3.3 Proporción de células reproductivas

Se observaron diferencias significativas en la proporción de células reproductivas en relación a la suplementación de ARA en la dieta ( $P < 0.01$ ). Los ostiones alimentados con la dieta suplementada con la emulsión de 9% de ARA tuvieron significativamente menor cantidad de gonias y mayor número de ovocitos previtelogenicos y vitelogenicos (Fig. 49).

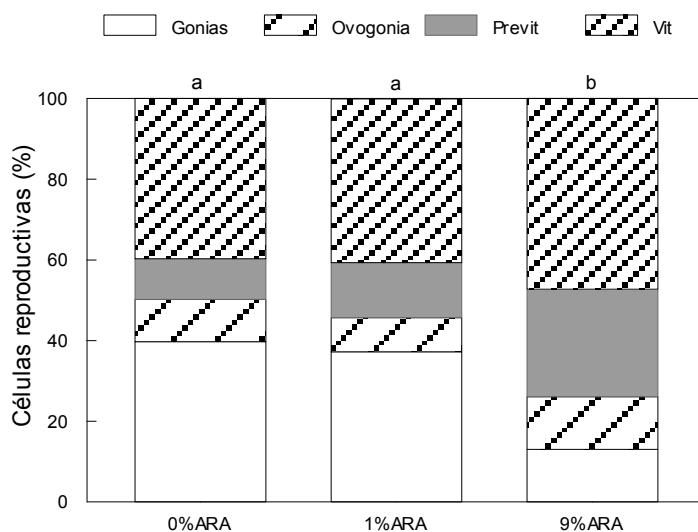


Fig. 49 Proporción de células reproductivas (%) de los ostiones *C. corteziensis* alimentados con *I. galbana* (T-ISO) y tres emulsiones con diferentes proporciones (0, 1 y 9%) de ARA. La proporción de células reproductivas se compararon usando tablas de contingencia (40/60, 37/63 y 13/87 para ARA 0, 1 y 9%, respectivamente; de gonias, vs. células diferenciadas). Las letras indican las diferencias significativas ( $X_2= 23.3$ ,  $P<0.001$ ).

#### 5.4 Composición bioquímica en tejidos

La concentración de proteínas fue significativamente mayor en los ostiones alimentados con la dieta suplementada con 1% de ARA (Tabla XVIII). No se observaron diferencias significativas en el resto de los componentes bioquímicos de los tejidos de los ostiones en relación a la suplementación de ARA en la dieta.

Tabla XVIII. Concentración de proteína, carbohidratos y lípidos totales ( $\text{mg g}^{-1}$  peso seco) en los tejidos de los ostiones *C. corteziensis* alimentados con *I. galbana* (T-ISO) y tres emulsiones con diferentes proporciones (0, 1 y 9%) de ARA.

	0%	1%	9%	P
Proteínas ( $\text{mg g}^{-1}$ )	617±27b	753±71a	592±29b	0.044
Carbohidratos ( $\text{mg g}^{-1}$ )	254±22	209±19	246±025	0.313
Lípidos totales ( $\text{mg g}^{-1}$ )	124±12	120±9	114±15	0.837

Los resultados están expresados en media ± error estándar. Ver tabla XVII para análisis estadísticos.

### 5.5 Composición bioquímica en hemolinfa

No se observaron diferencias significativas en la composición bioquímica de la hemolinfa de los ostiones en relación a la suplementación de ARA en la dieta (Tabla XIX).

Tabla XIX. Composición bioquímica en la hemolinfa de los ostiones *C. corteziensis* alimentados con *I. galbana* (T-ISO) y tres emulsiones con diferentes proporciones (0, 1 y 9%) de ARA.

	0%	1%	9%	<i>P</i>
Proteínas (mg mL <sup>-1</sup> )	1.33±0.16	1.37±0.17	1.54±0.11	0.436
Glucosa (mg dL <sup>-1</sup> )	7.55±1.88	8.26±1.31	6.88±0.88	0.747
Triacilglicéridos (mg dL <sup>-1</sup> )	11.6±1.7	11.9±1.5	11.4±0.7	0.956
Hemocianina (mg mL <sup>-1</sup> )	0.85±0.12	1.02±0.13	0.97±0.12	0.580
Hemocianina/proteínas (%)	62.9±3.8	74.3±4.1	62.3±5.4	0.129

Los resultados están expresados en media ± error estándar. Ver tabla XVII para análisis estadísticos.

### 5.6 Concentración de ácidos grasos en la fracción de lípidos neutros y polares en tejidos

La concentración de los ácidos grasos 16:1 $n$ -7 y 18:3 $n$ -3 de la fracción de lípidos neutros fue mayor en los ostiones alimentados con el 9% de ARA en la dieta (Tabla XX). La concentración de 20:4 $n$ -6 incremento en la fracción neutra de los tejidos en relación al aumento en la dieta. No se observaron diferencias significativas en la composición de ácidos grasos de la fracción de lípidos polares en relación a la suplementación de ARA en la dieta.

Tabla XX. Concentración de ácidos grasos ( $\text{mg } 100\text{g}^{-1}$  peso húmedo) en la fracción de lípidos neutros y polares de los ostiones *C. corteziensis* alimentados con *I. galbana* (T-ISO) y tres emulsiones con diferentes proporciones (0, 1 y 9%) de ARA.

	0%	1%	9%	P	
Lípidos neutros	16:0	139±29	190±44	300±57	N.S.
	18:0	35.5±6.4	51.4±12.3	62.1±11.3	N.S.
	16:1n-7	50.7±19.0a	48.2±11.8a	115±20.9b	P<0.05
	18:1n-9	23.3±3.2	36.4±11.3	50.7±12.2	N.S.
	18:1n-7	62.1±20.3	66.7±14.6	117±22.9	N.S.
	18:2n-6	18.9±3.8	25.5±8.2	43.1±7.6	N.S.
	18:3n-3	18.0±3a	19.3±4.2a	39.5±7.0b	P<0.05
	20:4n-6	58.5±15.4a	69.2±7.6ab	106±15b	P<0.05
	20:5n-3	106±29	129±36	214±32	N.S.
	22:6n-3	117±24	162±50	243±60	N.S.
	Σ Total	823±177	1036±250	1665±273	N.S.
	N3/N6	2.9±0.2	2.9±0.4	3.0±0.3	N.S.
Lípidos polares	16:0	31.0±9.5	30.6±6.2	28.5±4.7	N.S.
	18:0	14.5±4.0	14.8±2.9	13.2±1.6	N.S.
	16:1n-7	5.5±1.6	5.5±1.4	6.0±0.9	N.S.
	18:1n-9	6.9±2.4	5.8±0.7	6.9±1.9	N.S.
	18:1n-7	12.7±3.0	12.1±3.6	12.8±1.7	N.S.
	18:2n-6	5.3±1.8	3.9±0.5	5.7±1.7	N.S.
	18:3n-3	2.6±0.9	2.2±0.4	2.3±0.4	N.S.
	20:4n-6	24.1±6.5	23.9±6.3	23.2±3.0	N.S.
	20:5n-3	20.3±5.2	21.5±6.5	17.4±2.0	N.S.
	22:6n-3	24.4±7.3	24.7±5.7	21.0±2.6	N.S.
	Σ Total	192±53	191±45	181±26	N.S.
	N3/N6	1.5±0.03	1.7±0.2	1.4±0.2	N.S.

Los resultados están expresados en media ± error estándar. Ver tabla XVII para análisis estadísticos.

## 5.7 Sistema inmunológico

### 5.7.1 Conteo total de hemocitos (CTH) y proporción de granulocitos

No se observaron diferencias significativas en el CTH en relación a la suplementación de ARA en la dieta (Fig. 50A). Sin embargo, la proporción de granulocitos

fue significativamente mayor en los ostiones alimentados con la dieta suplementada con el 1% ARA, y menor con el 9% de ARA (Fig. 50B).

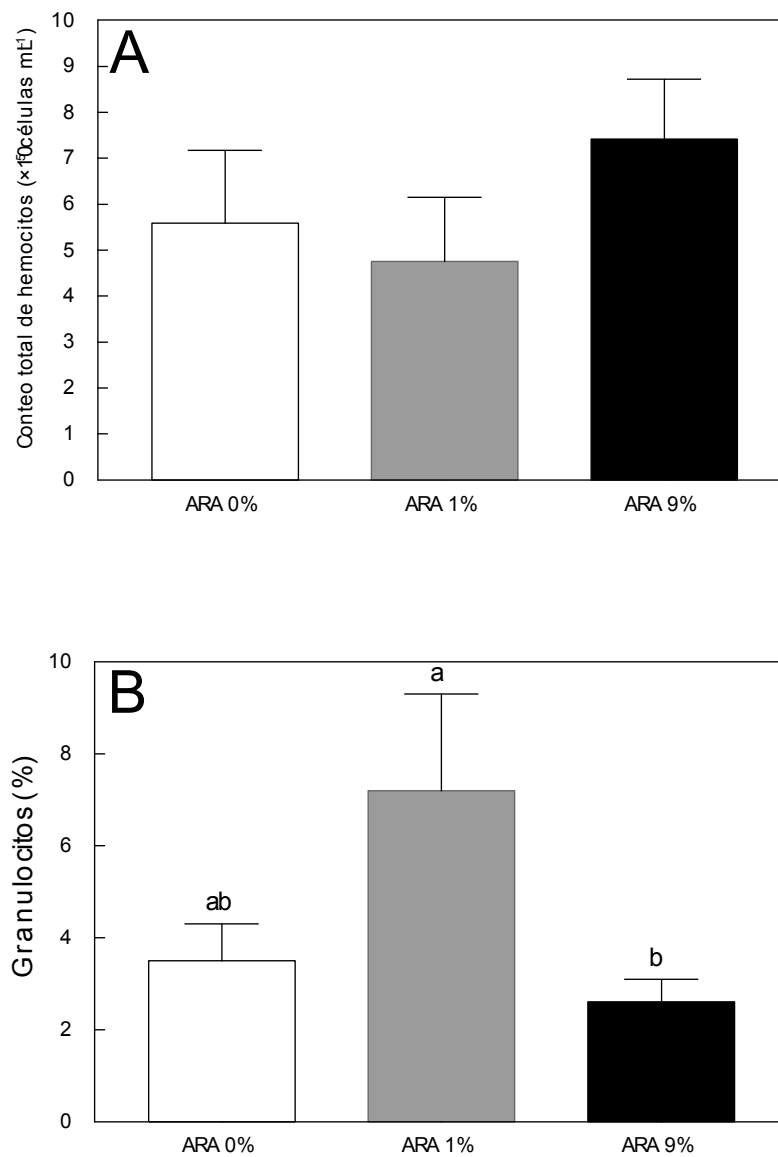


Fig. 50 Conteo total de hemocitos ( $\times 10^5$  células mL $^{-1}$ ) (A) y proporción de granulocitos (%) B) en los ostiones *C. corteziensis* alimentados con *I. galbana* (T-ISO) y tres emulsiones con diferentes proporciones (0, 1 y 9%) de ARA. Los resultados están expresados en media  $\pm$  error estándar. Ver tabla XVII para análisis estadísticos.



### 5.7.2 Producción de anión superóxido (PAS) en hemocitos totales

No se observaron diferencias significativas en relación a la PAS en hemocitos basales (Fig. 51A) y estimulados (Fig. 51B).

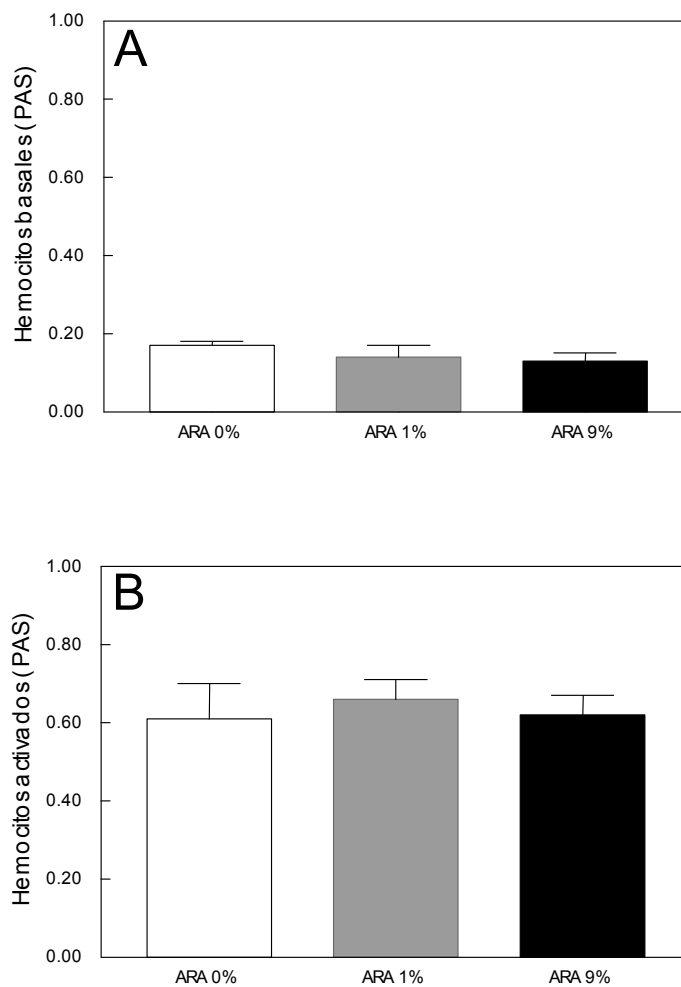


Fig. 51 PAS en hemocitos basales (A) y estimulados (B) de los ostiones *C. corteziensis* alimentados con *I. galbana* (T-ISO) y tres emulsiones con diferentes proporciones (0, 1 y 9%) de ARA. Los resultados están expresados en media  $\pm$  error estándar. Ver tabla XVII para análisis estadísticos.

La producción de anión superóxido (PAS) en relación al conteo total de hemocitos fue significativamente mayor en los ostiones alimentados con la dieta suplementada con 1% ARA (Fig. 52).

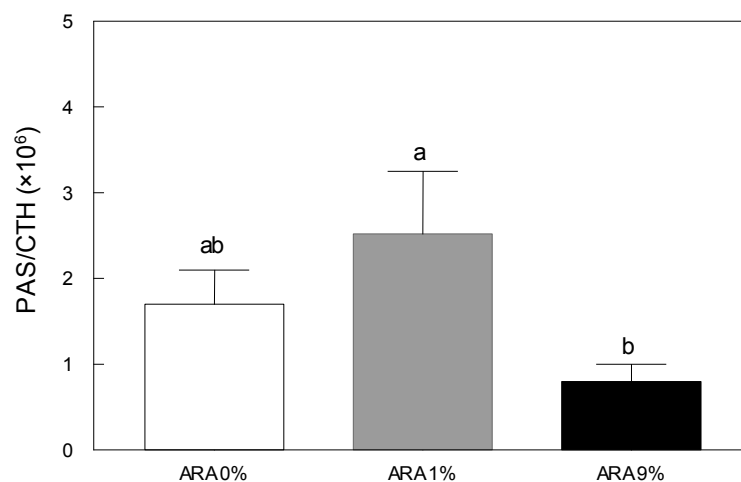


Fig. 52 Producción de anión superóxido (PAS) en relación al conteo total de hemocitos ( $\times 10^6$ ) en los ostiones *C. corteziensis* alimentados con *I. galbana* (T-ISO) y 3 emulsiones con diferentes proporciones (0, 1 y 9%) de araquidónico (ARA). Los resultados están expresados en media  $\pm$  error estándar. Ver tabla XVII para análisis estadísticos.

## 5.8 Discusión

La suplementación de emulsiones con diferentes proporciones de ARA en la dieta tuvo diferentes efectos en la maduración y en el sistema inmunológico de *C. corteziensis*. Los ostiones alimentados con el suplemento de 1% ARA en la dieta mostraron una mayor ACG en comparación con los que fueron alimentados con 0% ARA en la dieta, mientras que en los que fueron alimentados con el suplemento de 9% ARA se obtuvieron con valores intermedios. Sin embargo, la capacidad de maduración (estimada en relación al desarrollo de los ovocitos) de los ostiones alimentados con 9% ARA fue mayor, ya que mostraron un mayor número de ovocitos en previtelogénesis y en vitelogénesis. El incremento en el ACG está asociado al aumento en el número de los ovocitos como al tamaño de estos. Por la tanto, es un índice tanto de fecundidad como de capacidad de entrar en maduración. Un incremento de ACG sin que simultáneamente incremente el tamaño o la maduración (vitelogénesis) de los ovocitos implicaría que el suplemento de 1% ARA en la dieta resultara favorable para incrementar el número de ovocitos y por ende, la fecundidad. En contraste, los ostiones alimentados con 9% ARA probablemente presenten menor fecundidad total, pero mayor avance de maduración. Esto podría ser indicativo de una mayor capacidad de presentar desoves parciales. Temperaturas más frías, y posiblemente mayor disponibilidad de fitoplancton, parece favorecer un mayor número (fecundidad) y menor talla de ovocitos (menor crecimiento de gónada) en poblaciones de *C. gigas* que se encuentra en Holanda al compararlas con poblaciones de Francia (Cardoso et al., 2007).

No se observaron diferencias significativas en la supervivencia, crecimiento, y composición bioquímica de los ostiones, incluyendo la composición de fosfolípidos. Esto

puede deberse al tiempo de experimentación, que fue de 3 semanas y que probablemente a pesar de las diferencias en la composición bioquímica de las dietas, principalmente de ácidos grasos, no afectaron de manera significativa el desempeño de los ostiones. En estudios similares donde se evaluaron los efectos de emulsiones de lípidos enriquecidas con DHA y EPA en la maduración y algunos parámetros inmunológicos en *C. gigas* (respectivamente), el tiempo de experimentación fue de 7 a 8 semanas (Caers et al., 2002; Delaporte et al., 2007). En ambos trabajos, los efectos de las emulsiones se observaron hasta la cuarta semana de alimentación. Por otro lado, Delaporte et al. (2006b) encontró efectos a las dos semanas de suplementación de ARA. Por otro lado, los ácidos grasos de los ostiones en el presente experimento fueron cuantificados en tejidos totales, lo cual pudo haber minimizado las diferencias en relación a la acumulación en algún tejido específico. Aunado a lo anterior, en el presente experimento se usaron emulsiones compuestas principalmente por triacilglicéridos (ICES, 1997), esto en comparación a las soluciones de los ácidos grasos libres en etanol utilizados por Segueineau et al. (2005) y Delaporte et al. (2006b), los cuales se ha propuesto que son absorbidos directamente a través de las branquias y el manto (Bunde y Fried, 1978; Delaporte et al. 2006b).

Los niveles de la prostaglandina PGE<sub>2</sub> (reportados en el anexo G) incrementaron con los niveles de suplementación de ARA en la dieta de los ostiones, principalmente en los que fueron alimentados con el suplemento de 9% ARA (ver anexo G). El ARA es un precursor de las prostaglandinas de la serie II (PGE<sub>2</sub>) (Morse et al., 1977; Rowley et al., 2005), por lo que un incremento de PGE<sub>2</sub> en ostiones alimentados con 9% de ARA podría indicar mayor síntesis de estas prostaglandinas. Sin embargo, no se obtuvieron diferencias significativas en la concentración de ARA en los fosfolípidos (lípidos polares) de los

ostiones entre las dietas. Se considera que los niveles de ARA en los fosfolípidos se mantienen estables, en comparación con EPA por ejemplo, como se ha observado para *P. maximus* (Soudant et al., 1996a; 1996b) y *C. gigas* (Soudant et al., 1999), dado que el ARA tiene una función reguladora mientras que el EPA tiene una función principalmente energética. Si bien, la síntesis de prostaglandinas se lleva a cabo a partir de ARA en lípidos estructurales (i.e. fosfatidilinositol), es posible que éstos se sintetizen a partir del ARA de los lípidos de reservas, manteniendo con ello constantes los los niveles de ARA de lípidos estructurales (Racotta et al., 2008). Aunado a lo anterior, es probable que la concentración de ARA en los fosfolípidos se mantuviera relativamente sin cambios porque solamente se requieren de pequeñas cantidades, del orden de microgramos (Bergström et al., 1964), para la síntesis de PGE<sub>2</sub>.

El ARA se encuentra en altas cantidades en los lípidos estructurales (membranas), particularmente en el fosfolípido fosfatidilinositol, tal y como se ha observado en *C. gigas* (Soudant et al., 1999) y *N. subnodosus* (Palacios et al., 2005). Sin embargo, lo anterior contrasta con lo observado en *C. corteziensis*, ya que tanto en las poblaciones silvestres de Laguna de Ceuta (primer capítulo), como en los ostiones alimentados con la suplementación de 0% ARA, la concentración del ARA fue mayor en la fracción de lípidos neutros que en la polar, lo cual sugiere que los acilglicéridos pueden ser un importante reservorio de este ácido graso. Esto concuerda con que los ostiones alimentados con 9% de ARA, presentaron mayores niveles de ARA en los lípidos de reservas y también presentaron mayores niveles de PGE<sub>2</sub>.

La síntesis de prostaglandinas está asociada a la gametogénesis, vitelogénesis y liberación de gametos (desoves) de distintas especies de moluscos bivalvos (Ono et al.,

1982; Matsutani y Nomura, 1987; Osada y Nomura, 1990; Martínez et al., 1996; 1999; 2000). En *C. gigas*, se ha observado que la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  se mantuvo constante durante la gametogénesis, pero varió durante la parte más avanzada de la maduración y en la fase inicial del desove (Ono et al., 1982). En la almeja *A. purpuratus* se observó una correlación inversa entre el índice gonadal y la concentración de las prostaglandinas  $\text{PGE}_2$  y  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (Martínez et al., 1999). Aquí se observó que organismos alimentados con dieta alta en ARA presentaron una mayor concentración de  $\text{PGE}_2$  y un mayor avance de madurez gonádica.

Por otro lado, a pesar de que se ha descrito en invertebrados que el sistema inmunológico está regulado por las prostaglandinas (Stanley-Samuelson, 1994; Stanley y Miller, 2006), pocos son los trabajos que se han realizado con moluscos bivalvos. En *C. gigas* se propuso que el CTH, la cuenta de hemocitos, fagocitosis, capacidad oxidativa y adhesión de hemocitos, son afectados por la suplementación de ARA en la dieta, posiblemente a través de los niveles de prostaglandinas (Delaporte et al., 2003). En el presente trabajo, se observó una mayor producción de PAS en relación al conteo de hemocitos y mayor proporción de granulocitos en organismos alimentados con 1% de ARA, y valores menores en organismos alimentados con 9% de ARA, lo cual sugiere un efecto inhibitorio en la respuesta inmune a concentraciones altas de ARA, como se ha descrito para peces (Bell y Sargent, 2003).

## 5.9 Conclusiones

- La suplementación del ARA al 1% favoreció el crecimiento de las gónadas, sin embargo al 9% se observó un mayor número de ovocitos pre- y vitelogenicos de *C. corteziensis*. Aparentemente, los niveles de ARA afectan de forma diferencial la gametogenesis (fecundidad) y la vitelogénesis.
- La supervivencia, crecimiento y la acumulación general de reservas no fueron afectados por los niveles de ARA en la dieta.
- El marcaje de ARA de la dieta se observó únicamente en los lípidos de reserva pero no en los lípidos estructurales.
- Estos resultados sugieren que los niveles de 1% de ARA en la dieta resultan más apropiados para inducir la maduración, dado que mayores niveles pueden deprimir la respuesta inmune de *C. corteziensis*.

## VIII. Discusión general

El ostión de placer *C. corteziensis* tiene un amplio periodo reproductivo (Rodríguez-Jaramillo et al., 2008; presente tesis), lo cual sugiere que probablemente pueda ser madurado en condiciones de cautiverio prácticamente en cualquier época del año (primer capítulo). La amplitud del ciclo reproductivo de *C. corteziensis* está probablemente modulada la alta temperatura, mayor de 20°C, durante casi todo el año y mayor de 25 °C durante la primavera-verano, así como sostenida por la abundante y continua disponibilidad de alimento (niveles de clorofila a  $>1 \text{ mg m}^{-3}$  condiciones eutróficas, según Kahru et al., 2000). Aún observándose un ciclo reproductivo amplio, se identificaron dos principales periodos de maduración y desove, el primero de ellos ocurrió en la primavera y el segundo en el verano (Fig. 21). Ambos periodos de desoves se observaron cuando la temperatura se encontró arriba de los 27°C, aún si las reservas energéticas fueron mayores en la primavera e invierno. Así, se puede concluir que la vitelogénesis en esta especie ocurre a temperaturas superiores a los 20°C, pero los desoves probablemente están disparados por temperaturas superiores a los 27°C. Es de notar que el primer desove ocurrió cuando la temperatura presento un fuerte ascenso, por arriba de los 25°C mientras que el segundo ocurrió cuando la temperatura descendió, sugiriendo que cambios bruscos de temperatura hacia arriba o abajo pueden inducir el desove. Estos resultados concuerdan con la práctica, dado que el desove en esta especie se logra con cambios bruscos de temperatura (J.L. Ramírez, comunicación personal) que posiblemente generen un estado de estrés en el organismo, lo cual produce la liberación de gametos (Galtsoff, 1938). Este resultado sugiere que el acondicionamiento reproductivo en condiciones de cautiverio debe realizarse



preferentemente arriba de los 20°C pero por debajo de los 25°C, ya que es posible que a temperaturas superiores los ostiones desoven y para inducir el desove se debe de variar la temperatura en forma brusca entre 25°C y 30°C.

Después del segundo periodo de desove, *C. corteziensis* presenta una disminución de reservas energéticas que vuelven a incrementar durante el corto periodo de reposo sexual o quiescencia durante el invierno. Esto sugiere que el inicio de la gametogénesis está asociado a la alimentación a bajas temperaturas o preacondicionamiento, aún si este efecto no es tan evidente como el reportado para poblaciones de ostiones de zonas templadas como *C. gigas* (Samain et al., 2001; 2001). Por lo tanto, se sugiere para *C. corteziensis* un periodo considerablemente más corto de aclimatación o preacondicionamiento, antes de incrementar la temperatura y cantidad de alimento para inducir la vitelogénesis.

Los experimentos de maduración en laboratorio para esta especie se realizaron a temperaturas de 22 a 28°C como máximo, las cuales favoreció la acumulación de reservas (capítulo 3) y la vitelogénesis (capítulos 2, 4 y 5). Sin embargo, los ostiones se muestrearon en distintos lugares y meses, lo cual pudo haber ocasionado una respuesta diferente en el desempeño reproductivo (Tabla XXI).

Tabla XXI. Sitio de recolecta de ostiones, época en la que se realizaron los experimentos, dietas y sistemas utilizados en la reproducción de *C. corteziensis* en los capítulos de esta tesis.

Exp.	Origen ostiones	Meses de Exp.	Dieta	Sistema alimentación	Gametogénesis	Vitelogénesis
2	Camichín/Cuautla	Jul-Sept	100 % <i>C. gracilis</i>	Continuo		*
3	Camichín	Feb-Abr	90% <i>C. gracilis</i> +10% T-ISO	Continuo	*	
4	Camichín/Cuautla	Oct-Nov	100% T-ISO + emulsión de lípidos	Pulsos/Continuo	*	*
5	Camichín/Cuautla	Oct-Nov	100% T-ISO + emulsión de lípidos con 0, 1 9% de ARA	Pulsos	*	*

En relación a la cantidad de alimento, se probaron diferentes raciones que van de 2 a  $4 \times 10^9$  células  $\times$  ostión  $\times$  día durante el acondicionamiento reproductivo en cautiverio de *C. corteziensis*. A menor densidad celular se observó menor maduración gonadal (capítulo 3), mientras que con las mayores densidades ( $3-4 \times 10^9$  células  $\times$  día  $\times$  ostión) se observó desarrollo de la gónada y desoves (capítulo 2). Por lo tanto, se sugiere suministrar como mínimo el 5% de biomasa de microalgas en relación al peso inicial de los ostiones (ambos en peso seco) durante el acondicionamiento reproductivo de *C. corteziensis*; también se sugiere evaluar el desempeño reproductivo con cantidades superiores de alimento, con la finalidad de establecer la cantidad adecuada de alimento para inducir la maduración.

En relación a la calidad del alimento, se identificaron y cuantificaron en el tracto digestivo y conchas de los ostiones un número considerable de diatomeas, incluyendo algunas especies bentónicas; las cuales pueden encontrarse entre 67 y 70% en el tracto digestivo de *C. gigas* en un estuario de Japón (Kasim y Mukai, 2006). Por otro lado, la vitelogénesis de *C. corteziensis* ocurre durante el florecimiento de fitoplancton en la primavera, en el cual predominan las diatomeas (Ibarguen-Zamudio, 2006). Por esta razón se probaron dietas monoalgales y mixtas con las especies de diatomeas *C. gracilis* y *C. calcitrans*, para evaluar sus efectos en la maduración y desempeño reproductivo de *C. corteziensis* (capítulo 2). Los resultados mostraron que ambas especies de diatomeas favorecieron la maduración de hembras, pero que la vitelogénesis fue mayor con *C. gracilis*, además de únicamente esta especie sola o combinada con otras favoreció la maduración de machos. Se sugiere evaluar el efecto que esta microalga tiene sobre el desarrollo de gónada masculina en comparación con otras especies. La diferencia en la

maduración de *C. corteziensis* alimentados con estas dos especies de microalgas es interesante dado que la *C. calcitrans* es más rica en relación a su composición bioquímica general. *C. gracilis* no se caracteriza por tener una concentración alta de pigmentos o ácidos grasos. Es posible que la vitelogénesis se encuentre afectada no tanto por la cantidad absoluta de ácidos grasos y otros compuestos bioquímicos, sino por la relación entre compuestos que favorezcan procesos tales como la síntesis de prostaglandinas (relación ARA/EPA alta) o la oxidación de lípidos en relación al tipo o relación de pigmentos. Ambas especies tienen pared y espinas, pero *C. gracilis* es una especie más pequeña que tiene una relación mayor de pared/citoplasma, lo cual podría explicar su mayor contenido de materia inorgánica (cenizas). Por otro lado, el tamaño las frústulas de las diatomeas pudiera ocasionar daño mecánico en el tracto digestivo, o algún factor antinutricional o tóxico no identificado, como se ha descrito con ciertas variedades de *C. calcitrans* para otras especies de moluscos (Ragg et al., 2008).

En general, las diatomeas son reconocidas por su alto contenido de lípidos y particularmente por su contenido de EPA (Volkman et al., 1989), el cual aunado al DHA resultan de suma importancia en la reproducción y crecimiento de moluscos bivalvos (Ackman y Kean-Howie, 1995). Al evaluar los efectos de estos ácidos grasos (capítulo 3) en la maduración de *C. corteziensis* con tres diferentes relaciones de DHA/EPA (0.3, 0.8 y 1) variando la proporción de *C. gracilis* e *Isochrysis galbana* (T-ISO), las cuales contienen mayoritariamente EPA (12.1%) y DHA (28.1%), respectivamente; se encontró que la menor relación DHA/EPA (0.3 en la dieta con 90% de *C. gracilis*) favoreció la iniciación de la maduración y mayor acumulación de carbohidratos y lípidos. Se sugiere analizar la composición de ácidos grasos en los tejidos de estos organismos para evaluar si realmente

acumularon mayores proporciones de EPA. La mayor acumulación de reservas concuerda con lo observado en las poblaciones silvestres de *C. corteziensis*, en que las reservas energéticas como los carbohidratos y lípidos, y el EPA, tanto de lípidos neutros como polares, incrementan con el desarrollo de las gónadas hasta alcanzar valores máximos cuando los ostiones se encuentran maduros. Probablemente, estos nutrientes son obtenidos de la abundante disponibilidad de alimento, principalmente de las diatomeas (Ibarguen-Zamudio, 2006). Cabe mencionar que algunas de las especies de microalgas identificadas, tanto en los órganos como en el hábitat de los ostiones, ya fueron asiladas y aclimatadas para su producción masiva por ceparios comerciales, donde pueden ser adquiridas para su evaluación como potencial alimento para la nutrición de *C. corteziensis* en condiciones de cautiverio. Se sugiere evaluar desde el punto de vista de la composición bioquímica todas aquellas especies de microalgas que hayan resultado con potencial para la alimentación de *C. corteziensis*, con la finalidad de corroborar estos resultados así como identificar otros componentes que favorezcan la maduración de los ostiones en cautiverio.

*C. gracilis* además tiene una alta proporción de ARA. En el capítulo 5, se analizó el efecto de altas concentraciones de ARA en la dieta de *C. corteziensis*, con emulsiones con distintas proporciones de ARA. Se demostró que las dietas a base de microalgas para *C. corteziensis* pueden ser enriquecidas con emulsiones de lípidos, las cuales pueden ser suministradas en raciones menores al 10% de la biomasa de las microalgas en relación al peso de los ostiones, ambos en peso húmedo (capítulo 4 y 5). Raciones superiores al 10% de lípidos provocan que los ostiones se cierran y dejen de alimentarse. Por otro lado, el suplemento de emulsiones ricas en ARA (>9% del total de ácidos grasos) pueden incrementar el desempeño reproductivo de *C. corteziensis*, probablemente por el

incremento en los niveles de prostaglandinas de la serie 2 (PGE<sub>2</sub>, capítulo 5). Sin embargo, a esos altos niveles de ARA, existe cierta inhibición de la capacidad de respuesta del sistema inmunológico, por lo que posiblemente se incremente la susceptibilidad de los ostiones a microorganismos patógenos, que eventualmente puede debilitarlos hasta su muerte. Lo anterior puede deberse al incremento en PGE<sub>2</sub> obtenido con esta dieta. Por lo tanto, se sugiere tener en cuenta la provisión en exceso de ARA en la dieta, tanto en las microalgas como a través de suplementos inertes como las emulsiones de lípidos.

La forma de alimentación, fue otro factor que influyó en el desempeño de los ostiones de *C. corteziensis* (capítulo 4). Esto fue notorio al comparar el tradicional sistema continuo por goteo con un sistema por pulsos en que el alimento se ofreció en una sola ración diaria. Este sistema, a diferencia del continuo, favoreció el incremento de la supervivencia, acumulación de lípidos, la maduración y la respuesta inmune, posiblemente ocasionado por la simulación de los efectos de las mareas a los que se encuentran sometidos en su hábitat natural. Sin embargo, este sistema de alimentación tiene que ser evaluado durante un periodo de tiempo mayor hasta lo lograr la completa maduración con la finalidad de evaluar y comparar con sistemas tradicionales de alimentación, el tiempo total de maduración, fecundidad, viabilidad de larvas, tasas de fijación y rendimiento de semillas.

## IX Conclusiones

- La amplitud del ciclo reproductivo de *C. corteziensis* sugiere que probablemente pueda madurarse en cautiverio durante una larga temporada del año.
- El acondicionamiento reproductivo para inducir la vitelogénesis de *C. corteziensis* debe de realizarse entre los 20 y 25°C, y con al menos el 5% de biomasa de algas en relación al peso inicial de los ostiones, ambos en peso seco. El desove es estimulado por cambios de temperatura, principalmente entre los 25 y 30°C.
- Se sugiere la utilización de microalgas diatomeas, particularmente *C. gracilis*, para la maduración de *C. corteziensis*. Así mismo se recomienda evaluar otras especies de microalgas, particularmente aquellas que fueron identificadas en los órganos y hábitat de los ostiones.
- La utilización del método alterno de alimentación por pulsos o de una ración al día favoreció el desempeño reproductivo de los ostiones, sin embargo se sugiere probar este sistema por tiempos prolongados, y evaluar sus efectos en la fecundidad y desempeño de larvas y semillas.
- La suplementación de emulsiones de lípidos en la dieta <10% de la biomasa de microalgas en relación al peso de los ostiones (ambos en peso húmedo) puede ser utilizada para *C. corteziensis*, en caso de querer suministrar nutrientes particulares.

- A partir de los resultados tanto de campo como de laboratorio, los nutrimentos que principalmente favorecen y determinan la maduración de *C. corteziensis* son los carbohidratos, los lípidos totales y en particular el EPA.
- La suplementación de altas cantidades de ARA en la dieta en exceso del ARA en la dieta de *C. corteziensis* puede favorecer la maduración, sin embargo podría comprometer la capacidad de respuesta del sistema inmunológico, lo cual podría inducir la mortalidad de los ostiones.

## Bibliografía

- Ackman, R.G., y Heras, H. 1997. Recent applications of Iatroscan TLC–FID methodology. En: McDonald, R.E., Mossoba, M.M. (Eds.). *New Technology and Applications in Lipid Analysis*. AOCS Press, Champaign, Illinois, pp. 325–340.
- Ackman, R.G. y Kean-Howie, J. 1995. Fatty acids in aquaculture: are w3 fatty acids always important? En: Lim, C. y Sessa, D.J. (Eds.). *Nutrition and Utilization Technology in Aquaculture*. AOCA Press, Champaign, IL, 82-104 pp.
- Albentosa, M; Fernandez-Reiriz, M.J., Perez-Camacho, A. y Labarta, U. 1999. Growth performance and biochemical composition of *Ruditapes decussatus* (L.) spat fed on microalgal and wheatgerm flour diets. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 232, 23-37.
- Allen, S.K. Jr. y Downing, S.L. 1986. Performance of triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg). I. Survival, growth, glycogen content and sexual maturation in yearlings. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 102, 197-208.
- Allen, W.V. y Conley, H. 1982. Transport of lipids in the blood of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Comp. Biochem. Physiol.* 71B, 201-207.
- Alonso-Pérez, F., Ruiz-Luna, A., Turner, J., Berlanga-Robles, C.A. y Mitchelson-Jacob, G. 2003. Land cover changes and impact of shrimp aquaculture on the landscape in the Ceuta coastal lagoon system, Sinaloa, Mexico. *Ocean Coast. Manage.* 46, 583-600.
- Alyakrinskaya, I.O. 2001. The dimensions, characteristics and functions of the crystalline style of molluscs. *Biol. Bull.* 28, 523-535.
- Anderson, R.S. 1999. *Perkinsus marinus* secretory products modulate superoxide anion production by oyster (*Crassostrea virginica*) haemocytes. *Fish Shellfish Immunol.* 9, 51-60.
- Andrews, A.C. 1948. Oysters as food in Greece and Rome. *The Classical Journal* 43, 299-303.
- Angell, C. L. 1986. *The Biology and Culture of Tropical Oysters*. ICLARM Contribution. International Center for Living Aquatic Resources Management. Manila, Philippines, No. 315, 1-37.
- Arala-Chavez, M. y Sequeira, T. 2000. Is there any of adaptive immunity in invertebrates? *Aquaculture* 191, 247-258.



- Arellano Martínez, M. 2005. Características ecofisiológicas de la reproducción de *Nodipecten subnodosus* (Sowerby, 1835) (Pectinidae) en la laguna Ojo de Liebre, B.C.S., México. Tesis de Doctorado. CICIMAR. 1-153.
- Arjona, O., Millan, A., Ibarra, A.M. y Palacios, E. 2008. Muscle and roe lipid composition in diploid and triploid scallops. *J. Food Lipids* 15, 407-419.
- Arumugan, M., Romestand, B. y Torreilles, J. 2000. Nitrite released in haemocytes from *Mytilus galloprovincialis*, *Crassostrea gigas* and *Ruditapes decussatus* upon stimulation with phorbol myristate acetate. *Aquat. Living Resour.* 13, 173-177.
- Babarro, J.M.F., Fernández Reiriz, M.J. y Labarta, U. 2001. Influence of preservation techniques and freezing storage time on biochemical composition and spectrum of fatty acids of *Isochrysis galbana* clone T-ISO. *Aquacult. Res.* 32, 565-572.
- Bacca, H., Huvet, A., Fabioux, C., Daniel, J.-Y., Delaporte, M., Pouvreau, S., Van Wormhoudt, A. y Moal, J. 2005. Molecular cloning and seasonal expression of oyster glycogen phosphorylase and glycogen synthase genes. *Comp. Biochem. Physiol.* 140B, 635-646.
- Bachère, E., Mialhe, E., Noël, D., Boulo, V., Morvan, A. y Rodríguez, J. 1995. Knowledge and research prospects in marine mollusc and crustacean immunology. *Aquaculture* 132, 17-32.
- Bachère, E., Chagot, D. y Grizel H. 1988. Separation of *Crassostrea gigas* hemocytes by density gradient centrifugation and counterflow centrifugal elutriation. *Dev. Comp. Immunol.* 12, 549-559.
- Bachère, E., Gueguen, Y., González, M., de Lorgeril, J., Garnier, J. y Romestand, B. 2004. Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. *Immunol. Rev.* 198, 149-168.
- Bahr, L.M. y Hillman, R.E. 1967. Effects of repeated shell damage on gametogenesis in the American oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Proc. Natl. Shell-fish. Assoc.* 57, 59-62.
- Baqueiro-Cárdenas, E.R. y Aldana-Aranda, D. 2007. Differences in the exploited oyster (*Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791)) populations from different coastal lagoons of the Gulf of Mexico. *Transit. Waters Bull.* 2, 21-35.
- Barber, B. J. y Blake, N. J. 1981. Energy storage and utilization in relation to gametogenesis in *Argopecten irradians concentricus* (Say). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 5, 121-134.

- Barber, B. J. y Blake, N. J. 1985b. Intra-organic biochemical transformations associated with oogenesis in the bay scallop, *Argopecten irradian concentricus* (Say), as indicated by <sup>14</sup>C incorporation. Biol. Bull. Mar. 168, 39-49.
- Barber, B.J., Ford, S.E. y Haskin, H.H. 1988a. Effects of the parasite MSX (*Haplosporidium nelsoni*) on the oyster (*Crassostrea virginica*) energy metabolism. I. Condition index and relatively fecundity. J. Shellfish Res. 7, 25-31.
- Barber, B.J., Ford, S.E. y Haskin, H.H. 1988b. Effects of the parasite MSX (*Haplosporidium nelsoni*) on the oyster (*Crassostrea virginica*) energy metabolism-II. Tissue biochemical composition. Comp. Biochem. Physiol. 91A, 603-608.
- Barber, B.J. y Blake, N.J. 1991. Reproductive physiology. En: Shumway, S.E. (Edit.). Scallops: biology, ecology and aquaculture. Amsterdam, Elsevier. 377-409.
- Barret, S.M., Volkman, J.K., Dunstan, G.A. y Le Roi, J.-M. Sterols of 14 species of marine diatoms (Bacillariophyta). J. Phycol. 31, 360-369.
- Barnes, H. y Blackstock, J. 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.
- Bell, M.V., Henderson, R.J. y Sargent, J.R. 1985. The role of polyunsaturated fatty acids in fish. Comp. Biochem. Physiol. 83B, 711-719.
- Bell, J.G. y Sargent, J.R. 2003. Arachidonic acid in aquaculture feeds: current status and future opportunities. Aquaculture 218, 491-499.
- Bergström, S., Danielsson, H., Klenberg, D. y Samuelsson, B. 1964. The enzymatic conversion of essential fatty acids into prostaglandins. J. Biol. Chem. 239, PC4006-PC4008.
- Berntsson, K.M., Jonsson, P.R., Wängberg, S.Å. y Carlsson, A.S. 1997. Effects of broodstock diets on fatty acid composition, survival and growth rates in larvae of the european flat oyster *Ostrea edulis*. Aquaculture 154, 139-153.
- Berthelin, C., Kellner, K. y Mathieu, M. 2000a. Storage metabolism in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in relation to summer mortalities and reproductive cycle (West Coast of France). Comp. Biochem. Physiol. 125B, 359-369.

- Berthelin, C., Kellner, K. y Mathieu, M. 2000b. Histological characterization and glucose incorporation into glycogen of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* storage cells. *Mar. Biotechnol.* 2, 136-145.
- Besnard, J.-Y., 1991. Seasonal variations in the lipids and fatty acids of the female gonad of the scallop *Pecten maximus* (Linnaeus, 1758) in the Bay of Seine (French Channel). En: Shumway, S.E. y Sandifer, P.A. (eds.). *An International Compendium of Scallop and Culture*. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, 74-86 pp.
- Bojórquez-Serrano, J.I., Nájera González. O., Marceleño Flores, S., González Flores, R.E. Romero Bañuelos, C.R. y Cupul Magaña, F. 2004. *Marismas Nacionales: Hacia la creación de un área protegida*. Universidad Autónoma de Nayarit, 144 p.
- Bollen, M., Keppens, S. y Stalmans W. 1998. Specific features of glycogen metabolism in the liver. *Biochem. J.* 336, 19-31.
- Boucad-Camou, E., Lebesnerais, C., Lubet, P. y Lihrmann, I. 1983. Dynamique et enzymologie de la digestion chez l'huître *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Basses biologiques de l'aquaculture*. IFREMER, Montpellier, France. Actes de Colloques n.1, 75-96 pp.
- Boyd, J.N. y Burnett, L.E. 1999 Reactive oxygen intermediate production by oyster hemocytes exposed to hypoxia. *J. Exp. Biol.* 202, 3135-3143.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-253.
- Brown, M.R. 1991. The amino-acid and sugar composition of 16 species of microalgae used in mariculture. *J. Exp. Biol. Ecol.* 145, 79-99.
- Brown, M.R., McCausland, M.A. y Kowalski, K. 1998. The nutritional value of four Australian microalgal strains fed to Pacific oyster *Crassostrea gigas* spat. *Aquaculture*, 165, 281-293.
- Brown, M.R. y McCausland, M.A. 2000. Increasing the growth of the juvenile Pacific oysters *Crassostrea gigas* by supplementary feeding with microalgal and dried diets. *Aquacult. Res.* 31, 671-682.
- Brown, M. R. 2002. Nutritional value and use of microalgae in aquaculture. En: Cruz-Suárez, L. E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Gaxiola-Cortés, M. G. y Simoes, N. (Eds.) *Avances en nutrición acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. 3-6 de septiembre del 2002. Cancún, Quintana Roo, México. 281-292 pp.

- Cáceres-Martínez, J., Macías-Montes de Oca, P. y Vasquez-Yeomans, R. 1998. *Polydora* sp. infestation and health of the Pacific Oyster *Crassostrea gigas* cultured in Baja California, NW Mexico. *J. Shellfish Res.* 17, 259–264.
- Cáceres-Martínez, J., Vásquez-Yeomans, R., Padilla-Lardizábal, G. y del Río Portilla, M.A. 2008. *Perkinsus marinus* in pleasure oyster *Crassostrea corteziensis* from Nayarit, Pacific coast of México. *J. Invertebr. Pathol.* 99, 66-37.
- Caers, M., Coutteau, P., Cure, K., Morales, V., Gajardo, G. y Sorgeloos, P. 1999. The Chilean scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819): II. Manipulation of the fatty acid composition and lipid content of the eggs via lipid supplementation of the broodstock diet. *Comp. Biochem. Physiol.* 123B, 97-103.
- Caers, M., Coutteau, P. y Sorgeloos, P. 2000. Impact of starvation and of feeding algal and artificial diets on the lipid content and composition of juvenile oysters (*Crassostrea gigas*) and clams (*Tapes philippinarum*). *Mar. Biol.* 136, 891-899.
- Caers, M., Coutteau, P., Sorgeloos, P. y Gajardo, G. 2003. Impact of algal diets and emulsions on the fatty acid composition and content of selected tissues of adult broodstock of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). *Aquaculture* 217, 437-452.
- Cáceres-Martínez, J., Ramírez-Gutiérrez, S.C., Vásquez-Yeomans, R. y Macías-Montes de Oca, P. 2004. Reproductive cycle and mortality of the Japanese oyster *Crassostrea gigas* cultured in Bahía Falsa, Baja California, México. *J. Shellfish Res.* 23, 795-801.
- Cáceres-Puig, J.I., Abasolo-Pacheco, F., Mazón-Suástegui, J.M., Maeda-Martínez, A.N. y Saucedo, P.E. 2007. Effect of temperature on growth and survival of *Crassostrea corteziensis* spat during late-nursery culturing at the hatchery. *Aquaculture* 272, 417-422.
- Calder, P.C. 1997. *N*-3 Polyunsaturated fatty acids and immune cell function. *Advan. Enzyme Regul.* 37, 197-237.
- Campbell, S.A. 1969. Seasonal cycles in the carotenoid content in *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.* 4, 227-232.
- Cano, J., Rosique, Ma.J. y Rocamora, J. 1997. Influence of environmental parameters on reproduction of the European flat oyster (*Ostrea edulis* L.) in a coastal lagoon (Mar Menor, Southeastern Spain). *J. Moll. Stud.* 63, 187-196.

- Cannuel, R. y Beninger, P.G., 2005. Is oyster broodstock feeding always necessary? A study using oocyte quality predictors and validators in *Crassostrea gigas*. *Aquat. Living Resour.* 18, 35-43.
- Cardoso, J.F.M.F., Langlet, D., Loff, J.F., Martins, A.R., Witte, J.I.J., Santos, P.T. y van der Veer, H.W. 2007. Spatial variability in growth and reproduction of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) along the west European coast. *J. Sea Res.* 57, 303-315.
- Carroll, M.A. y Catapane, E.J. 2007. The nervous system control of lateral ciliary activity of the gill of the bivalve mollusc, *Crassostrea virginica*. *Comp. Biochem. Physiol.* 148A, 445-450.
- Carta Nacional Pesquera. 2006. Instituto Nacional de la Pesca. Diario Oficial de la Federación.
- Chávez-Villalba, J., Mingant, C., Cochard, J.-C. y Le Pennec, M. 2001. Gamétogenèse chez l'huître *Crassostrea gigas* de l'Aber Benoît (Bretagne, France), à la limite nord de son aire de reproduction. *Haliotis* 30, 1-12.
- Chávez-Villalba, J., Pommier, J., Andriamiseza, J., Pouvreau, S., Barret, J., Cochard, J.-C. y Le Pennec, M. 2002. Broodstock conditioning of the oyster *Crassostrea gigas*: origin and temperature effect. *Aquaculture* 214, 115-130.
- Chávez-Villalba, J., Barret, J., Mingant, C., Cochard, J.-C. y Le Pennec, M. 2003a. 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., Cochard, J.-C., Le Pennec, M., Barret, J., Enríquez-Díaz, M. y Cáceres-Martínez, J. 2003b. Effects of temperature and feeding regimes on gametogenesis and larval production in the oyster *Crassostrea gigas*. *J. Shellfish Res.* 22, 721-731.
- Chávez-Villalba, J., López-Tapia, M., Mazón-Suástegui, J.M. y Robles-Mungaray, M. 2005. Growth of the oyster *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1951) in Sonora, Mexico. *Aquacult. Res.* 36, 1337-1344.
- Chávez-Villalba, J., Villelas-Ávila, R. y Cáceres-Martínez, C. 2007. Reproduction, condition and mortality of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) in Sonora, México. *Aquacult. Res.* 38, 268-278.
- Chávez-Villalba, J., Hernández-Ibarra, A., López-Tapia, M.R. y Mazón-Suástegui J.M. 2008. Prospective culture of the Cortez oyster *Crassostrea corteziensis* from

- northwestern Mexico: growth, gametogenic activity, and condition index. *J. Shell Res.* 27, 711-720.
- Chen, J.-S., Sappington, T.W. y Raikhel, A.S. 1997. Extensive sequence conservation among insect, nematode, and vertebrate vitellogenins reveals ancient common ancestry. *J. Mol. Evol.* 44, 440-451.
- Cheney, D.P., Macdonald, B.F. y Elston, R.A. 2000. Summer mortality of Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg): initial findings on multiple environmental stressors in Puget Sound, Washington, 1998. *J. Shellfish Res.* 19, 353-359.
- Cheng, T.C., 1981. Bivalves. En: Ratcliffe, N.A. y Rowley, A.F. (Eds.). *Invertebrate Blood Cells*, Vol. 1. Academic Press, N.Y., USA, 233-300 pp.
- Chipman, W.A. Jr. 1948. Seasonal changes in the fattening of oysters. *Proc. Natl. Shellfish. Assoc.* 1947, 28-32.
- Cho, S.-M. y Jeong, W.-G., 2005. Spawning impact of lysosomal stability of the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquaculture* 244, 383-387.
- Chu, F.L.E. 2000. Defense Mechanisms of Marine Bivalves. *Mar. Biotech.*, 1-42.
- Chu, F.-L.E. y Dupuy, J.L. 1980. The fatty acid composition of three unicellular algal species used as food sources for larvae of the american oyster (*Crassostrea virginica*). *Lipids* 15, 356-364.
- Chu, F.-L.E. y Webb, K.L. 1984. Polyunsaturated fatty acids and neutral lipids in developing larvae of the oyster, *Crassostrea virginica*. *Lipids* 19, 815-820.
- Chu, F.L.E. y Greaves, J. 1991. Metabolism of palmitic, linoleic and linolenic acids in adult oysters, *Crassostrea virginica*. *Mar. Biol.* 110, 229-236.
- Cook, P.A. y Gabbott, P.A. 1978. Glycogen synthetasa in the sea mussel *Mytilus edulis* L. I. Purification, interconversion and kinetic properties of the I and D forms. *Comp. Biochem. Physiol.* 60B, 419-421.
- Cortés-Guzmán, A.S. y Martínez-Guerrero, A. 1979. Identificación y cuantificación de larvas pediveliger de *Crassostrea corteziensis* (Hertlein) y balánidos, en el placton de dos esteros de San Blas, Nayarit, Pacífico Mexicano. *An. Inst. Cienc. del Mar y Limnol. Univ. Nal. Auto.* 6, 1-19.
- Coss-Tirado, V. H. y Chávez-Cortes, J. M. 1976. Composición, estructura y estabilidad de una comunidad fitoplanctónica en una laguna litoral. Tesis de Licenciatura. *Fac. Cien. UNAM, México, D.F.* 55 p.

- Croll, R.P y Wang, C. 2007. Possible roles of sex steroids in the control of reproduction in bivalve molluscs. *Aquaculture* 271, 76-86.
- Cuevas-Guevara, C.A. y Martínez-Guerrero, A. 1979. Estudio gonádico de *Crassostrea corteziensis* Hertlein, *C. pamula* Carpenter y *C. iridescens* Hanley, de San Blás Nayarit, México (Bivalvia: ostreide). *An. Inst. Cienc. Mar Limnol. Univ. Nal. Auto.* 6, 1-20.
- Coutteau, P., Castell, J.D., Ackman, R.G. y Sorgeloos, P. 1996. The use of lipid emulsions as carriers for essential fatty acids in bivalves: A test case with juvenile *Placocecten magellanicus*. *J. Shellfish Res.*, 15, 259-264.
- Das, U.N. 1991. Interactions between essential fatty acids, eicosanoids, cytokines, growth factors and free radicals: relevance to new therapeutic strategies in rheumatoid arthritis and other collagen vascular diseases. *Prostaglandins. Leukot. Essent. Fatty Acids.* 44, 201-210.
- Davis, N.W. y Hillman, R.E. 1971. Effect of artificial shell damage on sex determination in oysters (Abstract). *Proc. Natl. Shellfish. Assoc.* 61, 2.
- de Pablo, M.A., Puertollano, M.A. y Álvarez-de Cien Fuegos, G. 2002. Biological and clinical significance of lipids as modulators of immune system functions. *C. Diagn. Lab. Immunol.* 9, 945-950.
- Delaporte, M., Soudant, P., Moal, J., Lambert, C., Queré, C., Miner, P., Choquet, G., Paillard, C. y Samain, J.-F. 2003. Effect of a mono-specific algal diet on immune functions in two bivalve species - *Crassostrea gigas* and *Ruditapes philippinarum*. *J. Exp. Biol.* 206, 3053-3064.
- Delaporte, M., Chu, F.-L., Langdon, C., Lund, E., Encomio, V., Constantin, G., Soudant, P. y Samain, J.-F. 2004. Effect of a dietary conditioning using lipid emulsion on immune response of the Pacific oysters *Crassostrea gigas*. *J. Shellfish Res.* 23, 287-288.
- Delaporte, M. 2005. Modulation des paramètres hemocytaires par la nutrition chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Implication dans les mortalités estivales. Thèse de Doctorat. Université de Rennes, France, 1-365 p.
- Delaporte, M., Soudant, P., Lambert, C., Moal, J., Pouvreau, S. y Samain, J.-F. 2006a. Impact of food availability on energy storage and defense related hemocyte parameters of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* during an experimental reproductive cycle. *Aquaculture* 254, 571-582.
- Delaporte, M., Soudant, P., Moal, J., Giudicelli, E., Lambert, C., Séguineau, C. y Samain, J.-F. 2006b. Impact of 20:4n-6 supplementation on the fatty acid composition

- and hemocyte parameters of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Lipids* 41, 567-576.
- Delaporte, M., Chu, F.-L., Langdon, C., Moal, J., Lambert, C., Samain, J.-F. y Soudant, P. 2007. Changes in biochemical and hemocyte parameters of the Pacific oysters *Crassostrea gigas* fed T-Iso supplemented with lipid emulsions rich in eicosapentaenoic acid. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 343, 261-275.
- Delauney, F., Marty, Y., Moal, J. y Samain, J.F. 1992. Growth and lipid class composition of *Pecten maximus* (L.) larvae grown under hatchery conditions. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 163, 209-219.
- Delaunay, F., Marty, Y., Moal, J. y Samain, J.F. 1993. The effect of monoespecific algal diets on growth and fatty acid composition of *Pecten maximus* (L.) larvae. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 173, 163-179.
- Deridovich, I.I. y Reunova, O.V. 1993. Prostaglandins - Reproduction control in bivalve mollusks. *Comp. Biochem. Physiol.* 104A, 23-27.
- Deslous-Paoli, J.M. y Héral, M. 1988. Biochemical composition and energy value of *Crassostrea gigas* (Thunberg) cultured in the bay of Marennes-Oléron. *Aquat. Living Resour.* 1, 239-249.
- Dore, I. 1991. Shellfish: a guide to oysters, mussels, scallops, clams and similar products for the commercials used. Van Nostrand Reinhold New York, 239 p.
- Dridi, S., Romdhane, M.S. y Elcafsi, M. 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.
- Duerr, E.O., Molnar, A. y Sato, V. 1998. Cultured microalgae as aquaculture feeds. *J. Mar. Biotechnol.* 7, 65-70.
- Eble, A.F. y Scro, R. 1996. General Anatomy. En: Kennedy, V.S., Newell, R.I.E. y Eble, A.F. (Eds.). *The Eastern Oyster: Crassostrea virginica*, Maryland Sea Grant College, Maryland, U.S.A., 19-73 pp.
- Engle, J.B. 1951. The condition of oysters as measured by the carbohydrate cycle, the condition factor and the percent dry weight. *Proc. Natl. Shellfish. Assoc.* 41, 20-25.
- Epifanio, C.E. y Ewart, J. 1977. Maximum ration of four algal diets for the oyster *Crassostrea virginica* Gmelin. *Aquaculture* 11, 13-29.



- Epifanio, C.E. 1979. Growth in bivalve molluscs: Nutritional effects of two or more species of algae in diets fed to the American oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin) and the hard clam *Mercenaria mercenaria* (L.). *Aquaculture* 18, 1-12.
- Epp, J., Bricelj, V. M. y Malouf, R. E. 1988. Seasonal partitioning and utilization of energy reserves in two age classes of the Bay scallop *Argopecten irradians irradians* (L.) *J. Exp. Mar. Biol.* 121:113-136.
- Enríquez-Díaz, M. 2004. Variabilité et bioénergétique de la reproduction chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Thèse de Doctorat. Université de la Bretagne Occidentale, Brest, France. 216 p.
- Enríquez-Díaz, M., Pouvreau, S., Fabioux, C., Le Coguc, Y., Cochard, J.-C. y Le Pennec, M. 2003. Reproductive strategy: variability of reproductive pattern in two population genetically determined of *Crassostrea gigas*. *J. Shellfish Res.* 22, 328.
- Fabioux, C., Pouvreau, S., Le Roux, F. y Huvet, A. 2004a. The oyster vasa-like gene: a specific marker of the germline in *Crassostrea gigas*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 315, 897-904.
- Fabioux, C., Huvet, A., Lelong, C., Robert, R., Pouvreau, S., Daniel, J.Y., Minguant, C. y Le Pennec, M. 2004b. Oyster vasa-like gene as a marker of the germline cell development in *Crassostrea gigas*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 320, 592-598.
- Fabioux, C., Huvet, A., Le Souchu, P., Le Pennec, M. y Pouvreau, S. 2005. Temperature and photoperiod drive *Crassostrea gigas* reproductive internal clock. *Aquaculture* 250, 458-470.
- Fernández-Reiriz, M.J., Pérez-Camacho, A., Ferreiro, M.J., Blanco, J., Planas, M., Campos, M.J. y Labarta, U. 1989. Biomass production and variation in the biochemical profile (total protein, carbohydrates, RNA, lipids and fatty acids) of seven species of marine microalgae. *Aquaculture* 83, 17-37.
- Fernández-Reiriz, M.J., Labarta, U., Albentosa, M. y Pérez-Camacho, A. 1998. Effect of microalgal diets and commercial wheatgerm flours on the lipid profile of *Ruditapes decussatus* Spat. *Comp. Biochem. Physiol.* 119A, 369-377.
- FIGIS, 2008. Disponible en internet: <http://www.fao.org/fishery/statistics/global-production> [13 de Octubre de 2008].
- Flores-Vergara, C., Cordero-Esquivel, B., Cerón-Ortiz, A.N. y Arredondo-Vega, B.O. 2004. Combined effects of temperature and diet on growth and biochemical composition of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) spat. *Aquacult. Res.* 35, 1131-1140.

- Foegh, M.L. y Ramwell, P.W. 1983. Physiological implications of products in the arachidonic acid cascade. En: Granström, P.A. (Ed.). Prostaglandins and Related Substances., Elsevier Science Publishers, B.V., pp. xiii-xix.
- Fong, P.P., Noordhuis, R. y Ram, J.L. 1993. Dopamine reduces intensity of serotonin-induced spawning in the zebra mussel *Dreissena polymorpha* (pallas). J. Exp. Zool. 266, 79-83.
- Fraser, P.D. y Bramley, P.M. 2004. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. Prog. Lipid Res. 43, 228-265.
- Frías-Espericueta, M.G., Páez-Osuna, F. y Osuna-López, J.I. 1997. Seasonal changes in the gonadal state of the oysters *Crassostrea iridescens* and *Crassostrea corteziensis* (Filibranchia: Ostreidae) in the Northwest coast of Mexico. Rev. Biol. Trop. 45, 1061-1065.
- Gabbott, P. A., 1983. Development and seasonal metabolic activities in marine molluscs. En: Hochachka, P.W. (Ed.). The Mollusca Vol. 2. Academic Press, London. 165-217 pp.
- Gabbott, P.A. y Whittle, M.A. 1986. Glycogen synthetase in the sea mussel *Mytilus edulis* L.-II. Seasonal changes in glycogen content and glycogen synthetase activity in the mantle tissue. Comp. Biochem. Physiol. 83B, 197-207.
- Galtsoff, P.S. 1938. Physiology of reproduction of *Ostrea virginica*. II. Stimulation of spawning in the female oyster. Biol. Bull. 75, 286-307.
- Galtsoff, 1964. The American Oyster *Crassostrea virginica*. Fishery Bulletin of the Fish and Wildlife Service. Vol. 64, 456 p.
- Gallager, S.M. y Mann, R. 1986. Growth and survival of larvae of *Mercenaria mercenaria* (L.) and *Crassostrea virginica* (Gmelin) relative to broodstock conditioning and lipid content of eggs. Aquaculture 56, 105-121.
- Gallager, S. y Mann, M. R. 1999. Growth and survival of larvae of *Mercenaria mercenaria* (L.) and *Crassostrea virginica* (Gmelin) relative to broodstock conditioning and lipid content of eggs. Aquaculture 56, 105-121.
- Gallager, S.M., Mann, R. y Sasaki, G.C. 1986. Lipid as an index of growth and viability in three species of bivalve larvae. Aquaculture 56, 81-103.
- George-Zamora, A., Sevilla-Hernández, M.L. y Aldana-Aranda, D. 2003. Ciclo gonádico del ostión americano *Crassostrea virginica* (Lamellibranchia: Ostreidae) en Mecoacán, Tabasco, México. Rev. Biol. Trop. 51, 109-117.

- Gibbons, M. C. y Castagna, M. 1984. Serotonin as an inducer of spawning in six bivalve species. *Aquaculture* 40, 189–191.
- Giese, A.C. 1959. Comparative physiology: Annual reproductive cycles of marine invertebrates. *Annu. Rev. Physiol.* 21, 547-576.
- Gordon, D.T. y Collins, N. 1982. Anatomical distribution of sterols in oysters (*Crassostrea gigas*). *Lipids* 17: 811-817.
- Guillard, R.R.L. y Ryther, J.H. 1962. Studies on marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* (Husted) and *Detonula confervaceae* (Cleve). *Can. J. Microbiol.* 8, 229-239.
- Guckert, J.B. y Cooksey, K.E. 1990. Triglyceride accumulation and fatty acid profile changes in *Chlorella* (Chlorophyta) during high pH-induced cell cycle inhibition. *J. Phycol.* 26, 72-79.
- Gunther, R.T. 1897. The oyster culture of the ancient Romans. *J. Mar. Biol. Ass. U. K.* 4, 360-365.
- Hagerman, L. 1986. Haemocyanin concentration in the shrimp *Crangon crangon* (L.) after exposure to moderate hypoxia. *Comp. Biochem. Physiol.* 85A, 721-724.
- Harbige, L.S. 2003. Fatty acids, the immune response, and autoimmunity: a question of n-6 essentiality and the balance between n-6 and n-3. *Lipids.* 38, 323-41.
- Hatlen, B., Jobling, M. y Bjerkeng, B. 1998. Relationships between carotenoid concentration and colour of fillets of Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.), fed astaxanthin. *Aquacult. Res.* 29, 191-202.
- Hata, K., Yokoyama, I., Suda, M., Hata, M. y Matsuda, K. 1987. Purification and properties of glycogen phosphorylase from the adductor muscle of the scallop, *Patinopecten yessoensis*. *Comp. Biochem. Physiol.* 87B, 747-753.
- Hata, K., Hata, M. y Matsuda, M. 1993. Purification and properties of glycogen phosphorylase from the adductor muscle of the oyster, *Crassostrea gigas*. *Comp. Biochem. Physiol.* 105B, 481-486.
- Heasman, M., Diemar, J., O'Connor, W., Sushames, T. y Foulkes, L. 2000. Development of extended shelf-life microalgae concentrate diets harvested by centrifugation for bivalve mollusc. *Aquacult. Res.* 31, 637-659.
- Heffernan, P.B., Randal, L., Walker, R.L. y Carr, J.L. 1989. Gametogenic cycles of three marine bivalves in Wassaw Sound, Georgia II *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1971). *J. Shellfish Res.* 8, 61-70.

- Hégaret, H., Wikfors, G.H. y Soudant, P. 2003. Flow-cytometric analysis of haemocytes from eastern oysters, *Crassostrea virginica*, subjected to a sudden temperature elevation I. Haemocyte types and morphology. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 293, 237-248.
- Hégaret, H., Wikfors, G.H. y Soudant, P. 2003. Flow cytometric analysis of haemocytes from eastern oysters, *Crassostrea virginica*, subjected to a sudden temperature elevation II. Haemocyte functions: aggregation, viability, phagocytosis, and respiratory burst. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 293, 249-265.
- Hégaret, H., Wikfors, G.H., Soudant, P., Delaporte, M., Alix, J.H., Smith, B.C., Dixon, M.S., Quéré, C., Le Coz, J.-R., Paillard, C., Moal, J. y Samain, J.-F. 2004. Immunological competence of eastern oysters, *Crassostrea virginica*, fed different microalgal diets and challenged with a temperature elevation. *Aquaculture* 234, 541-560.
- Higgins P. 1980a. Effects of food availability on the valve movements and feeding behavior of juvenile *Crassostrea virginica* (Gmelin). I. Valve movements and periodic activity. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 45, 229-244.
- Higgins P. 1980b. Effects of food availability on the valve movements and feeding behavior of juvenile *Crassostrea virginica* (Gmelin). II. Feeding rates and behavior. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 46, 17-27.
- Hine, PM. 1999. The inter-relationships of bivalve haemocytes. *Fish Shellfish Immunol.* 9, 367-385.
- Helm, M.M. y Laing, I. 1987. Preliminary observations on the nutritional value of 'Tahiti *Isochrysis*' to bivalve larvae. *Aquaculture* 62, 281-288.
- Helm, M.M. y Bourne, N. 2004. Hatchery culture of bivalves. A practical manual. Lovatelli, A. (Comp./ed.). FAO Fisheries Technical Paper. No. 471, Rome, FAO, 177 p.
- Holden, M.J. y Patterson, G.W. 1991. Absence of sterol biosynthesis in oyster tissue culture. *Lipids* 26, 81-82.
- Howard, D.W. y Smith, C.S. 1983. Histological techniques for marine bivalve mollusks. National Oceanic and Atmospheric Administration. Technical Memorandum NMFS-F/NEC-25. U.S. Department of Commerce. 95 pp.
- Humason, L.G. 1979. Animal Tissue Techniques. W.H. Freeman and Company, San Francisco. 661 pp.

- Idler, D.R. y Wiseman, P. 1972. Molluscan sterols: a review. *J. Fish. Res. Board Can.* 29, 385–398.
- Ibarguen-Zamudio, J. 2006. Composición, variación y abundancia de las comunidades fitoplanctónicas en tres lagunas costeras del estado de Sinaloa, México, periodo 2004-2005. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Sinaloa. Facultad de Ciencias del Mar. 1-101 p.
- Islas-Olivares, R., Guardado, V. y Pérez, A.M. 1982. Crecimiento y sobrevivencia del ostión japonés (*Crassostrea gigas*) en la laguna Manuela, B.C., México. *Cienc. Mar.* 8, 47-54.
- Islas-Olivares, R. 1982. Análisis económico en el cultivo del ostión japonés (*Crassostrea gigas*) en Puerto Don Juan, Bahía de los Ángeles. *Cienc. Mar.* 8, 55-68.
- Jo, Q., Choy, E.J., Park, D.W. y Verón, B. 2004. Sterol dynamics of heterotrophic *Tetraselmis suecica* and its nutritional implication in the bivalve aquaculture. *Aquacult. Res.* 35, 371-377.
- Johnston, P.V. 1985. Dietary fat, eicosanoids, and immunity. *Advances Lipid Res.* 21, 103-141.
- Joseph, M.M. y Madhyastha, M.N. 1984. Annual reproductive cycle and sexuality of the oyster *Crassostrea madrasensis* (Preston). *Aquaculture* 40: 223-231.
- Kahru, M. y Mitchell B.G. 2000. Influence of the 1997-98 El Niño on the surface chlorophyll in the California Current. *Geophys Res Lett.* 27, 2937-2940.
- Kasim, M. y Mukai, H. 2006. Contribution of benthic and epiphytic diatoms to clam and oyster production in the Akkeshi-ko estuary. *J. Oceanogr.* 62, 267-281.
- Kanazawa, A. 2001. Sterols in marine invertebrates. *Fish. Sci.* 67, 997-1007.
- Keen, A.M., 1971. *Sea Shells of Tropical West American Marine Mollusks from Baja California to Perú.* Stanford University, Stanford. 1064 pp.
- Kelley, D.S., 2001. Modulation of human immune and inflammatory responses by dietary fatty acids. *Nutrition.* 17(7-8):669-73.
- Kantha, S.S. 1989. Carotenoids of edible molluscs; a review. *J. Food Biochem.* 13, 429-442.
- Khotimchenko, Y.S. y Deridovich, I.I. 1991. Monoaminergic mechanism of reproduction control in the marine bivalve mollusc and echinoderms: a review. *Comp. Biochem. Physiol.* 100C, 311–317.

- Knauer, J. y Southgate, P.C. 1997a. Growth and fatty acid composition of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) spat fed a microalga and microcapsules containing varying amounts of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid. *J. Shellfish Res.* 16, 447-453.
- Knauer, J. y Southgate, P.C. 1997b. Growth and fatty acid composition of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) spat fed a spray-dried freshwater microalga (*Spongiococcum excentricum*) and microencapsulated lipids. *Aquaculture* 154, 293-303.
- Knuckey, R.M., Brown, M.R., Barrett, S.M. y Hallegraeff, G.M. 2002. Isolation of new nanoplanktonic diatom strains and their evaluation as diets for juvenile Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture* 211, 253-274.
- Kong, L., Wang, Z., Yu, R., Li, Q. y Wang, R. 2007. Seasonal variation of the glycogen enzyme activity in diploid and triploid pacific oyster gonad during sexual maturation. *J. Ocean Univer. China* 6, 383-386.
- Koven, W.M., Barr, Y., Lutzky, S., Ben-Atia, I., Weiss, R., Harel, M., Behrens, P. y Tandler, A. 2001. The effect of dietary arachidonic acid (20:4n-6) on growth, survival and resistance to handling stress in gilthead seabream (*Sparus aurata*) larvae. *Aquaculture* 193, 107-122.
- Kreeger, D.A. y Langdon, C.J. 1993. Effect of dietary protein content on growth of juvenile mussels, *Mytilus trossulus* (Gould 1850). *Biol. Bull.* 185: 123-139.
- Kuwasawa, K. y Hill, R.B. 1997. Evidence for cholinergic inhibitory and serotonergic excitatory neuromuscular transmission in the heart of bivalve *Mercenaria mercenaria*. *J. Exp. Biol.* 200, 2123-2135.
- Kwan Wong, C. y Kim Wong, 2003. HPLC pigment analysis of marine phytoplankton during a red tide occurrence in Tolo Harbour, Hong Kong. *Chemosphere.* 52, 1633-1640.
- Lacoste, A., Malham, S.K., Gélébart, F., Cueff, A. y Poulet, S.A. 2002. Stress-induced immune changes in the oyster *Crassostrea gigas*. *Dev. Comp. Immunol.* 26, 1-9.
- Langdon, C. y Waldock, M.J. 1981. The effect of algal and artificial diets on the growth and fatty acid composition of *Crassostrea gigas* spat. *J. Mar. Biol. Ass. U. K.* 61, 431-448.
- Langdon, C.J., Segueineau, C., Ponce, B., Moal, J. y Samain, J.-F. 2000. Delivery of riboflavin to larval and adult Pacif Oysters, *Crassostrea gigas* Thunberg by lipid spray beads. *J. Shellfish Res.* 19, 129-132.

- Langton, R.W. y McKay, G.U. 1976. Growth of *Crassostrea gigas* (Thunberg) spat under different feeding regimes in a hatchery. *Aquaculture*, 7: 225-233.
- Lango-Reynoso, F., Chávez-Villalba, J., Cochard, J.-C. y Le Pennec, M. 2000. Oocyte size, a means to evaluate the gametogenic development of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture* 190, 183-190.
- Lango-Reynoso, F., Chávez-Villalba, J. y Le Pennec, M. 2006. Reproductive patterns of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in France. *Invertebr. Reprod. Dev.* 49, 41-50.
- Lavoie, R.E. 2005. Oyster culture in North America history, present and future. The 1<sup>st</sup> International Oyster Symposium Proceedings, Tokyo, Japón 13-14 de Julio, No. 17.
- Lee, R.F. y Heffernan, P.B. 1991. Lipids and proteins in eggs of eastern oysters (*Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791)) and northern quahogs (*Mercenaria mercenaria* (Linnaeus, 1758)). *J. Shellfish Res.* 10, 203-206.
- Leyva-Miranda, G. A. 2005. Cultivo experimental de ostión de placer *Crassostrea corteziensis* (Hertlain, 1951) preengordado con 3 dietas distintas, para comparar su crecimiento en un sistema de suspensión con el arte de canastas en línea larga ubicado en el estero "El Riíto", Huatabampo, Sonora. Centro de Estudios Superiores del Estado de Sonora. Unidad Navojoa. 1-43 p.
- Li, Q., Osada, M., Suzuki, T. y Mori, K. 1998. Changes in vitellin during oogenesis and effect of estradiol-17-b on vitellogenesis in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Invert. Repro. Develop.* 33, 87-93.
- Li, Q., Osada, M. y Mori, K. 2000. Seasonal biochemical variations in Pacific oyster gonadal tissue during sexual maturation. *Fish. Sci.* 66, 502-508.
- Loosanoff, V.L. 1958. Some aspects of behavior of oysters at different temperatures. *Biol. Bull.* 114, 57-70.
- Lourenço, S.O., Lanfer Marquez, U.M., Mancini-Filho, J., Barbarino, E. y Aida, E. 1997. Changes in biochemical profile of *Tetraselmis gracilis* I. Comparison of two culture media. *Aquaculture* 148, 153-168.
- Lubet, P. 1976. Ecophysiologie de la reproduction chez les mollusques lamelibranches. *Haliotis* 7:49-55.
- Lubet, P. y Mann, R., 1987. Les diferentes modalidades de la reproduction chez les molusques bivalves. *Haliotis* 16, 181-195.

- Luna-González, A., Maeda-Martínez, A.N., Vargas-Albores, F., Ascencio-Valle, F. y Robles-Mungaray, M. 2003. Phenoloxidase activity in larval and juvenile homogenates and adult plasma and haemocytes of bivalve mollusc. *Fish Shellfish Immunol.* 15, 275-282.
- Mansour, M.P., Volkman, J.K. y Blackburn, S.I. 2003. The effect of growth phase on the lipid class, fatty acid and sterol composition in the marine dinoflagellate, *Gymnodinium* sp. in batch culture. *Phytochemistry* 63, 145-153.
- Mann, R. 1979. Some biochemical and physiological aspects of the growth and gametogenesis in *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis* grown at sustained elevated temperatures. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 59:95-110.
- Marlowe, I.T., Green, J.C., Neal, A.C., Brassel, S.C., Eglinton, G. y Course, P.A. 1984. Long-chain (n-C37–C39) alkenones in the Prymnesiophyceae. Distribution of alkenones and other lipids and their taxonomic significance. *Br. Phycol. J.* 19, 203–216.
- Martínez-Fernández, E., Acosta-Salmón, H. y Rangel-Dávalos, C. 2004. Ingestion and digestion of 10 species of microalgae by winged pearl oyster *Pteria sterna* (Gould, 1851) larvae. *Aquaculture* 230, 417-423.
- Martínez-Fernández, E., Acosta-Salmón, H. y Southgate, P.C. 2006. The nutritional value of seven species of tropical microalgae for black-lip pearl oyster (*Pinctada margaritifera*, L.) larvae. *Aquaculture* 257, 491-503.
- Martínez, G., Garrote, C., Mettifogo, L., Pérez, H. y Uribe, E. 1996. Monoamines and prostaglandin E2 as inducers of the spawning of the scallop *Argopecten purpuratus* Lamarck. *J. Shellfish Res.* 15, 245-249.
- Martínez, G. y Mettifogo, L. 1998. Mobilization of energy from adductor muscle for gametogenesis of the scallop, *Argopecten purpuratus* Lamarck. *J. Shellfish Research* 17, 113-116.
- Martínez, G., Mettifogo, L., Lenoir, R. y Campos, E.O. 1999. Prostaglandins and reproduction of the scallop *Argopecten purpuratus*: I. Relationship with gamete development. *J. Exp. Zool.* 284, 225-231.
- Martínez, G., Mettifogo, L., Lenoir, R. y Olivares, A. 2000. Prostaglandins and reproduction of the scallop *Argopecten purpuratus*: II. Relationship with gamete release. *J. Exp. Zool.* 287, 86-91.
- Marty, Y., F. Delaunay, J. Moal y Samain, J. F. 1992. Change in the fatty acid composition of *Pecten maximus* (L.). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 163:221-234.



- Massapina, C., Dores, E., Matias, D., Joaquim, S. y Devauchelle, N. 1995. Etat actuel des connaissances sur la reproduction artificielle de l'huître *Crassostrea angulata* au Portugal. En: Devauchelle, N., Barret, J. y Salaun, G. (Eds.). La reproduction naturelle et contrôlée des Bivalves cultivés en France, IFREMER, Brest, 113-126 pp.
- Massapina, C., Joaquim, S., Matias, D. y Devauchelle, N. 1999. Oocyte and embryo quality in *Crassostrea gigas* (Portuguese strain) during a spawning period in Algarve, South Portugal. *Aquat. Living Resour.* 12, 327-333.
- Masseau, I., Bannon, P., Anctil, M. y Dubé, F. 2002. Localization and quantification of gonad serotonin during gametogenesis of the surf clam, *Spisula solidissima*. *Biol. Bull.* 202, 23-33.
- Mathieu, M. y Lubet, P. 1993. Storage tissue metabolism and reproduction in marine bivalves- a brief review. *Invertebr. Reprod. Dev.* 23, 123-129.
- Mathieu, M., Dubois, B., Costil, K., Heude, C., Huvet, A., Kellner, K. y Pouvreau, S., 2003. Characterization of summer mortalities of *Crassostrea gigas* oyster in relation to physiological parameters. *J. Shellfish Res.* 22, 343-344.
- Matsumoto, T., Nakamura, A.M., Mori, K. y Kayano, T. 2003. Molecular Characterization of a cDNA encoding putative vitellogenin from the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Zoological Science* 20, 37-42.
- Matsuno, A. y Kuga, H. 1989. Ultrastructure of muscle cells in the adductor of the boring clam *Tridacna crocea*. *J. Morphol.* 200, 247-253.
- Matsutani, T. 1990. Endogenous factors controlling spawning in marine bivalves. En: Hoshi, M. y Yamashita, O. (Eds.). *Advances in Invertebrate Reproduction* Vol. 5. Elsevier Science, Amsterdam. 231-237 pp.
- Matsutani, T. y Nomura, T. 1986. Serotonin-like immunoreactivity in the central nervous system and gonad of the scallop, *Patinopecten yessoensis*. *Cell and Tissue Res.* 244, 515-517.
- Matsutani, T. y Nomura, T. 1987. In vitro effects of serotonin and prostaglandins on release of eggs from the ovary of the scallop, *Patinopecten yessoensis*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 67, 111-118.
- Matus de la Parra, A., García, O. y San Juan, F. 2005. Seasonal variations on the biochemical composition and lipid classes of the gonadal and storage tissues of *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1794) in relation to gametogenic cycle. *J. Shellfish Res.* 24, 457-467.

- Mazón-Suástegui, J.M. y Avilés-Quevedo, M.A. 1988. Ensayo Preliminar sobre la Alimentación de Bivalvos Juveniles con Dietas Artificiales. *Revista Latinoamericana de Acuicultura* 36: 56–62.
- Mercier, L., Palacios, E., Campa-Córdova, A. I., Tovar-Ramírez, D., Hernández-Herrera, R. y Racotta, I. S. 2006. Metabolic and immune responses in Pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to a repeated handling stress *Aquaculture* 258, 633-640.
- McGinnis, K.M., Dempster, T.A. y Sommerfeld, M.R. 1997. Characterization of the growth and lipid content of the diatom *Chaetoceros muelleri*. *J. Appl. Phycol.* 9, 19-24.
- Miki, W. 1991. Biological functions and activities of animal carotenoids. *Pure & Appl. Chem.* 63, 141-146.
- Millman, B.M. 1964. Contraction in the opaque part of the adductor muscle of the oyster (*Crassostrea angulata*). *J. Physiol.* 173, 238-262.
- Miyamoto, H., Hamaguchi, M. y Okoshi, K. 2002. Analysis of genes expressed in the mantle of oyster *Crassostrea gigas*. *Fish. Sci.* 68, 651-658.
- Moal, J., Bédier, E., Gildas Fleury, P., Langlade, A., Le Coguc, Y., Dégremont, L., Boudry, P., Le Coz, J. R., Pouvreau, S., Enriquez-Díaz, M., Lambert, C., Soudant, P. y Samain, J.-F. 2003. Genetic variability in reproduction and summer mortality in *Crassostrea gigas*. *J. Shellfish Res.* 22, 345.
- Mohammady, N.G. 2004. Total, free and conjugated sterolic forms in three microalgae used in mariculture. *Z. Naturforsch.* 59c, 619-624.
- Moncada, S., Palmer, R.M. y Higgs, E.A. 1991. Nitrite oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Revue.* 43, 109-142.
- Mori, K. 1979. Effects of artificial eutrophication on the metabolism of the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. *Mar. Biol.* 53, 361-369.
- Morse, D.E., Duncan, H., Hooker, N. y Morse, A. 1977. Hydrogen peroxide induces spawning in mollusks, with activation of prostaglandin endoperoxide synthetase. *Science* 196, 298-300.
- Morse, N.H. 1971. An economic study of the oyster fishery of the Maritime Provinces. *Fish. Res. Board of C.* 81 p.
- Morton, J.E. 1952. The role of the crystalline style. *J. Moll. Stud.* 29, 85-92.

- Nakayama, K. y Maruyama, T. 1998. Differential production of active oxygen species in photo-symbiotic and non-symbiotic bivalves. *Develop. Comp. Immunol.* 22, 151-159.
- Napolitano, G. E. y Ackman, R. G. 1992. Anatomical distributions and temporal variations of lipid classes in sea scallop *Placopecten magellanicus* (Gmelin) from Georges Bank (Nova-Scotia). *Comp. Biochem. Physiol.* 103B:645-650.
- Napolitano, G.E., Ackman, R.G. y Silva-Serra, M.A. 1993. Incorporation of dietary sterols by the sea scallop *Placopecten magellanicus* fed on microalgae. *Mar. Biol.* 117, 647-654.
- Nell, J.A. 1993. The development of oyster diets. *Aust. J. Agric. Res.* 44, 557-566.
- Nes, W.D. 1974. Role of sterols in membranes. *Lipids* 9, 596-612.
- Nevejan, N., Courtens, V., Hauva, M., Gajardo, G. y Sorgeloos, P. 2003. Effect of lipid emulsions on production and fatty acid composition of eggs of the scallop *Argopecten purpuratus*. *Mar. Biol.* 143, 327-338.
- Ojea, J., Pazos, A.J., Martinez, D., Novoa, S., Sanchez, J.L. y Abad, M. 2004. Seasonal variation in weight and biochemical composition of the tissues of *Ruditapes decussates* in relation to the gametogenic cycle. *Aquaculture* 238: 451-468.
- Ojeda-Ramírez, J.J., Cáceres-Puig, J.I., Mazón-Suástegui, J.M. y Saucedo, P.E. 2008. Nutritional value of *Pavlova* spp. (Prymnesiophyceae) for spat of the Cortez oyster *Crassostrea corteziensis* during late-nursery culturing at the hatchery. *Aquacult. Res.* 39, 18-23.
- Olicard, C., Renault, T., Torhy, C., Benmansour, A. y Bourgougnon, N. 2005. Putative antiviral activity in hemolymph from adult Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. *Antiviral Research* 66, 147-152.
- Oliw, E., Granström, E. y Änggard, E. 1983. The prostaglandins and essential fatty acids. En: Granström, P.A. (Ed.). *Prostaglandins and Related Substances*, Elsevier Science Publishers, B.V., 1-44 pp.
- Ono, K., Osada, M., Matsutani, T., Mori, H. y Nomura, T. 1982. Gonadal prostaglandin F2 $\alpha$  profile during sexual maturation in the oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg. *Mar. Biol. Lett.* 3, 223-230.
- Osada, M., T. Matsutani y Nomura, T. 1987. Implication of catecholamines during spawning in marine bivalves molluscs. *Invertebr. Reprod. Develop.* 12:241-252.

- Osada, M. y Nomura, T. 1990. The levels of prostaglandins associated with the reproductive cycle of the scallop *Patinopecten yessoensis*. Prostaglandins 40, 229-239.
- Otero, A., García, D. y Fábregas, J. 1997. Factors controlling eicosapentaenoic acid production in semicontinuous cultures of marine microalgae. J. Appl. Phycol. 9, 465-469.
- Páez-Osuna, F., Zazueta-Padilla, H.M., Rodríguez-Higuera, A. y Osuna-López, J.I. 1991. Variación estacional de la composición química del ostión *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1951) en Mazatlán (Sinaloa, México). An. Inst. Cienc. del Mar y Limnol. Univ. Nal. Auto. 18, 1-12.
- Páez-Osuna, F., Zazueta-Padilla, H.M. y Osuna-López, J.I. 1993. Biochemical composition of the oysters *Crassostrea iridescens* Hanley and *Crassostrea corteziensis* Hertlein in the Northwest coast of Mexico seasonal changes. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 170, 1-9.
- Palacios, E., Racotta, I.S., Heras, H., Marty, Y., Moal, J. y Samain, J.F. 2001. Relation between lipid and fatty acid composition of eggs and larval survival in white pacific shrimp (*Penaeus vannamei*, Boone, 1931). Aquacut. Int. 9, 531-543.
- Palacios, E., Racotta, I.S., Marty, Y., Kraffe, E., Moal, J. y Samain, J.F. 2005. Lipid composition of the Pacific lion-paw scallop, *Nodipecten (Lyropecten) subnodosus*, in relation to gametogenesis. I. Fatty acids. Aquaculture 250, 270-282.
- Palacios, E., Racotta, I.S., Arjona, O., Marty, Y., Le Coz, J.R., Moal, J., Samain, J.F. 2007. Lipid composition of the pacific lion-paw scallop, *Nodipecten subnodosus*, in relation to gametogenesis 2. Lipid classes and sterols. Aquaculture 266, 266-273.
- Pani, A.K. y Croll, R.P. 2000. Catechol concentrations in the hemolymph of the Scallop, *Placopecten magellanicus*. Gen. Comp. Endocr. 118, 48-56.
- Parrish, C.C., Wells, J.S., Yang, Z. y Dabinett, P. 1998. Growth and lipid composition of scallop juveniles, *Placopecten magellanicus*, fed the flagellate *Isochrysis galbana* with varying lipid composition and the diatom *Chaetoceros muelleri*. Mar. Biol. 133, 461-471.
- Patil, V., Kälqvist, T., Olsen, E., Vogt, y Gislerød, G. 2007. Fatty acid composition of 12 microalgae for possible use in aquaculture feed. Aquacult. Int. 15, 1-9.
- Patterson, G.W., Tsitsa-Tzardis, E., Wikfors, G.H., Ghosh, P., Smith, B.C. y Gladu, P.K. 1994. Sterols of eustigmatophytes. Lipids 29, 661-664.

- Pazos, A. J., G. Román, C. P. Acosta, M. Abad y Sánchez, J. L. 1997. Seasonal changes in condition and biochemical composition of the scallop *Pecten maximus* L. from suspended culture in the Ria de Arousa (Galicia, N. W. Spain) in relation to environmental conditions J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 211, 169-193.
- Pazos, A.J., Sánchez, J.L., Román, G., Luz Pérez-Parallé, M. y Abad, M. 2003. Seasonal changes in lipid classes and fatty acid composition in the digestive gland of *Pecten maximus*. Comp. Biochem. Physiol. 134B, 367–380.
- Perdue, J.A., Beattie, J.H. y Chew, K.K. 1981. Some relationships between gametogenic cycle and summer mortality phenomenon in the Pacific oyster (*C. gigas*) in Washington state. J. Shellfish Res. 1:9-16.
- Pernet, F., Tremblay, R., Langdon, C. y Bourget, E. 2004. Effect of additions of dietary triacylglycerol microspheres on growth, survival, and settlement of mussel (*Mytilus* sp.) larvae. Mar. Biol. 144, 693-703.
- Piveteau, F., Gandemer, G., Baub, J.-P. y Demaimay, M., 1999. Changes in lipid and fatty acid compositions of European oysters fattened with *Skeletonema costatum* diatom for six weeks in ponds. Aquacult. Int. 7, 341-355.
- Pratoomyot, J., Sriviliyas, P. y Noiraksar, T. 2005. Fatty acids composition of 10 microalgal species. Songklanakarin J. Sci. Technol. 27, 1179-1187.
- Ponis, E., Robert, R. y Parisi, G. 2003. Nutritional value of fresh and concentrated algal diets for larval and juvenile Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). Aquaculture 221:491-505.
- Poon, R., Richards, J.M. y Clark, W.R. 1981. The relationship between plasma membrane lipid composition and physical-chemical properties. II. Effect of phospholipid fatty acid modulation on plasma membrane physical properties and enzymatic activities. Biochim. Biophys. Acta 649, 58-66.
- Pouvreau, S., Enriquez-Díaz, M., Le Souchu, P., Connan, J. P., Le Roy, B., Mingant, C., Moal, J., Delaporte, M., Le Coz, J. R. y Samain, J.-F., 2003. Reproduction, bioenergetic and summer mortality of *Crassostrea gigas*: Experimental approach. J. Shellfish Res. 22, 351.
- Racotta, I. S., J. L. Ramírez, S. Avila y Ibarra, A. M. 1998. Biochemical composition of gonad and muscle in the catarina scallop, *Argopecten ventricosus*, after reproductive conditioning under two feeding systems. Aquaculture 163:111-122.
- Racotta, I.S., Ramírez, J.L., Ibarra, A.M., Rodriguez-Jaramillo, C., Carreño, D. y Palacios, E. 2003. Growth and gametogenesis in the lion-paw scallop *Nodipecten (Lyropecten) subnodosus*. Aquaculture 217, 335-349.

- Racotta, I.S., Palacios, E., Ibarra, A.M., Ramírez, J.L., Arcos, F., Arjona, O. 2008. Comparative biochemical composition of ploidy groups of the lion-paw scallop (*Nodipecten subnodosus* Sowerby) supports the physiological hypothesis for the lack of advantage in triploid mollusc's growth in food-rich environments. *Mar. Biol.* 153, 1245-1256.
- Ragg, N., King, N., Watts, E. y Morrish, J. 2008. The conflicting requirements of feeding an important but potentially toxic diatom, *Chaetoceros calcitrans*, to Greenshell™ mussel larvae. Physiological aspects of reproduction, nutrition and growth: Marine molluscs in a changing environment. En: Book of abstracts of Physiomar meeting (compilado por Gasbeek, M. y McCombie, H.), editado por IFREMER; Brest, Francia, 1-4 de septiembre.
- Ram, J.L., Moore, D., Putchakayala, S., Paredes, A.A., Ma, D. y Croll, R.P. 1999. Serotonergic responses of the siphons and adjacent mantle tissue of the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*. *Comp. Biochem. Physiol.* 124C, 211-220.
- Ramírez-Granados, R. y Sevilla, M.L. 1965. Las Ostras de México. Datos Biológicos y Planeación de su Cultivo. México.
- Ramírez, J.L., Avila, S. e Ibarra, A.M. 1999. Optimization of forage in two food-filtering organisms with the use of a continuous low-food concentration, agricultural drip system. *Aquacult. Eng.* 20, 175-189.
- Raven, Chr. P. 1961. Oogenesis: The storage of developmental information. Pergamon Press. E.U.A. 227 p.
- Ren, J.S., Marsden, I.D., Ross, A.H. y Schiel, D.R. 2003. Seasonal variation in the reproductive activity and biochemical composition of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) from the Marlborough Sounds, New Zealand. *New Zeland J. Mar. Freshwater Res.* 37, 171-182.
- Renaud, S.M., Parry, D.L., Thinh, L.V., Kuo, C., Padovan, A. y Sammy, N. 1991. Effect of light intensity on the proximate biochemical and fatty acid composition of *Isochrysis* sp and *Nannochloropsis oculata* for use in tropical aquaculture. *J. Appl. Phycol.* 3, 43-53.
- Renaud, S.M., Thinh, L.-V. y Parry, D.L. 1999. The gross chemical composition and fatty acid composition of 18 species of tropical Australian microalgae for possible use in mariculture. *Aquaculture* 170, 147-159.
- Renaud, S.M., Thinh, L.-V., Lambrinidis, G. y Parry, D.L. 2002. Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures. *Aquaculture* 211, 195-214.

- Rivero-Rodríguez, S., Beaumont, A.R. y Lora-Vilchis, M.C. 2007. The effect of microalgal diets on growth, biochemical composition, and fatty acid profile of *Crassostrea corteziensis* (Hertlein) juveniles. *Aquaculture* 263, 199-210.
- Robert, R., Chretiennot-Dinet, M.-J., Moal, J., Le Coz, J.-R., Nicolas, J.-L., Bernard, E., Connan, J.-P., Le Dean, L., Le Gourrierec, G., Leroy, B. y Queré, C. 2004. Amélioration des productions phytoplanctoniques en éclosion de mollusques: caractérisation des microalgues fourrage. Brest, France. 1-150.
- Robinson, A. 1992a. Dietary supplements for reproductive conditioning of *Crassostrea gigas* Kumamoto (Thunberg). I. Effects on gonadal development, quality of ova and larvae through metamorphosis. *J. Shellfish Res.* 11, 437-441.
- Robinson, A. 1992b. Dietary supplements for the reproductive conditioning of *Crassostrea gigas* Kumamoto (Thunberg): II Effects on glycogen, lipid and fatty acid content of broodstock oysters and eggs. *J. Shellfish Res.* 11, 443-447.
- Rodríguez-Jaramillo, C., Hurtado, M.A., Vivas, E., Ramírez, J.L., Manzano, M. y Palacios, E. 2008. Gonadal development and histochemistry of the tropical oyster, *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1951) during an annual reproductive cycle *J. Shellfish Res.* 27, 1-13.
- Rodríguez-Romero, F., Laguarda-Figueras, A. y Uribe-Alcocer, M. 1979. Comparative analysis of the karyotypes of two oyster species of the genus *Crassostrea* from México: *C. virginica* and *C. corteziensis*. *An. Inst. Cienc. del Mar y Limnol. Univ. Nal. Auto.* 6, 1-6.
- Rodríguez-Romero, F., Uribe-Alcocer, M. y Laguarda-Figueras, A. 1979. The karyotype of *Crassostrea corteziensis* Hertlein (Mollusca: Ostreidae). *An. Inst. Cienc. Mar Limnol. Univ. Nal. Auto.* 6, 1-7.
- Rodríguez-Romero, F., García-Saez, C. y Laguarda-Figueras, A. 1988. Electrophoretic patterns variation in two oyster populations of *Crassostrea corteziensis* from the mexican coast. *An. Inst. Cienc. Mar Limnol. Univ. Nal. Auto.* 15, 1-12.
- Roe, J.H. 1955. The determination of sugar in blood and spinal fluid with antrone reagent. *J. Biol. Chem.* 212, 335-343.
- Rogers, P. y García-Cubas, A. 1981. Evolución gonádica a nivel histológico del ostión *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791) del sistema fluvio lagunar Atasta-Pom, Laguna de Términos, Campeche, México. *An. Inst. Cienc. del Mar y Limnol. Univ. Nal. Auto.* Vol. 8, 21-42.

- Roland, I., De Leval, X., Evrard, B., Pirotte, B., Dogne, J.M. y Delattre, L. 2004. Modulation of the arachidonic cascade with omega3 fatty acids or analogues: potential therapeutic benefits. *Mini Rev. Med. Chem.* 4, 659-68.
- Romberger, H.P. y Epifanio, C.E. 1981. Comparative effects of diets consisting of one or two algal species upon assimilation efficiencies and growth of juvenile oysters, *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Aquaculture* 25, 77-87.
- Roncarati, A., Meluzzi, A., Acciarri, S., Tallarico, N. y Melotti, P. 2004. Fatty acid composition of different microalgae strains (*Nannochloropsis* sp., *Nannochloropsis oculata* (Droop) Hibberd, *Nannochloropsis atomus* Butcher and *Isochrysis* sp.) according to the culture phase and the carbon dioxide concentration. *J. World Aquacult. Soc.* 35, 401-411.
- Rowley, A.F., Knight, J., Lloyd-Evans, P., Holland, J.W. y Vickers, P.J. 1995. Eicosanoids and their role in immune modulation in fish-a brief overview. *Fish Shellfish Immunol.* 5, 549-567.
- Rowley, A.F., Vogan, C.L., Taylor, G.W. y Clare, A.S. 2005. Prostaglandins in non-insectan invertebrates: recent insights and unsolved problems. *J. Exp. Biol.* 208, 3-14.
- Ruíz Durá, Ma. F. 1974. Estudio histológico de los ciclos gonádicos de *Ostrea corteziensis* Hertlein, *Crassostrea virginica* Gmelin, *Crassostrea iridescens* Hanley. 1-16. FAO. Simposio FAO/Carpas Sobre Acuicultura en América Latina. Montevideo, Uruguay.
- Ruddy, G.M., Feng, S.Y. y Campbell, G.S. 1975. The effect of prolonged exposure to elevated temperatures on the biochemical constituents, gonadal development and shell deposition of the American oyster *Crassostrea virginica*. *Comp. Biochem. Physiol.* 51B, 157-164.
- Ruíz, C.A., Abad, M., Sedane, F., García-Martín, L.O. y J.L. Sánchez-López. 1992. Influence of seasonal environmental changes on the gamete production and biochemical composition of *Crassostrea gigas* (Thunberg) in suspended culture in El Grove, Galicia, Spain. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 155: 249-262.
- Ruíz-Verdugo, C. A., I. S. Racotta y A. M. Ibarra. 2001. Comparative biochemical composition in gonad and adductor muscle of triploid catarina scallop (*Argopecten ventricosus* Sowerby II, 1842). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 259:155-170.
- Samain, J.-F., Mathieu, M., Garcia, O., Espinosa, J., Caers M. y Moal, J. 2000. Giganuga 5: reproduction of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* at fall, a combination of physical and nutritional factors? Perspectives for a better reproduction process in



hatcheries. May 2-6, 2000 Nice, France, European Aquaculture Society, Special Publication No. 28. 69-77.

- Samain, J.-F., Sorgeloos, P., Caers, M., Van Ryckeghem, C., Soudant, P., Garcia, O., Espinosa, J., Marty, Y., Mathieu, M., Berthelin, C., Quere, C., Le Coz, J. R., Segueineau, C. y Moal, J. 2000. Nutrition and reproduction of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: Main results of the European project GIGANUGA (GIGAS nutrition and Gametogenesis). Hendry, C. I., Van Stappen, G., Wille, M., and Sorgeloos, P. Larvi 2001. Ghent, Belgium, European Aquaculture Society, Special Publication No. 30. 532-535.
- Samain, J.F., Dégremont, L., Soletchnik, P., Haure, J., Bédier, E., Ropert, M., Moal, J., Huvet, A., Bacca, H., Van Wormhoudt, A., Delaporte, M., Costil, K., Pouvreau, S., Lambert, C., Boulo, V., Soudant, P., Nicolas, J.L., Le Roux, F., Renault, T., Gagnaire, B., Geret, F., Boutet, I., Burgeot, T. y Boudry, P. 2007. Genetically based resistance to summer mortality in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and its relationship with physiological, immunological characteristics and infection processes. *Aquaculture* 268, 227-243.
- Sammon, A.M. 1999. Dietary linoleic, immune inhibition and disease. *Postgrad. Med.* 75, 129-132.
- Sanchez-Martínez, A.J. 1994. El sistema lagunar Teacapán-Agua Brava. En: de la Lanza-Espino, G., Salaya-Ávila, J.J. y Varsi E. (Eds.). Manejo y aprovechamiento acuícola de las lagunas costeras en América Latina y el Caribe. Taller regional sobre lagunas costeras, México, D.F. 9-12 Febrero de 1994. Proyecto Aquila, Documento de campo No. 10.
- San Juan Serrano, F., Fernández González, M., Sánchez López, J.L. y García Martín, L.O. 1991. Purification and molecular properties of glycogen phosphorylase b from mantle tissue of mussel, *Mytilus galloprovincialis*. *Comp. Biochem. Physiol.* 98B, 33-39.
- Saout, C., Quere, C., Donval, A., Paulet, Y.M. y Samain, J.F. 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.
- Sastry, A. N. 1968. The relationships among food, temperature, and gonad development of the Bay Scallops *Aequipecten irradians* Lamarck. *Physiol. Zool.* 41:44-53.
- Sastry, A. N., 1979. Pelecypoda (excluding Ostreidae). En: Giese, A.C. y J. S. Pearse, (Eds.), *Reproduction of Marine Invertebrates*. New York: Academic Press, 113-292 pp.

- Schlenk, D. y Buhler, D.R. 1990. The in-vitro biotransformation of 2 aminofluorene in the visceral mass of the pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Xenobiotica*, 20, 563-572.
- Seguineau, C., Saout, C., Paulet, Y.M., Muzellec, M.-L., Quéré, C., Moal, J. y Samain, J.-F. 2001. Changes in tissue concentrations of the vitamins B1 and B2 during reproductive cycle of bivalves Part 1: The scallop *Pecten maximus*. *Aquaculture* 196, 125-137.
- Seguineau, C., Migaud, H., Quéré, C., Moal, J. y Samain, J.-F. 2001. Changes in tissue concentrations of the vitamins B1 and B2 during reproductive cycle of bivalves Part 2. The Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Aquaculture* 196, 139-150.
- Serhan, C.N., Hamberg, M. y Samuelsson, B. 1984. Lipoxins: novel series of biologically active compounds formed from arachidonic acid human leukocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81, 5335-5339.
- Shaw, B. L. y Batle, H. I. 1957. The gross and microscopic anatomy of the digestive tract of the oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Can. J. Zool.* 35:325-346.
- Sidwell, V.D., Loomis, A.L. y Grodner, R.M. 1979. Geographical and monthly variation in composition of oysters *Crassostrea virginica*. *Mar. Fish. Rev.* 41, 13-17.
- Siniscalchi, A., Cavallini, S., Sonetti, D., Sbrenna, G., Capuano, S., Barbin, L., Turrolla, E., Rossi, R. 2004. Serotonergic neurotransmission in the bivalve *Venus verrucosa* (Veneridae): a neurochemical and immunohistochemical study of the visceral ganglion and gonads. *Mar. Biol.* 144, 1205-1212.
- Song, Y.L. y Hsieh, Y.T. 1994. Immunostimulation of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) hemocytes for generation of microbicidal substances: analysis of reactive oxygen species. *Dev. Comp. Immunol.* 18, 201-209.
- Song, L., Li, X., Clarke, S., Wang, T. y Bott, T. 2007. The effect of size on the response of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) to changes in water temperature and air exposure. *Aquacult. Int.* 15, 351-362.
- Soudant, P., Marty, Y., Moal, J., Robert, R., Quéré, C., Le Coz, J.R. y Samain, J.F. 1996a. Effect of food fatty acid and sterol quality on *Pecten maximus* gonad composition and reproduction process. *Aquaculture* 143, 361-378.
- Soudant, P., Marty, Y., Moal, J. y Samain, J.F. 1996b. Fatty acids and egg quality in great scallop. *Aquacult. Int.* 4, 191-200.
- Soudant, P., Moal, J., Marty, Y. y Samain, J.F. 1996c. Impact of the quality of dietary fatty acids on metabolism and the composition of polar lipid classes in female gonads of *Pecten maximus* (L.). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 205, 149-163.

- Soudant, P., Moal, J., Marty, Y. y Samain, J.F. 1997. Composition of polar lipid classes in male gonads of *Pecten maximus* (L.). Effect of nutrition. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 215, 103-114.
- Soudant, P., Marty, Y., Moal, J., Masski, H. y Samain, J.F. 1998a. Fatty acid composition of polar lipid classes during larval development of scallop *Pecten maximus* (L.). Comp. Biochem. Physiol. 121A, 279-288.
- Soudant, P., Le Coz, J.R., Marty, Y., Moal, J., Robert, R. y Samain, J.F. 1998b. Incorporation of microalgae sterols by scallop *Pecten maximus* (L.) larvae. Comp. Biochem. Physiol. 119A, 451-457.
- Soudant, P., Van Ryckeghem, K., Marty, Y., Moal, J., Samain, J.-F. y Sorgeloos, P. 1999. Comparasion of the lipid class and fatty acid composition between a reproductive cycle in nature and standard hatchery conditioning of the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. Comp. Biochem. Physiol. 123B, 209-222.
- Stacey, N. E. y Goetz, F. W. 1982. Role of prostaglandins in fish reproduction. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 39, 92-98.
- Stanley-Samuelson, D. 1987. Physiological roles of prostaglandins and other eicosanoids in invertebrates. Biol. Bull. 173, 92-109.
- Stanley-Samuelson, D. 1994. The biological significance of prostaglandins and related eicosanoids in invertebrates. Amer. Zool., 34, 589-598.
- Stanley, D.W. y Miller, J.S. 2006. Eicosanoid actions in insect cellular immune functions. Etomol. Exp. Appl. 119, 1-13.
- Stuardo, J. y Martínez, A. 1975. Relaciones entre algunos factores ecológicos y la biología, de poblaciones de *Crassostrea corteziensis* Hertlein, 1951, de San Blas, Nayarit, México. An. Inst. Cienc. del Mar y Limnol. Univ. Nal. Auto. 2, 1-51.
- Suzuki, T., Hara, A., Yamaguchi, K. y Mori, K. 1992. Purification and immunolocalization of a vitellin-like protein from the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Mar. Biol. 113, 239-245.
- Swift, M.L., White, D. y Ghassemieh, M.B. 1980. Distribution of neutral lipids in the tissues of the oyster *Crassostrea virginica*. Lipids 15, 129-132.
- Swift, M.L., Thomas, T.P. y Humphrey, C.L. 1988. Characteristics of glycogen synthase activity in the oyster, *Crassostrea virginica* Gmelin. Comp. Biochem. Physiol. 90B, 361-365.

- Tanabe, T., Osada, M., Kyojuka, K., Inaba, K. y Kijima, A. 2006. A novel oocyte maturation arresting factor in the central nervous system of scallops inhibits serotonin-induced oocyte maturation and spawning of bivalve mollusks. *Gen. Comp. Endocrinol.* 147, 352-361.
- Teshima, S.-I., Patterson, G.W. y Dutky, S.R. 1980. Sterols of the oyster, *Crassostrea virginica*. *Lipids* 15, 1004-1011.
- Teshima, S.-I. y Patterson, G.W. 1981. Sterol biosynthesis in the oyster, *Crassostrea virginica*. *Lipids* 16, 234-239.
- Thompson, R.J., Newell, R.I.E., Kennedy, V.S. y Mann, R. 1996. Reproductive Processes and Early Development. En: Kennedy, V.S., Newell, R.I.E. y Eble, A.F. (Eds.). *The Easter Oyster: Crassostrea virginica*, Maryland Sea Grant College, Maryland, U.S.A., 335-370 pp.
- Tirapé, A., Bacque, C., Brizard, R., Vandebulcke, F. y Boulo, V. 2007. Expression of immune-related genes in the oyster *Crassostrea gigas* during ontogenesis. *Dev. Comp. Immunol.* 31, 859-873.
- Tonon, T., Harvey, D., Larson, T.R. y Graham, I.A. 2002. Long chain polyunsaturated fatty acid production and partitioning to triacylglycerols in four microalgae. *Phytochemistry* 61, 15-24.
- Trider, D.J. y Castell, J.D. 1980. Effect of dietary lipids on growth, tissue composition and metabolism of the oyster (*Crassostrea virginica*). *J. Nutr.* 110, 1303-1309.
- Tsitsa-Tzardis, E., Patterson, G.W., Wikfors, G.H., Gladu, P.K. y Harrison, D. 1993. Sterols of *Chaetoceros* and *Skeletonema*. *Lipids* 28, 465-467.
- Urban, H.-J. 2000. Culture potential of the pearl oyster (*Pinctada imbricata*) from the Caribbean. I. Gametogenic activity, growth, mortality and production of a natural population. *Aquaculture* 189, 361-373.
- Turner, N., Else, P.L. y Hulbert, A.J. 2003. Docosahexaenoic acid (DHA) content of membranes determines molecular activity of the sodium pump: Implications for disease states and metabolism. *Naturwissenschaften* 90, 521-523.
- Uriarte, I., Farías, A., Navarro, J.M., Cancino, J., Gajardo, G. y Nevejan, N. 2003. Effects of lipid emulsions and temperature on the hatchery performance of Chilean scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck 1819) larvae. *Aquacult. Res.* 34, 899-902.

- Uriarte, I., Farías, A., Hernandez, J., Schäfer, C. y Sorgeloos, P. 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. y Millican, P. 1997. Techniques for the hatchery conditioning broodstocks and the subsequent effect quality and larval viability. *Aquaculture* 155, 45-54.
- van Weel, P.B. 1961. The comparative physiology of digestion in molluscs. *Amer. Zool.* 1, 245-252.
- Venkatesh, B., Tan, C.H. y Lam, T.J. 1992. Prostaglandins and teleost neurohypophyseal hormones induce premature parturition in the guppy, *Poecilia reticulata*. *Gen Comp Endocrinol.* 87, 28-32.
- Vershinin, A., 1996. Carotenoids in mollusca: approaching the functions. *Comp. Biochem. Physiol.* 113B, 63-71.
- Vidussi, F., Claustre, H., Bustillos-Gúzman, J., Cailliau, C. y Marty, J.C. 1996. Determination of chlorophylls and carotenoids of marine phytoplankton: Separation of chlorophyll a from divinyl chlorophyll a and zeaxanthin from lutein. *J. Plankton Res.* 18, 2377-2382.
- Viso, A.C. y Marty, J.C. 1993. Fatty acids from 28 marine microalgae. *Phytochemistry* 34, 1521-1533.
- Volkman, J.K., Jeffrey, S.W., Nichols, P.D., Rogers, G.I. y Garland, C.D. 1989. Fatty acid and lipid composition of 10 species of microalgae used in mariculture. *J. Exp. Biol. Ecol.* 128, 219-240.
- Volkman, J.K., Rijpstra, W.I.C., de Leeuw, J.W., Mansour, M.P., Jackson, A.E. y Blackburn, S.I. Sterols of four dinoflagellates from the genus *Prorocentrum*. *Phytochemistry* 52, 659-668.
- Voogt, P.A. 1975. Investigations of the capacity of synthesizing 3 $\beta$ -sterols in mollusca-XIV. Biosynthesis and composition of sterols in some bivalves (Eulamellibranchia). *Comp. Biochem. Physiol.* 50B, 505-510.
- Waldock, M.J. y Holland, D.L. 1984. Fatty acid metabolism in young oysters, *Crassostrea gigas*: polyunsaturated fatty acids. *Lipids* 19, 332-336.
- Wander, R.C., Hall, J.A., Gradin, J.L., Du, S.-H. y Jewell, D.E. 1997. The ratio of dietary (n-6) to (n-3) fatty acids influences immune system function, eicosanoid metabolism, lipid peroxidation and vitamin E status in aged dogs. *J. Nutr.* 127, 1198-1205.

- Ward, J.E., Newell, R.I.E., Thompson, R.J., MacDonald, B.A. 1994. In vivo studies of suspension-feeding processes in the eastern oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Bio. Bull.* 186, 221-240.
- Watkins, B.A., Shen, C.-L., McMurtry, J.P., Xu, H., Bain, S.D., Allen, K.G.D. y Seifert, M.F. 1997. Dietary lipids modulate bone prostaglandins E<sub>2</sub> production, insuline-like growth factor-I concentration and formation rate chicks. *J. Nutr.* 127, 1084-1091.
- Yamaguchi, T., Ito, K. y Hata, M. 1986. Studies in some marine phytoplanktons. *Tohoku J. Agric. Res.* 37, 5-14.
- Zhu, C.J., Lee, Y.K. y Chao, T.M. 1997. Effects of temperature and growth phase on lipid and biochemical composition of *Isocrysis galbana* TK1. *J. Appl. Phycol.* 9, 451-457.
- Zar, J.H. 1999. *Biostatistical analysis*. Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ, U.S.A 663 p.

## Anexo A

Las series de datos de temperatura superficial del mar (Fig. 53) y clorofila *a* (Fig. 54) (una aproximación de la disponibilidad de fitoplancton) que se utilizaron en esta tesis para evaluar los efectos en la maduración y crecimiento de los ostiones de Laguna de Ceuta fueron obtenidos a través del análisis de imágenes de satélite o percepción remota. Para ambas series de datos se calcularon los valores mensuales de enero de 2005 a mayo de 2006, así como los estacionales a partir de los promedios mensuales de 2002 a 2006 y de 1997 a 2006 para temperatura y clorofila *a*, respectivamente. Las series de datos fueron obtenidas de un área adyacente a la boca artificial de la Laguna de Ceuta, esto debido a lo estrecho de la fisiografía de la laguna y la resolución de 1km de las imágenes utilizadas para obtener los datos. Todo esto se debió a que los registros de los datos *in situ* se perdieron durante el 2006 tras el paso de dos huracanes (Lane y John) en la zona de muestreo. Sin embargo, posteriormente se pudo validar la información obtenida por percepción remota con datos *in situ* para 2007, obteniéndose una positiva y significativa correlación entre ambas series de datos ( $r^2=0.97$ ). En el caso de la clorofila *a* la validación de entre ambas series de datos (percepción remota vs. *in situ*) se realizó a través del análisis de carotenoides en los tejidos de los ostiones, los cuales se correlacionaron positiva y significativamente con la clorofila *a* ( $r^2=0.60$ ). Resulta probable que la alta correlación de la temperatura se deba a la proximidad de donde fueron obtenidas ambas series de datos (percepción remota vs. *in situ*), así como a la dinámica particular de la boca de la laguna, la cual facilita el intercambio de agua, nutrientes y alimento entre el océano y el interior de la laguna. Esto se reflejó en la correlación que se observó entre la clorofila *a*, la cual se obtuvo en la parte costera afuera de la laguna, y los carotenoides en los tejidos de los

ostiones que fueron recolectados en una zona próxima a la boca artificial en el interior de la laguna.

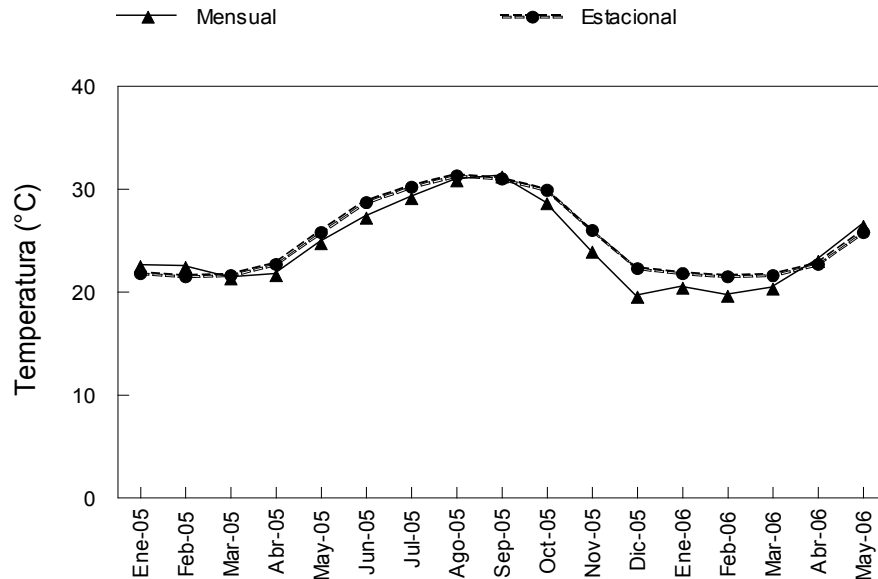


Fig. 53 Valores de temperatura superficial del mar mensual (Ene-05 a May-06) y estacional promedio (2002-2006) de la zona adyacente a la boca artificial de Laguna de Ceuta, Sinaloa.

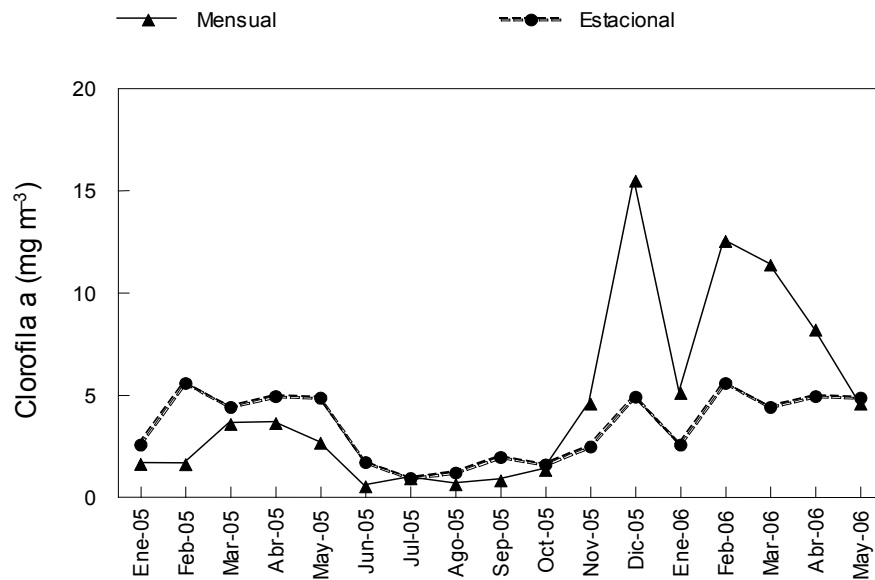


Fig. 54 Concentración de clorofila *a* ( $\text{mg m}^{-3}$ ) mensual (Ene-05 a May-06) y estacional promedio (1997-2006) de la zona adyacente a la boca artificial de Laguna de Ceuta, Sinaloa.



## Anexo B

Tabla XXII. Concentración ( $\text{mg g}^{-1}$ ) de esteroides de la suma de las fracciones libre y esterificada de esteroides en hembras de *C. corteziensis* muestreadas en Laguna de Ceuta, Sinaloa de abril de 2005 a abril de 2006.

	2005								2006			
	Abril	Mayo	Junio	Julio	Septiembre	Octubre	Noviembre	Diciembre	Enero	Febrero	Marzo	Abril
$\text{mg g}^{-1}$												
Colesterol	1.14±0.24b	0.78±0.01b	0.86±0.07cd	1.16±0.18ab	1.25±0.13a	0.89±0.09c	0.80±0.04d	0.96±0.06bc	0.75±0.03d	0.75±0.07d	0.77±0.03d	0.78±0.08d
Brassicasterol	0.40±0.05a	0.34±0.01ab	0.36±0.03ab	0.36±0.03ab	0.35±0.02ab	0.30±0.03ab	0.27±0.01b	0.35±0.02ab	0.38±0.02ab	0.34±0.03ab	0.35±0.02ab	0.32±0.03ab
Isofucosterol	0.26±0.04ab	0.27±0.03ab	0.30±0.03a	0.27±0.02ab	0.30±0.05ab	0.23±0.02b	0.23±0.03b	0.30±0.01ab	0.29±0.02ab	0.25±0.03ab	0.24±0.02ab	0.26±0.02ab
Campesterol	0.17±0.01a	0.13±0.01bc	0.07±0.01d	0.09±0.01cd	0.07±0.02d	0.06±0.01d	0.06±0.01d	0.11±0.01d	0.14±0.01b	0.16±0.01ab	0.16±0.01ab	0.17±0.01a
24-Metilenecolesterol	0.21±0.01a	0.15±0.01bc	0.13±0.01bc	0.14±0.01bc	0.15±0.01b	0.15±0.01bc	0.13±0.01bc	0.17±0.01ab	0.11±0.01c	0.10±0.01d	0.10±0.01d	0.11±0.01d
Stigmasterol	0.16±0.02a	0.13±0.01bc	0.14±0.01bc	0.15±0.01b	0.12±0.02bc	0.09±0.01c	0.09±0.01d	0.14±0.01bc	0.15±0.01a	0.14±0.01bc	0.13±0.01bc	0.15±0.01ab
Ergosterol	0.12±0.01a	0.11±0.01ab	0.10±0.01ab	0.11±0.01ab	0.10±0.01ab	0.09±0.01ab	0.08±0.01ab	0.12±0.01ab	0.08±0.01b	0.10±0.01ab	0.09±0.01ab	0.10±0.01ab
b-sito+fucosterol	0.12±0.01b	0.13±0.01ab	0.13±0.01ab	0.15±0.02a	0.13±0.02ab	0.10±0.01b	0.13±0.01ab	0.13±0.01ab	0.12±0.01b	0.12±0.01b	0.13±0.01ab	0.13±0.01ab
t.dehidrocolesterol	0.108±0.010c	0.105±0.002c	0.113±0.008c	0.113±0.010bc	0.137±0.014a	0.121±0.012ab	0.112±0.006c	0.125±0.009ab	0.102±0.02c	0.104±0.007c	0.110±0.006c	0.117±0.009ab
c-dehidrocolesterol	0.030±0.002bc	0.030±0.002bc	0.033±0.003b	0.033±0.003ab	0.034±0.003a	0.032±0.002bc	0.022±0.001c	0.029±0.002bc	0.030±0.01bc	0.035±0.004a	0.037±0.003a	0.038±0.003a
Desmosterol	0.063±0.006a	0.049±0.003ab	0.028±0.002bc	0.030±0.002bc	0.028±0.002bc	0.024±0.002c	0.025±0.002c	0.043±0.004b	0.048±0.003ab	0.062±0.003a	0.060±0.007ab	0.064±0.005a
Esteroides totales	2.64±0.38ab	2.22±0.06bc	2.23±0.19bc	3.08±0.33a	2.60±0.16±ab	2.08±0.17bc	1.98±0.09c	2.47±0.13b	2.20±0.05bc	2.55±0.27b	2.19±0.11bc	2.53±0.38b

Los resultados están expresados en media±error estándar y fueron analizados por ANOVA unifactorial (mes). Las medias se compararon por análisis de Tukey, las letras en cada renglón indican las diferencias significativas ( $P<0.05$ ).

Tabla XXIII. Concentración de ácidos grasos ( $\text{mg } 100\text{g}^{-1}$ ) de la fracción de lípidos neutros en hembras de *Crassostrea corteziensis* muestreadas de abril de 2005 a abril 2006 en Laguna de Ceuta, Sinaloa, México.

	2005								2006			
	Abril	Mayo	Junio	Julio	Septiembre	Octubre	Noviembre	Diciembre	Enero	Febrero	Marzo	Abril
14:0	20.2±2.9ab	26.1±3.6a	16.0±2.1bc	17.5±2.8bc	12.0±2.0cd	13.6±3.2c	5.3±0.7d	14.7±2.2c	21.0±2.1ab	20.0±1.1ab	18.5±2.9b	19.9±3.5ab
16:0	90.6±14.5ab	114.8±12.4a	90.8±11.7ab	102.3±12.8ab	72.5±12.5b	83.4±16.2ab	47.2±6.1c	69.9±9.6b	93.1±11.0ab	87.9±4.2ab	84.8±11.3ab	91.8±12.4ab
17:0	7.5±1.2b	9.6±1.1a	6.6±0.9bc	9.3±1.0a	6.9±1.0b	7.8±1.3b	3.6±0.6d	5.3±0.6c	8.2±1.0ab	7.5±0.6b	7.6±0.9b	7.4±0.8b
18:0	22.6±3.8b	26.2±2.1ab	25.1±2.3ab	29.0±3.1a	24.2±3.4ab	27.7±4.7ab	15.0±2.0c	19.4±2.4bc	22.8±2.9b	23.3±1.5b	21.6±1.8b	24.3±3.3ab
22:2i	7.4±1.0bc	8.8±1.0b	8.8±0.6b	9.7±0.9ab	8.6±0.9b	10.8±1.0a	7.0±0.9c	9.7±1.2ab	8.6±0.9b	7.2±0.5bc	7.1±0.6bc	7.8±0.4bc
22:2j	27.9±4.4b	32.3±3.5a	21.1±1.6ed	23.6±2.6c	26.3±3.0bc	30.4±2.9ab	20.2±2.8e	23.5±2.9cd	23.9±1.5bc	23.2±2.8d	24.7±1.4bc	26.0±1.9bc
18:0dma	31.9±3.2cd	49.3±6.3bc	39.0±4.9c	50.1±2.7b	40.8±4.9bc	42.0±4.4bc	26.6±4.0d	42.6±4.6bc	51.4±5.3b	59.1±3.4ab	55.0±3.6b	62.5±4.8a
15:1n-8	17.6±2.1a	12.0±2.3ab	11.1±1.6ab	12.8±1.2ab	10.5±0.9b	12.0±1.0ab	8.7±0.9b	12.0±0.6ab	13.9±0.7ab	12.2±1.9ab	11.1±0.9b	10.5±0.8b
16:1n-7	17.0±3.1ab	22.5±3.3ab	12.2±1.8c	15.6±2.5bc	10.7±2.1cd	12.2±2.8c	5.2±0.8d	8.8±1.2cd	15.8±1.5ab	16.6±1.4ab	15.8±2.3b	15.6±2.2bc
18:1n-9	11.7±2.0b	16.4±1.5ab	15.4±2.0ab	16.7±1.9a	11.9±2.0b	14.7±2.6b	10.5±1.1c	12.5±1.7b	13.6±1.6b	12.2±0.7b	11.2±1.0bc	12.2±1.2b
18:1n-7	24.1±4.1ab	29.0±3.8a	18.9±2.7b	20.7±3.4ab	16.6±3.2bc	17.8±4.0b	9.7±1.6c	15.0±2.3bc	22.9±2.6ab	23.1±1.1ab	21.6±3.3ab	22.5±3.1ab
20:1n-7	12.6±2.5ab	15.6±1.9a	9.8±0.7bc	11.1±1.5b	10.2±1.4bc	11.7±2.1ab	7.2±0.9c	9.8±1.2bc	12.8±1.8ab	12.1±1.5ab	13.1±1.1ab	13.0±1.6ab
18:2n-6	8.7±1.3ab	12.3±1.1a	10.4±1.5ab	11.8±1.6a	7.2±1.4b	8.1±1.8b	8.7±0.9ab	10.0±1.3ab	10.8±1.3ab	10.2±0.5ab	9.5±1.1ab	10.3±1.2ab
18:3n-3	11.5±1.9ab	13.8±1.1a	12.4±2.0a	11.6±1.7ab	7.4±1.6d	7.5±1.9c	11.4±1.1b	9.4±1.1bc	12.7±1.4a	11.5±0.9ab	10.7±1.1bc	10.7±1.5bc
18:4n-3	16.5±2.5b	19.5±2.3b	13.7±1.9b	12.8±2.3bc	7.2±1.5c	9.1±2.7bc	14.6±1.3b	14.1±1.8b	24.0±2.6a	20.5±1.1ab	20.0±2.8ab	19.8±3.7ab
20:4n-6	19.8±3.5b	25.0±2.2a	21.6±2.2ab	25.7±2.3a	22.5±3.1a	24.0±3.4a	12.1±1.9e	14.4±2.3d	15.0±1.8bc	15.2±1.2bc	14.6±1.1cd	14.8±1.4c
20:5n-3	120.0±18.3ab	131.4±16.5ab	81.6±11.3b	87.7±12.8b	61.8±12.0bc	66.5±14.1b	49.1±6.3cd	89.5±12.0c	116.9±12.0ab	122.5±7.1ab	111.4±14.3b	110.4±16.6b
21:5n-3	10.1±1.4a	9.3±1.0ab	5.9±0.8b	6.6±1.3b	4.5±0.8bc	4.9±1.0bc	3.6±0.4c	6.5±0.7b	8.2±1.4b	9.7±0.6ab	9.4±1.2ab	8.9±1.4ab
22:5n-6	7.7±0.9b	10.6±0.7ab	10.4±0.9ab	11.6±0.6a	8.3±0.8b	9.7±1.0ab	5.6±0.8d	11.2±1.3ab	10.1±0.7ab	8.6±0.3b	7.4±0.6c	7.5±0.5bc
22:5n-3	16.1±2.0ab	18.2±1.7a	14.8±1.4ab	16.8±0.9ab	14.3±1.8ab	14.9±1.4ab	9.8±1.4b	15.7±1.6ab	15.3±1.1ab	16.0±0.8ab	15.2±1.1ab	14.6±0.8ab
22:6n-3	155.6±19.2ab	189.9±14.0ab	153.1±17.5ab	164.4±13.8ab	115.0±14.0bc	131.7±17.7b	76.7±8.6c	138.1±15.9b	197.5±17.8a	164.9±3.9ab	159.9±14.7ab	170.6±12.3ab
Σ SAT.	208.1±30.2ab	267.2±25.4a	207.4±20.4ab	241.4±18.3a	191.4±24.1ab	215.7±31.2ab	124.8±16.0b	185.1±19.9ab	228.9±20.8ab	228.1±10.9ab	219.4±16.8ab	239.8±23.4a
Σ MONO	84.2±11.5ab	97.3±9.2a	69.2±8.4ab	78.8±9.4ab	61.3±9.0ab	69.7±12.0ab	42.7±4.8b	59.7±7.1ab	80.5±7.1ab	77.2±4.1ab	74.2±8.3ab	76.3±9.7ab
Σ PUFA	366.2±50.1b	429.9±38.7a	323.8±38.7c	349.0±34.0bc	248.2±35.3d	276.4±44.0cd	191.7±21.8e	308.9±36.7c	410.5±39.3ab	379.2±14.9b	358.1±37.2b	367.7±39.1b
Σ HUFA	345.9±46.9a	403.8±36.8a	301.0±35.4ab	325.6±30.8ab	233.7±32.6ab	260.7±40.4ab	171.6±20.1b	289.5±34.5ab	387.0±36.7a	357.4±13.9a	337.9±35.2ab	346.7±36.4a
Σ NMI	35.3±5.4b	41.1±4.4ab	29.9±2.2c	33.2±3.3b	34.9±3.8b	41.3±3.3a	27.2±3.7c	33.2±4.1b	32.5±3.1b	30.3±3.2bc	31.8±2.2b	33.9±2.6b
(n-3)/(n-6)	9.4±0.4ab	8.0±0.4b	6.6±0.3c	6.1±0.4cd	5.6±0.4d	5.6±0.3d	6.4±0.2c	7.8±0.2bc	10.5±0.1a	10.2±0.2a	10.3±0.3a	10.2±0.3a
22:6/20:5	1.3±0.1c	1.5±0.1c	1.9±0.1ab	2.0±0.2ab	2.1±0.3a	2.3±0.3a	1.6±0.1b	1.6±0.1b	1.7±0.1b	1.4±0.1c	1.5±0.1c	1.6±0.1b
20:5/20:4	6.3±0.3ab	5.2±0.4b	3.7±0.3c	3.5±0.4c	2.8±0.4cd	2.6±0.3d	4.3±0.3bc	6.4±0.5ab	7.4±0.3a	8.1±0.3a	7.6±0.5a	7.3±0.4ab
I.INSAT.	1985±267b	2328±207a	1750±207c	1891±182bc	1351±188d	1511±235cd	1002±115e	1665±197c	2234±211ab	2049±77b	1940±200b	1999±206b
TOTAL	659±91b	794±72a	600±67bc	669±61b	501±68c	562±87bc	359±42d	554±64bc	720±66ab	684±29b	652±62b	684±72b

Los resultados están expresados en media±error estándar y fueron analizados por ANOVA unifactorial (mes). Las medias se compararon por análisis de Tukey, las letras en cada renglón indican las diferencias significativas ( $P<0.05$ ). SAT= total de ácidos grasos saturados; MONO= total de ácidos grasos mono-insaturados; PUFA= total de ácidos grasos poli-insaturados; HUFA= total de ácidos grasos altamente insaturados; NMI=total de ácidos grasos no metileno-interrumpidos; I.INSAT.= índice de insaturación. Únicamente se muestran los ácidos grasos >1%, aunque en las sumas se incluyen el total de ácidos grasos.

Tabla XXIV. Concentración de ácidos grasos ( $\text{mg } 100\text{g}^{-1}$ ) de la fracción de lípidos polares en hembras de *Crassostrea corteziensis* muestreadas de abril de 2005 a abril 2006 en Laguna de Ceuta, Sinaloa, México.

	2005								2006			
	Abril	Mayo	Junio	Julio	Septiembre	Octubre	Noviembre	Diciembre	Enero	Febrero	Marzo	Abril
14:0	2.9±0.3ab	2.7±0.4ab	2.6±0.2ab	2.0±0.3b	3.0±0.5ab	2.5±0.4ab	2.4±0.2ab	3.2±0.5a	2.9±0.3ab	2.5±0.5ab	2.5±0.5ab	2.0±0.5b
16:0	24.4±2.7ab	20.7±3.9ab	24.0±1.5ab	19.3±2.9b	27.3±2.4ab	25.9±4.0ab	35.5±3.2a	26.2±4.5ab	18.8±1.8b	16.0±2.9b	17.6±2.4b	15.2±3.6b
17:0	2.7±0.3ab	2.1±0.4b	2.6±0.1b	1.9±0.3b	2.9±0.2ab	2.5±0.4b	3.2±0.3a	2.6±0.4b	1.8±0.1bc	1.5±0.2cd	1.8±0.2c	1.3±0.2d
18:0	9.7±1.0b	6.9±1.2bc	9.4±0.5b	7.6±0.9b	11.1±0.9ab	9.7±1.2b	12.3±1.1a	9.6±1.3b	6.3±0.4c	5.7±0.5c	6.5±0.7bc	5.5±1.0c
22:2i	3.9±0.5b	3.0±0.6bc	3.8±0.2b	2.9±0.4bc	3.9±0.5b	3.9±0.6b	5.4±0.7a	5.0±0.9ab	3.0±0.2bc	2.4±0.4bc	2.6±0.4bc	2.0±0.3c
22:2j	15.6±1.7ab	11.1±2.1c	9.6±0.6c	6.8±0.9d	12.1±1.1bc	12.1±1.9bc	16.9±1.6a	13.1±2.1b	9.1±0.9c	8.1±1.2cd	9.6±1.2c	7.1±1.0d
18:0dma	8.2±1.6bc	7.1±1.6bc	8.0±0.6bc	5.3±0.9c	9.3±1.3b	8.3±1.7bc	14.0±2.0a	11.4±2.4ab	6.7±0.7c	5.8±0.8c	7.0±1.0bc	4.7±0.8d
15:1n-8	7.1±0.9a	5.1±0.9cd	5.4±0.2c	4.7±0.6d	6.1±0.7b	5.7±0.9b	6.5±0.8ab	5.4±1.1bc	4.3±0.4ed	4.1±0.6ed	4.3±0.4ed	3.3±0.4e
16:1n-7	2.4±0.3ab	1.9±0.2ab	2.0±0.2ab	1.9±0.3ab	2.5±0.3a	2.3±0.5ab	2.4±0.2ab	1.9±0.3ab	2.3±0.3ab	2.2±0.5ab	2.3±0.4ab	1.7±0.4b
18:1n-9	2.5±0.3bc	2.8±0.5bc	4.1±0.2bc	3.0±0.4bc	4.1±0.4bc	4.2±0.6b	6.4±0.5a	4.2±0.8ab	2.7±0.3bc	2.1±0.4bc	2.3±0.3bc	1.9±0.4c
18:1n-7	6.4±0.6ab	4.1±0.6c	4.7±0.4b	3.6±0.5c	5.8±0.4ab	5.5±0.7ab	7.4±0.5a	6.0±1.0ab	5.1±0.6ab	4.6±0.7bc	4.8±0.7ab	3.6±0.7c
20:1n-7	7.6±0.9ab	4.8±0.8bc	4.3±0.2c	3.5±0.5c	5.1±0.4bc	4.9±0.6bc	8.4±0.7a	6.8±1.1b	4.3±0.4bc	3.8±0.6c	4.8±0.6bc	3.5±0.7c
18:2n-6	2.0±0.3b	2.3±0.5b	2.8±0.2b	2.2±0.3b	2.4±0.2b	2.3±0.3b	6.8±0.6a	3.8±0.7ab	2.2±0.3b	1.9±0.3b	2.0±0.3b	1.6±0.4c
18:3n-3	1.8±0.3d	2.3±0.5bc	2.5±0.2bc	1.7±0.3d	1.9±0.3c	1.4±0.2d	7.8±0.7a	3.2±0.6b	2.5±0.3bc	1.9±0.3cd	2.1±0.3bc	1.4±0.4d
18:4n-3	2.2±0.4bc	2.2±0.4bc	2.1±0.3bc	1.3±0.2c	1.3±0.2bc	1.4±0.2bc	8.1±0.7a	3.8±0.7bc	4.0±0.5b	2.9±0.5bc	3.2±0.5bc	2.1±0.5bc
20:4n-6	11.7±0.9b	8.6±1.6c	10.5±0.6bc	9.1±1.3c	13.8±1.1a	13.3±2.1a	14.4±1.1a	10.6±1.6b	6.2±0.5cd	5.8±1.2cd	6.0±0.7cd	4.4±0.7d
20:5n-3	35.1±5.1ab	21.3±3.8bc	18.6±1.5c	14.7±2.3c	19.9±2.2bc	19.9±2.3bc	39.3±3.3a	42.3±4.3a	27.0±2.6b	24.8±3.8b	25.0±3.1b	17.1±3.5c
21:5n-3	2.1±0.3b	1.4±0.3c	1.1±0.1cd	0.7±0.1d	1.0±0.1cd	1.1±0.1bc	2.7±0.3a	2.3±0.4b	2.3±0.3ab	2.0±0.3bc	2.0±0.3bc	1.3±0.3c
22:5n-6	2.5±0.4b	2.6±0.6b	3.3±0.2ab	2.1±0.6bc	3.0±0.3b	2.7±0.5b	3.6±0.4ab	4.4±0.7a	2.2±0.2bc	1.6±0.3bc	1.7±0.2bc	1.2±0.2c
22:5n-3	5.6±0.8ab	3.9±0.8b	4.1±0.2b	3.2±0.5cd	4.9±0.5b	4.3±0.7b	6.6±0.8a	6.0±1.0ab	3.4±0.3bc	3.2±0.5c	3.4±0.3c	2.3±0.5d
22:6n-3	45.0±6.4b	38.7±7.7c	42.2±2.5bc	27.3±4.5e	35.8±2.8cd	34.3±5.4cd	46.2±5.1ab	52.1±8.7a	39.9±3.6c	31.3±4.8d	34.4±4.2cd	28.8±6.1ed
Σ SAT.	67.4±7.4ab	53.6±10.0ab	60.1±3.1ab	45.8±6.4b	69.6±5.7ab	65.0±9.3ab	89.7±8.4a	71.0±11.6ab	48.7±4.2b	42.0±6.2b	47.6±6.0b	37.7±7.5b
Σ MONO	31.1±2.8ab	23.0±3.8b	27.1±1.3b	23.0±3.0bc	32.5±2.7ab	30.0±4.0b	37.8±2.7a	28.3±4.3b	22.1±2.0bc	19.2±2.9bc	21.0±2.5bc	16.6±3.0c
Σ PUFA	108.1±12.9b	83.3±15.7b	87.3±5.3b	62.3±9.8cd	84.0±6.8b	80.6±11.1bc	135.4±11.9a	122.6±20.1ab	89.8±8.6b	75.5±11.8c	79.6±9.4c	60.4±12.6d
Σ HUFA	104.3±12.5b	78.7±14.8c	82.0±5.0c	58.4±9.2d	79.7±6.3c	77.0±10.8c	120.9±11.0a	115.6±19.0ab	85.0±8.0bc	71.7±11.1c	75.6±9.0c	57.3±11.8d
Σ NMI	19.5±2.2ab	14.1±2.7b	13.4±0.8bc	9.6±1.3d	16.0±1.6b	16.0±2.4b	22.3±2.3a	18.0±3.0b	12.1±1.1cd	10.5±1.5cd	12.2±1.6c	9.1±1.3d
(n-3)/(n-6)	5.6±0.3b	5.3±0.2c	4.2±0.2d	3.6±0.2ed	3.4±0.2e	3.5±0.2e	4.5±0.1cd	5.5±0.2bc	7.4±0.2a	7.3±0.2a	7.3±0.2a	7.0±0.3
22:6/20:5	1.3±0.2c	1.8±0.2b	2.3±0.1a	1.8±0.1b	1.9±0.1ab	1.7±0.2bc	1.2±0.1d	1.5±0.1c	1.5±0.1c	1.3±0.1cd	1.4±0.1c	1.7±0.1bc
20:5/20:4	2.9±0.2c	2.6±0.2d	1.8±0.1ed	1.6±0.1ed	1.5±0.1e	1.6±0.1e	2.7±0.1cd	3.4±0.2bc	4.3±0.2ab	4.5±0.3a	4.2±0.2ab	3.7±0.2b
I.INSAT.	593±71b	456±86c	480±29c	341±53d	462±37c	443±62c	703±63a	661±108ab	489±46bc	410±63c	434±52c	333±69d
TOTAL	207±23b	160±30c	174±10bc	131±19d	186±15bc	176±24bc	261±23a	222±36ab	161±15c	137±21d	148±18cd	115±23e

Los resultados están expresados en media± error estándar y fueron analizados por ANOVA unifactorial (mes). Las medias se compararon por análisis de Tukey, las letras en cada renglón indican las diferencias significativas ( $P<0.05$ ). Ver tabla XXIII para las abreviaciones.

Tabla XXV. Proporción de ácidos grasos (%) de la fracción de lípidos neutros en hembras de *Crassostrea corteziensis* muestreadas de abril de 2005 a abril 2006 en Laguna de Ceuta, Sinaloa, México.

	2005								2006			
	Abril	Mayo	Junio	Julio	Septiembre	Octubre	Noviembre	Diciembre	Enero	Febrero	Marzo	Abril
14:0	3.1±0.1ab	3.2±0.2a	2.6±0.1cd	2.6±0.2cd	2.4±0.2d	2.2±0.3ed	1.5±0.1e	2.6±0.2c	2.9±0.1b	2.9±0.1b	2.8±0.2bc	2.8±0.2bc
16:0	13.4±0.5ab	14.4±0.5ab	14.9±0.4a	15.1±0.5a	13.9±1.0ab	14.1±1.1ab	13.2±0.6b	12.5±0.5b	12.8±0.4b	12.8±0.3b	12.8±0.5b	13.3±0.4ab
17:0	1.1±0.1b	1.2±0.1b	1.2±0.29b	1.4±0.1a	1.4±0.1a	1.4±0.1ab	1.0±0.1c	1.0±0.1bc	1.1±0.1b	1.1±0.1b	1.2±0.1b	1.1±0.1b
18:0	3.3±0.2c	3.3±0.1c	4.3±0.3ab	4.3±0.2ab	4.8±0.2a	4.9±0.1a	4.1±0.1b	3.5±0.2bc	3.1±0.1d	3.4±0.1c	3.3±0.1c	3.5±0.1bc
22:2i	1.1±0.1bc	1.1±0.1bc	1.5±0.1b	1.5±0.2b	1.8±0.2ab	2.1±0.2a	1.9±0.1a	1.8±0.1b	1.2±0.1bc	1.0±0.1c	1.1±0.1bc	1.2±0.1bc
22:2j	4.2±0.3bc	4.1±0.3bc	3.7±0.3cd	3.6±0.4d	5.5±0.7b	5.9±0.7a	5.5±0.4ab	4.2±0.1bc	3.3±0.2e	3.4±0.3d	3.9±0.3bc	3.9±0.2c
18:0dma	5.1±0.4c	6.2±0.7bc	6.7±0.7bc	7.9±0.9ab	8.7±1.0ab	8.2±1.1ab	7.2±0.6bc	8.0±1.0ab	7.3±0.8b	8.7±0.4ab	8.8±1.1ab	9.5±0.8a
15:1n-8	3.0±0.5a	1.6±0.4ed	1.8±0.2cd	1.9±0.2c	2.3±0.3bc	2.4±0.3b	2.5±0.2ab	2.3±0.2bc	2.0±0.2c	1.8±0.3d	1.7±0.1ed	1.6±0.1e
16:1n-7	2.5±0.2a	2.8±0.2a	2.0±0.1b	2.3±0.2ab	2.0±0.2b	2.0±0.2b	1.4±0.1c	1.6±0.1bc	2.2±0.1b	2.4±0.2ab	2.4±0.1ab	2.3±0.1ab
18:1n-9	1.7±0.1e	2.1±0.1bc	2.5±0.1ab	2.5±0.1b	2.3±0.2bc	2.5±0.2ab	3.0±0.2a	2.2±0.1bc	1.9±0.1c	1.8±0.1d	1.7±0.1e	1.8±0.1ed
18:1n-7	3.5±0.2ab	3.6±0.2a	3.1±0.1c	3.0±0.2cd	3.1±0.3c	2.9±0.3d	2.6±0.1e	2.7±0.1ed	3.1±0.1c	3.4±0.1b	3.2±0.2bc	3.2±0.1bc
20:1n-7	1.9±0.2bc	1.9±0.1bc	1.7±0.2bc	1.7±0.2c	2.0±0.1a	2.0±0.1a	2.0±0.1b	1.8±0.1bc	1.7±0.1bc	1.7±0.2bc	2.0±0.1ab	1.9±0.1bc
18:2n-6	1.3±0.1c	1.6±0.1bc	1.7±0.1b	1.7±0.1b	1.4±0.1c	1.4±0.1c	2.5±0.2a	1.8±0.1b	1.5±0.1bc	1.5±0.1bc	1.5±0.1bc	1.5±0.1bc
18:3n-3	1.7±0.1bc	1.8±0.1bc	2.0±0.1b	1.7±0.1bc	1.4±0.2cd	1.2±0.2d	3.3±0.2a	1.7±0.1bc	1.8±0.1bc	1.7±0.1bc	1.7±0.1c	1.5±0.1cd
18:4n-3	2.5±0.1c	2.4±0.1c	2.2±0.1c	1.9±0.2cd	1.4±0.2d	1.4±0.2d	4.3±0.4a	2.6±0.2c	3.3±0.1ab	3.0±0.1b	3.0±0.2b	2.8±0.2bc
20:4n-6	2.9±0.2d	3.2±0.1cd	3.7±0.2bc	3.9±0.4b	4.5±0.4a	4.3±0.3ab	3.2±0.2c	2.5±0.2ed	2.1±0.1f	2.2±0.1e	2.3±0.1e	2.2±0.1e
20:5n-3	18.1±0.5a	16.4±0.7b	13.3±0.6bc	12.9±0.8d	11.7±1.0e	11.2±0.9e	13.5±0.3c	16.0±0.6bc	16.2±0.3b	17.9±0.3a	16.9±0.6ab	15.8±0.7bc
21:5n-3	1.6±0.1a	1.2±0.1c	1.0±0.1d	0.9±0.1d	0.9±0.1e	0.9±0.1e	1.0±0.1d	1.2±0.1c	1.1±0.2cd	1.4±0.1b	1.4±0.1b	1.3±0.1bc
22:5n-6	1.2±0.1c	1.3±0.1b	1.8±0.1ab	1.8±0.1ab	1.7±0.1ab	1.8±0.1ab	1.5±0.1b	2.0±0.1a	1.4±0.1b	1.3±0.1c	1.1±0.1c	1.1±0.1c
22:5n-3	2.5±0.1bc	2.3±0.1bc	2.5±0.1bc	2.6±0.1bc	2.9±0.1a	2.8±0.2b	2.7±0.1bc	2.9±0.2ab	2.1±0.1d	2.3±0.1bc	2.4±0.1bc	2.2±0.1c
22:6n-3	24.0±0.8c	24.1±0.5c	25.5±0.3b	24.7±0.8b	23.4±0.8c	24.0±0.7c	21.5±0.5d	25.0±0.3b	27.5±0.2a	24.2±0.6c	24.6±0.2bc	25.4±0.8b
Σ SAT.	31.5±0.5e	33.6±0.7cd	35.0±0.8c	36.3±0.9b	38.6±1.0ab	38.8±0.6a	34.4±0.5cd	33.6±0.5cd	31.8±0.6d	33.3±0.3cd	33.9±0.8cd	35.2±0.4bc
Σ MONO	12.8±0.1a	12.3±0.3ab	11.4±0.2ab	11.7±0.4ab	12.1±0.5ab	12.2±0.4ab	12.0±0.2ab	10.8±0.1b	11.2±0.2b	11.3±0.3ab	11.3±0.3ab	11.0±0.3b
Σ PUFA	55.7±0.4ab	54.2±0.4b	53.6±0.7bc	52.0±0.6c	49.3±0.7d	49.0±0.3d	53.6±0.4bc	55.6±0.4ab	56.9±0.5a	55.4±0.3ab	54.8±0.6b	53.8±0.3bc
Σ HUFA	52.7±0.4ab	50.8±0.4bc	49.9±0.5c	48.6±0.5cd	46.5±0.6d	46.5±0.2d	47.8±0.4d	52.1±0.4b	53.7±0.4a	52.3±0.3b	51.6±0.5b	50.7±0.3bc
Σ NMI	5.4±0.3bc	5.2±0.4c	5.2±0.4bc	5.1±0.6cd	7.4±0.9ab	8.0±0.9a	7.4±0.5ab	6.0±0.2b	4.5±0.2d	4.4±0.3d	5.0±0.4cd	5.0±0.2cd
(n-3)/(n-6)	9.4±0.4ab	8.0±0.4b	6.6±0.3c	6.1±0.4cd	5.6±0.4d	5.6±0.3d	6.4±0.2c	7.8±0.2bc	10.5±0.1a	10.2±0.2a	10.3±0.3a	10.2±0.3a
22:6/20:5	1.3±0.1c	1.5±0.1b	1.9±0.1b	2.0±0.2b	2.1±0.3ab	2.3±0.3a	1.6±0.1b	1.6±0.1b	1.7±0.1b	1.4±0.1bc	1.5±0.1b	1.6±0.1b
20:5/20:4	6.3±0.3ab	5.2±0.4b	3.7±0.3c	3.5±0.4c	2.8±0.4cd	2.6±0.3d	4.3±0.3bc	6.4±0.5ab	7.4±0.3a	8.1±0.3a	7.6±0.5a	7.3±0.4ab
I.INSAT.	303±3ab	293±2b	290±3b	282±4bc	269±4c	269±1c	280±2bc	300±2ab	310±2a	300±2ab	297±3ab	293±2b

Los resultados están expresados en media± error estándar y fueron analizados por ANOVA unifactorial (mes). Las medias se compararon por análisis de Tukey, las letras en cada renglón indican las diferencias significativas ( $P<0.05$ ). Ver tabla XXIII para las abreviaciones.

Tabla XXVI. Proporción de ácidos grasos (%) de la fracción de lípidos polares en hembras de *Crassostrea corteziensis* muestreadas de abril de 2005 a abril 2006 en Laguna de Ceuta, Sinaloa, México.

	2005								2006			
	Abril	Mayo	Junio	Julio	Septiembre	Octubre	Noviembre	Diciembre	Enero	Febrero	Marzo	Abril
14:0	1.4±0.1ab	1.8±0.2a	1.5±0.1ab	1.5±0.1ab	1.6±0.2a	1.5±0.2ab	0.9±0.1b	1.5±0.1ab	1.8±0.1a	1.8±0.2a	1.7±0.2a	1.6±0.2a
16:0	11.8±0.4b	13.0±0.3ab	13.7±0.4ab	14.8±0.2a	14.7±0.8a	14.8±0.6a	13.5±0.5ab	11.7±0.4b	11.7±0.3b	11.6±0.5b	11.7±0.4b	12.7±0.6ab
17:0	1.3±0.1b	1.3±0.1bc	1.5±0.1ab	1.5±0.1ab	1.6±0.1a	1.4±0.1ab	1.2±0.1c	1.2±0.1c	1.2±0.1c	1.1±0.1d	1.2±0.1c	1.1±0.1cd
18:0	4.8±0.2bc	4.4±0.2c	5.4±0.1b	6.0±0.3a	6.0±0.3a	5.7±0.3ab	4.7±0.1c	4.4±0.2c	4.0±0.1d	4.3±0.2d	4.4±0.1c	4.9±0.2bc
22:2i	1.9±0.1c	1.9±0.1cd	2.2±0.1ab	2.2±0.1b	2.1±0.2bc	2.3±0.1a	2.0±0.1bc	2.3±0.2ab	1.9±0.1c	1.7±0.1d	1.8±0.1d	1.8±0.1cd
22:2j	7.6±0.5a	6.8±0.3ab	5.5±0.3d	5.3±0.3d	6.5±0.3b	6.9±0.3ab	6.5±0.2b	5.9±0.3bc	5.7±0.3c	6.0±0.2bc	6.5±0.4b	6.6±0.4b
18:0dma	3.8±0.6c	4.2±0.5b	4.6±0.3b	4.0±0.3bc	4.8±0.4b	4.4±0.6b	5.3±0.3a	5.1±0.4ab	4.1±0.3bc	4.3±0.3b	4.7±0.3b	4.2±0.3b
15:1n-8	3.4±0.4ab	3.3±0.1ab	3.1±0.1b	3.6±0.1a	3.3±0.3ab	3.2±0.2ab	2.5±0.2d	2.5±0.3cd	2.8±0.3c	3.0±0.2bc	3.0±0.2bc	3.2±0.3b
16:1n-7	1.2±0.1ab	1.3±0.2ab	1.1±0.1ab	1.4±0.1ab	1.3±0.1ab	1.2±0.2ab	0.9±0.1b	0.9±0.1b	1.4±0.1ab	1.6±0.2a	1.5±0.1a	1.3±0.1ab
18:1n-9	1.3±0.1d	1.8±0.1c	2.4±0.1ab	2.3±0.1ab	2.2±0.1b	2.4±0.1ab	2.5±0.1a	1.9±0.2bc	1.7±0.1cd	1.5±0.1cd	1.5±0.1cd	1.6±0.1cd
18:1n-7	3.2±0.3ab	2.7±0.2d	2.7±0.1d	2.7±0.1c	3.1±0.1b	3.2±0.1ab	2.9±0.1bc	2.7±0.2d	3.2±0.1b	3.3±0.1a	3.2±0.2ab	3.2±0.1b
20:1n-7	3.7±0.2a	3.1±0.1bc	2.5±0.1d	2.7±0.2c	2.7±0.1c	2.9±0.1c	3.2±0.2b	3.1±0.1bc	3.0±0.1c	2.8±0.1c	3.3±0.1ab	3.1±0.1bc
18:2n-6	1.0±0.1c	1.4±0.1bc	1.6±0.1b	1.6±0.1b	1.3±0.1bc	1.3±0.1bc	2.6±0.1a	1.7±0.2b	1.4±0.1bc	1.4±0.1bc	1.4±0.1bc	1.4±0.1bc
18:3n-3	0.9±0.1d	1.4±0.1cd	1.4±0.1c	1.3±0.1cd	1.0±0.1cd	0.9±0.1e	3.0±0.2a	1.5±0.1bc	1.5±0.1b	1.4±0.1cd	1.4±0.1cd	1.1±0.1cd
18:4n-3	1.1±0.1ed	1.4±0.1d	1.2±0.1ed	1.0±0.1e	0.7±0.1f	0.9±0.1f	3.1±0.2a	1.7±0.2cd	2.4±0.1b	2.1±0.2bc	2.2±0.2bc	1.7±0.1c
20:4n-6	5.8±0.3bc	5.3±0.1c	6.0±0.2b	7.1±0.3ab	7.5±0.4a	7.6±0.4a	5.5±0.1bc	4.8±0.1cd	3.9±0.2e	4.1±0.2d	4.0±0.2d	4.1±0.2d
20:5n-3	16.9±1.1ab	13.7±0.9cd	10.6±0.4e	11.2±0.4e	10.7±0.7e	11.8±0.7d	15.0±0.2bc	16.2±0.8b	16.8±0.2b	18.3±0.6a	16.9±0.4b	14.6±0.5c
21:5n-3	1.0±0.1bc	0.9±0.1c	0.6±0.1d	0.6±0.1d	0.6±0.1d	0.6±0.1d	1.0±0.1b	1.0±0.1b	1.4±0.1a	1.5±0.1a	1.4±0.1ab	1.1±0.1b
22:5n-6	1.2±0.1b	1.6±0.1ab	1.9±0.1a	1.5±0.3ab	1.6±0.1ab	1.5±0.1ab	1.4±0.1b	2.0±0.1a	1.4±0.1b	1.2±0.1b	1.1±0.1b	1.1±0.1b
22:5n-3	2.7±0.2a	2.4±0.1ab	2.4±0.1ab	2.4±0.1ab	2.6±0.1a	2.4±0.2ab	2.5±0.1ab	2.7±0.1a	2.1±0.1b	2.4±0.1ab	2.3±0.1ab	2.0±0.1b
22:6n-3	21.5±1.3c	23.7±0.8b	24.2±0.3ab	20.3±0.8cd	19.3±0.3d	19.0±0.8ed	17.5±0.6e	23.4±0.8b	24.9±0.2ab	22.9±0.8bc	23.1±0.4b	25.0±0.4a
Σ SAT	32.6±0.4d	33.4±0.3c	34.5±0.3bc	35.2±0.4b	37.4±0.7a	36.9±0.4ab	34.0±0.3c	32.0±0.4ed	30.4±0.3f	30.8±0.3e	32.0±0.5ed	33.0±0.2cd
Σ MONO	15.2±0.4b	14.8±0.5b	15.6±0.2ab	17.8±0.5a	17.5±0.4a	17.2±0.2a	14.5±0.3bc	12.9±0.3d	13.8±0.2c	14.1±0.2bc	14.2±0.3bc	14.8±0.4b
Σ PUFA	52.1±0.6b	51.8±0.5b	49.9±0.4bc	47.0±0.8c	45.1±0.7c	45.8±0.4c	51.5±0.3b	55.1±0.3a	55.8±0.3a	55.1±0.3a	53.8±0.3ab	52.2±0.5b
Σ HUFAs	50.2±0.5c	49.0±0.4d	46.9±0.4ed	44.1±0.8ef	42.9±0.6f	43.7±0.4f	45.9±0.5e	52.0±0.2b	52.9±0.2a	52.4±0.4ab	51.0±0.2bc	49.7±0.4cd
Σ NMI	9.5±0.5a	8.7±0.3ab	7.7±0.4ab	7.4±0.3b	8.6±0.5ab	9.1±0.4ab	8.5±0.3ab	8.2±0.5ab	7.6±0.3ab	7.7±0.2ab	8.3±0.5ab	8.5±0.5ab
(n-3)/(n-6)	5.6±0.3ab	5.3±0.2bc	4.2±0.2cd	3.6±0.2d	3.4±0.2e	3.5±0.2e	4.5±0.1c	5.5±0.2b	7.4±0.2a	7.3±0.2a	7.3±0.2a	7.0±0.3a
22:6/20:5	1.3±0.2bc	1.8±0.2b	2.3±0.1a	1.8±0.1ab	1.9±0.1ab	1.7±0.2bc	1.2±0.1c	1.5±0.1bc	1.5±0.1bc	1.3±0.1bc	1.4±0.1bc	1.7±0.1bc
20:5/20:4	2.9±0.2c	2.6±0.2d	1.8±0.1ed	1.6±0.1ed	1.5±0.1e	1.6±0.1e	2.7±0.1cd	3.4±0.2bc	4.3±0.2ab	4.5±0.3a	4.2±0.2ab	3.7±0.2b
I.INSAT	286±3c	284±2cd	274±2d	258±4e	249±3f	251±2f	267±2ed	297±1b	304±1a	299±2ab	293±1b	289±2bc

Los resultados están expresados en media± error estándar y fueron analizados por ANOVA unifactorial (mes). Las medias se compararon por análisis de Tukey, las letras en cada renglón indican las diferencias significativas ( $P<0.05$ ). Ver tabla XXIII para las abreviaciones.

## Anexo C

### Microalgas en el tracto digestivo de ostiones silvestres *C. corteziensis*

Las microalgas utilizadas hasta el momento para inducir la maduración en *C. corteziensis* son las mismas que se usan para otras especies de moluscos, incluyendo *C. gigas*. El conocimiento de la estructura fitoplanctónica de las zonas donde se distribuye *C. corteziensis* es limitado, por lo tanto se determinó la presencia y la frecuencia de las especies de diatomeas y dinoflagelados que se obtuvieron a partir del análisis del contenido del tracto digestivo de *C. corteziensis* provenientes de Boca de Camichín, Nayarit. La identificación de las especies de microalgas (Tabla XXVII) se realizó a través de la colaboración con el M. en C. Oscar Hernández del grupo del Dr. David Siqueiros (CICIMAR).

Tabla XXVII. Especies de microalgas identificadas en el tracto digestivo de *C. corteziensis*.

<b>Dinoflagelados</b>	<i>Navicula pennata</i>
<i>Prorocentrum gracile</i>	<i>Navicula sp. 1</i>
<i>Prorocentrum compressum</i>	<i>Navicula sp. 2</i>
<i>Prorocentrum dentatum</i>	<i>Navicula sp. 3</i>
<i>Prorocentrum micans</i>	<i>Nitzschia closterium</i>
<i>Alexandrium monilatum</i>	<i>Nitzschia coartacta</i>
<i>Oxyphysis oxitoides</i>	<i>Nitzschia frustulum</i>
<i>Gonyaulax sp. 1</i>	<i>Nitzschia lavéis</i>
<i>Protoperidinium ovum</i>	<i>Nitzschia macilenta</i>
<b>Diatomeas</b>	<i>Nitzschia panduriformis</i> var <i>constricta</i>
<i>Achnanthes cf. pseudogroenlandica</i>	<i>Nitzschia sigma</i>
<i>Actinocyclus octonarius</i>	<i>Nitzschia sp. 1</i>
<i>Amphora acutiuscula</i>	<i>Odontella aurita</i>
<i>Amphora angusta</i>	<i>Paralia sulfata</i>
<i>Amphora coffaeiformis</i> var <i>salina</i>	<i>Pleurosigma sp. 1</i>
<i>Amphora pediculus</i>	<i>Pleurosigma sp. 2</i>
<i>Amphora proteus</i>	<i>Psammodyction sp. 1</i>
<i>Amphora salina</i>	<i>Rhopalodia musculus</i>
<i>Asterionellopsis glacialis</i>	<i>Seminavis sp. 1</i>
<i>Biddulphia alternans</i>	<i>Seminavis sp. 2</i>

*Biddulphia biddulphiana*  
*Biddulphia* sp. 1  
*Coscinodiscus radiatus* var. ?  
*Cyclotella littoralis*  
*Cymatnitzschia marina*  
*Cymatoteca weisflogii*  
*Cymbella turgida*  
*Diploneis caffra*  
*Diploenis cabro*  
*Eunotogramma laeve*  
*Falcula media*  
*Grammatophora marina*  
*Gyrosigma* sp. 1  
*Hemidiscus cuneiformis*  
*Huttoniella reichardtii*  
*Leptocylindrus* sp. 1  
*Melosira* sp. 1

*Surirella armoricana*  
*Surirella fastuosa*  
*Surirella fastuosa* var. *cuneata*  
*Synedra commutata*  
*Synedra* sp. 1  
*Thalassionema nitzschiodes*  
*Thalassiosira eccentrica*  
*Thalassiosira hendeyi*  
*Thalassiosira leptopus*  
*Thalassiosira oestrupii*  
*Thalassiosira rothii*  
*Thalassiosira* sp. 1.  
*Thalassiosira* sp. 2

---

## Anexo D

Tabla XXVIII. Composición bioquímica (%) y concentración de aminoácidos ( $\mu\text{g mg}^{-1}$ ) en microalgas cosechadas durante el tercer día de cultivo.

	<i>C. gracilis</i>	<i>C. calcitrans</i>	<i>P. lutheri</i>	<i>I. galbana T-ISO</i>	<i>D. tertiolecta</i>
Proteínas	59.2	37.7	35.5	73.1	64.9
Carbohidratos	21.7	4.8	14.0	4.8	7.4
Lípidos totales	19.1	57.5	50.5	22.1	27.6
<b>HUFA</b>					
20:4n-6	4.97	8.55	0.18	0.22	N.D.
20:5n-3	12.01	18.24	31.87	1.08	N.D.
22:6n-3	1.15	1.86	16.30	28.11	N.D.
<b>Esteroles</b>					
Colesterol	86.5	74.5	7.7	1.1	-
Brassicasterol	-	-	1.2	48.3	-
b-sito y fucoesterol	1	25.6	44.6	50.6	33.4
Ergosterol	-	-	11.6	-	50.5
Campesterol	-	-	13.4	-	16.1
Stigmasterol	-	-	21.5	-	-
<b>Pigmentos</b>					
Clorofila a	32.4	51.4	68.5	39.6	3.81
Clorofila C1, C2	10.5	11.4	5.8	19.5	-
Fucoxantina	53.6	27.7	16.4	34.3	-
Diadinoxantina	3.5	9.6	9.3	6.5	-
Violaxantina	-	-	-	-	2.9
Luteína	-	-	-	-	12.9
Clorofila b	-	-	-	-	13.2
b-caroteno	-	-	-	-	4.1
<b>Aminoácidos</b>					
Ac. Aspartico	0.60	0	0	1.3	-
Ac. Glutámico	1.35	1.35	5.00	4.5	-
Serina	1.09	1.47	1.44	1.8	-
Histidina	0.95	1.00	1.29	2.7	-
Glicina	1.79	1.85	2.59	2.9	-
Treonina	1.19	1.35	1.91	2.3	-
Arginina	4.72	4.35	6.20	6.4	-
Taurina	2.01	0.68	0.80	1.6	-
Alanina	0.96	1.08	1.89	2.2	-
Tirosina	1.23	1.69	1.54	2.9	-
Metionina	0.88	1.12	1.31	1.5	-
Valina	1.27	1.48	1.80	2.4	-
Fenilalanina	1.24	1.81	1.81	1.7	-
Isoleucina	1.35	1.42	1.31	1.8	-
Leucina	2.78	3.59	4.30	4.6	-
Lisina	2.34	5.47	6.58	4.6	-

Los valores de bioquímica están en porcentaje de materia orgánica. Los HUFA y esteroles en relación al total de cada componente. Los resultados están expresados en media  $\pm$  error estándar.



## Anexo E

Tabla XXIX. Ácidos grasos (% del total) de las tres emulsiones utilizadas en los capítulos cuarto y quinto como suplemento de las microalgas para inducir la maduración de *C. corteziensis*.

	ICES 0/-/C	ICES 30/06/C	ICES ARA
14:0	40.51	5.77	1.08
16:0	23.27	14.21	15.00
18:0	6.25	2.83	6.59
18:1n-9	15.43	16.36	20.14
18:2n-6	12.89	9.24	18.08
18:3n-3	1.16	1.61	1.69
20:4n-6	-	1.11	29.46
20:5n-3	-	20.59	0.10
22:6n-3	-	14.41	-
Σ SAT.	70.31	24.40	25.07
Σ MUFA	15.62	27.46	21.69
Σ PUFA	14.07	48.14	53.24
Σ HUFA	-	36.56	29.85
Σ n-6	12.91	10.98	51.44
Σ n-3	1.16	37.16	1.81
(n-3)/(n-6)	0.09	3.38	0.04
20:5/22:6	-	1.43	-
20:4/20:5	-	0.05	381.71
I. Insaturación	44.93	248.73	193.17

Los datos están expresados como media ± error estándar. ΣSat= total de ácidos grasos saturados, ΣMONO = total de ácidos grasos mono-insaturados, ΣPUFA= total de ácidos grasos poli-insaturados. Las emulsiones y su composición pueden ser adquiridas en el siguiente sitio:

<http://www.aquaculture.ugent.be/index.htm>.