



UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y
TECNOLÓGICAS

POSGRADO EN BIOCENCIAS

EFFECTO DE TEMPERATURA Y DIETA EN LA INDUCCIÓN A LA MADURACIÓN Y DESOVE DE LA ALMEJA REINA *Dosinia ponderosa*.

TESIS

que para obtener el grado de:

MAESTRO EN BIOCENCIAS

presenta:

EMMANUEL VILLANUEVA GUTIÉRREZ

Hermosillo, Sonora, México

Enero de 2017

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

DERECHOS DE AUTOR

El presente trabajo de tesis se presenta como uno de los requisitos parciales para la obtención del grado de **Maestro en Biociencias** de la Universidad de Sonora.

Se deposita en la biblioteca de Ciencias Biológicas y de la Salud para ponerla a disposición de los interesados. Se permiten citas breves del material contenido en la tesis sin permiso del autor, siempre y cuando se otorgue el crédito correspondiente. Para reproducir, o en su caso referirse a este documento en forma parcial o total, se deberá solicitar la autorización al Coordinador del Programa del Posgrado.

Bajo cualquier otra circunstancia se debe solicitar permiso directamente al autor.

Atentamente

Emmanuel Villanueva Gutiérrez

Autor

Dra. Nohemí Gámez Meza

Coordinadora del Programa de Maestría en Biociencias

EFFECTO DE TEMPERATURA Y DIETA EN LA INDUCCIÓN A LA MADURACIÓN
Y DESOVE DE LA ALMEJA REINA *Dosinia ponderosa*

TESIS

que para obtener el grado de:

MAESTRO EN BIOCIENCIAS

presenta:


EMMANUEL VILLANUEVA GUTIÉRREZ

Hermosillo, Sonora, México.

Enero de 2017

APROBACIÓN

Los miembros del Comité designado para revisar la tesis titulada Efecto de temperatura y dieta en la inducción a la maduración y desove de la almeja reina *Dosinia ponderosa* presentada por el Biól. Emmanuel Villanueva Gutiérrez, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Biociencias.



Dr. Luis Rafael Martínez Córdova
Director




Dr. Luis Fernando Enriquez Ocaña
Co-Director



Dr. José Antonio López Elías
Secretario



Dra. María del Carmen Garza Aguirre
Sinodal Interno



Dr. José Manuel Mazón Suástegui
Sinodal Externo

DEDICATORIA

Con mucho cariño a mi familia Nora L., Enrique & Norita

Muchas gracias por su gran apoyo, ayuda y estar en todo momento
en mi formación personal y profesional.

AnaLu

Gracias a Dios por permitirme conocerte, gracias a la vida por darme cada día junto a ti, por ser mi consejera, mi novia y mi complemento hacia la felicidad.

Gracias por el apoyo incondicional, ánimos, ayuda prestada y por compartir nuevos e inolvidables momentos en mi vida.

Te agradezco de la manera más sincera e infinitamente por estar a mi lado en todo momento.

¡Que Dios te bendiga siempre!

Te amo honey ♥

V. M. S. H. W.

AGRADECIMIENTOS

- Al Posgrado en Biociencias de la Universidad de Sonora, por darme la oportunidad de estudiar una maestría.
- Al Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (DICTUS), por participar en mi formación y constante apoyo durante mi etapa profesional e intelectual.
- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por brindar de su apoyo para la realización de este trabajo.
- Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste de La Paz B.C.S, México (CIBNOR), por las facilidades otorgadas para el desarrollo de ésta investigación. A Dr. José Manuel Mazón Suástegui, M.C. Delfino Barajas Frías y TECM Pablo Omart Castro por su asesoría en el Laboratorio Experimental de Moluscos, en cuanto al manejo de reproductores de moluscos bivalvos. Dra. María del Carmen Rodríguez Jaramillo y señora Eulalia, gracias por su asesoría y orientación relativa a la estandarización de técnicas de histología, en el Laboratorio de Histología e Histoquímica.
- M.C. Miguel Robles Mungaray (Acuacultura Robles) gracias por su amabilidad y disponibilidad durante mi estancia en La Paz B.C.S.
- Dr. Luis Rafael Martínez Córdova gracias por todo el gran apoyo que me a brindado a lo largo de estos años. Gracias por permitirme vivir una experiencia tan importante para mi formación como investigador, deseo contar siempre con su sabiduría y amistad.
- Dr. Luis Fernando Enríquez Ocaña gracias por su tiempo, disponibilidad y por su apoyo; además, por los conocimientos que me transmitió en el desarrollo de esta nueva etapa de mi formación profesional.
- Dr. José Antonio López Elías gracias por brindarme de su amistad, apoyo y consejos para la realización de este proyecto.
- Dra. María del Carmen Garza Aguirre gracias por su aporte, apoyo brindado, por darme la oportunidad de trabajar con usted y por siempre estar en la mejor disposición de hacer posible esta tesis.
- Dr. José Manuel Mazón Suástegui gracias por su confianza, ayuda, colaboración y grandes observaciones acertadas que sirvieron para realizar una mejor investigación.

- Un especial agradecimiento a Iván por el gran apoyo brindado y por formar conmigo un gran equipo de trabajo.
- A los técnicos Álvaro y José Luis del laboratorio de Acuicultura, gracias por su gran amistad, experiencia y orientación; también el haberme facilitado siempre los medios suficientes para llevar a cabo todas las actividades de esta tesis.
- A Perla Urquidez y Christian Minjarez por su tiempo, asesoramiento y ayuda que me brindaron para la realización de esta investigación.
- A mis compañeros de Laboratorio, AnaLu, Diana F., Iván, Rocío, Jonathan, Diana M., Encinas, Angélica, Perla, Norma gracias por su gran amistad, ayuda y por los buenos momentos que hemos compartido en estos años.
- A los estudiantes del servicio social, Silvia, Jonathan, Rocío, Valeria, Issac, Julián muchas gracias por su gran ayuda que me brindaron para realización de este trabajo.
- A la familia Gómez Ramírez que ahora forman parte de mí, muchas gracias por su confianza, amistad y gran apoyo que me han brindado en esta nueva etapa, los quiero mucho!
- A Emi por acompañarme en esta trayectoria de aprendizaje, conocimientos y por ser un excelente amigo.
- A mis compañeros de generación 2014-2016, Emi, Perlos, Karen, Carolina, Martha, Panchito, y César, por todos esos buenos momentos que compartimos a lo largo de este tiempo.

RESUMEN

En esta investigación se evaluó el efecto de la temperatura y la dieta microalgal durante el proceso de acondicionamiento gonádico para la inducción a la maduración sexual de la almeja Reina (*Dosinia ponderosa*) bajo condiciones de laboratorio. El experimento fue el acondicionamiento de los reproductores fueron alimentados con tres dietas naturales basadas en las microalgas (*Isochrysis* sp.), (*Tetraselmis suecica*) y (*Chaetoceros calcitrans*), a tres niveles de temperatura (20, 25 y 30°C). A lo largo del periodo de acondicionamiento la sobrevivencia se mantuvo por arriba del 50% en los tratamientos *T. suecica* y *C. calcitrans* a 20 y 25°C; sin embargo, siendo menor con la dieta de *Isochrysis* sp. para las tres temperaturas evaluadas. A los 22 y 44 días de acondicionamiento se presentó la mayor proporción de hembras y machos en estadio de madurez a 20 y 25°C al suministrarles la dieta de *T. suecica* y *C. calcitrans*. La temperatura de 25°C fomentó significativamente un mayor diámetro teórico de ovocitos (81.96 μm) con la dieta de *T. suecica*. Se observó con la dieta de *Isochrysis* sp. un incremento lento del diámetro teórico de los ovocitos (74.42 μm), por lo que se asume que esta dieta no cubrió con los requerimientos de los organismos durante el periodo del bioensayo. Los resultados no fueron satisfactorios durante la inducción al desove (disminución e incremento de salinidad y shock térmico), ya que con ambas técnicas se registró una mortalidad del 100%. En función de los resultados obtenidos se puede asumir que la temperatura óptima de acondicionamiento gonadal de *D. ponderosa* es de 20-25°C, éste rango térmico favoreció el crecimiento de los ovocitos vitelogénicos y el aprovechamiento de nutrientes principalmente con las dietas basadas en *Tetraselmis suecica* y *C. calcitrans*. Bajo las condiciones experimentales del presente estudio, los resultados obtenidos aportan nuevo conocimiento científico sobre los procesos reproductivos de la especie, así como elementos zootécnicos para su manejo en laboratorio, aplicables en la producción de semilla para acuicultura

Palabras clave: *Dosinia ponderosa*; Acondicionamiento gonádico y maduración sexual; Dietas microalgales; Manejo térmico

ABSTRACT

In this study was evaluated the effect of temperature and microalgae diet during the gonadal conditioning process on the induction to sexual maturity and spawning of the white clam *Dosinia ponderosa* under laboratory conditions. The conditioning broodstock of *D. ponderosa* were fed three natural diet of microalgae (*Isochrysis* sp., *Tetraselmis suecica* and *Chaetoceros calcitrans*) at three temperature levels (20, 25 and 30 °C). During the conditioning period the survival was maintained above 50% in the treatments with *T. suecica* and *C. calcitrans* at 20 and 25°C; however, being smaller with the diet of *Isochrysis* sp. For the three temperatures evaluated. At the 22 and 44 days of conditioning, the highest proportion of females and males at maturity stage was presented in 20 and 25°C when fed with diet of *T. suecica* and *C. calcitrans*. The temperature of 25°C significantly promoted a greater theoretical diameter of oocytes (81.96 μm with *T. suecica* diet). A slow increase in the theoretical diameter of oocytes was observed with the diet of *Isochrysis* sp. (74.42 μm), so, it is assumed that this diet didn't cover the requirements of the organisms during the bioassay period. The results weren't satisfactory during the spawning induction (decrease and increase of salinity and thermal shock), with both techniques, a mortality of 100% was registered. According on the obtained results, it is possible to assume that the optimum gonadal conditioning temperature of *D. ponderosa* is 20 – 25°C, this thermal range favored the growth of vitellogenic oocytes and the mainly utilization of nutrients with the diets based on *T. suecica* and *C. calcitrans*. Under the experimental conditions of this study, the obtained results provide new scientific knowledge about the reproductive processes of the species, as well as zootechnical elements for its laboratory management, applicable in the production of clam seed for aquaculture.

Key words: *Dosinia ponderosa*, Gonadal conditioning, Sexual maturity, Microalgae diet, Temperature

INDICE GENERAL

	PÁGINA
APROBACIÓN	ii
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	vi
RESUMEN	viii
ABSTRACT	ix
LISTA DE TABLAS	xii
LISTA DE FIGURAS	xiii
INTRODUCCIÓN	1
I. ANTECEDENTES	3
I.1. Generalidades de Moluscos Bivalvos	3
I.2. Taxonomía de <i>Dosinia ponderosa</i>	5
I.3. Aspectos Biológicos	5
I.4. Mecanismo de Alimentación	7
I.5. Reproducción de <i>Dosinia ponderosa</i>	8
I.6. Acondicionamiento de Bivalvos Reproductores	9
I.7. Uso de Temperatura en el Acondicionamiento de Bivalvos	10
I.8. Uso de Microalgas en el Acondicionamiento de Bivalvos	11
I.9. Inducción al Desove	12
I.10. Posición Actual de <i>Dosinia ponderosa</i> en la Acuicultura	13
II. JUSTIFICACIÓN	14
III. HIPÓTESIS	15
IV. OBJETIVOS	16
IV.1. Objetivo General	16
IV.2. Objetivos Específicos	16
V. METODOLOGÍA	17
V.1. Origen y Obtención de Organismos Experimentales	17
V.2. Bioensayos	17
V.3. Cultivo de Microalgas	18
V.4. Acondicionamiento de <i>D. ponderosa</i>	19
V.5. Técnica de Histología (Hematoxilina-Eosina)	20
V.6. Análisis Cualitativo	21
V.7. Análisis Cuantitativo	24
V.7.1. Frecuencia de Estadios de Desarrollo	24
V.7.2. Diámetro Teórico de Ovocitos	24

	PÁGINA
V.8. Inducción al Desove	25
V.9. Análisis Estadístico	26
VI. RESULTADOS	27
VI.1. Biometría y Proporción Sexual	27
VI.2. Supervivencia	27
VI.3. Análisis Cualitativo y Cuantitativo de Histología	29
VI.3.1. Estadios y Frecuencia de Desarrollo Gonádico	29
VI.3.2. Diámetro Teórico de Ovocitos	34
VII. DISCUSIÓN	38
VIII. CONCLUSIONES	46
IX. RECOMENDACIONES	47
X. LITERATURA CITADA	48

LISTA DE TABLAS

TABLA		PÁGINA
1	Caracterización de los estadios de desarrollo gonádico en hembras de <i>Dosinia ponderosa</i> .	22
2	Caracterización de los estadios de desarrollo gonádico en machos de <i>Dosinia ponderosa</i> .	23
3	Tallas promedio \pm ds de las tallas y proporción de sexos de <i>D. ponderosa</i> , para cada uno de los experimentos.	27
4	Diámetro teórico de ovocitos de <i>D. ponderosa</i> en función a la dieta (<i>Isochrysis</i> sp.) a tres niveles temperatura durante su período de acondicionamiento.	35
5	Diámetro teórico de ovocitos de <i>D. ponderosa</i> en función a la dieta (<i>Tetraselmis suecica</i>) a tres niveles temperatura, al concluir su período de acondicionamiento gonádico.	36
6	Diámetro teórico de ovocitos de <i>D. ponderosa</i> en función a la dieta de (<i>Chaetoceros calcitrans</i>) a tres niveles temperatura, al concluir su período de acondicionamiento gonádico.	37

LISTA DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
1	Vista externa (izquierda) y vista interna (derecha), de <i>D. ponderosa</i> .	6
2	Gónada femenina (izquierda) y gónada masculina (derecha), de <i>D. ponderosa</i> .	8
3	Medidas biométricas de <i>D. ponderosa</i> .	17
4	Unidades experimentales utilizadas durante el bioensayo.	18
5	Cultivo de las microalgas de <i>Isochrysis</i> sp., <i>Tetraselmis suecica</i> y <i>Chaetoceros calcitrans</i> en recipientes de 18 L.	19
6	Corte transversal y longitudinal (1 cm) del tejido visceral de <i>D. ponderosa</i> .	21
7	Inducción al desove de <i>D. ponderosa</i> por choque térmico.	26
8	Sobrevivencia de <i>D. ponderosa</i> en función a la dieta y la temperatura durante un periodo de acondicionamiento gonádico de seis semanas.	28
9	Estadios de desarrollo gonádico de hembras de <i>D. ponderosa</i> en función de la dieta y la temperatura.	31
10	Estadios de desarrollo gonádico de machos de <i>D. ponderosa</i> en función de la dieta y la temperatura.	32
11	Frecuencia de fases de desarrollo gonádico de hembras y machos de <i>D. ponderosa</i> , sometidos a diferente dieta y temperatura.	33

INTRODUCCIÓN

Los moluscos representan, después de los crustáceos, el filo con mayor número de especies en el mundo. Estos organismos son abundantes tanto en ambientes marinos como dulceacuícolas y, en menor medida, terrestres. En las lagunas costeras los moluscos son un importante elemento dentro del funcionamiento del ecosistema, siendo la principal fuente de alimentación de muchos organismos, tales como peces, crustáceos, aves, entre otros (Martínez-Córdova, 1996).

En México la acuicultura de bivalvos se realiza casi exclusivamente en las costas del Pacífico de Baja California y en el Golfo de California. Nuestro país ocupa el cuarto lugar de producción en América Latina, después de Chile, Brasil y Perú. Los datos de producción de FAO inician en 1987 con 20 toneladas y posteriormente la producción se incrementa a 2 200 toneladas en 1990. En 1993 la producción declina a 1 053 toneladas y posteriormente se incrementa en 1995 a 2 500 toneladas y a 3 038 toneladas en 1997. Después de ese año la producción decrece nuevamente a un promedio de 1 500 toneladas anuales, cifra que se ha mantenido hasta el 2005 (Maeda-Martínez, 2008).

En la región noroeste de México se explotan alrededor de 25 especies de bivalvos pertenecientes a varias familias, incluyendo: Pectinidos como la mano de león (*Nodipecten subnodosus*) y la almeja Catarina (*Argopecten circularis*); Ostreridos como el ostión de mangle (*Saccostrea palmula*), el ostión de roca (*Striostea prismatica*), el ostión japonés (*Crassostrea gigas*), el ostión de placer (*Crassostrea corteziensis*); Pinnidos como el hacha larga y hacha china (*Pinna rugosa* y *Atrina maura*); Arcidos como la pata de mula (*Anadara tuberculosa*); Veneridos como la almeja chocolate roja (*M. aurantiaca*), la almeja chocolate negra (*Megapitaria squalida*), la almeja roñosa (*Chione gnidia*, *C. californiensis*, *C. undatella* y *C. fluctifraga*), y la almeja reina (*Dosinia ponderosa*) (Holguin, 1976; Baqueiro y Guajardo, 1977; Baqueiro *et al.*, 1982;; Arizpe-Covarrubias, 1992; Martínez-Córdova, 1996).

El conocimiento de la reproducción de las especies de bivalvos es muy importante para el manejo de sus pesquerías comerciales (Barber y Blake, 1991) y en la acuicultura (Alfaro *et al.*, 2001). La producción de bivalvos en criaderos generalmente consta de dos fases, la gametogénesis o el periodo de acondicionamiento de reproductores y una etapa de cría de

larvas hasta su fijación y producción de juveniles o “semillas” (Helm *et al.*, 2006). Entre los factores clave que determinan el éxito en ambas fases se incluyen diversos factores físicos y biológicos (temperatura, salinidad, calidad del agua, densidad de población y las enfermedades) y factores nutricionales (tipo de alimento, ración, calidad de alimento) (Brenko y Calabrese, 1969; Gallager y Mann, 1986; Su *et al.*, 1989; Utting y Millican, 1997; Helm *et al.*, 2006).

Los factores físicos y nutricionales, junto con las características genotípicas propias de la especie, determinan el ciclo reproductivo del organismo, lo que da como resultado un patrón característico de reproducción en el que se regulan la duración, intensidad y frecuencia del mismo. La temperatura y la disponibilidad de alimento han sido señaladas como los principales factores ambientales que regulan el ciclo reproductivo de los bivalvos marinos (García-Domínguez, 2002).

I. ANTECEDENTES

I.1. Generalidades de los Moluscos Bivalvos

Los moluscos bivalvos son invertebrados con simetría bilateral, habitan en las aguas dulces y marinas del planeta y se caracterizan por la presencia de dos valvas que protegen su cuerpo blando. A este grupo pertenecen animales como las almejas, las ostras o los mejillones. La especial distribución corporal de los bivalvos dificulta la división de su cuerpo en secciones claramente diferenciadas, dificultad que se ve incrementada por las diferentes especializaciones de cada uno de los grupos. En general se puede distinguir una región cefálica, muy rudimentaria, en la que no aparece la característica rádula de otros moluscos; el manto, en cuyos bordes se localiza la mayor parte de los órganos sensoriales; y el pie, quizás la región corporal más claramente diferenciada y visible de estos animales que puede presentar diferentes morfologías en función de los hábitos de vida de las especies. Este musculoso pie facilita el desplazamiento del animal en el sustrato en el que habita, aunque existen especies capaces de avanzar mediante bruscos movimientos de las valvas (Gosling, 2008).

La concha de los bivalvos está formada por dos valvas que generalmente son desiguales y ocupan las regiones izquierda y derecha del animal. La estructura de esta concha consta de tres capas diferenciadas: una orgánica externa, llamada periostraco, y otras dos de carbonato de calcio que se encuentran englobadas en una matriz orgánica. El conjunto de las tres capas confiere una gran resistencia a la estructura, que actúa como elemento exoesquelético y de protección de los órganos internos del animal. Los principales componentes de la concha son la conquiolina y el carbonato de calcio. La primera es una proteína queratinoide segregada por las células especializadas del manto, mientras que el carbonato de calcio es una concreción de materiales inorgánicos calizos, que aparecen principalmente en forma de calcita o aragonito. En muchas especies la concha permite aproximar la edad del animal debido a que en su superficie aparecen líneas concéntricas marcadas en torno al vértice, llamado umbo, que corresponden a los períodos de crecimiento. Las dos valvas están unidas en la región dorsal por un ligamento córneo formado por conquiolina. Este ligamento es elástico, de manera que tiene tendencia a mantener las dos valvas abiertas por la región ventral, es decir, por el borde, cuando la musculatura del animal está relajada. En la zona en que aparece el ligamento se localiza la charnela, cuya misión es la de articular ambas partes

de la concha. En muchas especies esta charnela presenta dientes de variadas morfologías que encajan unos en otros y evitan el desplazamiento lateral de las valvas. Las especies que carecen de dientes en las charnelas reciben el nombre de adentados (Ruppert y Barnes, 1996).

El manto, responsable de la formación de la concha de estos animales, es una característica anatómica común a los moluscos, que en los bivalvos ha tenido hacia la fusión de los márgenes. Se trata de un epitelio secretor con dos grandes lóbulos laterales, cada uno de ellos conectado a una de las valvas; su misión fundamental es la de englobar y proteger las vísceras del animal. La tendencia evolutiva de este grupo hacia la fusión de los dos lóbulos del manto se ha logrado en mayor o menor medida según las diferentes especies o grupos, y en función de los hábitos de vida de los organismos en cuestión. Resultado de esta fusión son, en gran medida, los sifones exhalantes e inhalantes que aparecen en muchas especies y con los que crean las corrientes de agua necesarias, tanto para la respiración como para alimentación. En los bivalvos adaptados a sustratos blandos, sin embargo, el desarrollo del pie es considerable, y su morfología variada, aunque parece predominar el tipo cuneiforme o pelecípodo, es decir, en forma de hacha. El movimiento de la musculatura del pie permite la penetración de éste en el sustrato blando y, mediante la retracción muscular, también del cuerpo completo del animal (Ruppert y Barnes, 1996; Gosling, 2008).

Los bivalvos respiran mediante branquias, unos finos filamentos muy irrigados que se localizan en la cavidad paleal, sostenidos por unas estructuras denominadas ctenidios. Las corrientes de agua generadas por los sifones inhalantes y exhalantes obligan al líquido oxigenado a circular a través de estos pliegues, de manera que el líquido interior del animal pueda captar el oxígeno del agua (Ruppert y Barnes, 1996).

Generalmente, los aspectos reproductivos de los bivalvos, suelen ser dioicos y en escasas ocasiones son hermafroditas funcionales. En todos los moluscos bivalvos, existen diferentes fases en un ciclo de gametogénico. En él se incluyen períodos de reposo en la actividad reproductiva, (períodos vegetativos) períodos de diferenciación celular, de crecimiento citoplasmático, de vitelogénesis (maduración), de puesta (liberación de gametos al medio ambiente) y de reabsorción de los restos de los gametos que no se liberaron (Barber y Blake, 1991). Las gónadas se localizan por lo general en la base del pie, junto a la masa visceral, y se abren al exterior por los conductos denominados gonoductos que, en las formas

menos evolucionadas, se unen a los órganos excretores para verter sus productos por el mismo poro. En las formas más evolucionadas, los conductos renales y gonadales son independientes y sus productos se vierten al exterior por diferente abertura. Cuando los bivalvos alcanzan la madurez sexual, liberan sus gametos al mar, en donde tiene lugar la fecundación. La fecundación, aunque es externa, puede llevarse a cabo en la cavidad paleal o incluso en las cavidades suprabranquiales. Los óvulos fecundados sufren una segmentación total y espiral, en un complejo proceso de desarrollo en el que pasan por diversos estadios larvarios. La mayoría de ellos pasan por un estadio de larva trocófora muy similar a la de los anélidos, pero con la particularidad de presentar una glándula de la concha. La concha inicial segregada por la glándula larvaria es única, y se va haciendo bivalva a medida que el manto se diferencia en los dos lóbulos laterales (Maeda-Martínez, 2002; Gosling, 2008, Baqueiro-Cárdenas, 2014).

I.2. Taxonomía de *Dosinia ponderosa*

Reino: Animalia

Filo: Mollusca

Clase: Bivalvia

Orden: Veneroidea

Familia: Veneridae

Género: *Dosinia*

Especie: *Dosinia ponderosa* (Gray, 1838)

I.3. Aspectos Biológicos

La almeja reina (también conocida como almeja blanca), *Dosinia ponderosa* (Gray, 1838), es un recurso natural que es objeto de pesca artesanal en las costas del Golfo de California. Ésta especie vive enterrada en los fondos arenosos donde el movimiento del agua es constante; su distribución está determinada principalmente por el tipo de sustrato de arena fina y los sustratos areno limosos. La especie se distribuye a lo largo de una gran parte del

Pacífico Centro Oriental, desde el Golfo de California, México hasta las costas del Ecuador y se encuentra primordialmente en zonas arenosas de la zona submareal hasta aproximadamente los 30 m de profundidad (Keen, 1971; Baqueiro y Stuardo, 1977).

En cuanto a su morfología externa, la especie presenta una concha de color blanco con franjas concéntricas de color café; y alcanza una talla máxima de 150 mm. Su placa dentaria es sólida y relativamente ancha posteriormente, con 3 dientes cardinales divergentes en cada valva y un diente lateral anterior en forma de tubérculo en la valva izquierda. Los bordes internos de la concha son lisos, y su superficie interna es de color blanco (Arreola-Hernández, 1997). El cuerpo blando, consta de sifón inhalante y exhalante, branquias, pie y la masa visceral, que se ve inmersa con el tejido gonadal, tracto digestivo y estómago; los músculos abductores se encuentran embonados en las valvas representando sus bisagras de las mismas (Figura 1).

D. ponderosa es un recurso comercial; su pesca artesanal que se encuentra registrada dentro de la Norma Mexicana: PROY-NMX-FF-056-SCF-2009 pesca-moluscos-especies comestibles de importancia comercial (Castillo-Rodríguez, 2009).



Figura 1. Vista externa (izquierda) y vista interna (derecha), de *D. ponderosa*.

I.4. Mecanismo de Alimentación

La alimentación, digestión y la asimilación en los bivalvos, son procesos coordinados cuya función principal es satisfacer la demanda de energía necesaria para todos y cada uno de los procesos fisiológicos del organismo, así como para la producción de gametos y su reproducción (Gosling, 2008). La principal fuente de alimento de los bivalvos es el seston, o materia orgánica particulada que se encuentra suspendida en la columna de agua, compuesta en su gran mayoría por fitoplancton, seguido de bacterias, protozoarios, zooplancton, partículas inorgánicas y detritos, los cuales varían de acuerdo a la interacción de ciertos factores físicos y biológicos como los ciclos estacionales, fluctuaciones anuales, temperatura, fotoperiodo, marea, presencia de patógenos y consumidores primarios, entre otros (Luna-González *et al.*, 2000; Maeda-Martínez, 2002). La filtración en los bivalvos es el proceso mediante el cual estos moluscos captan su alimento. El mecanismo particular de los venéridos, se inicia al absorber grandes volúmenes de agua de mar por medio de una prolongación el manto llamada sifón inhalante, para retener el suficiente fitoplancton y seston. Al ingresar una corriente de agua, ésta circula por la cavidad del manto, y pasa por los ctenidios (branquias) donde se lleva a cabo la retención y selección de partículas de alimento suspendidas en el agua, además de la captación de oxígeno disuelto (Gosling, 2008). Cuando el agua pasa a través de los ctenidios, la acción conjunta y sincronizada de los cilios que se encuentran cubriéndolos y el moco segregado, permite que las partículas sean trasladadas hacia los cilios de los márgenes dorsales y ventrales de los ctenidios, y se conduzcan hacia los palpos labiales los cuales dirigen e introducen el alimento a la boca y de ahí pasa al estómago. Por otro lado, al realizar el proceso de filtración por medio de los cilios laterales, los bivalvos tienen la capacidad de rechazar parte del alimento que se ingiere en grandes cantidades. Las partículas grandes son agregadas por mucosidad y retenidas, para ser evacuadas de la cavidad paleal a través del sifón exhalante en forma de pequeñas masas empaquetadas (partículas indeseables y moco), que se conocen como “pseudoheces” (Ruppert y Barnes, 1996).

I.5. Reproducción de *D. ponderosa*

La especie incluye organismos dióicos sin dimorfismo sexual, la gónada se encuentra inmersa junto con los intestinos, la glándula digestiva y parte del pie. Los machos presentan una gónada de color blanquecina y de textura espesa, en contraparte las hembras presentan una gónada granulosa de color amarillenta (Figura 2).



Figura 2. Gónada femenina (izquierda) y gónada masculina (derecha) de *D. ponderosa*.

Se han realizado estudios sobre su reproducción en el Pacífico Mexicano, y en Baja California Sur. Arreola-Hernández (1997) estudió el ciclo gametogénico de *D. ponderosa* por medio de técnicas histológicas y su relación con parámetros ambientales como la temperatura del agua y el fotoperiodo. Su ciclo gonádico fue caracterizado por Arreola (1997) en cuatro estadios: Desarrollo, Madurez, Desove y Postdesove, estas etapas fueron determinadas tanto para las hembras como para los machos, en donde no encontraron ningún organismo indiferenciado, ni hermafrodita. Sus resultados en relación al índice gonádico confirman que el tamaño de los ovocitos es mayor en los meses de mayor porcentaje de individuos sexualmente maduros (Marzo y Abril). El autor observó que existe una relación entre el desove y la temperatura, ya que los porcentajes más altos de organismos en desove se presentaron en los meses más cálidos del año (Julio a Octubre), y no encontró relación directa con otros parámetros ambientales como fotoperiodo o concentración de clorofila.

El índice gonadosomático mostró valores más altos en enero y el más bajo en agosto, lo que no demuestra una relación clara con la madurez o desove y, por lo tanto, este índice

no se recomienda para determinar el evento reproductivo de la especie. Por otro lado, en la Bahía de Zihuatanejo se realizó un análisis de las características de longitud, altura y peso total de las poblaciones de *D. ponderosa*, donde encontraron que la reproducción es constante durante todo el año, con tres periodos de desove máximo que coinciden con la presencia de juveniles en la población, dos meses después (Baqueiro–Cárdenas, 1977).

I.6. Acondicionamiento gonádico de Bivalvos Reproductores

El éxito en la industria acuícola depende en gran medida de la disponibilidad de organismos reproductores que asegure el suministro suficiente y oportuno de juveniles (“semillas”) de alta calidad, que puedan crecer rápidamente hasta un tamaño comercial. El conocimiento del ciclo de vida, permite comprender sobre la distribución y estructura poblacional de cierta especie, más importante dentro de la acuicultura es posible efectuar reclutamientos de poblaciones adultas para la obtención de semillas para la producción (Seed, 1976; Arsenault y Himmelman, 1998). La explotación de pesquerías al igual que la acuicultura, se basan en el manejo de ciertas especies la cual es indispensables previos estudios sobre sus ciclos de vida (Fariás *et al.*, 2001).

El acondicionamiento gonádico de reproductores incluye técnicas aplicables para acelerar, mantener o retrasar la madurez sexual en un grupo de organismos reproductores fuera de su ambiente natural, y bajo condiciones controladas de laboratorio (Mazón-Suástegui, 1987, 2005; Mazón-Suástegui *et al.*, 2011). El proceso de acondicionamiento de reproductores se inicia con la selección de los reproductores en el medio natural, ya sea de bancos naturales o cultivos en la etapa de engorda. La selección se realiza tomando en cuenta el buen aspecto, forma adecuada, buena relación tamaño/edad, y en el caso específico de los pectínidos, el color de concha (Maeda-Martínez, 2002; Mazón-Suástegui *et al.*, 2011). Debido a lo anterior, el acondicionamiento se utiliza para tener un conocimiento general de los aspectos de la respuesta fisiológica bajo condiciones de laboratorio (Martínez-Guzmán, 2008; Loor-Mera, 2012). Existen muchos factores, tanto endógenos como exógenos, que afectan el desempeño de reproductores, larvas y juveniles tempranos y tardíos. Son tres las etapas principales en las cuales puede manifestarse el efecto de esos factores: (1) desarrollo de las gónadas y gametos, (2) desove y fecundación, desarrollo, y (3) crecimiento de la

progenie. Considerando que los factores endógenos son más difíciles de manejar experimentalmente, los esfuerzos destinados a obtener organismos maduros para la producción de semillas, se han dirigido a los de naturaleza exógena, principalmente a aquellos que se refieren a la dieta y temperatura (Martínez-Guzmán, 2008). La maduración puede tomar de 2 a 5 semanas dependiendo de la especie, el estadio de madurez de los reproductores en el momento de la colecta y de las condiciones de temperatura y alimentación (Villalaz, 1994; Mazón-Suástegui *et al.*, 2011). Avilés y Muciño (1988), documentan que lograron el acondicionamiento de *A. ventricosus* en 20 días a 18 y 35°C. Para analizar la actividad reproductiva de bivalvos en acondicionamiento, es recomendable utilizar análisis: (a) cualitativos, que proporcionan información exacta para clasificar los estadios del desarrollo gonadal, y (b) cuantitativos, como la frecuencia de los distintos estadios reproductivos en la población estudiada y el diámetro teórico de los ovocitos, como uno de los indicadores más confiables para determinar el grado de madurez de bivalvos reproductores (Lannan, 1980; Lango-Reynoso *et al.*, 2000; Mazón-Suástegui, 2005; Rodríguez-Jaramillo *et al.*, 2008).

I.7. Uso de Temperatura en el Acondicionamiento de Bivalvos

La temperatura se considera el factor ambiental más importante que controla la reproducción de los bivalvos (Sastry, 1968). Una temperatura óptima proporciona un mejor desarrollo de las gónadas y la producción de gametos, incluyendo la reducción del tiempo requerido para la maduración sexual de los reproductores (Mann, 1979; Fabioux *et al.*, 2005), un aumento en el número de huevos (Honkoop y van del Meer, 1998), y la rápida acumulación de lípidos y proteínas en la gónada (Martínez *et al.*, 2000). La temperatura óptima para el desarrollo de las gónadas en un criadero debe ser acorde a los objetivos que se persiguen, ya que podría ser necesario inhibir el inicio de la gametogénesis (baja temperatura), o promover de manera programada su desarrollo, sin causar la degeneración de los productos sexuales y la reabsorción de las gónadas (altas temperaturas) (Sastry, 1968). Flores-Vergara *et al.*, (2004), documentaron que los incrementos de temperatura pueden repercutir de manera negativa en cuanto a una disminución de proteínas y carbohidratos; y sin embargo, en contraparte el contenido de lípidos tiende a aumentar. Lo anterior se ve reflejado con el estudio de Chávez-

Villalba *et al.*, (2002b), quienes reportan que se incrementa el tamaño de los ovocitos cuando se mantiene de una manera constante y estable de temperatura y además se tiene abundante alimento.

I.8. Uso de Microalgas en el Acondicionamiento de Bivalvos

Las microalgas son la dieta básica para los bivalvos que se alimentan por filtración y en acuicultura las especies utilizadas son seleccionadas por su facilidad de cultivo, digestibilidad, tamaño de célula y valor alimenticio (Webb y Chu 1981). La alimentación de los reproductores en condiciones de laboratorio es beneficiosa, ya que aumenta la producción gamética. Sin embargo, los beneficios dependen en gran medida de la cantidad y la calidad del alimento suministrado. Es indispensable considerar como factores nutricionales importantes, la ración diaria (células/organismo/día), la especie de microalga proporcionada, y sus condiciones de cultivo, composición bioquímica del alimento y forma de presentación, particularmente si se trata de fitoplancton vivo, o fitoplancton conservado de alimentación (Utting y Spencer, 1991). Jaramillo *et al.*, 1993, consideran que es más probable que el suministro de alimento esté más relacionado con el desarrollo gonadal que la temperatura.

En relación a la calidad del alimento para el acondicionamiento gonádico de reproductores de bivalvos, es necesario satisfacer los requerimientos nutricionales de energía que será utilizada durante el proceso de la gametogénesis. El desarrollo gonadal demanda cantidades importantes de energía que deben proveerse mediante la transmisión de proteínas, lípidos y carbohidratos, principalmente de los músculos abductores y de la glándula digestiva (Brown *et al.*, 2002; Mathieu y Lubet, 1993). Las condiciones de cultivo y la cepa de microalga utilizada puede repercutir en la calidad del alimento disponible en el laboratorio para el acondicionamiento gonádico de los bivalvos, ya que se ha documentado que puede haber la variación en la composición bioquímica entre diferentes cepas microalgales (Robert *et al.*, 2004). La calidad del alimento varía también en función de la edad del cultivo (Lourenço *et al.*, 1997; Zhu *et al.*, 1997), así como del contenido celular de lípidos en las distintas fases de crecimiento poblacional en las que las microalgas son cosechadas (Fernández-Reiriz *et al.*, 1989; Tonon *et al.*, 2002) e influyen en la nutrición de estos organismos.

Se ha reportado que durante el proceso de almacenaje de reservas en los ovocitos (principalmente para los invertebrados), se presenta una acumulación de carbohidratos, los cuales posteriormente son empleados como una fuente de energía, y un continuo almacenaje de lípidos; sin embargo, para el caso de las proteínas, estas se anexan a los ovocitos al final del proceso (Raven, 1961). Lo anterior se relaciona con investigaciones previas Gabbott, (1975) y Barber y Blake, (1991), quienes evidenciaron que en varias especies de bivalvos la incorporación de las proteínas al final de la gametogénesis. Se ha documentado ampliamente que el almacenaje de lípidos en tejido gonadal es importante para el proceso de la gametogénesis y maduración sexual en moluscos bivalvos (Gosling, 2008). La acumulación de los ácidos grasos es un patrón que se refleja en la energía necesaria para su incorporación directa en los tejidos somáticos o mediante la síntesis de los carbohidratos acumulados en el músculo abductor vía lipogénesis; posteriormente al incorporarse los lípidos se utilizan para el desarrollo de los gametos (Palacios *et al.*, 2007).

I.9. Inducción al Desove

El desove es uno de los eventos más importantes en el ciclo reproductivo de los invertebrados. Frecuentemente el desove es abrupto y puede ocurrir en poblaciones completas en un lapso de tiempo corto (Maeda-Martínez, 2002). Existen varios métodos para inducir el desove en los reproductores bivalvos madurados en laboratorio, mediante estímulos físicos, químicos, biológicos, mecánicos o una combinación de ellos. Dentro de los estímulos físicos, los más utilizados son el incremento y disminución de la temperatura y la salinidad.

La estimulación térmica es quizás el método más comúnmente empleado en los laboratorios de producción de semillas por la facilidad de producirla y los buenos resultados que generalmente produce (Maeda-Martínez, 2002; Mazón-Suástegui, 2005; Mazón-Suástegui *et al.*, 2011). Lora-Vilchis *et al.*, 1997, obtuvieron desoves de *A. ventricosus* con variaciones escalonadas de temperatura, aumentando de 24 a 26°C y manteniéndola en ese nivel durante 45 minutos. Luego la temperatura se incrementó gradualmente a 27°C, en donde se mantuvo durante 20 minutos hasta que ocurrió la emisión de espermatozoides.

I.10. Posición Actual de *Dosinia ponderosa* en la Acuicultura

Existen escasas investigaciones actualizadas sobre *D. ponderosa*; sin embargo, algunos trabajos se han realizado en los últimos años. Gutiérrez-Reyes, 2015, registra a *D. ponderosa* como una especie con potencial de biorremediación para la remoción de la materia particulada en suspensión en cuerpos de agua impactados por efluentes acuícolas, siendo mejor su desempeño a temperaturas elevadas, características de la región de Sonora, México. Así mismo, Ramos-Corella *et al.* (2014), demostraron que los especímenes de *D. ponderosa* colectados en las áreas impactadas por descargas de efluentes, exhibieron proporciones más altas de filtración bajo condiciones de laboratorio, comparado con aquellas que se colectaron en áreas no impactadas. En relación con lo anterior, Martínez-Porchas *et al.* (2016), registran que las descargas de los efluentes de las granjas camaroneras tienen un impacto negativo en la calidad ambiental y las condiciones fisiológicas de *D. ponderosa* dentro de un radio de por los menos 150 m de la salida de los efluentes. Por otra parte, Encinas-Arzate (2015), ha documentado que el balance energético de *D. ponderosa* es positivo con el uso como alimento de microalgas criopreservadas sin afectar las tasas fisiológicas (filtración y clarificación). Recientemente, González-Vega (2016), estableció que al suministrar dietas monoalgales de *Chaetoceros muelleri* e *Isochrysis* sp. como alimento para *D. ponderosa* se impactan de manera positiva en los parámetros de calidad, valor nutricional y desarrollo gonadal.

En este estudio se pretende establecer una relación entre las variaciones de la temperatura y el consumo de diferentes dietas naturales a base de fitoplancton con el desarrollo gonadal de la almeja reina *D. ponderosa* a fin de generar nuevo conocimiento, y contribuyendo al establecimiento de las estrategias aplicables para definir técnicas para el manejo adecuado de los reproductores durante su acondicionamiento gonádico y maduración sexual bajo condiciones controladas de laboratorio, con el propósito de producir semillas de la especie y promover su cultivo en las costas de Sonora.

II. JUSTIFICACIÓN

La almeja reina (*Dosinia ponderosa*) es una especie sobreexplotada en las costas de Bahía de Kino, Sonora y para evitar el declive de sus bancos naturales de ésta especie a corto o largo plazo, es indispensable desarrollo técnicas su cultivo. La producción de semilla en el laboratorio es una de las alternativas para ello, y es de gran importancia definir los requerimientos fundamentales para el acondicionamiento gonádico de reproductores que puedan ser desovados para obtener larvas y semillas. En el presente estudio se pretende establecer una relación entre las variaciones de la temperatura y el consumo de diferentes dietas microalgales con el acondicionamiento gonadal, madurez sexual y desove de la almeja reina. Este conocimiento a futuro ayudará al manejo adecuado de los reproductores bajo condiciones controladas, sentando así las bases para un cultivo exitoso de la especie en las costas de Sonora.

Pregunta de Investigación

¿Cuál es la combinación más adecuada de alimento y temperatura para el acondicionamiento gonádico y maduración sexual de reproductores, de la almeja reina (*Dosinia ponderosa*) bajo condiciones de laboratorio?

III. HIPÓTESIS

Es factible encontrar una dieta microalgal, que en combinación con una temperatura en particular, tenga el mejor efecto positivo en el acondicionamiento gonádico y maduración sexual de reproductores de la almeja reina (*Dosinia ponderosa*).

IV. OBJETIVOS

IV.1 Objetivo General

Evaluar la combinación de tres niveles de temperatura y tres dietas microalgales sobre el acondicionamiento gonádico y maduración sexual de reproductores, de almeja reina (*Dosinia ponderosa*) bajo condiciones de laboratorio.

IV.2. Objetivos Específicos

- Evaluar el efecto de la dieta monoalgal durante el acondicionamiento gonádico de reproductores de almeja reina *D. ponderosa*.
- Evaluar el efecto de la temperatura durante el acondicionamiento gonádico de reproductores de la almeja reina *D. ponderosa*.
- Determinar mediante histología los estadios de desarrollo gonadal en hembras y machos de *D. ponderosa*, acondicionados mediante diferentes tratamientos de dieta y temperatura.
- Determinar, el diámetro teórico de ovocitos y frecuencia de categorías ovocitarias en hembras de *D. ponderosa* acondicionadas mediante diferentes tratamientos de dieta y temperatura.
- Evaluar el efecto de temperatura y dieta en el desove de *D. ponderosa* inducido mediante shock térmico y cambios de salinidad.

V. METODOLOGÍA

V.1. Origen y Obtención de Organismos Experimentales

Se colectaron 226 especímenes (adultos reproductores) del molusco venérido conocido regionalmente (Sonora, México) como almeja reina *D. ponderosa* por buceo autónomo en la zona costera de Bahía de Kino, Sonora (28°49'00"N 111°56'00"W). Los ejemplares midieron entre 10 y 15 cm de longitud. Los organismos se trasladaron usando una hielera y en seco a las instalaciones del Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Hermosillo, Sonora al Laboratorio Húmedo de la Academia de Acuacultura. Las almejas se limpiaron y se les realizó una biometría (longitud, altura de la concha y peso húmedo) (Figura 3).



Figura 3. Medidas biométricas de *D. ponderosa*

V.2. Bioensayos

Como unidades experimentales se utilizaron acuarios rectangulares de plástico con 60L de capacidad, con agua de mar filtrada ($1\mu m$) por medio de un sistema de biofiltro, con una salinidad de 35ups y aireación continua (Figura 4). Los organismos fueron aclimatados a las temperaturas experimentales (20, 25 y 30°C) y sin alimentación, por un lapso de 48 horas con la finalidad de depurar su sistema digestivo y a su vez para cambiar paulatinamente las características del agua del nuevo medio para el acondicionamiento, ya que son organismos sensibles a las variaciones bruscas en temperatura y salinidad (Maeda-Martínez, 2002).

Durante el acondicionamiento los acuarios se limpiaron cada mañana, retirando las heces mediante sifoneo manual antes de alimentar. Se realizaron recambios de agua totales (100%) en cada acuario cada tres días.



Figura 4. Unidades experimentales utilizadas durante el bioensayo.

V.3. Cultivo de Microalgas

El cultivo de microalgas se realizó en el Cepario de Acuicultura (DICTUS), utilizando agua de mar filtrada y esterilizada, con una salinidad de 35 ups, para las especies *Isochrysis* sp., *Tetraselmis suecica* y *Chaetoceros calcitrans* (Figura 5). Para preparar el medio de cultivo el agua de mar se esterilizó mediante dos procesos: para tubos y matraces se empleó una autoclave y para garrafones y columnas se aplicaron $3 \text{ ml} \cdot \text{L}^{-1}$ de hipoclorito de sodio comercial, dejando reposar durante 24 horas, y al culminar éste periodo, se neutralizó el cloro restante del agua de mar añadiendo $0.175 \text{ gr} \cdot \text{L}^{-1}$ de tiosulfato de sodio y se proporcionó aireación continua durante dos horas. Posteriormente el agua de mar se enriqueció con los nutrientes requeridos por cada microalga, que deben ser incluidos en los medios de cultivo; entre ellos se encuentran los macronutrientes, micronutrientes y vitaminas de acuerdo al medio de F/2 (Guillard y Ryther, 1962). Los cultivos de cada una de las cepas se realizaron de manera escalonada iniciando en tubos de 15 mL, durante 5 días de crecimiento. Al término de éste tiempo las cepas se transfirieron a matraces de 250 mL y posterior al mismo tiempo de desarrollo celular se pasaron a matraces de un litro, después a garrafones de 18 L y por

último a columnas de 70L. Se utilizó la técnica de cultivo semicontinuo manteniendo el cultivo de cada dieta en fase exponencial (López y Voltolina, 1993). Los cultivos se mantuvieron al interior del cepario, con iluminación de focos fluorescentes de luz blanca (F96T12/D) de 75 W, con aireación continua y a una temperatura de a 21 ± 1 °C.



Figura 5. Cultivo de las microalgas de *Isochrysis* sp., *Tetraselmis suecica* y *Chaetoceros calcitrans* en recipientes de 18 L.

V.4. Acondicionamiento de *D. ponderosa*

En el bioensayo de acondicionamiento gonadal, los organismos se expusieron a tres tratamientos combinados de dieta y temperatura mantenidos durante un periodo de 6 semanas; cada tratamiento se experimentó con cuatro unidades experimentales y en cada una con seis reproductores de *D. ponderosa*. Con lo anterior, las dietas monoalgales (*Isochrysis* sp., *Tetraselmis suecica* y *Chaetoceros calcitrans*) se combinaron cada una con tres diferentes temperaturas de acondicionamiento (20, 25 y 30°C) con la finalidad de experimentar con nueve tratamientos totales. Para mantener la temperatura de 20°C se ajustó con el sistema de aire acondicionado del laboratorio, sin embargo, para mantener constante y estable las temperaturas de 25 y 30°C respectivamente se colocaron en los acuarios calentadores de inmersión (ViaAqua Titanium Aquarium Heater, 300-Watt) con regulador incluido.

Se suministró una ración de 1.5 litros diarios de dietas monoalgales a una concentración de 100 000 células·L⁻¹ de *Isochrysis* sp., *Tetraselmis suecica* y *Chaetoceros calcitrans* como alimento para los reproductores de *D. ponderosa* para cada tratamiento. Para obtener la concentración de microalgas requerida, previamente se tomó una muestra (1mL) de los cultivos de las columnas y garrafones para realizar un conteo celular con un hematocitómetro y observando la muestra con un microscopio óptico compuesto (Carl Zeiss Axiostar Plus, Model No. 1169-149) utilizando los objetivos de 40x. El número celular fue cuantificado mediante la siguiente fórmula:

$$No.cel/ml = \frac{No. Células\ totales \times 10,000}{No. de\ cuadros\ contados}$$

Al obtener los datos del conteo celular se procedió a realizar soluciones de las diferentes dietas monoalgales con la finalidad de obtener la concentración de 100 000 células·L⁻¹ necesaria para la alimentación de *D. ponderosa*.

V.5. Técnica de Histología (Hematoxilina-Eosina)

Para los análisis de histología, al inicio, a los 22 y 44 días de acondicionamiento se sacrificaron cinco organismos aleatoriamente de cada tratamiento con el fin de determinar la proporción de sexos y realizar los cortes histológicos utilizando la técnica de tinción de hematoxilina y eosina (Humason,1962). La madurez en la que se encontraban los especímenes al inicio del proyecto correspondiente y posteriormente para los días de acondicionamiento anteriormente mencionados fue evaluada, removiendo de su concha el tejido visceral de los organismos y se fijándolo en solución Davidson durante 24 horas. Posteriormente al término de este tiempo se transfirió el tejido visceral en alcohol etílico al 70% mediante un lapso de 48 horas. Se llevaron a cabo cortes del tejido de manera transversal y longitudinalmente de 1 cm por triplicado sobre las vísceras de los organismos en los cuales abarcaba parte de las branquias, pie, gónada y glándula digestiva, continuamente éstos se colocaron en pequeños casetes de plástico con su correspondiente etiquetado por tratamiento (Figura 6).

Consecutivamente se deshidrataron y se clarificaron los tejidos con un aumento de concentración de etanol que va del 70 al 100% y xilol, por último, se realizó la infiltración (55°C) e inclusión de parafina para procesarlos como bloques de parafina. Se realizaron de 2-3 cortes de 5 μm de espesor (repeticiones) con un micrótomomo de rotación (Kedee KD-2258) con cada una de las muestras de las gónadas; posteriormente se montaron en lamillas y se tiñeron con hematoxilina-eosina de acuerdo a lo propuesto por (Humason,1962). Finalmente, teñidas las muestras, estas se montan con la adición de una gota de resina (Entellan®) y un cubreobjetos, con el fin de darle nitidez al tejido al ser observados bajo un microscopio compuesto y a su vez interpretar cada muestra para la identificación de la fase de madurez en la que se encontraban los especímenes.



Figura 6. Corte transversal y longitudinal (1 cm) del tejido visceral de *D. ponderosa*.

V.6. Análisis Cualitativo

Para los análisis cualitativos, las laminillas teñidas se observaron mediante el uso de un microscopio óptico compuesto (Carl Zeiss Axiostar Plus, Model No. 1169-149) que además tenía integrada una cámara digital (Dino-Eye Digital Eyepiece Camera AM423X). Empleando los objetivos de 10 y 40x de aumento del microscopio se obtuvieron las proporciones de sexo de los organismos y además se identificaron las fases de maduración gonadal utilizando el software analizador de imágenes Image Pro. Plus v. 4. 5.1.

Para determinar la interpretación y caracterización de las fases de desarrollo gonadal de los organismos se tomó como referencias la información propuesta por Rodríguez-Jaramillo *et al.*, 2008 (Tablas 1 y 2).

Tabla 1. Caracterización de los estadios de desarrollo gonádico en hembras de *Dosinia ponderosa*.

Estadio de desarrollo	Hembras	Referencias
<i>Estadio 0</i> <i>Indiferenciado</i>	En el área gonadal, se caracteriza por la ausencia de folículos o están en proceso de formarse, y sin evidencia de gametos por lo que no es posible determinar el sexo.	Rodríguez-Jaramillo <i>et al.</i> , 2008.
<i>Estadio I</i> <i>Previtelogénesis</i>	Gónada ligeramente desarrollada con presencia de ovogonias y folículos pequeños. Formación de ovocitos rodeados de células foliculares sin estar libres.	Rodríguez-Jaramillo <i>et al.</i> , 2008.
<i>Estadio II</i> <i>Vitelogénesis</i>	Evidencia de ovocitos pedunculados unidos a pared del acino y ovocitos de diferente tamaño (previtelogénicos y postvitelogénicos).	Rodríguez-Jaramillo <i>et al.</i> , 2008.
<i>Estadio III</i> <i>Postvitelogénesis</i> <i>(Madurez)</i>	Incremento del área gonadal por delgadas bandas interfoliculares y ausencia de tejido conectivo. Ovocitos de forma esférica y ovalada de tamaño homogéneo, libres en el acino.	Rodríguez-Jaramillo <i>et al.</i> , 2008.
<i>Estadio IV</i> <i>Desove parcial</i>	Folículos semivacíos y su diámetro disminuye, con pocos ovocitos previtelogénicos, presencia de espacios vacíos dentro de los acinos.	Rodríguez-Jaramillo <i>et al.</i> , 2008.
<i>Estadio V</i> <i>Postdesove</i>	Acinos vacíos y no se aprecia el tejido conectivo. Presencia de ovocitos residuales y en algunos casos se observan ovocitos previtelogénicos, se reabsorben los gametos que no fueron expulsados.	Rodríguez-Jaramillo <i>et al.</i> , 2008.

Tabla 2. Caracterización de los estadios de desarrollo gonádico en machos de *Dosinia ponderosa*.

Estadio de desarrollo	Machos	Referencias
<i>Estadio 0 Indiferenciado</i>	El área gonadal, se caracteriza por la ausencia de folículos o están en proceso de formarse. Sin evidencia de gametos por lo que no es posible determinar el sexo.	Rodríguez-Jaramillo <i>et al.</i> , 2008.
<i>Estadio I Espermatogénesis temprana</i>	Escaso desarrollo de la gónada, presencia de espermatogonias adheridas a pequeños folículos dispersos. Abundante tejido conectivo.	Rodríguez-Jaramillo <i>et al.</i> , 2008.
<i>Estadio II Espermatogénesis avanzada</i>	Espermatocitos visibles han repoblado los folículos casi totalmente y tejido conectivo reducido.	Rodríguez-Jaramillo <i>et al.</i> , 2008.
<i>Estadio III Madurez</i>	Tejido conectivo sustituido por los folículos del tejido gonádico alargados y llenos de espermatocitos.	Rodríguez-Jaramillo <i>et al.</i> , 2008.
<i>Estadio IV Desove parcial</i>	Folículos presentan liberación de esperma y aparecen espacios vacíos en el interior de los túbulos seminíferos, se evidencian escasos espermatozoides hacia el centro.	Rodríguez-Jaramillo <i>et al.</i> , 2008.
<i>Estadio V Postdesove</i>	Acinos vacíos, quedando sólo escasos espermatozoides residuales, se reabsorben los gametos que no fueron expulsados. Abunda el tejido conectivo interfolicular.	Rodríguez-Jaramillo <i>et al.</i> , 2008.

V.7. Análisis Cuantitativo

En relación a los análisis cuantitativos, cuando se determina la actividad reproductiva de bivalvos en acondicionamiento se obtienen datos precisos que permiten realizar comparaciones estadísticas. Se llevó el conteo de los organismos muertos de las unidades experimentales de cada tratamiento para determinar a sobrevivencia.

V.7.1. Frecuencia de Estadios de Desarrollo

Para evaluar las determinaciones de los estadios de maduración, el porcentaje de la frecuencia de fases de desarrollo gonádico de los organismos (Seed, 1976) fue considerado para hembras y machos de la almeja reina. En la cual se suma la frecuencia de especímenes según su grado de desarrollo gonadal.

$$[FI (a) + FII (b) + FIII (c) + FIV(d) + FV(e) + FVI (f)]$$

En donde FI= Frecuencia del estadio de indiferenciación, FII= Frecuencia del estadio de desarrollo prematuro (Previtelogénesis y/o Espermatogénesis temprana), FIII= Frecuencia del estadio de desarrollo avanzado (Vitelogénesis y/o Espermatogénesis avanzada), FIV= Frecuencia de estadio de madurez (Postvitelogénesis y/o Madurez), FV= Frecuencia de estadio de desove parcial, FVI= Frecuencia de estadio de postdesove.

V.7.2. Diámetro de ovocitos

Para la medición del diámetro teórico de los ovocitos, se utilizaron imágenes digitalizadas a 40x obtenidas de las preparaciones histológicas de hembras en estadio de Postvitelogénesis (Madurez) con la finalidad de evaluar el crecimiento de los ovocitos. En cada imagen se midieron 100 ovocitos con núcleo visible de tres zonas seleccionadas al azar de las preparaciones histológicas, siguiendo la fórmula propuesta por Saout *et al.*, 1999; Grant y Tyler, 1983 a,b; y Rodríguez-Jaramillo *et al.*, 2008.

$$DT = \sqrt{4A/\pi}$$

En donde A es el área de la gónada y $\pi = 3.1416$

V.8. Inducción al Desove

Al término de las 6 semanas de acondicionamiento, los organismos fueron inducidos al desove mediante la aplicación de dos técnicas: shock térmico y cambios de salinidad, las cuales son procedimientos estándar utilizados en el Centro Reproductor de Especies Marinas del Estado de Sonora (CREMES). Para llevar a cabo la evaluación de los estímulos se seleccionaron al azar 5 organismos de cada tratamiento (Figura 7). A continuación, se describen el procedimiento:

Técnica por shock térmico: Este consistió en calentar el agua de mar contenida en un recipiente de 20 L mediante el uso de un calentador de agua (ViaAqua Titanium Aquarium Heater, 300-Watt) para alcanzar un incremento de 10°C a la temperatura del agua de acondicionamiento de cada experimento. Así mismo en otro recipiente de 20L se dispuso de agua de mar disminuyendo en 5°C la temperatura del agua de acondicionamiento de cada experimento. Posteriormente se sumergieron los organismos en el recipiente con agua cálida por un lapso de 40 minutos; pasado este tiempo de manera continua se colocaron los organismos en el recipiente con agua fría por otro lapso de 40 minutos. Esta técnica fue aplicada de manera alternada (caliente-frío-caliente-frío) durante un periodo de 3 horas.

Técnica por cambios de salinidad: Para esta técnica se dispusieron dos recipientes de 20 L de agua dulce y otro de agua de mar (35ups). Se sumergieron cinco organismos en el recipiente de agua dulce por un lapso de 10 minutos; al transcurrir este tiempo de manera continua se sumergieron las almejas en el recipiente de agua de mar por el mismo lapso de 10 minutos. Esta técnica fue empleada de manera alternada durante un periodo de 2 horas. La temperatura de los recipientes se mantuvo de manera constante y estable a la temperatura de acondicionamiento de cada tratamiento. Por otro lado, también se aplicaron turnos de 15 minutos por un tiempo de 2 horas.



Figura 7. Inducción al desove de *D. ponderosa* por choque térmico.

V.9. Análisis Estadístico

Los datos obtenidos de la medición de los diámetros teóricos de los ovocitos, sobrevivencia, y frecuencia de fases de desarrollo se sometieron a pruebas de normalidad y homocedasticidad. Se realizó una ANDEVA de una vía utilizando un diseño de bloques aleatorios para detectar diferencias significativas en la sobrevivencia, los diámetros de los ovocitos y la frecuencia de fases de desarrollo gonádico en función de la dieta y temperatura. Los valores reportados como porcentajes fueron transformados a la función arcoseno. Se tomaron como diferencias significativas entre los tratamientos con valores de probabilidad $P < 0.05$ mediante pruebas de comparaciones múltiples de Duncan. Todos los análisis fueron realizados con el programa IBM SPSS Statistics versión 22.0.

VI. RESULTADOS

VI.1. Biometría y Proporción Sexual

Inicialmente se registraron las tallas de los organismos, en los cuales su altura varió entre 10.12 y 10.20 cm, una longitud entre 10.83 y 11.06cm, en cuanto al peso húmedo, se registraron valores entre 356.66 y 387.20 gramos. Se encontró una proporción sexual de las almejas similar para cada uno de los experimentos sin presentar diferencias significativas; con *Isochrysis* sp. (55% hembras y 45% machos), en *T. suecica* (60% hembras y 40% machos) y para *C. calcitrans* (57% hembras y 43% machos) (Tabla 3).

Tabla 3. Promedio y desviación estándar (\pm d.e.) de las tallas y proporción de sexos de *D. ponderosa*, para cada uno de los experimentos.

	Altura (cm)	Longitud (cm)	Peso (g)	Hembra (%)	Macho (%)
Experimento 1 (<i>Isochrysis</i> sp)	10.12 \pm 1.45	10.83 \pm 1.06	356.66 \pm 87.76	55	45
Experimento 2 (<i>Tetraselmis suecica</i>)	10.18 \pm 1.12	11.06 \pm 1.38	387.20 \pm 77.41	60	40
Experimento3 (<i>Chaetoceros calcitrans</i>)	10.20 \pm 1.39	10.96 \pm 1.37	371.68 \pm 89.42	57	43

VI.2. Sobrevivencia

Bajo las condiciones experimentales se obtuvieron diferencias significativas entre las temperaturas empleadas para cada uno de los tratamientos. La sobrevivencia fue mayor a 20°C (90%), en comparación a la temperatura de 30°C (29%) en el tratamiento de *T. suecica* (Figura 4). Con respecto a los tratamientos de *C. calcitrans* a 20 y 25°C se mantuvo la sobrevivencia a lo largo del periodo de acondicionamiento por arriba del 50%, sin embargo, fue menor en 30°C (37%). En el tratamiento de *Isochrysis* sp. se evaluó una gran mortalidad a la temperatura de 30°C antes de finalizar las 6 semanas del experimento, cabe destacar que para las otras temperaturas fue menor de 50% de sobrevivencia con respecto a esta dieta, 20°C (47%) y 25°C (18%) (Figura 8).

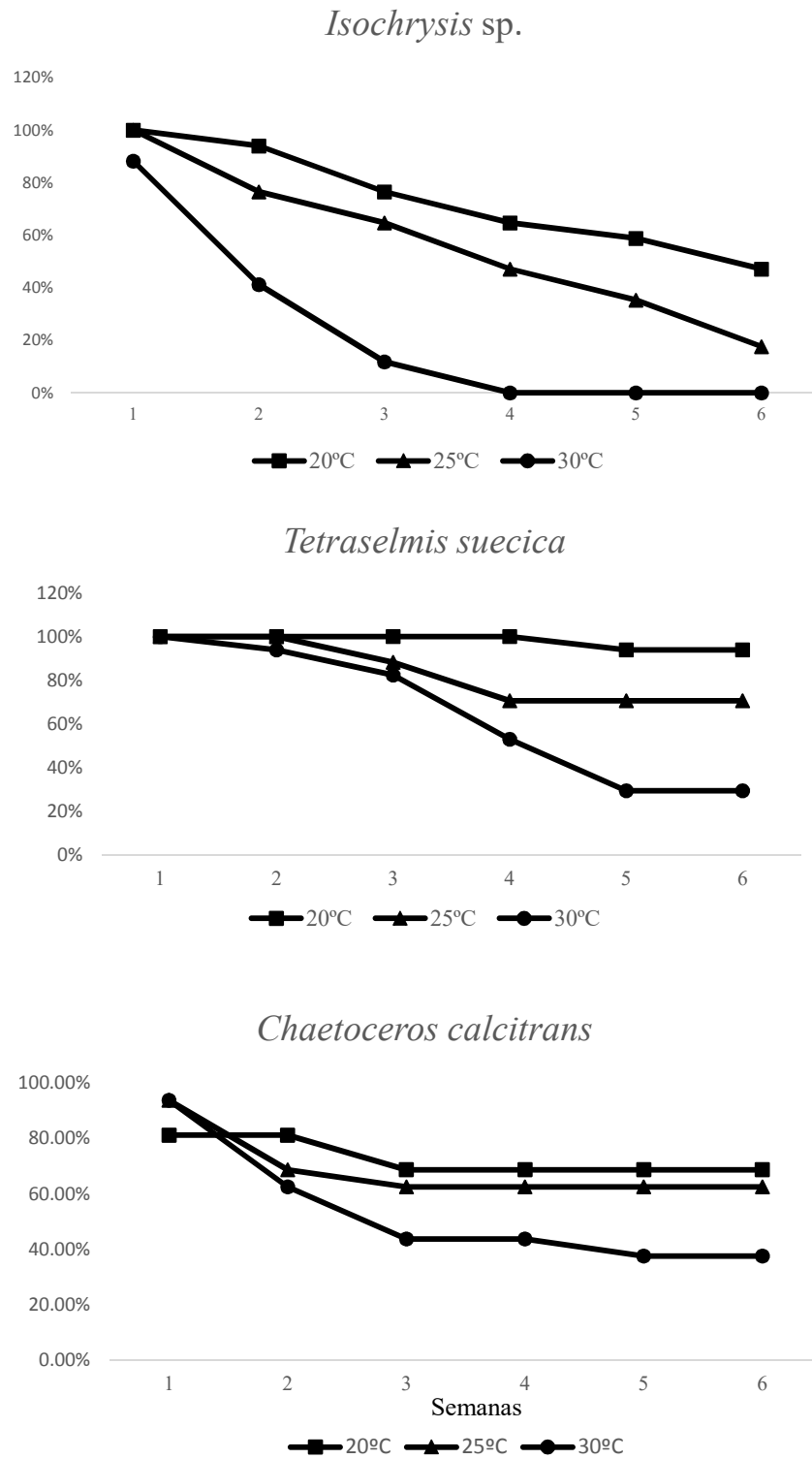


Figura 8. Supervivencia de *D. ponderosa* en función a la dieta y la temperatura durante un periodo de acondicionamiento gonádico de seis semanas.

VI. 3. Análisis Cualitativo y Cuantitativo de Histología

VI.3.1. Estadios y Frecuencia de Desarrollo Gonádico

La descripción de los estadios de desarrollo gonádico se encuentra resumida en la Tabla 1 para las hembras y en la Tabla 2 para los machos. Tanto al inicio, así como a los 22 y 44 días de acondicionamiento fue posible identificar los 6 estadios de desarrollo gonádico de reproducción de las hembras (Figura 9) y de los machos (Figura 10).

Al inicio del experimento las almejas colectadas del medio natural se encontraron indiferenciadas, para las hembras un (25 %) y para los machos (25 %); sin embargo, también se observaron hembras en estado de desove parcial (35%) y en postdesove (40%), por otro lado, en los machos se observó la presencia de organismos en estado de espermatogénesis (7%), desove parcial (20%) y en postdesove (48%) (Figura 11).

A los 22 días de acondicionamiento de hembras, se observaron organismos indiferenciados en el tratamiento de *Isochrysis* sp. a 25 y 30°C (9% y 3%). La mayor proporción de hembras en estadio de desove parcial se registró para *Isochrysis* sp. a 25°C (38%), seguido por *C. calcitrans* a 30°C (16%). Las almejas acondicionadas a la temperatura de 25°C presentaron un mayor desarrollo gonádico de madurez (65%) al suministrarles la dieta de *T. suecica*, seguido de *C. calcitrans* a 25°C (59%) y *T. suecica* a 20°C (58%); tanto la temperatura y dieta empleadas promovieron una maduración gonádica a la mitad del experimento. El estadio de hembras que se presentó en menor proporción de hembras maduras fue con *Isochrysis* sp. a 20, 25 y 30°C (15%, 17% y 19%) (Figura 11). El estadio de hembras maduras que dominó a los 44 días de acondicionamiento fue en *T. suecica* a 20 y 25°C (60% y 50%), la menor cantidad de organismos en fase de maduración correspondió a *Isochrysis* sp. a 20°C (22%) (Figura 11). Se observó la mayor proporción de organismos con desove parcial con *T. suecica* a 25°C (22%) y en *Isochrysis* sp. a 25°C (20%), por otro lado, los valores de menor proporción se registraron con *Isochrysis* sp. a 20°C (7%).

Se registraron machos a los 22 días de acondicionamiento indiferenciados en los tratamientos de *Isochrysis* sp. a 20 y 25°C (4% y 3%). El mayor número de machos en estadio de espermatogénesis avanzada que se registró fue en los tratamientos con *T. suecica* y *C. calcitrans* a 20°C (47% y 44%), la menor frecuencia se presentó en *C. calcitrans* a 25°C (22%).

Los estadios de madurez con una mayor proporción se registraron en *C. calcitrans* y *T. suecica* a 25°C (57% y 49%). El menor porcentaje de madurez se registró con *Isochrysis sp.* y *T. suecica* a 30°C (18% y 19%) (Figura 11). Con la dieta de *Isochrysis sp.* a 30°C se observó una alta frecuencia de organismos parcialmente desovados (30%), seguido de *T. suecica* a 30°C (22%) e *Isochrysis sp.* a 20°C (20%). A los 44 días de acondicionamiento la fase de espermatogénesis avanzada que se registraron mayor cantidad de organismos se registró en los bivalvos alimentados con *Isochrysis sp.* a 20°C (49%), *C. calcitrans* a 20°C, 30°C (44% y 40%) y *T. suecica* a 25°C, 30°C (40% y 43%). El estadio madurez donde se presentó con mayor porcentaje fue con la dieta de *C. calcitrans* a 25°C (44%), seguido de la dieta de *T. suecica* a 20°C (39%), sin embargo, la menor frecuencia del estadio de madurez se registró en el tratamiento de *Isochrysis sp.* a 25°C (23%) (Figura 11). Los únicos tratamientos que no se observaron organismos en postdesove fue en aquellos alimentados con *T. suecica* a 20°C e *Isochrysis sp.* a 25°C.

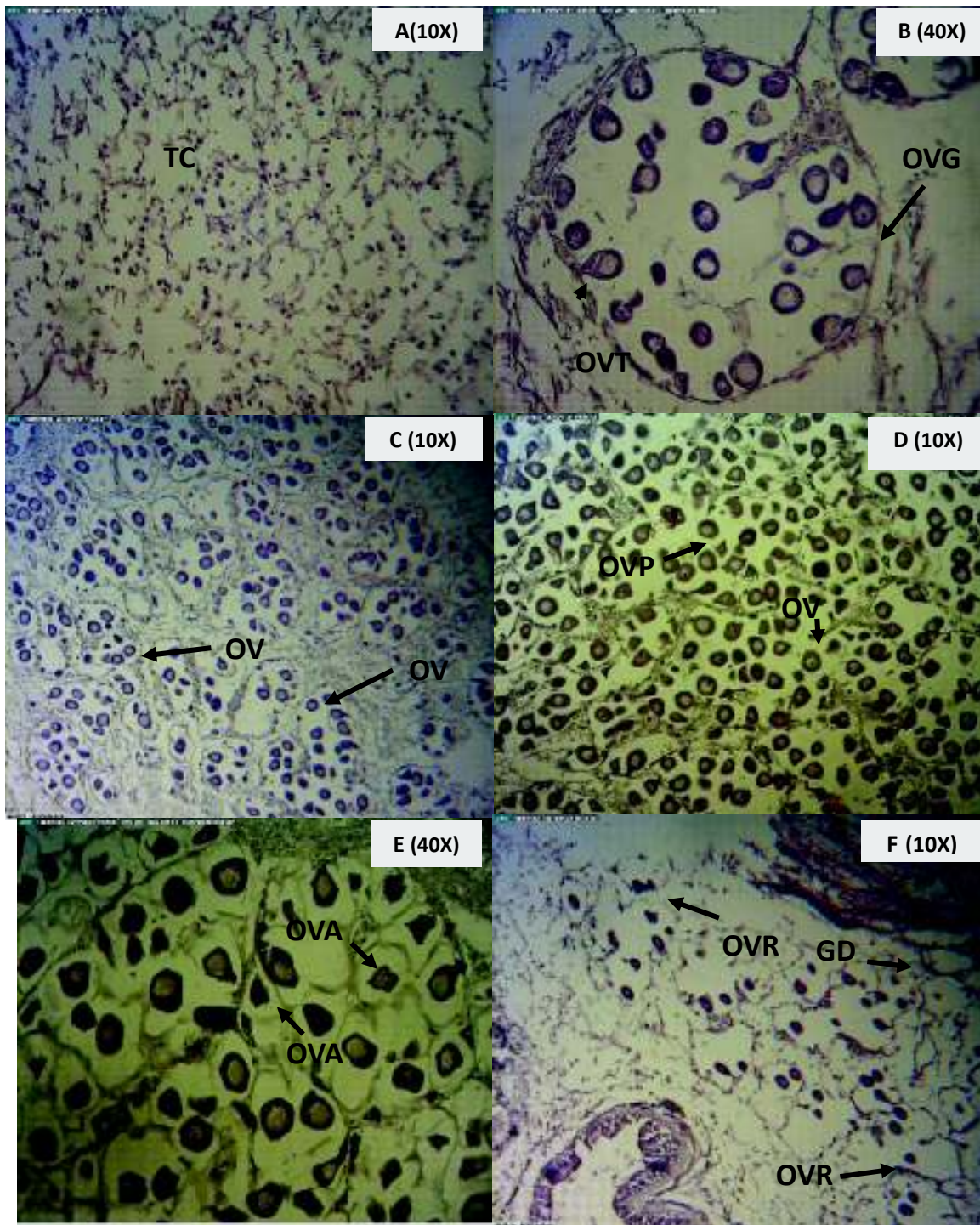


Figura 9. Estadios de desarrollo gonádico de hembras de *D. ponderosa* en función de la dieta y la temperatura. A) Indiferenciado, B) Previtelogénesis, C) Vitelogénesis, D) Postvitelogénesis, E) Desove Parcial, F) Postdesove. OVT. Ovocito vitelogénico temprano, OVG. Ovogonia, TC. Tejido conjuntivo, GD. Gonoducto, OV. Ovocito vitelogénico, OVP. Ovocito postvitelogénico, OVA. Ovocito atrésicos OVR. Ovocito residual.

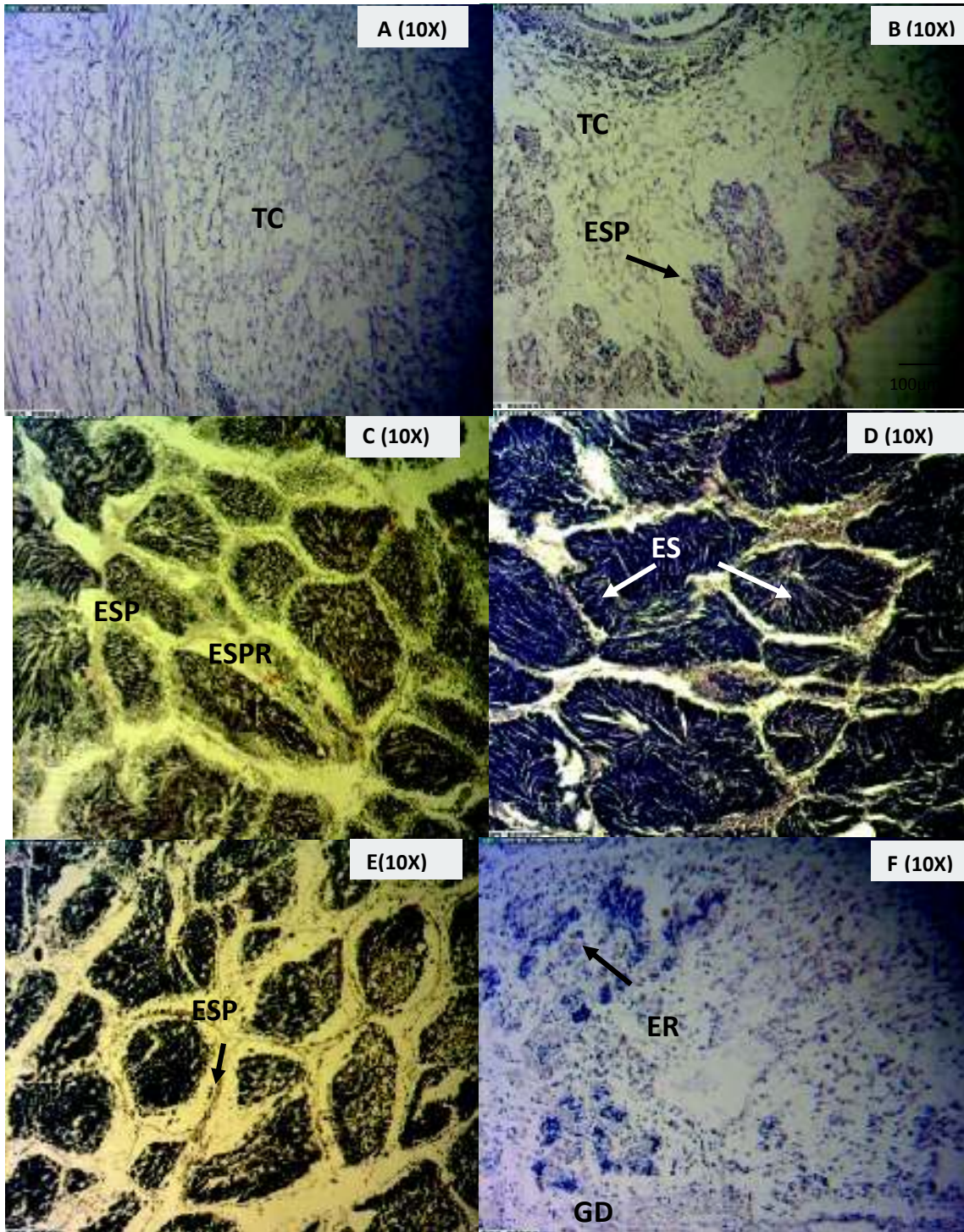


Figura 10. Estadios de desarrollo gonádico de machos de *D. ponderosa* en función de la dieta y la temperatura. A) Indiferenciado, B) Espermatogénesis, C) Espermatogénesis avanzada, D) Madurez, E) Desove parcial, F) Postdesove. TC. Tejido conjuntivo, GD. Gonoducto. OV. Ovocito vitelogénico, ESPR. Espermátidas, ESP. Espermatozoides, ER. Espermatozoides residuales.

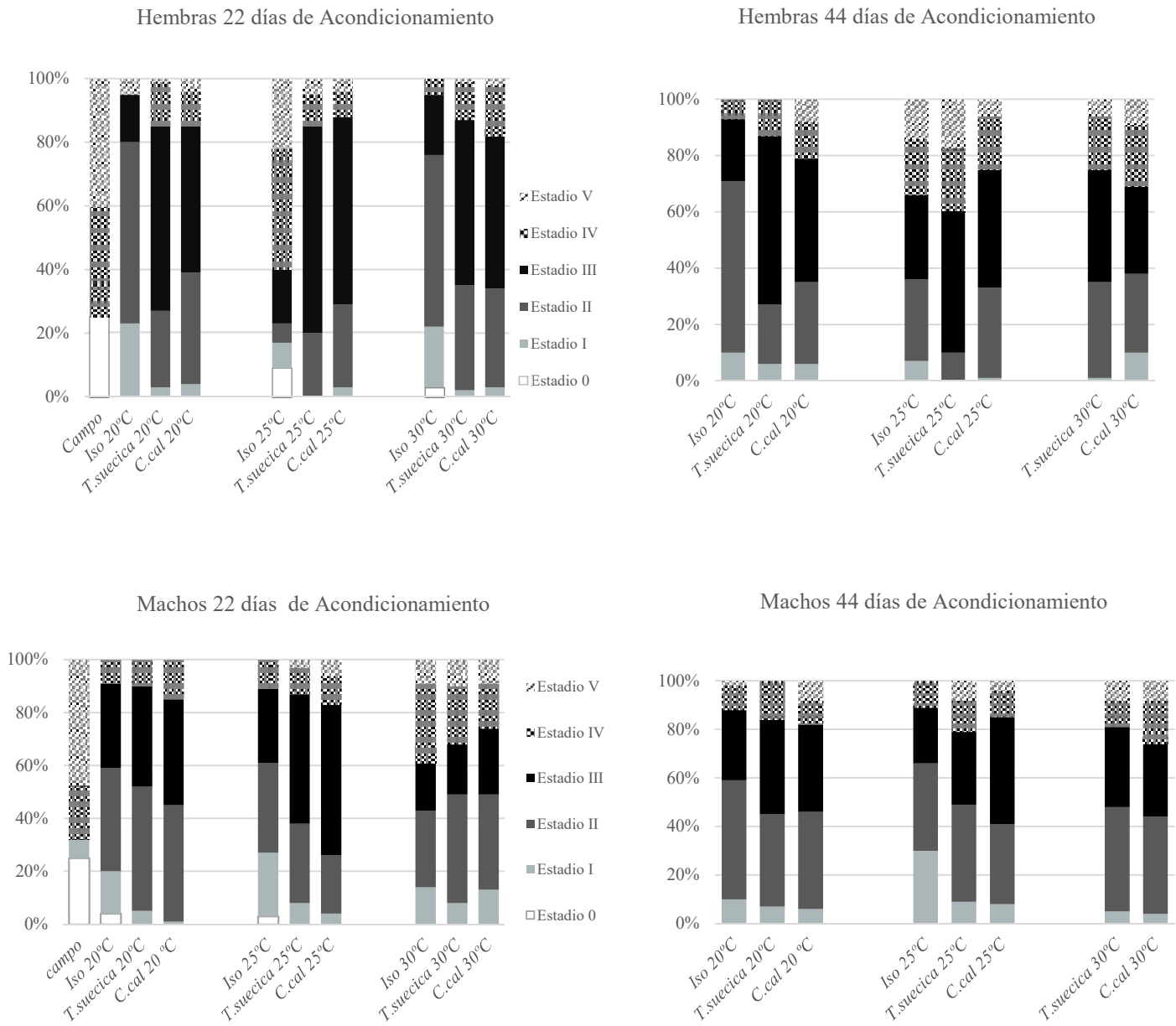


Figura 11. Frecuencia de fases de desarrollo gonádico de hembras y machos de *D. ponderosa*, sometidos a diferente dieta y temperatura.

VI.3.2. Diámetro Teórico de Ovocitos

En la Tabla 4, se presentan los resultados obtenidos del tamaño de los ovocitos con la dieta de *Isochrysis* sp. A los 22 días de acondicionamiento a una temperatura de 20°C mostró un valor significativamente menor ($P < 0.025$) del diámetro teórico de los ovocitos ($74.42 \mu\text{m}$) lo cual detonó una menor acumulación del vitelo en contraste con las almejas expuestas a las otras dos temperaturas.

El mayor valor del diámetro teórico de los ovocitos fue a una temperatura de 25°C ($76.75 \mu\text{m}$); sin embargo, no se observaron diferencias significativas con respecto a la temperatura de 30°C. Al concluir los 44 días de acondicionamiento el mayor valor de diámetro teórico de ovocito correspondió al tratamiento de 20°C ($77.50 \mu\text{m}$), aunque no fue significativamente diferente ($P > 0.189$) del valor obtenido bajo el tratamiento a 25°C.

De los datos obtenidos con la dieta de *Tetraselmis suecica* a los 22 días de acondicionamiento se encontraron diferencias significativas entre los diferentes niveles de temperatura ($P < 0.001$); la temperatura de 25°C incrementó significativamente mayor diámetro teórico de ovocitos ($81.96 \mu\text{m}$). Sin embargo, con la temperatura de 30°C se registró el menor valor ($77.30 \mu\text{m}$) (Tabla 5). Igualmente, a los 44 días de acondicionamiento el análisis de varianza realizado demostró que hubo diferencias significativas del diámetro teórico de los ovocitos entre los tratamientos ($P < 0.009$). En las hembras mantenidas a una temperatura de 30°C este valor fue estadísticamente menor ($76.64 \mu\text{m}$) en comparación con los registrados a 20°C ($80.94 \mu\text{m}$) y 25°C ($81.84 \mu\text{m}$).

Los valores registrados del diámetro teórico de los ovocitos de *D. ponderosa* con la dieta de *Chaetoceros calcitrans* se presentan en la Tabla 6. En el caso del acondicionamiento de 22 días, el diámetro teórico de los ovocitos a la temperatura de 20°C, registró un valor de $79.03 \mu\text{m}$, menor en comparación con las temperaturas de 25 y 30°C, el análisis estadístico reveló la significancia de estas diferencias ($P < 0.001$). Respecto a los 44 días del acondicionamiento los valores de los diámetros teóricos de ovocitos fueron similares entre las tres temperaturas; el análisis demostró que no hubo diferencias significativas ($P > 0.429$).

Tabla 4. Diámetro teórico de ovocitos de *D. ponderosa* alimentada con *Isochrysis* sp. bajo tres niveles temperaturas durante su período de acondicionamiento.

Efectos Principales	Diámetro Teórico (μm)	Diámetro Teórico (μm)
	22 Días	44 Días
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)		
20	74.42 ^a ±1.06	77.50±2.44
25	76.75 ^b ±0.95	76.42±0.83
30	75.70 ^c ±1.70	
Bloque		
B1	75.85±2.36	76.97±2.55
B2	75.65±1.18	76.00±1.60
B3	75.96±1.20	76.41±0.84
B4	75.03±1.37	78.46±1.47
ANOVA PR>F		
Bloque	.594	.209
Temperatura	0.025	.189

Los valores promedio de bloque son de 4 réplicas experimentales \pm desviación estándar. Los valores del efecto temperatura corresponden \pm desviación estándar de 4 réplicas Promedio de las columnas con la misma letra no son significativamente diferentes, análisis pos hoc de Duncan ($P>0.05$).

Tabla 5. Diámetro teórico de ovocitos de *D. ponderosa* alimentada con *Tetraselmis suecica* a tres niveles temperatura, al concluir su período de acondicionamiento gonádico.

Efectos principales	Diámetro teórico (μm) 22 días	Diámetro teórico (μm) 44 días
Temperatura (°C)		
20	80.73 ^a ±0.93	80.94 ^a ±1.15
25	81.96 ^b ±1.87	81.84 ^a ±2.85
30	77.30 ^c ±0.46	76.64 ^b ±1.27
Bloque		
B1	79.41±2.39	80.89±3.41
B2	80.40±2.65	78.24±3.07
B3	80.01±2.32	80.08±3.39
B4	80.16±2.23	79.02±1.81
Anova Pr>F		
Bloque	0.660	0.537
Temperatura	0.001	0.009

Los valores promedio de bloque son de 4 réplicas experimentales \pm desviación estándar. Los valores del efecto temperatura corresponden \pm desviación estándar de 4 réplicas Promedio de las columnas con la misma letra no son significativamente diferentes, análisis pos hoc de Duncan ($P>0.05$).

Tabla 6. Diámetro teórico de ovocitos de *D. ponderosa* en función a la dieta (*Chaetoceros calcitrans*) a tres niveles temperatura, al concluir su período de acondicionamiento gonádico.

Efectos principales	Diámetro teórico (μm) 22 días	Diámetro teórico (μm) 44 días
Temperatura (°C)		
20	79.03 ^a ±1.22	78.62 ^a ±1.44
25	81.49 ^b ±1.44	79.82 ^a ±1.03
30	81.05 ^b ±0.76	79.32 ^a ±2.85
Bloque		
B1	81.13±1.73	78.69±2.67
B2	80.72±1.67	78.84±1.90
B3	79.84±1.10	80.36±1.30
B4	80.40±1.68	79.13±1.48
Anova Pr>F		
Bloque	0.081	0.398
Temperatura	0.001	0.429

Los valores promedio de bloque son de 4 réplicas experimentales \pm desviación estándar. Los valores del efecto temperatura corresponden \pm desviación estándar de 4 réplicas Promedio de las columnas con la misma letra no son significativamente diferentes, análisis pos hoc de Duncan ($P>0.05$).

VII. DISCUSIÓN

En la mayoría de los bivalvos, la madurez sexual depende del tamaño del animal más que de su edad, y el tamaño que alcanzan en la madurez sexual varía de una especie a otra y según la distribución geográfica. La producción de óvulos y esperma es un proceso denominado gametogénesis, cuyo inicio es consecuencia de varios factores, como la talla del bivalvo, la temperatura y la calidad y cantidad de alimento que recibe (Helm *et al.*, 2006). Se ha reportado que las variables de temperatura y disponibilidad de alimento en el medio natural tienden a ciertas fluctuaciones a lo largo del año, es por ello que ambas guardan una estrecha relación con la fisiología reproductiva de organismos reproductores (Barber y Blake, 1991). La madurez sexual de *D. ponderosa* depende en gran medida del rango anual de temperaturas características del Golfo de California, las cuales varían entre los 18 a 32°C (Arreola-Hernández, 1997).

Algunos estudios realizados en localidades cercanas a Sonora, México, con bivalvos Veneridae como *C. californiensis*, *C. fluctifraga*, *M. squalida*, muestran comportamientos relativamente similares que *D. ponderosa*, coincidiendo aproximadamente con el inicio de los estadios de gametogénesis, de madurez sexual y desove en el medio natural (Martínez-Córdova, 1988; García-Domínguez *et al.*, 1993; Villalejo-Fuerte *et al.*, 2000). También en el medio natural, se ha documentado que los moluscos bivalvos durante el periodo de bajas temperaturas tienden a almacenar reservas nutricionales y energéticas en la masa visceral, así como en los músculos abductores, las cuales utilizan para iniciar el proceso de la gametogénesis cuando comienza la temporada de temperaturas cálidas (Baqueiro-Cárdenas & Aldana-Arana, 2000; Maeda-Martínez, 2002). Bajo condiciones de laboratorio, en varios trabajos realizados con bivalvos se ha demostrado que empleando temperaturas estables y proporcionando dietas adecuadas de microalga, se obtiene una madurez gonádica y un acelerado desarrollo gametogénico (Sastry, 1963; Sastry, 1968; Chávez-Villalba *et al.*, 2002; Rodríguez-Jaramillo, 2004). Así, el mantener una temperatura constante y estable otorga a que la energía de los organismos sea utilizada para su reproducción y evita que se desvíe a otros procesos fisiológicos (Rodríguez-Jaramillo, 2004; Sicard *et al.*, 2006; López-Sánchez *et al.*, 2009).

En el medio natural existen gran cantidad de especies de microalgas y partículas que son adquiridas como alimento por los bivalvos (Gosling, 2008). En el acondicionamiento de los bivalvos es fundamental documentar los requerimientos nutricionales utilizando dietas de microalgas, ya que juegan un papel muy importante en la obtención de óptimos resultados para la maduración gonadal de los reproductores en cautiverio (Helm *et al.*, 2006). Por otra parte, para asegurar el óptimo aprovechamiento del alimento por los moluscos bivalvos, es esencial elegir la cantidad y la calidad de la dieta de microalgal ya que es importante para que los organismos obtengan los nutrientes y reservas energéticas necesario para asegurar el éxito en la etapa de maduración (Sastry, 1968; Sastry, 1970; Gallager y Mann, 1986).

Sin embargo, cuando los bivalvos son alimentados con gran cantidad de células de microalgas, aunque estos tiendan a engordar y el incremento en el peso se vea reflejado en el peso húmedo y de la masa visceral, en el caso del tejido gonadal no necesariamente tendrá un impacto positivo ya que puede no cubrir la demanda de requerimientos nutricionales para el proceso de gametogénesis que conlleva a la maduración sexual y a la producción de gametos viables. Al respecto, se tiene evidencia que el suministrar gran cantidad de alimento fomenta a que los bivalvos produzcan pseudoheces indicando a su vez un bajo aprovechamiento de nutrientes esenciales para el desarrollo de tejido gonádico.

En el presente estudio se utilizó una ración de alimento de 100,000 céls/mL para cada una de las dietas empleadas en los experimentos, debido a que se desconoce por completo la ración y requerimientos óptimos de alimento para el crecimiento, reproducción y acondicionamiento gonadal de *D. ponderosa* mantenidos bajo condiciones de laboratorio. La concentración de microalgas ofrecidas a los reproductores se determinó también atendiendo las recomendaciones de Ramos-Corella *et al.*, (2014) para *D. ponderosa* de acuerdo a su capacidad filtradora, ello con la finalidad de evitar que la almeja produjera pseudoheces y favoreciera así un mejor aprovechamiento de los nutrientes de cada una de las dietas suministradas.

En la selección de las microalgas utilizadas como alimento para organismos reproductores, el contenido de ácidos grasos (lípidos), en especial al ácido eicosapentaenoico (EPA) es de gran importancia (Brown y Blackburn, 2013). Aunque el contenido de ácidos grasos no se analizó en este estudio, el EPA en moluscos bivalvos está vinculado con la

maduración sexual de reproductores (Sünhel *et al.*, 2012), la tasa de crecimiento, (Leonardos y Lucas, 2000) y la sobrevivencia (Sünhel *et al.*, 2012). Algunos autores como Soudant *et al.*, 1996 y Martínez-Pita *et al.*, 2014, han sugerido que el ácido graso EPA en moluscos está vinculado a las reservas energéticas para la gametogénesis (fuente de energía); además su máximo contenido está relacionado a funciones específicas mediadas por algunos fosfolípidos de membranas (Hall *et al.*, 2002).

Se han empleado varios métodos en los bivalvos para determinar el momento en que los bivalvos alcanzan la madurez y están listos para desovar. Es frecuente el empleo de índices gonadales, que expresan la proporción de peso de la gónada con respecto al peso total del animal. Consiste en disectar la gónada y posteriormente pesarla, sin embargo, cuando la gónada recubre también glándula digestiva es complicado realizarlo (Maeda-Martínez, 2002). Con lo anterior, Luna-González, 1997, considera que los índices gonadosomáticos no son completamente fiables debido a la acumulación de agua en las gónadas en desove; además, indica el grado de desarrollo del ciclo gametogénico en el que se encuentra la gónada en términos porcentuales o de peso, mas no el grado de madurez de los gametos. El método más preciso consiste en hacer cortes histológicos de la gónada (Howard y Smith, 1983). Existe amplia información en trabajos de investigación la cual respalda que la técnica clásica de histología que mayormente se utiliza es con la tinción de Hematoxilina – Eosina la cual se emplea para identificar cualitativamente las fases de desarrollo gonadal de moluscos bivalvos (Humason, 1962). Así mismo, para darle fortaleza al análisis cualitativo de la histología, es importante realizar análisis complementarios, tales como la cuantificación de ciertos índices que evalúan el desarrollo gonadal durante el tiempo de acondicionamiento estudiado o establecido para los bivalvos reproductores (Rodríguez-Jaramillo, 2004). El diámetro teórico de los ovocitos y las frecuencias de fases de desarrollo gonádico son importantes indicadores que en conjunto determinan la madurez sexual en el que se encuentran los organismos (Lango-Reynoso *et al.*, 2000; Rodríguez-Jaramillo, 2008).

Los resultados de los análisis histológicos demuestran que el presente bioensayo con reproductores de *D. ponderosa* que se encontraban con una alta frecuencia de estadios de postdesove, y en desove parcial con la finalidad de obtener éxito en su madurez sexual. Cabe mencionar que lo anterior concuerda con Matías *et al.* (2009), quienes reportan que el acondicionamiento requerido para llevar a un organismo reproductor a la etapa óptima de

desarrollo gonadal depende de la etapa de desarrollo gonadal al comienzo del acondicionamiento. En el presente estudio se logró obtener organismos maduros en un lapso de tiempo similar en comparación con otros organismos; así como en estudios con *C. gigas* donde se determinó que a temperaturas entre 16 y 22°C se acelera el crecimiento de los ovocitos, detectando los primeros ovocitos maduros luego de 27 días a 16°C, 23 días a 19°C, 19 días a 22°C y 22 días a 25°C (Chávez-Villalba *et al.*, 2002a).

Arreola-Hernández (1997), para *D. ponderosa* reporta dos picos de maduración en el medio natural en las estaciones de primavera-verano, de los cuales el más importante fue en abril ya que el crecimiento de la gónada y la formación de gametos ocurre a una temperatura de 20.5°C, identificando valores máximos de diámetro promedio mensual de ovocitos de 57µm. Esas tallas son menores a las registradas en los organismos acondicionados en el laboratorio bajo las condiciones experimentales de la presente investigación, demostrándose que el efecto de la temperatura y la dieta monoalgal repercute favorablemente en el diámetro de los ovocitos de los reproductores bajo los tratamientos evaluados. No obstante, esa marcada diferencia del diámetro de los ovocitos reportados por Arreola-Hernández, (1997); es probablemente que se deba a que su estudio fue realizado en Bahía Concepción en Baja California, por lo que se asume que el patrón reproductivo de *D. ponderosa* puede variar en las poblaciones separadas geográficamente y presentar diferencias en la gametogénesis.

El acondicionamiento con la dieta de *Isochrysis* sp. se presentó a lo largo de las seis semanas una alta mortalidad, registrando la menor frecuencia de madurez en hembras y machos, y a su vez se obtuvieron los menores diámetros teóricos de ovocitos (74 µm) en hembras, por ello se puede aludir que los reproductores no obtuvieron una cantidad necesaria de ácidos grasos tanto para su crecimiento como para la gametogénesis, considerando que *Isochrysis* contiene una baja cantidad de EPA (pero alto en DHA) (Hendriks *et al.*, 2003). Velasco y Barros, 2007, observaron un nulo progreso en la madurez gonadal para *Argopecten nucleus* y *Nodipecten noclosus* acondicionados con una dieta compuesta por *Isochrysis galbana*; el cual fue atribuido al bajo nivel de EPA de la microalga. Por otro lado, la menor sobrevivencia y el menor diámetro de los ovocitos de los organismos alimentados con *Isochrysis* puede atribuirse que fue una dieta pobre debido al pequeño tamaño de la microalga, 6µm, lo cual se traduce en una menor cantidad de alimento (menor biomasa), en comparación con las otras dos dietas, dado que la alimentación se basó en un igual número

de células por mililitro en todas las dietas. Lo anterior pudo haber repercutido en el tamaño de los ovocitos y en una disminución de la velocidad de la vitelogénesis, que, si se estaba llevando a cabo en organismos, ya que, en conjunto, los estadios previtelogénicos, vitelogénicos y de madurez, conformaron casi siempre más del 70% del total de los estadios. La menor frecuencia de estos estadios en el tratamiento de 25°C a los 22 días de acondicionamiento puede ser precisamente el resultado de una lenta vitelogénesis. Una situación similar pudo observarse en los machos. Aunado a lo anterior, al parecer la alimentación no compensó el mayor gasto energético provocado por la más alta temperatura afectando así la sobrevivencia de los organismos.

En contraste, los organismos alimentados con *T. suecica*, tuvieron una alta sobrevivencia y presentaron un buen desarrollo gonadal avanzado con altas frecuencias de organismos maduros. Las hembras de dicho tratamiento a una temperatura de 25°C presentaron a los 22 días de acondicionamiento el mayor diámetro teórico de sus ovocitos (81.96 µm). Lo anterior concuerda con los resultados de Encinas-Arzate, 2015, quien obtuvo una alta tasa de filtración con la dieta de *T. suecica* en fresco; asimismo debido al tamaño de la célula microalgal (14 µm) (Muller-Feuga *et al.*, 2003 a, b), se demuestra que como dieta puede contribuir a cubrir los requerimientos nutricionales durante el proceso de maduración en esta especie.

Respecto a los organismos alimentados con *C. calcitrans*, se evidenció un aumento del diámetro de los ovocitos (81.49 µm) a la temperatura de 25°C, así como una alta proporción de organismos en estadio de maduración tanto de hembras y machos. Lo anterior concuerda con el trabajo previo de González-Vega, 2016, quien reporta que la dieta de *Chaetoceros muelleri* cultivada en fase estacionaria y fase exponencial como alimento para *D. ponderosa*, aportó un alto contenido de lípidos, según el análisis proximal de las gónadas (38.95% y 36.99%, respectivamente); en contraste, la aportación de lípidos a las gónadas por *Isochrysis* sp. fue menor en contenido de lípidos en las gónadas, tanto en la fase estacionaria (8.32%) como en la fase exponencial (25.24%). En base a lo anterior es evidente que la cantidad de ácidos grasos de *Chaetoceros* sp. son bien aprovechadas por *D. ponderosa* para la formación y acumulación directa de lípidos de reserva para el proceso de su maduración gonadal. Cabe señalar que, por otra parte, en nuestro caso, las temperaturas utilizadas de 25 y 30°C ayudaron

a acelerar el proceso de desarrollo gonádico de los organismos obteniendo a 22 días de acondicionamiento de organismos completamente maduros.

En la presente investigación se observó un incremento del tamaño de los ovocitos de cada una de las dietas experimentales a 25°C con respecto a la temperatura de 20°C, lo cual puede relacionarse con el estudio de Villalejo-Fuerte y Ceballos Vázquez (1996) quienes declararon que el empleo de una baja temperatura, influye en el ciclo gametogénico ya que su disminución favorece en el transporte de sustancias de reservas que van desde el músculo abductor hasta el tejido gonadal.

Por otro lado, el aumento de temperatura puede implicar un bajo crecimiento de los ovocitos y su vez una reducción o nula maduración de los moluscos bivalvos (Rodríguez-Jaramillo, 2004). Lo anterior se hace referencia a la temperatura de 30°C para hembras y machos empleada para cada una de las dietas del presente bioensayo, en donde efectivamente se observó tanto un drástico, así como un bajo rendimiento en el crecimiento de los gametos de los organismos, tomando en cuenta que es probable que esto se debió posiblemente a que *D. ponderosa* llegó a su máxima temperatura límite de tolerancia.

En los tratamientos de *C. calcitrans* y *T. suecica* con las temperaturas de 25 y 30°C, a los 44 días de acondicionamiento se observó la disminución del diámetro de los ovocitos en contraste a las medidas obtenidas a los 22 días. Además, se identificaron ovocitos atrésicos, los cuales son ovocitos que han detenido su desarrollo y que se encuentran en reabsorción, de lo cual puede ocurrir cuando las condiciones del medio no son favorables para la maduración o cuando los organismos se encuentran estresados. Por otro lado, también se asocia a la frecuencia de organismos en desove parcial y postdesove en los tratamientos mencionados. Al igual que en las hembras, en los machos también se presentaron durante el tiempo de acondicionamiento estadios de desove parcial y postdesove en machos también se presentaron durante el tiempo de acondicionamiento al igual que las hembras de los tres experimentos evaluados; sin embargo, esto no fueron detectadas las incipientes ocurrencias de desoves en las unidades experimentales, así mismo es probable que también tenga relación con el grado de estrés que se manifestaron los organismos a las condiciones del cultivo. Es importante incluir que en otros experimentos llevados a cabo en el mismo laboratorio de la presente investigación y bajo condiciones similares han ocurrido desoves espontáneos

documentado por Gutiérrez-Reyes, 2015, cuando trabajó evaluando tasa de filtración de *D. ponderosa* a diferentes temperaturas; así mismo, González-Vega, 2016, durante su bioensayo en el establecimiento de los parámetros de calidad y valor nutritivo de gónada de *D. ponderosa*.

Dada la naturaleza de la presente investigación, los resultados de la inducción al desove son preliminares, ya que no existen reportes de desoves de *D. ponderosa* bajo condiciones de laboratorio. Al término de las seis semanas de acondicionamiento, *D. ponderosa* no mostró una conducta favorable en cuanto a la inducción al desove de los tres experimentos, los cuales cada uno se sometieron a las técnicas estandarizadas de shock térmico de temperatura y los cambios de salinidad. Uno de los motivos por los cuales *D. ponderosa* no presentó emisiones de gametos bajo las condiciones establecidas de los experimentos, se debe al grado de madurez que presentaban los organismos al momento de realizar dicho proceso. Por otra parte, probablemente debido el mismo estrés fisiológico por el cual estuvieron expuestos los organismos, no fueron susceptibles a los estímulos aplicados. Cabe resaltar que al realizar la técnica de cambios de salinidad se notó que los organismos resultaron ser intolerables a la reducción de salinidad ya que como consecuencia se observó el cierre total de las valvas de manera hermética por lo que el cambio brusco de salinidad no interactuó para que se expresara el desove. Sin embargo, hubo una mortalidad del 100 % de los especímenes a las 48 horas después de haberlos sometido con la técnica del shock térmico y a las 32 horas con los cambios de salinidad. Cabe mencionar que es necesario dar continuación a estos estudios relacionados a la inducción al desove de esta especie ya que es necesario conocer si realmente el desove es regulado por factores endógenos o a su vez por la combinación de factores exógenos. Galtsoff (1938); Loosanoff y Davis (1963), reportan que para algunos casos la termo- estimulación sola no es capaz de inducir el desove a bivalvos, por lo que más bien requieren de una estimulación adicional para que se desencadene el desove como es la adición de gametos en pequeñas cantidades extraídas de las gónadas de organismos maduros de la misma especie. Por otro lado, también una mezcla de microalgas puede ayudar a que el desove se lleve a cabo con mayor eficiencia, debido a que una mezcla aportaría diferentes tipos y cantidades de ácidos grasos necesarios para la formación de ovocitos y a su vez podría asegurar que el desove se lleve a cabo con éxito y a incrementar la sobrevivencia de las larvas. Es necesario enfatizar, que en otro estudio

(Gallager y Mann, 1986) la suplementación de ácidos grasos insaturados provocó un efecto positivo sobre el éxito de desoves, sin embargo, es probable que suministrando un suplemento de lípidos en la dieta de *D. ponderosa* se pueda dar un apropiado desove en laboratorio; ya que la suplementación lipídica no solo es importante desde el punto de vista energético, sino que también porque estos proveen ácidos grasos esenciales para la síntesis de tejido. Maeda-Martínez (2002), documenta que los animales madurados en el laboratorio son frecuentes que no desoven al aplicar un estímulo inductor, a pesar de que las gónadas parezcan maduras y se encuentren en el periodo natural de desove.

De acuerdo a los resultados obtenidos, *D. ponderosa* es capaz de adaptarse bajo condiciones de laboratorio, y lograr una buena sobrevivencia y maduración gonadal con el manejo de las condiciones ambientales como son la temperatura y la alimentación. Se asume que la temperatura óptima de acondicionamiento gonadal de *D. ponderosa* es entre 20-25°C, con ello se determina que ayuda al crecimiento de ovocitos para la fase de vitelogénesis y además de la transmisión de nutrientes necesarios con la dieta empleada de *Tetraselmis suecica* y *C. calcitrans*. Es evidente que, bajo las condiciones experimentales del presente estudio, los resultados aportan información esencial para registrar los tratamientos más viables que promovieron el acondicionamiento y maduración de esta especie, logrando un primer avance de información para futuras investigaciones.

VIII. CONCLUSIONES

- *D. ponderosa* es capaz de adaptarse a las condiciones de laboratorio.
- Los resultados obtenidos sugieren que la temperatura óptima de acondicionamiento gonadal de *D. ponderosa* es entre 20 y 25°C, la cual favorece el crecimiento de los ovocitos hasta lograr la fase de maduración.
- La dieta de *Isochrysis* sp. a 30°C, no cubrió las demandas energéticas de los organismos durante el periodo del bioensayo, lo cual se vio reflejado en la baja sobrevivencia y el menor diámetro de los ovocitos.
- Los resultados de esta investigación aportan información esencial para registrar los tratamientos más viables que promueven el acondicionamiento y maduración de esta especie; logrando un avance de información para futuras investigaciones

IX. RECOMENDACIONES

- Es necesario realizar estos experimentos considerando la biomasa de las microalgas ofrecidas como alimento.
- Es necesario continuar con futuras investigaciones realizadas en condiciones de laboratorio relacionadas con la reproducción y desove de *D. ponderosa*, mediante el suministro de dietas natural/artificial, combinaciones de microalgas y emulsiones lipídicas.
- Realizar un análisis histoquímico, composición proximal de tejido digestivo, gonadal, manto y músculo abductor además de evaluar otro rango de temperaturas
- Realizar tinciones histológicas con Black Sudan para evidenciar la proporción de lípidos en los ovocitos.
- Evaluar otros métodos de inducción al desove como inyección de serotonina, peróxido de hidrogeno, exposición a rayos UV, desecación. Así mismo, realizar estudios en función a la combinación de los mencionados métodos.

X. LITERATURA CITADA

- Alfaro, C.A., Jeffs, A. G. y Hooker, S. H., 2001. Reproductive behavior of the Green-lipped mussel, *Perna canaliculus*, in Northern New Zeland. Bulletin of Marine Science, 69: 1095-1108.
- Arreola-Hernández, J. F. 1997. Aspectos reproductivos de *Dosinia ponderosa*, Gray 1838 (Bivalvia: Veneridae) en Punta Arena, Bahía Concepción, B. C. S. Tesis de Maestría, CICIMAR, La Paz, B. C. S. 85
- Arizpe-Covarrubias, O. (1992). Los moluscos y su importancia comercial en el Pacífico Mexicano. Libros Universitarios 1, Serie Didáctica. La Paz. Universidad Autónoma de Baja California Sur.
- Avilés, A., Muciño, O. 1988. Acondicionamiento gonádico y desove de *Argopecten circularis* (Sowerby, 1835) en condiciones de laboratorio. Rev. Lat. Acui. Lima 38(13):1-120.
- Barber, B. J., Blake, N. J. (1991). Reproductive Physiology. En: Shumway, S.E. (Ed). Scallops: Biology, Ecology and Aquaculture. (pp. 377-428). Amsterdam Elsevier.
- Baqueiro-Cárdenas, E. R. 2014. Spawning: Biology, sexual strategies and ecological effects. New York: Novinka.
- Baqueiro, C. E., Masso, J. A., Guajardo, H. 1982. Distribución y Abundancia de Moluscos de Importancia Comercial en Baja California Sur. Serie de Divulgación No. 11. México: Secretaria de Pesca.
- Baqueiro-Cárdenas, E., Stuardo, J. 1977. Observaciones sobre la biología, ecología y explotación de *Megapitaria aurantiaca* (Sowerby, 1831), *M. squalida* (Sowerby, 1835) y *Dosinia ponderosa* (Gray, 1838) (Bivalvia; Veneridae) de la Bahía de Zihuatanejo e Isla de Ixtapa, Guerrero, México. Anales del Centro de Ciencias del Mar y Limnología 4: 161–208.
- Baqueiro-Cárdenas, E. 1979. Sobre la distribución de *Megapitaria aurantiaca* (Sowerby 1831), *M. squalida* (Sowerby 1835) y *Dosinia ponderosa* (Gray 1838) en relación a la granulometría del sedimento (Bivalvia: Veneridae): Nota científica. *Anuales del Centro de Ciencias del Mar y Limnología* 6: 25–32.
- Baqueiro-Cárdenas, E., Aldana-Arana, D. 2000. A review of reproductive patterns of bivalve mollusks from México. Bull. Mar. Sci., 66:13-27.

- Brenko, M. H., Calabrese, A., 1969. The combined effects of salinity and temperature on larvae of the mussel *Mytilus edulis*. *Marine Biology* 4, 224-226.
- 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.
- Brown, M. R. y Blackburn, S. I. 2013. Chapter 4: Live microalgae as feeds in aquaculture hatcheries. Allan Geoff & Burnell Gavin (ed.). *Advances in aquaculture hatchery technology*. Woodhead Publishing Series in Food Science, Tech. Nutr. 117-156 pp
- Castillo-Rodríguez, Z.G. 2009. Moluscos de interés alimenticio en México. *Noticiario de la Sociedad Española de Malacología* 53:39-41.
- Chávez-Villalba, J., Pommier, J., Andriamiseza, J., Pouvreau, S., Barret, J., Cochard, J. C., y Le Penec, M., 2002a. 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., Le Penec, M. 2002b. Autumn conditioning of the oyster *Crassostrea gigas*: a new approach. *Aquaculture*. 210(1- 4): 171-186.110.
- Encinas-Arzate, J. J., 2015. Evaluación fisiológica alimentaria y balance energético de *Dosinia ponderosa* alimentada con microalgas frescas y criopreservadas. Tesis de Maestría Biociencias Universidad de Sonora. Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas. Hermosillo, Sonora, México.
- Fabioux, C., Huvet, A., Le Souchu, P., Le Penec, M., 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.
- Flores-Vergara, C., Cordero-Esquivel, B., Cerón-Ortiz, A. N., Arredondo-Vega, B. O. 2004. Combined effects of temperature and diet on growth and biochemical composition of

- the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) spat. *Aquaculture Research*. 35. 1131-1140.
- Gallager, S. M., 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.
- Galtsoff, P. S. (1938). Physiology of reproduction of *Ostrea virginica* I. spawning reactions of the female and male. *The Biological Bulletin*, 74(3), 461-486.
- García-Domínguez, F. A. 2002. Estrategias reproductivas de bivalvos marinos en el Noroeste Mexicano, Tesis de Doctorado. Facultad de medicina veterinaria y zootecnia. Universidad de Colima, Colima, Col., México.
- García-Domínguez F., García-Melgar, G., y González-Ramírez, P. 1993. Ciclo Reproductivo de la almeja roñosa, *Chione californiensis* (Broderip, 1835), en Bahía Magdalena, Baja California Sur, México. *Ciencias Marinas*, 19(1): 15-28.
- González-Vega, R. I., 2016. Avances en el establecimiento de un cultivo acuícola para la almeja reina *Dosinia ponderosa* (Gray, 1838): Calidad y producción gonadal. Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad de Sonora. Departamento de Investigación y posgrado en Alimentos. Hermosillo, Sonora, México.
- Gosling, E. 2008. Bivalve molluscs: biology, ecology and culture. John Wiley & Sons.
- Grant, A. y Tyler, P. A. 1983 (a). The analysis of data in studies of invertebrate reproduction. 1. Introduction and statistical analysis of gonad indices and maturity indices. *International Journal of Invertebrate Reproduction* 6. 259-269.
- Grant, A. y Tyler, P. A. 1983 (b). The analysis of data in studies of invertebrate reproduction. II. The analysis of oocyte size/frecuency data, and comparison of different types of data. *International Journal of Invertebrate Reproduction* 6: 271-283.
- Guillard, R. R., y Ryther, J. H. 1962. Studies of marine planktonic diatoms: I. *Cyclotella nana* (Hustedt), and *Detonula confervacea* (CLEVE) Gran. *Canadian Journal of Microbiology*, 8 (2), 229-239.
- Gutiérrez-Reyes, S. 2015. Efecto de la temperatura (°C) sobre la capacidad biofiltradora y balance energético de *Dosinia ponderosa* (Gray, 1838) de áreas impactadas y no impactadas por efluentes acuícolas. Tesis de Licenciatura. Universidad de Sonora.

- Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas. Hermosillo, Sonora, México.
- Hall, J. M., Parrish, C.C., Thompson, R.J. 2002. Eicosapentaenoic Acid Regulates Scallop (*Placopecten magellanicus*) Membrane Fluidity in Response to Cold. *Biol. Bull.* 202:201-203.
- Hendriks, I. E., Van Duren, L. A., y Herman, P. M. 2003. Effect of dietary polyunsaturated fatty acids on reproductive output and larval growth of bivalves. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 296(2), 199-213.
- Helm, M. M., Bourne, N., Lovatelli, A. 2006. Cultivo de bivalvos en criadero. Un manual práctico. FAO Documento Técnico de Pesca. No. 471. Roma, FAO.
- Honkoop, P. J. C., van der Meer, J., 1998. Experimentally induced effects of water temperature and immersion time on reproductive output of bivalves in the Wadden Sea. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 220, 227-246.
- Howard, D.W., y Smith, C. S. 1983. Histological techniques for marine bivalve mollusks.
- Humason, G.L. 1962. *Animal Tissue Techniques*. W. H. Freeman and Company. United States of America. 468 p.
- Jaramillo, R., Winter, J., Valencia, J. y Ribera, A. 1993. Gametogenic cycle of the Chiloe scallop (*Chlamys amandi*). *J. Shellfish Res.* 12 (1):59-64.
- Keen, A. M. 1971. *Sea Shells of Tropical West America. Marine Mollusks from Baja California, México to Peru*. Stanford University Press, U. S. A. Second Ed. 1971 1064 p., 22 (1a. edición. 1958).
- Lango-Reynoso, F., Chávez-Villalba, J., Claude-Cochard, J., Le-Pennec, M. 2000. Oocyte size, mean to evaluate the gametogenic development of the pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture* 190:183-199.
- Lannan, J.E. 1980. Broodstock management of *Crassostrea gigas* I. Genetic and environmental variation in survival in the larval rearing system. *Aquaculture* 21:323-336
- Leonardos, N., y Lucas, I. A. 2000. The use of larval fatty acids as an index of growth in *Mytilus edulis* L. larvae. *Aquaculture*, 184(1), 155-166.
- Lora-Vilchis, M.C., Rodríguez-Jaramillo, M.C., Maeda-Martínez, A. N. 1997. Spawning process in the catarina scallop *Argopecten ventricosus* (=circularis) (Sowerby II, 1842):

- Histological description. Pp. 178-179. En: Book of Abstracts, 11th International Pectinid Workshop. La Paz, B.C.S., México. 10-15 April, 1997.
- Loor-Mera, A., 2012. Desarrollo de protocolos de manejo para la inducción al desove y larvicultura de la ostra nativa *Crassostrea iridescens* (Hanley, 1854). Undergraduate thesis, Escuela Superior Politecnica del Litoral, Ecuador 115 pp.
- Loosanoff, V. L. y Davis H.C. 1963. Rearing of Bivalve Mollusks. *Advances in Marine Biology*, 42 (4): 607-624.
- López-Eliás, J. A. y Voltolina, D. 1993. Cultivos semicontinuos de cuatro especies de microalgas con un medio no tradicional. *Ciencias Marinas*, México 19:169-180.
- López-Sánchez, J. A., Maeda-Martínez, A. N., Croll, R. P., y Acosta-Salmón, H. 2009. Monoamine fluctuations during the reproductive cycle of scallop *Nodipecten subnodosus* the Pacific lion's paw. *Comp. Biochem. Physiol.*, A, 154: 425- 428.
- Lourenço, S.O., Lanfer Marquez, U.M., Mancini-Filho, J., Barbarino, E. y Aidar, E. 1997. Changes in biochemical profile of *Tetraselmis gracilis* I. Comparison of two culture media. *Aquaculture* 148, 153-168.
- Luna-González, A. 1997. Ciclo reproductivo de la almeja catarina *Argopecten ventricosus* (Sowerby II, 1842), cultivada en la rada del Puerto de Pichilingüe, B.C.S., y su relación con el medio. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Baja California Sur, México.
- Luna-González, A., Cáceres-Marínez, C., Zúñiga-Pacheco, C., López-López, S., Ceballos-Vázquez, B.P. 2000. Reproductive cycle of *Argopecten ventricosus* (Sowerby 1842) (Bivalvia: Pectinidae) in the Rada del puerto de Pichilingue, B.C.S, Mexico and its relation to temperature, salinity, and food. *J Shellfish Res.* 19: 107–112.
- Maeda-Martínez, A. N. (Ed.). 2002. Los moluscos pectínidos de Iberoamérica: Ciencia y acuicultura. Editorial Limusa.
- Maeda-Martínez, A. N. 2008. Estado actual del cultivo de bivalvos en México. En A. Lovatelli, A. Farías e I. Uriarte (eds). Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina. Taller Técnico Regional de la FAO. 20–24 de agosto de 2007, Puerto Montt, Chile. FAO Actas de Pesca y Acuicultura. No. 12. Roma, FAO. pp. 91–100.

- Mann, R., 1979. The effect of temperature on growth, physiology, and gametogenesis in the Manila clam *Tapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 38, 121-133.
- Martínez-Córdova L.R. 1988. Bioecología de la almeja negra *Chione fluctifraga* (Sowerby, 1853). *Rev. Biol. Trop.*, 36 (2A): 213-219.
- Martínez-Córdova, L. R. 1996. Contribución al conocimiento de la fauna malacológica de cuatro lagunas costeras del estado de Sonora, México. *Ciencias Marinas* (1996), 22(2): 191-203
- Martínez-Guzmán, G. 2008. Control de la reproducción y producción de semillas de bivalvos en sistemas controlados. En A. Lovatelli, A. Farías e I. Uriarte (eds). Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina. Taller Técnico Regional de la FAO. 20–24 de agosto de 2007, Puerto Montt, Chile. FAO Actas de Pesca y Acuicultura. No. 12. Roma, FAO. pp. 267–275.
- Martínez-Pita, I., Sánchez-Lazo, C., y García, F. J. 2014. Influence of microalga lipid composition on the sexual maturation of *Mytilus galloprovincialis*: a hatchery study. *Aquaculture Nutrition*.
- Martínez-Porchas, M., Scheuren-Acevedo, S. M., Martínez-Córdova, L. R., Gollas-Galvan, T., Barraza-Guardado, R. H., Enríquez-Ocaña, F., y Porchas-Cornejo, M. A. 2016. Physiological and sanitary condition of the white clam *Dosinia ponderosa* collected from a coastal area impacted by shrimp farm effluent. *Aquaculture International*, 24(1), 243-256.
- Mathieu, M. y Lubet, P. 1993. Storage tissue metabolism and reproduction in marine bivalves- a brief review. *Invertebr. Reprod. Dev.* 23, 123-129.
- Matias, D., Joaquim, S., Leitao, A., Massapina, C. 2009. Effect of geographic origin, temperature and timing of broodstock collection on conditioning, spawning success and larval viability of *Ruditapes decussatus* (Linné, 1758). *Aquacult. Int.* 17:257- 271.
- Mazón-Suástegui, J.M., 1987. “Evaluación de cinco dietas microalgales en el crecimiento larval de *Modiolus capax* (CONRAD, 1837) y *Pinctada mazatlanica* (HANLEY, 1845) (MOLLUSCA BIVALVIA)”. Tesis de Maestría. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, Instituto Politécnico Nacional, México; 70 pp.

- Mazón-Suástegui, J.M., 2005. “Biología y cultivo de la almeja catarina *Argopecten ventricosus* (Sowerby II, 1842)”. Tesis Doctoral. Universitat de Barcelona. Barcelona, España. 217 pp.
- Mazón-Suástegui J.M., Maeda-Martínez A.N., Robles-Mungaray M., De La Roche J.P., Guilherme S. Rupp, Mendes-De-Bem M., Velasco L.A. y Freites-Valbuena, L.F. 2011. Avances en la producción de juveniles de *Nodipecten* spp. Cap. 11, 275-311. En: A.N. Maeda-Martínez y C. Lodeiros-Seijo (Eds.), Biología y cultivo de los moluscos pectínidos del género *Nodipecten*. Editorial Limusa, México.
- Muller-Feuga, A., Robert, R., Cahu, C., Robin, J., & Divanach, P. 2003 (a). Uses of microalgae in aquaculture. Live feeds in Marine aquaculture, 253-299.
- Muller-Feuga, A., Moal, J., y Kaas, R. 2003 (b). The microalgae of aquaculture. Live feeds in marine aquaculture, 206-252.
- Palacios, E., Racotta, I.S., Arjona-Leyva, 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.
- Ramos-Corella, K., Martínez-Córdova, L. R., Enríquez-Ocaña, L. F., Miranda-Baeza, A., López-Elías, J. A. 2014. Bio-filtration capacity, oxygen consumption and ammonium excretion of *Dosinia ponderosa* and *Chione gnidia* (Veneroidea: Veneridae) from areas impacted and non-impacted by shrimp aquaculture effluents. Revista de Biología Tropical, vol. 62, núm. 3, septiembre, 2014, pp. 969-976.
- Raven, Chr. P. 1961. Oogenesis: The storage of developmental information. Pergamon Press. E.U.A. 227 p.
- Rodríguez-Jaramillo, C., M. A. Hurtado, E. Romero-Vivas, J. L. Ramírez, M. Manzano, E. Palacios. 2008. Gonadal development and histochemistry of the tropical oyster, *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1951) during an annual reproductive cycle. J. Shellfish Res. 27:1129-1141.
- Rodríguez-Jaramillo, M. C. 2004. Efecto de la temperatura sobre la gametogénesis en el callo de hacha *Atrina maura* (Sowerby, 1835) (Bivalvia: Pinnidae). Tesis de Maestría, Instituto Politécnico Nacional, Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, 74 p.
- Ruppert, E., y Barnes, R. 1996. Zoología de Invertebrados. 6ta Edición Mc Graw-Hill Interamericana. 1114pp.

- Saout, C., Quèrè, C., Donval, A., Paulet, Y. M., 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. 1963. Reproduction of the bay scallop, *Aequipecten irradians* Lamarck. Influence of temperature on maturation and spawning. *Biol. Bull.* 125:146-153.
- Sastry, A. N. 1968. Relationships among food, temperature and gonad development of the bay scallop, *Aequipecten irradians concentricus* Say, reared in the laboratory. *Bull. Mar. Sci.* 15, 417-435.
- Sastry, A. N. 1970. Reproductive physiological variation in latitudinally separated populations of the bay scallop, *Aequipecten irradians* Lamarck. *The Biological Bulletin*, 138(1), 56-65.
- Seed, R. 1976. Ecology. En: Marine mussel. (Ed. Bayne, B. L.) *International Biology Programme 10*. London, Cambridge University Press. 13-60 pp.
- Sicard, M. T., Maeda-Martínez, A. N., Lluch-Cota, S. E., Lodeiros-Seijo, C., Roldán-Carrilo, L. M., y Mendoza-Alfaro, R. 2006. Frequent monitoring of temperature: an essential requirement for site selection in bivalve aquaculture in tropical-temperate transition zones. *Aquac. Res.*, 37: 1040- 1049.
- Soudant P., Marty, Y., Moal, J., Samain, J. F. 1996. Fatty acids and egg quality in great scallop. *Aquacult. Int.* 4, 191-200.
- Sühnel, S., Lagrese, F., Zanette, G., Magalhães, A. R. M., Ferreira, J. F. 2012. Effect of the fatty acid EPA and DHA in the conditioning of the scallop *Nodipecten nodosus* (Linné, 1758). *Aquaculture* 330-333:167-171.
- 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.
- Velasco, L. A., Barros, J. 2007. Potential for hatchery broodstock conditioning of the Caribbean scallops *Argopecten nucleus* and *Nodipecten nudosus*. *Aquaculture* 273, 767-773.
- Villalaz, J. 1994. Laboratory study of food concentration and temperature effect on the reproductive cycle of *Argopecten ventricosus*. *J. Shellfish Res.* 13(2):513-519.

- Villalejo-Fuerte M. y Ceballos-Vázquez, B. P. 1996. Variación de los índices de condición general, gonádico y de rendimiento muscular en *Argopecten circularis* (Bivalvia: Pectinidae). Rev. Biol. Trop., 44: 591-594.
- Villalejo-Fuerte, M., Arellano-Martínez, M., Ceballos-Vázquez, B.P. y García Domínguez, F. 2000. Ciclo reproductivo de la almeja chocolate *Megapitaria squalida* (Sowerby, 1835) (Bivalvia: Veneridae) en Bahía Juncalito, Golfo de California, México. Hidrobiológica 10 (2): 165-168.
- 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.
- Utting, S. D., Spencer, B. E. 1991. The hatchery culture of bivalve mollusk larvae and juveniles, Laboratory Leaflet, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food Directorate of Fisheries Research, Lowestoft (68).
- Webb, K. L., Chu, F.-L. 1981. Phytoplankton as a food source for bivalve larvae, in: Pruder, G.D., Landgon, C., Conklin, D. (Eds.), Proceedings of the Second International Conference on Aquaculture Nutrition: Biochemical and Physiological Approaches to Shellfish Nutrition. Special Publication No.2. Louisiana State University, Baton Rouge, Louisiana, pp. 272-291.
- 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.