



JACUMAR
JUNTA NACIONAL ASESORA DE CULTIVOS MARINOS

PLANES NACIONALES DE CULTIVOS MARINOS

INFORME FINAL EXTENSO

Título: Cultivo de Nuevas Especies de Moluscos
Bivalvos de Interés en Hatcheries



ÍNDICE

1. C.A. GALICIA-SUBPROYECTO 1. CULTIVO DE COQUINA (<i>DONAX TRUNCULUS</i>) Y LONGUEIRÓN (<i>SOLEN MARGINATUS</i>)	10
1.1. COQUINA (<i>DONAX TRUNCULUS</i>)	11
1.1.1. LÍNEA 1. CICLO REPRODUCTIVO DE <i>DONAX TRUNCULUS</i> EN EL MEDIO NATURAL 11	
1.1.1.1. INTRODUCCIÓN.....	11
1.1.1.2. MATERIAL Y MÉTODOS	11
1.1.1.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	17
1.1.1.4. CONCLUSIONES.....	29
1.1.2. LÍNEA 2. CULTIVO LARVARIO EN CRIADERO	30
1.1.2.1. INTRODUCCIÓN.....	30
1.1.2.2. MATERIAL Y MÉTODOS	30
1.1.2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
1.1.2.4. CONCLUSIONES.....	37
1.1.3. LÍNEA 3. CULTIVO POSTLARVARIO Y DE SEMILLA	38
1.1.3.1. INTRODUCCIÓN.....	38
1.1.3.2. MATERIAL Y MÉTODOS	38
1.1.3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
1.1.3.4. CONCLUSIONES.....	39
1.1.4. LÍNEA 4. PREENGORDE DE <i>DONAX TRUNCULUS</i>	40
1.1.4.1. INTRODUCCIÓN.....	40
1.1.4.2. MATERIAL Y MÉTODOS	40
1.1.4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
1.1.4.4. CONCLUSIONES.....	47
1.1.5. LÍNEA 5. ADAPTACIÓN DE <i>DONAX TRUNCULUS</i> AL MEDIO NATURAL	48
1.1.5.1. INTRODUCCIÓN.....	48
1.1.5.2. MATERIAL Y MÉTODOS	48
1.1.5.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	49
1.1.5.4. CONCLUSIONES.....	51
1.1.6. LÍNEA 6. PATOLOGÍA DE <i>DONAX TRUNCULUS</i>	53
1.1.6.1. INTRODUCCIÓN.....	53
1.1.6.2. MATERIAL Y MÉTODOS	54
1.1.6.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	57
1.1.6.4. CONCLUSIONES.....	70
1.1.7. BIBLIOGRAFÍA	72
1.2. LONGUEIRÓN VELLO (<i>SOLEN MARGINATUS</i>)	75
1.2.1. LÍNEA 2. ACONDICIONAMIENTO Y OBTENCIÓN DE PUESTAS EN <i>S. MARGINATUS</i> ...	75
1.2.1.1. INTRODUCCIÓN.....	75
1.2.1.2. MATERIAL Y MÉTODOS	76
1.2.1.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	78
1.2.1.4. CONCLUSIONES.....	82



1.2.2. LÍNEA 3. CULTIVO LARVARIO Y POSTLARVARIO DE <i>S. MARGINATUS</i> Y <i>D. TRUNCULUS</i>.....	84
1.2.2.1. INTRODUCCIÓN.....	84
1.2.2.2. MATERIAL Y MÉTODOS	86
1.2.2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	92
1.2.2.4. CONCLUSIONES.....	111
1.2.3. LÍNEA 4. PREENGORDE DE <i>S. MARGINATUS</i> Y <i>D. TRUNCULUS</i>.....	113
1.2.3.1. INTRODUCCIÓN.....	113
1.2.3.2. MATERIAL Y MÉTODOS	113
1.2.3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	115
1.2.3.4. CONCLUSIONES.....	118
1.2.4. LÍNEA 5. ADAPTACIÓN AL MEDIO NATURAL: SIEMBRA.....	119
1.2.4.1. INTRODUCCIÓN.....	119
1.2.4.2. MATERIAL Y MÉTODOS	120
1.2.4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	123
1.2.4.4. CONCLUSIONES.....	131
1.2.5. LÍNEA 6. PATOLOGÍA DE <i>S. MARGINATUS</i>	132
1.2.5.1. INTRODUCCIÓN.....	132
1.2.5.2. MATERIAL Y MÉTODOS	134
1.2.5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	136
1.2.5.4. CONCLUSIONES.....	150
1.2.6. BIBLIOGRAFÍA	152
2. C.A. CATALUÑA-SUBPROYECTO 2. DESARROLLO DE TÉCNICAS DE CULTIVO EN HATCHERIES DE <i>CALLISTA CHIONE</i>	158
2.1. LÍNEA 1. SEGUIMIENTO DEL CICLO BIOLÓGICO DE UNA POBLACIÓN NATURAL....	158
2.1.1. MATERIAL Y MÉTODOS	158
2.1.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	159
2.1.3. CONCLUSIONES.....	161
2.2. LÍNEA 2. ACONDICIONAMIENTO DE REPRODUCTORES Y OBTENCIÓN DE PUESTAS	162
2.2.1. MATERIAL Y MÉTODOS	162
2.2.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	171
2.2.3. CONCLUSIONES.....	183
2.3. LÍNEA 3. CULTIVO LARVARIO Y POSTLARVARIO	184
2.3.1. MATERIAL Y MÉTODOS	184
2.3.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	190
2.3.3. CONCLUSIONES.....	199
2.4. BIBLIOGRAFÍA	200
3. C.A. ANDALUCÍA-SUBPROYECTO 3. TÉCNICAS DE CULTIVO EN CRIADERO DE LONGUERÓN (<i>S. MARGINATUS</i>), COQUINA (<i>D. TRUNCULUS</i>) Y CONCHA FINA (<i>C. CHIONE</i>).....	201
3.1. LONGUERÓN (<i>S. MARGINATUS</i>).....	201
3.1.1. LÍNEA 1. ACONDICIONAMIENTO DE REPRODUCTORES Y OBTENCIÓN DE PUESTAS	201



3.1.1.1. INTRODUCCIÓN.....	201
3.1.1.2. MATERIAL Y MÉTODOS	203
3.1.1.3. RESULTADOS	208
3.1.2. LÍNEA 3. PREENGORDE DE SEMILLA	217
3.1.2.1. MATERIAL Y MÉTODOS	217
3.1.2.2. RESULTADOS	219
3.1.3. BIBLIOGRAFÍA	222
3.2. COQUINA (<i>DONAX TRUNCULUS</i>)	223
3.2.1. LÍNEA 1. ACONDICIONAMIENTO DE REPRODUCTORES Y OBTENCIÓN DE PUESTAS	223
3.2.1.1. INTRODUCCIÓN.....	223
3.2.1.2. MATERIAL Y MÉTODOS	223
3.2.1.3. RESULTADOS	225
3.2.1.4. DISCUSIÓN.....	230
3.2.2. LÍNEA 2. CULTIVO LARVARIO DE <i>D. TRUNCULUS</i>	232
3.2.2.1. MATERIAL Y MÉTODOS	232
3.2.2.2. RESULTADOS	234
3.2.3. BIBLIOGRAFÍA	237
3.3. CONCHA FINA (<i>CALLISTA CHIONE</i>)	240
3.3.1. LÍNEA 1. ACONDICIONAMIENTO Y OBTENCIÓN DE PUESTAS	240
3.3.1.1. INTRODUCCIÓN.....	240
3.3.1.2. MATERIAL Y MÉTODOS	240
3.3.1.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	246
3.3.2. BIBLIOGRAFÍA	255



INFORME FINAL EXTENSO

1.- DATOS ADMINISTRATIVOS

TITULO: Cultivo de Nuevas Especies de Moluscos Bivalvos de Interés en Hatcheries

FECHAS DE REALIZACIÓN: 2006-2009

DATOS DEL COORDINADOR DEL PROYECTO

Apellidos: Martínez Patiño

Nombre: Dorotea

Entidad: Consellería do Mar. Xunta de Galicia

Centro: Centro de Cultivos Mariños (CIMA)

Teléfono: 982889404. Fax: 9821889419

Correo electrónico: mptea@cimacoron.org

Dirección Postal Completa: Centro de Cultivos Mariños, Consellería do Mar, Xunta de Galicia, Peirao de Porcillán s/n. 27700 Ribadeo (Lugo)

PARTICIPANTES por cada comunidad

CA de GALICIA

CENTRO DE INVESTIGACIÓN

Tipo de centro: Centro Público de I+D

Nombre: CIMA

CIF: S-1511001-H

Nombre Representante Legal: Susana Rodríguez Carballo

DATOS DE LOS INVESTIGADORES

Apellidos: Martínez Patiño

Nombre: Dorotea

Entidad: Consellería do Mar. Xunta de Galicia

Centro: Centro de Cultivos Mariños (CIMA)

Departamento: Acuicultura

Equipo: Moluscos

Teléfono: 982889404. Fax: 9821889419

Correo electrónico: mptea@cimacoron.org

Dirección Postal Completa: Centro de Cultivos Mariños, Peirao de Porcillán s/n. 27700 Ribadeo (Lugo)

Apellidos: Nóvoa Vázquez

Nombre: Susana



Entidad: Consellería do Mar. Xunta de Galicia
Centro: Centro de Cultivos Mariños (CIMA)
Departamento: Acuicultura
Equipo: Moluscos
Teléfono: 982889405. **Fax:** 9821889419
Correo electrónico: snovoa@cimacoron.org
Dirección Postal Completa: Centro de Cultivos Mariños, Peirao de Porcillán s/n. 27700 Ribadeo (Lugo)

Apellidos: Ojea Martínez
Nombre: Justa
Entidad: Consellería do Mar. Xunta de Galicia
Centro: Centro de Cultivos Mariños (CIMA)
Departamento: Acuicultura
Equipo: Moluscos
Teléfono: 982889407. **Fax:** 9821889419
Correo electrónico: justaom@cimacoron.org
Dirección Postal Completa: Centro de Cultivos Mariños, Peirao de Porcillán s/n. 27700 Ribadeo (Lugo)

Apellidos: da Costa González
Nombre: Fiz
Entidad: Consellería do Mar. Xunta de Galicia
Centro: Centro de Cultivos Mariños (CIMA)
Departamento: Acuicultura
Equipo: Moluscos
Teléfono: 982889413. **Fax:** 9821889419
Correo electrónico: fizdacosta37@gmail.com
Dirección Postal Completa: Centro de Cultivos Mariños, Peirao de Porcillán s/n. 27700 Ribadeo (Lugo)

Apellidos: Louzán Pérez
Nombre: Andrea
Entidad: Consellería do Mar. Xunta de Galicia
Centro: Centro de Cultivos Mariños (CIMA)
Departamento: Acuicultura
Equipo: Moluscos
Teléfono: 982889412. **Fax:** 9821889419
Correo electrónico: andrealp@cimacoron.org
Dirección Postal Completa: Centro de Cultivos Mariños, Peirao de Porcillán s/n. 27700 Ribadeo (Lugo)

Apellidos: Carballal Durán
Nombre: M^a Jesús
Entidad: Consellería do Mar. Xunta de Galicia
Centro: Centro de Investigacións Mariñas (CIMA)
Departamento: Patoloxía
Equipo: Moluscos



Teléfono: 886206334. **Fax:** 986506788

Correo electrónico: maria.carballal@cimacoron.org

Dirección Postal Completa: Centro de Investigacións Mariñas, Pedrás de Corón s/n.
Apdo. 13, 36620 Vilanova de Arousa (Pontevedra)

Apellidos: López Gómez

Nombre: Carmen

Entidad: Consellería do Mar. Xunta de Galicia

Centro: Centro de Investigacións Mariñas (CIMA)

Departamento: Patología

Equipo: Moluscos

Teléfono: 886206332. **Fax:** 986506788

Correo electrónico: clopez@cimacoron.org

Dirección Postal Completa: Centro de Investigacións Mariñas, Pedrás de Corón s/n.
Apdo. 13, 36620 Vilanova de Arousa (Pontevedra)

Apellidos: Cerviño Eiroa

Nombre: Antonio

Entidad: Consellería do Mar. Xunta de Galicia

Centro: Centro de Investigacións Mariñas (CIMA)

Departamento: Recursos Marinos

Equipo: Moluscos

Teléfono: 886206350. **Fax:** 986506788

Correo electrónico: cervi@cimacoron.org

Dirección Postal Completa: Centro de Investigacións Mariñas, Pedrás de Corón s/n.
Apdo. 13, 36620 Vilanova de Arousa (Pontevedra)

CA de CATALUÑA

CENTRO DE INVESTIGACIÓN

Tipo de centro: Centro Público de I+D

Nombre: Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA)

CIF: Q-5855049-B

Nombre Representante Legal: Agustí Fonts i Cavestany

DATOS DE LOS INVESTIGADORES

Apellidos: Pérez Larruscain

Nombre: Josu

Centro: Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA)

Departamento: Cultivos Experimentales

Teléfono: 977745427

Correo electrónico: josu.perez@irta.cat

Dirección Postal Completa: Ctra. de Poble Nou s/n. Apdo. 200, 3540 Sant Carles de la Ràpita (Tarragona)



Apellidos: Gairín Deulofeu
Nombre: Joan Ignasi
Centro: Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA)
Departamento: Desenvolupament de Negoci
Teléfono: 977745427
Correo electrónico: ignasi.gairin@irta.cat
Dirección Postal Completa: Ctra. de Poble Nou s/n. Apdo. 200, 3540 Sant Carles de la Ràpita (Tarragona)

Apellidos: Delgado Fernández
Nombre: Marina
Centro: Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA) (2006-2008)
Departamento: Cultivos Experimentales
Correo electrónico: marina.delgado@cd.ieo.es
Dirección Postal Completa: Ctra. de Poble Nou s/n. Apdo. 200, 3540 Sant Carles de la Ràpita (Tarragona)

Apellidos: Ramón Herrero
Nombre: Montserrat
Centro: Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA)
Departamento: Cultivos Experimentales
Teléfono: 977745427
Dirección Postal Completa: Ctra. de Poble Nou s/n. Apdo. 200, 3540 Sant Carles de la Ràpita (Tarragona)

Apellidos: Elandaloussi
Nombre: Laurence Myriam
Centro: IRTA
Departamento: Seguiment del medi marí
Teléfono: 977745427
Dirección Postal Completa: Ctra. de Poble Nou s/n. Apdo. 200, 3540 Sant Carles de la Ràpita (Tarragona)

CA de ANDALUCÍA

CENTRO DE INVESTIGACIÓN

Tipo de centro: Centro Público de I+D
Nombre: Centro de Investigación y Formación Pesquera y Acuícola (IFAPA) “Agua del Pino”. Junta de Andalucía
CIF: S-4100689-A
Nombre Representante Legal: Fernando Morillo Pérez

DATOS DE LOS INVESTIGADORES

Apellidos: Moreno Escalante
Nombre: Oscar



Centro: Centro de Investigación y Formación Pesquera y Acuícola (IFAPA) “Agua del Pino”.

Departamento: Cultivos Marinos y Recursos Pesqueros

Teléfono: 959399104 **Fax:** 959024929

Correo electrónico: oscar.moreno@juntadeandalucia.es

Dirección Postal Completa: Centro de Investigación y Formación Pesquera y Acuícola Agua del Pino. Ctra. El Rompido-Punta Umbría 3.8 Km, Huelva.

Apellidos: Martínez Pita

Nombre: Inés

Centro: Centro de Investigación y Formación Pesquera y Acuícola (IFAPA) “Agua del Pino”.

Departamento: Cultivos Marinos y Recursos Pesqueros

Teléfono: 959399104 **Fax:** 959024929

Correo electrónico: ines.martinez@juntadeandalucia.es

Dirección Postal Completa: Centro de Investigación y Formación Pesquera y Acuícola Agua del Pino. Ctra. El Rompido-Punta Umbría 3.8 Km, Huelva.

Apellidos: Márquez Rodríguez

Nombre: Lorenzo

Centro: Centro de Investigación y Formación Pesquera y Acuícola (IFAPA) “Agua del Pino”.

Departamento: Cultivos Marinos y Recursos Pesqueros

Teléfono: 959399104 **Fax:** 959024929

Correo electrónico: lorenzo.marquez@juntadeandalucia.es

Dirección Postal Completa: Centro de Investigación y Formación Pesquera y Acuícola Agua del Pino. Ctra. El Rompido-Punta Umbría 3.8 Km, Huelva.

Apellidos: Sánchez Lago

Nombre: Clara

Centro: Centro de Investigación y Formación Pesquera y Acuícola (IFAPA) “Agua del Pino”.

Departamento: Cultivos Marinos y Recursos Pesqueros

Teléfono: 959399104 **Fax:** 959024929

Correo electrónico: clara.sanchez@juntadeandalucia.es

Dirección Postal Completa: Centro de Investigación y Formación Pesquera y Acuícola Agua del Pino. Ctra. El Rompido-Punta Umbría 3.8 Km, Huelva.



1. C.A. GALICIA-SUBPROYECTO 1. CULTIVO DE COQUINA (*DONAX TRUNCULUS*) Y LONGUEIRÓN (*SOLEN MARGINATUS*)

Donax trunculus (Lamarck, 1758) y *Solen marginatus* (Pennánt, 1777), son dos especies de moluscos bivalvos que representan un recurso económico importante para el sector marisquero de Galicia y cuyos bancos en la actualidad están en regresión.

La coquina, presenta una distribución limitada a determinadas zonas de la costa norte de la C.A. de Galicia, donde se encuentra formando bancos en las zonas más externas de las rías en playas expuestas al oleaje. Se trata de una especie de alto valor comercial superando en primera venta un valor superior a los 30 €/kg. El longueirón vello (*Solen marginatus*), es la tercera especie en importancia del grupo de las “navajas” en Galicia, y también posee interés en otras regiones de España como Asturias, Cantabria, Andalucía y en el sur de Portugal. Ambas especies son endobentónicas, encontrándose enterradas en la franja intermareal baja y resultan de interés para el sector productivo.

En la actualidad los bancos naturales han sufrido un fenómeno de regresión, bien por sobreexplotación o debido a mortalidades importantes como sucedió con el longueirón vello en la zona norte de Galicia. De ahí el interés del sector en que se produzca la semilla suficiente para hacer repoblaciones de estas especies y para llevar a cabo tareas de cultivo en zonas controladas.



1.1. COQUINA (*DONAX TRUNCULUS*)

1.1.1. LÍNEA 1. CICLO REPRODUCTIVO DE *DONAX TRUNCULUS* EN EL MEDIO NATURAL

1.1.1.1. INTRODUCCIÓN

Para comenzar el cultivo de una especie en criadero, es preciso conocer su ciclo reproductivo en el medio natural. La reproducción en los moluscos bivalvos está sujeta a ciclos estacionales, lo que hace disponer de gametos viables durante un período de tiempo determinado. Se ha hecho un estudio del ciclo gametogénico y análisis de la composición bioquímica de progenitores de la coquina, *Donax trunculus*. El objetivo es optimizar la obtención de puestas en laboratorio y viabilidad de las mismas además de conocer la relación que existe entre la variación en la composición bioquímica y los distintos estadios del ciclo gametogénico en el medio natural.

Existen sobre el ciclo reproductor de esta especie estudios en la Ría de O Barqueiro (NO Galicia), son los de Fernández Otero (1982); Mazé y Laborda (1990) y Martínez *et al.* (2003). En estos últimos años este banco sufre un descenso importante en la producción, por lo que se decide recoger los reproductores en otro banco próximo, en la Ría de Cedeira, así se estudia el ciclo reproductor de esta especie. Junto al estudio histológico, se hizo un análisis de la variación en la composición bioquímica mayoritaria (carbohidratos, lípidos y proteínas) en la gónada de progenitores de coquina. Su objetivo es establecer la relación que existe entre esta variación y los distintos estadios de su ciclo gametogénico en el medio natural.

1.1.1.2. MATERIAL Y MÉTODOS

Durante dos años, de noviembre de 2006 a noviembre de 2008, se realizan muestreos mensuales de coquina en un banco natural localizado en la playa de Vilarrube (Ría de Cedeira). La recogida de reproductores tiene lugar en períodos de bajamar comprendidos entre los 0,70 m y 1,1 m de marea. La talla de los individuos recolectados es superior a la comercial, 35 mm. Una vez en el Centro de Cultivos Mariños de Ribadeo, se dejan filtrar durante 24 horas en agua de mar en circuito abierto. Parte de estas coquinas se



utilizan para estudio del estado de madurez gonadal, el resto, se mantendrán en criadero para la obtención de desoves y su posterior cultivo. Se toman datos biométricos: largo o eje antero-posterior, alto o eje dorso-ventral y se abren los ejemplares separando la concha de la víscera, obteniéndose así los pesos frescos de cada parte por separado. Se observa la gónada separada del resto de la vianda para determinar macroscópicamente el estado de madurez y se procesa mediante técnicas histológicas.

A- Estudio histológico

Las gónadas se introducen en fijador Davidson durante 48 horas, pasado este tiempo se conservan en alcohol de 70° hasta el momento en que se someten a deshidratación mediante inmersión en baño creciente de alcoholes. Se utiliza un procesador de tejidos Histolab ZX-100, que realiza este proceso previa programación. Los cortes se realizan en un microtomo, las secciones de 5 µm de grosor se depositan en un baño de agua que está a una temperatura de 40°C. Del baño se recogen con un porta, empapado en gelatina que facilita su adherencia. Una vez concluido este proceso, los cortes se dejan secar en una estufa a 40°C. El último paso en el proceso histológico es la tinción. Como colorante se usan la hematoxilina y eosina. Es necesario desparafinar e hidratar los cortes previamente.

La escala descrita para definir las diferentes fases de madurez gonadal de coquina, es la siguiente:

E0. Reposo sexual

El sexo no es diferenciable a nivel macroscópico ni microscópico, debido a que no aparecen folículos en el tejido gonadal. Se caracteriza este estadio por una abundancia de tejido conectivo, con una gran cantidad de hemocitos.



E1. Inicio del desarrollo gametogénico

Comienza el desarrollo gametogénico. Macroscópicamente el sexo no es diferenciable, pero al microscopio óptico, existen individuos en que se diferencia el sexo. Se observan folículos formados rodeados por una capa de tejido conectivo, con un alto porcentaje de células germinales adheridas a sus paredes. En hembras se ven ovogonias y ovocitos en su primera fase de desarrollo, en machos, espermatogonias formando bandas centrípetas en la pared folicular, pero serán las células vesiculares las que ocupen la mayor parte de la superficie folicular.

E2. Gametogénesis avanzada

Los folículos ocupan gran parte de la gónada. El sexo es diferenciable en todos los individuos que se encuentran en este estadio e incluso, patente a nivel macroscópico, diferenciándose coloración violeta en hembras y blanquecina en machos. En el folículo se aprecia un porcentaje menor de células vesiculares que comienzan a desaparecer y aún existe presencia hemocitaria. En las hembras se observan ovocitos maduros acompañados de líneas germinales más tempranas, tales como ovocitos primarios que están saliendo de la pared folicular y ovocitos pedunculados. En machos se ven los primeros espermatozoides en el lumen, acompañados de líneas germinales tempranas, espermatogonias y espermatocitos, que se desarrollan concéntricamente hacia el interior del folículo.

E3. Madurez y puesta

La gónada se encuentra en el grado más alto de desarrollo. El sexo es diferenciable en todos los individuos, siendo más patente el color violáceo en hembras y blanquecino en gónadas macho. No se observan células vesiculares ni hemocitos. En las hembras se aprecian ovocitos totalmente maduros, con núcleo formado, libres en el lumen y ovocitos pedunculados que aún no se han despegado de la pared folicular. En los machos, el folículo en su totalidad, está prácticamente lleno de espermatozoides, quedando en la zona mas



externa del folículo dos líneas germinales que se desarrollarán dando lugar a espermatozoides.

E4. Postpuesta

Macroscópicamente se ve todavía el color correspondiente a cada sexo. Es el estadio resultado del vaciado gonadal tras la puesta. En las hembras se ven folículos prácticamente vacíos y otros con ovocitos residuales apilados. En los machos se aprecia también una reducción folicular y aparecen espermatozoides residuales dentro y fuera del folículo. Se observa proliferación del tejido conectivo y una elevada presencia hemocitaria.

B- Evolución de la composición bioquímica en relación con el ciclo gametogénico

Se analizan por separado los tejidos de machos, hembras e individuos con sexo sin diferenciar. Las muestras, previamente liofilizadas y trituradas, se procesan según los métodos modificados en el laboratorio de Ribadeo (CIMA), que se describen a continuación.

B-1. Determinación de Carbohidratos

Se emplea el método de Dreywood (1946). Es un método colorimétrico basado en una cuantificación de glucosa total empleando el reactivo de antrona-sulfúrico y que se considera que da buenos resultados en moluscos marinos (Fraga, 1956). Se utiliza un estándar: D (+) glucosa anhidra (Merck®), en un rango de concentraciones de 15–105 µg para obtener la recta de calibración. La absorbancia se mide a 625 nm en un espectrofotómetro (Perkin Elmer. UV/VIS. Lambda 25).

Los reactivos empleados son: ácido sulfúrico (SO₄H₂) 96% para análisis, Panreac®; antrona (C₁₄H₁₀O) para análisis, Merck®; hidróxido de potasio (KOH) en pastillas, Merck® y ácido benzoico (C₇H₆O₂) para análisis, Merck®.



El proceso comprende los siguientes pasos:

1º Extracción de carbohidratos: Las muestras, por duplicado, se someten a hidrólisis con hidróxido potásico 3N. La reacción tiene lugar en un baño a 90°C durante una hora y se mantienen en agitación durante 24 horas.

2º Reacción colorimétrica: Después de la neutralización con ácido sulfúrico, de cada muestra se toman tres alícuotas a las que se les adiciona el reactivo antrona-sulfúrico y se favorece la reacción manteniéndolas en un baño a 90°C durante 16 minutos.

3º Lectura en espectrofotómetro a una longitud de onda de 625 nm.

B-2. Determinación de Lípidos totales

Para la determinación de lípidos totales, se emplea un método gravimétrico, previa extracción de los lípidos por el método de Folch (1957).

Se utilizan los siguientes reactivos: cloroformo (Cl_3CH) para cromatografía en fase líquida, Merck®; metanol (MeOH) químicamente puro, Panreac® y cloruro sódico (NaCl), Merck®.

El método se puede dividir en los siguientes pasos:

1º Extracción de lípidos: Dos muestras del tejido a analizar, se someten a cuatro lavados con cloroformo metanol (2:1, v/v). Al someter la mezcla a centrifugación, los lípidos se van obteniendo del sobrenadante, desechando el tejido que queda en la parte inferior.

2º Eliminación del agua y lavado de los componentes no lipídicos: Los lípidos obtenidos se trasvasan a embudos de decantación a los que se les adiciona, el 25% del volumen total de cloroformo-metanol de una solución salina (cloruro sódico 0,6N). Para evitar la posible interferencia de los restos de tejido que quedan después de las



centrifugaciones, se pasan por un filtro Whatman. Después de agitar la mezcla y dejar decantar, la fase orgánica (lípidos) se recoge de la fase inferior, repitiendo el proceso dos veces.

3º Cuantificación gravimétrica: Una vez evaporados en estufa (30°C), los lípidos se redisuelven en un volumen conocido de cloroformo. Se toman tres alícuotas en cápsulas previamente taradas y después de ser evaporadas en estufa (50°C), se pesan nuevamente para hallar por diferencia los lípidos totales.

B-3. Determinación de proteínas totales

El análisis de proteínas se realiza a partir del método modificado de Lowry (1951), basado en los resultados de Bensadoun y Weinstein (1976) y Hess y col. (1978). La recta de calibrado se realiza utilizando como estándar la seroalbúmina bovina (Sigma®) en un rango de concentraciones de 5 a 30 µg. La lectura en espectrofotómetro se realiza a una longitud de onda de 750 nm.

Los reactivos son: hidróxido sódico (NaOH), Merck®; tartrato disódico (C₄H₄Na₂O₆ * H₂O), Merck®; carbonato sódico (CO₃Na₂), Merck®; sulfato de cobre II hidratado (SO₄Cu * 5 H₂O), Merck®; reactivo del fenol según Folin-Ciocalteu (ácido fosfomolibdeno-ácido fosfotúngstico), Merck®.

La determinación de proteínas totales comprende los siguientes pasos:

1º Extracción de proteínas: La digestión se lleva a cabo con hidróxido sódico NaOH 2,5 N, manteniendo las muestras (por duplicado) en un baño a 56°C durante 30 minutos. Durante 24 horas permanecen agitándose para completar la reacción.

2º Reacción colorimétrica: Se toman tres alícuotas de cada muestra en viales eppendorf, a las que se les adiciona los reactivos I y II. Después de agitar vigorosamente, para su incubación se mantienen en oscuridad durante 45 minutos.

1.1.1.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A- Estudio histológico

En este apartado se representan fotos de las gónadas de coquina en los diferentes estadios descritos anteriormente.

E0. Reposo sexual

En este estadio no se observa ningún folículo en la gónada, ésta aparece ocupada por tejido conectivo (TC) con gran cantidad de hemocitos (HMC) (Fig. 1). Estas estructuras están rodeadas por haces de tejido muscular (MUSC) muy abundante en este estadio.

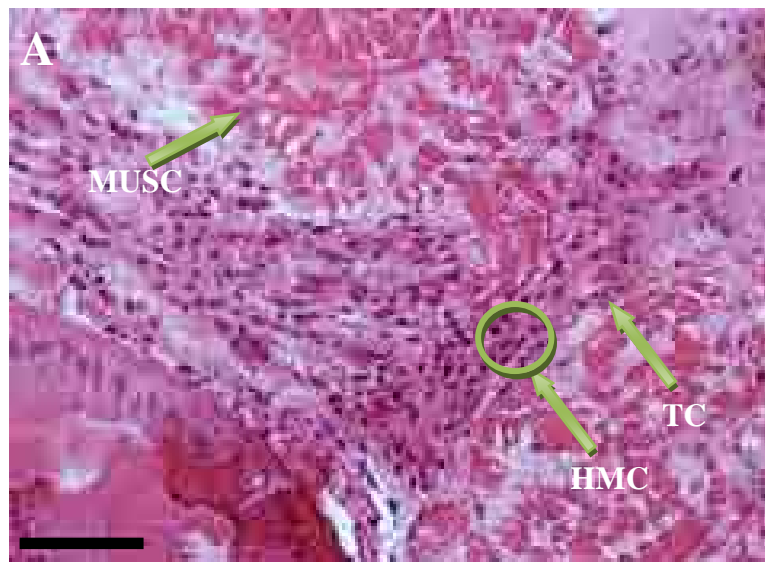


Fig. 1. (A). Corte histológico de coquina en estadio E0. (TC) tejido conectivo, (HMC) hemocitos y (MUSC) músculo. Barra de escala 100 µm.



E1. Inicio del desarrollo gametogénico

En el estadio de inicio de desarrollo gametogénico se ven folículos formados rodeados por una fina capa de tejido conectivo (TC), las gonias (GN), se encuentran adheridas a sus paredes, pero serán las células vesiculares (CV), las que ocupen la mayor parte del folículo (Fig. 2).

En ocasiones, en el lumen del folículo, se observan espermatogonias (ESPG), en machos y ovogonias (OVOG), en hembras de muy reciente formación.

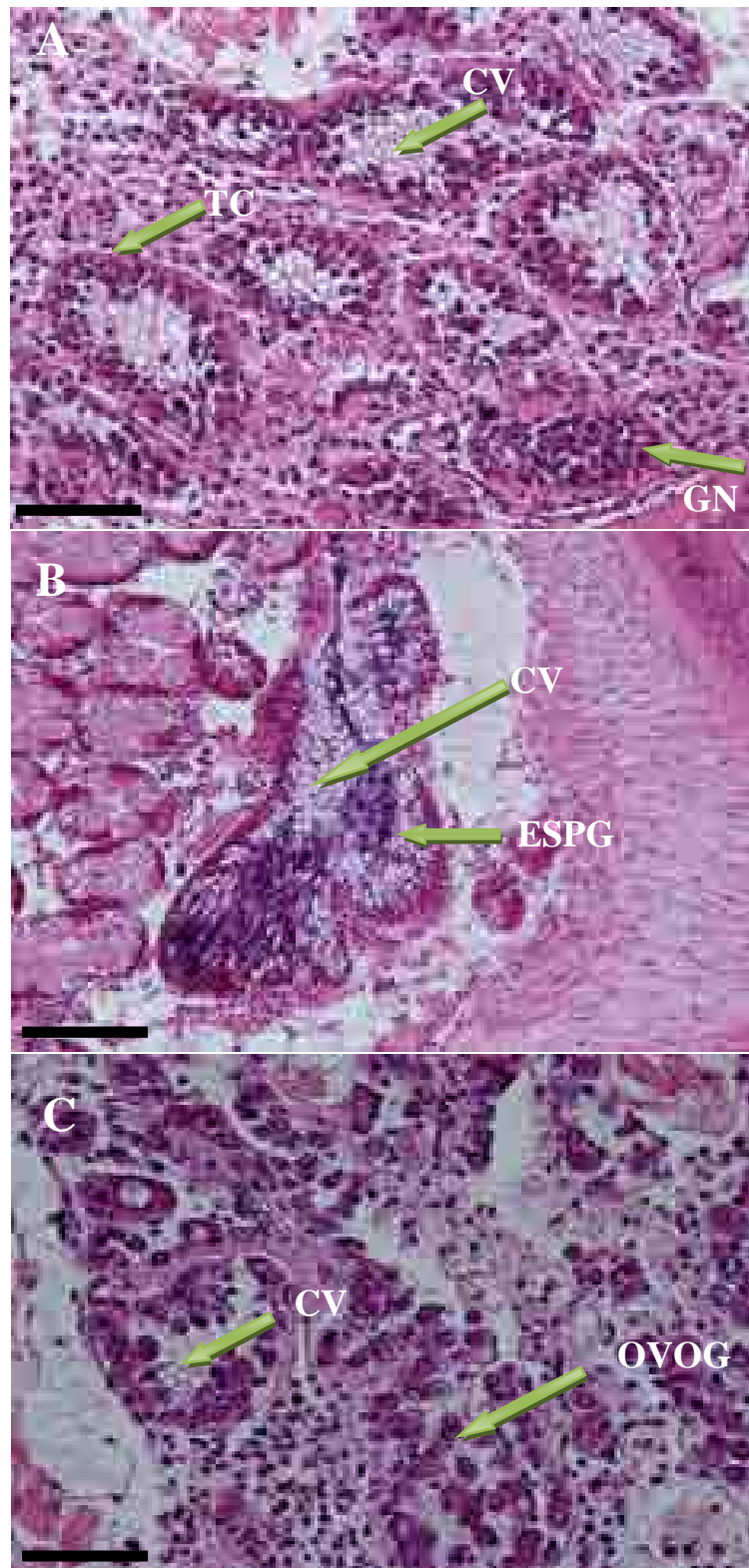


Fig. 2. (A-C). Cortes histológicas de coquina. A) Sexo sin diferenciar. B) Macho. C) Hembra. Se observan folículos rodeados por tejido conectivo (TC) con células vesiculares (CV) y gonias (GN) adheridas a las paredes. Espermatogonias (ESPG) en machos y ovogonias (OVOG) en hembras. Barras de escala 100 μ m.

E2. Gametogénesis avanzada

Los folículos ocupan gran parte de la gónada. En hembras (Figs. 3, A y B), se aprecian ovocitos maduros acompañados de líneas germinales más tempranas, ovocitos primarios (OPR), que aún no han salido de la pared del folículo y ovocitos pedunculados (OP).

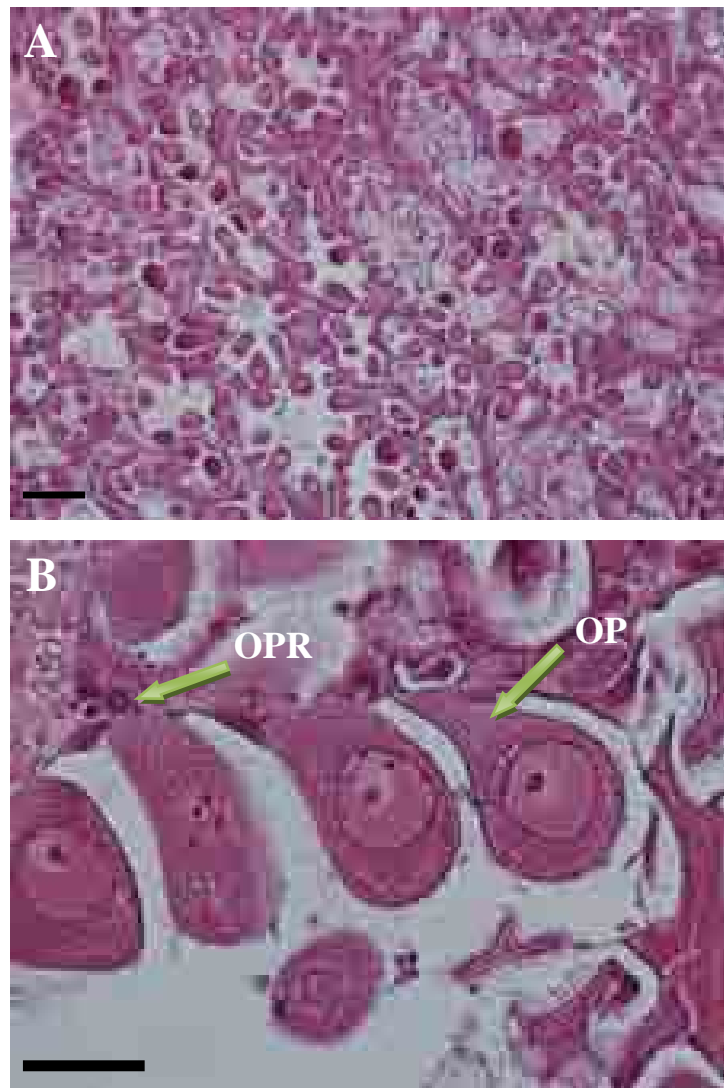


Fig. 3. (A-B). A) Hembra en gametogénesis avanzada. Barra de escala 100 µm. B) Líneas germinales femeninas tempranas, (OPR) ovocitos primarios, (OP) ovocitos pedunculados. Barra de escala 50 µm.

En gónadas masculinas, (Figs. 4, C y D), los folículos presentan ya espermatozoides maduros (ESPM) en el lumen, a la vez existen bandas centrípetas de líneas germinales tempranas por desarrollar.

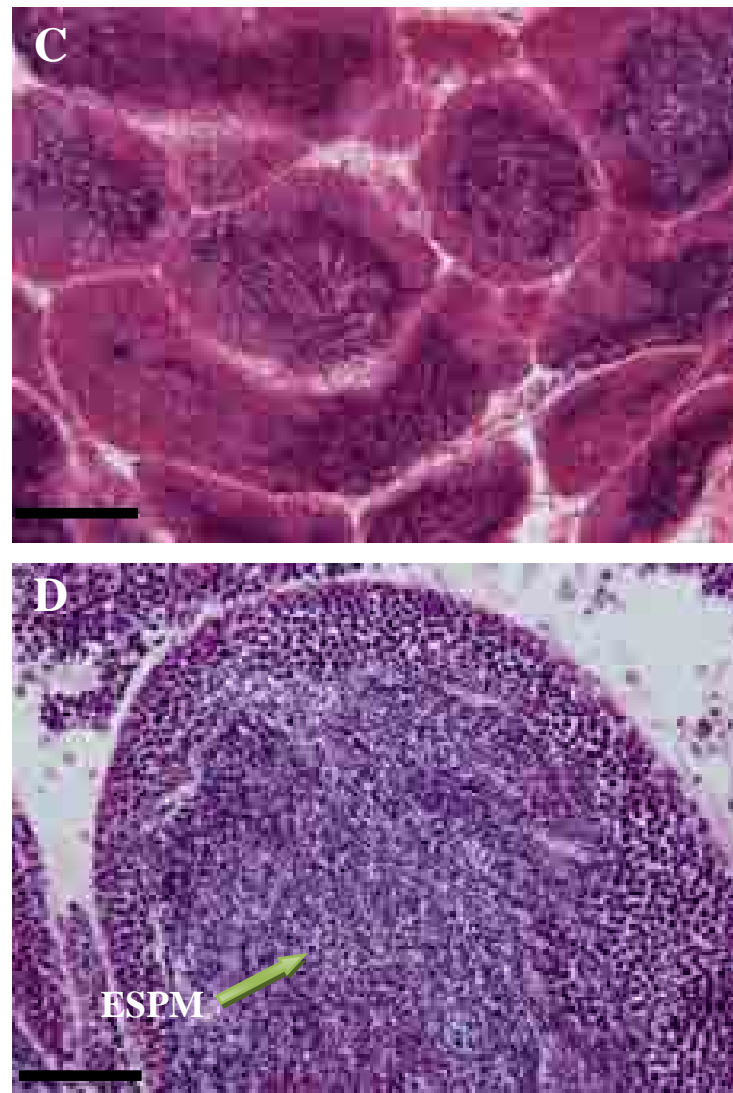


Fig. 4. (C-D). C) Gónada macho en gametogénesis avanzada. Barra de escala 100 µm. D) Folículo masculino con espermatozoides maduros en el lumen, (ESPM) y líneas germinales en desarrollo en su cara externa. Barra de escala 50 µm.

E3. Madurez y puesta

En el estadio E3, la gónada se encuentra en su máximo grado de desarrollo. No existen células vesiculares en el folículo. En la gónada femenina, (Fig. 5, A), los ovocitos

totalmente maduros (OVOC), se encuentran libres en el lumen despegados de la pared folicular, aunque puede encontrarse en este estadio algún ovocito pedunculado (OP) a punto de desprenderse e incluso, algún ovocito primario (OPR) en la pared del folículo. En machos, (Fig. 5, B), el folículo aparece lleno casi en su totalidad de espermatozoides maduros (ESPM), pudiendo quedar en la zona más externa del folículo dos líneas germinales que se desarrollarán dando lugar a espermatozoides.

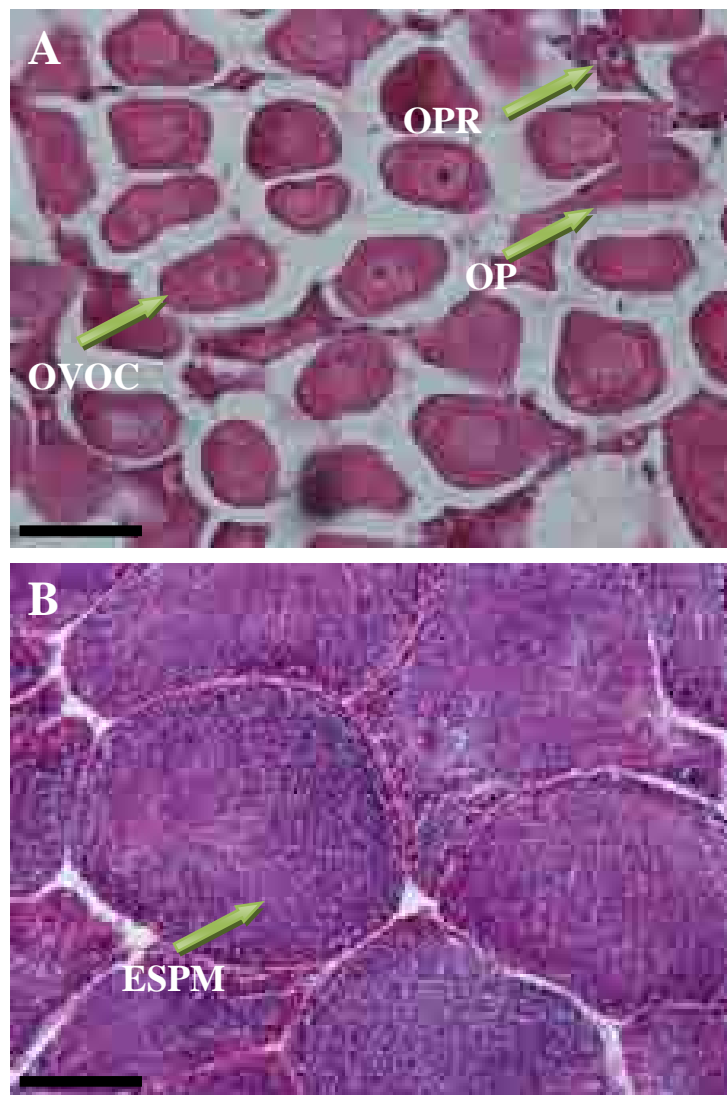


Fig. 5. (A-B). A) Gónada hembra madura, se observan ovocitos maduros (OVOC), pedunculados (OP) y algún ovocito primario (OPR). Barra de escala 50 μ m. B) Gónada macho en estado de madurez con folículos llenos en su totalidad de espermatozoides maduros (ESPM). Barra de escala 100 μ m.

E4. Postpuesta

Este estadio resulta del vaciado gonadal tras la puesta. Los folículos están en regresión. En hembras (Fig. 6, A), se ven ovocitos residuales (OVOCR), con una alta presencia hemocitaria alrededor. En gónadas masculinas (Fig. 6, B), también se observan los folículos en regresión con espermatozoides residuales (ESPR), dispersos incluso por el exterior del folículo. La proliferación de tejido conectivo (TC) y la elevada presencia de hemocitos (HMC), caracterizan este estadio.

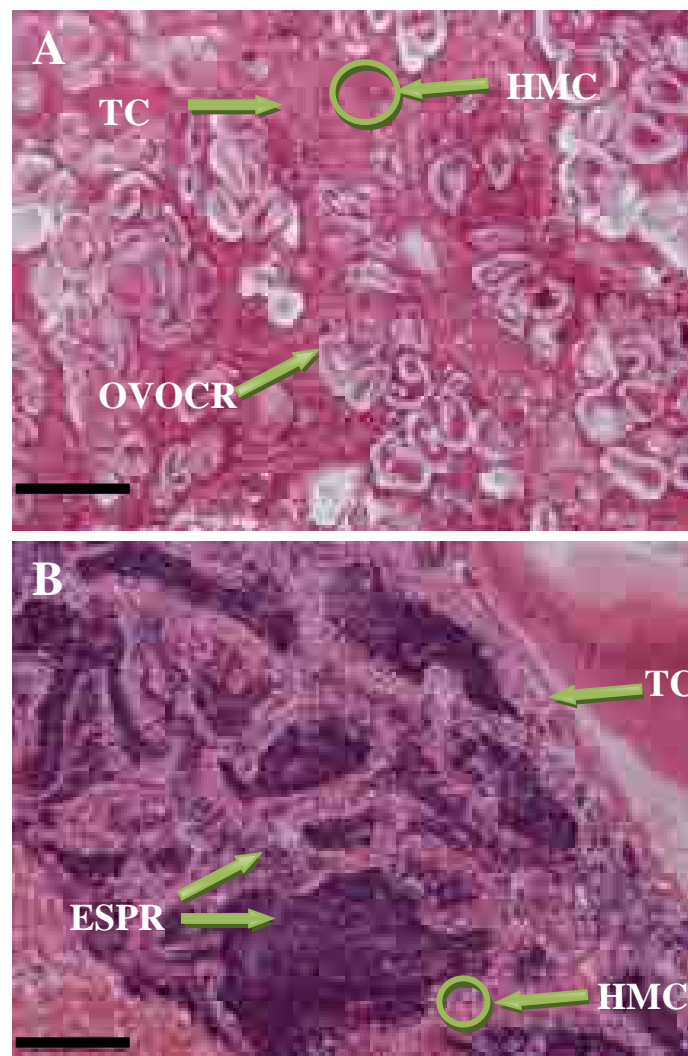


Fig. 6. (A-B). A) Gónada hembra en postpuesta. Se observa proliferación de tejido conectivo (TC), de hemocitos (HMC) y ovocitos residuales (OVOCR). B) Gónada macho tras el vaciado gonadal, se observan espermatozoides residuales (ESPR), proliferación de tejido conectivo (TC) y hemocitos (HMC). Barra de escala 100 μ m.

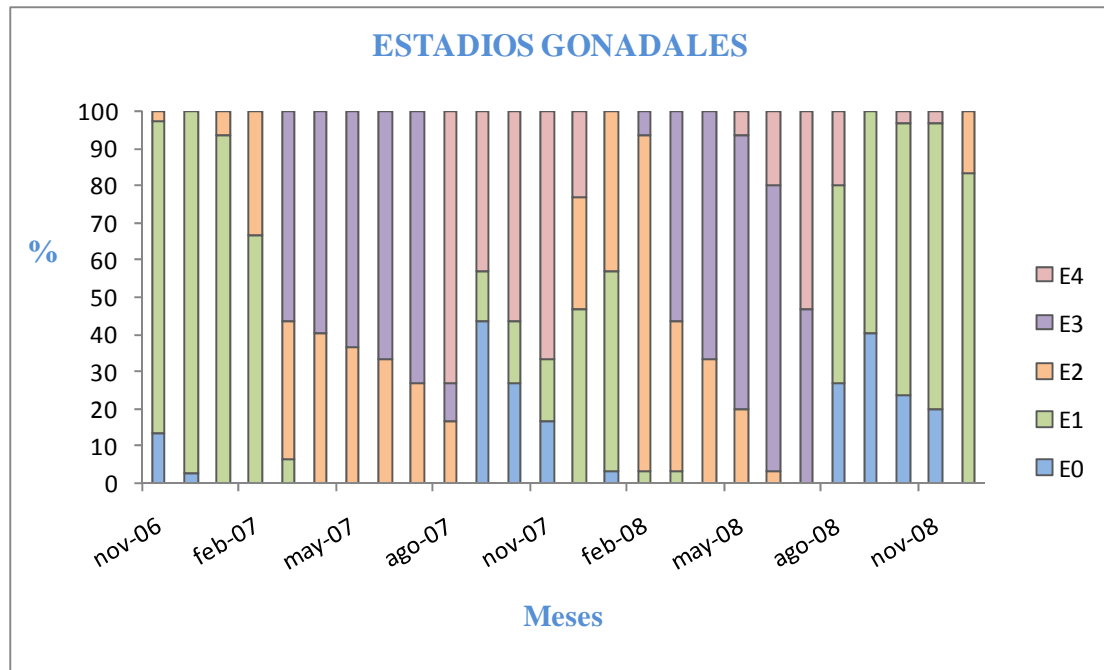


Fig. 7. Representación de los diferentes estadios de maduración gonadal de coquina.

La coquina presenta un período de madurez y puesta que se extiende de marzo a agosto. En la etapa de madurez, a nivel macroscópico se diferencia el sexo por la coloración de la gónada, violeta en hembras y blanquecina en machos. Además tiene lugar un incremento en el tamaño de la misma, en este período mediante estudio con frotis, al microscopio óptico se ven en los folículos de las hembras ovocitos y en el lumen de los machos espermatozoides maduros.

En junio y julio de 2007, un 66% y un 73% de individuos respectivamente se encuentran en este estadio. En 2008 el comportamiento del ciclo es el mismo, pero se adelanta en el tiempo, en febrero aparecen individuos en E3 y en marzo un 60% de las coquinas muestreadas están ya maduras dándose los máximos valores en mayo y junio (73% y 77%). Aunque no existen datos de condiciones ambientales en este banco, se tomaron temperaturas en un punto próximo observándose que éstas eran algo más elevadas en el segundo año de estudio.



Tras el período de puesta comienzan a verse gónadas vacías y de muy pequeño tamaño a nivel macroscópico. De agosto a noviembre hay individuos en estadio E4 de postpuesta, en 2008, en mayo y junio, aparece una pequeña proporción de coquinas en E4.

Donax trunculus presenta un corto período de reposo que comienza a verse en septiembre en 2007, adelantándose su aparición un mes en 2008.

En conclusión, la coquina presenta un amplio período E3 de madurez y puesta. La facilidad de obtención de puestas en criadero y la cantidad de huevos obtenidos en cada uno de los desoves, hace que en principio no sea necesario un acondicionamiento de progenitores de esta especie en criadero. La etapa más óptima para la obtención de desoves se da entre marzo y julio. En estos meses, en los que la mayor parte de coquinas se encuentran en estadio E3, el número de desoves en criadero es mayor y serán estos desoves los que llegan a semilla. *Donax trunculus* presenta un corto período de reposo encontrando que, como máximo, un 43% de la población presentaba este estadio.

El ciclo gametogénico de coquina fue similar en los dos años de estudio adelantándose un poco en el tiempo en 2008. Esta evolución es observada también por Martínez *et al.* (1993, 2003) en la Ría de O Barqueiro.

B- Evolución de la composición bioquímica en relación con el ciclo gametogénico

En este apartado se relaciona la evolución de las cantidades de carbohidratos, lípidos y proteínas en la gónada de coquina, en relación con el ciclo gametogénico en el medio natural a lo largo de dos años de estudio. En las tres figuras expuestas a continuación, se representan estas evoluciones junto con el ciclo gametogénico tanto en machos (Fig. 8), hembras (Fig. 9) como en individuos con sexos sin diferenciar (Fig. 10).

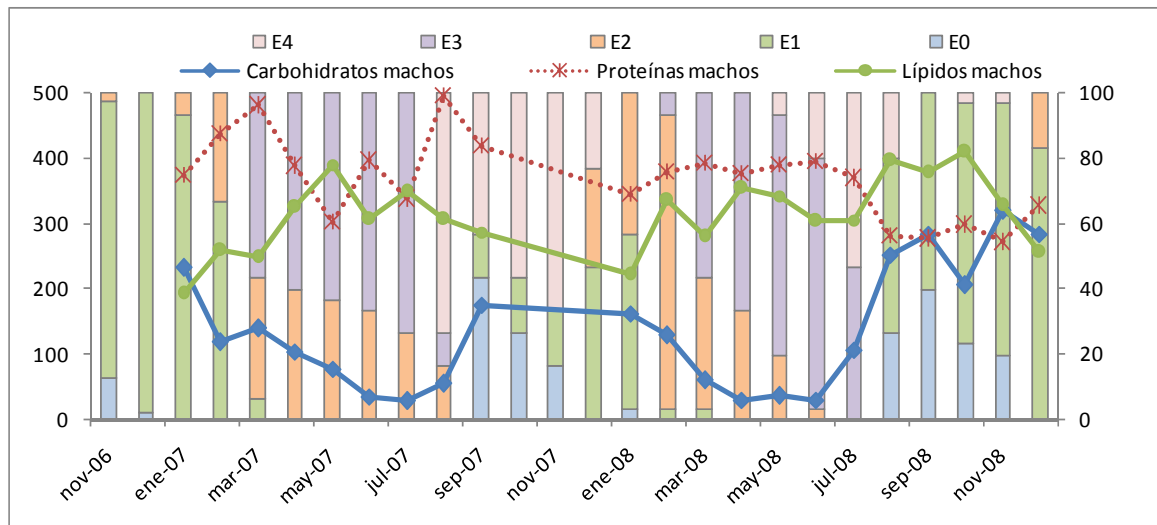


Fig. 8. Evolución de la composición bioquímica en gónadas macho, en relación con el ciclo. Eje "y" cantidad de carbohidratos y proteínas en $\mu\text{g}/\text{mg}$. Eje "z" cantidad de lípidos en $\mu\text{g}/\text{mg}$ y porcentaje de individuos en cada estadio.

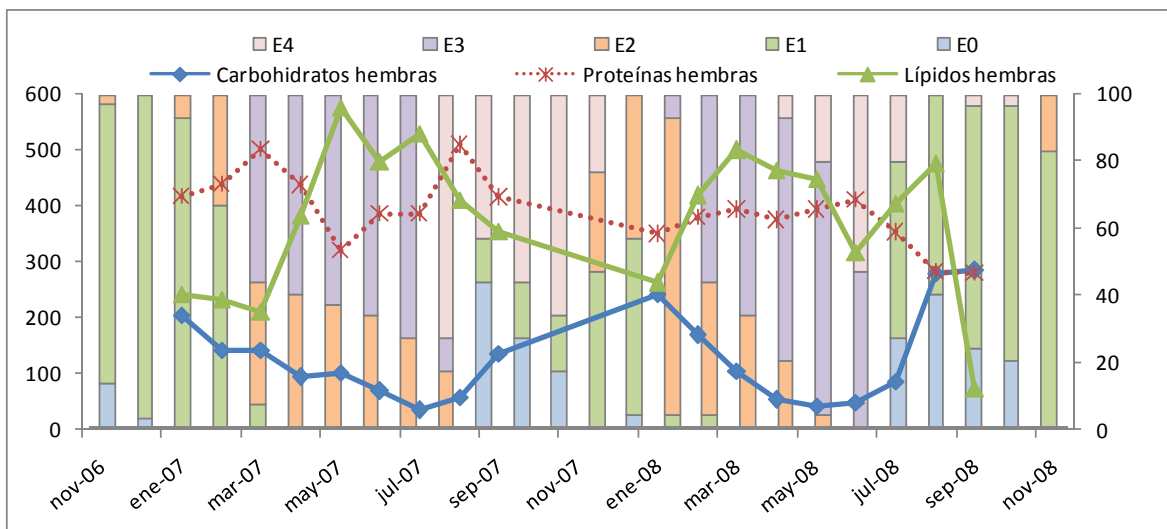


Fig. 9. Evolución de la composición bioquímica en gónadas hembra, en relación con el ciclo. Eje "y" cantidad de carbohidratos y proteínas en $\mu\text{g}/\text{mg}$. Eje "z" cantidad de lípidos en $\mu\text{g}/\text{mg}$ y porcentaje de individuos en cada estadio.

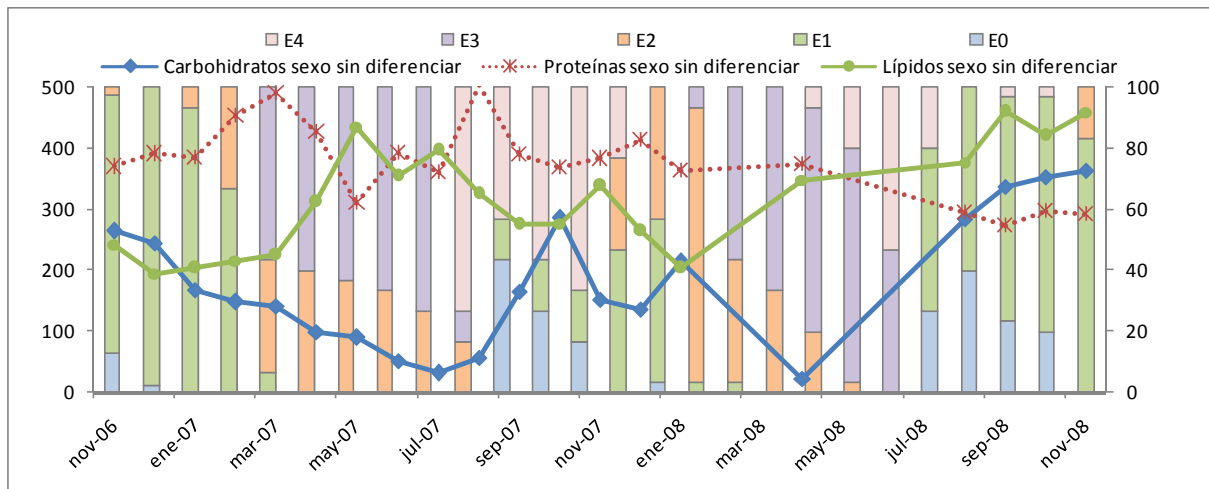


Fig. 10. Evolución de la composición bioquímica en gónadas de individuos con sexo sin diferenciar, en relación con el ciclo. Eje “y” cantidad de carbohidratos y proteínas en $\mu\text{g}/\text{mg}$. Eje “z” cantidad de lípidos en $\mu\text{g}/\text{mg}$ y porcentaje de individuos en cada estadio.

En cuanto a la evolución de los carbohidratos, los mínimos valores, $26,8 \mu\text{g}/\text{mg}$ en machos, $34 \mu\text{g}/\text{mg}$ en hembras y $30,5 \mu\text{g}/\text{mg}$ en individuos con sexo sin diferenciar, se dan en el mes de julio en el primer año de estudio, coincidiendo este mes con el mayor porcentaje de individuos maduros, 73%, y un mayor número de puestas. En el segundo año, la evolución es la misma adelantándose ésta un mes. Los valores más altos en composición en carbohidratos, $318 \mu\text{g}/\text{mg}$ en machos, $283,6 \mu\text{g}/\text{mg}$ en hembras y $362 \mu\text{g}/\text{mg}$ en individuos con sexo sin diferenciar, se dan en invierno.

El componente lipídico sigue una evolución inversa a los carbohidratos presentando valores más altos, entre 70 y $80 \mu\text{g}/\text{mg}$ en período de madurez y mínimos en torno a los $40 \mu\text{g}/\text{mg}$ durante el inicio gametogénico.

Se observa que la evolución en la cantidad de carbohidratos está inversamente relacionada con el desarrollo gonadal. Esto coincide con lo también observado para esta especie por Ansell *et al.* (1980) y Martínez *et al.* (1993). En *Ruditapes decussatus* comprobaron este comportamiento autores como Beninger *et al.* (1984) y Ojea *et al.* (2002). Rodríguez *et al.* (1993) concluye que, en la almeja fina, los carbohidratos se utilizan como fuente energética principal para la formación de gametos. Estudios realizados sobre otras especies de moluscos bivalvos como *Ensis siliqua* y *Solen*



marginatus (Martínez, 2002); *Ruditapes philippinarum* (Ojea *et al.*, 2005) y *Venerupis pullastra* (Cerviño Otero, 2005) encuentran esta evolución de carbohidratos con disminución en los meses de madurez y recuperación en los meses de reposo o anteriores a la gametogénesis. De modo que existe un mínimo, coincidiendo con el porcentaje más alto de individuos en el estadio E3 (madurez y puesta) de máximo desarrollo gonadal. Observándose el máximo en el período de inicio de la gametogénesis.

El comportamiento general en el componente lipídico, sigue un patrón opuesto al ciclo de los carbohidratos. Se incrementa en el período de madurez, decreciendo en estadios de escaso desarrollo gonadal. La evolución del contenido en lípidos sería por tanto, directamente proporcional al desarrollo del ciclo gametogénico, tal y como observan Ansell *et al.* (1980), en la costa de Argel. Martínez (2002), en un estudio realizado a dos especies de solénidos (*Ensis siliqua* y *Solen marginatus*), también encuentra que la variación de los lípidos sigue la evolución del ciclo gametogénico, con valores positivos durante la madurez y valores negativos durante y después del desove. Por lo tanto, en todas estas especies podríamos decir que acumulan preferentemente carbohidratos que van a ser empleados en el desarrollo gametogénico y lo transforman en reservas lipídicas (Martínez, 2002).

La evolución de las proteínas de *Donax trunculus*, componente mayoritario, presenta pocas variaciones por lo que no se relaciona de un modo directo con la evolución del ciclo..

En resumen, a lo largo de la evolución del ciclo gametogénico, los carbohidratos mantienen una relación inversa con el ciclo, disminuyen conforme éste avanza. A medida que los carbohidratos disminuyen, el ciclo de los lípidos aumenta, mientras que las proteínas mantienen un patrón de evolución no relacionado con el desarrollo gametogénico.



1.1.1.4. CONCLUSIONES

La coquina presenta un período de madurez y puesta que se extiende de marzo a agosto. La etapa más óptima para la obtención de desoves se da entre marzo y julio. En estos meses en los que la mayor parte de coquinas se encuentran en estadio E3, el número de desoves en criadero es mayor y serán estos desoves los que llegan a semilla. *Donax trunculus* presenta un corto período de reposo encontrando que, como máximo un 43% de la población presentaba este estadio. A lo largo de la evolución del ciclo gametogénico, los carbohidratos mantienen una relación inversa con el ciclo, disminuyen conforme este avanza. A medida que los carbohidratos disminuyen, el ciclo de los lípidos aumenta, mientras que las proteínas mantienen un patrón de evolución no relacionado con el desarrollo gametogénico.

En cuanto a la variación de la composición bioquímica, no existen diferencias entre machos, hembras e individuos con sexos sin diferenciar.



1.1.2. LÍNEA 2. CULTIVO LARVARIO EN CRIADERO

1.1.2.1. INTRODUCCIÓN

La coquina está considerada como una especie de alto valor comercial. En Galicia, en la actualidad, alcanza en primera venta un valor en torno a los 30 €/kg. Los bancos naturales de coquina en la costa gallega están en regresión, por lo que es de interés el cultivo en criadero de la especie con fines de obtener semilla para su repoblación. Comenzó este trabajo con el estudio del ciclo reproductor de la misma población que se va a emplear como progenitores en el criadero. El conocimiento de los diferentes estadios embrionarios y tiempos de transformación, constituye una parte importante en el proceso de optimización del cultivo de cualquier especie de molusco bivalvo. El objetivo final, es la obtención de semilla de coquina que permita hacer repoblaciones en aquellos bancos donde la proporción de esta especie ha disminuido en los últimos años.

Durante estos años, se han estado llevando a cabo en criadero diversas experiencias de cultivo larvario de *Donax trunculus* con el fin de optimizar esta fase e incrementar la supervivencia y viabilidad de los desoves.

1.1.2.2. MATERIAL Y MÉTODOS

- Puestas

Los mismos progenitores que vienen del medio natural y que se utilizaron para el estudio del ciclo, de los bancos de Vilarrube en Valdoviño y playa de Abrela en O Vicedo, se trasladan al criadero y se depositan en tanques con una capacidad de 200 litros, con entrada constante de agua de mar filtrada. La coquina tiene un período de madurez comprendido entre marzo y agosto, los desoves se pueden obtener por el método clásico empleado con la almeja de choque térmico o bien manteniendo los reproductores en seco entre 2 y 12 horas.



- Embriología

Para controlar los tiempos en los que aparecen las diferentes fases del desarrollo embrionario de coquina, se observan las larvas cada 10 minutos al microscopio óptico. Desde la fase de trocófora hasta larva D, se toman muestras cada hora y a partir de este momento, el control se hará diariamente. En cada estadio del desarrollo se tomaron, al menos, 100 individuos, se midieron con un programa de Análisis de Imagen PC image y se fotografiaron usando el microscopio óptico.

- Cultivo larvario

Una vez producido el desove, los huevos fecundados se trasladan a tanques troncocónicos de fibra de vidrio, con una capacidad de 500 litros donde se mantienen con agua de mar filtrada a una temperatura de $21^{\circ}\text{C}\pm 1$ y con una aireación constante. El cultivo larvario se realiza en los mismos tanques en circuito cerrado, con renovación total de agua tres veces por semana. La densidad inicial de coquina en cada tanque está entre las 5 y 10 larvas por mililitro.

Dos veces por semana, se toman muestras, se observan al microscopio óptico para determinar los cambios morfológicos a lo largo del desarrollo, se miden un total de 100 larvas por muestra en un analizador de imagen, obteniendo datos de altura y longitud.

También se realiza un conteo de individuos a lo largo del desarrollo larvario para conseguir datos de mortalidad y supervivencia.

La alimentación diaria se basa en una dieta mixta de cuatro microalgas: *Isochrysis galvana*, *Paulova lutheri*, *Chaetoceros gracilis* y *Tetraselmis suecica* en la misma proporción, que son cultivadas en cámara isoterma ($19\pm 1^{\circ}\text{C}$) con luz continua. Se comienza con una dosis de 10 equivalentes por especie y se irá incrementando a demanda.

En 2009, se realiza una experiencia de estabulación de progenitores para relacionar la calidad de las puestas con el tiempo de permanencia de progenitores en criadero.



Además se sustituye el sistema de alimentación de reproductores, semilla y larvas de *Donax trunculus* y *Solen marginatus* por un sistema de cultivo continuo de fitoplancton. El sistema de producción de microalgas en continuo, se basa en un aporte constante del medio nutritivo a los recipientes de cultivo y en la obtención de la cosecha de microalgas, también constante (70-80 L/día por cada bolsa). Los recipientes utilizados son bolsas de 400 L, donde se van a cultivar las especies utilizadas como alimento en la planta de cultivo (*Tetraselmis suecica*, *Isochrysis galbana*, *T-iso*, *Monochrysis lutheri*, *Chaetoceros gracilis*, *Chaetoceros mulleri* y *Skeletonema costatum*).

Se dispone de un total de 40 bolsas de polietileno natural distribuidas en cuatro filas de diez, correspondiendo cada una a una especie, salvo en el caso de las diatomeas que comparten la misma fila. El agua de entrada se esteriliza por medio de un tratamiento por pasteurizado a 75°C durante unos 30 minutos. Los nutrientes utilizados, consisten en una mezcla de sales minerales, nitrato y fosfato (Solución C) que se dosifican de forma automática mientras que, el aporte a las diatomeas del silicato, se hace de forma manual. El cultivo se realiza en un invernadero con luz natural pero el sistema también cuenta con una iluminación artificial mediante parrillas de 4 tubos fluorescentes de tipo luz-día, cuyo encendido/apagado puede ser regulado mediante un sensor de temperatura que permite programar la iluminación a razón de la temperatura deseada para las bolsas.

Éstas se inoculan con matraces de 6 litros, con el fin de mantener el sistema lo más aséptico posible, la acometida de agua pasteurizada y la canalización de la cosecha se realiza en tubería de vidrio con conexiones de silicona que permiten su desinfección periódica con vapor a unos 100°C.

1.1.2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

- Puestas

Los desoves se obtienen manteniendo los reproductores en seco unas horas y también someténdolos a shocks térmicos. En períodos de madurez, es suficiente con



introducir las coquinas en tanques con agua de mar a 16°C, para que tengan lugar las puestas.

- Embriología

En la Tabla I se muestran los tiempos de aparición de los diferentes estadios embrionarios y larvarios de coquina.

Tabla I. Tiempos de aparición de los estadios embrionarios y larvarios de *Donax trunculus*

Estadios	Tiempos y talla
Huevo	0 h (85 µm)
2 células	1h 15'
4 células	2h 05'
8 células	3h 05'
16 células	4h 20'
32 células	5h 20'
Blástula	7h 20'
Gástrula	9h 40'
Trocófora	13h 45' (95 µm)
Larva D	41h 45' (105 µm)
Umbonada	8 días (130 µm)
Pediveliger	22 días (211 µm)
Postlarva	31 días (256 µm)

La coquina presenta un tamaño medio de huevo entre 80 µm y 85 µm. Tras la fecundación aparece el primer corpúsculo polar dándose aproximadamente al cabo de 1 hora el estadio de 2 células con 2 blastómeros desiguales. A las 2 horas aparece el estadio de 4 células con 3 blastómeros iguales y uno de mayor tamaño. Con una hora de diferencia entre cada uno, se suceden los estadios de 8, 16 y 32 células, a las 3, 4 y 5 horas post fecundación aproximadamente. La blástula aparece a las 7 horas y la gástrula al cabo de casi 10 horas. La trocófora de 95 µm de talla aparece pasadas las 12 horas, el estadio de larva D a los dos días aproximadamente. El pie aparece a los 22 días en coquina, aproximadamente al cabo de un mes de cultivo se produce la fijación.

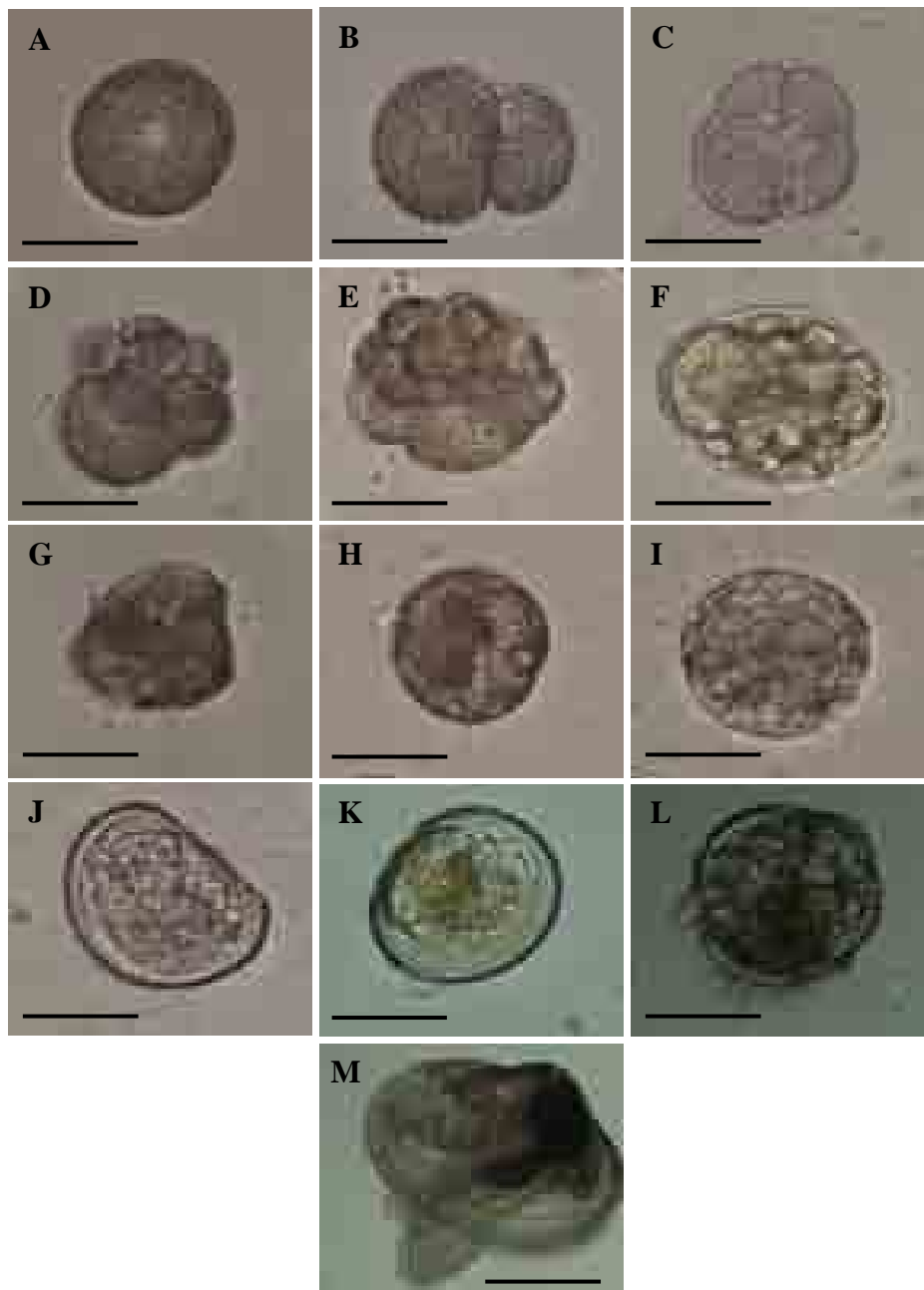


Fig. 11. Desarrollo embrionario y larvario de *Donax trunculus*. A) Huevo. B) Estadio de 2 células. C) Estadio de 4 células. D) Estadio de ocho células. E) Estadio de 16 células. F) Estadio de 32 células. G) Blástula. H) Gástrula. I) Trocófora. J) Larva D. K) Larva umbonada. L) Larva pediveliger. M) Postlarva.



- Cultivo larvario

En las experiencias de cultivo larvario de 2007 y 2008 se obtuvieron los primeros desoves en el mes de marzo y a finales de febrero, respectivamente. A partir de esta fecha, se suceden hasta el mes de julio. De todos los desoves obtenidos se hizo un seguimiento del desarrollo hasta la fijación. Los huevos tienen una talla media de 80 μ , después de fecundados sufren procesos de segmentación que darán al cabo de más de 12 horas a una larva trocófora de 95 μ . A los dos días se forma la larva D con talla media de 110 μ , la larva umbonada, con talla superior a 130 μ , se forma al cabo de ocho días aproximadamente. Entre los 15 y 20 días comienza a aparecer el pie, en este momento las larvas tienen una talla de 210 μ . Aproximadamente al cabo de un mes de cultivo, se produce la fijación.

La supervivencia larvaria fue baja, localizándose entre un 5% y un 10% en los desoves que llegaron a fijación.

En la gráfica de la figura 12, se representa la media de la evolución de las tallas de las larvas que llegaron a fijación.

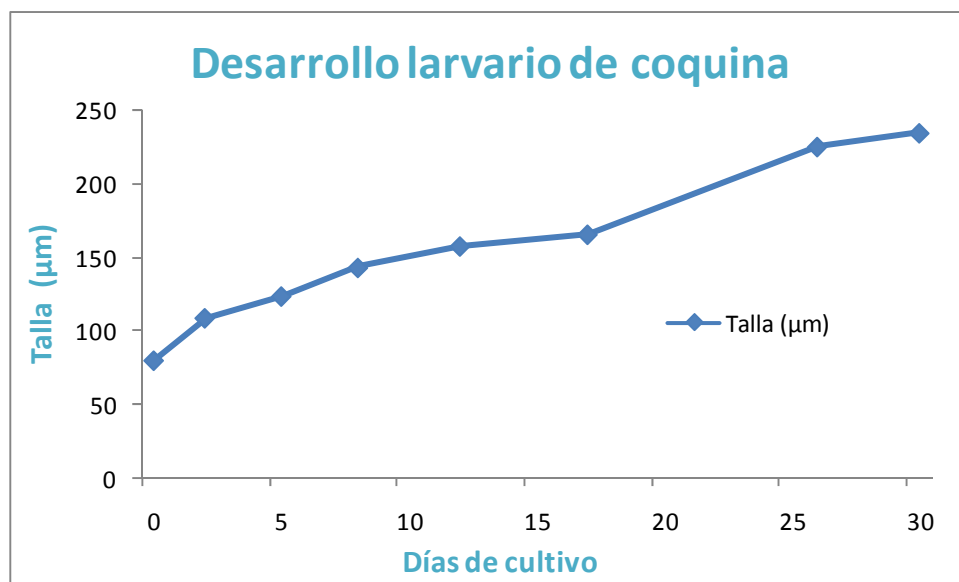


Fig. 12. Crecimiento en longitud de las larvas de *Donax trunculus* a lo largo del cultivo hasta fijación.



Con los resultados de cultivo larvario de coquina obtenidos en 2007 y 2008, se pone de manifiesto que esta fase de cultivo es crítica haciéndose necesario conseguir un incremento en la supervivencia larvaria.

En 2009, de cada uno de los cinco lotes de reproductores estabulados en el criadero, se obtuvieron varios desoves.

Tabla II. Relación del tiempo de estabulación de progenitores con los desoves y cultivos larvarios.

Lotes de reproductores	Desoves	Talla de ovocitos	Tiempo de permanencia en criadero	Talla de fijación	Tiempo hasta fijación	Supervivencia hasta fijación	Número de huevos por puesta
1 (12/02/09)	1A (17/03)	78 μm	5 días	299 μm	25 días	13%	3,5 millones
	1B (08/05)	78 μm	85 días	253 μm	23 días	18%	3 millones
2 (24/03/09)	2A (30/03)	79 μm	6 días				10 millones
	2B (08/05)	80 μm	45 días	275 μm	25 días	20%	6 millones
	2C (19/05)	82 μm	56 días	238 μm	30 días	31%	9,5 millones
	2D (21/05)	85 μm	58 días	280 μm	30 días	31%	3 millones
3 (22/04/09)	3A (08/05)	72 μm	16 días				3 millones
	3B (21/05)	75 μm	29 días	330 μm	32 días	19%	8 millones
4 (27/04/09)	4A (29/04)	77 μm	2 días	273 μm	34 días	21%	6 millones
	4B (21/05)	77 μm	24 días				21 millones
	4C (26/05)	85 μm	29 días	256 μm	30 días	22%	24 millones
	4D (28/05)	82 μm	31 días	260 μm	35 días	24%	10 millones
5 (28/05/09)	5A (29/05)	80 μm	1 día	350 μm	26 días	20%	3 millones
	5B (03/06)	73 μm	6 días	267 μm	29 días	24%	6 millones

El tamaño medio de los ovocitos de coquina es de 80 μm , algo superior al observado en almeja babosa por Cerviño-Otero *et al.* (2008) con 74 μm , al de almeja fina, 68 μm y al de navaja 71 μm , Da Costa *et al.* (2007). Al cabo de 25–30 días de cultivo la coquina alcanza la fijación, a diferencia del longueirón y longueirón vello que fijan a los 14 y 9 días, respectivamente (Da Costa, 2009) y algo más tarde que en almeja babosa que fija a los 22 días de cultivo. Las puestas 2A, 3A y 4B, mueren antes de fijar. El resto de desoves sí alcanzan la fijación con porcentajes de supervivencia comprendidos entre el 13% y 31%.

Los mejores datos de supervivencia larvaria, entre un 20% y un 31% se obtienen en las puestas cuyos reproductores han permanecido más tiempo en criadero, en los individuos no estabulados se obtuvieron peores resultados. Estudios microbiológicos



preliminares han puesto de manifiesto que la carga bacteriana de reproductores se reduce al cabo de un mes de permanencia en el criadero. En el caso de la puesta 4B, la mortalidad podría tener un origen microbiológico.

1.1.2.4. CONCLUSIONES

- Los desoves de *Donax trunculus*, se pueden obtener por el método clásico empleado en almeja, de choque térmico o bien manteniendo los reproductores en seco entre 2 y 12 horas. En períodos de madurez, es suficiente con introducir las coquinas en tanques con agua de mar a 16°C, para que tengan lugar las puestas.
- Los huevos tienen una talla media de 80 μ , después de fecundados, sufren procesos de segmentación que darán al cabo de más de 12 horas a una larva trocófora de 95 μ m. A los dos días se forma la larva D con talla media de 110 μ m, la larva umbonada con talla superior a 130 μ m se forma al cabo de ocho días, aproximadamente. Entre los 15 y 20 días comienza a aparecer el pie, en este momento las larvas tienen una talla de 210 μ m. Aproximadamente al cabo de un mes de cultivo se produce la fijación.
- El tiempo de permanencia de progenitores en criadero con una dieta y condiciones adecuadas, parece favorecer la supervivencia y viabilidad de las puestas durante el período larvario, manteniéndose entre un 20% y un 31% en aquellos desoves cuyos progenitores llevan un mes o más tiempo en el criadero.



1.1.3. LÍNEA 3. CULTIVO POSTLARVARIO Y DE SEMILLA

1.1.3.1. INTRODUCCIÓN

Entre los 25 y 30 días de cultivo, la coquina alcanza la fijación con una talla superior a las 250 μm . Una vez superado el período larvario, *Donax trunculus* comienza su vida bentónica, por lo que es necesario un nuevo sistema para el desarrollo de las postlarvas hasta una talla de entre 1500 y 2000 μm .

1.1.3.2. MATERIAL Y MÉTODOS

Cuando aparece el pie y desaparece el velo se transvasan las larvas a unos cilindros de malla inferior a ellas, de unos 150 μm de diámetro, con una fina capa de arena de aproximadamente 170 μm de diámetro. El flujo de agua y aireación, se mantiene por un sistema de “air-lift” descendente. Cada dos días se realiza un cambio de agua total y la alimentación se basa en una dieta mixta de fitoplancton cosechado en cultivo continuo. Dos veces por semana, se toman muestras y se miden un total de 100 larvas por muestra en un analizador de imagen. Cada 15 días se tamizan para su clasificación por tallas y desinfección de la arena. El cultivo de las postlarvas se realiza en cilindros de 150 μm de malla hasta alcanzar una talla superior a las 1500 - 2000 μm , aproximadamente (Fig. 13).



Fig. 13. Cilindro de 150 μm de malla con sustrato de arena.



1.1.3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al cabo de un mes de cultivo larvario, desaparece el velo por completo constituyéndose las postlarvas que se cultivan en cilindros con arena mayor de 170 μm como sustrato durante tres meses, hasta alcanzar una talla superior a las 2000 μm (Fig. 14). Pasado este tiempo, comienza la experiencia de preengorde en el medio natural. La supervivencia desde la fijación hasta el preengorde es del 36%.

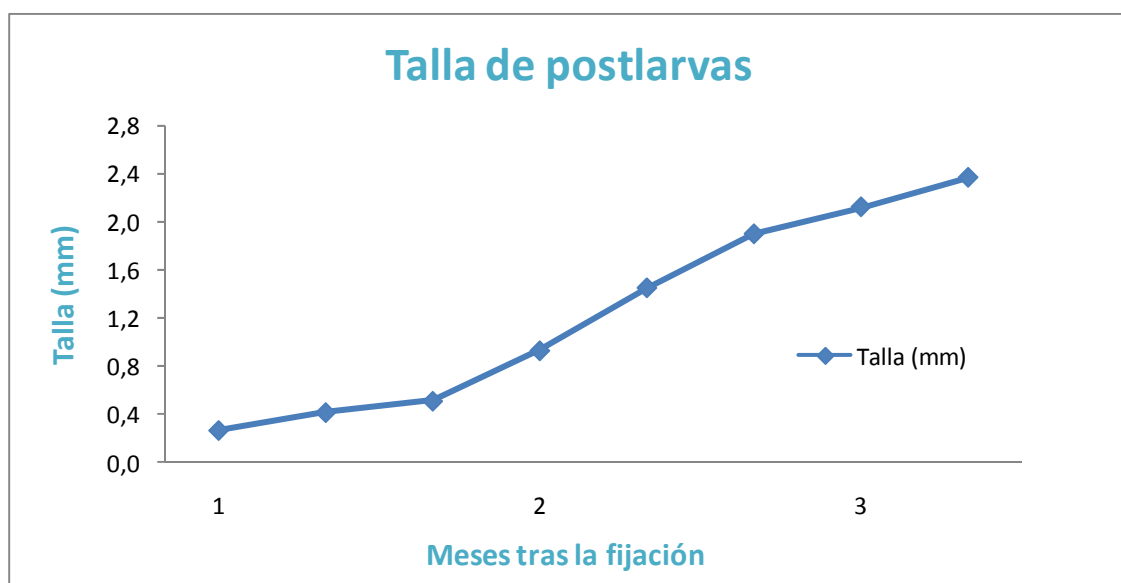


Fig. 14. Crecimiento en longitud de postlarvas de *Donax trunculus* a partir de su fijación.

1.1.3.4. CONCLUSIONES

Al cabo de 25-30 días de cultivo aproximadamente, desaparece el velo por completo formándose las postlarvas con una talla superior a 250 μm , éstas se cultivan en cilindros de 150 μm de malla con un fino sustrato de arena hasta alcanzar una talla de 2000 μm . El cultivo postlarvario dura aproximadamente tres meses. El empleo de sustrato en esta fase de cultivo favorece la supervivencia.

1.1.4. LÍNEA 4. PREENGORDE DE *DONAX TRUNCULUS*

1.1.4.1. INTRODUCCIÓN

El consumo de nutrientes en esta fase de cultivo es muy elevado, por lo que el esfuerzo en criadero hace necesario un cambio en las estructuras y sistemas de cultivo. El cultivo de semilla lleva implícito el cultivo de fitoplancton en volúmenes cada vez mayores, puesto que, tras la fijación, se produce un incremento radical en las tasas de crecimiento y de filtración. A mayor talla aumenta la demanda de alimento.

1.1.4.2. MATERIAL Y MÉTODOS

El seguimiento de semilla, una vez alcanzadas tallas de entre 1500 – 2000 μm , se lleva a cabo en el medio natural, se emplearon en 2007 dos tipos de estructura: cilindros con sustrato de arena y linternas, que albergarán a la coquina a lo largo de su período de crecimiento (Fig. 15).

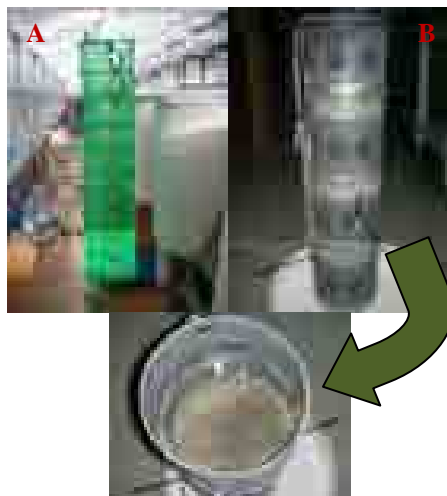


Fig. 15. Estructuras de cultivo de semilla en el medio natural. A) Linterna de 0,9 mm de malla. B) Cilindro con sustrato de arena.

En 2008, la semilla con tallas entre 2,7 mm y 5 mm se separa en tamices de 2000 y 3000 μm de luz de malla (T1 y T2) en lotes de densidades conocidas. Se utilizan linternas sin sustrato de 0,99 mm de malla, ya que tras los resultados de cultivo obtenidos el pasado año, se descartan los tambores con arena como estructuras de cultivo en el medio natural por problemas de recirculación de agua.

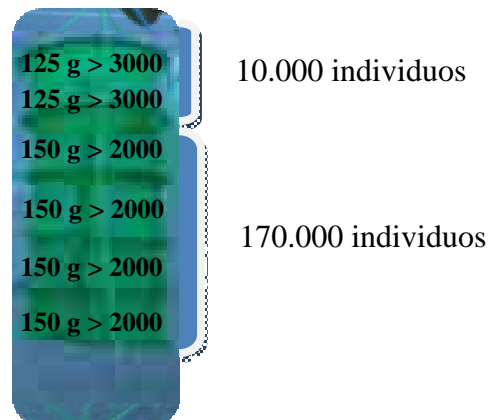


Fig. 16. Distribución de tallas y densidades de coquina en linterna de 0,99 mm de malla utilizada como estructura de cultivo de semilla en el medio natural.

En 2009, cuatro de los desoves obtenidos en criadero (1B, 2B, 2D y 4C) llegaron a semilla. Para evitar problemas de descenso en la salinidad y bajas temperaturas, en este año el preengorde, en lugar de, en el medio externo, se realizó en cilindros de 150 μm con sustrato de arena mayor de 170 μm dentro de tanques de 1000 litros de capacidad en criadero. Mensualmente se tamiza la semilla y se clasifica en función de la talla, utilizando tamices con distinta luz de malla a medida que va creciendo: >400 μm , >750 μm , >1000 μm , >1500 μm , >2000 μm , >2500 μm , >3000 μm y >4000 μm , para hacer un seguimiento de crecimiento y porcentaje de supervivencia.



Fig. 17. Tanques de cultivo de semilla en criadero.

1.1.4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En 2007, se realizó una doble experiencia de preengorde en los dos tipos de estructuras experimentales. La coquina separada inicialmente en tamices, con talla superior a 2000 y 3000 μm , se reparte en lotes de densidades conocidas que permitan llevar un seguimiento de los individuos en los dos tipos de estructuras.



Fig. 18. Densidades de coquina en las dos estructuras experimentales.

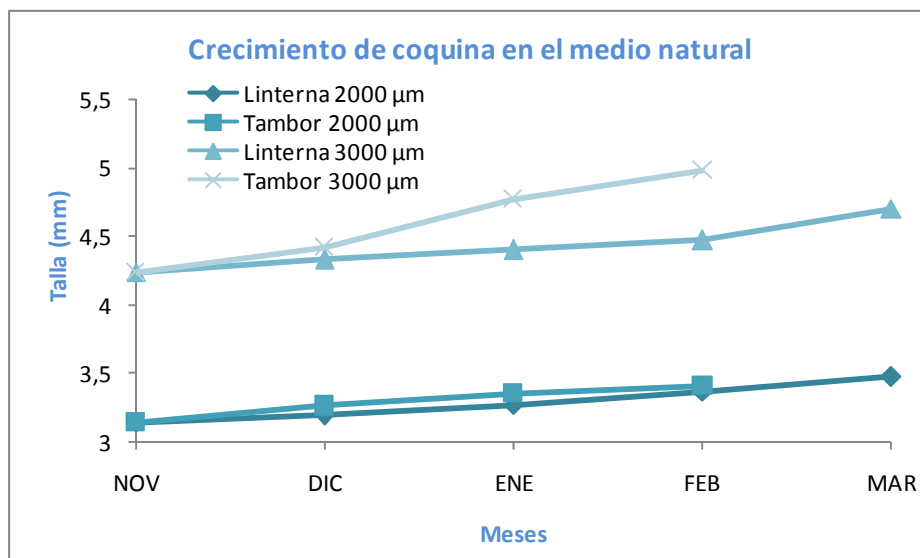


Fig. 19. Crecimiento de semilla de coquina de dos rangos de talla en el medio natural.

Las medidas iniciales de semilla son de 3,14 y 4,24 mm. El crecimiento de coquina en el medio natural transcurre de un modo lento en esta experiencia, produciéndose en una mayor proporción en los cilindros con sustrato de arena donde se alcanzan tallas de 3,41 y

4,98 mm al cabo de 4 meses del comienzo de la experiencia de cultivo, transcurrida durante los meses de invierno con una temperatura media de 12,4°C.

Aunque en un principio el crecimiento de semilla de coquina transcurre de un modo más rápido en los tambores con sustrato de arena, éstos se descartan como estructuras de cultivo en el medio natural por problemas de recirculación de agua que conlleva a la muerte de la semilla en el mes de febrero. Por este motivo, la estructura seleccionada para este tipo de experiencias, será la linterna sin sustrato de 0,99 mm de malla.

En 2008, la semilla que, al inicio de la experiencia queda retenida en tamices de 2000 μm , alcanza una talla final de 3,98 mm al cabo de ocho meses de cultivo en el medio natural, la retenida en tamices de 3000 μm llega a una talla de 7,5 mm. La temperatura del agua disminuye de 20°C en agosto hasta 12°C en diciembre. El crecimiento de la semilla es lento hasta el mes de noviembre, momento en que se traslada de nuevo al criadero, dado que las precipitaciones provocan una caída de la salinidad hasta valores de 15,6‰ haciendo que las condiciones de la ría donde está instalada no sean adecuadas para su crecimiento.



Fig. 20. (A-B). Semilla de coquina tras la experiencia de preengorde. A) Semilla mayor de 7 mm. B) Semilla mayor de 3 mm.

En la experiencia de preengorde tiene una supervivencia más alta, 78,5%, la semilla que parte con una talla mayor, la coquina que parte con 2,7 mm tiene un porcentaje de supervivencia mucho menor 5%.

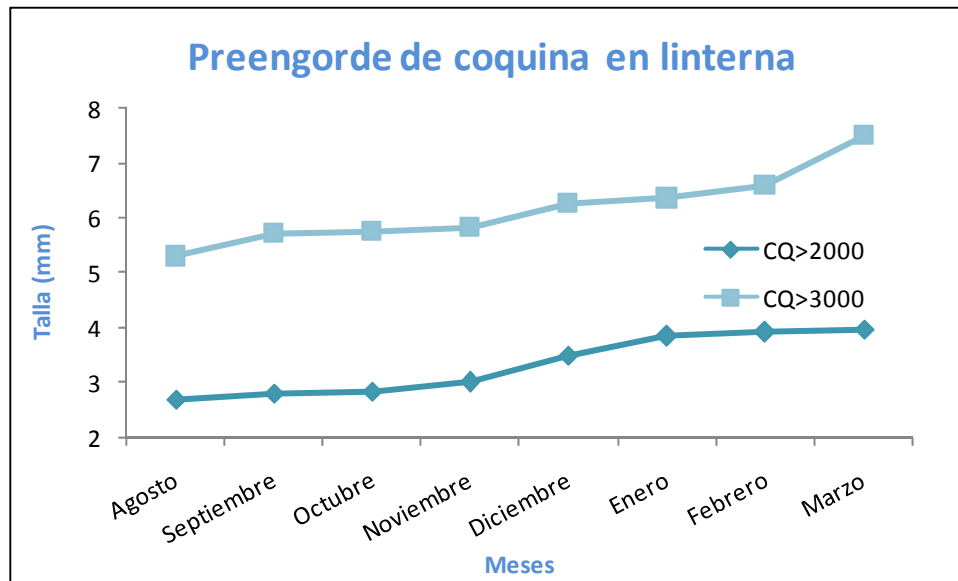


Fig. 21. Crecimiento de semilla de coquina en la experiencia de preengorde.

Estos resultados indican que, el cultivo de semilla en el medio natural con una talla adecuada, favorece la supervivencia en la etapa de preengorde.

La semilla de coquina resultado de esta experiencia, se trasladará a un banco natural para evaluar su capacidad de adaptación al medio.

En 2009, se hizo un seguimiento de la semilla obtenida. Cuatro fueron los desoves que llegan a semilla: La segunda puesta del lote de progenitores número 1 (1B), la segunda y cuarta puesta del lote de progenitores número 2 (2B y 2D) y la tercera puesta del lote de reproductores número 4 (4C). Ninguna de las primeras puestas de cada lote de progenitores superaron la experiencia.

Mensualmente se tamizaron y clasificaron por tallas para hacer un seguimiento de crecimiento y porcentaje de supervivencia. En las siguientes tablas, se representan las tallas en μm de cada uno de los desoves a lo largo de los siete meses de cultivo en criadero.



Tabla III. Tallas del desove 1B en μm a lo largo de siete meses de cultivo en criadero.

TAMIZ	JUNIO	JULIO	AGOSTO	SEPTIEMBRE	OCTUBRE	NOVIEMBRE	DICIEMBRE
>400	968,68	1007,71					
>750			1526,62				
>1000			1947,11	2078,12			
>1500				2587,57	2734,07	2926,62	
>2000				3074,33	3169,93	3241,06	3327,75
>2500					3859,6	4177,16	4245,56
>3000					5466,59	5805,96	5831,66

Tras siete meses de cultivo en criadero, la talla final de los individuos es de 5831 μm (5,8 mm). El porcentaje de supervivencia para este desove es de un 55%.

Tabla IV. Tallas del desove 2B en μm a lo largo de siete meses de cultivo en criadero.

TAMIZ	JUNIO	JULIO	AGOSTO	SEPTIEMBRE	OCTUBRE	NOVIEMBRE	DICIEMBRE
>400	889,77	1155,85					
>750			1395,38	1471,81			
>1000			1834,38	1867,94	1884,93	2067,84	
>1500			2261,24	2363,34	2363,36	2472,77	
>2000			3155,02	3236,43	3770	3870,19	
>2500					3973,64	4286,31	
>3000					5281,08	5417,23	5838,91

La talla final de los individuos de la puesta 2B es de 5839 μm (5,8 mm), al igual que el desove anterior, aunque el porcentaje de supervivencia fue algo menor con un 35%.

Tabla V. Tallas del desove 2D en μm a lo largo de siete meses de cultivo en criadero.

TAMIZ	JUNIO	JULIO	AGOSTO	SEPTIEMBRE	OCTUBRE	NOVIEMBRE	DICIEMBRE
>400	892,71	1111,9					
>750			1444,55	1483,25			
>1000			1809,85	2010,38	2066,17		
>1500			2421,47	2468,83	2657,61	2872,92	
>2000				2961,27	3378,92	3400,21	
>2500					4062,77	4138,71	
>3000					5665,07	5881,01	5902,84
<4000							7540,34



En este caso, la semilla alcanza una talla máxima de 7540 μm (7,5 mm) al cabo de siete meses de cultivo en criadero. El porcentaje de supervivencia fue de un 36%.

Tabla VI. Tallas del desove 4C en μm a lo largo de siete meses de cultivo en criadero.

TAMIZ	JUNIO	JULIO	AGOSTO	SEPTIEMBRE	OCTUBRE	NOVIEMBRE	DICIEMBRE
>400	890,34	1195,62					
>750			1337,88	1493,37	1527,11		
>1000			1838,69	1927,46	1931,45	2008,91	
>1500				2460,2	2565,94	2642,57	
>2000				3057,97	3123,74	3154,87	3576,14
>2500						3748,97	4002,43
>3000						5864,03	5920,09

El desove 4C, último de todos los cuatro en alcanzar la fijación, es el que menor talla final alcanza, 5920 μm (5,9 mm). El porcentaje de supervivencia es también el menor de los cuatro (13%).

1.1.4.4. CONCLUSIONES

Aunque, en un principio, el crecimiento de la semilla transcurre de un modo más rápido en los tambores con sustrato de arena, éstos se descartan como estructuras de cultivo en el medio natural por problemas de recirculación de agua que conlleva a la muerte de la semilla. Por este motivo, la estructura seleccionada para este tipo de experiencias, será la linterna sin sustrato de 0,99 mm de malla. El cultivo de semilla en el medio natural con una talla superior a 3000 μm , favorece la supervivencia en la etapa de preengorde.



1.1.5. LÍNEA 5. ADAPTACIÓN DE *DONAX TRUNCULUS* AL MEDIO NATURAL

1.1.5.1. INTRODUCCIÓN

Los bancos naturales de coquina han sufrido un notable descenso, estando en la actualidad restringidos a zonas muy concretas de la costa norte gallega, Martínez *et al.* (2003). Para su recuperación, una de las actividades a realizar en el CIMA de Ribadeo, es la obtención de semilla para realizar su siembra. Diversos factores afectan al crecimiento y supervivencia en el medio natural, tales como: la talla inicial de siembra, las condiciones ambientales, la competencia y el sistema empleado. En esta experiencia se estudia la adaptación al medio natural en estructuras de cultivo para poder hacer un seguimiento y así establecer un protocolo de repoblación.

1.1.5.2. MATERIAL Y MÉTODOS

Tras un año de cultivo en criadero, a finales de marzo de 2009, la semilla de coquina, con una talla comprendida entre los 7 y 8 mm, se traslada a un banco natural, conocido con el nombre de “O Lombo das Navallas”, localizado en la Ría de O Barqueiro. Los individuos se colocan en cuatro jaulas con armazón de acero inoxidable con un área de 50 x 50 cm y 50 cm de altura, recubiertas con malla rígida de 2 mm de luz. Las jaulas se entierran a 30 cm de profundidad dejando 20 cm al descubierto. La ubicación de estas estructuras se sitúa en las coordenadas 29T X: 605271 Y: 4843567 formato UTM y Datum European 1950. La densidad inicial es de 6000 individuos/m². Las condiciones ambientales, temperatura, pH, salinidad y oxígeno disuelto, se midieron semanalmente en este punto.

Mensualmente, en períodos de bajamar entre los 0,43 y 0,46 m de marea, se hace un muestreo de la población para el estudio de biometrías: longitud (mm) y peso (g). Se obtienen datos de crecimiento y supervivencia para lo cual se utiliza un calibre digital y una balanza de precisión. Posteriormente, se limpian las estructuras y se evalúa la posible incidencia de depredadores.



Fig. 22. Siembra de semilla de coquina en jaulas en el banco de O Lombo das Navallas.

1.1.5.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En los siguientes gráficos se representa el crecimiento en peso y longitud de semilla de coquina en la experiencia de adaptación al medio natural.

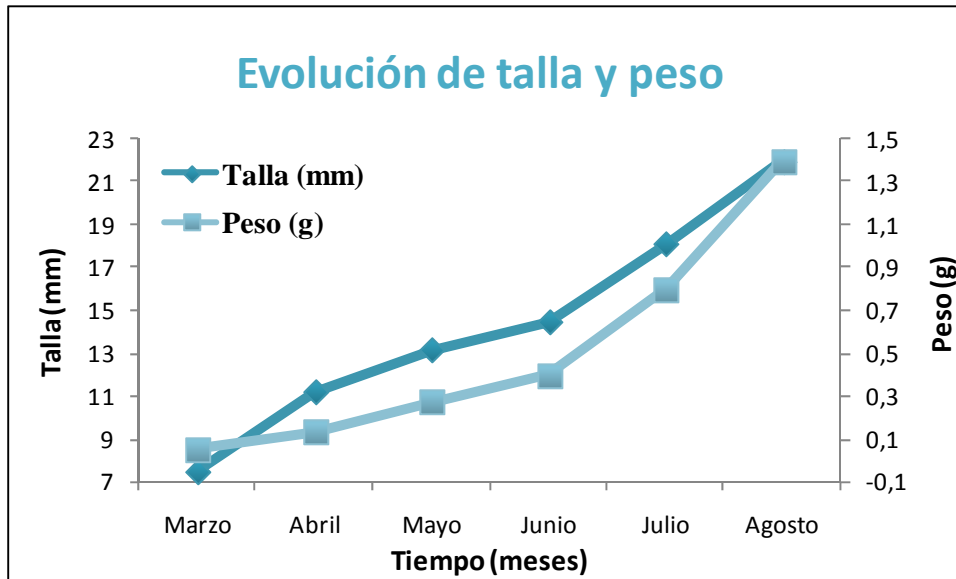


Fig. 23. Evolución de talla y peso en los meses de estudio.

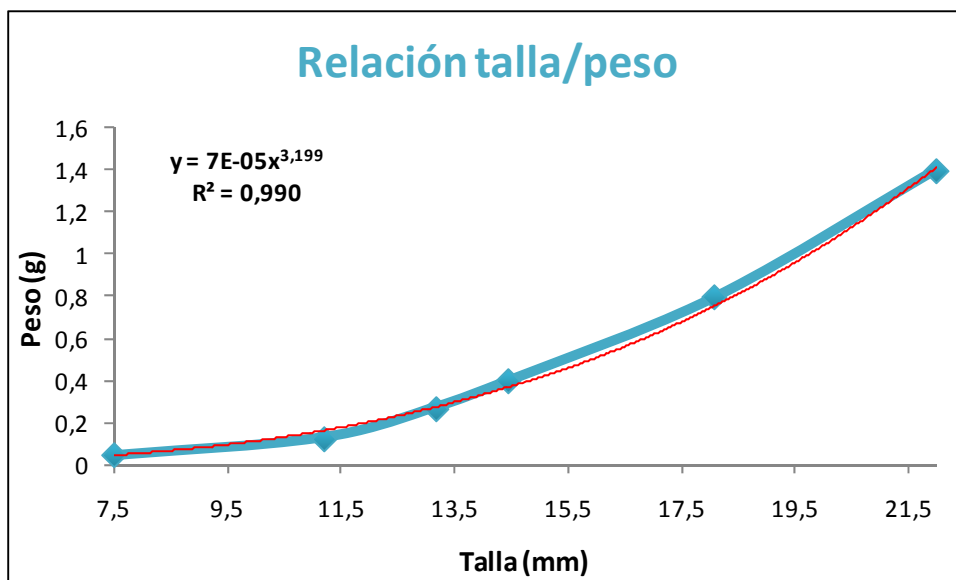


Fig. 24. Relación talla - peso, línea de ajuste y ecuación.

La coquina, con una talla inicial de siembra de entre 7 y 8 mm y 0,05 g de peso, alcanza una talla media de 22 mm y un peso de 1,5 g al cabo de 5 meses. En cuanto a la relación talla – peso, la ecuación de regresión sigue un modelo potencial. Para los rangos de talla, entre 7,5 y 22 mm y peso, 0,05 y 1,5 g con los que se trabaja en esta experiencia, la relación de alometría parece ser positiva, sin embargo, Gaspar (1996), observa una relación alométrica negativa en coquinas de la costa portuguesa con diferentes rangos de talla, de hasta 44 mm y 11 g de peso. En *Solen marginatus* y *Ensis siliqua*, la relación longitud – peso, se ajusta también a una ecuación potencial donde la alometría es negativa,



Martínez (2002). La supervivencia tras 5 meses es del 13%. La mortalidad, pasado un mes del comienzo de la experiencia, fue muy elevada, 87%, estabilizándose y reduciéndose al 0% en los 4 meses sucesivos.

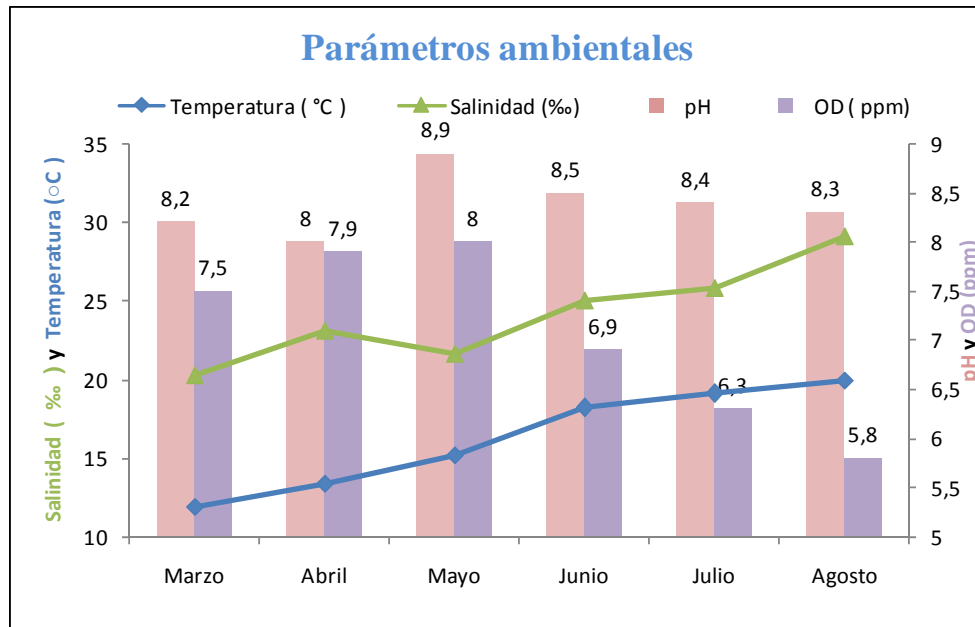


Fig. 25. Condiciones ambientales en el banco natural.

La temperatura sigue un ciclo estacional con valores de 12°C en el mes de marzo, ascendiendo hasta casi 20°C en el mes de agosto. La salinidad tiene un comportamiento similar, partiendo de valores del 23‰ al comienzo de la experiencia, incrementándose hasta un 29‰ en agosto. El oxígeno disuelto sigue una evolución inversa a la salinidad y temperatura presentando los mínimos valores hacia el mes de agosto. El pH sigue una evolución más o menos uniforme a lo largo de los meses de estudio.

1.1.5.4. CONCLUSIONES

Se concluye, que es viable la repoblación de coquina con la siembra en el medio natural, aunque, la talla y período del año en que se realiza la siembra, van a influir en el porcentaje de supervivencia. La mortalidad en el primer mes es elevada, reduciéndose por completo en los meses sucesivos, lo que indica que la dificultad se encuentra en la fase de adaptación a las nuevas condiciones. En esta experiencia la coquina, con una talla media



C.A. Galicia-Subproy. 1. Cultivo de coquina (*Donax trunculus*) y longueirón (*Solen marginatus*)

inicial de 7,5 mm y 0,05 g de peso, alcanza una talla de 22 mm y un peso de 1,5 g al cabo de 5 meses de la siembra en el medio natural.



1.1.6. LÍNEA 6. PATOLOGÍA DE *DONAX TRUNCULUS*

1.1.6.1. INTRODUCCIÓN

1.1.6.1.1. Seguimiento microbiológico de reproductores y desoves de *D. trunculus*

El cultivo de coquina en criadero se ve afectado por frecuentes episodios de mortalidad que comprometen la reproducción. La ausencia de estudios microbiológicos sobre esta especie, hace necesario abordar el conocimiento de la microbiota asociada a los cultivos para intentar identificar los agentes causales del problema. Dado que los patógenos larvarios descritos para cultivos larvarios de bivalvos son en su mayoría miembros del género *Vibrio*, el objetivo inicial ha de ser conocer sus poblaciones.

Paralelo al cultivo, se hace un seguimiento microbiológico de reproductores y desoves de *Donax trunculus* para evaluar la incidencia bacteriana en la viabilidad de los individuos en el criadero.

1.1.6.1.2. Histopatología de la coquina

En los últimos años se ha comenzado con ensayos de cultivo en criadero de *Donax trunculus*, que pretenden sentar las bases para el desarrollo de una futura actividad acuicultora centrada en estas especies (Louzán *et al.*, 2007; Martínez *et al.*, 2008). Poco se conoce del aspecto patológico de estos moluscos (Louzán, 2008; Carballal *et al.*, 2008).

El desarrollo de una línea de investigación sobre las alteraciones patológicas que afectan a un grupo de organismos de interés comercial, y que busque obtener resultados útiles para la gestión de la explotación del recurso en una región, debe contemplar tres etapas (Villalba, informe interno Xunta de Galicia):

1. Una primera aproximación que permita identificar los organismos simbioses y alteraciones patológicas que afectan al grupo objeto de estudio.
2. Profundización en el estudio de las alteraciones patológicas detectadas potencialmente dañinas, con el fin de adquirir un nivel de conocimientos suficientes para abordar la siguiente etapa.



3. Desarrollo de medidas de lucha para que los problemas patológicos se mitiguen o desaparezcan.

El objetivo de este estudio es conocer los simbiontes y otras alteraciones patológicas presentes en un banco natural de coquina (*Donax trunculus*) de Vilarrube (Valdoviño, Galicia).

1.1.6.2. MATERIAL Y MÉTODOS

1.1.6.2.1. Seguimiento microbiológico de reproductores y desoves de *D. trunculus*

Se toman muestras de los reproductores que entran en el criadero, de las larvas y del agua de cultivo. Para la siembra de muestras se utilizan los medios Agar Marino (AM, Pronadisa) para recuento de bacterias heterótrofas marinas y Tiosulfato-Citrato-Bilis-Sacarosa (TCBS, Oxoid), medio selectivo para vibrios. Las placas se incuban a 25°C. El medio TCBS se lee en 24-48 horas, para evitar los problemas de reversión de color de las colonias, que dificultaría su interpretación. El AM se debe dejar hasta 7 días para permitir el crecimiento de los tipos más lentos, como pueden ser algunas bacterias pigmentadas. En el caso de muestras cuantitativas, se recuentan aquellas placas con crecimiento entre 30 y 300 unidades formadoras de colonia (ufc) por placa.

En todas las placas se seleccionan los tipos de colonia representativos, aislándose en placas de AM. Se dan los pases necesarios para asegurar la pureza del cultivo y se congelan a -80°C en Caldo Marino con glicerol (15%) para su conservación.

Procesado de las muestras de reproductores:

Se abre el ejemplar. Se lava con agua de mar estéril (AME). Se toma un trozo de gónada cortada asépticamente, con un peso conocido (≈ 0.08 g). Se coloca en un mortero estéril, donde se homogeniza con 1 ml de AME. Se hacen las diluciones seriadas necesarias, en tubos estériles con 4.5 ml de AME, sembrándose 100 μ l en los medios AM y TCBS. Los datos obtenidos se expresan en ufc por gramo (ufc/g) de gónada.



Muestras de cultivos larvarios:

Para el muestreo se escoge el cambio de agua de los tanques de cultivo, después de lavar en el tamiz donde quedan retenidas las larvas con la propia agua del criadero. Se toma la muestra directamente, con asa de siembra estéril de 1 μ l, y se extiende sobre las placas de AM y TCBS. Se obtiene una estimación cualitativa de las poblaciones bacterianas, aunque permitiendo la comparación entre muestras al unificar el volumen sembrado.

Muestras de agua de cultivo:

Se recoge del tanque una muestra del agua de cultivo justo antes del vaciado para el cambio de agua. En el laboratorio, se hacen las diluciones seriadas apropiadas y se siembran 100 μ l de cada una en placas de AM y TCBS. Se obtienen datos cuantitativos, que se expresan en ufc/ml.

1.1.6.2.2. Histopatología de la coquina

Desde noviembre del año 2006 y durante el año 2007, se han realizado muestreos mensuales de 25 coquinas adultas (*Donax trunculus*) del banco natural de Vilarrube en Valdoviño, a las que se les ha realizado un análisis histopatológico para la evaluación de la presencia de parásitos y alteraciones patológicas. También se estimó la presencia de parásitos de tipo *Perkinsus* por cultivo de lámina branquial en tioglicolato. Durante el año 2008, se realizó un seguimiento parasitológico en este mismo banco, y para ello se tomaron muestras estacionales de 25 coquinas adultas. En este último año, también se ha estudiado el sistema de defensa interno de las coquinas, y para ello se han estudiado las características estructurales de las células de la hemolinfa y su contenido enzimático.

Para el estudio histopatológico de coquina, tras la toma de los índices morfométricos (longitud y peso vivo), se llevó a cabo un análisis del aspecto macroscópico de los distintos ejemplares para determinar la presencia de alguna anomalía, como deformaciones en las valvas, pústulas en masa visceral, lesiones en branquia, presencia de



macroparásitos, etc. Posteriormente, se realizó un corte sagital de un fragmento, de unos 5 mm de espesor que contenía el mayor número de órganos posible (masa visceral, pie, lóbulos del manto y branquias), como solución fijadora se utilizó la solución de Davidson, después de un lavado con alcohol de 70° se procedió a la preparación del tejido en un procesador automático para su posterior inclusión en parafina y formación de bloques. Para el estudio al microscopio óptico se realizaron cortes histológicos de 5 micras teñidos con hematoxilina de Harris-eosina.

En los meses de abril, mayo, junio y octubre se evaluó la presencia de parásitos de tipo *Perkinus*. Para ello, se incubó una lámina branquial de cada una de las coquinas en caldo de tioglicolato durante una semana a 20°C y en la oscuridad. Después se tiñó cada lámina branquial con lugol para la observación de prezoosporangios con el microscopio óptico (Ray, 1966).

En coquina se tomaron también muestras de hemolinfa, realizando una punción en el seno del músculo aductor con una aguja y jeringuilla estériles. Para ello, previamente se hizo una muesca a la altura de este músculo con ayuda de una lima. El número de hemocitos en circulación se determinó en una cámara de recuento tipo Malassez. Se realizaron citocentrifugaciones para obtener frotis de hemocitos sobre portaobjetos, que se fijaron y tiñeron con el kit Hemacolor. Para el estudio de la ultraestructura de los hemocitos, se agrupó la hemolinfa de 4 individuos que se había extraído en el fijador 2.5 % de glutaraldehído en tampón cacodilato 0.1 M. Después de un lavado en tampón, se incluyeron los hemocitos en 1% de agar, y se cortaron pequeñas piezas que se incluyeron en Epon. Se realizaron cortes ultrafinos (50-70 nm) que se contrastaron para su observación en el microscopio electrónico. Para el estudio del contenido enzimático de los hemocitos se utilizó el sistema colorimétrico API ZYM (BioMérieux), se siguieron las instrucciones del Kit y las medidas se llevaron a cabo en la hemolinfa de 6 individuos, realizando 2 grupos de 3 individuos.



1.1.6.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.1.6.3.1. Seguimiento microbiológico de reproductores y desoves de *D. trunculus*

Reproductores

En 2008 se analizaron 5 lotes de reproductores, que llegaron al criadero entre los meses de marzo y julio procedentes del banco ubicado en la Ría de Cedeira.

En los controles iniciales los recuentos de bacterias heterótrofas marinas oscilaron entre 5.0×10^3 y 3.4×10^8 ufc/g, con valores medios de 4.6×10^7 ufc/g. Los contenidos de vibrios, estimados por el crecimiento en TCBS, variaron desde muestras por debajo del límite de detección en este medio hasta valores de 4.3×10^6 ufc/g, con una media de 3.0×10^5 ufc/g.

En general, a partir de finales del mes de mayo las concentraciones de bacterias en la gónada de los reproductores de coquina que llegaban al criadero fueron más elevadas, aumentando también los contenidos de vibrios. En lo que respecta a su evolución después de la permanencia en el criadero, los lotes que entran en junio y julio rebajan la carga bacteriana, tanto en bacterias heterótrofas marinas como en poblaciones estimadas de vibrios.

Durante el año 2009 se han analizado 7 lotes de reproductores (Lote 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7) con dos orígenes geográficos diferentes, mantenidos en el criadero durante diferentes períodos entre los meses de febrero y octubre.

Lote de reproductores 1. Cedeira.

Llegan al criadero con carga bacteriana muy variable entre individuos. En el control 1 no hay reducción de vibrios, sí en el control final.



Lote de reproductores 2. Cedeira.

Llegan al criadero bien, es el mejor lote, y se mantienen así en los controles medio y final.

Lote de reproductores 3. Cedeira.

Llegan al criadero bien, con una carga no muy elevada de vibrios, que aumenta en el control final.

Lote de reproductores 4. O Vicedo.

Llegan con elevada carga (vibrios), reduciéndose en el primer control y aumentando de nuevo en el final.

Lote de reproductores 5. Cedeira.

Llegan bastante cargados, pero van limpiando durante la estancia.

Lote de reproductores 6. Cedeira.

Llegan bien y reducen en el criadero.

Lote de reproductores 7. Cedeira.

Llegan con elevada carga (vibrios), reduciéndose en el primer control y aumentando de nuevo en el control final.

Cultivo larvario

De la primera puesta (puesta 1-marzo) sólo hay un análisis puntual, en el momento en que ya se van a desechar las larvas, cultivadas con antibiótico, por elevadas



mortalidades. Hay una carga elevada de vibrios, seleccionándose dos aislados que pueden ser ensayados en el futuro para elucidar su papel en las mortalidades, bien como patógenos oportunistas bien como simples comensales.

La segunda puesta (abril) parte con elevada carga bacteriana, tanto en AM como en TCBS, mayor en el caso de las larvas cultivadas sin antibiótico. Sin embargo, en el agua de cultivo, con o sin antibiótico, apenas se detectan vibrios y las bacterias heterótrofas marinas están en niveles normales (10^4 ufc/ml). La evolución es muy preocupante en los cultivos sin antibiótico, según se refleja en las placas de TCBS. En la muestra final, cuando se elimina el cultivo (talla 120-150 μ m), hay un tipo de colonia predominante en este medio, común tanto a larvas con y sin tratamiento antibiótico, en este último caso además cultivo puro. Dado que las muestras de agua no presentan carga de vibrios (o está por debajo de 10^1 ufc/ml), todo parece indicar que el problema, de tener un origen bacteriológico, comenzó en las propias larvas, desde el inicio del cultivo. Su evolución parece más rápida sin el tratamiento con antibiótico, pero de cualquier manera este no es suficiente. Sólo en una muestra puntual hay presencia de vibrios en el agua de cultivo, lo que se correspondería con un pico en la infección larvaria que hace que las bacterias inicialmente asociadas a las larvas proliferen en el medio.

La tercera puesta (mayo) presenta carga bacteriana inicial, tanto en AM como en TCBS. Las diferencias a los 4 días de cultivo entre los lotes sin y con antibiótico radican en los tipos de colonias en las placas de TCBS correspondientes a las muestras de larvas, mientras que en AM el crecimiento es tal que es imposible diferenciar. Al igual que ocurre en la puesta anterior, la carga bacteriana está asociada a las larvas, mientras en el agua de cultivo no hay vibrios y los tipos de heterótrofas marinas (10^5 ufc/ml) corresponden a bacterias oxidativas. Cuatro días después de esta muestra, las mortalidades obligan a eliminar las larvas sin antibiótico. En cuanto al cultivo con antibiótico, después de 11 días de cultivo la muestra de larvas apenas presenta crecimiento en TCBS, aunque sí en AM, de donde se aíslan entre otras dos bacterias fermentativas. El agua presenta crecimientos bajos en TCBS y se mantienen los recuentos en AM (10^5 ufc/ml), con presencia sólo de bacterias oxidativas. Finalmente, después de 18 días de cultivo, se eliminan las larvas cultivadas con antibiótico por mortalidades, observándose un tipo de colonia predominante en TCBS.



La cuarta puesta (mayo) parte de nuevo con carga bacteriana asociada a las larvas, según se refleja en el medio TCBS. Dados los malos resultados de los cultivos larvarios previos, se decide mantener todo el lote con tratamiento de antibiótico. A pesar de ello, las larvas continúan mostrando una carga muy elevada, mientras en el agua no se detecta crecimiento de vibrios (TCBS) y los recuentos en AM están en niveles normales (8.9×10^4 ufc/ml). A los 17 días se elimina el cultivo, pero problemas técnicos impidieron la toma de muestra.

La quinta puesta (mayo), a diferencia de las anteriores, comienza con una carga bacteriana baja. Se divide en tres lotes: sin antibiótico, con antibiótico y con dosis de antibiótico doble. Al cabo de cuatro días de cultivo, estos recuentos en TCBS sólo se incrementan ligeramente en las larvas sin antibiótico, mientras en las muestras del agua de cultivo no hay crecimiento. En cuanto a las siembras de larvas en AM, en el lote sin antibiótico se aíslan bacterias fermentativas, en el lote con antibiótico sólo se aíslan bacterias oxidativas y en el lote con antibiótico doble se aíslan de ambos tipos. En el agua de los cultivos, de dónde sólo se aíslan en todos los casos bacterias oxidativas, el menor recuento corresponde al cultivo sin antibiótico, seguido por aquel con antibiótico doble y los mayores números se dan en las placas del lote tratado con dosis normal de antibiótico. Esta tendencia se mantendrá a lo largo de todo el cultivo.

A los 11 días se aprecian diferencias en los tipos (TCBS) asociados a las larvas cultivadas sin antibiótico y con antibiótico o antibiótico doble. En las muestras de agua, sólo hay crecimiento en TCBS en las correspondientes al antibiótico en dosis doble. Con respecto al AM, la carga en las larvas con los tratamientos con antibiótico es tal que no se puede diferenciar nada. No ocurre así con las placas correspondientes al cultivo sin antibiótico, donde se aíslan bacterias fermentativas y oxidativas. En el agua tratada, con recuentos mayores que aquella sin tratar, aparece un tipo claramente dominante (oxidativa) en AM.

Después de 18 días de cultivo se eliminan las larvas sin antibiótico, con elevada carga en TCBS (dos tipos predominantes). En las muestras de agua, aunque el contenido no es elevado, hay prácticamente un cultivo puro. A pesar de ello, en AM los recuentos en



el agua de cultivo son nuevamente los más bajos. En las larvas, el crecimiento es abundante, con diferentes tipos y claro predominio de bacterias fermentativas. Las larvas tratadas presentan también elevada carga bacteriana en TCBS, mientras en el agua no hay apenas crecimiento. En AM presentan menos tipos que las larvas sin antibiótico, prácticamente los mismos en ambos casos.

Al cabo de 25 días, ambos tipos de larvas presentan un cultivo puro en TCBS, en mayor número en aquellas con antibiótico doble, sin que haya crecimiento en el agua de cultivo. Todos los aislados de AM de larvas corresponden a bacterias oxidativas, al igual que ocurre con los seleccionados del agua de cultivo.

A los 29 días de cultivo se eliminan todas las larvas. En TCBS de nuevo hay un crecimiento en cultivo puro y los aislados de AM se corresponden con bacterias fermentativas mayoritariamente.

En 2009 se analizaron las puestas que llegaron a semilla y también las que no alcanzaron este estadio.

Puestas que llegaron a semilla

Puesta 1B

La carga inicial de las larvas es relativamente alta en AM y baja en TCBS. No hay apenas vibrios asociados ni a las larvas ni al agua durante todo el cultivo. Es la 2ª puesta del Lote 1, a los 85 días de la llegada de progenitores al criadero. En el control que se les realiza 10 días después, se ve una reducción de la carga de vibrios.

Puesta 2B

La carga inicial de las larvas es elevada en AM y media-alta en TCBS (vibrios). Los vibrios se rebajan desde el principio, y nunca se detectan en el agua de cultivo. Es la 2ª puesta del Lote 2, a los 45 días de la llegada de reproductores al criadero. Son el mejor



lote, aunque la primera puesta de este lote va mal. En el control que se hace 10 días después del desove se ve un ligero aumento de la carga bacteriana, aunque no importante.

Puesta 2D

La carga inicial de las larvas es baja en ambos medios. Apenas se detectan vibrios, ni asociados a larvas ni al agua. Es la 4ª puesta del Lote 2, producida a los 58 días de estancia en criadero.

Puesta 4C con antibiótico

Las larvas tienen una elevada carga bacteriana inicial, tanto en AM como en TCBS. Se reducen drásticamente (con antibiótico) los vibrios tanto en larvas como en el agua de cultivo, aumentando sólo justo antes de fijación. Es la 3ª puesta del Lote 4, producida a los 29 días. Los progenitores llegaron al criadero con una carga bacteriana elevada. En el siguiente control que se realiza (1 mes después) se ve una reducción de la carga de vibrios.

Puestas que no llegaron a semilla

Puesta 1A

No se detectan vibrios asociados, ni siquiera en la muestra inicial. La microbiología, al menos de forma preliminar, no justifica las mortalidades.

Puesta 2A

La carga inicial de vibrios es muy alta. No se vuelven a detectar prácticamente en todo el cultivo, sólo puntualmente en el cultivo FCA-22°C. En las muestras correspondientes a las mortalidades de ambos lotes no aparecen vibrios en un número que las justifique.



Puesta 4A

La carga inicial es media. Hay vibrios asociados a las larvas durante todo el cultivo, aumentando antes de fijación y disparándose en las muestras de las mortalidades. Concordaría con un episodio de origen bacteriano, bien por las propias poblaciones bacterianas presentes, o bien por un desove con problemas desde el principio que resulta más susceptible y posibilita proliferaciones bacterianas por encima de los límites deseados.

Puesta 3A

La carga inicial es muy elevada. Hay vibrios asociados a las larvas durante todo el cultivo.

Puesta 2C

En las muestras correspondientes a las mortalidades no hay vibrios.

Puesta 3B

La carga bacteriana inicial es baja. No hay vibrios asociados hasta el momento de la fijación en que se detectan tanto en larvas como en agua. También están en las muestras de la mortalidad.

Puesta 4B

Las muestras de larvas muertas presentan una población de vibrios muy importante.

Puesta 4C sin antibiótico

La carga inicial es muy elevada. Aparecen vibrios en la muestra siguiente, pero no se vuelven a detectar hasta las muestras correspondientes a las mortalidades.



Puesta 4D

Aparecen vibrios asociados a las larvas muertas.

Puesta 5A

La carga bacteriana inicial es media. Se detectan vibrios a los 3 y 24 días de cultivo.

Puesta 5B

En las muestras correspondientes a las mortalidades no hay vibrios.

De los distintos episodios de mortalidades se ha obtenido una colección de aislados. De 10 lotes de los que se ha cogido muestra coincidiendo con las mortalidades se han aislado un total de 36 cepas, 12 del medio selectivo para vibrios TCBS y 24 del medio general Agar Marino (AM). Con estos aislados se podrán realizar ensayos de patogenicidad para establecer su papel real en las mortalidades, bien como causantes de ellas o bien como colonizadores secundarios una vez que éstas se produjeron, aprovechando unas condiciones favorables para su proliferación. También es necesario conocer su posición taxonómica, con el fin de poder identificar aquellos que puedan constituir un riesgo para los cultivos de coquina. Además, así se podrá comprobar si se repiten los mismos tipos bacterianos.

Según estos resultados, parece que la mejor época para llevar reproductores a criadero, es la comprendida entre abril y mayo, en esta etapa de puestas, la carga bacteriana se mantiene en un nivel medio-bajo, especialmente de vibrios. Desde un punto de vista microbiológico, el mejor lote fue el 2, que a su vez tuvo 2 de las 4 puestas viables.

Los reproductores en el mes de junio presentan una carga bacteriana baja. Se puede descartar una alta carga relacionada con el origen geográfico, porque este año hay lotes de Cedeira que llegan muy bien.



Respecto a las puestas, en las 4 que fueron bien no se detectaron vibrios asociados, especialmente en lo que se refiere a las propias larvas, aunque hubo también puestas que fueron mal en las que no se detectaron vibrios. Esto parece indicar que la presencia de vibrios se traduce en problemas, pero la ausencia no garantiza el éxito de la puesta. De todos modos, si se consiguen controlar durante el cultivo se minimiza uno de los factores de riesgo para las mortalidades, además de ser un indicador del estado del medio ambiente, según los tipos que crezcan (predominio de bacterias fermentativas sobre las oxidativas suele indicar un ambiente con menos oxígeno, por diversas causas posibles). Otra observación importante es un aumento, en muchos casos, de los vibrios en el momento de la fijación. La no detección de vibrios en larvas muertas puede deberse a dos razones: Que no hayan tenido que ver en la mortalidad, o que las larvas lleven ya tiempo muertas y las bacterias las hayan “abandonado”.

En general, parece que los vibrios sí están relacionados, como ocurre en los cultivos larvarios en criadero de los otros bivalvos estudiados hasta el momento, con los episodios de mortalidades. Pero en este caso otros factores tienen también mucha importancia, lo cual podría ser esperable en el cultivo de una nueva especie.

1.1.6.3.2. Histopatología de la coquina

El examen de las preparaciones histológicas mostró que algunas de las coquinas presentaban organismos de tipo bacteriano, protistas y alguna metacercaria de trematodo (Tablas VII y VIII). Dentro de las bacterias, se observaron colonias intracelulares de organismos de tipo rickettsiano en epitelios de túbulos digestivos (Fig. 26). En los dos años de estudio, las prevalencias máximas fueron del 60% y se registraron en mayo y septiembre el primer año, y en mayo y finales de agosto el segundo año, por lo que podría existir una variación estacional. En cualquier caso, la intensidad de infección fue generalmente baja, aunque el primer año de estudio, en el mes de septiembre, el 20% de las coquinas tenían una intensidad moderada de rickettsias. Dentro de los protistas se detectaron gregarinas y ciliados. La gregarina *Nematopsis sp.* se observó en el tejido conjuntivo de varios órganos, principalmente en branquia y gónada, sus ovoquistes contenían un único esporozoito vermiforme (Fig. 27). Las prevalencias de estas gregarinas



fueron altas con un máximo de 92% en enero de 2007, pero se observaban pocas gregarinas por corte histológico por lo que sus efectos patológicos no eran importantes. Con menor prevalencia se detectaba otra gregarina no identificada en epitelio de intestino y tejido conectivo circundante (Fig. 28). En algunos cortes histológicos del intestino se observaron varios individuos de esta gregarina, y en algunos casos había una ligera reacción hemocitaria local, por lo que su efecto sobre el hospedador no era importante. Otros protistas que se detectaron fueron los ciliados en branquia y túbulos digestivos, en muchos casos tan sólo uno o dos individuos por branquia (Fig. 29). Los ciliados en el lumen digestivo sólo se observaron en un individuo con signos de necrosis en los tejidos, por lo que probablemente son parásitos oportunistas. Se detectaron metacercarias de trematodo en el pie de dos coquinas (Fig. 30). La presencia de los parásitos de tipo *Perkinsus* no se detectó por ninguna de las dos técnicas utilizadas.

Tabla VII. Prevalencias de los parásitos observados en las coquinas *Donax trunculus* en los años 2006-2007.

Fecha	Talla \pm ES (mm)	% <i>Nematopsis</i> sp.	% Ciliados en branquia	% <i>Rickettsias</i> digestivo	% Gregarina indeterminada	% Metacercarias de trematodos
23/11/06	27,3 \pm 0,3	23	0	4	0	0
21/12/06	36,1 \pm 0,2	84	0	4	23	0
24/1/07	42,8 \pm 0,3	92	0	12	8	0
22/2/07	40,1 \pm 0,6	80	12	32	8	0
22/3/07	39,6 \pm 0,6	80	4	44	48	0
20/4/07	36,1 \pm 0,5	52	32	28	16	0
15/5/07	37,4 \pm 0,5	64	24	60	36	0
7/6/07	36,6 \pm 0,3	64	20	52	4	0
4/7/07	35,9 \pm 0,6	60	4	32	16	0
7/8/07	38,3 \pm 0,5	84	16	32	20	0
13/9/07	38,7 \pm 0,6	56	4	60	32	4
26/10/07	38,3 \pm 0,4	60	4	40	8	0
15/11/07	37,7 \pm 0,4	48	4	28	4	0

Tabla VIII. Prevalencias de los parásitos observados en las coquinas *Donax trunculus* en el año 2008.

Fecha	Talla \pm ES (mm)	% <i>Rickettsias</i> digestivo	% <i>Nematopsis</i> sp.	% Gregarina indeterminada	% Ciliados branquia/ digestivo	% <i>Metacercaria</i> trematodo
24 / 1 / 08	38,9 \pm 0,6	16	80	20	0 / 0	0
8 / 5 / 08	39,6 \pm 0,5	60	64	32	0 / 0	0
20 / 8 / 08	38,6 \pm 0,7	56	52	24	8 / 4	0
21 / 11 / 08	36,7 \pm 0,7	24	84	28	4 / 0	4

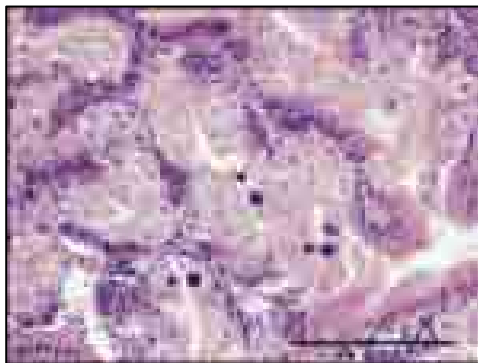


Fig. 26. Organismos tipo- *Rickettsias*.

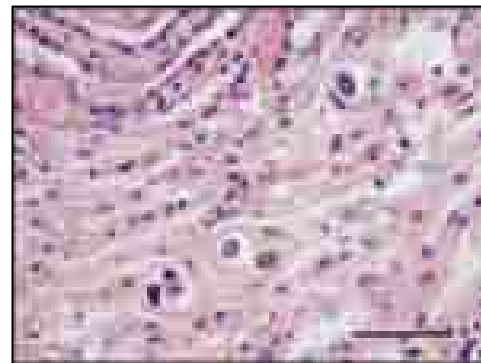


Fig. 27. *Nematopsis* sp.

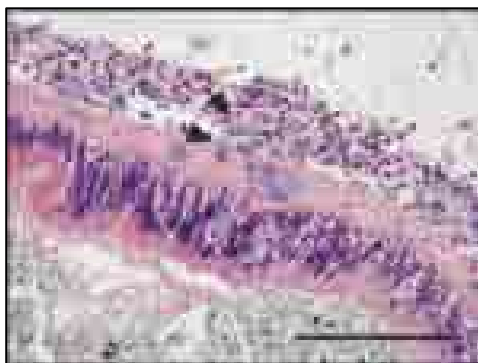


Fig. 28. *Gregarinas* indeterminadas.



Fig. 29. Ciliados.

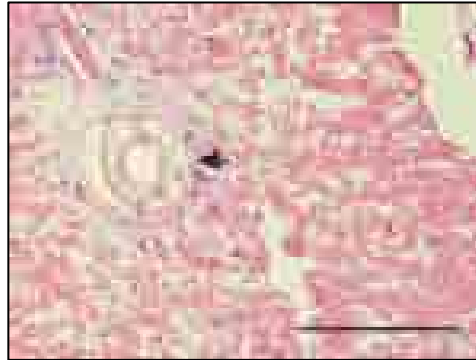


Fig. 30. *Metacercaria* de trematodo.

Fig. 26. Organismos de tipo rickettsiano en túbulos digestivos. Barra = 90 μ m. Fig. 27. Ovoquistes de *Nematopsis* sp., en tejido conjuntivo de branquia. Barra = 40 μ m. Fig. 28. Gregarina indeterminada en epitelio de intestino y tejido conjuntivo circundante. Barra = 90 μ m. Fig. 29. Ciliados en branquia. Barra = 90 μ m. Fig. 30. *Metacercaria* de trematodo enquistada en pie. Barra = 120 μ m.

El valor medio del número de hemocitos en la circulación fue de $3,2 \pm 0,5 \times 10^6$ hemocitos/ml. Se distinguieron dos tipos de hemocitos en los frotis de hemolinfa: células granulares o granulocitos y células agranulares o hialinocitos. Los granulocitos eran acidófilos y contenían numerosos gránulos. Los hialinocitos eran basófilos con pocos gránulos o sin gránulos y frecuentemente formaban agregados (Figs. 31 y 32). Ambos tipos tenían tallas similares, con un valor medio y error estándar de $7,2 \pm 3 \mu$ m (N = 10) en secciones histológicas. Los dos tipos de hemocitos formaban pseudópodos, principalmente los granulocitos. El estudio ultraestructural de los hemocitos confirmó la presencia de hialinocitos y granulocitos (Fig. 33). El citoplasma de ambos tipos celulares contenía mitocondrias, y numerosas cisternas y vesículas del retículo endoplásmico. En algunos hemocitos se observaron ribosomas e inclusiones de lípidos. Los núcleos de granulocitos e hialinocitos eran pleomórficos con abundante heterocromatina en el centro y en la periferia. En ambos tipos se observaron pseudópodos delgados. Los granulocitos contenían numerosos gránulos limitados por una membrana y con un contenido denso a los electrones. En los hialinocitos se observaron pocos o ningún granulo denso.



Fig. 31. Corte histológico de hemocitos de coquina. Barra = 40 μ m.

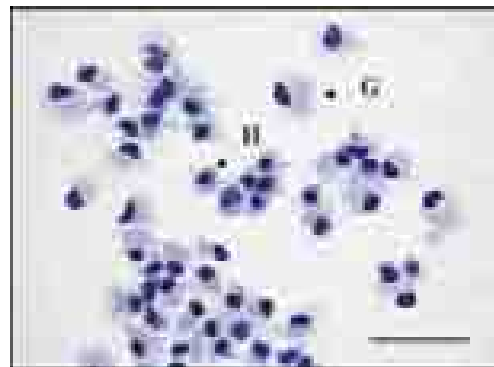


Fig. 32. Frotis de hemocitos. G = granulocito. H= hialinocito. Barra = 40 μ m.

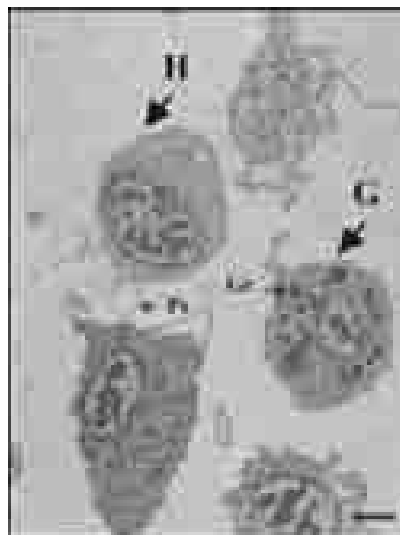


Fig. 33. Ultraestructura de los hemocitos de *Donax trunculus*. G = granulocito, H = hialinocito, Gr = gránulo, Ps = pseudópodo. Barra =2 μ m.

El estudio del contenido enzimático demostró que los hemocitos de la coquina tenían fosfatasa, esterasa, proteasa y glucosidasa (Tabla IX).



Tabla IX. Niveles de actividad de enzimas hidrolíticos de los hemocitos de *Donax trunculus*.

Enzima	Media \pm ES (nmol)	Enzima	Media \pm ES
Fosfatasa alcalina	22,5 \pm 17,7	Fosfatasa ácida	40,0 \pm 0,0
Esterasa	7,5 \pm 5,5	N-fosfohidrolasa*	30,0 \pm 0,0
Esterasa lipasa	5,0 \pm 0,0	α -galactosidasa	1,3 \pm 0,8
Lipasa	1,3 \pm 1,8	β -galactosidasa	15,0 \pm 7,1
Leucina arilamidasa	40 \pm 0,0	N-glucosaminidasa**	7,5 \pm 3,5
Valina arilamidasa	20 \pm 0,0	α -manosidasa	2,5 \pm 0,0
Cistina arilamidasa	3,8 \pm 0,0	α -fucosidasa	10,0 \pm 0,0
Tripsina	2,5		
A-quimiotripsina	1,3 \pm 1,8		

*Naftol fosfohidrolasa

**N-acetil- β -glucosaminidasa

1.1.6.4. CONCLUSIONES

1.1.6.4.1. Seguimiento microbiológico de reproductores y desoves de *D. trunculus*

Según estos resultados, parece que la mejor época para llevar reproductores a criadero, es la comprendida entre abril y mayo, en esta etapa de puestas, la carga bacteriana se mantiene en un nivel medio-bajo, especialmente de vibrios.

Las concentraciones de bacterias en la gónada de los reproductores de coquina que llegaban al criadero fueron elevadas, tanto en bacterias heterótrofas marinas como en poblaciones estimadas de vibrios. Después de la permanencia en el criadero, los lotes rebajan la carga bacteriana. El contenido en bacterias está asociado a las larvas mientras que, en el agua apenas se detecta presencia de vibrios.

En general, parece que los vibrios sí están relacionados, como ocurre en los cultivos larvarios en criadero de otros bivalvos estudiados hasta el momento, con los episodios de mortalidades. Pero en este caso otros factores tienen también mucha importancia, lo cual podría ser esperable en el cultivo de una nueva especie.

1.1.6.4.2. Histopatología de la coquina

Las coquinas presentan organismos simbioses y parásitos tipo-rickettsias, protozoos y alguna metacercaria de trematodos. Con prevalencias muy altas se observaron



los quistes de la gregarina *Nematopsis* sp. Las prevalencias de los organismos tipo-rickettsias fueron mayores en primavera y final de verano lo que sucedió en los dos años del seguimiento, lo cual sugiere una variación estacional de la prevalencia de estos organismos bacterianos.

Los parásitos detectados en las coquinas no causaban daños importantes por su baja intensidad, su baja prevalencia y/o por su escaso poder patogénico. Sin embargo, la presencia de los organismos tipo-rickettsias constituye un peligro potencial ya que en algunos meses las prevalencias fueron altas y se han registrado mortalidades en Francia asociadas con esta patología (Comps y Raimbault, 1978).

En la hemolinfa de la coquina se observaron dos tipos de hemocitos: células granulares o granulocitos, y células agranulares o hialinocitos. Los hemocitos mostraron actividad de los enzimas hidrolíticos: fosfatasas, estererasas, proteasas y glucosidasas.



1.1.7. BIBLIOGRAFÍA

Ansell, A.D.; Frenkiel, L.; Moueza, M. 1980. Seasonal changes in tissue weight and biochemical composition for the bivalve *Donax trunculus* L. on the Algerian coast. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 45: 105-116.

Beninger, P.G.; Lucas, A. 1984. Seasonal variations in condition, reproductive activity, and gross biochemical composition of two species of adult clam reared in a common habitat: *Ruditapes decussatus* L. (Jeffreys) and *Tapes philippinarum* (Adams & Reeve). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 79: 19-37.

Bensadoun, A.; Weinstein, D. 1976. Assay of proteins in the presence of interfering material. *Analyt. Biochem.* 70: 241-250.

Carballal, M.J; Díaz, S.; Louzán, A.; D. Martínez. 2008. Parasites and cells of the internal defence system of the bivalve *Donax trunculus*. *Aquaculture Europe*. Cracovia (Polonia).

Cerviño-Otero, A. 2005. Estudio del ciclo reproductivo de la almeja babosa *Venerupis pullastra* (Montagu, 1803), en dos poblaciones de la costa gallega: Camariñas y O Grove. *Diploma de Estudios Avanzados. Univ. de Santiago de Compostela*. 64 pp.

Cerviño-Otero, A.; Da Costa, F.; Ojea, J.; Nóvoa, S.; Martínez-Patiño D. 2008. Desarrollo embrionario y larvario de tres especies de bivalvos: navaja (*Ensis arcuatus*), longueirón (*Ensis siliqua*) y almeja babosa (*Venerupis pullastra*). *XI Foro dos Recursos Mariños e da Acuicultura das Rías Galegas*. 317-320.

Comps, M.; Raimbult, R. 1978. Infection rickettsienne de la glande digestive de *Donax trunculus* Linné. *Science et Pêche, Bull. Inst. Pêches Marit.* 281: 11-12

Da Costa, F.; Darriba, S.; Martínez-Patiño, D. 2008. Embryonic and larval development of *Ensis arcuatus* (Jeffreys, 1865) (Bivalvia: Pharidae). *J. Molluscan Stud.* 74. 103-109.

Da Costa, F. Optimización del cultivo en criadero de navaja (*Ensis arcuatus* Jeffreys, 1865), longueirón (*E. siliqua* Linneo, 1758) y longueirón vello (*Solen marginatus* Pennánt, 1777): composición bioquímica y de ácidos grasos en los desarrollos larvarios. 2009. *Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela*. 336 pp.

Dreywood, R. 1946. Qualitative test for carbohydrate material. *Ind. Eng. Chem. (Anal. ed.)*. 18: 499.

Fernández Otero, J. 1982. Aportación al estudio de la biología del bivalvo *Donax trunculus* L. en la Ría del Barquero. *Tesis de Licenciatura, Universidad de Santiago de Compostela*. 92 pp.

Folch, J.; Lees, M.; Stanley, G.H. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from the animals tissues. *J. Biol. Chem.* 226: 497-509.



- Fraga, F. 1956. Determinación de glucógeno en moluscos con el reactivo de antrona. *Inv. Pesq.* III: 69-74.
- Gaspar, M.B. 1996. Bivalves do litoral oceánico algarvio. Aspectos da bioloxía, ecoloxía e da pesca dos mananciais de interese económico: aplicación á xestión dos recursos. *Tesis Doctoral. Universidad de Faro.* 282 pp.
- Hess, H.H.; Lees, M.B.; Derr, J.E. 1978. A linear Lowry-Folin assay for both water-soluble and sodium dodecyl sulfate-solubilized proteins. *Anal. Biochem.* 85: 295-300.
- Louzán, A.; Cerviño-Otero, A.; Nóvoa, S.; Ojea, J.; Martínez, D. 2007. Seguimento do ciclo reprodutor e desenvolvemento larvario de unha poboación de coquina *Donax trunculus* (Linné, 1758). *X Foro dos Recursos Mariños e da Acuicultura das Rías Galegas.*
- Louzán, A. 2008. Ciclo reprodutor, composición bioquímica e patoloxía de los progenitores de *Donax trunculus* (Linné, 1758), de un banco natural de Valdoviño (NO Galicia), para a obtención de semilla en criadero. *Diploma de Estudios Avanzados. Univ. de Santiago de Compostela.*
- Louzán, A.; Nóvoa, S.; Ojea, J.; Martínez, D. 2008. Evolución do contido en carbohidratos a lo largo do ciclo gametogénico de *Donax trunculus* (Linné, 1758). *XI Foro dos Recursos Mariños e da Acuicultura das Rías Galegas.*
- Lowry, H.O.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Martínez, D.; Rodríguez Moscoso, M.E.; Arnaiz, R.; Alonso de Landa, J.L.; Camiño, J.M. 1993. Ciclo reprodutor de la coquina, *Donax trunculus*, relacións con su contido en proteínas, glucógeno, lípidos e ácidos grasos poliinsaturados. *Libro de Actas del IV Congreso Nacional de Acuicultura.* 347-352.
- Martínez Patiño, D. 2002. Estudio de los solénidos, *Solen marginatus* (Pennant, 1777) y *Ensis siliqua* (Linné, 1758), de los bancos naturais de la Ría de Ortigueira y Ría del Barquero: ciclo gametogénico, composición bioquímica e cultivo larvario. *Tesis Doctoral. Univ. de Santiago de Compostela.* 240 pp.
- Martínez Patiño, D.; Nóvoa Vázquez, S.; Ojea Martínez, J.; Rodríguez Moscoso, E. 2003. Determinación de la talla de primeira maduración sexual de la coquina, *Donax trunculus* (Linné, 1758) (Mollusca: Bivalvia), en un banco natural de la Ría del Barquero (NO Galicia). *Libro de Actas IX Congreso Nacional de Acuicultura.* 215-217.
- Martínez, D.; Cerviño Otero, A.; Louzán, A.; Da Costa, F.; Ojea, J.; Nóvoa, S. 2008. Producción de especies de interés marisquero en la planta de cultivos marinos de Ribadeo (CIMA). *II Foro Iberoamericano de los recursos marinos y la acuicultura. FIRMA 2008.* Cumaná (Venezuela).
- Mazé, R.A.; Laborda, A.J. 1990. Cambios estacionales de una poboación de *Donax trunculus* L. en la Ría del Barquero (Lugo, NO España). *Scient. Mar.* 54: 131-138.



Ojea, J.; Martínez, D.; Nóvoa, S.; Pazos, J.; Abad, M. 2002. Contenido y distribución de glucógeno en relación con el ciclo gametogénico de *Ruditapes decussatus* (Linné, 1758) en una población natural de las lagunas de Baldaio (Galicia, noroeste de España). *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.* 18: 307-313.

Ojea, J.; Martínez, D.; Nóvoa, S.; Cerviño-Otero, A. 2005. Ciclo gametogénico de una población de almeja japonesa *Ruditapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850) en la Ría de Camariñas (Noroeste de España) y relación con la composición bioquímica mayoritaria. *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.* 21: 337-342.

Ray, S.M. 1966. A review of the culture method for detecting *Dermocystidium marinum*, with suggested modifications and precautions. *Proc. Natl. Shellfish. Assoc.* 54: 55-69.

Rodríguez, S.; Quintana, R.; Lamas, L.; Ayensa, G.; Velasco, F.J.; Pascual, C. 1993. Etude comparative du cycle gametogénique et composition biochimique de *Tapes decussatus* et *Ruditapes philippinarum* dans la Ría de Muros y Noya. En: Bordeaux Aquaculture 92. Production, Environment and Quality (Special publication). G. Barnabé y P. Kestemont (eds.) 18: 503-511. *European Aquaculture Society*. Ghent, Bélgica.



1.2. LONGUEIRÓN VELLO (*SOLEN MARGINATUS*)

1.2.1. LÍNEA 2. ACONDICIONAMIENTO Y OBTENCIÓN DE PUESTAS EN *S. MARGINATUS*

1.2.1.1. INTRODUCCIÓN

1.2.1.1.1. Acondicionamiento

El acondicionamiento es una fase importante del cultivo de moluscos bivalvos en criadero (Wilson *et al.*, 1996). Este proceso consiste en mantener los adultos en las instalaciones de cultivo en unas condiciones adecuadas para controlar el desarrollo gonadal y conseguir períodos de madurez diferentes a los que presentan en el medio natural, así en individuos cuyo ciclo reproductivo presenta cortos períodos de madurez se puede conseguir que las puestas sean más prolongadas en el tiempo. La finalidad es potenciar la fecundidad de los progenitores, la calidad de los huevos y la viabilidad larvaria (Utting y Millican, 1997). El acondicionamiento se realiza manipulando el medio físico y la alimentación para promover el desarrollo gonadal y la gametogénesis. Entre los factores que afectan al acondicionamiento están la temperatura, la alimentación, el fotoperíodo y el estadio gametogénico inicial.

El longueirón vello (*Solen marginatus*) en el medio natural está maduro y desova en mayo-junio en Galicia (Martínez, 2002), por lo que es necesario realizar el acondicionamiento para ampliar la época de puestas.

Por todo ello, el objetivo de este estudio es determinar desde qué estadio es más óptimo realizar el acondicionamiento y por otro lado, estudiar si es mejor realizarlo en un régimen de temperatura gradual o constante.

1.2.1.1.2. Inducción a la puesta

La inducción a la puesta o “spawning”, que es el procedimiento por el cual los bivalvos maduros son estimulados a liberar sus gametos en respuesta al estímulo que se les ha aplicado. La inducción a la puesta en un criadero permite obtener puestas cuando se necesiten, siempre que los individuos presenten gametos maduros. Ésto permite planificar



los cultivos, además de realizar una fecundación controlada, por lo que se van a estudiar los métodos para obtener desoves en *S. marginatus*.

1.2.1.2. MATERIAL Y MÉTODOS

1.2.1.2.1. Acondicionamiento

1.2.1.2.1.1. Sistema de mantenimiento

Se emplearon tanques de 200 litros en circuito abierto y con un flujo de agua de 18 litros/hora. Se dispusieron 80 individuos por tanque, realizando la experiencia por duplicado. Los reproductores se mantuvieron con una capa de arena de grano medio-fino de unos 30-40 cm de espesor.

1.2.1.2.1.2. Estudio de los parámetros que afectan al acondicionamiento

La alimentación consistió en una dieta mixta compuesta por: *T. suecica*, *I. galbana*, *P. lutheri*, *C. calcitrans*, *P. tricornutum* y *S. costatum*. La ración de microalgas fue del 6% en peso seco de algas con respecto al peso seco de los reproductores.

Se hicieron dos experiencias para probar el efecto del estadio gametogénico inicial en el acondicionamiento de *S. marginatus*, una desde reposo gonadal y otra desde gametogénesis avanzada. La temperatura durante la experiencia fue de $18\pm 1^{\circ}\text{C}$.

Además, se estudió el efecto de la temperatura. Se utilizaron dos regímenes de temperatura por duplicado: 1. Temperatura constante a $18\pm 1^{\circ}\text{C}$ desde el inicio de la experiencia, y 2: incremento gradual de la temperatura de $1^{\circ}\text{C}/\text{semana}$ hasta alcanzar los $18\pm 1^{\circ}\text{C}$.

1.2.1.2.1.3. Procesado e histología

Mensualmente se realizaron controles histológicos de la maduración gonadal de 20 individuos, en el laboratorio se mantuvieron atados con gomas, y sumergidos en agua salada un mínimo de 1 hora para la eliminación de arena. Para cada individuo diseccionado



se determinaron los parámetros biométricos: longitud, altura, espesor, peso fresco del individuo, peso fresco de las valvas, peso fresco de la vianda y peso seco de las valvas. El peso seco de las valvas se obtuvo tras mantener en la estufa a 100°C las valvas durante 24 horas y enfriando en desecador hasta peso constante.

De cada ejemplar diseccionado se separaron la glándula digestiva, la gónada y el resto de la vianda. Una sección del pie de 1 cm³, próxima a la glándula digestiva y con gónada en su interior, se introdujo en un cassette para el análisis histológico. Las muestras se fijaron en fijador Davidson durante 24 horas. Se deshidrataron en alcoholes de graduación creciente y se incluyeron en parafina a 60°C. Las preparaciones se han realizado con cortes de 7 µm de espesor y se tiñeron los cortes con hematoxilina-eosina.

La caracterización descriptiva de las fases del ciclo reproductivo se realizó a partir de la observación al microscopio de las preparaciones histológicas, siguiendo la escala gametogénica descrita por Gaspar (1996) para *Ensis siliqua* y adaptada para esta especie por Martínez (2002). Esta escala diferencia varios estadios: Estadio 0 (E0) de reposo sexual, Estadio I (EI) o gametogénesis inicial, Estadio II (EII) o gametogénesis avanzada, Estadio III (EIII) de madurez, Estadio IV (EIV) o desove y Estadio V (EV) de post-puesta.

1.2.1.2.2. Inducción a la puesta

Para la inducción a la puesta se utilizaron diferentes sistemas para mantener los reproductores, que van a ser analizados en los resultados. Se indujo la puesta en grupos de 25 individuos por tratamiento probando diferentes metodologías:

- Choque térmico añadiendo gametos masculinos y microalgas. Para ello se varió la temperatura añadiendo agua de mar filtrada enfriada a 5-10°C, permaneciendo a esta temperatura entre 30 y 60 minutos. Posteriormente, se vaciaba el tanque y rellenaba con agua calentada hasta 25-27°C, añadiendo gametos y microalgas, manteniendo la temperatura entre 30 y 60 minutos. A continuación, se realizaban cambios de temperatura sucesivos, hasta repetir 5 veces los ciclos de agua fría-caliente.



- Raspado de las gónadas y mezcla de gametos femeninos y masculinos en agua de mar filtrada, según lo descrito por Breese y Robinson (1981) para *Siliqua patula*. Los individuos se diseccionaron, retirando los gametos de las gónadas y separando machos y hembras. Posteriormente, se realizó un homogenizado de las gónadas separadas por sexos y se disolvieron en agua de mar filtrada y esterilizada por ultravioleta. A continuación, se realizaron intentos de fecundación.
- Flujo de agua filtrada y esterilizada con ultravioleta (UV). Los ejemplares se mantuvieron con un flujo de agua esterilizada con UV de 100 litros hora⁻¹ durante un período de 3-4 horas.
- Cambio de niveles de agua, en los que se simula el efecto de las mareas. Los individuos se sometieron a cambios sucesivos en los niveles de agua del tanque, exponiéndolos a breves períodos de desecación. Los cambios de nivel se llevaron a cabo cada 2 horas y la temperatura del agua fue de 15±1°C.

Además, se dispuso de un tanque control al que no se le aplicó estímulo alguno, simplemente se mantuvieron en los tanques, sin variar las condiciones habituales de estabulación.

1.2.1.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.2.1.3.1. Acondicionamiento

1.2.1.3.1.1. Efecto del estadio gametogénico inicial

1.2.1.3.1.1.1. Desde reposo gonadal

Al inicio de la experiencia la mitad de los ejemplares se encontraban en reposo y la otra mitad, en gametogénesis inicial (Fig. 34). En el muestreo de marzo (120 días), el 62% ya se encontraban en gametogénesis avanzada y en abril (150 días) en gametogénesis avanzada y madurez, 54% y 46%, respectivamente. Se alcanzaron estadios de madurez y puesta a finales de abril, comparado con madurez en mayo y junio en el medio natural. Esto mismo sucede en otros solénidos como *Ensis arcuatus* y *E. siliqua* (da Costa, 2009).



Por lo tanto, no se conseguiría adelantar la maduración en el criadero desde reposo gonadal, no siendo interesante el mantenerlos tanto tiempo en el criadero, debido a los elevados costes de alimentación de progenitores.

1.2.1.3.1.1.2. Desde gametogénesis avanzada

En el control inicial el 80% de los individuos muestreados se encontraban en gametogénesis avanzada (Fig. 35). A los 38 días de estudio la mayoría se encontraba en madurez y puesta, 60% y 20%, respectivamente. Como se observa, si comenzamos el acondicionamiento desde gametogénesis avanzada en *S. marginatus*, se obtienen estadios de madurez en marzo, adelantando entre 1 y 2 meses la maduración con respecto al medio natural. En *E. siliqua* se observó un patrón similar al realizar el acondicionamiento desde gametogénesis avanzada con una temperatura igual a la empleada en este estudio (da Costa, 2009).

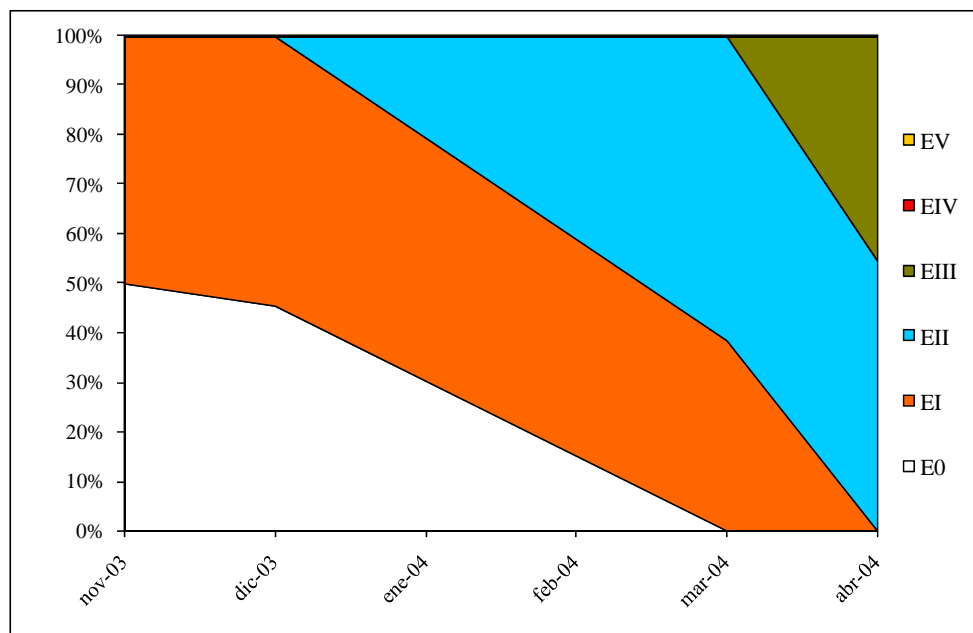


Fig. 34. Estadios gametogénicos de *S. marginatus* acondicionados desde reposo gonadal.

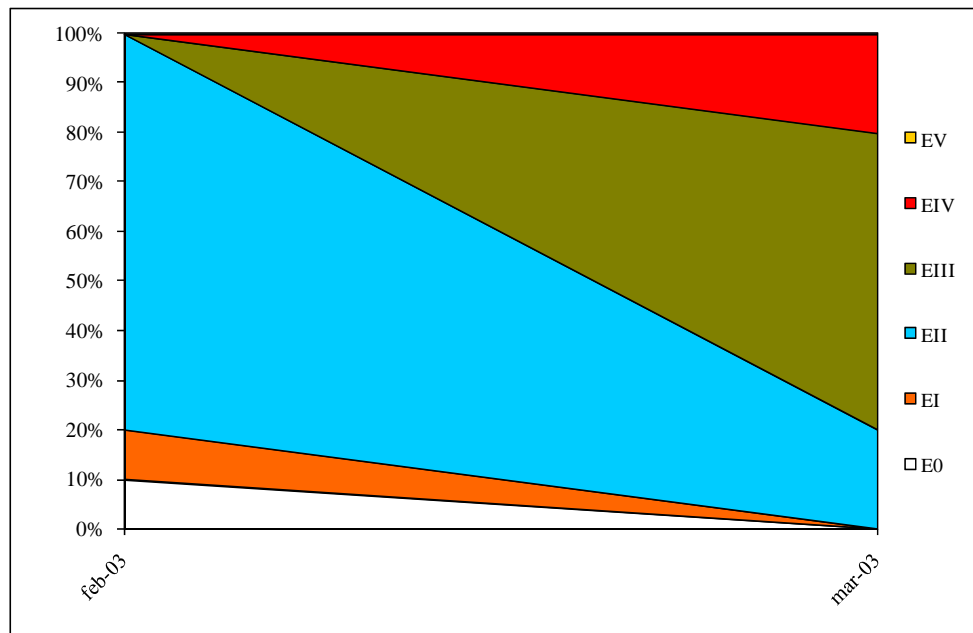


Fig. 35. Estadios gametogénicos de *S. marginatus* acondicionados desde gametogénesis avanzada.

1.2.1.3.1.2. Efecto del gradiente y temperatura constante en el acondicionamiento

Al inicio de la experiencia todos los individuos estaban en reposo. En el control intermedio, hay una mayor proporción de individuos en gametogénesis avanzada (EII) en la temperatura constante que en el gradiente (Fig. 36). Sin embargo, al final de la experiencia la temperatura en gradiente presenta mayor porcentaje en madurez (EIIIA) y puesta (EIIIB) que la temperatura constante. Aunque parece que al principio es mejor ponerlos a temperatura constante, esto puede tener un efecto perjudicial al final de la experiencia. El cambio brusco de temperatura puede afectar a la calidad de los gametos producidos al causar estrés a los individuos acondicionados.

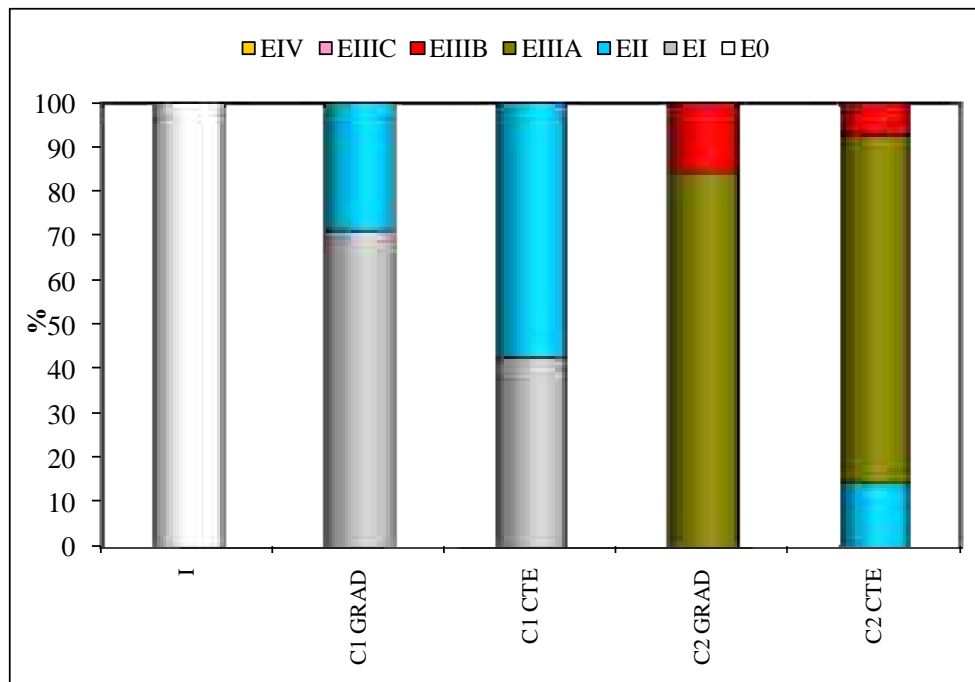


Fig. 36. Estadios gametogénicos en el acondicionamiento de *S. marginatus* en dos regímenes de temperatura.

1.2.1.3.2. Inducción a la puesta

Puesto que los adultos de esta especie viven enterrados, es necesario mantenerlos de una forma en la que se reduzca al máximo el estrés causado a los ejemplares. Para ello se utilizó un método desarrollado por Miranda (2002) para *Ensis siliqua*. Éste consiste en mantener atados individualmente los longueirones con gomas a varillas de vidrio (Fig. 37). Después éstos se colocan en tanques de 200 litros sin sustrato para poder individualizar los ejemplares que desovan. Con el longueirón vello se realizaron numerosas pruebas con los diferentes estímulos para la inducción a la puesta, sin conseguir respuesta alguna. Tras la inducción por choque térmico se suele obtener una puesta al día siguiente en el mismo tanque en que se realiza. Los huevos al dividirse presentan una coloración marrón.

Loosanoff y Davis (1963) indican que en *Ensis directus*, cuando se aumenta la temperatura desde 13 a 25°C, se produce el desove. López *et al.* (2005) han conseguido en *Ensis macha* inducir a la puesta con choque térmico satisfactoriamente y del mismo modo, en nuestro criadero, *E. siliqua* también desovó con choque térmico (da Costa, 2009). Sin embargo, no todos los solénidos responden al choque térmico, como es el caso de *E.*



arcuatus, especie en la que el método de inducción consiste en la modificación del nivel del agua simulando el efecto de las mareas, con breves períodos de desecación (da Costa *et al.*, 2008). De los métodos probados en el longueirón vello (*S. marginatus*), sólo los cambios de temperatura estimulan el desove pasadas unas horas, recogiendo el desove al día siguiente. Un modo efectivo de conseguir desoves de los progenitores mantenidos enterrados en tanques es bajarles la temperatura durante 1 día y posteriormente volver a la temperatura inicial, con lo que en época de madurez se consiguen numerosos desoves sin problema. Aún así, se consiguen larvas suficientes para llevar a cabo los cultivos larvarios y obtener semilla, no siendo éste un factor limitante para el cultivo.



Fig. 37. Longueirón vello atado con gomas a varilla de vidrio.

1.2.1.4. CONCLUSIONES

- **Acondicionamiento**

- Dado que *S. marginatus* tiene un corto período de madurez (mayo-junio) es interesante su acondicionamiento, aunque sólo se consigue adelantar la maduración entre 1 y 2 meses.
- El acondicionamiento se debe hacer en tanques con una capa de arena de aproximadamente 30 cm de espesor para permitir el correcto enterramiento de los ejemplares.



- La dieta debe de ser una dieta mixta de microalgas al 6% en peso seco de algas con respecto al peso seco de los reproductores.
 - Utilizando gradiente de temperatura en el acondicionamiento se alcanza una mayor proporción de madurez que con temperatura constante.
 - El mejor momento para comenzar el acondicionamiento es en el estadio de gametogénesis avanzada, con el que consigue adelantar la maduración entre 1 y 2 meses.
 - Se debe suministrar a los reproductores una dieta rica en proteínas y equilibrada en ácidos grasos, ya que éstos son componentes importantes en el desarrollo embrionario y larvario de esta especie.
- **Inducción a la puesta**
- Un modo efectivo de conseguir desoves de los progenitores mantenidos enterrados en tanques, es bajarles la temperatura durante 1 día y posteriormente volver a la temperatura inicial.
 - Si se quiere individualizar a los adultos para la inducción a la puesta se deben colgar los ejemplares individualmente atados con gomas elásticas a varillas de vidrio.



1.2.2. LÍNEA 3. CULTIVO LARVARIO Y POSTLARVARIO DE *S. MARGINATUS* Y *D. TRUNCULUS*

1.2.2.1. INTRODUCCIÓN

1.2.2.1.1. Cultivo larvario

La optimización de las técnicas de cultivo larvario es un punto importante para comenzar a desarrollar el cultivo en criadero de una especie. La calidad de los ovocitos es uno de los factores más determinantes en la viabilidad larvaria, pudiendo estar referida al tamaño y/o volumen de los ovocitos, a la composición bioquímica o a ambas. Pequeños cambios en el tamaño de los ovocitos pueden ser importantes en la supervivencia larvaria. Esto es debido a que puede reflejar cambios en la cantidad de reservas bioquímicas almacenadas en el huevo.

Las primeras fases del cultivo de bivalvos (desarrollo embrionario y larvario) presentan mayores mortalidades que las fases posteriores (cultivo postlarvario y de semilla). Por lo tanto, el éxito de los cultivos dependerá de la superación de dos etapas cruciales en el desarrollo larvario, la embriogénesis y la metamorfosis (paso de larva a postlarva).

Entre los factores ambientales que afectan al crecimiento de las larvas, la temperatura, salinidad y alimentación son los que han recibido más atención. En el control de la nutrición, además de la cantidad, se debe controlar la calidad del alimento suministrado para cubrir todas las necesidades nutricionales de larvas y postlarvas. Otro de los factores importantes en el cultivo larvario es la temperatura a la que se desarrolla, puesto que cada especie tiene un rango óptimo en el que se maximiza crecimiento y supervivencia hasta la metamorfosis. La salinidad es también importante, ya que valores por debajo de los óptimos pueden reducir mucho el éxito de los cultivos.

El objetivo de este estudio es investigar los cambios en la composición bioquímica y de ácidos grasos durante el desarrollo larvario en criadero de *Solen marginatus*. Además, se van a estudiar los requerimientos nutricionales de las larvas de esta especie.



1.2.2.1.2. Cultivo postlarvario y de semilla en criadero

El éxito del cultivo en semillero depende de la calidad de las postlarvas obtenidas y del sistema empleado durante su cultivo. En esta fase se va a estudiar el cultivo de postlarvas desde la fijación hasta la talla de 1 mm, que se corresponde con el mes de vida (da Costa, 2009). La fijación de larvas se tiene que hacer en unas condiciones adecuadas, que en muchos casos supone el utilizar sustratos adecuados para la fijación. En experiencias anteriores con *S. marginatus* se había identificado la necesidad de poner las postlarvas en contenedores con sustrato para poder aumentar la supervivencia. Sin embargo, el uso de sustrato presenta problemas tanto por la necesidad de utilizar grandes volúmenes de arena como por problemas asociados con la limpieza del sustrato. Por todo ello, se ha propuesto como objetivo el minimizar el uso de sustrato en las fases de semillero y si es posible, eliminarlo.

Además, los resultados obtenidos durante el cultivo de semilla variarán en función de varios factores, así Lucas (1977) cita: la densidad de la semilla, el flujo de agua, la calidad del agua, la temperatura y salinidad, como factores físicos. En relación con la alimentación afectan: la cantidad y calidad del alimento, y la tasa de alimentación, que puede ser continua o discontinua. Además, la frecuencia de las operaciones de manejo va a influir en el comportamiento de cada especie en el criadero.

En el caso de *Solen marginatus* es también destacable el sistema empleado y el uso de sustrato (Darriba *et al.*, 2002; Martínez, 2002), debido a que, igual que los adultos de estas especies, la semilla necesita de sustrato para mantenerse enterrada y mantener las valvas cerradas. En el cultivo intensivo de los solénidos, éstos presentan una baja supervivencia durante la fase de semillero (da Costa, 2009). Asimismo, para la producción de semilla a gran escala, es importante intentar evitar usar sustrato y, en caso de que fuera necesario, reducir el volumen de arena utilizado. Por todo ello, el objetivo de este trabajo es establecer las mejores condiciones para el cultivo de semilla de *Solen marginatus*, determinando la necesidad de uso de sustrato en el cultivo en semillero de estas especies.



1.2.2.2. MATERIAL Y MÉTODOS

1.2.2.2.1. Cultivo larvario

1.2.2.2.1.1. Método de cultivo general

La incubación de los huevos y el cultivo larvario se realizó en tanques troncocónicos de fibra de vidrio de 150 y 500 litros. El cambio de agua se realizó tres veces a la semana con agua filtrada por filtro de arena, cartucho de 1 μm y esterilizada por ultravioleta. La temperatura del cultivo se mantuvo en $19\pm 1^\circ\text{C}$, con una salinidad de 32-35‰. Las experiencias se hicieron por duplicado.

Las muestras de los diferentes estadios embrionarios y larvarios se observaron “*in vivo*” al microscopio óptico. Se recogieron del total de larvas que se dispusieron en un vaso de precipitado de volumen conocido. Se homogenizaron, se tomaron 10 alícuotas que se depositaron en portaobjetos excavados y se procedió al conteo de las mismas bajo lupa. A partir de estas alícuotas se calculó el número total de larvas presentes en el cultivo. Para el seguimiento del crecimiento se midió la longitud y el alto de 50 larvas elegidas aleatoriamente con una lupa acoplada a un analizador de imagen y se contaron para poder calcular la supervivencia. El cálculo de la misma se realizó a partir del número inicial de ovocitos liberados y del número inicial de larvas D.

1.2.2.2.1.2. Estudio de la composición bioquímica y de ácidos grasos en los desarrollos larvarios

Se siguen dos desarrollos larvarios de *S. marginatus* para estudiar el crecimiento y supervivencia larvaria y realizando en cada uno de ellos dos réplicas. Se recogen muestras para los análisis bioquímicos y de ácidos grasos de ovocitos (día 0), larva D veliger (día 1), pediveliger (día 5) y postlarva recién fijada (día 9). Las muestras de mezcla de microalgas para los análisis se tomaron cuando las algas estaban en crecimiento exponencial (7 días). Para el análisis de lípidos totales se usó el método de Marsh y Weinstein (1966). Las proteínas se determinaron según el método descrito por Lowry *et al.* (1951). Los carbohidratos se cuantificaron según el método de Fraga (1956). Las muestras de ácidos grasos se purificaron según el método de Soudant (1995) modificado en nuestro laboratorio



(da Costa, 2009) y se cuantificaron y determinaron por el método de Marty *et al.* (1992). La comparación de medias entre estadios se realizó con el test no paramétrico *U de Mann-Whitney*. Para la comparación de porcentajes se transformaron los datos con la función arcoseno, para evitar trabajar con porcentajes (Sokal y Rohlf, 1995).

1.2.2.2.1.3. Efecto del ayuno y las dietas microalgales en el desarrollo larvario

Se cultivaron larvas D (1 día) en tanques de 150 litros por duplicado a $19\pm 1^{\circ}\text{C}$. El agua se cambió cada dos días con agua filtrada por filtro de arena y esterilizada con ultravioleta. Se ensayaron las siguientes dietas: 1. 10 células equivalentes (*I. galbana*, *P. lutheri* y *C. calcitrans*) y 20 equiv. de *T. suecica*; 2. 80 células equiv. de *I. galbana*; y 3. ayuno de 8 días, hasta la fijación, y a partir de ahí se da la dieta 1. Se midieron y contaron, para determinar la supervivencia. Además, se tomaron muestras para el análisis de ácidos grasos de las dietas microalgales y larvas al inicio de la experiencia (larva D) y a los 8 días. Las muestras de ácidos grasos se purificaron según el método de Soudant (1995) modificado en nuestro laboratorio (da Costa, 2009) y se cuantificaron y determinaron por el método de Marty *et al.* (1992).

1.2.2.2.2. Cultivo postlarvario y de semilla

El paso de la fase natátil larvaria a sésil (postlarva) se realiza en tanques troncocónicos de 150 y 500 litros en cilindros con malla de 150 μm . El flujo de agua es forzado por “air-lift” descendente. El cambio de agua se realiza tres veces a la semana con agua de mar filtrada y esterilizada con U.V., manteniendo la temperatura a $19\pm 1^{\circ}\text{C}$. Las primeras experiencias se realizaron añadiendo sustrato en el momento de la fijación. Posteriormente, debido a la baja supervivencia se probó con dos tipos de contenedores con malla de 150 μm , unos de 0,125 m^2 de área a los que no les añadía sustrato y otros de 0,5 m^2 de área a los que se les añadía arena de grano medio-fino (entre 150 y 600 μm).

Las primeras fases del cultivo de semilla se mantuvieron en tanques troncocónicos de 500 litros, en cilindros con malla de 150 μm , con una fina capa de arena de grano medio-fino (grano entre 150 y 600 μm). El flujo de agua fue forzado por “air-lift”

descendente. El cambio de agua se realizó con la misma periodicidad que en el cultivo larvario. La semilla (10 mm) se cultivó en tanques rectangulares de 200 litros, con una capa de arena de grano medio-fino (de 150 a 600 μm) en el fondo, de 10 cm de espesor. Los tanques estaban en circuito abierto, con un flujo de agua de 18 litros hora⁻¹ y con aireación. La temperatura durante la experiencia se mantuvo en $18\pm 1^\circ\text{C}$ y la salinidad en torno a 32-35‰.

1.2.2.2.3. Efecto del uso de sustratos

1.2.2.2.3.1. Prueba en cilindros

En el año 2006 se realizó una prueba con lotes de semilla de *S. marginatus* de 30.000 individuos con una talla inicial de 1,4 mm en tres sistemas distintos con 2 réplicas por sistema: 1: contenedor de 0,125 m² de arena y sin arena; 2: contenedor de 0,5 m² y con arena de grano fino y 3: contenedor de 0,5 m² y con arena de grano grueso (Fig. 38).

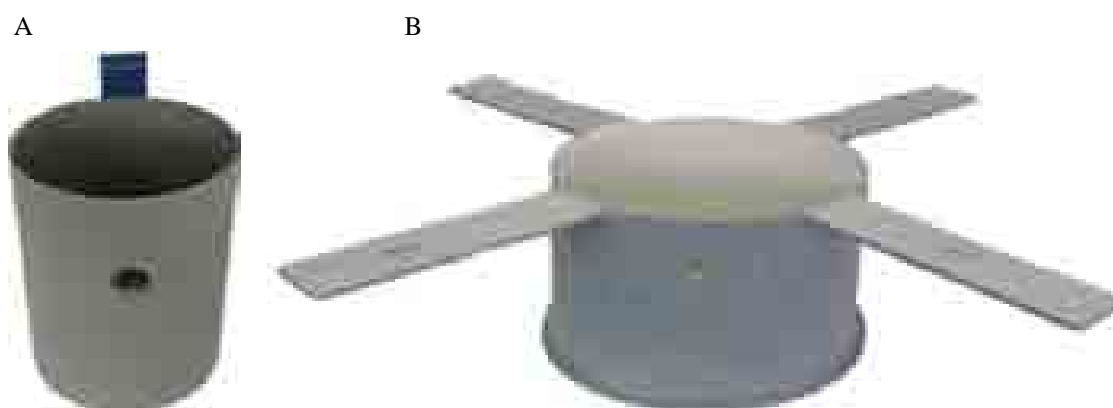


Fig. 38. Sistemas de mantenimiento de semilla. A. Contenedor de 0,125 m² de área para el cultivo de semilla sin sustrato. B. Contenedor de 0,5 m² en el que se realizaron experiencias con sustrato.

La semilla se mantuvo al principio en tanques troncocónicos de 150 litros de volumen, similares a los de cultivo larvario. La dieta estuvo compuesta por *Tetraselmis suecica*, *Isochrysis galbana*, *Pavlova lutheri* y *Chaetoceros calcitrans*. Tras 15 días de cultivo, toda la semilla se transfirió a un tanque rectangular de 1000 litros de volumen en circuito abierto y con una dieta de *T. suecica*, *I. galbana*, *P. lutheri*, *C. calcitrans*, *Phaeodactylum tricornutum* y *Skeletonema costatum*. El ensayo duró 30 días, realizándose



controles al inicio, a los 15 y 30 días de crecimiento en longitud y supervivencia. Esta semilla se mantuvo así hasta alcanzar una talla óptima para el cultivo en medio exterior.

1.2.2.2.3.2. Prueba en cilindro sin sustrato y tanque con capa de arena

En 2009 se diseñó una experiencia para probar el efecto del sustrato en el cultivo de semilla utilizando 2 densidades. Se partió de semilla de 52 días de edad, con una talla inicial de $2,75 \pm 0,57$ mm. Se utilizaron 2 sistemas para mantener la semilla: 1. cilindros de $0,5 \text{ m}^2$ de área con malla de $150 \mu\text{m}$ en los que se mantuvo la semilla sin sustrato en tanques de 1000 L (SS), y 2. tanques rectangulares de 200 litros, con una capa de arena de grano medio-fino (de 150 a $600 \mu\text{m}$) en el fondo, de 10 cm de espesor (CS). En cada sistema se ensayaron 2 densidades de semilla, correspondientes a un peso fresco total por lote de 25 (D1) y 50 g (D2). La dieta suministrada consistió en una mezcla de las microalgas *T. suecica*, *I. galbana*, *P. lutheri*, *C. calcitrans*, *P. tricorutum* y *S. costatum* producidas en un sistema de cultivo en continuo de microalgas. La temperatura se mantuvo a $18 \pm 1^\circ\text{C}$. Se tomaron muestras para el control de crecimiento cada 15 días y mensualmente para la supervivencia, durando en total 2 meses.

1.2.2.2.4. Efecto de la densidad en el cultivo de semilla

En base a los resultados obtenidos previamente y para optimizar el cultivo de semilla en 2009 se decidió estudiar la densidad óptima. Para ello se dispuso semilla de $0,67 \pm 0,17$ mm de longitud en cilindros de $0,5 \text{ m}^2$ de área con malla de $150 \mu\text{m}$ en tanques de 1000 L en circuito abierto. Se suministró una dieta mixta de microalgas producidas en el sistema de cultivo de fitoplancton en continuo. Se cambió el agua cada dos días, aprovechando para tamizar la semilla. Se controló el crecimiento y la supervivencia cada dos semanas y se mantuvo la semilla un total de 76 días en este sistema hasta la siembra en el medio natural.



1.2.2.2.5. Efecto de distintas dietas microalgales en el cultivo de semilla

Se realizó una experiencia de distintas dietas con postlarvas de 1 mes de edad. Se ensayaron tres dietas por duplicado: dieta 1: 25 células equivalentes (*I. galbana*, *P. lutheri* y *C. calcitrans*) y 50 equiv. de *T. suecica*; dieta 2: 25 células equivalentes (*I. galbana*, *P. lutheri* y *S. costatum*) y 50 equiv. de *T. suecica*; y dieta 3: 40 células equivalentes (*I. galbana* y *P. lutheri*) y 50 equiv. de *T. suecica*. Se realizaron medidas de longitud y peso al inicio, a los 8 días y a los 15 días (final de la experiencia). Se controló la supervivencia al final de la experiencia. Al inicio, y final del ensayo se recogieron muestras para análisis bioquímicos (glúcidos, lípidos y proteínas) y para análisis de ácidos grasos.

Posteriormente se continúa con el cultivo de semilla para la realización de experiencias en el medio exterior. De los tanques de 500 litros en circuito cerrado, la semilla se transfiere a tanques rectangulares de 1000 litros en los mismos cilindros en circuito abierto a la misma temperatura. Tras 15 días de cultivo, toda la semilla se transfirió a un tanque rectangular de 1000 litros de volumen en circuito abierto y con una dieta de *T. suecica*, *I. galbana*, *P. lutheri*, *C. calcitrans*, *Phaeodactylum tricornutum* y *Skeletonema costatum*. Cada dos semanas se toman muestras para estimar el crecimiento y la supervivencia de los distintos lotes. Esta semilla se mantuvo así hasta alcanzar una talla óptima para el cultivo en medio exterior.

1.2.2.2.6. Efecto de la temperatura en el consumo de oxígeno en la semilla

En 2009 se estudió el consumo de oxígeno en la semilla a distintas temperaturas para ver qué condiciones son las más adecuadas para el cultivo de semilla en criadero. Para ello, se utilizaron 30 g de semilla de $3,7\pm 0,5$ mm de longitud. Se colocó en una cámara estanca en un sistema de recirculación para mantener estable la temperatura (Fig. 39). Dentro de la cámara de medición se dispuso un pequeño agitador para mantener homogénea la concentración de oxígeno en la cámara.

Se ensayaron las siguientes temperaturas: 12, 14, 16, 18, 20, 22 y 24°C. La medición del consumo de oxígeno se hizo con un oxímetro portátil Hatch HQ30d con el

que se midió la concentración de oxígeno y la temperatura cada minuto durante 1 hora. Los primeros 10 minutos de las mediciones se descartaron para permitir la estabilización del sistema.



Fig. 39. Sistema para la medición de oxígeno en la semilla de *S. marginatus*. A. Cámara donde se recircula agua dulce para mantener la temperatura. B. Cámara estanca para la medición de oxígeno.

1.2.2.2.7. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el paquete estadístico SPSS[®] para Windows versión 15.0. La longitud final de la semilla se comparó utilizando un test de análisis de varianza (ANOVA) utilizando el test de Tukey para las comparaciones múltiples. Para la comparación de las supervivencias al final de la experiencia, y para evitar trabajar con porcentajes, los valores se transformaron según la transformación angular, con la función arcoseno (Sokal y Rohlf, 1995). Una vez transformados los datos, las medias se compararon mediante el test no paramétrico *U de Mann-Whitney*.



1.2.2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.2.2.3.1. Cultivo larvario

1.2.2.3.1.1. Descripción general del cultivo larvario

Los huevos de *Solen marginatus* presentan un diámetro de 140-150 μm y una envuelta coriónica translúcida de unos 30 μm de espesor (Fig. 40A). El desarrollo embrionario continúa dentro de esta envuelta. Al llegar al estadio de 16 células se observa cómo la envuelta coriónica está compuesta por una membrana exterior y en su interior hay una gota lipídica que comienza a reducir su tamaño visiblemente, separándose de la membrana exterior (Fig. 40B). A medida que el número de células del embrión aumenta, la gota lipídica se va reduciendo, hasta desaparecer por completo en la gástrula, quedando el embrión dentro de la membrana exterior. La trocófora continúa en el interior de esta envuelta, dentro de la cual presenta un movimiento giratorio debido al batido de los cilios, permitiéndole el desplazamiento en la columna de agua. La envuelta coriónica sigue presente hasta que la larva D veliger está completamente formada, momento en el que la larva sale de esta membrana. A microscopía óptica se puede ver cómo la larva D se desplaza con el velo y captura el alimento, además de un aparato digestivo completo, con su boca, esófago, estómago, intestino y ano, que está rodeado por un mechón post-anal (Fig. 40C). Esta larva presenta una longitud de 160-170 μm . En la larva veliger a los 3 dpf aparece el umbo, con una longitud de 200-210 μm (Fig. 40D). La glándula digestiva comienza a ser más evidente, en forma de mancha marrón, en el centro de la larva. Ésta, con el paso de los días irá adquiriendo más coloración, llegando a pediveliger a los 6 dpf, con una talla de 240-260 μm (Fig. 40E). A los 8-9 dpf las larvas sufren la metamorfosis dando lugar a postlarvas con 300-320 μm de longitud, en las que se puede observar el pie y los filamentos branquiales (Fig. 40F).

La dieta estuvo compuesta por las microalgas *T. suecica*, *I. galbana*, *P. lutheri* y *C. calcitrans* en igual proporción y el suministro de alimentación fue diario. Esta dieta dio buenos resultados. A partir del año 2009 se comenzó a alimentar las larvas con la mezcla obtenida del cultivo de microalgas en continuo, en el que se mantiene una calidad constante. Se comenzó la alimentación en el día 1 (larva D) con una ración de 40 células equivalentes μl^{-1} , aumentándola paulatinamente hasta 80 células equivalentes μl^{-1} .

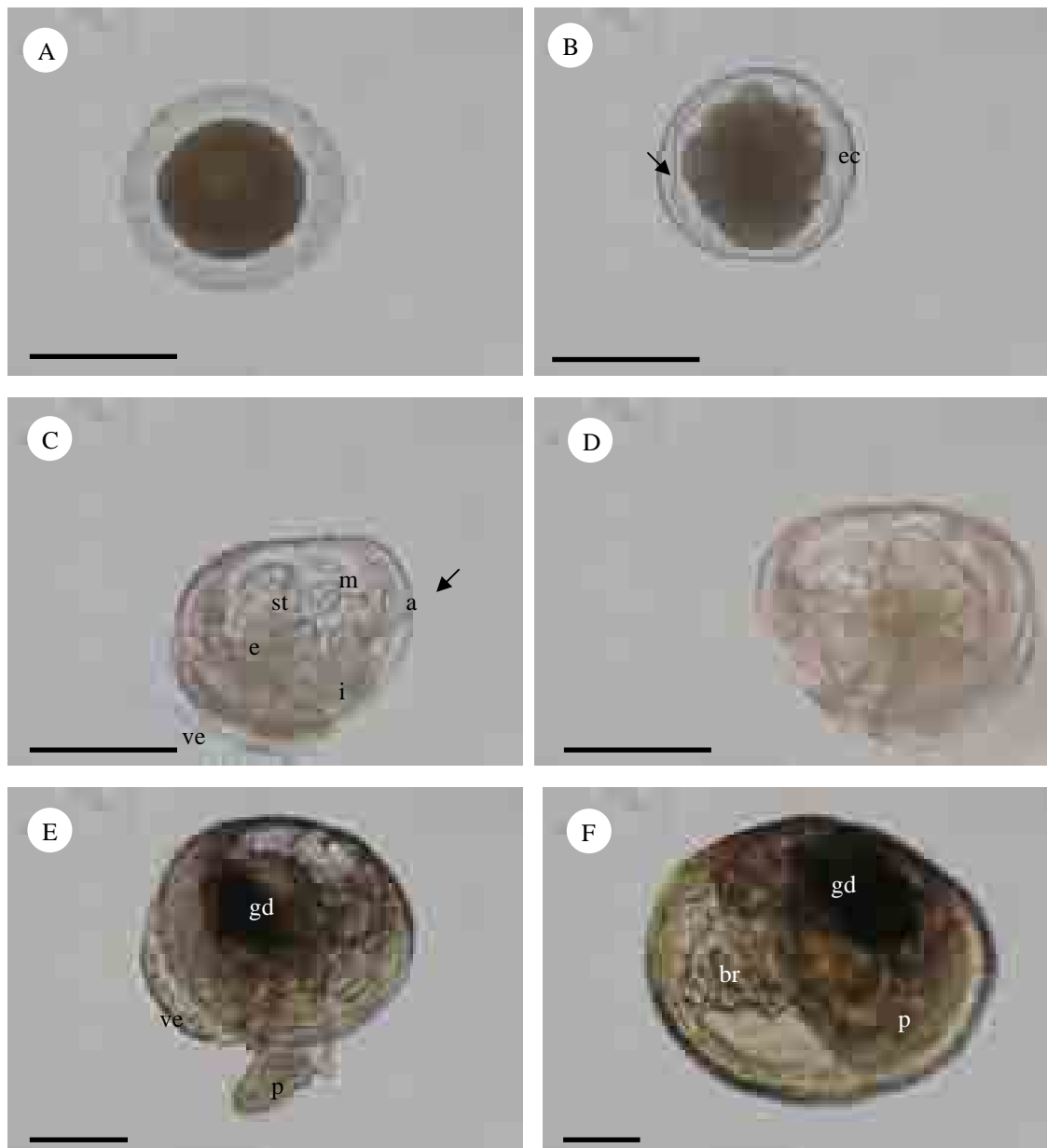


Fig. 40. Fotografías al microscopio óptico del desarrollo embrionario y larvario de *Solen marginatus*. A. Ovocito. B. Estadio de 16 células; envuelta coriónica (ec); gota lipídica (flecha). C. Larva D veliger de 1 dpf; velo (ve); esófago (e); estómago (st); intestino (i); ano (a); músculo (m); mechón post-anal (flecha). D. Larva umbonada de 3 dpf. E. Pediveliger de 6 dpf; velo (ve); glándula digestiva (gd); pie (p). F. Postlarva de 9 dpf; branquias (br). Barra de escala equivalente a 100 μm .

Se utilizó una densidad inicial de 5 huevos fecundados ml^{-1} , hasta 1-2 larvas ml^{-1} al final del cultivo, en la metamorfosis. Esta densidad es en la que se observaron buenos resultados de crecimiento y supervivencia.



La supervivencia es un factor muy importante a considerar cuando se analiza el cultivo larvario de una especie, por lo que se van a analizar las supervivencias larvarias de *S. marginatus* a lo largo del proyecto. En el año 2006 la mayoría de los desoves se hicieron para obtener suficiente semilla para las pruebas de cultivo de postlarvas y semilla y de preengorde en exterior. Se siguió una puesta de 1.697.000 ovocitos, que tardó 9 días en alcanzar la fijación y lo hizo con una supervivencia de 62,4%.

De los cultivos realizados en 2007 se han seleccionado para presentar los datos los que aportaban una información más completa (Tabla X). Cuatro de los cultivos se realizaron con desoves procedentes de los individuos mantenidos en jaulas hasta talla comercial, y que por tanto permitieron cerrar el ciclo de cultivo. La puesta media de estos desoves fue de 2,1 millones de ovocitos. La supervivencia media fue buena (49,7%) y la fijación se observó entre los días 8 y 9.

Tabla X. Supervivencias de los cultivos de 2007. P-1, P-2, P-3 y P-5 son cultivos de los desoves procedentes de los individuos mantenidos en jaulas hasta talla comercial. N° Hv.: número ovocitos; Talla Hv.: talla ovocitos (μm); Talla Fij.: Talla fijación (μm); Fij.: tiempo necesario para llegar a fijación en días; Sup. Fij.: Supervivencia de ovocito a postlarvas recién fijadas (%).

Puesta	N° Hv.	Talla Hv.	Talla Fij.	Fij.	Sup. Fij. (%)
20/04/07	1.000.000	148,6	288,7	10	55,7
P-1 26/05/07	2.168.000	146,8	293,2	8	82,8
P-2 01/06/07	1.891.892	147,3	326,2	10	33,3
P-3 13/06/07	2.500.000	151,2	283,3	8	41,1
20/06/07	3.645.000	153,3	287,6	8	48,9
P-5 27/06/07	1.500.000	149,7	278,4	9	36,6
Media	2.117.482	149,5	292,9	8,8	49,7
Desv.	912.482,8	2,5	17,1	1,1	18,1

Las puestas de 2008 se dedicaron en parte para el estudio de la microbiología de los cultivos, por lo que los datos se van a presentar en el apartado de microbiología de los cultivos larvarios y otros desoves, se utilizaron para obtener semilla para las experiencias de cultivo de semilla y preengorde. De todas formas este año la supervivencia fue baja durante todas las fases de cultivo.



C.A. Galicia-Subproy. 1. Cultivo de coquina (*Donax trunculus*) y longueirón (*Solen marginatus*)

Tabla XI. Cultivos larvarios 2009. Trat.: tratamiento; N° Hv.: número ovocitos; Talla Hv.: talla ovocitos (μm); Sup. LD.: Supervivencia de ovocito a larva D (%); Talla Fij.: Talla fijación (μm); Fij.: tiempo necesario para llegar a fijación en días; Sup. Fij.: Supervivencia de ovocito a postlarvas recién fijadas (%). C. Ab.: con antibiótico; S. Ab.: sin antibiótico.

Puesta	Trat.	N° Hv.	Talla Hv.	Sup. LD.	Talla Fij.	Fij.	Sup. Fij.
14-4-9	C. Ab	2.053.200	-	73,06	256,8	10	49,12
14-4-9	S. Ab	2.053.200	-	73,06	260,69	10	19,49
SM1	C. Ab	372.000	-	-	285,22	19	-
SM2	C. Ab	684.000	129,22	-	-	13	-
SM3	C. Ab	1.937.600	140,05	72,83	264,99	11	53,08
SM3	S. Ab	1.937.600	140,05	72,83	248,97	11	44,59
SM4	C. Ab	392.000	146,27	-	302,88	12	57,14
SM5	C. Ab	4.480.000	137,16	-	241,22	8	63,12
SM6	C. Ab	2.576.000	144,55	61,73	267,59	8	39,6
SM6	S. Ab	2.576.000	144,55	61,73	261,17	8	32,6
20-5-9	C. Ab	960.000	-	-	359,51	12	60
20-5-9	C. Ab	2.400.000	-	-	-	9	55,53
SM7	C. Ab	5.068.800	140,23	-	268,35	11	36,29
SM8	C. Ab	7.276.000	145,92	-	238,31	8	4,82
SM9	C. Ab	4.088.000	140,70	-	284,56	13	44,25
SM10	C. Ab	7.764.000	142,62	-	268,52	10	40,61
2-6-9	C. Ab	2.580.000	151,48	-	272,48	10	47,32
3-6-9	C. Ab	1.435.200	149,39	-	253,08	9	42,92
4-6-9	C. Ab	3.729.600	-	-	285,43	11	76,25
4-6-9	C. Ab	3.729.600	-	-	288,05	11	62,74
9-6-9	C. Ab	996.000	159,08	-	252,34	8	46,99
Media		2.813.752	143,66	69,21	271,59	10,57	46,12
Desv.		2.044.681	7,04	5,79	27,19	2,52	16,19

En 2009 se siguieron 19 cultivos larvarios, en 3 de ellos se estudió el efecto del uso de antibiótico en el rendimiento del cultivo larvario y su influencia en la microbiología de los cultivos (Tabla XI). La puesta media fue de 2,8 millones de ovocitos, siendo la mayor de 7,2 y la menor de 0,3 millones de ovocitos. En la puesta SM8 de 7,8 millones de ovocitos sin embargo se observó la supervivencia más baja. La supervivencia media fue de 46,12%, siendo estos resultados similares a los obtenidos anteriormente en esta especie (da Costa, 2009; da Costa & Martínez-Patiño, 2009) y a los observados en *E. siliqua* (da Costa, 2009). En general, la supervivencia larvaria de esta especie es elevada y por lo tanto, la



fase de cultivo larvario no presenta problemas. Se pueden obtener suficientes postlarvas para iniciar el cultivo de semilla.

1.2.2.3.1.2. Estudio de la composición bioquímica y de ácidos grasos en los desarrollos larvarios

La supervivencia, desde fertilización hasta larva D, es similar en los dos cultivos (73% y 81%), siendo la supervivencia en la fijación del 44% y 63%, respectivamente.

La composición bioquímica de la mezcla de microalgas suministrada como alimento tenía un 23,5% de proteínas, un 21,3% de lípidos y un 3,6% de carbohidratos.

El componente principal en los ovocitos de *S. marginatus* son las proteínas, con 77,5 ng ind.⁻¹ en los ovocitos. En los ovocitos hay un ligero descenso en su paso a la larva D, pero este no es significativo ($p > 0,05$). En la pediveliger (día 5) hay un aumento significativo con respecto al estadio anterior, continuando el incremento significativo hasta la postlarva (día 9), con 184,9 y 388,8 ng ind.⁻¹, respectivamente. Los lípidos y glúcidos siguen el mismo patrón que las proteínas, con ligeros descensos no significativos ($p > 0,05$) de ovocito a larva D veliger, y aumentos significativos en pediveliger y postlarva. La mayoría de los autores se centran en los lípidos en el estudio de la bioquímica de los desarrollos larvarios, aunque en este estudio se puede apreciar la importancia de los tres componentes estudiados. En *S. marginatus* no se produce acumulación selectiva de ninguno de los componentes bioquímicos, ni se utilizan preferentemente en la metamorfosis.

Los porcentajes de las proteínas en ovocitos, larva D y pediveliger varían entre 13,05 y 13,75 (Fig. 41), no presentando diferencias significativas al 95% de confianza. En la postlarva el porcentaje de proteínas aumenta significativamente ($p < 0,05$) hasta el 17,81%. Porcentualmente los lípidos aumentan en la larva D (día 1), para descender y volver a aumentar en pediveliger y postlarva, respectivamente. Los glúcidos descienden en la larva D veliger con respecto a los ovocitos, para aumentar significativamente ($p < 0,05$) en pediveliger y postlarva.

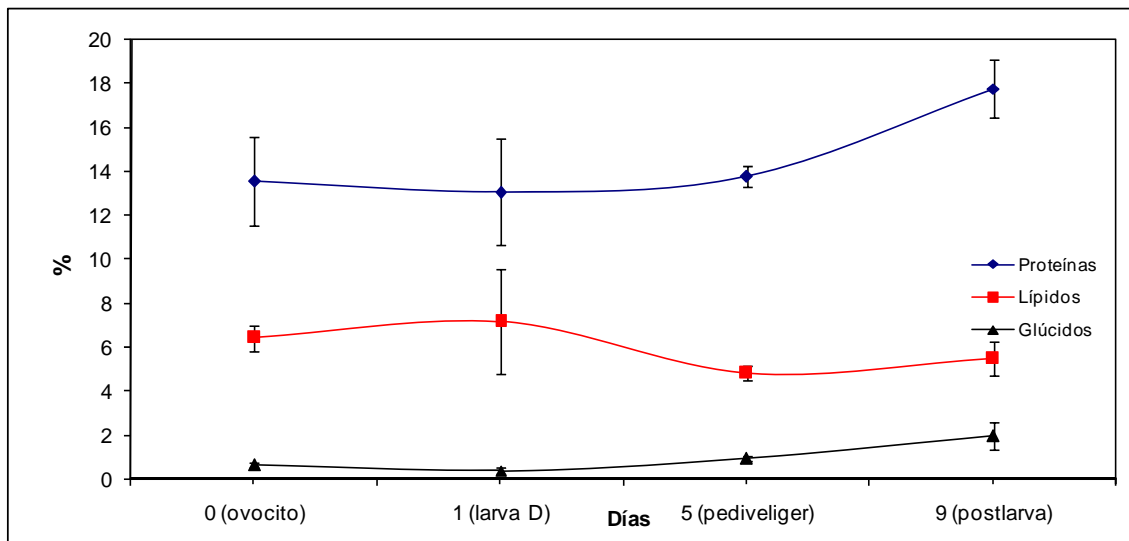


Fig. 41. Evolución de la composición bioquímica en porcentaje a lo largo del desarrollo larvario de *Solen marginatus*, expresado como media \pm desviación típica.

En la composición en ácidos grasos de la mezcla de fitoplancton con la que se alimentó a las larvas predominaron los AGPI (36,6%) y los AGS (34,4%). Dentro de los AGS, el ácido graso palmítico (16:0) presentaba el porcentaje más alto (17,8%), mientras en los AGPI, el más abundante fue el DHA (22:6n3) con un 4,9%.

La Tabla XII muestra la composición de los lípidos (neutros y polares) a lo largo del desarrollo larvario de *S. marginatus*. Los AGS son predominantes en los lípidos neutros. En los lípidos polares los AGPI predominan en los ovocitos y la larva D, pero a lo largo del tiempo éstos se reducen, ganando importancia los AGS. Durante la embriogénesis hay un ligero descenso en el EPA (20:5n3) en ambas clases lipídicas, pero el 16:0 se incrementa en los AGS de los lípidos polares. A partir del estadio de larva D hasta la fijación, el porcentaje de EPA disminuye observándose un mínimo en la pediveliger en los lípidos neutros y en la postlarva en los lípidos polares.

El total de ácidos grasos en los lípidos neutros de los ovocitos es elevado (29,7 ng huevo⁻¹) comparado con otras especies de bivalvos, como *Venerupis pullastra* (1,8-2,0 ng huevo⁻¹) (Nóvoa, 2007). Estas elevadas reservas lipídicas le permiten alcanzar la fijación en sólo 9 días. Los ácidos grasos totales descienden a lo largo del desarrollo embrionario en los lípidos neutros y polares. La energía para el desarrollo embrionario suele proceder de los lípidos neutros, observándose un descenso importante en esta clase lipídica. En los



lípidos neutros y polares se observa una fase mixotrófica desde la larva D hasta la pediveliger (5 días) y después el total de ácidos grasos aumenta en la postlarva sin llegar a alcanzar los valores presentes en los ovocitos. En la fase mixotrófica en *S. marginatus* desciende el 16:0 y el EPA. El EPA no se trasfiere a los lípidos polares, por lo tanto, parece presentar una función energética. El descenso del EPA en los lípidos polares durante el desarrollo larvario sugiere que éste podría usarse como fuente de energía secundaria (papel energético) en períodos de ayuno o en períodos de alta demanda de energía como es la embriogénesis. La energía suministrada por las microalgas no fue suficiente para mantener el crecimiento e incrementar las reservas hasta la pediveliger. El desarrollo larvario corto, presente en esta especie, con nuevas estructuras que se fabrican rápidamente, hace que la energía usada para el crecimiento sea mayor que la asimilada. Este tipo de desarrollo larvario sólo es posible con ovocitos ricos en reservas bioquímicas y con una gran inversión de energía por parte de los progenitores.

Tabla XII. Composición de ácidos grasos durante el desarrollo larvario de *S. marginatus* (n=4), expresado como porcentaje de los ácidos grasos totales. AGS: ácidos grasos saturados; AGMI: ácidos grasos monoinsaturados; AGPI: ácidos grasos poliinsaturados; ARA: 20:4n6; EPA: 20:5n3; DHA: 22:6n3. Total: ácidos grasos totales, expresados en ng individuo⁻¹.

	Días	AGS	AGMI	AGPI	16:0	ARA	EPA	DHA	Total
Lípidos neutros (%)	0	43,32	32,53	29,17	30,63	0,12	11,30	3,99	29,73
	1	45,29	30,55	28,22	29,66	0,14	10,52	3,90	20,60
	5	70,05	18,56	10,20	41,35	0,09	2,99	4,67	10,65
	9	42,99	29,82	27,17	21,23	0,11	4,49	2,84	23,77
Lípidos polares (%)	0	24,10	15,29	60,61	12,57	0,58	27,69	9,98	7,90
	1	23,29	15,74	59,79	16,78	0,59	22,59	11,81	7,56
	5	68,37	17,60	25,78	30,38	0,44	4,16	3,89	4,56
	9	44,10	21,06	35,86	25,93	0,71	1,59	0,75	6,68

Este estudio pone de manifiesto la importancia de las proteínas y de la composición en ácidos grasos en los huevos de *S. marginatus*, debiendo aportar una dieta rica en proteínas y una dieta equilibrada en ácidos grasos a los reproductores para obtener huevos de calidad.



1.2.1.3.1.3. Efecto del ayuno y las dietas microalgales en el desarrollo larvario

En la experiencia de cultivo larvario con distintas dietas, la dieta 1 es la que permite un mayor crecimiento al final de la experiencia, fijando a una talla de 287,5 μm (Fig. 42). La dieta 1 es más rica en los ácidos grasos esenciales 18:2n6 y EPA que la dieta 2. Las larvas sometidas a la dieta 1 almacenan más lípidos polares y sin embargo, con la dieta 2, se almacenan más lípidos neutros (Tabla XIII y XIV).

Las larvas mantenidas en ayuno experimentaron un crecimiento mínimo, sin alcanzar la fijación, muriendo el día 11 (a los tres días de comenzar a alimentarlas), aunque, en experiencias anteriores, se consiguió que fijasen el día 10 tras estar 5 días de ayuno, con una supervivencia de 16,2% (datos sin publicar). Se podía observar como las larvas iban perdiendo reservas en la glándula digestiva (Fig. 43), perdiendo demasiadas reservas, lo que hizo que, al volver a alimentarse, no pudiesen recuperarse, por lo que se produjo la muerte a los 3 días de comenzar la alimentación. Sin embargo, a los 8 días las larvas sometidas a ayuno lograron la supervivencia más elevada de las tres dietas (66%), seguida por la dieta 1 (49%). Esto puede ser debido a que las altas reservas energéticas almacenadas en el ovocito de *S. marginatus* permiten que se mantengan hasta 8 días sin alimento (tiempo normal que tardan en alcanzar la fijación en condiciones de alimentación). Las larvas alimentadas con la dieta 1, fueron las que alcanzaron la fijación con un mayor porcentaje de supervivencia.

En las larvas sometidas a ayuno el contenido de lípidos de reserva descendió bruscamente con respecto a los valores de las larvas D y en los lípidos polares descendieron ligeramente con respecto a los valores iniciales. Las larvas alimentadas con la dieta 2 almacenaron en los lípidos neutros más ácidos grasos esenciales 18:2n6, 18:3n3 y DHA que los de la dieta 1, aunque la supervivencia de las larvas de la dieta 2 fue menor. La mejor dieta consistió en una mezcla de 4 microalgas. Se ha demostrado que, a pesar de que los ovocitos de *S. marginatus* presentan un gran tamaño y muchas reservas, las larvas necesitan alimentarse para superar la metamorfosis.

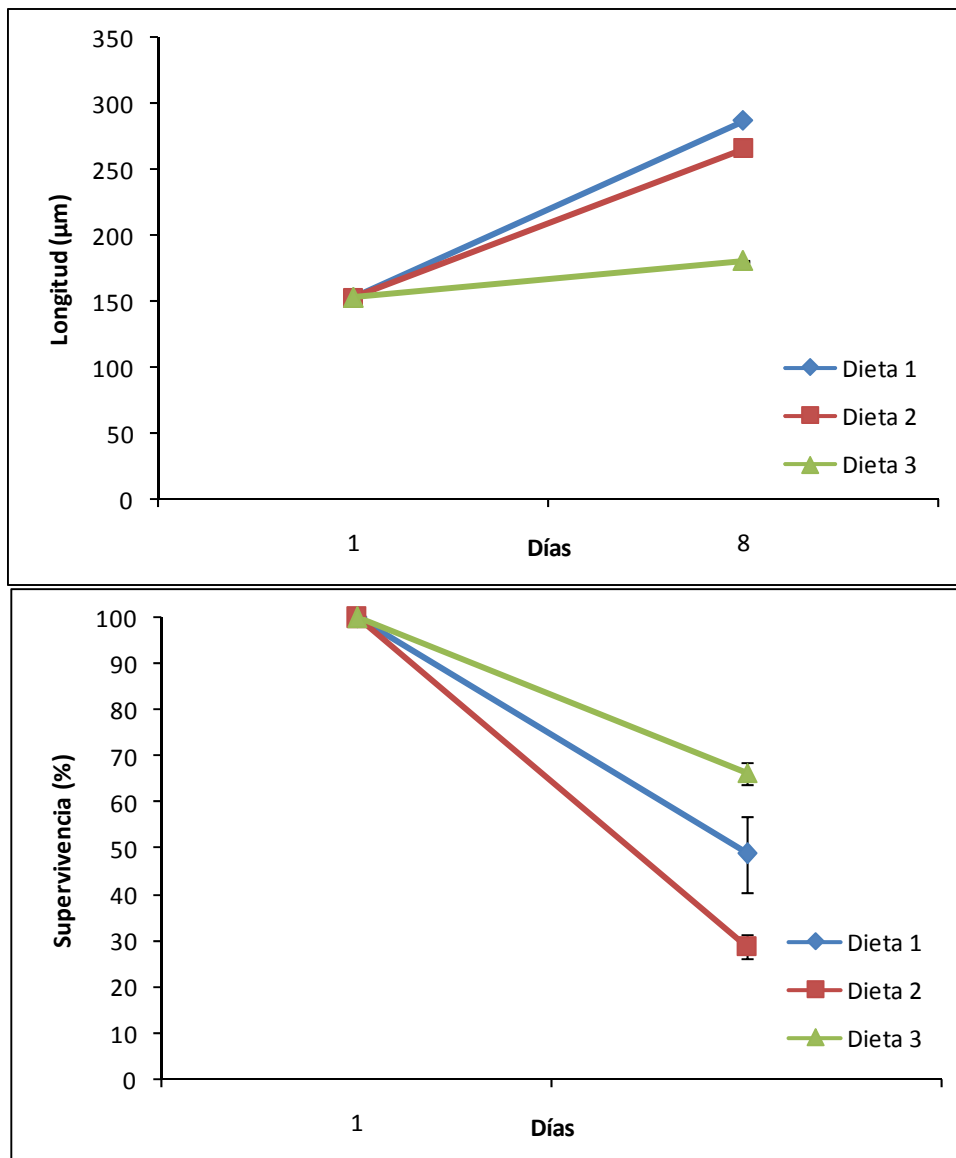


Fig. 42. Crecimiento en longitud y supervivencia en el cultivo larvario de las larvas de *S. marginatus* cultivadas con 3 dietas. Dieta 1:10 células equivalentes (*I. galbana*, *P. lutheri* y *C. calcitrans*) y 20 equiv. de *T. suecica*; 2:80 células equivalentes de *I. galbana*; y 3: ayuno de 8 días, hasta la fijación.



Fig. 43. A. Larva D de 1 día, aspecto normal. B. Larva tras 8 días de ayuno (dieta 3). C. Postlarva recién fijada al finalizar la experiencia (8 días) en las dietas 1 y 2.



Tabla XIII. Composición de ácidos grasos totales en las dietas microalgales (expresado en porcentaje).

	Microalgas (%)	
	Dieta 1	Dieta 2
18:2n6	8,0±2,4	7,18±0,14
18:3n3	5,9±0,6	14,96±0,44
EPA	2,3±0,2	0,44±0,02
DHA	5,4±1,2	8,44±0,25

Tabla XIV. Composición de ácidos grasos en los lípidos neutros y polares en las larvas al inicio y final de la experiencia (expresado en ng/individuo).

		Larvas (ng/individuo)			
		Inicio	Fin Dieta 1	Fin Dieta 2	Fin Ayuno
Lípidos neutros	18:2n6	0,10±0,01	0,81±0,16	2,06±0,00	0,03±0,00
	18:3n3	0,25±0,02	0,67±0,00	1,44±0,27	0,03±0,00
	EPA	1,41±0,13	0,51±0,09	0,25±0,03	0,18±0,02
	DHA	1,01±0,11	0,60±0,11	1,66±0,27	0,19±0,02
	TOTAL	16,05±1,21	16,84±0,53	20,42±4,88	2,84±0,08
Lípidos polares	18:2n6	0,01±0,00	0,29±0,08	0,43±0,13	0,01±0,00
	18:3n3	0,02±0,00	0,49±0,16	0,35±0,14	0,01±0,00
	EPA	0,21±0,04	0,74±0,13	0,24±0,09	0,10±0,01
	DHA	0,19±0,04	1,32±0,06	1,60±0,54	0,15±0,01
	TOTAL	1,61±0,11	16,44±3,00	9,84±4,38	1,30±0,17

1.2.2.3.2. Cultivo postlarvario

1.2.2.3.2.1. Descripción general

La fijación de *S. marginatus* ocurre a los 8-9 días post-fertilización con una talla de 270-350 µm (Fig. 44A). Al mes de vida los individuos suelen presentar una talla entre 1 y 2 mm. En este momento comienzan a adquirir el aspecto alargado característico de esta especie (Fig. 44B). Por su parte, *E. arcuatus* mide 861 µm al mes de vida y *E. siliqua* 652 µm (da Costa, 2009). La talla alcanzada por las postlarvas de 1 mes de vida de *E. arcuatus* es similar a la mencionada por Darriba (2001), que daba una talla de 958 µm de longitud. A pesar de que las postlarvas de *S. marginatus* se fijan a una talla menor, tienen más tiempo desde la fijación hasta el mes de vida para crecer, coincidiendo además con la fase en la que se produce el alargamiento. Así, pueden alcanzar una mayor talla frente a las

otras dos especies. Entre las dos especies de *Ensis*, la diferencia puede deberse a la diferente talla de fijación.

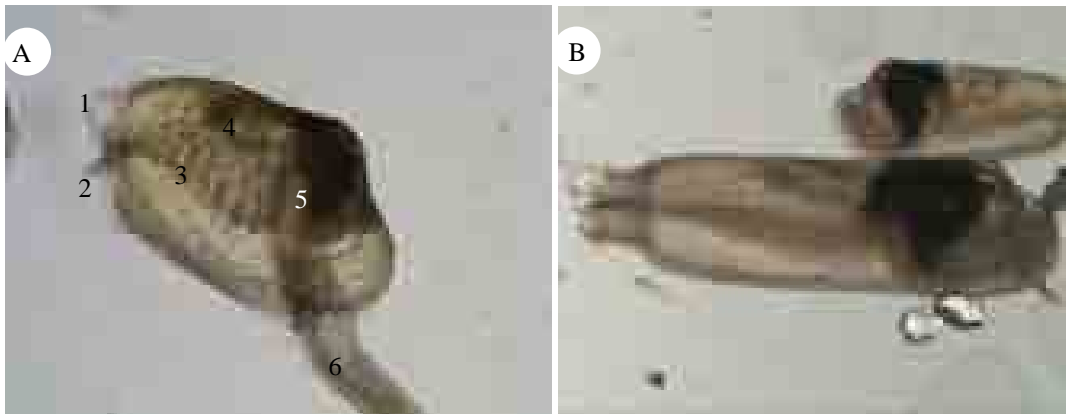


Fig. 44. A. Postlarva de *Solen marginatus* con el pie extendido. 1: sifón inhalante; 2: sifón exhalante; 3: filamentos branquiales; 4: estómago; 5: glándula digestiva; 6: pie. B. Postlarvas de 1 mes de vida.

En las postlarvas se pueden ver los órganos internos a través de la concha: glándula digestiva, intestino, pie, corazón, filamentos branquiales y sifones. A los tres meses de vida la concha ya es casi totalmente opaca, sólo dejando ver de la vianda, la glándula digestiva. Las valvas poseen un color anaranjado y mate característico de la especie. Además, se observan los sifones bastante largos con respecto a la longitud de las valvas, que autotomizan como los adultos.

La dieta estuvo compuesta por las microalgas *T. suecica*, *I. galbana*, *P. lutheri* y *C. calcitrans* en igual proporción y el suministro de alimentación fue diario. La ración inicial fue de 80 células equivalentes μl^{-1} y se incrementó según la demanda del cultivo. A partir del año 2009 se comenzó a alimentar las larvas con la mezcla obtenida del cultivo de microalgas en continuo.

1.2.2.3.2.2. Mejora de la supervivencia postlarvaria. Experiencias sin y con sustrato en la fijación

En experiencias previas al proyecto se había constatado el siguiente patrón de supervivencia entre la fijación (aproximadamente a los 8 días) y el mes de vida. La



supervivencia de las postlarvas se mantenía hasta los 15 días, y a partir de aquí, hasta los 22 días, se producía una elevada mortalidad, coincidiendo con la llegada a la talla de 1 mm. A los 30 días de cultivo la supervivencia de las postlarvas variaba entre 5 y el 16% en el mejor de los casos. Estas experiencias se hacían añadiendo sustrato de tipo medio-fino (partículas entre 150 y 600 μm de diámetro). La supervivencia de postlarvas en *E. arcuatus* y *E. siliqua* también es baja, situándose en torno al 5-10% a los 30 días de cultivo con respecto a la fijación (da Costa, 2009).

Por lo que al siguiente año, 2007, se decidió realizar pruebas sin sustrato en contenedores de 0,125 m² de área. En los contenedores con menor área se mantiene una densidad más elevada que permite que unos individuos presionen a otros evitando que necesiten gastar tanta energía para mantener las valvas cerradas. Se ha pasado de una supervivencia a los 30 días desde la fijación de entre 5 y 16% con sustrato, a una supervivencia media del 35%, con valores entre el 24 y el 46%, en los contenedores de menor área sin sustrato (Tabla XV). El cultivo de las postlarvas recién fijadas sin sustrato posibilita una limpieza más adecuada, así como el tamizado y eliminación de colas y ejemplares muertos o moribundos. Ésto limita la proliferación de agentes patógenos en el cultivo y evita el que se puedan dar condiciones anóxicas debido al sustrato.

Tabla XV. Supervivencias de los cultivos postlarvarios de 2007. P-1, P-2, P-3 y P-5 son cultivos de los desoves procedentes de los individuos mantenidos en jaulas hasta talla comercial.

Puesta	Talla 1 mes (μm)	Superv Fijación-1 mes (%)
20/04/07	1475,5 (30 días)	23,5
02/05/07	1174,8 (30 días)	45,8
P-1 26/05/07	1312,9 (30 días)	45,6
P-2 01/06/07	2589,0 (48 días)	33,9
P-3 13/06/07	1308,3 (33 días)	35,0
P-5 27/06/07	1285,5 (30 días)	23,5

En 2009 se siguieron estudiando los resultados de la que primero había sido considerada como la fase más crítica en el cultivo de *S. marginatus*, que era la fase desde fijación hasta 1 mm (Tabla XVI). Este año se ha logrado mejorar los rendimientos de esta fase hasta alcanzar una supervivencia media de 63,5%, con valores entre 12,9 y 100%. Por lo tanto, en la fase de cultivo de postlarvas desde fijación hasta el mes de vida, se ha



conseguido solucionar el problema de las bajas supervivencias observadas en experiencias previas al desarrollo de este proyecto.

Tabla XVI. Supervivencias de los cultivos postlarvarios de 2009.

Puesta	Tratamiento	Talla 1 mes (μm)	Superv Fijación-1 mes (%)
14/04/2009	C. Ab	663,97 (30 días)	12,87 (44 días)
14/04/2009	S. Ab	555,49 (30 días)	68,19 (44 días)
SM1-p22/4/9	C. Ab	-	-
SM2-p5/5/9	C. Ab	1432,09 (37 días)	-
SM3-p14/5/9	C. Ab	1116,19 (36 días)	90,63 (36 días)
SM3-p14/5/9	S. Ab	-	-
SM4-p15/5/9	C. Ab	1478,36 (35 días)	94,59 (35 días)
SM5-p19/5/9	C. Ab	-	-
SM6-p19/5/9	C. Ab	997,97 (30 días)	94,52 (30 días)
SM6-p19/5/9	S. Ab	1129,42 (30 días)	20,56 (30 días)
p20/5/9	C. Ab	855,6 (28 días)	16,56 (28 días)
SM7-p21/5/9	C. Ab	-	-
SM8-p26/5/9	C. Ab	-	-
SM9-p26/5/9	C. Ab	673,97 (29 días)	73,44 (29 días)
p9/6/9	C. Ab	1076,88 (29 días)	100,00 (29 días)

1.2.2.3.3. Descripción del cultivo de semilla en criadero a partir del mes de vida

La semilla de *S. marginatus* a los 30 días de vida alcanza 1-2 mm de longitud, creciendo hasta los 6-7 mm a los 60 días, mientras que a los 90 días la talla ronda los 15-16 mm (Fig. 45). Comparado con otras especies de solénidos, a los 90 días se alcanzan en alguno casos tallas mayores, como en *E. siliqua*, con casi 21 mm (da Costa, 2009) o en *E. arcuatus*, con 30 mm (Darriba, 2001). Otras especies presentan a los tres meses tallas menores, como los 11 mm de *E. arcuatus* (da Costa, 2009), *E. directus* en la que los juveniles de 3 meses alcanzan 7-9 mm (Kenchington *et al.*, 1998) y en *E. macha*, en este período, alcanza 1 cm de longitud (López *et al.*, 2008).

Por otra parte, el peso fue de 0,03-0,04 g a los 60 días, aumentando hasta 0,13 g a los 90 días. Durante la fase de semillero, a medida que aumentaba la talla, lo hacía la dispersión de los datos, pero este hecho fue mucho más acusado en el caso del peso.



La supervivencia de la semilla en *S. marginatus* es baja, situándose en torno al 2-5% a los 90 días de cultivo con respecto a la fijación. Se detectaron mortalidades periódicas a partir del mes de vida sin razón aparente. Así, en los cultivos que se siguieron en 2009 la supervivencia media desde la fijación a los 30 días de vida fue 63,5%, cayendo a los 60 días de vida a 20,2% y a los 90 días de vida de tan sólo 2,15%. Se debe investigar en estudios futuros la fase desde el mes de vida, a la que se llega con supervivencias aceptables, hasta que se saca la semilla del semillero. Este patrón también se ha observado en otros solénidos, como en *E. arcuatus* y *E. siliqua* en los que se obtuvieron supervivencias similares a los 90 días (da Costa, 2009) y en *E. macha* en la que la supervivencia a los 50 días del cultivo de postlarvas es aproximadamente del 5% (López *et al.*, 2005).



Fig. 45. Semilla de tres meses de *S. marginatus*.

1.2.2.3.4. Efecto del uso de sustratos

1.2.2.3.4.1. Prueba en cilindros

La semilla de *S. marginatus* cultivada sin sustrato fue la que alcanzó una menor talla ($5,39 \pm 1,58$ mm), presentando diferencias significativas con los dos grupos mantenidos en sustrato ($p < 0,05$). La mayor talla la lograron los individuos mantenidos en arena fina ($7,61 \pm 1,21$ mm), aunque no se apreciaron diferencias significativas en la talla final alcanzada ($p > 0,05$) (Fig. 46). Una posible explicación sería que en el cultivo sin sustrato, los individuos gastarían más energía en mantener las valvas cerradas, con lo cual se destinaría menos energía al crecimiento. Además, Brousseau y Baglivo (1987) citan que



los individuos que crecen más rápido de *Mya arenaria* habitan en sedimentos finos, mientras que los que viven en sedimentos más gruesos gastan más energía reparando los bordes de la concha. El uso de un sustrato adecuado, como es la arena de grano fino, puesto que el longueirón vello habita zonas de sustrato más fino, permitiría maximizar el crecimiento. Sin embargo, *E. arcuatus* mostró un patrón opuesto al de *S. marginatus*, alcanzando la mayor talla en los individuos cultivados sin arena (12,07±2,50 mm) y la menor en los individuos mantenidos en arena fina (10,86±1,96 mm) (da Costa *et al.*, 2009). No se observaron diferencias significativas en la longitud de los tres grupos de *E. arcuatus* al final de la experiencia ($p>0,05$).

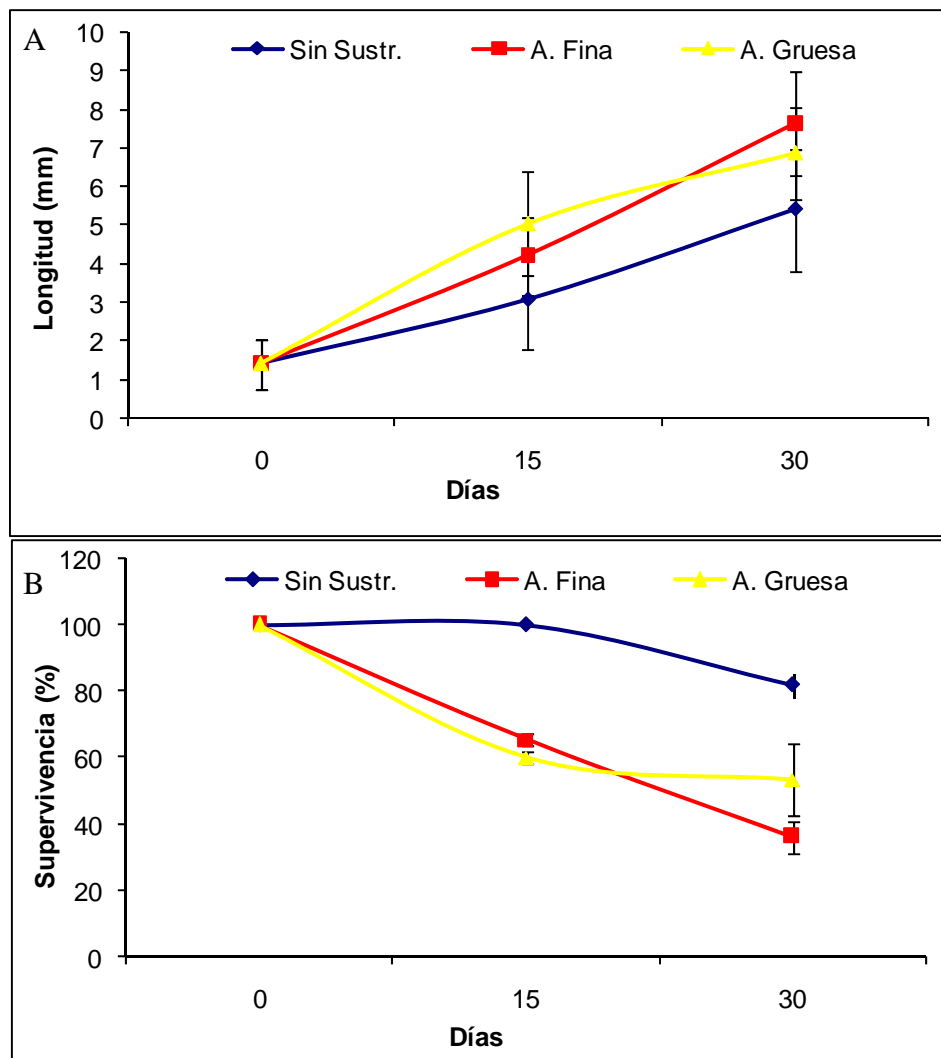


Fig. 46. Evolución del crecimiento y supervivencia en los distintos tratamientos. A. Crecimiento. B. Supervivencia.



La supervivencia de la semilla de *S. marginatus* fue más elevada en el sistema de cultivo sin sustrato (81,9%), siendo menor en los contenedores con arena gruesa y fina, 56,3 y 36,1%, respectivamente (Fig. 46). Se han encontrado diferencias significativas en las supervivencias de los tres grupos ($p=0,029$). La menor supervivencia en la arena fina podría deberse al apelmazamiento del sustrato y a una mayor acumulación de metabolitos de excreción de los ejemplares, puesto que, como se comentó anteriormente, esta especie habita en sedimentos finos. Los resultados muestran que al poder realizar la etapa de semillero sin sustrato se puede mantener una mayor cantidad de semilla en el criadero y se reduce la mano de obra necesaria. Además, esto permite el tamizado, eliminando los individuos muertos y moribundos, y por tanto, reduciendo las probabilidades de infecciones. Es necesario determinar la talla hasta la que se puede mantener sin sustrato la semilla de *S. marginatus* sin que ello afecte a la supervivencia y sin que reduzca la adaptación de la semilla para su posterior engorde en el medio natural.

1.2.2.3.4.2. Prueba en cilindro sin sustrato y tanque con capa de arena

Los individuos que alcanzaron una talla final mayor fueron los cultivados en sustrato, independientemente de la densidad utilizada (Fig. 47). Los individuos mantenidos en sustrato crecieron más presentando diferencias significativas con los individuos mantenidos sin sustrato ($P<0,05$). La supervivencia más elevada fue la correspondiente a la densidad baja sin sustrato (D1-SS) tanto a los 30 como a los 60 días (Fig. 47). Por lo tanto, se observó el mismo patrón que en la experiencia realizada con cilindros con y sin sustrato. No se observaron diferencias con la supervivencia de la semilla mantenida en sustrato a baja densidad. La densidad 2 (90 g) parece ser demasiado elevada para que se obtengan unos resultados de supervivencia aceptables. Se debe decidir si conviene centrarse en obtener un mayor crecimiento manteniendo la semilla de *S. marginatus* enterrada en sustrato o por el contrario es mejor maximizar la supervivencia. El uso de arena para el cultivo de semilla en criadero hace que se requiera más espacio para mantenerla que si se hace el cultivo en cilindros sin sustrato. Además, hace falta mantener grandes cantidades de arena en el criadero, requiriendo mucha más mano de obra para realizar la limpieza de la semilla y del sustrato.

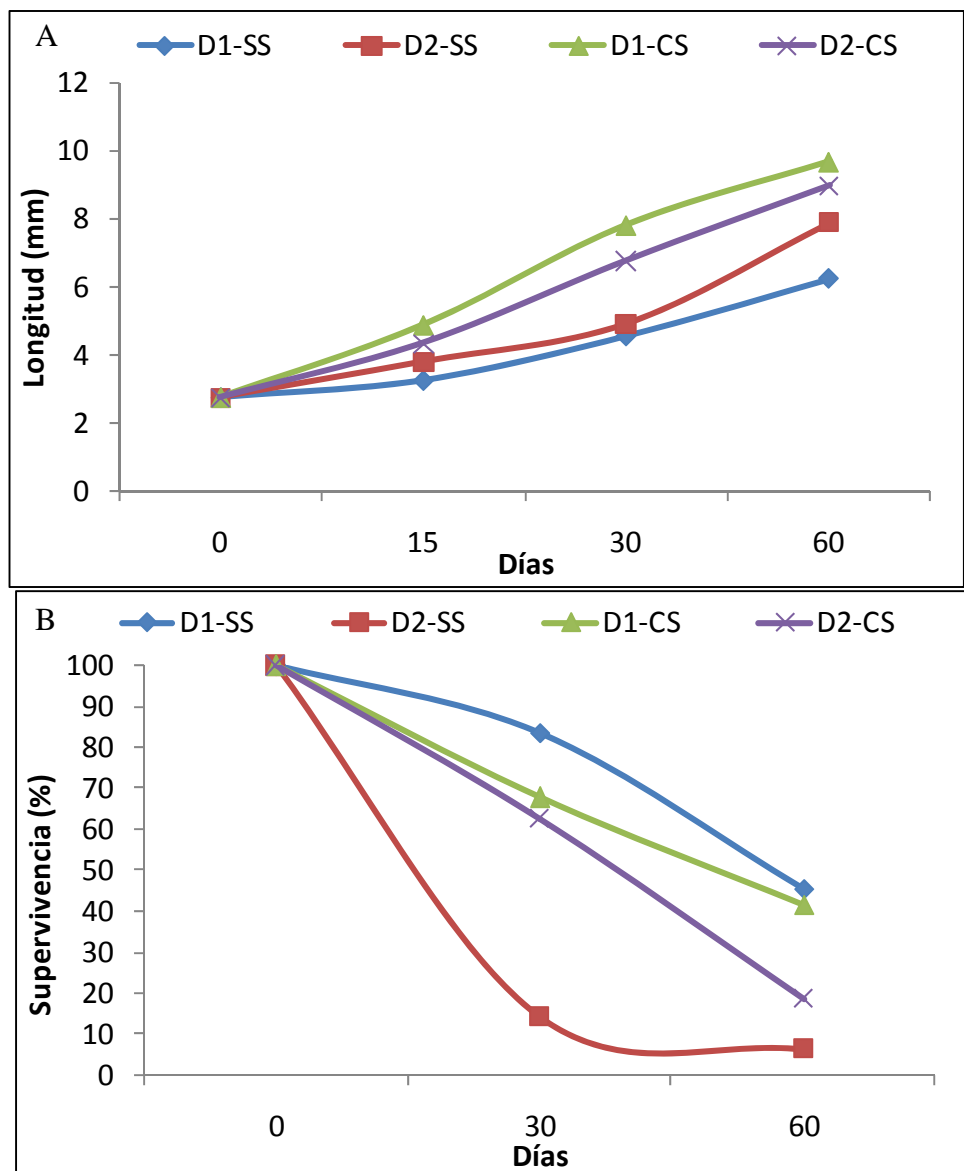


Fig. 47. Evolución del crecimiento y supervivencia en los distintos tratamientos. A. Crecimiento. B. Supervivencia. D1: densidad 1 (25 g); D2: densidad 2 (50 g); SS: sin sustrato; CS: con sustrato.

1.2.2.3.5. Efecto de la densidad en el cultivo de semilla

Al final de la experiencia de cultivo de semilla con tres densidades se encontraron diferencias significativas en la talla final entre la densidad 2 y el otro grupo, formado por la densidad 1 y 3 (Fig. 48). La mayor talla alcanzada fue para la densidad 2, con $6,39 \pm 1,05$ mm de longitud. La supervivencia fue baja al final de la experiencia, presentando la supervivencia más alta la densidad 1 (7,85%) y la más baja la densidad 3 (2,86%). Durante los primeros días de la experiencia la supervivencia ya se había reducido



considerablemente, siendo menor en las tres densidades de 42%. Por lo tanto, los resultados de esta experiencia serían preliminares para las densidades utilizadas, ya que en ninguno de los casos se observaron buenos resultados al final de la experiencia.

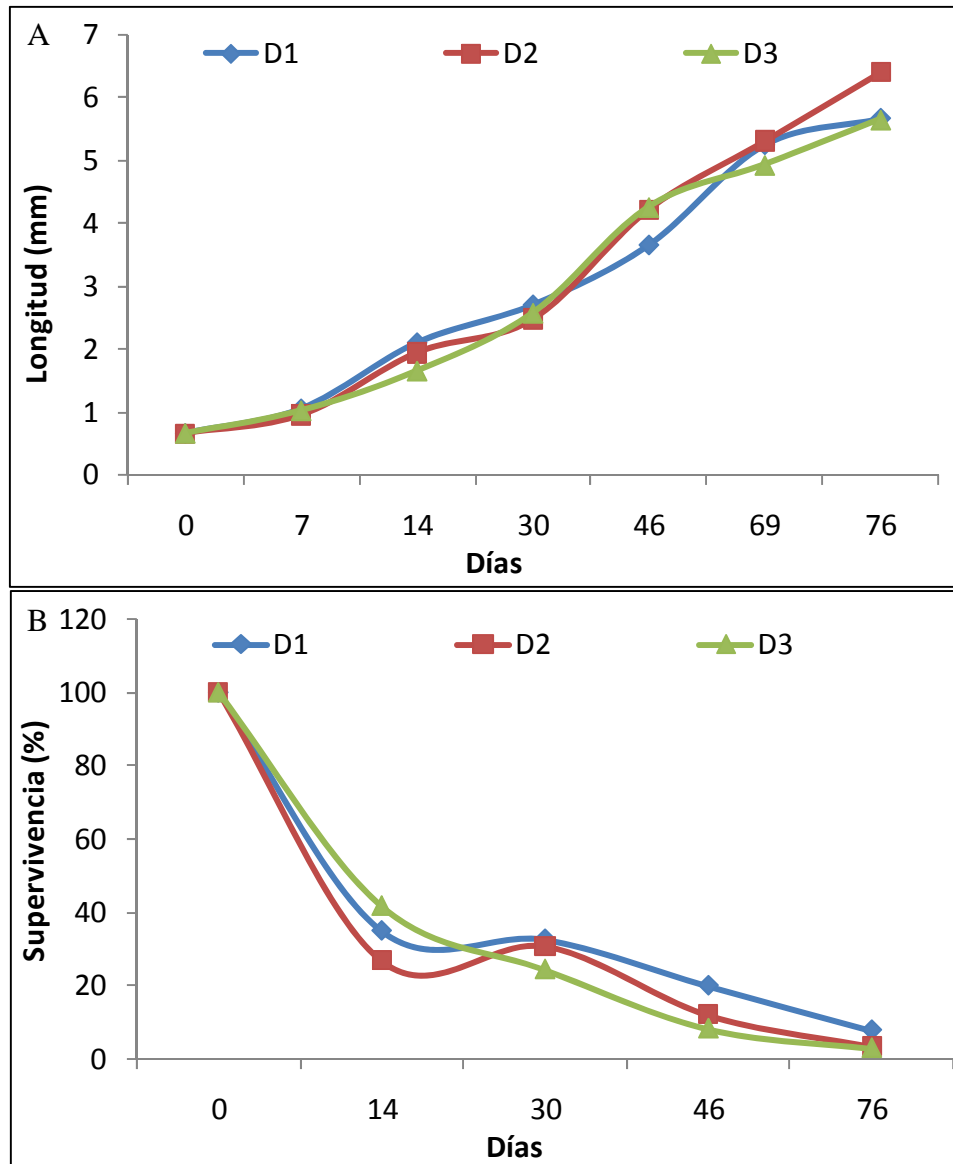


Fig. 48. Evolución del crecimiento y supervivencia en las distintas densidades. A. Crecimiento. B. Supervivencia. D1: densidad 1 (12 g); D2: densidad 2 (24 g); D3: densidad 3 (36 g).

1.2.2.3.6. Efecto de distintas dietas microalgales en el cultivo de semilla

El inicio de la experiencia se realizó con semilla de $1,17 \pm 0,29$ mm (Fig. 49). En el control intermedio el crecimiento fue similar entre dietas. Sin embargo, a los 15 días la dieta 1 fue la que mantuvo un crecimiento mayor, alcanzando $2,11 \pm 0,24$ mm de longitud.



La supervivencia al final de la experiencia fue similar entre dietas, con un 97% en la dieta 1 y un 100% en las otras dos dietas.

Por lo tanto, en esta experiencia la dieta 1, compuesta por *I. galbana*, *P. lutheri*, *C. calcitrans* y *T. suecica*, fue la que mostró unos mejores resultados en crecimiento, con tasas similares entre todas en supervivencia. La experiencia se debería repetir estudiando en períodos más largos la influencia de la dieta en el crecimiento y supervivencia de la semilla de esta especie, para concluir cual es la dieta que mejor se adapta a esta especie.

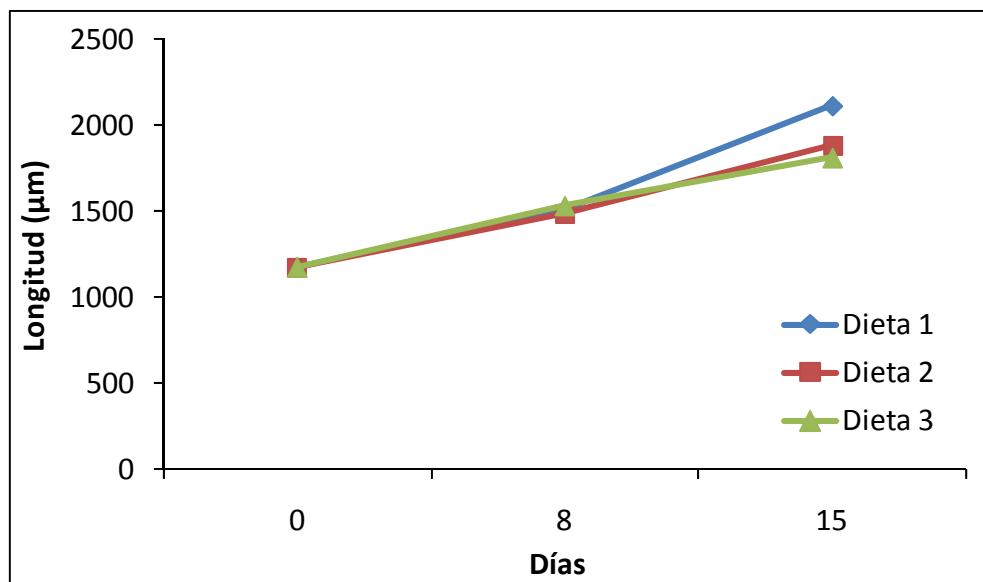


Fig. 49. Crecimiento en longitud de semilla de *S. marginatus* a lo largo de 15 días de experiencia alimentadas con 3 dietas. Dieta 1:25 células equivalentes (*I. galbana*, *P. lutheri* y *C. calcitrans*) y 50 equiv. de *T. suecica*; dieta 2:25 células equivalentes (*I. galbana*, *P. lutheri* y *S. costatum*) y 50 equiv. de *T. suecica*; y dieta 3:40 células equivalentes (*I. galbana* y *P. lutheri*) y 50 equiv. de *T. suecica*.

2.3.7. Efecto de la temperatura en el consumo de oxígeno en la semilla

El consumo de oxígeno en la semilla de *S. marginatus* a diferentes temperaturas se muestra en la figura 50. En principio el consumo de oxígeno parece aumentar a medida que aumenta la temperatura. Sin embargo, los valores más bajos se han observado a la temperatura de 16°C y no a 12°C como cabría esperar. A la temperatura más alta utilizada, 24°C, se observó el consumo de oxígeno más elevado. Por lo tanto, se debe de mantener un



suministro adecuado de oxígeno disuelto cuando se cultiva la semilla y aumentar el cuidado a medida que se aumenta la temperatura para prevenir posibles problemas asociados con el descenso de oxígeno disuelto.

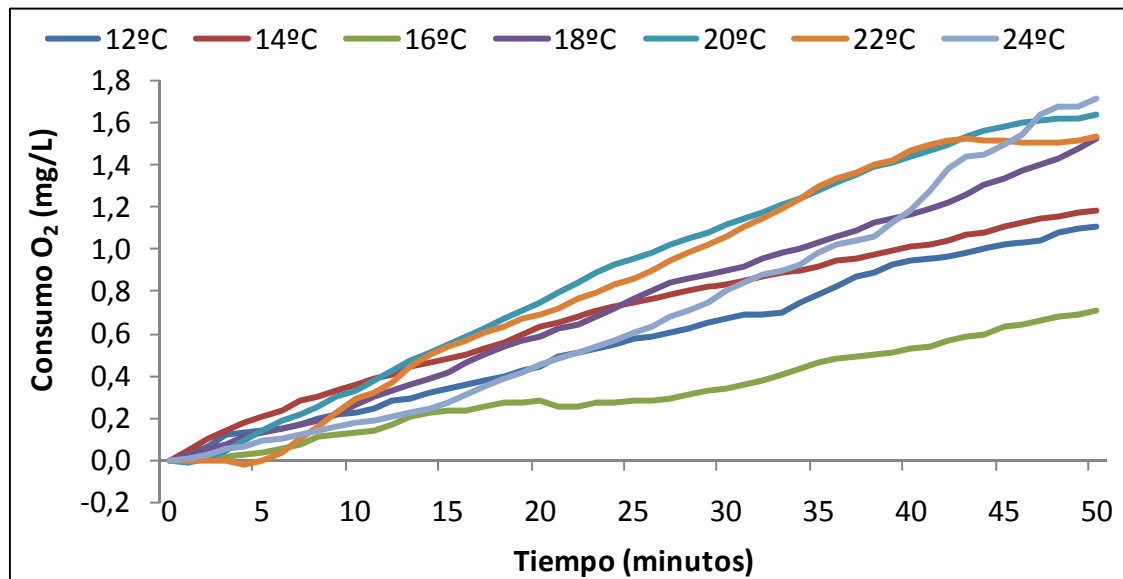


Fig. 50. Evolución del consumo acumulado de oxígeno a lo largo de la experiencia con distintas temperaturas.

1.2.2.4. CONCLUSIONES

- **Cultivo larvario**
 - Las larvas de *S. marginatus* deben cultivarse a una densidad inicial de 5 huevos fecundados ml^{-1} .
 - La dieta debe componerse por *I. galbana*, *P. lutheri*, *C. calcitrans* y *T. suecica* ya que es con la que se alcanzaron mejores crecimientos y supervivencias.
 - Se ha demostrado que, a pesar de que esta especie posee ovocitos muy ricos en reservas energéticas, es necesario alimentar las larvas para superar la metamorfosis.



- La alimentación se debe empezar a suministrar en el día 1 (larva D) con una ración de 40 células equivalentes μl^{-1} , aumentándola paulatinamente hasta 80 células equivalentes μl^{-1} . De este modo se consiguió una supervivencia larvaria elevada, no presentando problemas el cultivo larvario.

- **Cultivo postlarvario y de semilla en criadero**

- El cultivo postlarvario debe hacerse en los tanques troncocónicos de cultivo larvario, dentro de unos contenedores de 0,125 m² de área y sin sustrato.

- La dieta debe componerse por *I. galbana*, *P. lutheri*, *C. calcitrans* y *T. suecica* ya que es con la que se alcanzaron mejores crecimientos y supervivencias. La ración inicial debe ser 80 células equivalentes μl^{-1} , que se irá incrementando según las necesidades del cultivo a demanda.

- La fase del cultivo correspondiente a 1 mm de talla (1 mes de vida aproximadamente) ha dejado de ser una fase crítica en el cultivo de esta especie, consiguiendo pasar de supervivencias entre a 5-15% a una supervivencia media de 63,5%, que puede llegar a ser del 100% en algún cultivo.

- La semilla de *S. marginatus* debe cultivarse sin sustrato desde la fijación hasta los 10 mm de longitud aproximadamente, lo que puede mejorar el manejo en criadero y posibilitar la producción de mayores cantidades de semilla.

- La dieta compuesta por *I. galbana*, *P. lutheri*, *C. calcitrans* y *T. suecica* es con la que se obtuvieron mejores resultados en el cultivo de postlarvas de *S. marginatus*, pero la supervivencia fue del 100% en las tres dietas.

- El consumo de oxígeno en la semilla de esta especie aumenta a medida que lo hace la temperatura, siendo máximo a 24°C y mínimo a 16°C.



1.2.3. LÍNEA 4. PREENGORDE DE *S. MARGINATUS* Y *D. TRUNCULUS*

1.2.3.1. INTRODUCCIÓN

El cultivo de postlarvas lleva implícito el cultivo de fitoplancton en volúmenes cada vez mayores, puesto que tras la fijación se produce un incremento radical en las tasas de crecimiento y de filtración. A mayor talla aumenta la demanda de alimento. Así, cuando la semilla alcanza una talla de aproximadamente 1 ó 2 mm, el consumo de fitoplancton en el semillero es muy elevado, con lo que en muchos casos, se rebasa el límite de factibilidad técnica. Por eso, la semilla debe ser transferida lo antes posible al medio natural, para que continúe su crecimiento hasta talla comercial. Sin embargo, si los juveniles se introducen en los bancos naturales cuando son demasiado pequeños, éstos sufrirán mortalidades elevadas, principalmente debidos a la predación. La producción industrial de la mayoría de especies de bivalvos comprende una fase de cultivo intermedio durante la cual los juveniles se hacen crecer bajo protección, usando el fitoplancton natural como fuente de alimento, hasta que se alcanza una talla en la que son menos propensos a la predación y se pueden trasladar a los bancos naturales para crecer hasta talla comercial. Por lo tanto, se deben diseñar distintos tipos de contenedores para estudiar el crecimiento y supervivencia de los juveniles de longueirón vello. Se ha estudiado el efecto del sustrato y la densidad de preengorde en el crecimiento y supervivencia de la semilla de *S. marginatus* en un sistema de contenedores.

1.2.3.2. MATERIAL Y MÉTODOS

1.2.3.2.1. Preengorde en bolsas sin sustrato en batea

La semilla al alcanzar una talla adecuada para su manejo en el medio exterior, se colocó en una batea de cultivo. Esta batea está situada en el polígono de Cambados, en la Ría de Arousa, sur de Galicia. En una jaula de acero inoxidable se dispusieron bolsas con semilla en malla de 2 mm y 13 cm de ancho para su crecimiento (Fig. 51). Este sistema había sido probado con éxito para el cultivo de distintas especies de almejas (*Venerupis pullastra*, *Ruditapes philippinarum* y *Tapes decussatus*). Las bolsas de semilla se mantienen en posición horizontal y sin sustrato, probando varias densidades distintas: 15, 25, 30, 40 y 90 gramos por bolsa por duplicado. El tamaño inicial de la semilla fue de 10

mm. Los muestreos se llevaron a cabo cada 15 días para estimar el crecimiento y supervivencia.



Fig. 51. A. Jaula de acero para el cultivo de semilla en bolsas sin sustrato. B. Detalle de la semilla dentro de una bolsa.

1.2.3.2.2. Preengorde con sustrato en cilindros de PVC colgados de pantalán

La fase de engorde es una parte del cultivo de estas especies muy delicada. Para ello se dispuso semilla de 6 mm de longitud, se probaron unos contenedores suspendidos en el pantalán del puerto de Ribadeo. Son tubos de PVC de 30 cm de diámetro, perforados y cubiertos de malla de 1 mm (Fig. 52). La semilla se mantuvo con dos tipos de arena: fina y gruesa; y a dos densidades: baja (45 g por nivel) y alta (90 g por nivel) por duplicado.



Fig. 52. Sistema de mantenimiento de semilla colgado en pantalán.



La fase de preengorde es una parte del cultivo de estas especies muy delicada. Basándonos en la experiencia presentada en el informe del año 2007 y debido a las bajas supervivencias obtenidas, se ha decidido volver a probar el sistema reduciendo las densidades iniciales. La semilla de $5,2 \pm 0,7$ mm de longitud se mantuvo con dos tipos de arena: fina y gruesa; y a dos densidades: baja (8,5 g por nivel) y alta (17 g por nivel) por duplicado.

1.2.3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.2.3.3.1. Preengorde en bolsas sin sustrato en batea

La experiencia no fue satisfactoria, produciéndose una mortalidad total en todas las densidades estudiadas, por lo que no se han podido muestrear para estimar el crecimiento. Con esta experiencia se ha demostrado que la adaptación de sistemas de preengorde de almeja sin sustrato no sirve para la semilla de *S. marginatus*. Posiblemente, el gasto energético para mantener las valvas cerradas sin sustrato, no permita que sobrevivan más que durante los primeros días de preengorde.

1.2.3.3.2. Preengorde con sustrato

1.2.3.3.2.1. En botellas colgadas de pantalán

En la primera experiencia llevada a cabo en 2007, el crecimiento tras un mes de cultivo, fue similar entre sustratos y densidades (Fig. 53).

Sin embargo, la supervivencia fue mejor en la densidad baja, independientemente del tamaño de grano de sustrato utilizado (Fig. 53). Pero, si se estudia detenidamente el comportamiento de cada estructura, individualmente se puede observar cómo la parte de abajo de cada estructura (B) alcanza menores supervivencias que la parte de arriba (A). Además, a densidad alta en la estructura B, la mortalidad es del 100%. Esto podría ser debido a un fallo en el diseño de la estructura o a que hay mayor depósito de productos de excreción. En el caso de la arena gruesa y densidad alta la supervivencia es menor (29%) que en el resto de los casos, arena fina (densidad baja y alta) y arena gruesa densidad baja, que se encuentra entre el 41 y el 49%.

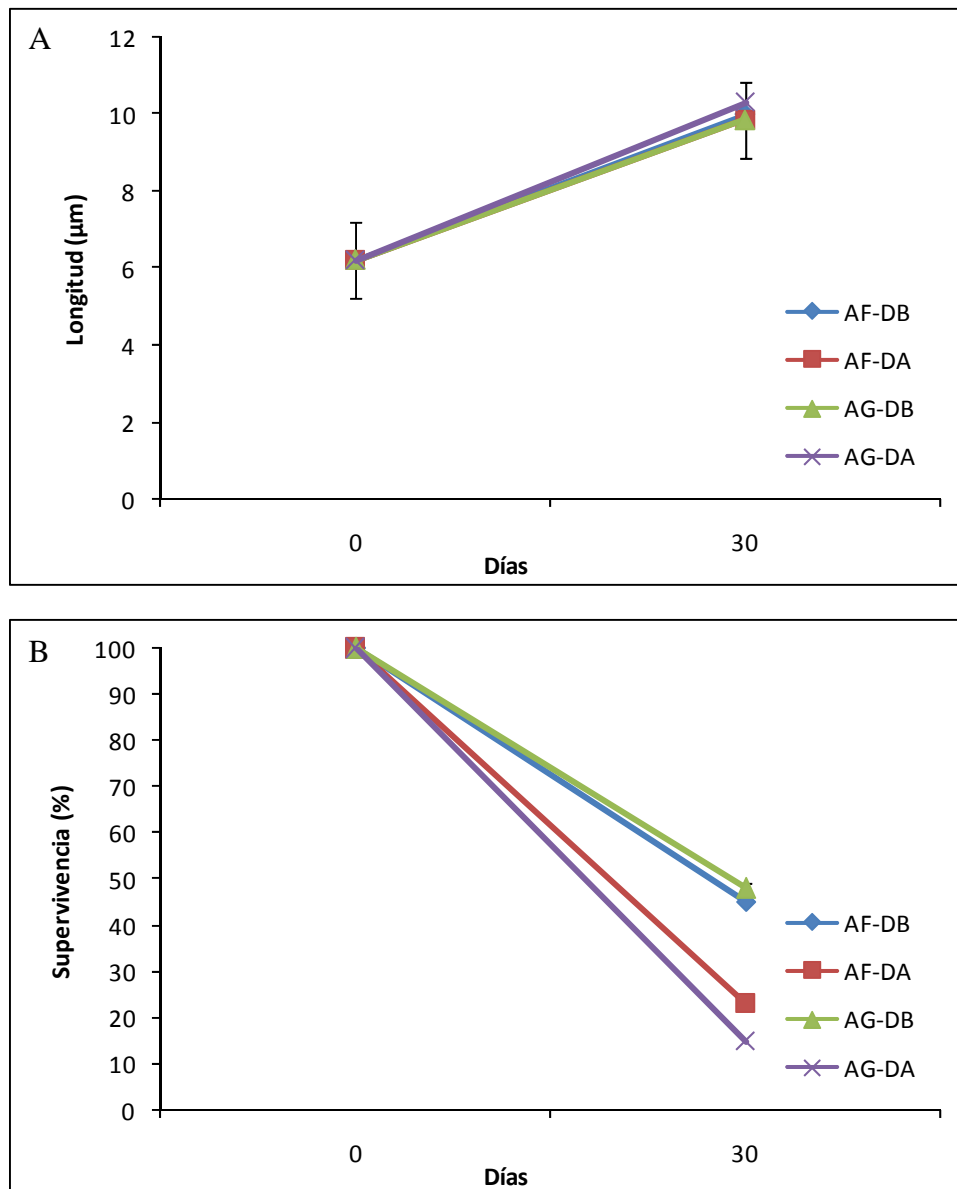


Fig. 53. Semilla de *S. marginatus* suspendida en pantalán en la Ría de Ribadeo. A. Crecimiento. B. Supervivencia. AF: arena fina; AG: arena gruesa; DB: densidad baja; DA: densidad alta.

El crecimiento y supervivencia de la semilla de *S. marginatus* preengordada en sistema de cilindros en 2008 se puede ver en la figura 54. La semilla al cabo de un mes ha incrementado su talla desde 5,1 mm hasta 8,4-8,6 mm, dependiendo de los tratamientos. De cualquier modo, no se observan diferencias entre los tratamientos en este momento. A los 4 meses, desde el inicio de la experiencia, el menor crecimiento se observó para la arena gruesa y la densidad alta (AG-DA) (10,74 mm) y el mayor en el mismo tipo de arena pero con densidad baja (AG-DB). Pertenecen a cada uno de estos grupos los cilindros individuales que crecieron menos y más, respectivamente.

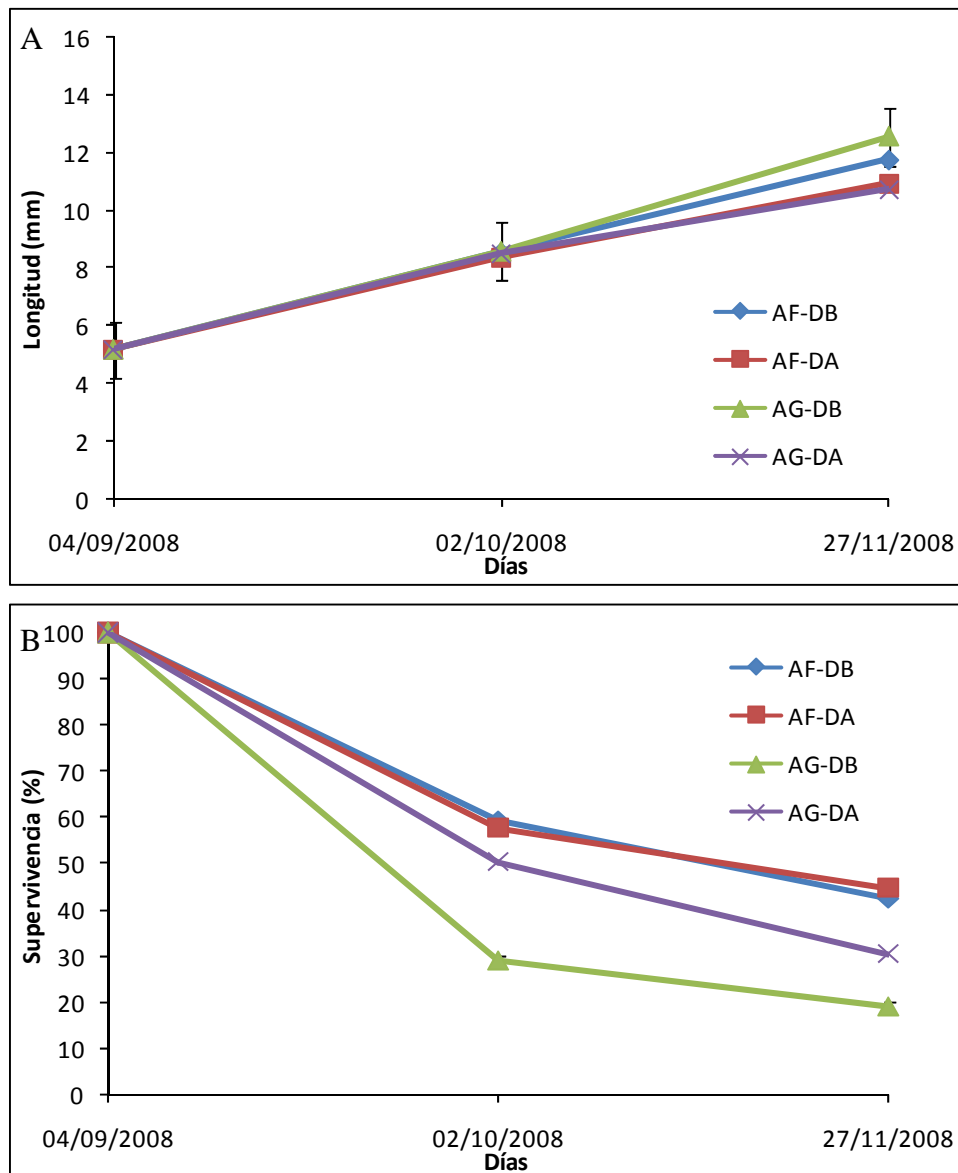


Fig. 54. Semilla de *S. marginatus* suspendida en cilindros en el pantalán de Ribadeo bajos distintos tratamientos. A. Crecimiento. B. Supervivencia. AF: arena fina; AG: arena gruesa; DB: densidad baja y DA: densidad alta.

La supervivencia en el primer control varió entre el 50 y 59% en la mayoría de tratamientos. En la semilla mantenida en arena gruesa y densidad baja (AG-DB) la supervivencia fue sólo del 29%. En el control del 27-11-08, la supervivencia menor fue también para AG-DB, cayendo hasta el 19%. También, en el caso de la arena gruesa y densidad alta, desciende la supervivencia hasta el 30%. Los cilindros de arena fina y en las dos densidades presentaron supervivencias que variaron entre el 43 y 45%. Los datos de



supervivencia por cilindro individual muestran que no hay mucha variación entre cada una de las dos réplicas de cada tratamiento.

Por todo lo expuesto anteriormente, se observa como los mejores rendimientos en supervivencia corresponden con la arena fina en cualquiera de las dos densidades iniciales utilizadas en esta experiencia, aunque los crecimientos no son los más elevados, pero podría ser que en los tratamientos de arena gruesa muriesen preferentemente los individuos de menor talla, aumentando esto la longitud media.

En una experiencia de preengorde realizada en botellas de 5L de volumen perforadas con *E. arcuatus*, se obtuvieron buenas supervivencias con sustrato fino independientemente de la densidad y con sustrato grueso a densidad baja, siempre superiores al 94% al mes de preengorde (da Costa *et al.*, 2009). Sin embargo, este sistema se descartó por necesitarse mucho tiempo para llenarlo de sustrato y muestrearlo.

1.2.3.4. CONCLUSIONES

- En el preengorde de *S. marginatus* en cilindros de PVC se observó que el mayor crecimiento se produce en arena gruesa y densidad baja, mientras las mejores supervivencias son para la arena fina independientemente de la densidad.



1.2.4. LÍNEA 5. ADAPTACIÓN AL MEDIO NATURAL: SIEMBRA

1.2.4.1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años ha habido un descenso en la producción de los bancos naturales de *S. marginatus*, principalmente en las Rías Altas Gallegas, debido a elevadas mortalidades (Martínez, 2002), lo que supuso un descenso en los reclutamientos y en definitiva en la producción de adultos comerciales.

Diversos factores afectan al crecimiento y supervivencia de la semilla en el medio natural, tales como: la talla inicial de siembra, las condiciones ambientales, la competencia y el sistema empleado.

La talla inicial de siembra es importante, ya que la respuesta adaptativa va a depender del tamaño de la semilla. Una menor talla de siembra implica que el daño en los muestreos se puede incrementar, con lo que se reduciría la supervivencia. A su vez, esta menor talla va implicar que tarden un mayor tiempo en alcanzar la talla comercial, incrementándose la mortalidad.

Las condiciones ambientales son un factor determinante en el crecimiento de juveniles en el medio natural, siendo los más importantes la temperatura y el alimento (Bayne y Newell, 1983). Hay otros parámetros ambientales importantes como la salinidad.

La competencia es la búsqueda de soluciones a una necesidad por los miembros de una misma o distinta especie. Desde el punto de vista del cultivo, inciden tres tipos de competencia: por el espacio, por la comida y por el oxígeno (Royo y Ruíz-Azcona, 2005).

El sistema empleado para el mantenimiento de los juveniles es determinante en el éxito de las experiencias. El estudio del crecimiento de los juveniles de longueirón vello en el medio natural se debe hacer en jaulas debido a su movilidad y rápido enterramiento en la arena. López *et al.* (2008), engordaron la navaja *Ensis macha* en cultivo suspendido con un dispositivo denominado “BDC”, en piletas con flujo continuo de agua de mar sin filtrar o en el submareal en recintos cubiertos de malla. Con semilla de *E. directus* se han realizado



experiencias con y sin cobertura de malla como protección (Leavitt y Burt, 2001; Leavitt *et al.*, 2002, 2005). Darriba (2001), realizó experiencias con juveniles de 6 cm de *E. arcuatus*.

El crecimiento se puede cuantificar en términos de incremento en talla (longitud y altura) y de peso. Diversos parámetros ambientales (temperatura, fotoperíodo, alimento, salinidad, etc.) y otros, como la edad de los individuos o la estructura de la población afectan al crecimiento.

Para hacer una correcta regulación de los recursos pesqueros, es preciso asegurar su renovación y el mantenimiento de las poblaciones en su hábitat natural. Entre las medidas adoptadas por la Administración figura el establecimiento de tallas mínimas de extracción y el período de veda de las especies. Para ello es necesario adecuar estas tallas con las de primera maduración sexual para asegurar la reproducción y el mantenimiento de una producción continuada. A efectos prácticos se suele definir esta talla como aquella en la que el 50% de los individuos de la población están maduros (López Veiga, 2000).

El primer objetivo de este trabajo es estudiar el crecimiento en el medio natural de la semilla producida en criadero, para establecer bases para la repoblación de los bancos naturales. Además, se intentará conocer si los individuos, una vez alcanzan la talla comercial, pueden desovar en el criadero, para cerrar el ciclo de cultivo. Por último, es necesario conocer la talla más adecuada para el inicio de experiencias de siembra en el medio natural.

1.2.4.2. MATERIAL Y MÉTODOS

1.2.4.2.1. Crecimiento de juveniles en jaulas hasta talla comercial

1.2.4.2.1.1. Estudio del crecimiento, supervivencia y su relación con los parámetros ambientales

Esta experiencia se comenzó en un proyecto JACUMAR anterior denominado “Cultivo y gestión de solénidos comerciales”. Al no llegar a talla comercial cuando finalizó el proyecto se continuó en el presente proyecto. A finales de agosto de 2004 se colocaron 6 jaulas en un banco arenoso en el intermareal de la Ría de Ribadeo con semilla de

longueirón vello (*S. marginatus*) con una talla de $19,10 \pm 1,92$ mm (4 meses de edad), procedente de criadero. La densidad de siembra fue de 400 individuos/m². Se sembró en jaulas fabricadas con varilla de acero inoxidable de 8 mm de diámetro, con un área de 50 x 50 cm y altura de 50 cm (Fig. 55). Las jaulas se enterraron en el sustrato de forma que sobresaliesen 5 cm del nivel del terreno y se cubrieron, en su parte superior, con una malla plástica de 2 mm de luz, para evitar el desplazamiento de los individuos.



Fig. 55. A. Jaulas enterradas en el sustrato, utilizadas para la siembra y control de la semilla de *S. marginatus*. B. Semilla dispuesta en una jaula en el momento de siembra.

Cada mes, durante las mareas vivas, alternativamente una de las jaulas se vació manualmente para recoger a los individuos sin dañarlos y poder determinar su crecimiento (longitud, altura y peso) y supervivencia de los individuos. Para ello se utilizó un calibre digital y una balanza de precisión. Posteriormente, en la misma jornada, se devolvieron a la jaula correspondiente. El resto de las jaulas se abrieron, limpiaron y se retiraron los depredadores.

Los datos ambientales de temperatura y salinidad se midieron diariamente desde septiembre de 2004 hasta agosto de 2007 en la Ría de Ribadeo, en un lugar próximo a la localización de las jaulas. Los datos de clorofila “a” se corresponden con datos recogidos semanalmente por el Instituto Tecnológico para el Control del Medio Mariño de Galicia (INTECMAR) de la Consellería de Pesca e Asuntos Marítimos y fueron cedidos para la realización de este estudio.



1.2.4.2.1.2. Desoves procedentes del longueirón vello (*Solen marginatus*) cultivado en jaulas

Una vez los individuos han alcanzado la talla comercial y coincidiendo con las mareas vivas de mayo, junio y julio de 2007, se recogieron los ejemplares muestreados en cada jaula y se trasladaron al criadero. Los ejemplares se dispusieron según lo descrito en el apartado 4.2.1.1. Las puestas obtenidas se siguieron de tal forma que permitiese obtener semilla, a partir de la puesta inicialmente obtenida en criadero tres años antes, para cerrar el ciclo de cultivo.

1.2.4.2.1.3. Estudio de la talla de primera maduración

Durante las mareas vivas de mayo y junio de 2005 se recogieron ejemplares para el estudio de la maduración correspondientes a un año de edad. Se escogieron estos dos meses por ser el momento en que se observa la máxima madurez en esta especie (Martínez, 2002). Para este estudio se dividieron las muestras por clases de tallas correspondientes a intervalos de 5 mm, procesando 10 individuos por clase de talla. Las muestras se fijaron con fijador Davidson, se cortaron a 7 μm y se tiñeron con hematoxilina-eosina. La escala gametogénica seguida es la descrita para *Ensis siliqua* por Gaspar (1996) y adaptada para *Solen marginatus* por Martínez (2002). Esta escala diferencia varios estadios: Estadio 0 (E0) de reposo sexual, Estadio I (EI) o gametogénesis inicial, Estadio II (EII) gametogénesis avanzada, Estadio III (EIII) de madurez, Estadio IV (EIV) o desove y Estadio V (EV) de post-puesta. Se define un Índice de Condición (I.C.) como el peso fresco de la vianda dividido entre el peso seco de la concha.

1.2.4.2.2. Efecto de la talla inicial en el cultivo de juveniles en jaulas

Una vez se comprobó que se podía llegar a talla comercial sembrando semilla producida en criadero de una talla inicial de 19 mm se diseñó esta experiencia para estudiar la adaptación al medio de semilla de menor tamaño. Esto posibilitaría el poder mantener en el criadero la semilla menos tiempo, con el consiguiente ahorro en los costes de producción. Para ello, se separaron 3 grupos de individuos por talla, estableciendo un



grupo de talla inicial de 9 mm (pequeña), 12 mm (mediana) y 16 mm (grande). Se usaron 2 jaulas como réplicas para cada grupo de talla. El sistema de cultivo en jaulas es el descrito en el apartado 1.2.4.2.1.1. La densidad inicial de siembra fue de 540 individuos/m². La experiencia comenzó el 17-9-2009 colocando las jaulas en un banco intermareal, Taro das Aceñas en la Ría de Ribadeo. Cada mes se muestrea una jaula correspondiente a una de las tallas iniciales, de modo que, cada talla inicial se muestrea cada tres meses.

1.2.4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.2.4.2.1. Crecimiento de juveniles en jaulas hasta talla comercial

1.2.4.2.1.1. Estudio del crecimiento, supervivencia y su relación con los parámetros ambientales

Al inicio de la experiencia la longitud de los ejemplares era de $19,10 \pm 1,93$ mm y el peso de $0,24 \pm 0,08$ g, correspondientes a 100 días de vida. En el mes de noviembre y con 180 días de vida, la longitud alcanzada fue de $31,55 \pm 3,58$ mm (Fig. 56). Hasta este mes, coincidiendo con el aumento de temperaturas de primavera y verano, el crecimiento es rápido. Pero a lo largo del invierno se produce una parada, alcanzando al año (mayo de 2005) una longitud de $38,53 \pm 3,89$ mm, que se corresponde con un peso de $1,56 \pm 0,46$ g. Cultivando *Ensis arcuatus*, Darriba (2001) alcanzó una talla media de 64,1 mm al año, lo que representa más del doble de lo obtenido con *S. marginatus*. Los datos aportados por esta autora hacen suponer que el crecimiento en el medio natural para la especie, es igual al que se habría obtenido en criadero, pero las condiciones de cultivo (temperatura y alimento) durante los meses de invierno pueden diferir mucho. Por el contrario, en el presente estudio, la semilla de *S. marginatus* se trasvasó al medio natural con 4 meses de vida, siendo una aproximación mejor a la realidad, la talla que se alcanzó al año de vida. Así, la temperatura baja y la limitación de alimento que hay en el medio natural durante el invierno, los ejemplares de *E. arcuatus* no la sufrieron, evitando la parada de crecimiento que suele darse durante estos meses en el medio natural. De nuevo, a partir de abril de 2005 existe un crecimiento significativo hasta noviembre en que vuelve a detenerse. A partir de abril-mayo de 2006 sucede lo mismo que el año anterior, aunque, en este caso, el aumento es menor. En mayo de 2007 (3 años) los ejemplares superan la talla comercial (80 mm) alcanzando $80,06 \pm 5,17$ mm en longitud (Fig. 57). En *E. arcuatus* la talla alcanzada a



los 2 años de vida se situó entre los 90-100 mm (Darriba, 2001). Este dato es una estimación del crecimiento con juveniles procedentes del medio natural sembrados en recintos controlados, en los que se supuso una edad inicial de un año. Según estos datos, a los 2 años y medio la longitud de estos ejemplares sería de 98 mm, aún ligeramente por debajo de la talla comercial (Darriba, 2001). Robinson & Richardson (1998), utilizando la técnica de la película de acetato en *E. arcuatus* dan una talla de 40 mm tras un año de crecimiento y de 80 mm a los 2 años. En *E. siliqua* Gaspar *et al.* (1994), con la técnica de la película de acetato, citan una talla de 80 mm en el primer año, mientras que, analizando los anillos externos obtienen una talla de 55 mm (1 año). También en la Ría de Ribadeo en 2001 se sembró semilla de *S. marginatus* de 40,9 mm de longitud (de aproximadamente un año de edad) y tras dos años más de cultivo alcanzó 75,8 mm (Martínez-Patiño, com. pers.). El patrón de crecimiento de *S. marginatus* en el presente estudio es similar al encontrado por Maia *et al.* (2006b) con la técnica de los anillos externos y de la película de acetato. En todos los casos es necesario tres años para superar la talla comercial de la especie.

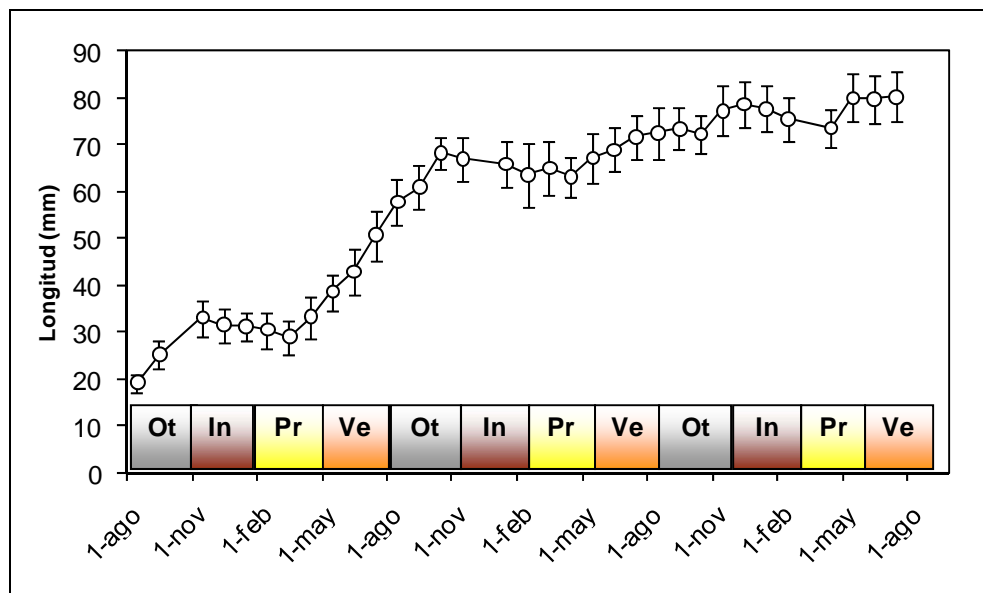


Fig. 56. Crecimiento en longitud (media \pm sd; mm) de la semilla de *Solen marginatus* en el medio natural. Ot: Otoño; In: Invierno; Pr: Primavera; Ve: Verano.

La supervivencia al año de vida fue superior al 80%. A los dos años (mayo de 2006) la talla alcanzada fue de 67,13 \pm 5,14 mm, con una supervivencia siempre superior al

62%. La supervivencia final varió entre 50 y 83% entre jaulas. La supervivencia a los seis meses de traslado de los juveniles de *E. arcuatus* de 1 año de vida procedentes del medio natural fue del 68,5% y a los doce meses la tasa se situó en el 56,8% de los individuos de partida (Darriba, 2001). En nuestra experiencia con *S. marginatus*, a los seis meses el 81% de los individuos permanecían vivos y al año de siembra, el 71%. Aun así, la distinta talla inicial de siembra imposibilita una comparación real de las experiencias entre estas dos especies.

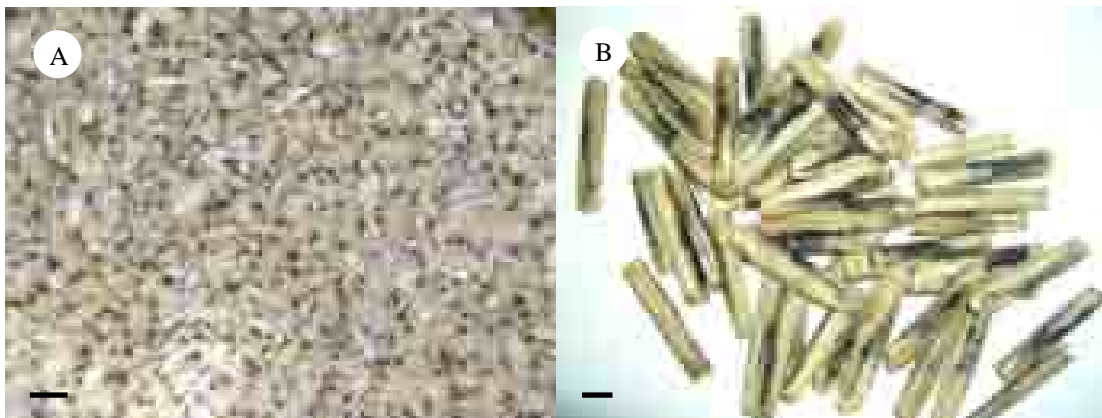


Fig. 57. A. Semilla de *S. marginatus* de la puesta P-1 procedente del criadero al inicio de la experiencia. B. Individuos recapturados al final de la experiencia de siembra.

La temperatura del agua osciló entre 8,5°C y 21,8°C a lo largo de todo el período estudiado. Durante el período del 15 de julio al 15 de septiembre se alcanzan los mayores valores de temperatura del agua de mar. Las más bajas se producen entre enero y mediados de marzo. Se observa por lo tanto, un marcado carácter estacional. Los períodos de crecimiento coinciden con el momento en que en el medio natural comienza a aumentar la temperatura. Aunque éste no es el único factor que afecta al comienzo de la época de crecimiento, puesto que con valores de temperatura superiores durante el invierno, el crecimiento se detiene. La temperatura tiene un efecto combinado con la presencia de alimento en la columna de agua. En marzo-abril comienza a elevarse la temperatura del agua de mar coincidiendo con un primer pico de clorofila “a”, y sucediéndole al menos otro pico a lo largo del verano. El pico más significativo es el presente al inicio del otoño, momento a partir del cual se detiene el crecimiento.



En nuestro estudio se observa un marcado crecimiento estacional, por el cual *S. marginatus* en el medio natural crece entre los meses de marzo-abril hasta octubre-noviembre. A finales del otoño y durante el invierno el crecimiento se detiene. Esto es totalmente coincidente con los valores de temperatura de la ría. Maia *et al.* (2006b) citan para esta especie crecimientos nulos durante todo el otoño y parte del invierno, y un período de crecimiento que comienza en enero-febrero y se mantiene hasta septiembre.

La salinidad registrada tuvo una media a lo largo de todo el estudio de 31,9‰, alcanzando los valores inferiores durante otoño e invierno (debido a riadas), y manteniéndose en torno a 34-35‰ el resto de año. La salinidad no afecta al crecimiento. Esta especie vive en las zonas internas de las rías, por lo que, normalmente está expuesto a cambios bruscos de salinidad. En el emplazamiento donde se realizó el estudio, la salinidad permaneció relativamente constante. Los descensos fueron puntuales y durante un período limitado de tiempo. Únicamente alguno de los descensos bruscos coincidió con el período de crecimiento, por lo que el efecto sobre el crecimiento fue limitado. La mayor parte de las salinidades subóptimas para el crecimiento se produjeron en invierno, cuando no se observa crecimiento. Durante este período la interacción entre los distintos parámetros ambientales no puede ser determinada, ni cual tiene un efecto mayor.

El crecimiento de esta especie en el medio natural también puede estar influenciado por la maduración, pudiendo afectar desde el primer año de vida (da Costa *et al.*, 2008). En los bivalvos es común que se produzca una redistribución de energía del crecimiento somático a la producción de gametos, y esto puede determinar la tasa de crecimiento de los adultos en bivalvos (Bayne y Newell, 1983). Maia *et al.* (2006a) citan en la Ría de Aveiro una talla de primera maduración en machos de 44,7 mm y para hembras de 47,7 mm. Así, en el primer año de vida sólo los individuos mayores maduran. El gasto energético destinado a la reproducción durante el primer año de vida es pequeño, permitiendo que los individuos sigan creciendo durante ese verano. A partir de la segunda maduración (2º año de vida) se ve como el crecimiento es mucho menor, y se destinará mucha más energía en la formación de gametos.



Por lo tanto, en *Solen marginatus* la semilla sembrada en el medio natural se adapta a las condiciones del medio con buenas tasas de crecimiento y supervivencia. Esto posibilita que se aborden repoblaciones con semilla producida en criadero en los bancos que han sufrido descensos en sus poblaciones.

1.2.4.2.1.2. Desoves procedentes del longueirón vello (*Solen marginatus*) cultivado en jaulas

A partir de los individuos de *S. marginatus* procedentes del cultivo en jaulas, correspondientes a la puesta obtenida en criadero, el 12-05-2004, se obtuvieron 7 puestas, realizando el seguimiento de 4 de ellas (Tabla XVII). El tamaño máximo de puesta correspondió a la puesta P-3, con 2,5 millones de ovocitos liberados. Esta puesta procedía de un tanque con 42 reproductores en el que, al ser una puesta espontánea, no se puede conocer el número de individuos que desovaron. La supervivencia más elevada en el momento de la fijación correspondió a P-1, con un 83% de supervivencia, siendo la media de los cultivos estudiados del 48%.

El mismo cultivo P-1 fue el que presenta una supervivencia más elevada a los 30 días de cultivo con respecto a los individuos fijados, con un 46%. La media de supervivencia en esta fase fue del 35%.

Tabla XVII. Número de ovocitos emitidos y supervivencias de cultivo de los desoves procedentes de los individuos mantenidos en jaulas hasta talla comercial. Sup. Fij.: supervivencia en la fijación; Sup. 30 días: supervivencia a los 30 días de cultivo con respecto a los individuos fijados.

Puesta	Nº Ovocitos	Nº adultos	Sup. Fij. (%)	Sup. 30 días (%)
P-1 26/05/07	2.168.000	42	82,8	45,6
P-2 01/06/07	1.894.000	42	33,3	33,9
P-3 13/06/07	2.500.000	42	41,1	35,0
P-4 15/06/07	1.000.000	90	-	-
P-5 27/06/07	1.500.000	90	36,6	23,5
P-6 10/07/07	750.000	90	-	-
P-7 18/07/07	500.000	90	-	-

Posteriormente, la semilla se mantuvo en el semillero hasta alcanzar una talla adecuada para su traslado al medio natural, en donde se realizaron repoblaciones.



1.2.3.3.1.3. Estudio de la talla de primera maduración

En el mes de mayo la longitud media de los juveniles era de $38,53 \pm 3,89$ mm y ya se podían encontrar individuos maduros en la clase de talla de 35-40 mm (Tabla XVIII, Fig. 58). En el muestreo de junio la talla de individuos maduros se encuentra a partir de 40 mm, siendo la media de $42,95 \pm 4,8$ mm. Por lo tanto, al año de edad la longitud media observada en *S. marginatus* en el presente estudio es similar al encontrado por Maia *et al.* (2006a) con la técnica de los anillos externos y de la película de acetato, con las que obtuvieron longitudes de 36,4 y 36,5 mm, respectivamente.

Tabla XVIII. Estadios gametogénicos por clase de talla en la semilla de *S. marginatus*. I.C. Índice de Condición. Reposo (E0), inicio de la gametogénesis (E1), gametogénesis avanzada (EII), madurez (EIII), puesta (EIV) y post-puesta (EV).

Fecha	Talla	E0	E1	EII	EIII	EIV	EV	I. C.
05/05/2005	25- 30 mm		100					1,352
	30-35 mm		33,4	66,6				1,509
	35-40 mm		10	80	10			1,558
	40-45 mm			85,71	14,29			1,964
	45-50 mm			50	33,33	16,77		2,156
23/06/2005	< 25 mm	100						0,3
	30-35 mm			100				-
	35-40 mm		11,11	89,89				1,783
	40-45 mm		10	40	50			2,143
	45-50 mm			16,67	83,33			2,374
	> 50 mm				100			2,675

La talla mínima de madurez sexual, o talla a la cual el 50% de la población está madura, se establece en 43 mm (Fig. 59). A medida que los individuos van aumentando de talla aumenta el Índice de Condición. Maia *et al.* (2006a) citan una talla de primera maduración en machos de 44,7 mm y para hembras de 47,7 mm en la Ría de Aveiro. Por lo tanto, lo observado en nuestro estudio es coincidente con los datos presentados para esta especie en otra localización.

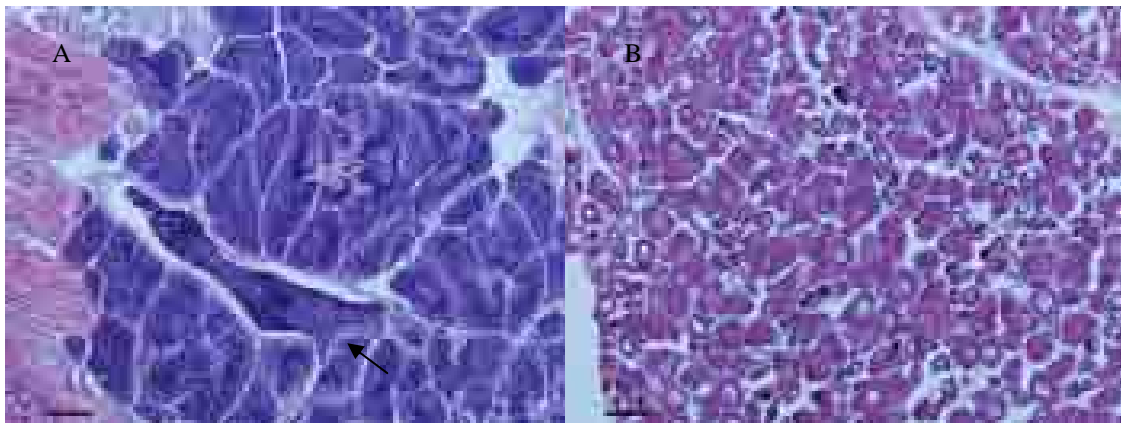


Fig. 58.A. Macho de *S. marginatus* en EIV (puesta) mostrando la liberación de esperma por el gonoducto (flecha). B. Hembra de *S. marginatus* en EIII (maduración). Barra de escala 100 µm.

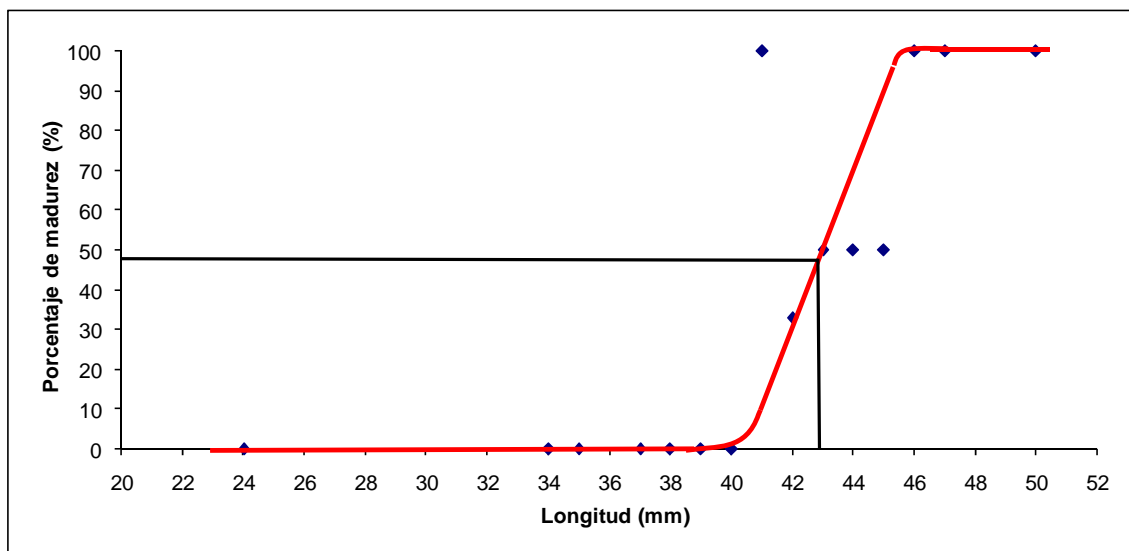


Fig. 59. Talla de primera maduración en *S. marginatus*, calculada a partir de ejemplares obtenidos de criadero y sembrados en el medio natural.

La redistribución de energía del crecimiento somático a la producción de gametos es común en bivalvos, y puede determinar la tasa de crecimiento en bivalvos adultos (Bayne & Newell, 1983). Así, el primer año de vida sólo los individuos mayores maduran. El gasto energético destinado a la reproducción durante el primer año es pequeño, permitiendo que los individuos sigan creciendo durante ese verano. Durante el primer año, aunque maduren, quizás el desove no será efectivo o la calidad de las larvas producidas sea baja, pero a los dos años siguientes, las larvas contribuirán a aumentar la población de bancos naturales.



1.2.4.3.2. Efecto de la talla inicial en el cultivo de juveniles en jaulas

Esta experiencia sigue en marcha, por lo que por el momento sólo hay datos preliminares. Tras haber completado el primer muestreo de cada una de las tallas iniciales los resultados muestran que, la talla inicial grande (16 mm) es la que mejor se ha adaptado al medio, con una supervivencia de 90,4%. La supervivencia de la talla media (12 mm) fue aceptable (42,2%), mientras los individuos de la talla inicial pequeña se han adaptado mal al medio, observándose una supervivencia muy baja de sólo el 5,9%. La semilla de todas las clases de talla ha crecido moderadamente por tratarse de los meses de otoño e invierno en los cuales las condiciones ambientales, temperatura y alimento, no son muy favorables.

1.2.4.3.3. Repoblación

Además, la semilla producida en criadero que no se utilizó para experiencias de crecimiento de juveniles en el medio natural, se ha destinado a repoblar bancos naturales en los que había descendido mucho la población. A finales de la década de los 90 en las Rías Altas Gallegas se produjo un colapso de las poblaciones por razones desconocidas en aquel momento. Esto llevó a que se abandonase la explotación comercial del longueirón vello en la Ría de Ribadeo y que no hubiese plan de explotación marisquera para esta especie durante varios años. Por todo ello, se ha elegido esta ría para realizar repoblaciones con la semilla obtenida en criadero en este proyecto. Además, en el proyecto JACUMAR “Cultivo y gestión de solénidos” ya se habían realizado siembras de semilla producida en criadero en la Ría de Ribadeo. En 2006 se consiguió una producción de 250.000 unidades de semilla de longueirón vello de entre 10-15 mm de longitud y se sembró en el medio natural, directamente en los bancos naturales, a una densidad desconocida. En 2007 se sembraron 72.000 unidades de semilla de 8-10 mm. En 2008 no se produjo suficiente semilla para llevar a cabo repoblación alguna. En 2009 se repobló con 114.000 unidades de una talla entre 8 y 13 mm.

Gracias a las repoblaciones realizadas en este proyecto y proyectos anteriores se ha reforzado el reclutamiento en los bancos naturales de la Ría de Ribadeo. Esto ha permitido que en 2007 se abriese un plan de explotación de carácter experimental con unos 10 días de



marisqueo al año, posibilitando que los mariscadores fuesen a recoger este recurso. Hasta el final de 2009 se ha ido incrementando lentamente la producción, siendo por el momento residual, alcanzando 86 kg en 2009 (Servicio de Estadísticas Pesqueras de la Xunta de Galicia, www.pescadegalicia.es).

1.2.4.4. CONCLUSIONES

- La semilla de *S. marginatus* producida en criadero y engordada en recintos controlados en el medio natural alcanzó tras 3 años la talla comercial (80 mm), con supervivencias que variaron entre 50 y 83%.
- Se cerró el ciclo de cultivo de esta especie, consiguiendo semilla a partir de los ejemplares cultivados en jaulas.
- La talla mínima de madurez sexual, o talla a la cual el 50% de la población está madura, se establece en 43 mm, correspondiéndose con individuos de 1 año de edad.
- La semilla de una talla inicial menor a 16 mm tiene una mala adaptación al medio natural, aumentando mucho la mortalidad si se reduce esta talla.
- Es importante elegir una localización adecuada para realizar las siembras, en la que la semilla no quede mucho tiempo descubierta, pudiendo afectar mucho los descensos bruscos de salinidad.



1.2.5. LÍNEA 6. PATOLOGÍA DE *S. MARGINATUS*

1.2.5.1. INTRODUCCIÓN

1.2.5.1.1. Seguimiento microbiológico de reproductores y desoves de *S. marginatus*

Los criaderos de bivalvos sufren en todo el mundo episodios de mortalidades que ocasionan pérdidas masivas. Esto implica una falta de regularidad en la producción y la consiguiente inestabilidad económica. La falta de estudios sistemáticos en relación a la patología de estos cultivos hace necesario trabajos que profundicen en la búsqueda de los agentes responsables de estas mortalidades, tanto de origen bacteriano como vírico.

Se ha observado que durante el desarrollo larvario y post-larvario del longueirón vello hay episodios de mortalidades masivas, que cursan con signos semejantes a los descritos para otras especies de bivalvos. Los agentes causales de enfermedades identificados en cultivos de bivalvos son en su mayoría bacterias fermentativas pertenecientes al género *Vibrio*. Este hecho, junto con el desconocimiento absoluto de la microbiota asociada a los cultivos de esta especie, hace necesario un estudio básico de las poblaciones bacterianas presentes y de su evolución a lo largo de los cultivos. La combinación de los datos de cultivo y microbiológicos, ofrecen una herramienta para la puesta a punto del protocolo de cultivo de esta especie en criadero.

Paralelo al cultivo, se hace un seguimiento microbiológico de reproductores y desoves para evaluar la incidencia bacteriana en la viabilidad de los individuos de *Solen marginatus* en el criadero. Además, se han realizado cultivos larvarios con y sin antibiótico (cloranfenicol) para estudiar la efectividad del mismo.

1.2.5.2. Estudio histopatológico de *S. marginatus*

En los últimos años se ha comenzado con ensayos de cultivo en criadero de *Solen marginatus*, que pretenden sentar las bases para el desarrollo de una futura actividad acuicultora centrada en estas especies (Martínez, 2002; Martínez *et al.*, 2008; da Costa y Martínez-Patiño, 2009). Poco se conoce del aspecto patológico de estos moluscos (López y Darriba, 2006; López *et al.*, 2008). Existen referencias de casos de mortalidad en



explotaciones de longueirón vello tanto en Galicia como en Asturias (Cofradías de Pescadores, comunicación personal). El conocimiento de los organismos simbiotes - entendiendo simbiote en su acepción original que incluye relaciones de mutualismo, comensalismo y parasitismo - y alteraciones patológicas que afectan a las especies que integran el grupo de los solénidos puede contribuir a dilucidar las causas de episodios de este tipo.

El desarrollo de una línea de investigación sobre las alteraciones patológicas que afectan a un grupo de organismos de interés comercial, y que busque obtener resultados útiles para la gestión de la explotación del recurso en una región, debe contemplar tres etapas (Villalba, informe interno Xunta de Galicia):

4. Una primera aproximación que permita identificar los organismos simbiotes y alteraciones patológicas que afectan al grupo objeto de estudio.
5. Profundización en el estudio de las alteraciones patológicas detectadas potencialmente dañinas, con el fin de adquirir un nivel de conocimientos suficientes para abordar la siguiente etapa.
6. Desarrollo de medidas de lucha para que los problemas patológicos se mitiguen o desaparezcan.

En Galicia, los estudios patológicos realizados en moluscos hasta el momento, se han centrado fundamentalmente en mejillón (*Mytilus galloprovincialis*) cultivado en batea (Gómez-Mourelle, 1993; Villalba *et al.*, 1993a,b; Robledo *et al.*, 1994; Robledo y Figueras, 1995) - estudios encuadrados en las etapas 1 y 2 descritas anteriormente, no habiéndose abordado la etapa 3 ante la ausencia de amenazas patológicas reales para el cultivo del mismo; almejas (*Tapes decussatus*, *Venerupis pullastra*, *V. rhomboides* y *Tapes philippinarum*) - siendo estudios de etapas 1 y 2 fundamentalmente (Figueras *et al.*, 1992; Villalba *et al.*, 1993c; López, 1995; López *et al.*, 1998; Villalba *et al.*, 1999; Ordás *et al.*, 2001; Casas, 2001; Casas *et al.*, 2002; Villalba *et al.*, 2005); ostra (*Ostrea edulis*) - habiéndose abordado ya estudios de etapas 1 y 2 (Montes *et al.*, 1989; Montes 1990, 1991; Figueras, 1991; Montes *et al.*, 1991, 1994, 1995) y etapa 3 (Montes *et al.*, 2003; da Silva, 2005; da Silva *et al.*, 2005)-; y berberecho (*Cerastoderma edule*) - hasta el momento



estudios de etapas 1 y 2 (Villalba *et al.*, 2001; Carballal *et al.*, 2001, 2003; Iglesias, 2006; Romalde *et al.*, 2007). Otros grupos con interés comercial, como pectínidos, solénidos y donácidos apenas han sido objeto de atención. En el caso de los solénidos existen publicaciones de la patología de la navaja, *Ensis arcuatus* (López y Darriba, 2006; Darriba *et al.*, 2006 y Darriba *et al.*, en prensa). El objetivo del estudio es conocer los simbioses y otras alteraciones patológicas presentes en los bancos naturales de longueirón vello (*Solen marginatus*) de Cabo de Cruz (Ría de Arousa) y Redondela (Ría de Vigo).

1.2.5.2. MATERIAL Y MÉTODOS

1.2.5.2.1. Seguimiento microbiológico de reproductores y desoves de *S. marginatus*

Se toman muestras de los reproductores que entran en el criadero, de las larvas y del agua de cultivo. Para la siembra de muestras se utilizan los medios Agar Marino (AM, Pronadisa) para recuento de bacterias heterótrofas marinas y Tiosulfato-Citrato-Bilis-Sacarosa (TCBS, Oxoid), medio selectivo para vibrios. Las placas se incuban a 25°C. El medio TCBS se lee en 24-48 horas, para evitar los problemas de reversión de color de las colonias, que dificultaría su interpretación. El AM se debe dejar hasta 7 días para permitir el crecimiento de los tipos más lentos, como pueden ser algunas bacterias pigmentadas. En el caso de muestras cuantitativas, se recuentan aquellas placas con crecimiento entre 30 y 300 unidades formadoras de colonia (ufc) por placa.

En todas las placas se seleccionan los tipos de colonia representativos, aislándose en placas de AM. Se dan los pases necesarios para asegurar la pureza del cultivo y se congelan a -80°C en Caldo Marino con glicerol (15%) para su conservación.

1.2.5.2.1.1. Procesado de las muestras de reproductores

Se abre el ejemplar, se lava con agua de mar estéril (AME) y se toma un trozo de gónada cortada asépticamente, con un peso conocido (≈ 0.08 g). Se coloca en un mortero estéril, donde se homogeniza con 1 ml de AME. Se hacen las diluciones seriadas necesarias, en tubos estériles con 4.5 ml de AME, sembrándose 100 μ l en los medios AM y TCBS. Los datos obtenidos se expresan en ufc por gramo (ufc/g) de gónada.



1.2.5.2.1.2. Muestras de cultivos larvarios

Para el muestreo se escoge el cambio de agua de los tanques de cultivo, después de lavar en el tamiz donde quedan retenidas las larvas con la propia agua del criadero. Se toma la muestra directamente, con asa de siembra estéril de 1 µl, y se extiende sobre las placas de AM y TCBS. Se obtiene una estimación cualitativa de las poblaciones bacterianas, aunque permitiendo la comparación entre muestras al unificar el volumen sembrado.

1.2.5.2.1.3. Muestras de agua de cultivo

Se recoge del tanque una muestra del agua de cultivo justo antes del vaciado para el cambio de agua. En el laboratorio, se hacen las diluciones seriadas apropiadas y se siembran 100 µl de cada una en placas de AM y TCBS. Se obtienen datos cuantitativos, que se expresan en ufc/ml.

1.2.5.2.2. Estudio histopatológico de *S. marginatus*

En lo que respecta a los bancos naturales de longueirón vello (*S. marginatus*), durante la preparación de este proyecto se estaba llevando a cabo la observación de preparaciones histológicas procedentes de un estudio reproductivo de un banco natural de longueirón vello de Cabo de Cruz (Ría de Vigo) que nunca habían sido observadas por patólogos. Una vez detectada la presencia de *Marteilia* sp. en ejemplares de este banco se decidió llevar a cabo un estudio de este banco, que a finales del 2005 y 2006 sufrió un descenso importante, y para ello se realizaron muestreos mensuales durante los años 2008-2009. También se realizaron muestreos mensuales en un banco localizado en Redondela (Ría de Vigo) durante los años 2006 y 2007. El tamaño de muestra era de 20 individuos de talla comercial. Al igual que en el caso de las preparaciones históricas de longueirón vello, se observaron también preparaciones de *Ensis siliqua* del 2003 y 2004 de un banco natural de Finisterre, para determinar la presencia o ausencia de una neoplasia gonadal (germinoma) que nunca habían sido observadas por patólogos y se detectó la presencia de un germinoma.



Para el estudio histopatológico de longueirón vello tras la toma de los índices morfométricos (longitud y peso vivo), se llevó a cabo un análisis del aspecto macroscópico de los distintos ejemplares para determinar la presencia de alguna anomalía, como deformaciones en las valvas, pústulas en masa visceral, lesiones en branquia, presencia de macroparásitos, etc. Posteriormente, se realizó un corte sagital de un fragmento, de unos 5 mm de espesor que contenía el mayor número de órganos posible (masa visceral, pie, lóbulos del manto y branquias), como solución fijadora se utilizó la solución de Davidson, después de un lavado con alcohol de 70° se procedió a la preparación del tejido en un procesador automático para su posterior inclusión en parafina y formación de bloques. Para el estudio al microscopio óptico se realizaron cortes histológicos de 5 micras teñidos con hematoxilina de Harris-eosina.

1.2.5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.2.5.3.1. Seguimiento microbiológico de reproductores y desoves de *S. marginatus*

1.2.5.3.1.1. Reproductores

En **2008** se analizaron 2 lotes de reproductores, con el mismo origen (Redondela), que llegaron al criadero en los meses de abril (lote I) y junio (lote II), respectivamente y se mantuvieron durante un mes en la instalación.

En los controles iniciales, a su entrada en el criadero, los recuentos en AM oscilaron entre un mínimo de 3.1×10^4 y un máximo de 2.6×10^7 ufc por gramo de gónada, con una media de aproximadamente 10^6 ufc/g. En TCBS los valores fueron desde 1.6×10^4 a 6.0×10^6 ufc/g, con un promedio de 10^6 ufc/g. La relación entre estos datos indica una elevada proporción de vibrios dentro de las bacterias heterótrofas marinas totales.

Los recuentos después de la permanencia en el criadero, en el medio AM, se situaron entre 8.6×10^4 y 7.6×10^6 ufc/g, con una media de 10^6 ufc/g, mientras que los vibrios (en el medio TCBS), variaron entre 2.6×10^3 y 1.9×10^5 ufc/g, con el valor medio en 10^4 ufc/g.



El primer lote (abril) llega con elevada carga bacteriana, como se refleja tanto en AM como en TCBS, destacando además la elevada proporción de vibrios dentro de la población de bacterias heterótrofas marinas. Después de un mes el contenido de vibrios y su proporción se reducen. Los individuos cuando entran en el criadero apenas están maduros, a lo que se acercan bastante al cabo de un mes. La puesta analizada que se obtiene de este lote (puesta 1-junio) llega a fijación.

El segundo lote (junio) presenta unos valores similares a su llegada al criadero y también su evolución es similar. Hay diferencias en la maduración sexual, con una evolución inversa al lote anterior, ya que los individuos analizados a la llegada estaban maduros, no así los correspondientes al control final. Se obtiene una puesta (puesta 2-junio), que muere en fase de post-larvas.

En 2009 se siguieron otros dos lotes de reproductores de Redondela (lote III y IV). El lote III permaneció en el criadero durante los meses de abril, mayo y junio (Tabla XIX). Se realizaron 4 controles, a días 0, 35, 57 y 91. Los niveles de vibrios de este lote en los distintos controles fueron bajos, con sólo un individuo por lote que alcanzaba 10^4 ufc/g. En lo que respecta a contenidos de bacterias heterótrofas marinas totales, presentaron niveles iniciales bajos, que fueron aumentando a medida que transcurría el tiempo en el criadero.

Tabla XIX. Valores medios de la carga bacteriana asociada a los reproductores del lote III.*
ufc/g: unidades formadoras de colonia/gramo de gónada.

Tiempo (días)	0	35	57	91
TCBS*	6.9×10^3	3.8×10^2	3.4×10^3	5.1×10^3
AM*	1.4×10^4	2.0×10^5	2.8×10^6	4.2×10^5

A pesar de los menores niveles de vibrios asociados a los reproductores, en el primer lote, ninguno de los desoves analizados superó los 65 días de cultivo (por lo que no llegó a sacarse semilla del criadero procedente de estos reproductores).

El lote IV permaneció en el criadero un mes y medio, durante mayo y junio (Tabla XX). Se realizaron 2 controles, a días 0 y 42. Presentaron niveles altos de vibrios, aunque



variables entre individuos. Los niveles de bacterias heterótrofas marinas fueron también elevados. La carga inicial de los desoves fue media-alta en todos aquellos analizados.

Tabla XX. Valores medios de la carga bacteriana asociada a los reproductores del lote IV. * ufc/g: unidades formadoras de colonia/gramo de gónada.

Tiempo (días)	0	42
TCBS*	7.4×10^4	6.8×10^4
AM*	5.8×10^6	6.5×10^5

1.2.5.3.1.2. Cultivo larvario

La primera puesta (puesta 1-junio-2008) es escasa, por lo que se mantiene en un solo lote con tratamiento con antibiótico. Las muestras de larvas a los 2 días de cultivo presentan un crecimiento escaso en TCBS. En lo que respecta al agua del cultivo, los valores son moderados, tanto en AM (3.4×10^4 ufc/ml) como en TCBS (1.1×10^2 ufc/ml), con variedad de tipos. Al cabo de 5 días de cultivo no hay crecimiento en TCBS. En AM, las larvas muestran variedad de tipos, predominando una bacteria oxidativa, de forma similar a lo que ocurre en las muestras del agua de cultivo en el mismo medio. Una semana más tarde, de nuevo no hay crecimiento en ninguna TCBS y todos los aislados de AM corresponden a bacterias oxidativas. Este mismo día se ponen a fijar, suprimiéndose el tratamiento con antibiótico. La muestra final del agua de cultivo, 19 días después del desove y una semana después de que se pongan a fijar las larvas, sigue el mismo patrón ya mencionado, tanto en recuentos como en tipos. Se realizó un estudio en profundidad de los aislados obtenidos de las puestas. De las muestras de larvas se aislaron 13 cepas, siendo sólo dos aislados de larvas en los primeros días del desarrollo, *Vibrio* spp.

La segunda puesta (puesta 2-junio-2008) tiene un elevado número de individuos de partida, pero desde un principio no va bien. Se mantiene en un sólo lote con antibiótico disuelto en alcohol, para tratar de ver si la falta de efectividad del tratamiento que se viene observando en el criadero, pudiera estar relacionada con un problema de solubilidad de la sustancia. A los ocho días de cultivo se cambia por antibiótico disuelto en agua, debido al mal aspecto de los tanques de cultivo. Al poner las larvas a fijar, a los 13 días, se continúa el tratamiento. Las mortalidades empiezan a registrarse a los 24 días después del desove, estando todo el lote muerto tres días después (300-400µm).



Las larvas parten con una carga bacteriana muy elevada, especialmente indicada por el crecimiento en TCBS, que se mantiene en el control realizado a los 3 y 6 días de cultivo. En el agua de cultivo sembrada a los 3 días, el crecimiento en AM está prácticamente por debajo del límite de detección de las diluciones sembradas (10^3 ufc/ml), mientras en TCBS (2.2×10^2 ufc/ml) se pueden diferenciar dos tipos de colonias. Tres días más tarde hay un aumento del recuento en AM (1.3×10^5 ufc/ml), aislándose sólo bacterias oxidativas, y en TCBS aparece un cultivo puro (2.4×10^2 ufc/ml). Al cabo de dos días se deja de usar el antibiótico disuelto en alcohol, volviendo a disolverse en agua, como es habitual.

En el momento de poner a fijar las larvas, el crecimiento en TCBS corresponde a un cultivo puro, mientras que de AM se recuperan sólo bacterias oxidativas. Sin embargo, en el agua de cultivo no hay crecimiento en TCBS, lo que indica que está por debajo del límite de detección (10^1 ufc/ml) y los recuentos en AM se rebajan ligeramente (1.0×10^4 ufc/ml). Una semana más tarde se aprecia un repunte del crecimiento en TCBS (1.6×10^2 ufc/ml), con un solo tipo de colonia. Al cabo de cuatro días empiezan los problemas, que terminan en la mortalidad de todo el lote en fase de post-larva a los 27 días del desove. Se toma una muestra final de estas post-larvas, donde se ve que se mantiene el crecimiento en TCBS, con un tipo claramente predominante.

Se obtuvieron 10 aislados fermentativos, del género *Vibrio*, 6 de larvas y 4 del agua de los tanques. Además, se obtuvieron 3 nuevos vibrios de la muestra de las post-larvas muertas. El antibiótico no impidió la proliferación de una población de bacterias fermentativas asociadas al cultivo desde el inicio.

Los aislados estudiados se encuadraron todos dentro del clado de *Vibrio splendidus*, al que pertenecen algunos patógenos de moluscos descritos. Un grupo, próximo a la especie *V. splendidus*, está formado por 7 aislados de la puesta con problemas, tanto de larvas y post-larvas como del agua de cultivo, siendo en todos los casos el tipo de colonia mayoritario y apareciendo a lo largo de todo el cultivo.



El segundo grupo, próximo a las especies *V. tasmaniensis*–*V. cyclitrophicus*–*V. lentus*, está formado por 8 aislados. No son los tipos mayoritarios y se aíslan de larvas y post-larvas mayoritariamente.

Complementariamente se realizaron ensayos de sensibilidad al cloranfenicol en placa, apareciendo dentro de los aislados del primer grupo, poblaciones resistentes a partir de los 6 días de cultivo. En el segundo grupo la sensibilidad inicial al antibiótico se mantuvo a lo largo del cultivo, aunque en la muestra final de post-larvas hubo indicios de desarrollo de resistencia.

Todo ello indica que el antibiótico no sólo no garantiza la viabilidad del cultivo, sino que con su uso puede potenciar la aparición de resistencias, con el riesgo que ello supone. Los cambios en la población asociada, en especial a las larvas y post-larvas, indican de todos modos la posible causalidad bacteriana, siendo necesario continuar los estudios.

Continuando con esta línea, y para completar los resultados obtenidos en fases anteriores, cuando el tamaño de los desoves lo permitió, se dividieron en dos lotes, tratando uno de ellos con antibiótico y manteniendo el cultivo del otro sin antibiótico. De esta manera se evalúa el efecto real del antibiótico sobre los organismos cultivados y sobre la población bacteriana presente.

Así, se realizó el seguimiento de 9 desoves en 2009 (Tabla XXI), desdoblándose 4 de ellos para estudios comparativos de la población bacteriana con y sin antibiótico. Los resultados preliminares del funcionamiento del antibiótico son inconsistentes, confirmando lo observado anteriormente. La carga inicial de los desoves fue media-alta en todos aquellos analizados.



Tabla XXI. Cultivos larvarios 2009. *Trat.:* tratamiento; *Lote:* lote de reproductores; *Días:* número de días de estabulación de reproductores en criadero; *Nº Hv.:* número ovocitos; *Sup. LD.:* Supervivencia de ovocito a larva D (%); *Fij.:* tiempo necesario para llegar a fijación en días; *Sup. Fij.:* Supervivencia de ovocito a postlarvas recién fijadas (%). *C. Ab.:* con antibiótico; *S. Ab.:* sin antibiótico. *.*:* lote de reproductores sin control microbiológico.

Desove	Puesta	Trat.	Lote	Días	Nº Hv.	Sup. LD.	Fij.	Sup. Fij.
1	14-4-9	C. Ab	III	15	2.053.200	73,06	10	49,12
		S. Ab			2.053.200	73,06	10	19,49
2	SM1	C. Ab	III	23	372.000	-	19	-
3	SM2	C. Ab	III	36	684.000	-	13	-
4	SM3	C. Ab	IV	3	1.937.600	72,83	11	53,08
		S. Ab			1.937.600	72,83	11	44,59
5	SM4	C. Ab	*	-	392.000	-	12	57,14
6	SM5	C. Ab	IV	8	4.480.000	-	8	63,12
7	SM6	C. Ab	*	-	2.576.000	61,73	8	39,6
		S. Ab			2.576.000	61,73	8	32,6
8	SM7	C. Ab	IV	10	5.068.800	-	11	36,29
9	SM8	C. Ab	III	57	7.276.000	-	8	4,82
10	SM9	C. Ab	IV	15	4.088.000	-	13	44,25
11	SM10	C. Ab	III	60	7.764.000	-	10	40,61

En la puesta 4 (3 d), que parte con una carga inicial muy elevada, se aprecian diferencias en el agua de cultivo con y sin antibiótico, con la reducción de vibrios en la primera, pero no en las larvas. Sin embargo, al llegar a fijación sólo aparecen vibrios en las larvas del cultivo sin antibiótico. En la mortalidad de este lote se detectan vibrios.

En la puesta 6 (8 d), los vibrios asociados inicialmente a las larvas van disminuyendo durante el cultivo, pero se detectan en números muy elevados inmediatamente después de la fijación y en el momento de la mortalidad.

En las dos puestas analizadas procedentes de reproductores sin controlar (nietos), la carga inicial es muy elevada, a pesar de lo cual ambos cultivos llegan a playa.

En la puesta 5 hay una reducción de vibrios al cabo de sólo 3 días, sin que se detecten durante el resto del cultivo.



En la puesta 7 hay diferencias entre los cultivos con y sin antibiótico durante el larvario, con la práctica desaparición de vibrios tanto en larvas como en agua de cultivo con tratamiento, frente a los elevados números en las muestras paralelas sin antibiótico. Sin embargo, las diferencias se minimizan después de fijación, con una clara reducción de los vibrios asociados a larvas sin antibiótico.

De los diferentes episodios de mortalidades registrados tanto en cultivos con o sin seguimiento, se obtuvieron un total de 25 aislados, 16 del medio TCBS y 9 de AM, que deben ser analizados para evaluar su papel en estas mortalidades.

Además, se recogieron muestras de los episodios de mortalidades en fase de semilla que se registraron en el criadero. Dado que la mayor parte de los problemas se han observado en esta fase, es necesario un estudio en profundidad de los aislados obtenidos, determinando su papel en las mortalidades y comparándolos con la microbiota presente durante el desarrollo larvario, para identificar el agente etiológico.

En la figura 60 están los recuentos puntuales de bacterias totales (Agar Marino) del agua de cultivo, aquellos desoves representados por triángulos llegaron a la playa. Los símbolos rellenos corresponden a cultivos tratados con antibiótico, los símbolos vacíos se refieren a los cultivos paralelos mantenidos sin antibiótico (marcados en la leyenda).

Los valores en todos los casos están alrededor de 10^5 ufc/ml, lo normal para el agua de mar. No hay ninguna relación entre el desarrollo del cultivo y los recuentos de bacterias marinas totales. En general, el antibiótico no garantiza la supervivencia, con resultados variables.

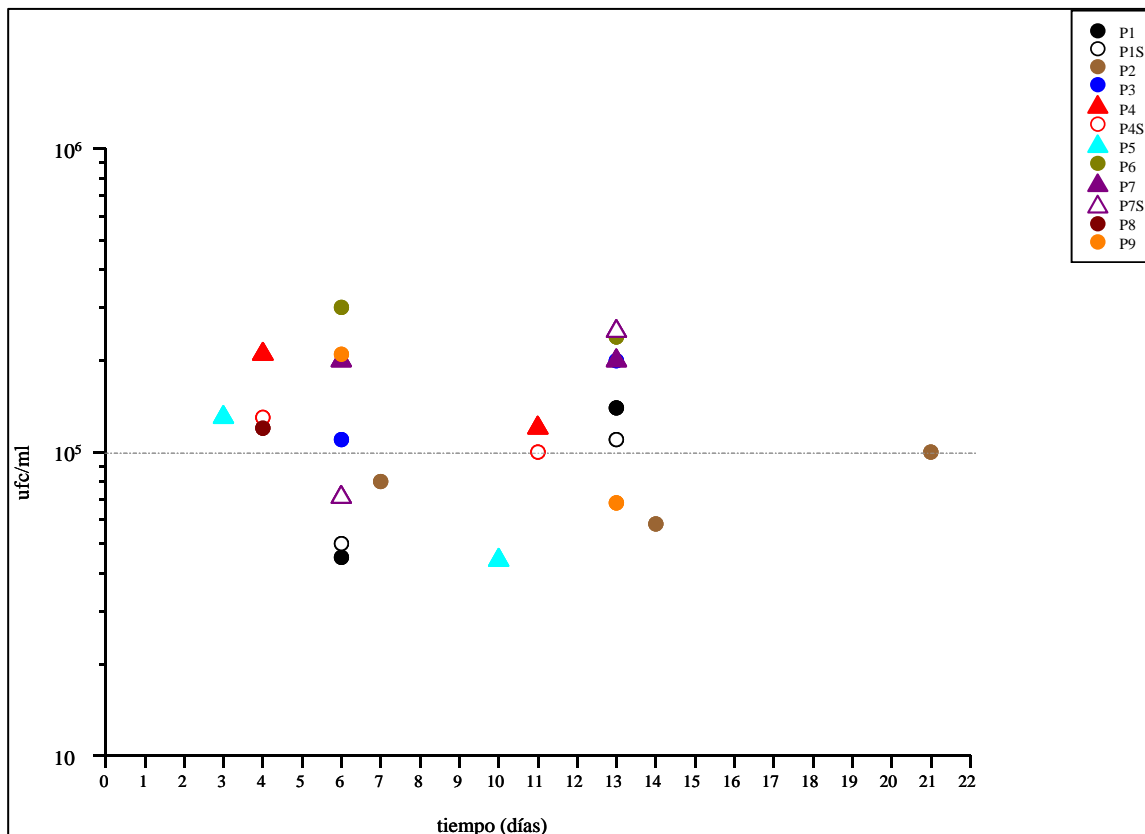


Fig. 60. Recuentos de bacterias marinas heterótrofas totales en el agua de cultivo de los diferentes desoves de longueirón vello.

1.2.5.3.2. Estudio histopatológico de *S. marginatus*

El examen de las preparaciones histológicas al microscopio óptico mostró la presencia de determinados organismos simbioses, cuyas prevalencias están representadas en las tablas XXII, XXIII y XXIV. Los parásitos detectados son los siguientes:

- 1) Colonias intracelulares de *tipo rickettsiano 1 y 2* en branquia. En el tejido conjunto de la branquia; y el tipo 2 en el borde de los filamentos branquiales.
- 2) Colonias intracelulares de tipo rickettsiano en el epitelio de los divertículos y canales de la glándula digestiva.
- 3) Bolsas bacterianas en los tubos del agua branquiales (alrededor de 100 μ m) incluidas dentro de una cubierta fibrosa derivada del tejido conjuntivo de la base del epitelio branquial.
- 4) Plasmodios de tipo Haplosporidian en el epitelio del digestivo.



- 5) *Marteilia* sp. en epitelio de glándula digestiva, observándose estados iniciales y avanzados.
- 6) Ciliados libres en la superficie y los canales del agua de las branquias, siendo en su mayoría *Trichodina* sp.
- 7) Turbelarios de tipo *Paravortex* en lumen de digestivo.
- 8) Esporoquistes y metacercarias de trematodos en diversos órganos.
- 9) Copépodos en la cavidad paleal y en lumen de estómago e intestino.
- 10) Metazoos no identificados en el lumen y conjuntivo de la glándula digestiva.
- 11) Una posible neoplasia diseminada detectada principalmente en branquia, y en algunos casos en glándula digestiva.
- 12) Infiltraciones hemocitarias y granulomas en algunos casos asociados a la presencia de parásitos, tal como *Marteilia* sp, metacercarias y a la posible neoplasia diseminada.

En la tabla XXII (longueirón vello de Cabo de Cruz) cabe destacar las altas prevalencias de los organismos *tipo-rickettsiano* en glándula digestiva (Fig. 61) y de los organismos tipo rickettsiano en branquia tipo 2 (Fig. 62), aunque en este caso únicamente en los meses de marzo y abril. Las intensidades, sin embargo, fueron normalmente bajas –o moderadas en algún caso- y no se observó reacción inflamatoria por parte del hospedador. En lo que respecta a los organismos tipo rickettsiano en branquia 1 y 2 presentan características diferenciadoras como es la localización y el carácter basófilo de la tipo 1 y eosinófilo de la tipo 2, que sugieren que puede tratarse de especies distintas. Resalta la presencia de *Marteilia* sp. (Fig. 63 y 64) a lo largo del período muestreado, con intensidades que van de ligeras a medias, con muy pocos casos avanzados, e indicar que, en algunos casos, la zona de la glándula digestiva afectada se encuentra invadida por células de *Marteilia* sp. de lo que cabría esperar efectos en el proceso de la digestión pudiendo producirse el debilitamiento de los individuos afectados, sin embargo en el examen macroscópico no se encontró ninguna señal evidente en el aspecto de la vianda. Importante también la presencia de la posible neoplasia diseminada (Fig. 65), aunque los focos observados en su mayoría no son grandes ni muy abundantes. Dentro de los trematodos destacar la presencia de algún caso de esporoquistes en gónada, observándose la castración del organismo afectado (Fig. 66). Ciliados, turbelarios y copépodos se

consideran simbioses oportunistas y no se observó daño provocado por ellos ni reacción por parte del hospedador, incluso en el caso de los ciliados que aparecen con prevalencias altas, normalmente se encuentran libres en la cavidad paleal sin causar daño aparente.

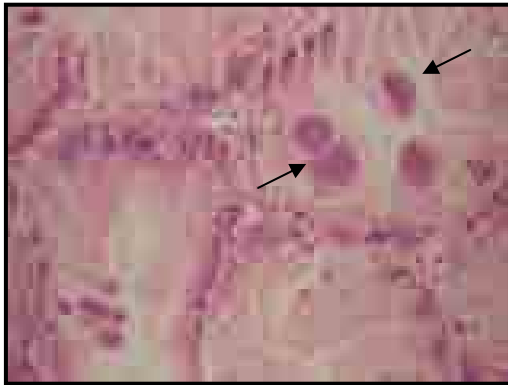


Fig. 61. Organismos tipo rickettsiano en glándula digestiva (HEE, x400).

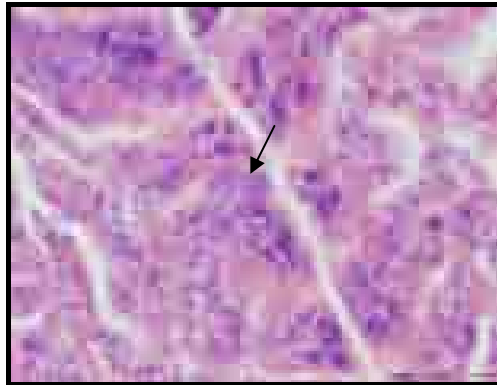


Fig. 62. Inclusiones bacterianas intracelulares en branquia (HEE, x400).

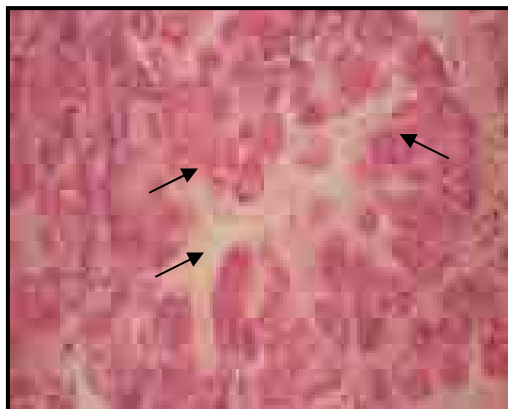


Fig. 63. *Marteilia* sp. en estados avanzados en glándula digestiva (HEE, x400).

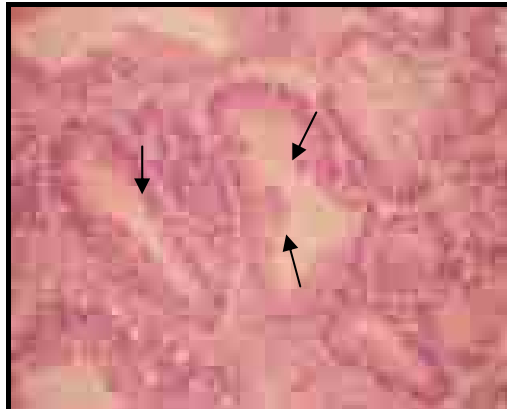


Fig. 64. Estados iniciales de *Marteilia* sp en glándula digestiva (HEE, x200).

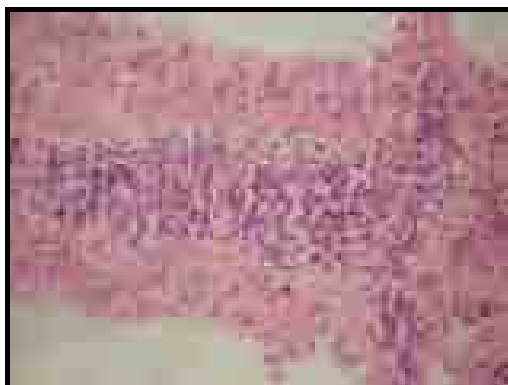


Fig. 65. Neoplasia diseminada en branquia (HHE, x 400).

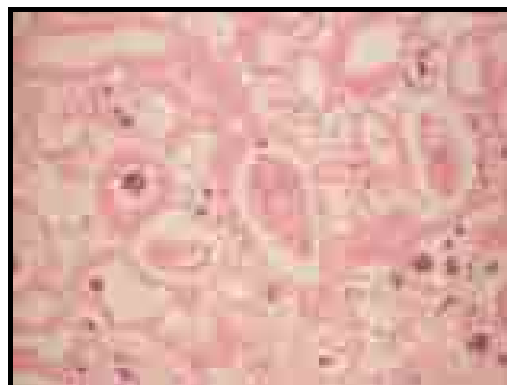


Fig. 66. Esporoquistes de trematodo causando castración gonadal (HHE, x100).

Tabla XXII. Prevalencias de los simbioses y otras condiciones detectados en *S. marginatus* de Cabo de Cruz durante los años 2003-2004 y 2005.

Fecha	Tamaño muestra	Tipo-Rickettsia glándula digestiva	Tipo-Rickettsia branquia 1	Tipo-Rickettsia branquia 2	Bolsas bact. branquia	<i>Marteilia</i> sp.	Ciliados	Turbelarios	Trematodos esporoquistes	Trematodos metacercarias	Copépodos	Neoplasias
02/2003	30	10	0	0	0	36.7	20	3.3	6.7	0	0	0
03/2003	20	15	0	90	1	10	65	10	5	0	0	15
04/2003	20	0	0	50	5.5	44.4	88.9	0	11.1	5.5	0	72.2
05/2003	30	46.7	0	0	0	30	76.7	10	16.7	6.7	3.3	6.7
06/2003	20	70	0	0	0	30	80	0	10	5	20	5
07/2003	20	45	0	0	0	25	90	15	0	5	25	0
08/2003	30	20.7	0	0	0	34.5	34.5	13.8	13.8	0	6.8	0
09/2003	15	6.7	0	0	0	33.3	40	6.7	6.7	6.7	6.7	6.7
10/2003	10	10	0	0	0	20	90	20	0	0	10	20
11/2003	20	15	0	0	10	40	45	15	0	20	5	5
12/2003	20	0	0	0	0	30	65	0	0	20	10	15
01/2004	20	25	0	0	0	35	35	35	0	15	5	20
02/2004	20	20	0	0	0	30	0	15	5	0	5	10
03/2004	20	20	10	0	0	35	50	10	0	0	20	20
04/2004	20	25	30	0	0	35	60	15	0	0	10	55
05/2004	30	26.7	0	0	0	20	53.3	16.7	6.7	0	6.7	0
06/2004	20	80	10	0	0	35	40	15	5	0	15	40
07/2004	19	47.4	0	0	5.3	36.8	78.9	10.5	5.3	0	31.6	5.3
08/2004	15	53.3	0	0	0	0	80	0	6.7	13.4	6.7	0
09/2004	16	18.7	0	0	0	31.2	81.2	0	0	18.7	12.5	50
10/2004	5	0	0	0	0	40	20	0	0	20	0	60
11/2004	5	0	0	0	0	80	40	0	0	0	0	0
12/2004	4	0	0	0	0	25	25	25	25	0	0	5
02/2005	20	0	0	0	0	30	25	0	0	10	5	0
03/2005	16	12.5	6.2	0	0	37.5	25	0	6.2	6.2	12.5	0
04/2005	19	0	0	0	0	26.3	26.3	5.3	0	0	0	5.3
05/2005	12	50	0	0	0	16.7	50	8.3	0	8.3	33.3	0
06/2005	9	33.3	0	0	0	22.2	66.7	0	0	0	0	0
07/2005	20	30	0	0	0	15.8	75	25	0	20	5	10
08/2005	5	0	0	0	0	0	50	16.7	0	16.7	16.7	0
09/2005	20	5	0	0	0	15	45	5	0	10	0	0
10/2005	15	20	0	0	0	26.7	66.7	0	13.3	20	13.3	0

En la tabla XXIII donde se representan los datos de las prevalencias de los simbioses y otras condiciones de *S. marginatus* de Cabo de Cruz (Ría de Arosa) durante los años 2008 y 2009 destaca el aumento de las prevalencias de los organismos tipo



rickettsiano en branquia tipo 2 con respecto a años anteriores (Tabla XXII), así como el descenso de las prevalencias de *Marteilia* sp., y la presencia de organismos tipo haplosporidian con prevalencias medias, pero en ningún caso se observó reacción hemocitaria por parte del hospedador, ni daño tisular asociado.

Tabla XXIII. Prevalencias de los simbioses y otras condiciones detectados en *S. marginatus* de Cabo de Cruz durante los años 2008 y 2009.

Fecha	Tamaño muestra	Tipo-Rickettsia glándula digestiva	Tipo-Rickettsia branquia 1	Tipo-Rickettsia branquia 2	Bolsas bact. branquia	<i>Marteilia</i> sp.	Ciliados	Tipo haplosporidian	Turbelarios	Trematodos esporoquistes	Trematodos metacercarias	Copépodos	Metazoos no identificados	Neoplasias
02/2008	20	25	5	5	0	0	25	5	5	0	0	15	0	0
03/2008	20	45	0	90	0	5	55	25	0	0	0	0	0	20
04/2008	20	25	0	70	0	5	70	30	10	0	0	0	0	30
05/2008	20	30	5	55	0	0	90	40	5	5	5	0	5	40
06/2008	20	60	5	80	0	0	100	55	5	0	0	20	0	15
07/2008	20	50	5	65	0	15	70	20	20	0	0	0	0	70
08/2008	12	8	0	0	0	8	50	25	0	8	8	0	0	33
09/2008	20	15	0	10	0	0	60	25	0	0	0	0	0	80
10/2008	20	20	0	5	0	5	65	25	10	0	5	5	0	15
12/2008	12	8	0	25	8	0	33	8	0	0	17	0	0	33
01/2009	20	0	0	20	0	5	20	0	5	0	0	0	5	20
02/2009	20	0	0	5	0	10	20	5	15	0	0	5	0	10
03/2009	20	25	0	20	0	10	30	15	0	0	5	5	10	15
04/2009	20	10	0	50	0	5	75	5	0	0	10	5	0	10

En la tabla XXIV (longueirón vello de Redondela), con respecto a la población de Cabo de Cruz cabe destacar la ausencia de *Marteilia* sp., y la menor abundancia de la posible neoplasia diseminada.



Tabla XXIV. Prevalencias de los simbioses y otras condiciones detectados en *S. marginatus* de Redondela durante los años 2006-2007.

Fecha	Tamaño muestra	Tipo-Rickettsia glándula digestiva	Tipo-Rickettsia branquia tipo 1	Tipo-Rickettsia branquia tipo 2	Bolsas bact. branquia	Tipo-Haplosporidian	Ciliados	Turbelarios	Trematodos esporoquistes	Trematodos metacercarias	Copepodos	Neoplasias
01/2006	20	10	15	0	10	0	30	0	10	5	0	5
02/2006	20	0	10	20	5	0	30	5	0	0	0	0
03/2006	20	20	0	0	10	0	30	15	0	0	0	0
04/2006	20	60	0	0	5	0	30	5	0	0	0	0
05/2006	20	25	0	5	0	0	45	5	0	0	0	0
06/2006	20	55	5	0	0	0	25	0	0	5	0	0
07/2006	20	40	5	5	0	0	65	0	0	0	0	0
08/2006	20	35	0	0	0	0	80	5	0	0	0	0
09/2006	20	50	5	10	0	0	0	0	0	0	5	0
10/2006	16	37,5	0	25	12,5	0	25	0	0	0	6,25	0
11/2006	20	30	0	15	0	15	30	0	0	0	5	0
12/2006	20	20	0	10	0	10	10	0	0	0	0	0
01/2007	20	25	0	20	5	0	10	10	0	0	0	20
02/2007	20	15	5	5	5	5	30	5	0	0	0	10
03/2007	20	45	0	45	0	0	15	10	0	0	0	10
04/2007	20	60	0	90	0	15	70	10	0	0	5	40

Germinoma en *Ensis siliqua*

Se detectó la presencia de un germinoma (Fig. 67) en *E. siliqua* similar al ya detectado en *Ensis arcuatus* (Darriba *et al.*, 2006). Las prevalencias están representadas en la tabla XXV.

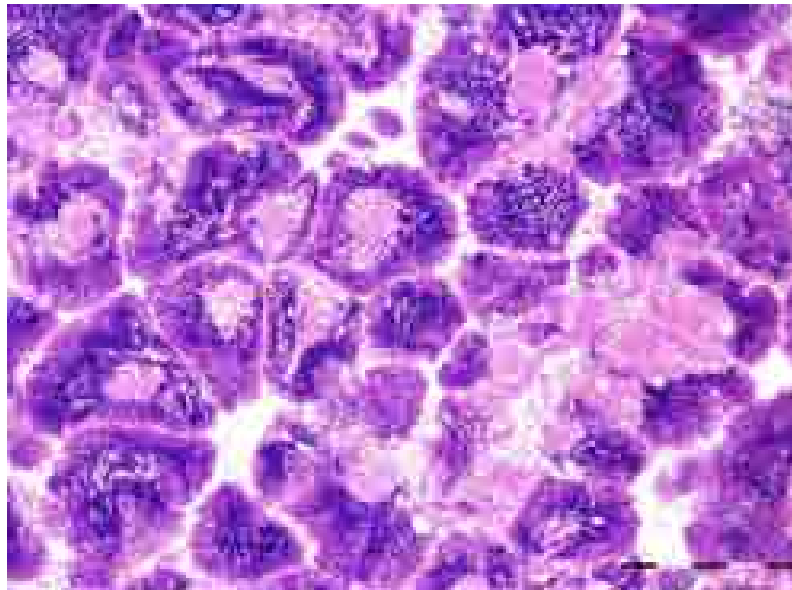


Fig. 67. Germinoma en un macho de *E. siliqua* (HHE, x 100).

Tabla XXV. Prevalencias del germinoma en *E. siliqua* de Finisterre durante los años 2003 y 2004.

Fecha	Nº de Individuos	Nº de casos con germinoma	(%)
01/03	20	0	0,0
02/03	15	1	6,7
03/03	20	0	0,0
04/03	18	0	0,0
05/03	20	2	10,0
06/03	20	2	10,0
07/03	20	1	5,0
08/03	15	0	0,0
09/03	20	1	5,0
10/03	20	2	10,0
11/03	15	0	0,0
12/03	15	0	0,0
01/04	15	0	0,0
02/04	15	0	0,0
03/04	18	3	16,7
04/04	15	2	13,3
05/04	15	0	0,0
06/04	15	1	6,7



1.2.5.4. CONCLUSIONES

- En el longueirón vello el uso de antibiótico no garantiza la supervivencia larvaria, con resultados variables.

- En el longueirón vello de Cabo de Cruz, destaca en primer lugar la presencia de *Marteilia* sp. y su descenso durante los años 2008 y 2009; la presencia de organismos tipo-rickettsiano en glándula digestiva, y en branquia (destacando la tipo 2, cuyas prevalencias aumentaron durante el 2008 -2009). Destacar también la presencia de los organismos tipo haplosporidian durante el 2008-2009 y la posible neoplasia diseminada; así como los esporoquistes de trematodo (debido a los casos encontrados de castración gonadal).

- En el longueirón vello de Redondela, destaca la presencia de organismos tipo-rickettsiano, la presencia del protozoo tipo haplosporidian y la posible neoplasia diseminada con prevalencias más altas en el año 2007.

- Comparando las patologías detectadas en longueirón vello en ambos bancos, tenemos que destacar la ausencia de *Marteilia* sp en Redondela, así como la menor presencia de los esporoquistes de trematodos en este banco.

- En general, de todos los simbioses parásitos y alteraciones patológicas detectados en longueirón vello resaltar:

- *Martelia* sp., por el potencial daño que le puede causar a los organismos parasitados ya que, en estados avanzados, llega a ocupar todo el epitelio de los túbulos y canales afectados, con sus consiguientes posibles efectos en el Índice de Condición. Existen referencias importantes de mortalidades asociadas a la presencia de especies pertenecientes al género *Marteilia* en otros moluscos.
- Los organismos tipo-rickettsiano, pues aunque las intensidades detectadas no son muy altas, ni se han observado daños importantes en el hospedador. Existen referencias de bancos de otros moluscos con mortalidades asociadas a organismos de este tipo.



C.A. Galicia-Subproy. 1. Cultivo de coquina (*Donax trunculus*) y longueirón (*Solen marginatus*)

- Se detectó algún caso de castración por la presencia de esporoquistes de trematodos, por lo que no se debe obviar la presencia de este parásito.
 - La presencia de la posible neoplasia diseminada debe tenerse en cuenta, ya que existen referencias de la asociación de esta patología con mortalidades.
- Presencia de germinoma en *E. siliqua*.



1.2.6. BIBLIOGRAFÍA

Bayne, B.L.; Newell, R.C. 1983. Physiological energetic of marine molluscs. pp: 407-415. En: Saleudin, A.S.M. & Wilbur, K.M. (ed). *The Mollusca: Vol. 4, Physiology*. Academic Press, Nueva York, USA.

Breese, W.P.; Robinson, A. 1981. Razor clams, *Siliqua patula* (Dixon): Gonadal development, induced spawning and larval rearing. *Aquaculture*. 22: 27-33.

Brousseau, D.J.; Baglivo, J.A., 1987. A comparative study of age and growth in *Mya arenaria* (soft-shell clam) from three populations in Long Island Sound. *J. Shellfish Res.* 6: 21-29.

Carballal, M.J.; Iglesias, D.; Santamarina, J.; Ferro-Soto, B.; Villalba, A. 2001. Parasites and pathological conditions of the cockle *Cerastoderma edule* populations of the coast of Galicia (NW Spain). *J. Invertebr. Pathol.* 78: 87-97.

Carballal, M.J.; Villalba, A.; Iglesias, D.; Hine, P.M. 2003. Virus-Like particles associated with Large foci of heavy hemocytic infiltration in cockles *Cerastoderma edule* from Galicia (Nw Spain). *J. Invertebr. Pathol.* 84: 234-237.

Casas, S.M. 2001. Estudio de la perkinsosis en la almeja fina, *Tapes decussatus* (Linnaeus, 1758), de Galicia. *Tesis doctoral. Universidad de Santiago de Compostela*.

Casas, S.M.; Villalba, A.; Reece, K.S., 2002. Study of perkinsosis in the carpet shell clam *Tapes decussatus* in Galicia (NW Spain). I. Identification of the aetiological agent and *in vitro* modulation of zoosporulation by temperature and salinity. *Dis. Aquat. Org.*, 50: 51-65.

da Costa, F. 2009. Optimización del cultivo en criadero de navaja (*Ensis arcuatus* Jeffreys, 1865), longueirón (*E. siliqua* Linneo, 1758) y longueirón vello (*Solen marginatus* Pennant, 1777): composición bioquímica y de ácidos grasos en los desarrollos larvarios. *Tesis doctoral. Univ. de Santiago de Compostela*. 309 pp.

da Costa, F.; Cerviño-Otero, A.; Louzán, A.; Ojea, J.; Nóvoa, S. 2009. Effects of substratum and stocking density on the performance of juveniles of *Ensis arcuatus* in intermediate cultivation trials. *Aquaculture Europe 2009*. Thronheim, Noruega.

da Costa, F.; Darriba, S.; Martínez-Patiño, D. 2008. Embryonic and larval development of *Ensis arcuatus* (Jeffreys, 1865) (Bivalvia: Pharidae). *J. Moll. Stud.* 74: 103-109.

da Costa, F.; Martínez-Patiño, D. 2009. Culture potential of the razor clam *Solen marginatus* (Pennant, 1777). *Aquaculture*. 288: 57-64.

Da Silva, P.M. 2005. Evaluación de la susceptibilidad a enfermedades, capacitación inmunológica y caracteres productivos en poblaciones de ostra plana *Ostrea edulis* de origen geográfico diverso. *Tesis doctoral. Universidad de Santiago*.



- Da Silva, P.M.; Fuentes, J.; Villalba, A. 2005. Growth, mortality and disease susceptibility of oyster *Ostrea edulis* families obtained from brood stocks of different geographical origins, through on-growing in the Ría de Arousa (Galicia, NW Spain). *Mar. Biol.* 147: 965-977.
- Darriba, S. 2001. Biología de la navaja (*Ensis arcuatus* Jeffreys, 1865) de la Ría de Vigo (N.O. de España): Crecimiento y reproducción. *Tesis doctoral. Univ. de Vigo.* 283 pp.
- Darriba S.; Martínez, D.; Guerra, A. 2002. The razor clam *Ensis arcuatus*: perspectives for hatchery outgrowing culture. *Abstracts Aquaculture Europe 2002. Special publication n° 32.* 198-199.
- Darriba, S.; Iglesias, D.; Harshbarger, J.C.; López, C. 2006. Germinoma in razor clam *Ensis arcuatus* (Jeffreys, 1865) in Galicia (NW Spain). *J. Invert. Pathol.* 93: 140-142
- Darriba, S.; Iglesias, D.; Ruiz, M.; Rodríguez, R.; López, C. (en prensa). Histological survey of symbionts and other conditions in razor clam *Ensis arcuatus* (Jeffreys, 1865) (Pharidae) of the coast of Galicia (NW Spain). *J. Invert. Pathol.* (2010), doi:10.1016/j.jip.2009.12.005.
- Figueras, A.J. 1991. *Bonamia* status and its effects in culture flat oysters in the Ría de Vigo, Galicia (N.W. Spain). *Aquaculture* 93: 225-233.
- Figueras, A.; Robledo, J.A.; Novoa, B. 1992. Occurrence of haplosporidian and *Perkinsus*-like infections in carpet-shell clams, *Ruditapes decussatus* (Linnaeus, 1758), of the Ría de Vigo (Galicia, NW Spain). *J. Shellfish Res.*, 11: 377-382.
- Fraga, F. 1956. Determinación de glucógeno en moluscos con el reactivo de la antrona. *Inv. Pesq.* III: 69-74.
- Gaspar, M.B. 1996. Bivalves do Litoral Oceánico Algarvio. Aspectos da biología, ecología e da pescaria dos mananciais de interese económico: aplicación à gestao dos recursos. *Tesis doctoral. Univ. do Algarve, Faro.* 282 pp.
- Gómez-Mourelle, S. 1993. Estudio patológico del mejillón cultivado en Galicia (*Mytilus galloprovincialis*). *Tesis doctoral. Universidad de Santiago.*
- Iglesias, D. 2006. Estudio patológico de las poblaciones de berberecho *Cerastoderma edule* (L.) de Galicia. *Tesis Doctoral. Univ. de Santiago de Compostela.*
- Kenchington, E.; Duggan, R.; Riddell, T. 1998. Early life history characteristics of the razor clam (*Ensis directus*) and the moonsnails (*Euspira* spp.) with applications to fisheries and aquaculture. *Can. Tech. Rep. Fish. Aquat. Sci.* 2223: vii + 32 pp.
- Leavitt, D.; Burt, W. 2001. The razor clam (*Ensis directus*) as a candidate for culture in the northeast: An introduction. *J. Shellfish Res.* 20: 522-523.



- Leavitt, D.; Burt, W.; Murphy, D.; Hanson, R. 2002. Progress with culturing the razor clam (*Ensis directus*). *J. Shellfish Res.* 21: 345-346.
- Leavitt, D.; Gardner, J.; Getchis, T.; Grunden, D.; Murphy, D.; O'Connell, J.; Patricio, M.; Surier, A.; Warsworth, J.; Burt, W. 2005. A preliminary investigation of the razor clam (*Ensis directus*) as a candidate for commercial farming. *J. Shellfish Res.* 24: 663.
- Lépez, I.; Arriagada, D.; Padget, C.; Tarifeño, E.; Vega, A.; Riquelme, R.; Araya, J.M. 2005. Cultivo larval y postlarval de *Ensis macha* en ambiente controlado. *Workshop Internacional. Estado Actual de la Biología y Cultivo de Bivalvos Enterradores.* Concepción, Chile, 19-20 de abril.
- Lépez, I.; Véjar, F.E.; Arriagada, D. 2008. Cultivo de la navaja (*Ensis macha*) en Chile. pp: 213-221. En: Guerra, A. & Lodeiros, C. (ed). *Navajas y longueirones: biología, pesquerías y cultivo.* Xunta de Galicia, Consellería de Pesca e Asuntos Marítimos, Santiago de Compostela, A Coruña, España.
- Loosanoff, V.; Davies, H.C. 1963. Rearing of bivalve larvae. *Avd. Mar. Biol.* 1: 1-136.
- López, C. 1995. Estudio patológico de la almeja *Ruditapes decussatus* (Linnaeus, 1758) cultivada en Galicia y sus mecanismos de defensa. *Tesis Doctoral de la Universidad de Santiago* (Galicia, España).
- López, C.; Villalba, A.; Carballal, M.J. 1998. Estudio patológico de la almeja fina (*Ruditapes decussatus*) cultivada en Carril (Galicia). *Marisqueo en Galicia. 3ª Xornadas de medio mariño e acuicultura.* Edicios do Castro. pp. 225-238.
- López, C.; Darriba, S. 2006. Presence of *Marteilia* sp., (Paramyxea) in the razor clam *Solen marginatus* (Pennant, 1777) in Galicia (NW Spain). *J. Invertebr. Pathol.*, 92: 109-111.
- López, C.; Rodríguez, R.; Darriba, S. 2008. Parasites and pathological conditions of two natural beds of razor clam *Solen marginatus* (Pennant, 1777) in Galicia (NW of Spain). *Aquaculture Europe.* Cracovia. Polonia.
- López Veiga, E. 2000. *Manual de política pesquera. Tomo I.* Consellería de Pesca, Marisqueo e Acuicultura. Xunta de Galicia. 525 pp.
- Lowry, H.O.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Lucas, A. 1977. Culture of manila clam (*Venerupis semidecussata*, Reeve) from hatchery-reared spat. *3rd Meeting of the ICES Working Group on Mariculture.* Brest, France, May 10-13. *Actes de Colloques du C.N.E.X.O.* 4: 317-330.
- Maia, F.; Sobral, M.P.; Gaspar, M. 2006a. Ciclo reproductivo e primeira maturação de *Solen marginatus* e *Venerupis pullastra* na Ría de Aveiro. *Relatórios científicos e técnicos do IPIMAR.* 35 pp.



- Maia, F.; Sobral, M.P.; Gaspar, M.; Pimenta, J. 2006b. Estudo do crescimento de *Solen marginatus* e de *Venerupis pullastra* na Ría de Aveiro. Bases científicas para a gestão de estes recursos. *Relatórios científicos e técnicos do IPIMAR*. 43 pp.
- Marsh, J.B.; Weinstein, D.B. 1966. Simple carrying method for determination of lipids. *J. Lipid Res.* 7: 574-576.
- Martínez, D. 2002. Estudio de los Solénidos, *Solen marginatus* (Pennánt, 1777) y *Ensis siliqua* (Linné, 1758), de los bancos naturales de la Ría de Ortigueira y Ría del Barquero: ciclo gametogénico, composición bioquímica y cultivo larvario. *Tesis doctoral. Univ. de Santiago de Compostela*. 240 pp.
- Martínez, D.; Cerviño Otero, A.; Louzán, A.; Da Costa, F.; Ojea, J.; Nóvoa, S. 2008. Producción de especies de interés marisquero en la Planta de Cultivos Marinos de Ribadeo (CIMA). *II Foro Iberoamericano de los recursos marinos y la acuicultura. FIRMA 2008*. Cumaná (Venezuela).
- Marty, Y.; Delaunay, F.; Moal, J.; Samain, J.F. 1992. Changes in the fatty acid composition of *Pecten maximus* (L.) during larval development. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 163: 221-234.
- Miranda, M. 2002. Eficiencia de retención y tasa de aclaramiento en *Ensis siliqua*. *Diploma de Estudios Avanzados. Univ. de Santiago de Compostela*. 25 pp.
- Montes, J. 1990. Development of *Bonamia ostreae* parasitosis of flat oyster, *Ostrea edulis*, from Galicia, Northwest Spain. En: *Pathology in Marine Science*. Perkins, F.O. & Cheng, T.C. (Eds.). Academic Press. pp. 223-227.
- Montes, J. 1991. Lag time for the infestation of flat oyster (*Ostrea edulis* L.) by *Bonamia ostreae* in estuaries of Galicia (NW Spain). *Aquaculture*. 93: 235-239.
- Montes, J.; Acosta, C.P.; Guerra, A. 1989. Oyster mortality in Galicia (NW Spain). En: *Aquaculture - A biotechnology in Progress. European Aquaculture Society*. Bredene, Belgium, pp. 941-948.
- Montes, J.; Anadón, R.; Azevedo, C. 1994. A possible life cycle for *Bonamia ostreae* on the basis of electron microscopy studies *J. Invertebr. Pathol.*, 63: 1-6.
- Montes, J.; Ferro-Soto, B.; Conchas, R.F.; Guerra, A. 2003. Determining culture strategies in populations of the European flat oyster, *Ostrea edulis*, affected by bonamiosis. *Aquaculture* 220: 175-182.
- Montes, J.; Lama, A.; Longa, M.A. 1995. Estudio sobre la incidencia de *Bonamia ostreae* en Galicia: perspectiva histórica, situación actual y problemática. *Actas V Congreso Nacional de Acuicultura* pp. 232-237.



Montes, J.; Villalba, A.; López, M.C.; Carballal, M.J.; Mourelle, S.G. 1991. Bonamiasis in native flat oysters (*Ostrea edulis* L.) from two intertidal beds of the Ortigueira estuary (Galicia, NW Spain) with different histories of oyster culture. *Aquaculture* 93: 213-224.

Nóvoa, S. 2007. Metabolismo lipídico, ácidos grasos en el cultivo larvario de almeja babosa, *Venerupis pullastra* (Montagu, 1803). “Calidad ovocitaria, larvaria y nutricional con una aproximación al uso de la microencapsulación lipídica”. *Tesis doctoral. Univ. de Santiago de Compostela*. 244 pp.

Ordás, M.C.; Gómez-León, J.; Figueras, A. 2001. Histopathology of the infection by *Perkinsus atlanticus* in three clam species (*Ruditapes decussatus*, *R. philippinarum* and *R. pullastra*) from Galicia (NW Spain). *J. Shellfish Res.* 20: 1019-1024.

Robinson, R.F.; Richardson, C.A. 1998. The direct and indirect effects of suction dredging on a razor clam (*Ensis arcuatus*) population. *ICES J. Mar. Scie.* 55: 970-977.

Robledo, J.A.F.; Figueras, A. 1995. The effects of culture-site, depth, season, and stock source on the prevalence of *Marteilia refringens* in cultured mussels (*Mytilus galloprovincialis*, Lmk) from Galicia, Spain. *J. Parasit.* 81: 354-363.

Robledo, J.A.F.; Santarem, M.M.; Figueras, A. 1994. Parasite loads of rafted blue mussels (*Mytilus galloprovincialis*) in Spain with special reference to the copepod, *Mytilicola intestinalis*. *Aquaculture* 127: 287-302.

Romalde, J.L.; Vilariño, M.L.; Beaz, R.; Rodríguez, J.M.; Díaz, S.; Villalba, A.; Carballal, M.J. 2007. Evidence of retroviral etiology for disseminated neoplasia in cockles (*Cerastoderma edule*). *J. Invertebr. Pathol.* 94: 95-101.

Royo, A.; Ruiz-Azcona, P. 2005. Incidencia de la densidad en el engorde de almeja japonesa (*Ruditapes philippinarum* Adams & Reeve, 1850) en la zona intermareal. pp: 229-233. En: *Actas del IX Congreso Nacional de Acuicultura* (13-16 de mayo, 2003, Cádiz). Consejería de Agricultura y Pesca, Junta de Andalucía, Sevilla.

Sokal, R.R.; Rohlf, F.J. 1995. *Biometry. The principles and practice of statistics in biological research*. Third edition. Freeman, Nueva York, USA. 358 pp.

Soudant, P. 1995. Les phospholipides et les sterols des geniteurs et des larves de coquille Saint Jacques *Pecten maximus* (L.). Relations avec la nutrition. *Thèse de doctoral. Univ. de Brest*. 277 pp.

Utting, S.D.; Millican, P.F. 1997. Techniques for the hatchery conditioning of bivalve broodstock and the subsequent effect on egg quality and larval viability. *Aquaculture*. 155: 45-54.

Villalba, A.; Mourelle, S.G.; Carballal, M.J.; López, M.C. 1993a. Effects of infection by the protistan parasite *Marteilia refringens* on the reproduction of cultured mussels *Mytilus galloprovincialis* in Galicia (NW Spain). *Dis. Aquat. Org.*, 17: 205-213.



Villalba, A.; Mourelle, S.G.; López, M.C.; Carballal, M.J.; Azevedo, C. 1993b. Marteiliasis affecting cultured mussels *Mytilus galloprovincialis* of Galicia (NW Spain) .1. Etiology, phases of the infection, and temporal and spatial variability in prevalence. *Dis. Aquat. Org.*, 16: 61-72.

Villalba, A.; López, C.; Carballal, M.J. 1993c. Parásitos y alteraciones patológicas de tres especies de almeja, *Ruditapes decussatus*, *Venerupis pullastra*, y *Venerupis rhomboides*, en las Rías Gallegas. *Actas IV Congreso Nacional de Acuicultura*. 551-556 pp.

Villalba, A.; Carballal, M.J.; López, C.; Cabada, A.; Corral, L.; Azevedo, C. 1999. Branchial rickettsia-like infection associated with clam *Venerupis rhomboides* mortality. *Dis. Aquat. Org.* 6: 53-60.

Villalba, A.; Carballal, M.J.; López, M.C. 2001. Disseminated neoplasia and large foci of haemocytic infiltration in cockles *Cerastoderma edule* from Galicia (NW Spain). *Dis. Aquat. Org.* 46: 213-216.

Villalba, A.; Casas, S.M.; López, C.; Carballal, M.J. 2005. Study of perkinsosis in the carpet shell clam *Tapes decussatus* in Galicia (NW Spain). II. Temporal pattern of disease dynamics and association with clam mortality. *Dis. Aquat. Org.* 65: 257-267.

Wilson, J.A.; Chaparro, O.R.; Thompson, R.J. 1996. The importance of broodstock nutrition on the viability of larvae and spat in the Chilean oyster *Ostrea chilensis*. *Aquaculture*. 139: 63-75.



2. C.A. CATALUÑA-SUBPROYECTO 2. DESARROLLO DE TÉCNICAS DE CULTIVO EN HATCHERIES DE *CALLISTA CHIONE*.

2.1. LÍNEA 1. SEGUIMIENTO DEL CICLO BIOLÓGICO DE UNA POBLACIÓN NATURAL

2.1.1. MATERIAL Y MÉTODOS

El desarrollo gonadal de *C. chione* se estudió en la costa central catalana mediante técnicas histológicas. La población analizada habita en fondos de arena, entre 5 a 30 metros de profundidad, en la zona comprendida entre los ríos Tordera y Besós.

Se analizaron mensualmente 30 individuos entre enero 2005 y enero 2006, a excepción del mes de agosto. Dichos ejemplares procedían de la pesca artesanal que se realiza en la zona. La temperatura del agua se registró a diario mediante una sonda de temperatura situada a 10 m de profundidad en una zona cercana a la zona de pesca.

Una vez en el laboratorio, se midió la longitud con un pie de rey y se diseccionaron los ejemplares para extraer una porción de la gónada. La muestra se fijó durante 24 horas en formol tamponado al 4% y se conservó en alcohol 70° hasta el momento de su procesado. El procesado histológico previo consistió en deshidratar e incluir el tejido en parafina de 60 grados de punto de fusión. Se realizaron cortes de 5 micras de grosor que se tiñeron con hematoxilina-eosina, empleándose DPX como medio de montaje.

El ciclo gonadal se clasificó siguiendo la escala propuesta por Valli (1994), que define 6 estadios: 0 para individuos inmaduros; 1 al aparecer pequeños folículos inmersos en un tejido conjuntivo laxo, rico en células adipogranulosas y hemocitos de diferentes categorías; 2 al formarse folículos bien definidos, con células germinales en su interior; 3 para gónadas maduras; 4 para la emisión de las células germinales maduras y 5 para la degradación de las estructuras sexuales residuales.

Con los resultados del estado sexual de cada uno de los individuos analizados se calculó el porcentaje mensual de cada estadio gonadal.



2.1.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las tallas de los ejemplares estudiados estuvieron comprendidas entre 31 y 95 mm de longitud.

Los resultados del estudio del ciclo gonadal muestran que *C. chione* puede reproducirse durante todo el año en la costa catalana. (Fig. 68). Los períodos de puesta más importantes tuvieron lugar en primavera y otoño. La maduración gonadal se inició en diciembre y los folículos se mantuvieron maduros en gran parte de la población desde febrero hasta marzo. Entre marzo y abril comenzó un nuevo período de puesta que presentó un máximo en el mes de mayo y se prolongó hasta junio. Durante el verano, cuando la temperatura del agua es elevada, se combinaron períodos de maduración y degradación de las gónadas, observándose una disminución importante en el porcentaje de individuos en puesta. Pasados los meses de calor se observó un segundo pico de puesta desde septiembre hasta noviembre, pero de menor intensidad que el primero. Durante estos mismos meses también tiene lugar la degradación gonadal, de forma que en diciembre el ciclo de maduración vuelve a reiniciarse.

El ciclo reproductor de ambos sexos fue sincrónico, a excepción de septiembre 2005. En dicho mes predominaron, en el caso de las hembras, estadios de liberación y degradación de ovocitos mientras que los machos ya presentaron los primeros estadios de maduración. La proporción de machos y hembras a lo largo del ciclo fue de 1:1.

Se observó una diferencia entre los meses de enero 2005 y enero 2006 en cuanto a la frecuencia relativa de los estadios de desarrollo gonadal (Fig. 68). Mientras que durante enero 2005 predominó el estadio 2 seguido del 3 (gónadas en maduración y ya maduras) durante enero 2006 la mayoría de gónadas estaban bien maduras y el estado 2 era minoritario. La situación que encontramos en enero 2006 es más similar a la de febrero 2005 que al correspondiente mes del año anterior, sugiriendo un adelantamiento de la puesta.

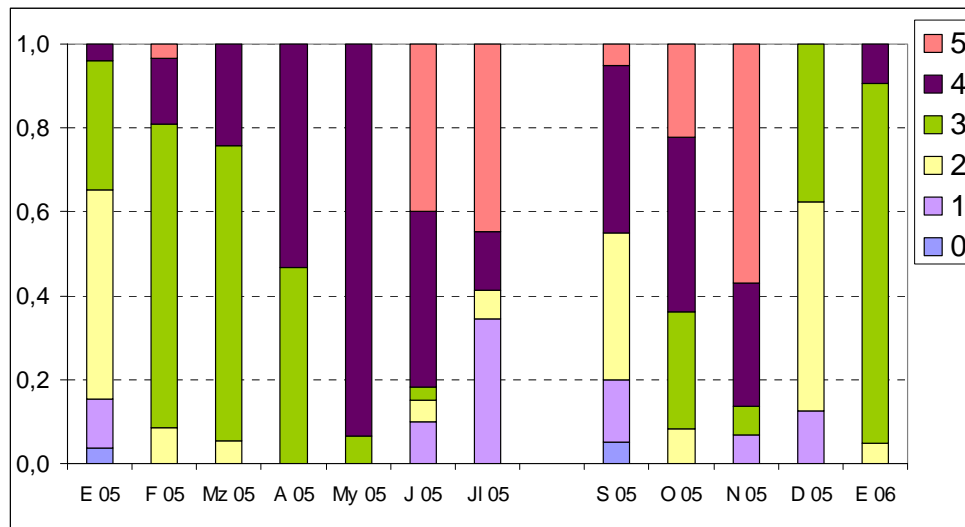


Fig. 68. Frecuencia relativa de los distintos estadios del ciclo gonadal de *C. chione* durante el periodo de estudio.

En la gónada de algunos individuos que realizaron la puesta entre enero y marzo y en el mes de octubre se observó la existencia de porciones de la gónada que volvieron a madurar rápidamente, formando nuevas células germinales. Así en las hembras se observaron estadios 2 y 4 (maduración y liberación de gametos maduros) simultáneamente en un mismo individuo.

El ciclo de temperatura del agua de mar (Tabla XXVI) presentó oscilaciones entre 12,21 °C el mes más frío (marzo 2005) y 25,02°C el mes de agosto, el más cálido.

Tabla XXVI. Temperaturas medias mensuales del agua de mar durante el período de estudio.

	E 2005	F 2005	Mz 2005	A 2005	My 2005	J 2005	JI 2005	Ag 2005	S 2005	O 2005	N 2005	D 2005	E 2006
T(°C)	13,36	12,88	12,21	14,69	17,99	20,14	23,48	25,02	22,42	21,37	17,24	13,83	12,80

El ciclo gonadal de *C. chione* en el litoral catalán concuerda parcialmente con el descrito por Tirado *et al.* (2002) en aguas de Málaga, donde puede reproducirse durante todo el año pero tiene un período principal de puesta en primavera. A diferencia del presente estudio, la emisión de gametos predomina entre febrero y junio, sin producirse puestas abundantes en otoño ni en invierno. Por otro lado, Valli *et al.* (1983-84, 1994) describen puestas en el golfo de Trieste (Italia) únicamente entre marzo y septiembre.



2.1.3. CONCLUSIONES

- El estudio del ciclo biológico ha permitido conocer mejor cual es la biología reproductiva de la lluenta. Además, ello permitirá determinar la mejor época de acondicionamiento de reproductores a la hora de abordar la problemática de su reproducción en hatchery.



2.2. LÍNEA 2. ACONDICIONAMIENTO DE REPRODUCTORES Y OBTENCIÓN DE PUESTAS

2.2.1. MATERIAL Y MÉTODOS

2.2.1.1. Año 2006

En 2006 se iniciaron tareas encaminadas a conocer la adaptabilidad de la especie a las condiciones de laboratorio y sus requerimientos vitales para optimizar las condiciones de mantenimiento en criadero.

Se han llevado a cabo dos experiencias de acondicionamiento de reproductores, en dos épocas diferentes del año, tal y como se describe en la tabla XXVII. En la figura 69 se muestra el circuito de acondicionamiento utilizado.



Fig. 69. Circuito de acondicionamiento de reproductores de C. chione.



Tabla XXVII. Acondicionamientos de reproductores de *C. chione*.

Prueba	Procedencia lote de reproductores	Fecha inicio de acondicionamiento	Duración acondicionamiento	Temperaturas de acondicionamiento
A	Maresme (Cataluña)	07/02/2006	70 días	18°C
B	Maresme (Cataluña)	16/11/2006	55 días	14°C/18°C
C	Maresme (Cataluña)	16/11/2006	27 días	16-19°C

Los acondicionamientos se llevaron a cabo con individuos adultos de *C. Chione*. Los ejemplares procedían del Maresme y fueron capturados a una profundidad de 10 metros. En la prueba A se acondicionaron 110 individuos de longitud media $68,48 \pm 7,58$ mm y peso vivo medio de $84,93 \pm 24,35$ g. En la prueba B se acondicionaron 138 individuos por condición experimental. En la prueba C se acondicionaron 50 individuos. La talla media inicial en la prueba B y C fue $43,8 \pm 0,30$ mm y un peso vivo medio de $21,49 \pm 5,10$ g.

Los acondicionamientos se realizaron en circuito abierto y en bandejas de 20 L, con agua de mar filtrada a $1 \mu\text{m}$. La salinidad se mantuvo a 34‰. En la prueba A la temperatura se mantuvo a $19 \pm 1^\circ \text{C}$. En la prueba B se experimentaron dos regímenes térmicos diferentes, un grupo se mantuvo a 18°C y otro 14°C. Ambos acondicionamientos se llevaron a cabo en las instalaciones del IRTA.

El alimento se suministró mediante bomba peristáltica en continuo las 24h. del día. La ración de alimento diario fue del 0,2% (porcentaje correspondiente al peso orgánico del alimento respecto al peso vivo del individuo), y estuvo constituida por una mezcla microalgal (*Isochrysis galbana* clone T-ISO, *Tetraselmis suecica*, *Chaetoceros calcitrans* y *Phaeodactylum tricornutum*).

La prueba C se realizó en las instalaciones del ICM (CSIC-Barcelona). En esta prueba C, los individuos se mantuvieron con un régimen natural de temperatura que osciló entre 16-19°C. La alimentación consistió en una dieta monoalgal (*Tetraselmis sp.*).



Se realizaron diferentes muestreos para determinar el estado de los reproductores en condiciones de criadero. Se aplicaron diferentes técnicas de diagnóstico patológico, de estado reproductivo y fisiológico, tal y como muestra la tabla XXVIII.

La inducción a la puesta se ha realizado mediante choque térmico, aplicando a los reproductores temperaturas 4°C por encima y por abajo de la temperatura de acondicionamiento.

Tabla XXVIII. Métodos y técnicas aplicadas en cada uno de los acondicionamientos.

Prueba A	RFTM	Histopatología- Histología reproductiva	Microbiología	Fisiología energética
Día 1	X	X		
Día 50	X	X	X	
Prueba B				
Día 1	X	X	X	X
Día 22		X	X	X
Día 42		X	X	X
Día 53		X	X	X
Prueba C				
Día 1	X	X	X	X
Día 27		X	X	X

2.2.1.2. Año 2007

Las líneas iniciales de investigación abordadas en la CC.AA. Cataluña durante 2007 han continuado el estudio de la adaptabilidad de individuos de *Callista chione* procedentes del banco natural del Maresme (Cataluña) a las condiciones de criadero y el



acondicionamiento de reproductores. Asimismo, se han conseguido datos preliminares sobre cultivo larvario.

En las experiencias llevadas a cabo el primer año del proyecto, se detectaron importantes mortalidades de reproductores durante su acondicionamiento en criadero. Los estudios histológicos revelaron la presencia de organismos tipo *Rickettsia* en branquia. Los organismos *Rickettsia-like*, suelen ser de carácter benigno y no suelen incidir en mortalidades masivas de bivalvos. No obstante, su presencia elevada puede interferir en las actividades fisiológicas básicas de las branquias (actividad filtradora y respiratoria). Suponemos que determinadas condiciones de estrés pueden activar la presencia o la indefensión de *C. chione* ante infecciones de este tipo. En todo caso, el mal estado fisiológico de los reproductores impedía el oportuno desarrollo de la gónada, objetivo prioritario de este proyecto.

Se continuaron tareas encaminadas a conocer la adaptabilidad de la especie a las condiciones de laboratorio y sus requerimientos vitales para optimizar las condiciones de mantenimiento en criadero, y evitar situaciones posibles de estrés. Los reproductores procedían de la costa del Maresme (Cataluña).

Se iniciaron dos grupos de experiencias en dos épocas diferentes del año (abril y septiembre), en las que se ha evaluado la temperatura de acondicionamiento, la presencia de substrato arenoso en las bandejas de acondicionamiento, la cantidad de alimento y la calidad microbiológica del agua. En la siguiente tabla XXIX se especifica el diseño experimental empleado en cada una de ellas.



Tabla XXIX. Diseño experimental.

	T ^a	Substrato arenoso	Alimento ofertado*	Filtración del agua a 1µm
Prueba A (abril 07)	18°C	Si	0,10%	Si
	18°C	No	0.10%	Si
Prueba B (sept 07)	15°C	Si	0.07% - A. alto	Si
	15°C	Si	0.04% - A. bajo	Si
	15°C	No	0.07%	Si
	15°C	Si	0.07% aprox.	No - WNF

En la prueba A se acondicionaron 100 individuos de longitud media $46,0 \pm 0,42$ mm y peso vivo medio de $26,61 \pm 6,71$ g, por condición experimental. En la prueba B se acondicionaron 140 individuos por condición experimental de longitud media inicial $45,1 \pm 9,37$ mm y un peso vivo medio de $25,11 \pm 5,23$ g.

Se realizó un control diario del caudal de entrada, temperatura, oferta de alimento e ingestión. Se realizaron diferentes muestreos para determinar el estado de los reproductores en condiciones de criadero: estado fisiológico, reproductivo y patológico.

2.2.1.3. Año 2008

Con el fin de relacionar la capacidad de puesta de *C. Chione* en laboratorio con el estado reproductivo y patológico de estos en el medio natural, se han realizado muestreos en el Maresme (Cataluña) a lo largo del año 2008.

Mensualmente se tomó una muestra de individuos de *C. Chione* de talla comprendida entre 5 y 7cm. 15 individuos se destinaron al estudio del estado de maduración sexual y patológico mediante técnicas histológicas. Aproximadamente otros 30 individuos se llevaron al laboratorio para la aplicación de técnicas de inducción a la puesta.

En la siguiente tabla XXX se especifican las fechas en la que se realizaron los distintos muestreos.



Tabla XXX. Muestreos realizados a lo largo de 2008 de individuos procedentes del medio natural.

Muestra	Longitud (cm)	Peso vivo (g)
29.01.08	4.66±0.18	25.84±4.19
27.02.08	4.72±0.19	26.68±3.59
01.04.08	5.19±0.24	36.39±593
17.04.08	6.07±1.02	67.11±31.31
08.05.08	5.39±0.64	43.76±18.27
01.07.08	5.13±1.02	43.06±24.74
17.07.08	6.32±0.92	64.79±23.77
20.08.08	5.64±0.58	48.93±14.66
07.10.08	5.94±0.90	56.41±23.99
02.12.08	6.42±0.86	65.50±25.97

- Técnicas de inducción a la puesta

En la tabla XXXI se especifica el método de inducción a la puesta empleado cada mes, con un grupo de reproductores tomado directamente del medio natural (uno por mes). Se detallan las condiciones empleadas en cada uno de los casos.



Tabla XXXI. Muestras realizadas a lo largo de 2008 de individuos procedentes del medio natural.

Muestra	Cámara de frío (4°C) en seco	Atemperar en seco (20°C)	Método inducción	Alimento añadido	Inducción						Otros
					Tª agua caliente	Tª agua fría	Nº de ciclos	Tiempo ciclos	Apertura de macho	Respuesta	
Enero	22 h	Si, 1 h	Choque térmico	Si	1°-20°C	12°C	4	1°-45 min	3° ciclo	Negativa	35 ejemplares
					Se sube a 24°C			Resto-30 min			
Febrero	22 h	Si, 1 h	Choque térmico	Si	1°-22°C	14°C	3	Último 60 min, resto 30 min	No	Negativa	2 lotes de 35 ejemplares
					Se sube a 24°C						
Marzo	22 h	Si, 1 h	Choque térmico	No	24°C	14°C	4	Último 60 min, resto 30 min	No	Negativa	Lote 1- 30 ejempl Lote 2- 15 ejempl
Abril	22 h	Si, 1 h	Choque térmico	No	25°C	14°C	3 ½	30 min	No	Negativa	35 ejemplares
Mayo	18 h	Si, 1 h	Choque térmico	No	24°C	14°C	3	30 min	No	Negativa	35 ejemplares
Junio	22 h	Si, 1 h	Choque térmico	No	24°C	14°C	4	30 min	2° ciclo	Negativa	35 ejemplares
Julio	22 h	No	Choque térmico	Si	24°C	14°C	3	30 min	2° ciclo	Negativa	40 ejemplares
Agosto	22 h	No	Choque térmico	Si	24°C	14°C	3	30 min	3° ciclo	Negativa	35 ejemplares
Septiembre	24 h	No	Choque térmico	No	24°C	14°C	3 ½	30 min	No	Negativa	40 ejemplares
Octubre	22 h	Si, 1 h	Se combinan ciclos de agua-seco cada 30 min	No	24°C- Lote 1	14°C- Lote 2	4	30 min	No	Negativa	2 lotes 25 ejemplares
Diciembre	22 h	Si, 1 h	Choque térmico	No	24°C	14°C	4	30 min	3° ciclo	Negativa	35 ejemplares

2.2.2.4. Año 2009

Durante el año 2009 se registró un notable descenso en la talla de captura de *Callista chione*, por lo que resultó prácticamente imposible realizar un seguimiento anual del estado de las poblaciones. Los descensos de capturas provocaron que la administración tomara medidas severas para intentar proteger el recurso; como ejemplo la veda de la pesca en las zonas de mayor producción. Debido a ello los esfuerzos se centraron en el acondicionamiento de reproductores.



Este año se solicitaron ejemplares de una talla superior a los 50 mm, con el fin de asegurarnos que los individuos habían alcanzado la talla adulta. Se acondicionaron dos lotes a lo largo del año, uno a finales de enero (prueba A), y otro en mayo (prueba B).

- **Prueba A**

En esta primera prueba se acondicionaron un total de 100 ejemplares (procedentes del Maresme, fecha 30/01/09) de *C. chione*, de talla superior a 50 mm. Se dispusieron en de la siguiente manera:

- +Bandeja 1: 25 individuos, sin arena
- +Bandeja 2: 25 individuos, con arena (autoclavada)
- +Bandeja 3: 25 individuos, sin arena
- +Bandeja 4: 25 individuos, con arena (autoclavada)

A diferencia de años anteriores las 4 bandejas de acondicionamiento utilizadas fueron de 80 litros (20 litros anteriormente), en las de arena una capa con grosor de unos 10 cm (5 cm otros años), de arena de micraje entre 500 y 1000 micras. Entrada de agua superior, y salida inferior para optimizar la circulación.

Mientras que en acondicionamientos anteriores la temperatura era constante a lo largo de todo el proceso de estabulación, esta vez comenzamos con una temperatura igual a la que se estima en esas fechas en el medio natural, unos 10°C y cada 4-5 días se fue subiendo esta temperatura 1 grado hasta alcanzar los 17-18°C, en los que se iniciaron los ciclos de inducción.

Todos los días se realizó un control de la temperatura y salinidad así como la retirada de ejemplares muertos. Dos veces a la semana se midió el nivel de oxígeno, y una vez a la semana el de nitritos/nitratos.

Las cajas sin arena se limpiaban los lunes, miércoles y viernes, y esos mismos días se sifonaron las que tenían arena. En los casos en los que se vio que la arena estaba muy sucia, se procedió a su limpieza. El caudal fue de una renovación / 2 horas.

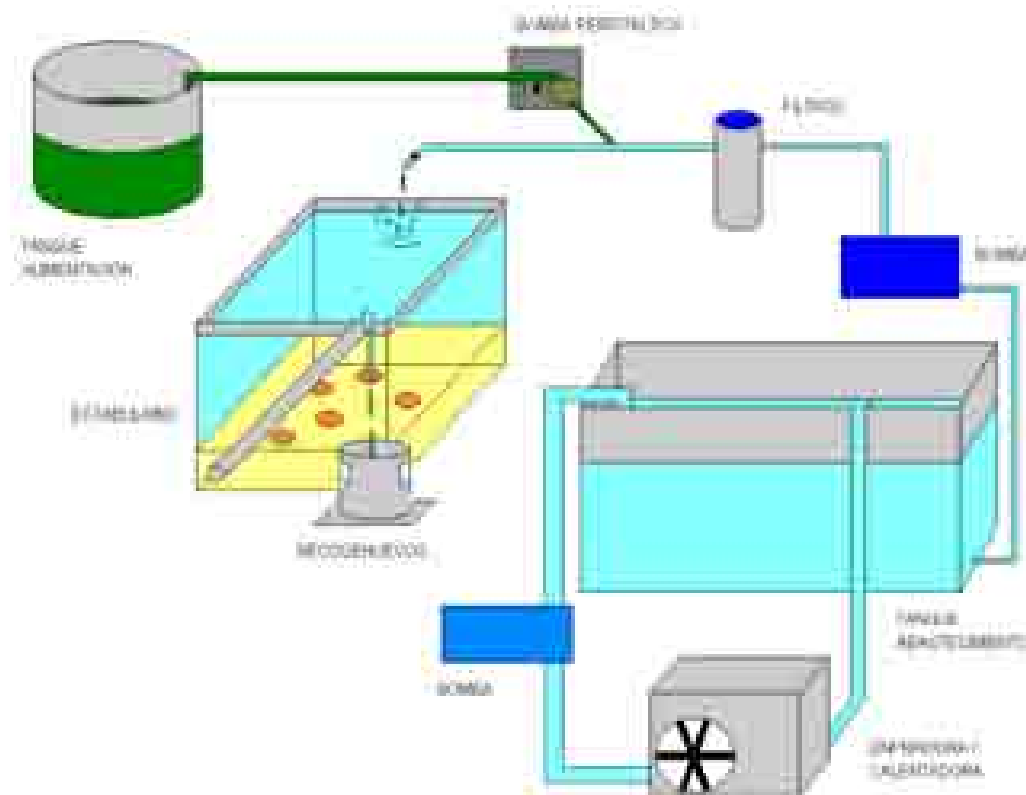


Fig. 70. Esquema del circuito de acondicionamiento de reproductores.

La alimentación en el caso de los reproductores fue del 0,1% del peso seco del alimento (fitoplancton) respecto al peso vivo del individuo. La distribución del peso obtenido, en proporción de las distintas microalgas fue:

- +40% *Chaetoceros*
- +20% *Isochrysis*
- +20% *Tetraselmis*
- +20% *Phaeodactylum*



- **Prueba B**

Un segundo lote de *Callista chione* fue acondicionado en el mes de mayo, también procedentes del Maresme (20/05/09). En este caso 4 bandejas, con una densidad de 50 individuos en cada una (bandejas de 80 litros), de una talla media de unos 40 mm. Las cuatro se dispusieron en las condiciones óptimas, a una temperatura de 16°C, y con un fondo de arena en dos de los casos de grosor de 10 cm, y otras dos sin sustrato, alimentadas por bomba peristáltica en las mismas proporciones a la prueba anterior, al igual que la renovación.

En este segundo lote, además de intentar la puesta de los mismos, se trató de ver si los avances realizados en el acondicionamiento en los años anteriores daban como resultado una optimización de la supervivencia de los reproductores.

2.2.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.2.2.1. Año 2006

En los acondicionamientos se producen importantes episodios de mortalidad, lo que nos hace replantearnos las condiciones de mantenimiento de esta especie en criadero. A continuación describimos de modo resumido los problemas detectados.

- **Prueba A**

El seguimiento histológico del estado reproductivo de *C. chione*, muestra que bajo las condiciones empleadas en este acondicionamiento se produce desarrollo gonadal.

No obstante, tras 20 días de acondicionamiento, comienza a registrarse un importante episodio de mortalidad, que se incrementa conforme avanza el período de acondicionamiento, tal y como se muestra en la tabla XXXII.

El estudio histopatológico nos muestra la presencia de *Rickettsia*-like y esporas de *Nematopsis* sp., en la muestra inicial, si bien a niveles muy bajos. El muestro realizado transcurridos 50 días, evidencia un considerable incremento en la presencia de organismos



Rickettsia-like, ocupando grandes áreas branquiales, y que posiblemente perjudicasen la actividad respiratoria y filtradora de estos organismos.

La técnica RFTM para diagnóstico de *Perkinsus sp.* determina la ausencia de este parásito en los ejemplares. El estudio microbiológico descarta la presencia de agentes bacterianos responsables del episodio de mortalidad.

Los organismos *Rickettsia-like*, suelen ser de carácter benigno y no suelen incidir en mortalidades masivas de bivalvos. No obstante, su presencia elevada puede interferir en las actividades fisiológicas básicas de las branquias (actividad filtradora y respiratoria). Suponemos que determinadas condiciones de estrés pueden activar la presencia o la indefensión de *C. chione* ante infecciones de este tipo.

- **Prueba B y C**

En la prueba B se emplearon 2 temperaturas de acondicionamiento (18°C -14°C), a fin de descartar o señalar a este factor como agente de estrés desencadenante. Igualmente, se mantuvo un grupo de 50 individuos en otro criadero (Prueba C: ICM), con un régimen natural de temperatura del agua. Además de los muestreos histopatológicos y patológicos se realizó un seguimiento de parámetros fisiológicos que nos proporcionará información del estado y comportamiento de los individuos.

Tabla XXXII. Tasa de mortalidad en las distintas pruebas de acondicionamiento.

Prueba A		Prueba B y C			
Día	% Mortalidad	Día	% Mortalidad		
	18°C		18°C	14°C	ICM
0	0	0	0	0	0
50	47	22	7.6	3.6	1
55	70	42	17.08	4.5	-
70	97	53	35.2	8	-



Durante el proceso se registró otro episodio de mortalidad de importancia, acelerado a la temperatura más elevada (18°C: tabla XXXII). Los ejemplares comenzaron por no poder cerrar las valvas, y terminaron muriendo días más tarde.

A continuación se muestran figuras correspondientes a la evolución de las tasas de mortalidad acumulada, tasas de ingestión e Índice de Condición (Tabla XXXII, Fig. 71 y 72).

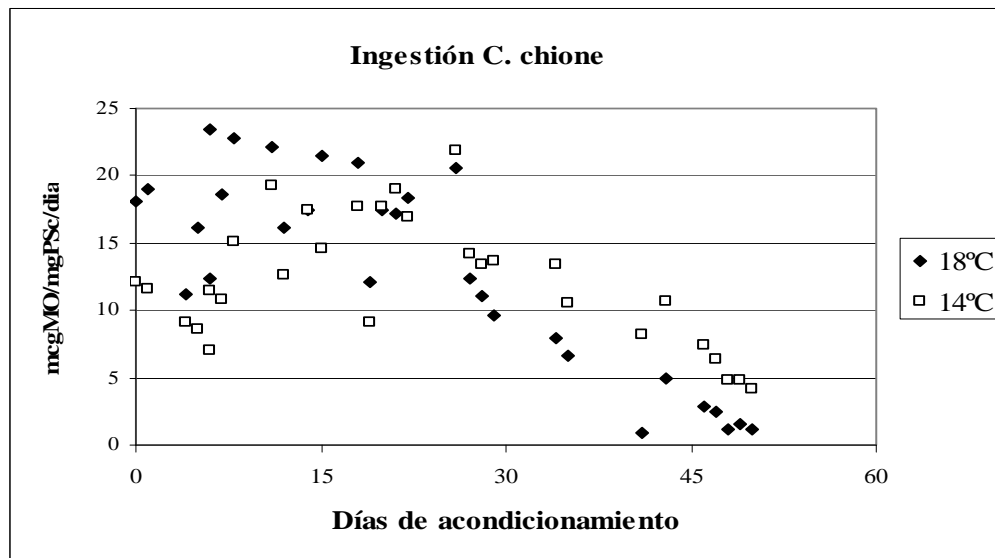


Fig. 71. Evolución de las tasa de ingestión a lo largo de la prueba B de acondicionamiento.

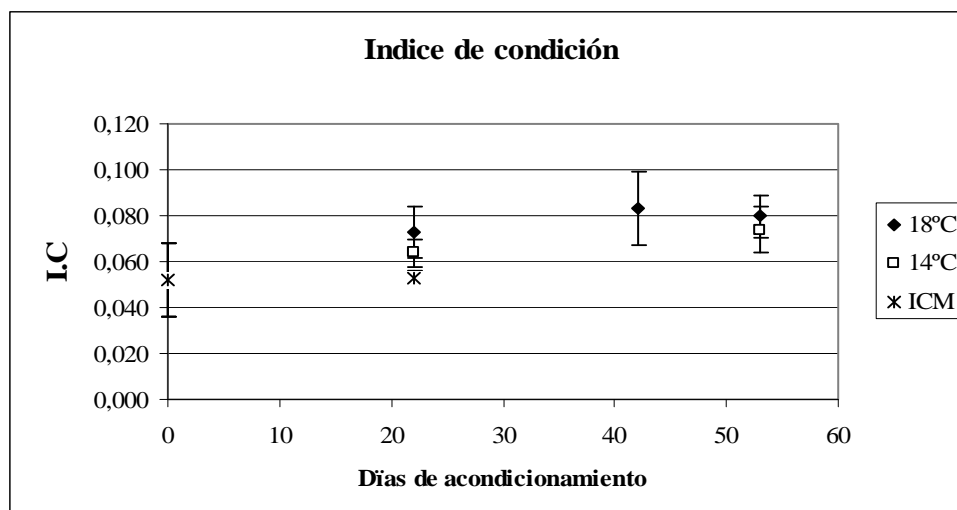


Fig. 72. Evolución del Índice de Condición a lo largo de la prueba B y C de acondicionamiento.



Tal y como podemos observar en la figura 71, la tasa de ingestión se mantiene en torno a los 10-20 mcg de materia orgánica/mg peso seco de la carne/día en los primeros días de acondicionamiento. En ese primer período, además, se evidencia que a 18°C la tasa de ingestión es superior que a 14°C. En torno al día 15, las tasas de ingestión se igualan, para a continuación descender en ambos casos (de modo acelerado a la temperatura más elevada, 18°C), hasta alcanzar niveles mínimos en torno a 1 mcg MO/mg PSc/día a 18°C. Los descensos en la tasa ingestiva están claramente relacionados con el inicio del episodio de mortalidad y la pésima apariencia de los ejemplares en las condiciones experimentales ensayadas (apertura prolongada de valvas).

El Índice de Condición (Fig. 72) aumenta conforme transcurre el ensayo, de modo directamente proporcional a la temperatura ensayada, si bien las diferencias no son estadísticamente significativas ($p > 0.05$) entre tratamientos. Estabilizándose en torno a 0.08, para ambas experiencias (14°C y 18°C), en la fase final del ensayo, y para los individuos que sobreviven al episodio de mortalidad.

Tal y como se comenta en el apartado sobre material y métodos, se recogieron muestras para un posterior estudio sobre el desarrollo gonadal a lo largo de los acondicionamientos.

Habida cuenta la dificultad que entraña el acondicionamiento de esta especie en criadero, la recogida de muestras para un exhaustivo estudio de la composición bioquímica quedó pendiente y pospuesto a 2007 y 2008, una vez se establezcan las condiciones idóneas de acondicionamiento en criadero de esta especie.

Se llevaron a cabo varias experiencias de inducción a la puesta. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla XXXIII.



Tabla XXXIII. Inducción a la puesta en *C. chione*.

Acondicionamiento	Nº inducciones	Nº respuestas +	Nº individuos	Nº ciclos (T ^a)
18°C	1	0	52	3 (14-24°C)
14°C	3	0	51/50/50	3 (10-20°C)

2.2.2.2. Año 2007

- Prueba A

En la prueba A se valoró la influencia de la presencia de sustrato arenoso en el mantenimiento de reproductores de *C. chione*. La experiencia se realizó a 18°C.

- Control de la tasa de ingestión

La tasa de ingestión específica desciende desde unos valores iniciales en torno a los 12 mcgMO/mgPSc/día a unos valores cercanos a 2 mcgMO/mgPSc/día, transcurridos 60 días de permanencia en el circuito de acondicionamiento (Fig. 73). El descenso, a su vez, parece más acusado en el caso de los individuos mantenidos sin sustrato arenoso.

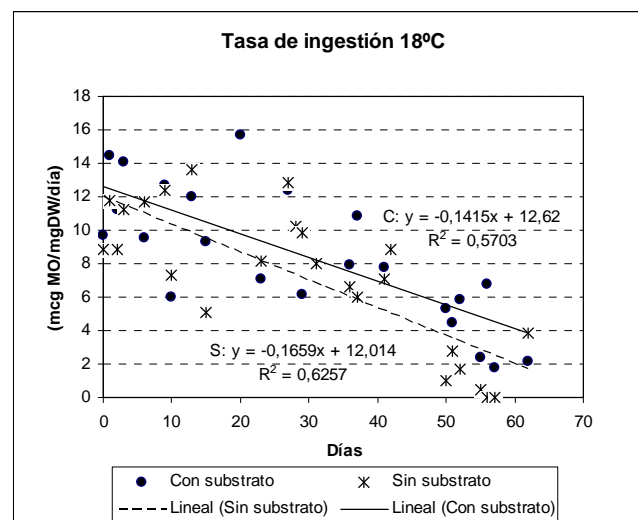


Fig. 73. Variación de la tasa de ingestión específica a lo largo del período de acondicionamiento en la prueba A.



- Determinación del peso seco de un individuo de talla estándar

En la figura 74 está representada la evolución de un individuo de longitud estándar Psc std (4,78cm). Tal y como se observa, el PSc std inicial es de 1.25 ± 0.27 g. Al finalizar la experiencia (65 días más tarde), los individuos mantenidos con substrato presentan un Psc std de 1.56 ± 0.17 g, y los mantenidos sin substrato de 1.41 ± 0.27 g.

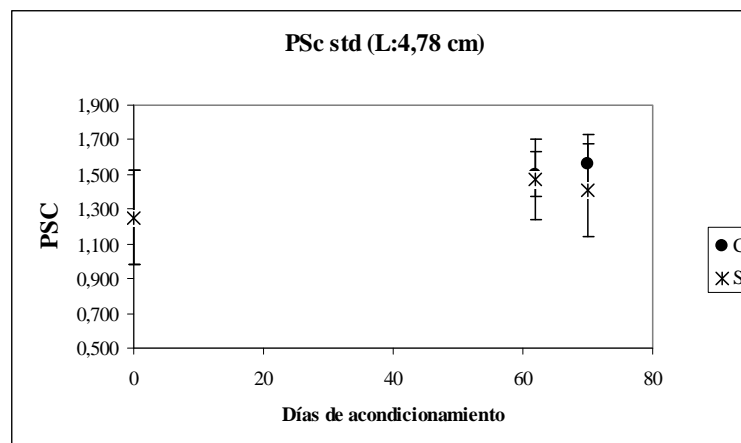


Fig. 74. Evolución del peso seco de un individuo de talla estándar (4,78 cm).

- Determinación del estado de maduración sexual

Los individuos inician la experiencia con la gónada diferenciada y cierto grado de madurez sexual. Al finalizar la misma, es evidente la maduración sexual y signos correspondientes a la emisión de gametos (Fig. 75).

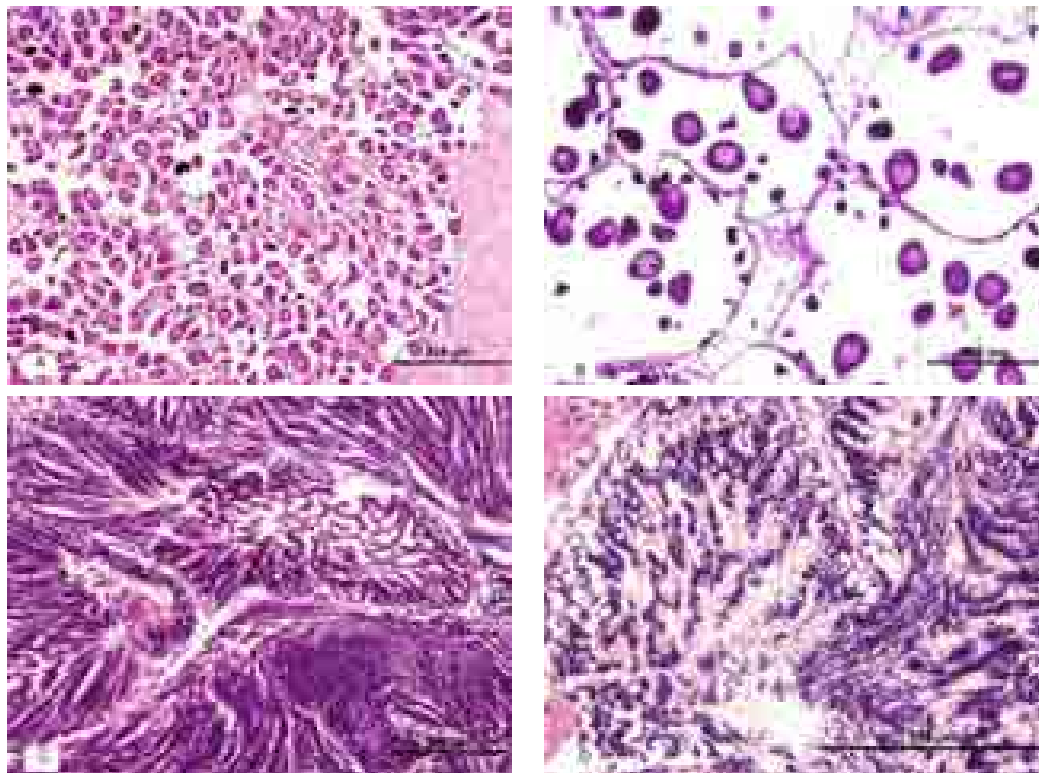


Fig. 75. Gónada de *C. chione* transcurridos 60 días de acondicionamiento (prueba A). A. Gónada ♀ madura. B. Gónada ♀ post-puesta. C y D. Gónada ♂ madura.

- Estudio histopatológico y mortalidad

En las muestras recogidas de branquias vuelve a observarse la presencia de organismos tipo *Rickettsia* (Fig. 76).

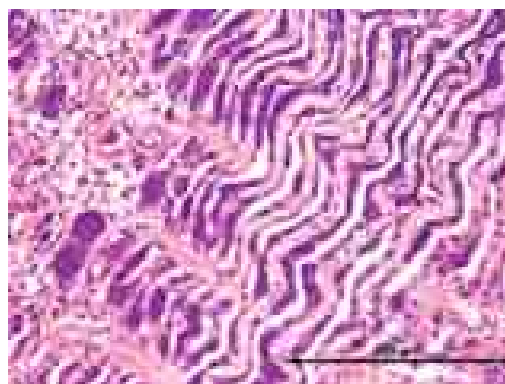


Fig. 76. Presencia de organismos tipo *Rickettsia* en branquia de *C. chione*, transcurridos 60 días de acondicionamiento (prueba A).



Tal y como se aprecia en la figura 77, en el caso de los individuos mantenidos sin substrato arenoso, transcurridos 60 días, el 50% de individuos muere, mientras que, en presencia de substrato arenoso la mortalidad no llega a alcanzar el 20% de los individuos.

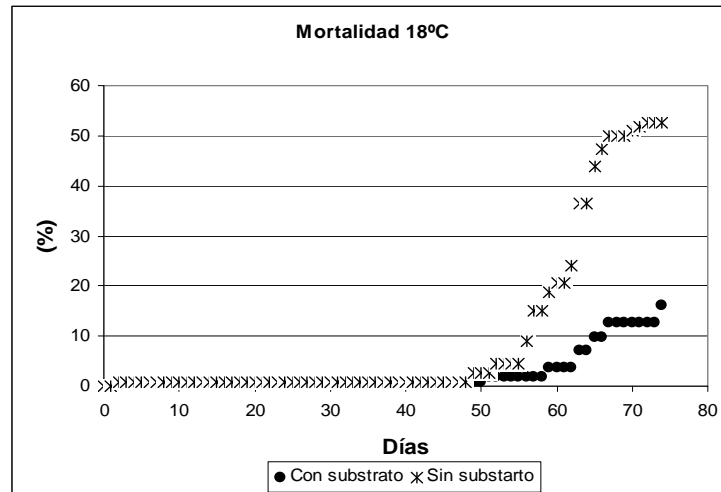


Fig. 77. Registro de la mortalidad acumulada (%) durante la prueba A.

- **Prueba B**

En la prueba B se valoró conjuntamente la influencia de la presencia de substrato arenoso en el mantenimiento de reproductores de *C. chione*, y el acondicionamiento de los reproductores a temperaturas bajas, 15°C. Asimismo, se evaluaron los efectos de la disponibilidad de alimento, así como, los efectos del suministro de agua sin filtrar (tan solo filtrada a 50µm) en el estado de los reproductores.

- Control de la tasa de ingestión

En la figura 78 aparece representado el comportamiento de las tasas de ingestión específicas (Tie) a lo largo de la prueba B, y correspondientes a las experiencias desarrolladas a 15°C, con substrato arenoso, y en las que se evaluó el efecto de la cantidad de alimento. Se observa una relación directa entre la tasa de ingestión específica y la ración de alimento ofertado. Con la ración de alimento alto (0.07%) la Tie se mantiene estable en



torno a los 10 mcgMO/mgDW/día, mientras que con la ración baja de alimento (0.04%), ésta parece incrementarse conforme avanza la prueba.

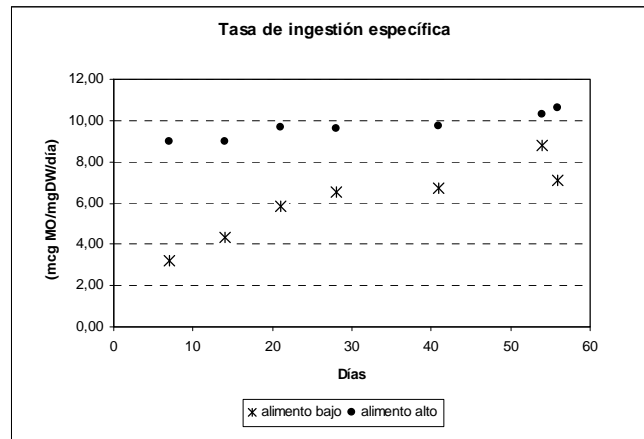


Fig. 78. Variación de la tasa de ingestión específica a lo largo del período de acondicionamiento en la prueba A.

- Determinación del peso seco de un individuo de talla estándar

En la figura 79 se presenta la evolución del peso seco de un individuo de talla estándar (45.13mm) a lo largo de la prueba B, y para cada una de las condiciones experimentales.

El incremento del peso seco es directamente proporcional a la cantidad de alimento ofertado. Ante situaciones de igual oferta alimenticia, los individuos mantenidos con substrato arenoso presentan valores más altos de Psc std que los mantenidos sin la presencia de substrato arenoso.

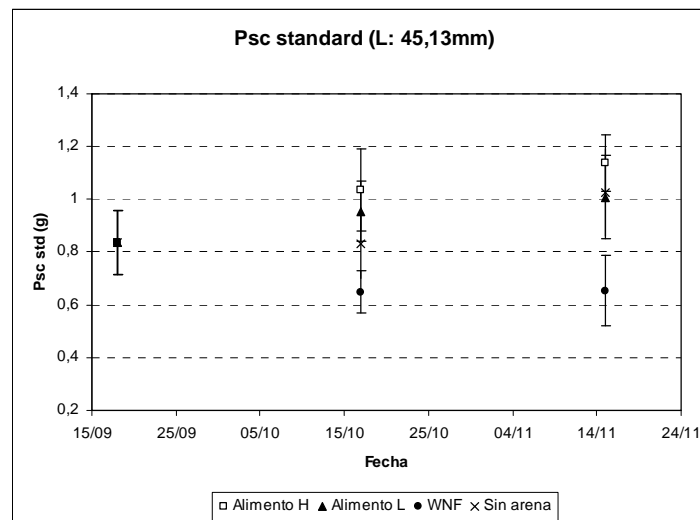


Fig. 79. Variación del PSc estándar a lo largo de la prueba B.

- Determinación del estado de maduración sexual

Se han recogido muestras de gónada para su estudio histológico en muestreos realizados los días 0, 30 y 56 de acondicionamiento.

- Estudio histopatológico y mortalidad

Se han recogido muestras de branquias para su estudio histológico en muestreos realizados los días 0, 30 y 56 de acondicionamiento.

En general, en esta prueba se detectan índices de mortalidad sensiblemente inferiores a los detectados en pruebas anteriores, posiblemente debido al empleo de temperaturas más bajas de acondicionamiento. Inicialmente, se registra un repunte coincidente con el período de aclimatación a las instalaciones. Posteriormente, se observa una mayor mortalidad en el caso de la condición experimental sin substrato arenoso (Fig. 80).

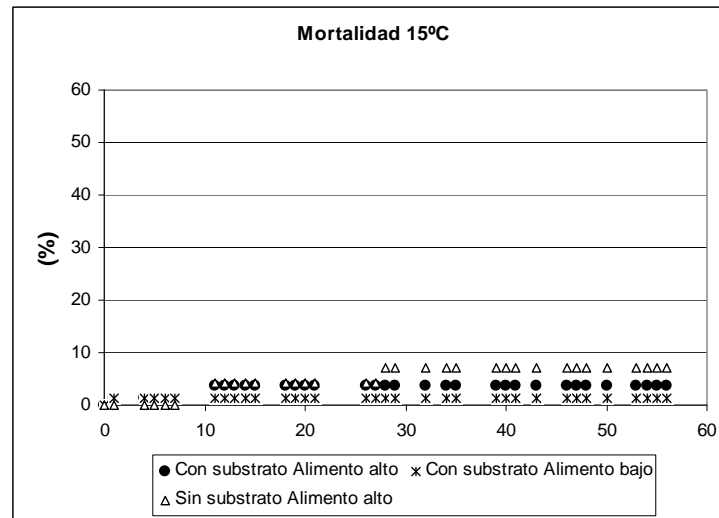


Fig. 80. Registro de la mortalidad acumulada (%) durante la prueba B.

2.2.2.3. Año 2008

En la tabla XXXIII se describen los resultados obtenidos con las técnicas empleadas. Como se puede apreciar, en ningún caso y con ninguna de las variantes de la técnica de choque térmico, se obtuvo respuesta positiva, independientemente del mes de año, y por lo tanto, del grado de maduración sexual de los individuos.

2.2.2.4. Año 2009

- **Prueba A**

Los individuos recibidos para su acondicionamiento tenían una talla media de $68,98 \pm 10,42$ mm, y un peso vivo de $79,891 \pm 22,573$ g. La evolución de los 4 lotes se muestra en la tabla XXXIV.



Tabla XXXIV. Condiciones de diferentes lotes y evolución.

	Bandeja 1 (sin arena) 24 individuos	Bandeja 2 (con arena) 25 individuos	Bandeja 3 (sin arena) 25 individuos	Bandeja 4 (con arena) 24 individuos
Muertas previa inducción	8	1	7	5
Muertas después de inducción (24 horas)	18	1	12	6
Muertas después de inducción (7 días)	24	3	18	10

Se aprecia que la influencia de la arena resulta determinante en la supervivencia de los reproductores. Tras las inducciones, esa relevancia es más marcada debido al debilitamiento de los individuos, lo que conlleva períodos más largos de apertura de valvas en los casos en los que no tienen arena, y por lo tanto, una mayor exposición a posibles patógenos (ver tabla XXXIV).

- **Prueba B**

El lote acondicionado presentó una talla media inicial de $40,01 \pm 3,04$ mm, y un peso vivo de $16,650 \pm 3,588$ g.

Comprobamos que con ejemplares de talla más pequeña, la mortalidad en ambos casos se reduce bastante, y en el caso de los ejemplares acondicionados en arena es prácticamente inexistente en los 4 primeros meses (ver tabla XXXV).



Tabla XXXV. Condiciones de diferentes lotes y evolución.

	Bandeja 1 (sin arena)	Bandeja 2 (con arena)	Bandeja 3 (con arena)	Bandeja 4 (sin arena)
Mortalidad 1° mes (0-15)	1	0	0	0
Mortalidad 1° mes (15-30)	0	0	0	0
Mortalidad 2° mes (0-15)	0	0	0	0
Mortalidad 2° mes (15-30)	2	3	0	13
Mortalidad 3° mes (0-15)	15	1	1	11
Mortalidad 3° mes (15-30)	6	0	0	4
Mortalidad 4° mes (0-15)	0	0	0	1
Mortalidad 4° mes (15-30)	0	1	0	1

2.2.3. CONCLUSIONES

- Las pruebas realizadas han venido a confirmar lo detectado en la línea 1. Los reproductores maduran mejor bajo unas condiciones de bajas temperaturas y raciones, en un entorno de sustrato arenoso grueso, justamente lo mismo a lo observado en el medio natural. De todos esos factores, la temperatura parece ser el factor más determinante.



2.3. LÍNEA 3. CULTIVO LARVARIO Y POSTLARVARIO

2.3.1. MATERIAL Y MÉTODOS

2.3.1.1. Año 2007

Se realizaron diversos intentos de puesta con individuos acondicionados en laboratorio, con diferentes protocolos de shock térmico, siendo el resultado negativo en todos los casos.

Se produjo una puesta espontánea de individuos maduros procedentes del medio natural.

El cultivo larvario se realizó en tanque de 500 L a densidad inferior a 1 larva/ml. Cada dos días se limpiaba el tanque, se suministraba antibiótico (eritromicina) y se aprovechaba para suministrar el alimento. La primera semana de cultivo se suministró únicamente *Isochrysis galbana* clone T-ISO, a concentraciones que oscilaron entre las 75.000 – 100.000 cels/ml. A partir de la segunda semana se suministró una mezcla microalgal compuesta por: *Isochrysis galbana* clone T-ISO, *Tetraselmis suecica*, *Chaetoceros calcitrans* y *Phaeodactylum tricorutum*. La temperatura de cultivo fue de $19 \pm 1^\circ\text{C}$.

Cuando la morfología larvaria indicó la aproximación del período de fijación y metamorfosis, las larvas fueron transferidas a cubiletes con fondo de malla provistos de air-lift. A partir del mes de cultivo, se incorporó al cubilete un lecho de arena para favorecer los procesos de fijación y metamorfosis.

Durante el primer mes de desarrollo larvario, se realizaron muestreos cada dos días. A partir del mes se realizaron muestreos mensuales. En los muestreos se contabilizó la supervivencia larvaria y se determinó la longitud media (eje antero-posterior), mediante gráticula adaptada al ocular de un microscopio Olympus BH-2.



2.3.1.2. Año 2008. Cultivo postlarvario y de semilla

En esta fase de estudio se intentó obtener información sobre el crecimiento de la semilla de *C. chione*.

Larvas de 25 días se colectaron y se pusieron en cilindros con base de malla de nylon (con air-lift), provistos de arena para facilitar la metamorfosis y la fijación, y solventar un episodio de elevada mortalidad registrado entre los días 21-25. Los cilindros se colocaron en un tanque de 450 L de capacidad. Postlarvas y semillas se alimentaron con una dieta multiespecífica (*I. galbana clone T-ISO*, *Tetraselmis suecica*, *Chaetoceros calcitrans*). Las microalgas se suministraron cada 2 días en cada renovación de agua del tanque, a una concentración de 75 células/ μL .

Se tomaron muestras los días 54, 77 y 194 para evitar problemas derivados del manejo, y se midió al azar la longitud individual de 50 individuos. A partir del día 259 hasta el día 376, las muestras se llevaron a cabo mensualmente, tomándose además la altura (H) y el peso vivo (W). Estos datos se usaron para establecer relaciones morfométricas para tallas comprendidas entre 2 y 10 mm.

Las muestras de 50 larvas se observaron a microscopio (Leyca DMI 3000B) provisto de una grátula para su medición. El número de larvas se calculó contando al menos 3 alícuotas de 1 mL en una cámara Sedgewick-Rafter.

Cuando la longitud excedió las 300 μm , las medidas se realizaron en una lupa Nikon SMZ800, y cuando excedió los 6 mm las medidas se realizaron utilizando pie de rey.

2.3.1.2.1. Análisis de datos

La tasa absoluta de crecimiento (AGR; $\mu\text{m} \pm \text{S.D. day}^{-1}$) se estimó de acuerdo con la expresión $\text{AGR} = \{(L_t - L_{t_0}) / (t - t_0)\}$, donde L_t = longitud a tiempo t y L_{t_0} = longitud a



tiempo t_0 (muestreo previo). La tasa relativa instantánea de crecimiento (k), se calculó usando la ecuación $k = (\ln L_t - \ln L_{t_0})/t$, siendo $K = 100k$ (Walne, 1963).

El crecimiento en longitud a lo largo del tiempo se expresó mediante una regresión lineal. La estimación de las relaciones morfométricas entre altura (H) y longitud (L) se realizó mediante ajuste de una función lineal a los datos: $\log H = \log a + b \log L$, donde a = ordenada en origen (coeficiente inicial de crecimiento) y b = pendiente (tasa de crecimiento relativa de las variables). Se aplicó un t-Test ($H_0: b=1$) para un nivel de confianza del 95% ($\alpha = 0.05$) (Sokal y Rohlf 1986) con el fin de determinar la inclusión de los datos en un rango isométrico ($b=1$) o alométrico (alometría negativa: $b<1$ o positiva: $b>1$), de acuerdo con Gaspar *et al.* (2002) y Leontarakis y Richardson (2005). La relación morfométrica entre peso (W) y longitud (L) se estableció mediante una ecuación potencial: $W = aL^b$.

2.3.1.3. Año 2009

Durante este año se propuso aplicar las condiciones óptimas registradas en años anteriores, con la finalidad de obtener puestas viables de lluenta.

2.3.1.3.1. Prueba A (31/01/09)

2.3.1.3.1.1. Inducción

Antes de iniciar los choques térmicos, las lluentas se sacaban al seco durante una hora aproximadamente.

1. Se iniciaba el shock térmico a temperatura fría (12°C o menos) durante 30-45 minutos.
2. Se pasaban los reproductores al tanque de agua caliente (22°C) durante el mismo período. Se suministraba una pequeña cantidad de microalgas para estimular la filtración en los individuos.
3. Si no se obtenían resultados, se comenzaba nuevamente el ciclo con la temperatura baja (12°C), 30-45 min.
4. Nuevamente se pasaban a temperatura cálida (22°C). En este período se le añadía serotonina 4M a un macho para provocarle la puesta y así estimular al resto.



Se probaron diferentes variables en caso de ver que los reproductores estaban maduros y no se obtenía respuesta. Una de esas posibilidades fue meter los individuos en una bandeja con un trapo húmedo en la cámara de frío la noche anterior.

2.3.1.3.1.2. Fertilización e incubación (primeras 48 horas)

Tanto la fertilización como la incubación se realizaron en tanques de 300 litros, dejándolos durante 48 horas en agua cruda esterilizada con UVA y control de la temperatura (20-22°C).

2.3.1.3.2. Prueba B (20/05/09)

2.3.1.3.2.1. Inducción, fertilización e incubación

Las inducciones que se realizaron siguieron la misma pauta a la prueba A, pero en esta ocasión se añadía a todos los individuos una inyección de serotonina 4 M de 0,1 ml en la base del pie, y la puesta se realizaba en tanque de fondo plano de 400 litros, que se mantenía con el agua original durante 48 horas a 20-22°C.

2.3.1.3.3. Prueba C (20/10/09)

Se realizó un estudio a escala de laboratorio de la biología larvaria de la especie, para lo que se emplearon placas NUNC de 96 pocillos.

Se dejó de alimentar los reproductores 2 días antes de la inducción a la puesta. El 20/10/09, una hora antes de la inducción, se pusieron en seco (en total 40 individuos acondicionados desde mayo). Se realizaron 3 pruebas, la primera de crecimiento, y la segunda y tercera de supervivencia larvaria con diferentes dietas.



2.3.1.3.3.1. Prueba C.1

1. Inducción, con estrés térmico (12°C frío, 22°C caliente) e inyectándoles en el pie serotonina 4 M (0,2 ml/individuo).
2. Se miden 50 ovocitos y se pone la puesta tras fecundación, y pasados por un tamiz de 100 micras para retirar porquería, en un tanque de 300 litros con agua pasada por filtros y UVA, y suave aireación (sala a 21°C, temperatura del tanque 18°C).
3. Se miden 50 trocóforas a las 24 horas (no se toca el tanque).
4. A las 72 horas se baja el tanque y se concentran en 500 ml con agua esterilizada (tan sólo hay unas 5.000 larvas). Se miden 50 larvas, ya son D la mayoría y se disponen 720 larvas en las cajetillas, 3 larvas por cubeta (con la ayuda de una micropipeta se seleccionan una a una). En total hay 48 cubetas por placa (cubetas de 300 microlitos, lo que equivaldría a unas 10 larvas/ml), por lo que se completan 5 placas en total, para 144 larvas por placa.
5. Se añade *Iso* a 100.000 cel/ml (de cámara). Las cajetillas se mantienen en una cámara isoterma, a 19°C, y con un fotoperíodo de 16:8 (luz:oscuridad)
6. Se realizan muestreos los días 7, 11, 13, 20 y 25. Se muestrean 10 larvas por cajetilla al azar, para un total de 50 larvas (mediante fotografía microscópica en vivo).
7. Semanalmente se retiran las larvas de cada cubetilla y se disponen en una nueva con el fito (respetando las que quedan vivas en cada cubeta, en las nuevas cajetillas).
8. A partir del día 7 mezcla de fito, 50% *Iso*, 40% *Chaeto* y 10% *Phaeo* (también 100.000 cels equivalentes *Iso*/ml). En caso de ver disminución de la cantidad de alimento se le añadía más. Esto no sucedió prácticamente en ningún caso, más bien el fito tendía a reproducirse y a aumentar algo la densidad.
9. El día 25 con la aparición de las primeras pediveliger se individualizan las larvas en una cubetilla cada una. En total 240 larvas, para un total de 5 placas.
10. Se realizan muestreos los días 27, 30, 34, 40, 48, 53 y 55. Se muestrean también 10 larvas por cajetilla para un total de 50 larvas (mediante fotografía microscópica en vivo).



11. Semanalmente se traspasan a cajetillas nuevas con nueva agua y fitoplancton. A lo largo de la semana, en caso de ver una disminución de la cantidad de alimento, se les añadía intentando ajustar aproximadamente la densidad (densidad fito 150.000 cel equivalentes *Iso*/ml). Mezcla de fito, 50% *Iso*, 40% *Chaeto*, 10% *Phaeo*. En este caso, las que más se desarrollaban sí que requirieron más alimento, las otras no.

El día 55 es el último día de muestreo ya que es en el último en el que hay muestras suficientes para recoger datos.

2.3.1.3.3.2. Prueba C.2.1

1. Inducción, con estrés térmico (12°C frío, 22°C caliente) e inyectándoles en el pie serotonina 4 M (0,2 ml/individuo).
2. Se miden 50 ovocitos y se pone la puesta tras fecundación, y pasados por un tamiz de 100 micras para retirar porquería, en un tanque de 300 litros con agua pasada por filtros y UVA, y suave aireación (sala a 21°C, temperatura del tanque 18°C).
3. Se miden 50 trocóforas a las 24 horas (no se toca el tanque).
4. A las 72 horas se baja el tanque y se concentran en 500 ml con agua esterilizada.
5. Se disponen 5 larvas por cubeta (con la ayuda de una micropipeta se seleccionan una a una). En total hay 24 cubetas por placa (cubetas de 300 microlitos, lo que equivaldría a unas 15 larvas/ml), complementándose 5 placas en total, para 120 larvas por placa. Se añade *Iso* a 100.000 cel/ml (de cámara).
6. Las cajetillas se mantienen en una cámara isoterma, a 19°C, y con un fotoperíodo de 16:8 (luz:oscuridad).
7. Semanalmente se retiran las larvas de cada cubetilla y se disponen en una nueva con el fito (respetando las que quedan vivas en cada cubeta, en las nuevas cajetillas).
8. Se muestrea casi a diario, contabilizando el número de vivas y muertas por pocillo y placa.



2.3.1.3.3.3. Prueba C.2.2

Los primeros 4 puntos son los mismos que en la prueba C.2.1.

5. En este caso se preparan dos placas por cada densidad y dieta. En total 3 densidades y 3 dietas, lo que da un total de 9 condiciones diferentes (y cada una dos placas).
6. Cada placa con 48 pocillos inoculados. Las tres dietas son:
 - 1) Nada
 - 2) *Isochrysis galbana*
 - 3) *Chaetoceros sp.*

(En estas dos últimas densidad de 100.000 cel equivalentes *Isochrysis* / ml).

Las tres densidades son:

- a) 3-4 larvas/pocillo (10 larvas/ml)
 - b) 6-8 larvas/pocillo (20 larvas/ml)
 - c) 13-14 larvas/pocillo (40 larvas/ml)
7. Las cajetillas se mantienen en una cámara isoterma, a 19°C, y con un fotoperíodo de 16:8 (luz:oscuridad).
 8. Se muestrea a diario, contabilizando el número de vivas y muertas por pocillo y placa.
 9. El cultivo se prolonga durante una semana (larvas de 10 días).

2.3.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.3.2.1. Año 2007

Con fecha del 01 de junio de 2007 se produjo una puesta espontánea de individuos maduros procedentes del medio natural (capturados en el Maresme el 29/05/07). El desove se produjo en tanque de 500L. Transcurridas 48 h se contabilizaron 389.000 larvas D.

En la figura 81, aparecen representados datos correspondientes al crecimiento en longitud (μm) y datos de supervivencia. En la figura 82 se aprecia la evolución de la distribución de frecuencias (%) de tallas de las larvas, a lo largo del período de cultivo.

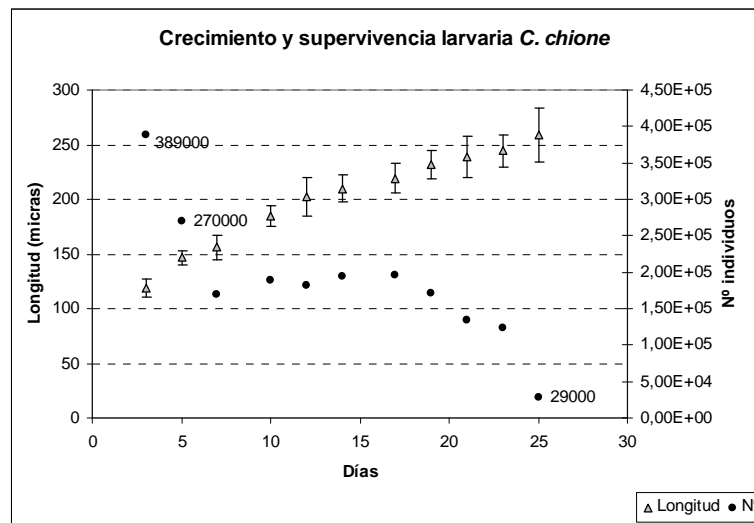


Fig. 81. Crecimiento larvario de *C. chione* de puesta obtenida en laboratorio.

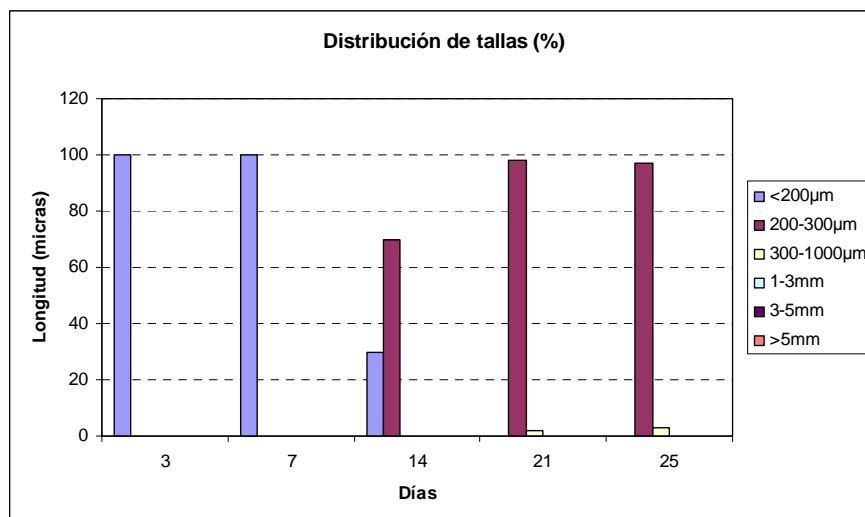


Fig. 82. Evolución de la distribución de frecuencias de tallas (% μm) a lo largo del período de cultivo.

El rendimiento larvario fue positivo los 20 primeros días de cultivo, oscilando entre el 70% (6 días) y el 44% (20 días). A partir de ese momento, se registró una significativa mortalidad larvaria (tasas de mortalidad de un 76.6% en dos días), coincidiendo con la probable fase de fijación y metamorfosis. En la figura 83, se presentan fotos correspondientes al desarrollo larvario en laboratorio.

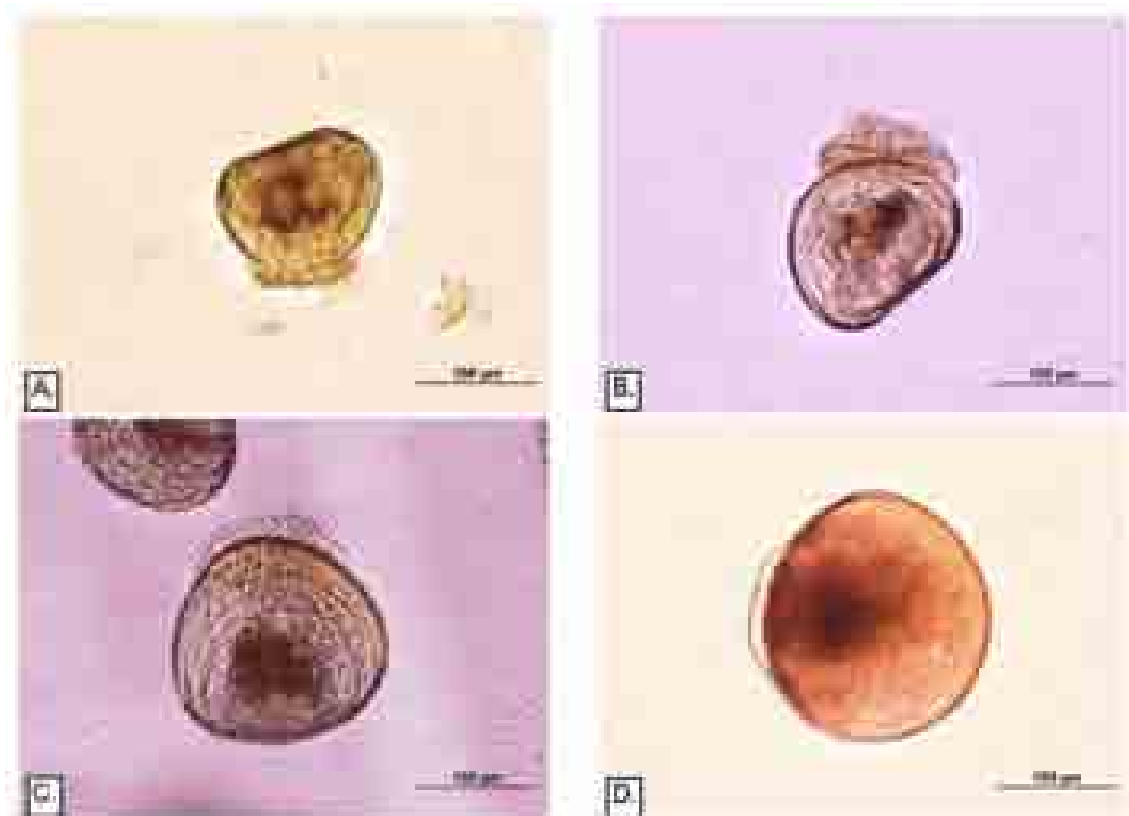


Fig. 83. Desarrollo larvario de *C. chione* en laboratorio. A. y B. Larvas veliger, días 5 y 7. C. Larva umbonada, día 10. D. Larva día 14.

2.3.2.2. Año 2008

El 1 de junio de 2007 (talla de los reproductores: 4.70 ± 0.35 mm) se produjo una puesta espontánea.

La figura 84 muestra un juvenil de seis meses de edad de 3.56 mm de longitud, donde se aprecia el borde del manto y los sifones. La figura 85 muestra el crecimiento de las larvas y semilla a lo largo del tiempo.

La longitud media de la semilla de 54 días fue de 0.40 ± 0.15 mm y alcanzó 6.51 ± 1.38 mm al final de la experiencia (376 días). Los valores de las tasas AGR y K para ese período fueron 0.02 y 0.86 mm.día⁻¹, respectivamente. El crecimiento de la semilla en longitud se describe con la ecuación lineal $L = -0.652 + 0.019t$, $r^2 = 0.99$ ($p = 0.00$), donde L se expresa en mm y t en días.

Se establecieron diferentes relaciones biométricas para el rango de talla comprendido entre 2 y 10 mm de longitud. Las relaciones entre longitud (L) y altura (H) se expresan según la ecuación $\log H = 0.044 + 0.822 \log L$ ($r^2 = 0.968$; $p = 0.00$). La relación entre longitud (L) y peso vivo (W) se expresó mediante la ecuación $W = 0.414L^{2.754}$ ($r^2 = 0.982$; $p = 0.00$) (Fig. 88).

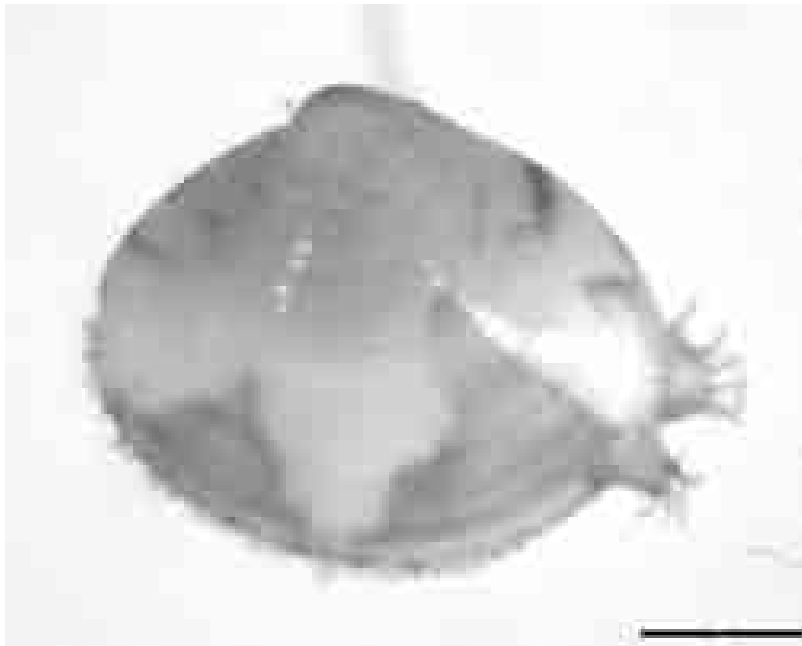


Fig. 84. *Callista chione*. Semilla de seis meses, 3.56 mm en longitud. Se observa sifones y borde del manto. Barra de escala = 1 mm.

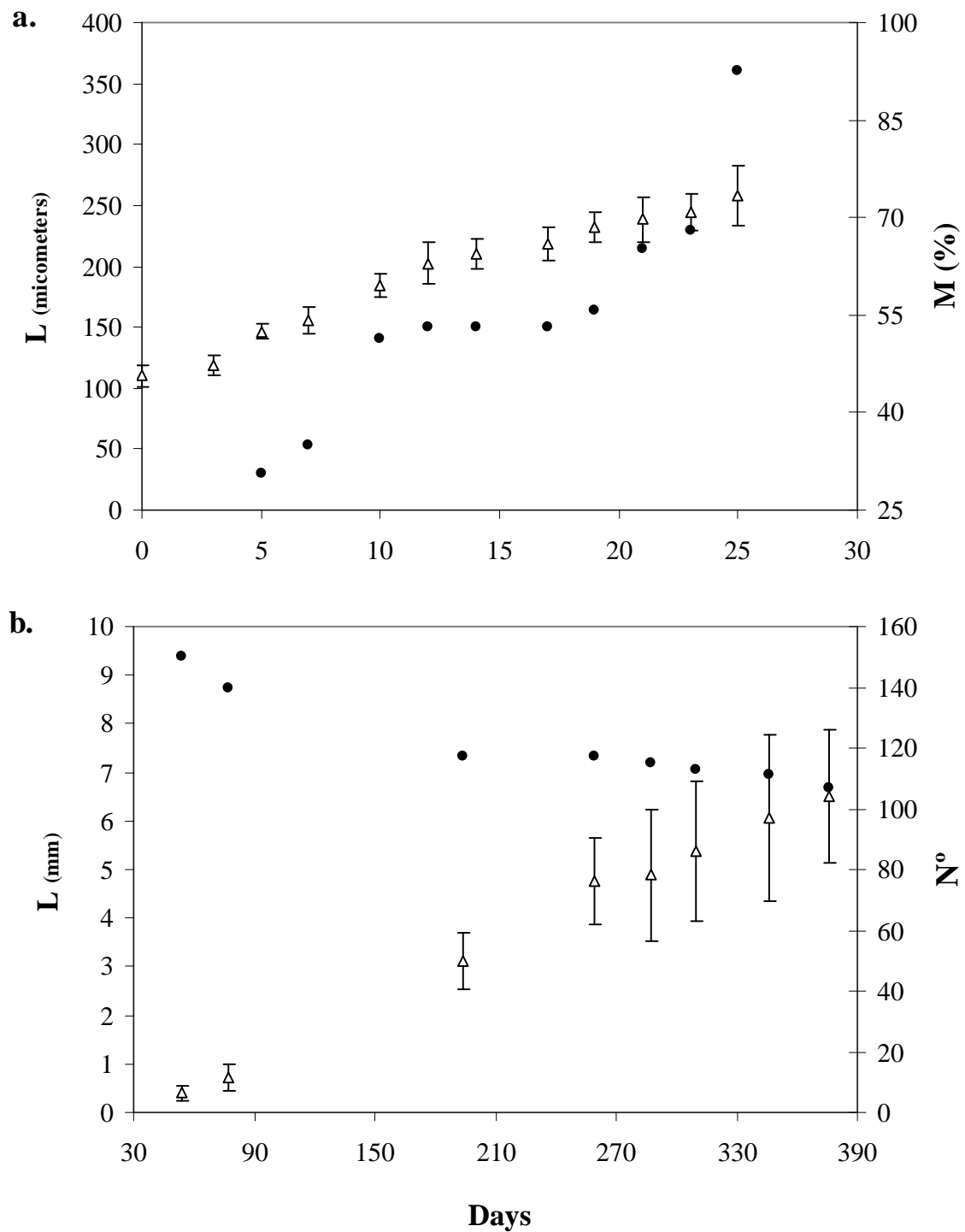


Fig. 85. Crecimiento y supervivencia de *Callista chione*. a. Evolución de la longitud en larvas (L; μm) y mortalidad (M; %). b. Evolución de la longitud en semilla (L; mm) y número de individuos (N). Media \pm S.D. Longitud (Δ); mortalidad y número de individuos (\bullet).

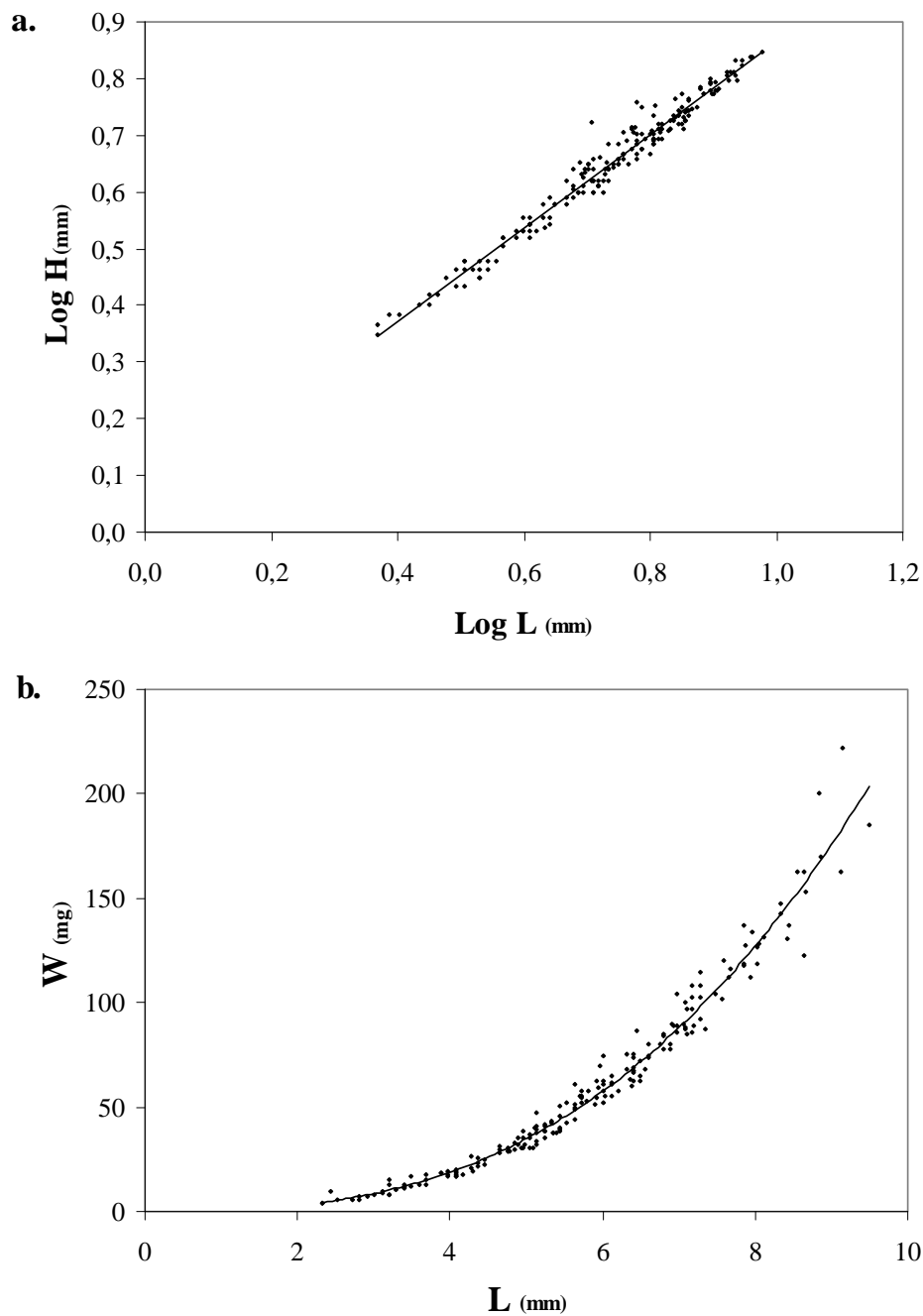


Fig. 86. Relaciones morfométricas de la semilla de Callista chione. a. Relación entre longitud (L) y altura (H). Ecuación de regresión: $\log H = 0.044 + 0.8219 \log L$ ($r^2 = 0.968$; $p = 0.00$). b. Relación entre longitud (L) y peso (W). Ecuación de regresión: $W = 0.414L^2.754$ ($r^2 = 0.982$; $p = 0.00$).



2.3.2.3. Año 2009

Tanto en la prueba A como en la B las puestas no superaron la semana de vida. En la prueba C aunque se obtuvieron postlarvas, la experiencia se dio por finalizada al día de cultivo 55 en el caso de la C.1, en el día 25 en el caso de C.2.1 y en el día 10 en el de C.2.2.

2.3.2.3.1. Prueba A

Se realizaron un total de 4 inducciones, de las cuales en sólo tres casos se obtuvo respuesta positiva (tabla XXXVI).

Tabla XXXVI. Puestas de la prueba A, y su talla a las 72 horas y 120 horas.

	Tanque 1 (sin arena) (26/03/09)	Tanque 2 (con arena) (01/04/09)	Tanque 3 (sin arena) (08/04/09)	Tanque 4 (con arena) (15/04/09)
Nº larvas (72 horas)	9.900	202.000	-	50.000
Talla media (µm)	89,1 ± 10,14	100 ± 9,87	-	103,4 ± 11,27
Nº larvas (120 horas)	-	-	-	5.000
Talla media (µm)	-	-	-	146,4 ± 15,49

La puesta 4 fue la que más duró, pero transcurridos 7 días la supervivencia fue nula.

2.3.2.3.2. Prueba B

Se realizaron varias inducciones durante todo el proceso de acondicionamiento, en los que tan sólo se registró algún intento de puesta por parte de machos. En este caso la talla de los reproductores de apenas 40 mm-s, pudo resultar determinante a la hora de la maduración de los reproductores.

2.3.2.3.3. Prueba C

2.3.2.3.3.1. Prueba C.1

Se siguió el crecimiento larvario y postlarvario de los individuos y, como se aprecia en la figura 87, se registraron dos períodos de crecimiento más intenso, tras la aparición de las primeras larvas D, y justo antes de la fase de fijación. Una vez superada ésta el crecimiento resultó más constante y tendido. Se observa en la figura 20 la evolución del crecimiento durante los 55 días de cultivo.

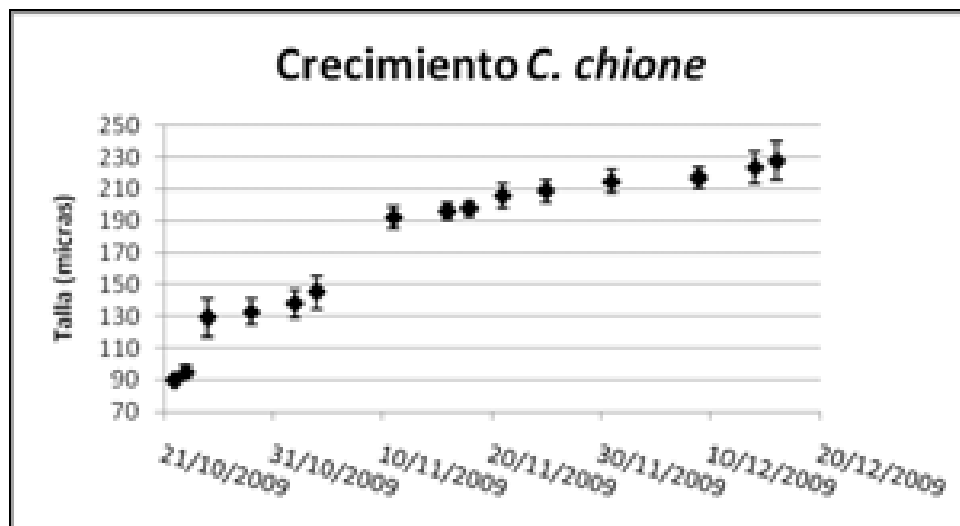


Fig. 87. Crecimiento de *C. chione* en placa. Mediciones en micras.

2.3.2.3.3.2. Prueba C.2.1

En este caso se observó durante el ciclo larvario que la mayor mortalidad se da durante la primera semana de cultivo. Luego se estabiliza hasta la fijación y metamorfosis. De las 5 placas que se inocularon, todas siguieron el mismo patrón, si bien la placa 1 mostró tasas de supervivencia más altas (Fig. 88).

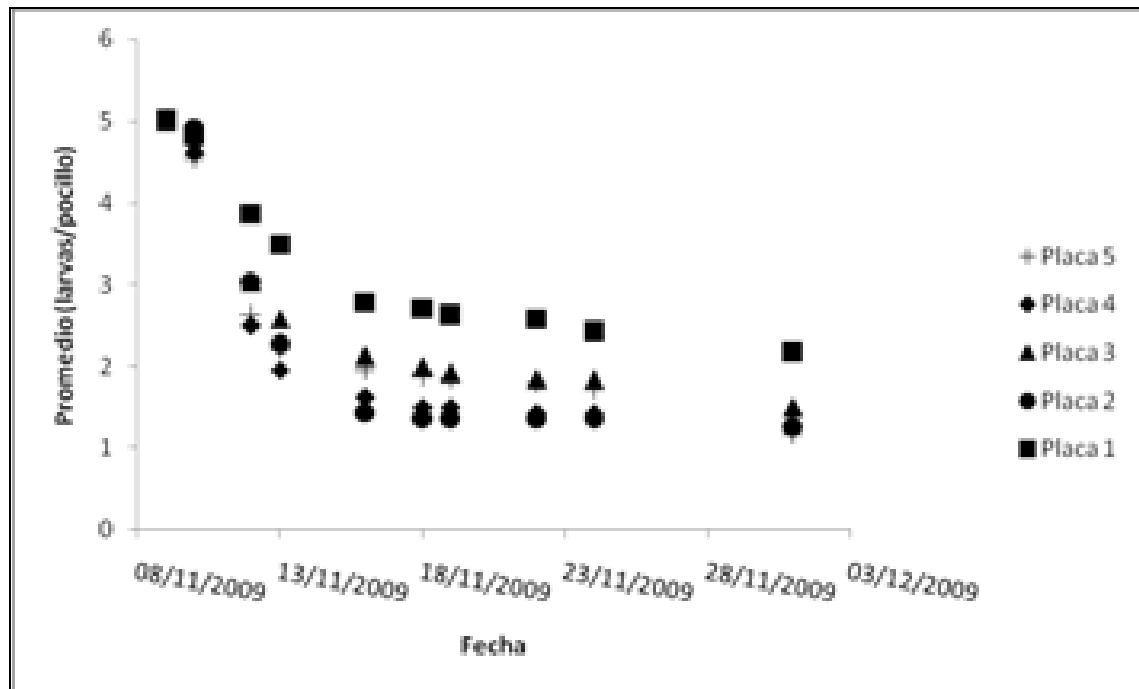


Fig. 88. Supervivencia larvaria de *C. chione* en placa. Se representa la media de número de larvas por pocillo y placa.

3.2.3.3.3. Prueba C.2.2

La idea de este experimento era ver como influía la presencia del fitoplancton en el cultivo, y cuáles eran las densidades máximas que podría llegar a soportar sin que éste se viera resentido durante la fase en la que las larvas aún son capaces de sobrevivir gracias a sus reservas. Como se puede observar en la figura 89, en las primeras dos densidades prácticamente no hay diferencia en ninguno de los tres casos, sin embargo, en la de mayor densidad, se ve que las que mejor se mantienen son las que no tienen aporte de fitoplancton. Por lo que se pudo observar, la presencia de fitoplancton genera una gran proliferación bacteriana, que añadido a una alta densidad de larvas, provocó un afloramiento masivo que acabó por infectar y dañar a las lluentas; en el caso de *Isochrysis* esta proliferación fue más acusada, por lo que pensamos que puede ser derivada de cada una de las especies. Esta situación apenas se observó en las que no tenían alimento.

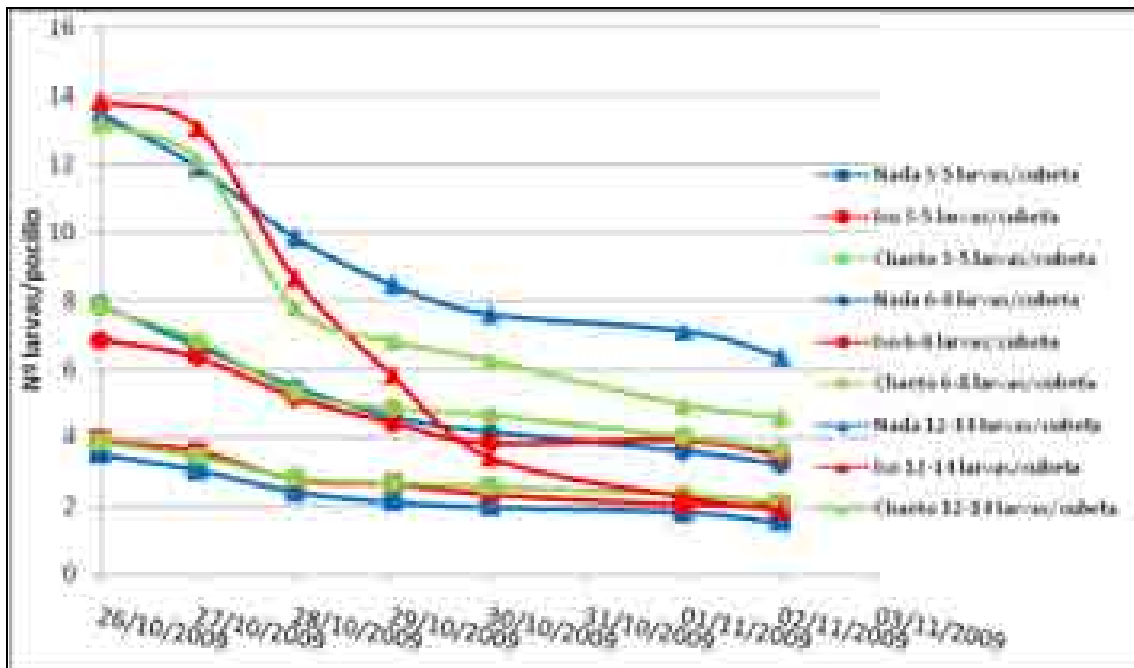


Fig. 89. Supervivencia larvaria de *C. chione* en placa. Se representa la media de número de larvas por pocillo y placa.

2.3.3. CONCLUSIONES

- Por lo observado hasta ahora, la reproducción de la lluenta es una tarea costosa y difícil de sacar adelante. Se han superado la mayoría de los problemas relacionados con el acondicionamiento de reproductores, pero aún queda por establecer cuáles son los parámetros óptimos de cultivo larvario. La supervivencia durante este ciclo se antoja como el cuello de botella de esta especie. Pero el hecho de haber podido sacar adelante un número de ejemplares hasta talla de supuesta siembra, nos induce a ser optimistas de que una vez superados estos problemas, el cultivo de esta especie pueda ser posible.



2.4. BIBLIOGRAFÍA

Gaspar, M.B.; Santos, M.N.; Vasconcelos, P.; Monteiro, C.C. 2002. Shell morphometric relationships of the most common bivalves species (Mollusca: Bivalvia) of the Algarve coast (southern Portugal). *Hydrobiologia* 477: 73–80.

Leontarakis, P.K.; Richardson, C.A., 2005. Growth of the smooth clam, *Callista chione* (Linnaeus, 1758) (Bivalvia: Veneridae) from the Thracian Sea, northeastern Mediterranean. *J. Molluscan Stud.* 71: 189–198.

Sokal, R.; Rohlf J., 1986. Introducción a la Bioestadística. Reverté, Buenos Aires, Argentina. 363 p.

Tirado, C.; Salas, C.; López, I. 2002. Reproduction of *Callista chione* L., 1758 (Bivalvia: Veneridae) in the littoral of Málaga (souther Spain). *J. Shellfish Res.* 21: 643-648.

Valli, G.; Bidoli, E.; Marussi, C. 1983-84. Preliminary observations on reproduction and biometry in *Callista chione* (L.) (Mollusca, Bivalvia) of the Gulf of Trieste. *Nova Thalassia* 6: 97-103.

Valli, G.; Marsich, N.; Marsich, M. 1994. Riproduzione, biometria e contenuto di metalli in *Callista chione* (L.) (Mollusca, Bivalvia) del Golfo di Trieste nel corso di un ciclo annuale. *Boll. Soc. Adriatica Scie.* LXXV: 441-464.



3. C.A. ANDALUCÍA-SUBPROYECTO 3. TÉCNICAS DE CULTIVO EN CRIADERO DE LONGUERÓN (*S. MARGINATUS*), COQUINA (*D. TRUNCULUS*) Y CONCHA FINA (*C. CHIONE*)

3.1. LONGUERÓN (*S. MARGINATUS*)

3.1.1. LÍNEA 1. ACONDICIONAMIENTO DE REPRODUCTORES Y OBTENCIÓN DE PUESTAS

3.1.1.1. INTRODUCCIÓN

El objetivo principal previsto para esta especie se refiere al proceso de maduración sexual de los reproductores hasta la obtención de puesta. Uno de los aspectos que más puede condicionar el calendario de la producción de cualquier especie marina en un criadero, es la obtención de puestas. En el caso concreto de las almejas y muchos otros bivalvos, la siembra de semillas en el medio exterior para el cultivo en engorde, debe cumplir como mínimo el requisito de que su tamaño mínimo se encuentre por encima de un umbral que asegure su supervivencia. El tiempo para alcanzar esta talla mínima, en el caso de las almejas 10-12 mm, viene determinado por las etapas anteriores del proceso de cultivo, cuyos períodos tienen escasa variación en las condiciones controladas de un criadero: 2-3 semanas de cultivo larvario, 3-4 semanas de cultivo postlarvario hasta 1 mm y 2-3 meses hasta semilla de 10 mm.

Teniendo en cuenta que la reproducción de estas especies en nuestra zona ocurre en la mayoría de los casos en primavera y, por lo tanto, esta última etapa se desarrolla en su mayoría en el medio exterior, las condiciones naturales, coinciden con momentos del año en los que la temperatura alcanza valores tan altos que regularmente ocasiona episodios de mortalidad en preengorde en sistemas suspendidos. De igual forma, aun a principios de otoño, se mantienen estas condiciones que tienen un efecto desfavorable sobre el engorde de las almejas, ya que las semillas recién sembradas en zonas intermareales en estas condiciones, sufren mayores mortalidades en un momento del cultivo que ya de por sí supone un cuello de botella en la supervivencia.

Para paliar estos posibles efectos, un adecuado calendario de puestas inducidas puede permitir realizar siembras de semillas cuando las condiciones aseguren una



reducción de la mortalidad, y, en consecuencia, reducir los costes de producción y por otro lado, se puede estimar la época de recogida del producto final cuando los precios del mercado nos brinden mayores beneficios. Diversos estudios se han realizado con diferentes especies para poder controlar las épocas de puesta, con resultados diversos. Especies como la almeja japonesa (*R. philippinarum*) responden bien a la temperatura de acondicionamiento, permitiendo planificar las épocas de puesta. No se obtienen tan buenos resultados con la almeja fina (*R. decussatus*).

Las experiencias de estabulación de reproductores de longuerón en otoño en condiciones de primavera (alimentación abundante y temperatura constante a 20°C) en épocas anteriores a la propia de maduración gonadal que se produce en el invierno, no dieron resultados satisfactorios, por lo que el mantenimiento de adultos en las instalaciones no resulta rentable antes de la propia época de puesta natural.

Sin embargo, hay que considerar que el inicio del proceso de gametogénesis en los bivalvos debe depender de un escaso número de factores a considerar: la temperatura del agua que controla el metabolismo, la disponibilidad de alimento que determina las reservas de la energía para la formación de tejido reproductor y secundariamente, y como refuerzo a los anteriores el fotoperíodo, que puede servir de interruptor para procesos hormonales que inicie los procesos de producción de gametos.

El objetivo planteado en este proyecto para el longuerón (*S. marginatus*) está enfocado a evaluar el efecto de estos factores sobre su maduración sexual.

Dentro de los objetivos del proyecto, se han realizado diversas experiencias que se complementan encaminadas a valorar los principales factores que influyen sobre la maduración de las gónadas de los reproductores. Se han estudiado los dos factores que para otras especies de bivalvos determinan la maduración sexual: el efecto de la temperatura y de la cantidad de alimento disponible en el medio. Para ello, se han planteado experimentos para valorar sus efectos en dos épocas del año. Inicialmente se realizó una experiencia sobre el efecto de la temperatura sobre los reproductores ya en el momento de maduración durante la primavera, que se describe en primer lugar. Como consecuencia de



los resultados observados, y con objetivo de evaluar independientemente los principales factores que influyen sobre la maduración de esta especie, los demás experimentos se plantearon en época de reposo sexual, a finales de verano o principios de otoño.

Si se considera que el factor principal que determina el desarrollo sexual de los reproductores de bivalvos es la temperatura, la disponibilidad de alimento es un elemento crucial para la calidad de los productos sexuales y, por ende, para la supervivencia larvaria. Una alta biomasa de diferentes especies de microalgas favorece el desarrollo de reservas nutricionales en los bivalvos. Algunos de estos tejidos de reserva son posteriormente transformados en gónada, desencadenando la gametogénesis. El ciclo biológico del longuerón ha sido completado en nuestras instalaciones en proyectos anteriores sufragados por JACUMAR. En este estudio se presentan los resultados sobre el efecto de la ración de alimento sobre el desarrollo sexual del longuerón.

3.1.1.2. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1.1.2.1. Influencia de la temperatura sobre la maduración del longuerón (*S. marginatus*, Pulteney, 1799) en época de maduración

Durante la primavera de 2006 se inició una experiencia de influencia de la temperatura del agua sobre la maduración sexual y la puesta en reproductores de esta especie. Para ello, en abril se capturaron un total de 1000 individuos, mediante inmersión con botella en mar abierto, en profundidades entre 10 y 15 m y utilizando salmuera. La talla de los ejemplares osciló entre los 65 y los 110 mm (talla media 100,29 mm y peso medio 25,33 g). Después de determinar la talla y peso de una muestra de 50 individuos, para su aclimatación se estabularon en tanques a temperatura natural durante 2-3 días hasta su ubicación definitiva en 8 tanques de 500 litros de capacidad con sustrato de arena fina ($> 250 \mu\text{m} > \emptyset > 125 \mu\text{m}$) en un horizonte de 20 cm.



Fig 90. Tanques de estabulación de reproductores para las experiencias a diferentes temperaturas.

Se establecieron 4 temperaturas de agua para cada dos tanques: 20°C, 17°C, 24°C y temperatura natural, todos con un régimen abierto de 2,5 litros/min. La densidad inicial de reproductores por tanque fue de 112 uds/m². La alimentación se repartió mediante bomba peristáltica con un flujo que permitió mantener en cada tanque una densidad de microalgas superior a 60.000 cels/ml a la salida del tanque. La dieta estaba compuesta por un “bloom” natural inducido y enriquecido con *T. suecica*, *I. galbana* y *C. gracilis*, valorándose diariamente, mediante contador de partículas, Beckman Multisizer 3, la densidad y la distribución de tamaños de partículas del cultivo.

Diariamente se tomó la temperatura máxima y mínima por tratamiento, se midieron los flujos de entrada de agua y de alimento para cada tanque, la concentración de fitoplancton diluido a la entrada y a la salida de cada tanque.

Inicialmente y durante un período de aproximadamente 2 meses (54 días), se realizaron muestreos quincenales de maduración gonadal (5 muestreos). Para cada muestreo y tratamiento se tomaron 20 individuos para cortes histológicos de los tejidos sexuales y 20 para índices de condición. Para estos análisis se han diseccionado los ejemplares considerando por separado diferentes partes: gónada, músculo abductor anterior, glándula digestiva y pie.

Para cada uno de los análisis previstos, cada individuo fue previamente tallado y pesado (0,1 g) y, en los casos que fue posible, anotado el sexo, ya que se pudieron distinguir macroscópicamente (hembra – gónada marrón, macho – gónada blanquecina).



Los cortes histológicos se procesaron introduciendo las muestras en *cassettes* de inclusión y sumergiéndolos en fijador Davidson durante 24-48 horas, después se han conservado en alcohol hasta su deshidratación en un procesador. Se han incluido en parafina y se han cortado con microtomo. Tras su posterior tinción con hematoxilina-eosina, se prepararán las muestras en portaobjetos para su observación al microscopio. Se distinguirán 5 estadios de maduración gonadal: 0, para individuos inmaduros; 1, al aparecer pequeños folículos; 2, gónada madurando; 3, para gónadas maduras y en emisión y 4, postpuesta.

Para el cálculo del índice de condición se han separado las partes del longuerón descritas anteriormente, mediante una incisión longitudinal del pie hasta la masa visceral y se han pesado en fresco los siguientes elementos: valvas, vianda (conjunto de carne incluyendo el manto), pie, músculo abductor anterior, glándula digestiva extraída de los tejidos que la rodeaban y gónada. Todos estos elementos fueron posteriormente secados 48 horas a 60°C para obtener finalmente el peso seco. Se calculó el índice de condición de los siguientes tejidos: músculo abductor, pie, glándula digestiva y gónada, mediante la relación:

$$I.C. = \frac{\text{PesoSecoOrgano}}{\text{PesoSecoValvas}} \times 100$$

Se utilizó como referencia el peso de la valva ya que es un valor que está directamente relacionado con la talla del individuo.

De cada tanque se recogieron las puestas diariamente mediante un colector con malla de 60 µm en el desagüe de cada uno, valorándose después la cantidad de ovocitos por tanque. Los cultivos larvarios procedentes de estas puestas se realizaron independientemente para cada tratamiento.



3.1.1.2.2. Influencia de la temperatura sobre la maduración del longuerón (*S. marginatus*, Pulteney, 1799) en época de reposo sexual (otoño)

Se estabularon 900 reproductores de talla media 114,9 mm y peso medio 34,2 g en nueve tanques de 0,53 m², con fondo de arena, a densidad aproximada de 240 uds m⁻². El agua aportada se filtró a 25 micras y el flujo en cada tanque fue de 2 L min⁻¹.

La alimentación en los tanques fue mediante el aporte continuo de mezcla de microalgas: *I. galbana*, *C. gracilis*, *T. suecica* y *S. costatum* asegurando que el aporte permitiera una concentración en los tanques no inferior a 120.000 cels/ml considerada adecuada para la maduración gonadal en otras especies como la almeja fina, para lo cual diariamente se realizó un control de la concentración de las algas, mediante un contador de partículas Beckman Multisizer 3. El fotoperíodo se fijó en los valores propios de invierno cuando comienza la maduración sexual de los longuerones, esto es, 8:16 (luz:oscuridad), utilizando alimentación artificial sobre los tanques.

Se establecieron 3 tratamientos de temperatura del agua que permitieran contrastar las condiciones naturales en el momento elegido para el experimento, con las que pudieran simular las deseadas para la maduración de los reproductores en invierno. Por ello, las temperaturas escogidas fueron: 17°C (invierno) y temperatura natural de nuestra zona en otoño, que varió entre 22 y 20 a lo largo del experimento. En los momentos de muestreo se recogieron también ejemplares del banco natural en la costa de Huelva para poder comparar la maduración en las diferentes condiciones.

El experimento se extendió durante 2 meses desde final de septiembre hasta final de diciembre. Quincenalmente se realizaron muestreos para evaluar el desarrollo gonadal. Se extrajeron 15 individuos para el cálculo de los índices condición, hallados a partir de los pesos secos de diferentes partes de la vianda del animal: glándula digestiva, pie y, en su caso, gónada. Se utilizó la expresión ya citada más arriba.

Se recogieron veinte ejemplares para realizar los cortes histológicos.



3.1.1.2.3. Influencia de la ración de alimento sobre la maduración sexual del longuerón (*Solen marginatus*, Pulteney, 1799)

Durante el período de reposo sexual del longuerón en otoño (Moreno, 2007) sendos lotes de 1000 individuos 114.9 ± 9.48 cm (media \pm DE) (sep - dic 2007) y 124.58 ± 12.50 cm (ago - oct 2008) fueron estabulados en tanques de 300 litros a una densidad de 120 uds m^{-2} . Los tanques disponían de un horizonte de arena de 20 cm para reducir el estrés de los individuos. El sistema de cultivo fue en circuito abierto con una renovación diaria de agua a $20 \pm 1^\circ\text{C}$ de temperatura. Se establecieron tres réplicas por tratamiento. El protocolo de alimentación se basó en una mezcla de *C. gracilis*, *T. suecica*, *S. costatum*, *I. galbana* y *P. lutheri* en proporciones 1:1:1:1:1 en peso seco de algas. Se utilizaron bombas peristálticas para el suministro del fitoplancton durante 20 horas al día.

En el experimento de 2007 se testaron tres regímenes de alimentación: 0,25, 0,5 y 1,0% de peso seco de algas a peso seco de carne de longuerón. Las densidades algales en los diferentes tratamientos se mantuvieron en 70.000, 110.000 y 140.000 cel/ml, respectivamente. El tratamiento de mayor densidad de algas se considera como alimentación óptima para el desarrollo gonadal en otras especies de bivalvos, mientras que la menor se considera como una dieta escasa (Delgado, 2001). Mensualmente se tomaron muestras de 30 individuos por dieta para la determinación del índice de condición (15 ind.) y para el análisis histológico (15 ind.).

En el experimento de 2008 se estudiaron dos raciones superiores: 1,5 y 2,5% de peso seco de algas a peso seco de carne de longuerón. La densidad algal en este caso se mantuvo a 120.000 células de la misma mezcla de algas por mililitro. Quincenalmente se recogieron 30 individuos de cada tratamiento para el análisis de histología e índice de condición.

En ambos experimentos, los resultados de índice de condición e histología se compararon con ejemplares recogidos del medio natural. El índice de condición se calculó como la razón entre el peso seco de diferentes órganos del longuerón (músculo abductor,



glándula digestiva, pie y gónada, en su caso) por cien, dividido por el peso seco de la valva.

Para el análisis histológico se utilizó la escala propuesta por Darriba (2001) para *E. arcuatus*: 0 – Reposo sexual, I – Inicio de gametogénesis; II – Desarrollo de gónada, maduración, IIIa – Maduración; IIIb – Maduración y puesta; IV – Postpuesta.

3.1.1.3. RESULTADOS

3.1.1.3.1. Influencia de la temperatura sobre la maduración del longuerón (*S. marginatus*, Pulteney, 1799) en época de maduración

Se han evaluado los índices de condición en peso de los diferentes órganos y las puestas obtenidas según los diferentes tratamientos.

Las variaciones de los índices de condición dependen del órgano considerado. Se han observado escasa oscilación de los pesos de músculo abductor y glándula digestiva, aunque tanto en éstos como en los demás parámetros, se ha observado un descenso de los valores. Este comportamiento debe ir asociado al progresivo desarrollo de las puestas durante este período, que corresponde con la época de reproducción de esta especie.

Se presenta en este informe los resultados de los índices de condición de la gónada de machos y hembras por ser representativo de la fecundidad, estar directamente relacionado con las puestas y ser el más sensible al factor a considerar (la temperatura). (Fig. 91).

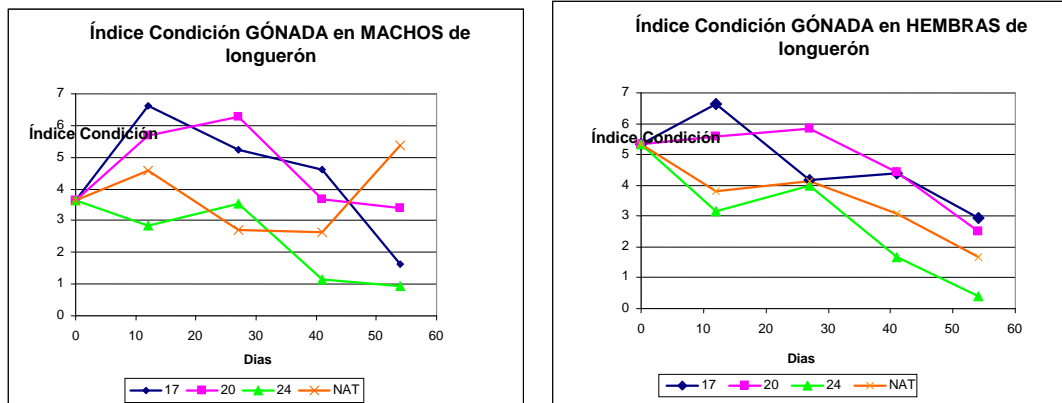


Fig. 91. Índices de condición de gónada en peso seco, para los diferentes tratamientos de temperatura.

Como puede observarse, el índice de condición de gónadas en hembras, a partir del primer muestreo, presenta dos comportamientos diferentes. Entre sexos para un mismo tratamiento, aparecen diferencias significativas al inicio y al final de la experiencia de $23\pm 1^\circ\text{C}$ (Kruskal-Wallis, $p=0,013$ y $p=0,044$, respectivamente), resultando muy similares para el resto de las temperaturas durante todo el período de estudio. Para las temperaturas más bajas, (17 y 20°C), se observa un aumento del peso de la gónada que se extiende en el tratamiento a 20°C hasta el tercer muestreo a los 30 días, aun cuando ya se han recogido puestas de estos tanques desde los 8 y los 13 días del comienzo del experimento, respectivamente. A continuación se observa un descenso semejante a los otros tratamientos. En éstos se aprecia un descenso desde el primer muestreo. El tratamiento a 24°C ha sido el que ha sufrido un descenso más acusado de este índice, mostrando que, a esta temperatura, la consecución de las puestas es más rápida, vaciándose la gónada.

Respecto a la comparación de los diferentes órganos, al igual que en el caso anterior, se muestran los resultados para ambos sexos para el tratamiento que ha mostrado una oscilación más amplia (24°C) (Fig. 92).

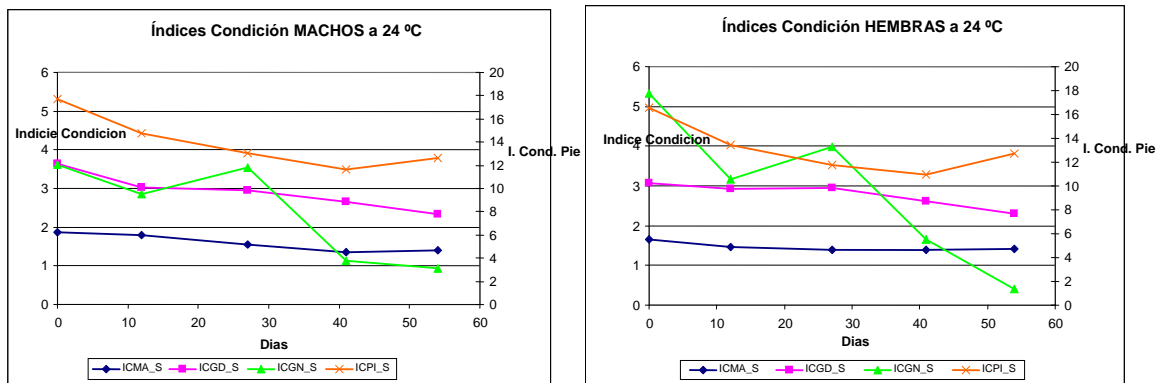


Fig. 92.- índices de condición de los diferentes órganos en hembras sometidas a acondicionamiento a 24°C. ICMA_S – Ind. de condición músculo abductor, peso seco, ICGD_S – I.C. glándula digestiva, ICGN_S - I.C. gónada, ICPI_S – I.C. de pie. Los valores del ICPI se representan en el eje derecho.

El índice de condición del pie es el que presentó valores mayores seguido de las gónadas. Como se puede observar en la gráfica, no se aprecian importantes variaciones de los índices de condición durante el período de puesta, a excepción de las gónadas. En todos los casos, salvo el último valor para el pie, en el que se aprecia un descenso paulatino de todos los índices de condición.

La valoración de los cortes histológicos mostró que, al inicio del experimento, todos los longuerones se encontraban en estado de gametogénesis avanzada (EII) y a partir de los trece días aparecen individuos maduros (EIII) y en estado de emisión de gametos (EIIIB) en todos los tratamientos (Fig. 93). Se observó un retraso en el desarrollo para los adultos acondicionados a $17\pm 1^\circ\text{C}$, encontrando a los 27 días un 60% de individuos en maduración (EII) ($\chi^2=23,58$; $p<0,001$) y a los 42 días es el único tratamiento en el que aún queda un 10% de individuos inmaduros.

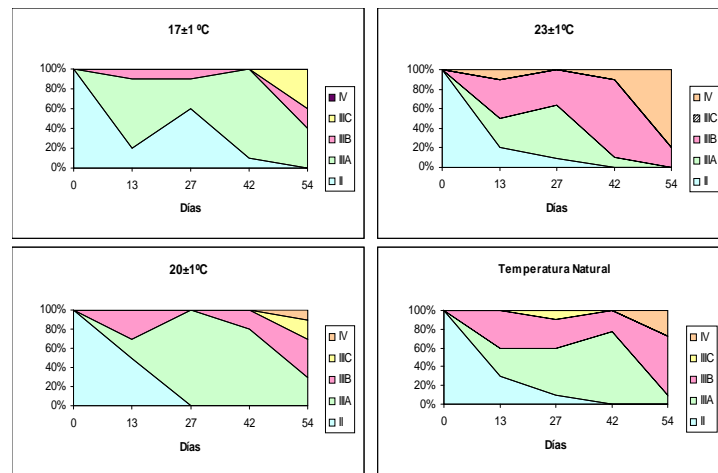


Fig. 93. Proporción de los diferentes estados de maduración valorado sobre cortes histológicos en relación a la temperatura.

El período de maduración (EIIIA) y puesta (EIIIB) se extiende para todos los tratamientos desde el segundo muestreo (a los 13 días) hasta el final, corroborándose con la aparición de puestas a partir del día 17, observándose en el tratamiento de 23±1°C la emisión de gametos desde el inicio.

Es de prever que durante la maduración sexual la movilización de nutrientes se realice desde otros tejidos de reserva hacia la gónada. En el comienzo de nuestra experiencia los individuos se encontraban ya en período de puesta, por lo que los altos valores del índice de condición gonadal, respecto a los demás índices, se deberán a que todos los recursos energéticos de los reproductores se encuentran ya orientados hacia la reproducción.

La temperatura es un factor que influye en la transferencia de reservas desde otros órganos a la gónada o directamente desencadenando la maduración sexual y la puesta en los moluscos bivalvos (Sastry, 1966; Breber, 1984; Devauchelle y Mingant, 1991; Chávez-Villalba *et al.*, 2001). Bruzón *et al.* (2000) establecen una relación entre época de maduración sexual y puesta del longuerón con la temperatura. En nuestro estudio, los resultados obtenidos a partir de los cortes histológicos e índices de condición de la gónada, corroboran esta hipótesis, mostrando un gran retraso en la emisión de gametos y la reorganización de la gónada a temperaturas inferiores a la natural (17±1°C) y, una



reducción del período de puesta a temperaturas superiores ($23\pm 1^{\circ}\text{C}$). Los ejemplares sometidos a $20\pm 1^{\circ}\text{C}$ sufren también un retraso en la emisión de gametos, observándose una menor proporción de ejemplares en puesta que los sometidos a temperatura natural. Este comportamiento coincide con lo observado por Sastry (1966) para *Aequipecten irradians*, Lamarck, que describe un acortamiento del período de puesta a temperaturas mayores y, dilatación de este período y reorganización de la gónada a bajas temperaturas.

En nuestra experiencia no hemos encontrado diferencias significativas en el IGD, IMA e IP entre las diferentes temperaturas, y, además, los valores de IMA e IP estudiados siguen, en general, un comportamiento similar al descrito por Martínez (2002) para esta especie en el medio natural para los meses estudiados.

Este experimento se repetirá en diferentes estados fisiológicos de los longuerones: postpuesta, reposo y maduración sexual, para valorar el efecto de la temperatura sobre la reproducción de esta especie.

Durante los 54 días que duró el experimento se recogieron puestas en 36 de ellas distribuidas a lo largo de todo el período. En la siguiente tabla se muestran los ovocitos fecundados recogidos en cada tratamiento.

Tabla XXXVII. Puestas obtenidas según los tratamientos de temperatura de acondicionamiento.

TRATAMIENTO	Nº Días	Puestas	Nº Medio de ovocitos
T17	16	29.542.200	1.846.387,50
T20	13	13.393.750	1.030.288,46
T24	18	22.692.900	1.260.716,67
TNAT	8	14.696.500	1.837.062,50
Total general	(36)	80.325.350	2.231.259,72

Como puede observarse, hay una correspondencia entre el número de días de puesta y el número de ovocitos emitidos, resultando mayor en los tratamientos de 17 y 24°C , sin embargo, considerando el número medio de ovocitos por puesta, éstas, a temperaturas más bajas, se asemejan a las de puesta natural. En este último caso el número de días de puesta fue escaso, pero se recogieron en algunas de ellas un gran número de ovocitos, lo que parece indicar que en condiciones normales, las puestas se concentran en pocos días en los que se produce el vaciado de las gónadas.



3.1.1.3.2. Influencia de la temperatura sobre la maduración del longuerón (*S. marginatus*, Pulteney, 1799) en época de reposo sexual (otoño)

En la figura 94 se presentan los resultados de los índices de condición de la glándula digestiva y del pie a lo largo del experimento.

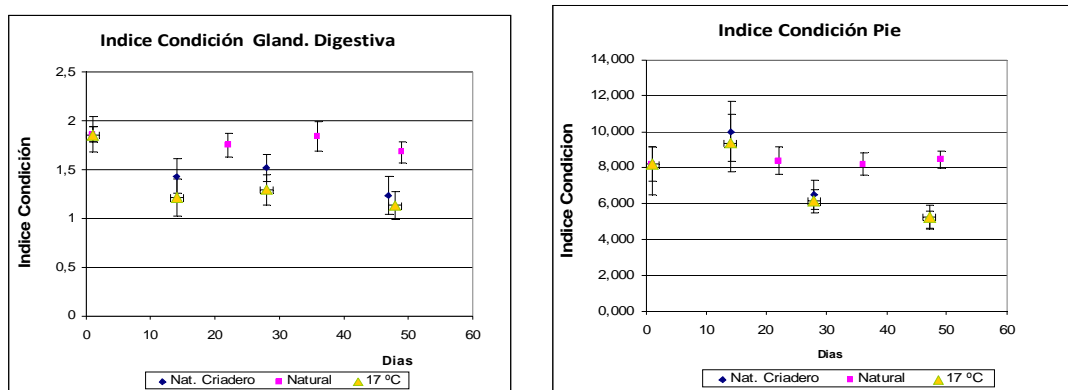


Fig. 94. Índices de condición para las diferentes temperaturas ensayadas: medio natural, temperatura natural en criadero y temperatura constante a 17°C.

No se representan los resultados de los índices de condición de la gónada ya que el número de individuos que presentó este órgano fue muy escaso y no se pueden deducir resultados. De igual forma, no se ha considerado importante valorar el peso del músculo abductor ya que en esta especie, al contrario de lo que ocurre en otras especies de la familia Solenidae, sufre pocas variaciones a lo largo del año.

Los resultados observados son poco concluyentes. Se puede apreciar que no existen diferencias significativas entre los dos tratamientos que se llevaron a cabo en el criadero, observándose incluso que durante la experiencia disminuyó la condición de los ejemplares estabulados, independientemente del tratamiento.

De igual manera, parecía, que tanto para el pie como para la glándula digestiva, los valores de peso seco son inferiores a los de las muestras recogidas de medio natural, lo que induce a pensar que, las condiciones en las que se encuentran en el experimento, no permiten observar diferencias debidas a los tratamientos.

Por estas razones, se plantearon nuevas experiencias con las que además de influir sobre la maduración de los adultos de longuerón, nos permita mejorar las condiciones de estabulación. Aunque las cantidades de alimento aportado se han considerado suficientes en comparación con el comportamiento de otras especies, se han planteado dos experiencias encaminadas a valorar el efecto de la cantidad de alimento sobre la condición de los reproductores y sobre su maduración sexual.

3.1.1.3.3. Influencia de la ración de alimento sobre la maduración sexual del longuerón (*Solen marginatus*, Pulteney, 1799)

Los índices de condición de la glándula digestiva y del pie no mostraron diferencias significativas en los experimentos de 2007 y 2008 para cualquier densidad de alimentación microalgal (Kruskal-Wallis, $p > 0,05$) (Fig. 95).

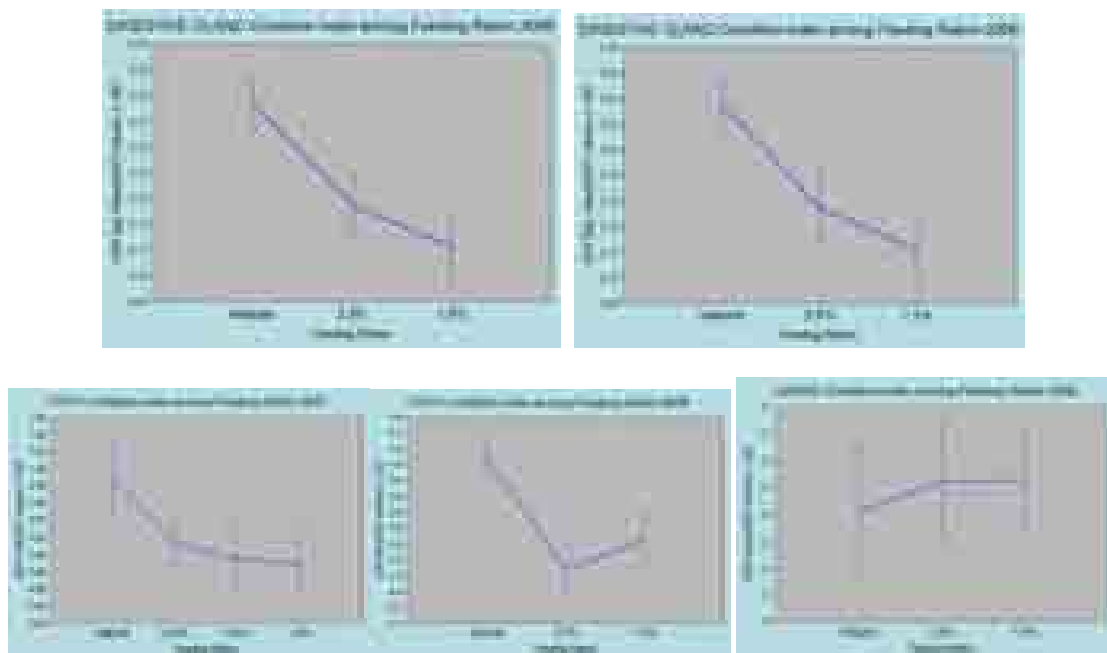


Fig. 95. Comparación entre los distintos tratamientos de los índices de condición de diferentes órganos en los experimentos de 2007 y 2008.

En todos los casos, el índice de condición fue significativamente inferior que los obtenidos en los longuerones procedentes de medio natural. En ambos casos, el índice de condición del pie disminuyó a lo largo del experimento, incluso con los regímenes de alimentación más altos (2,5%) mientras que para la glándula digestiva permanecieron



constantes (Fig. 96). El índice de condición de la glándula digestiva mostró un ligero, aunque no significativo, aumento en los regímenes de mayor alimentación y similares a los observados en las muestras de medio natural. Se observó un descenso general en el peso de los órganos sexuales, con valores inferiores con los de las muestras de medio natural en el experimento de 2008.

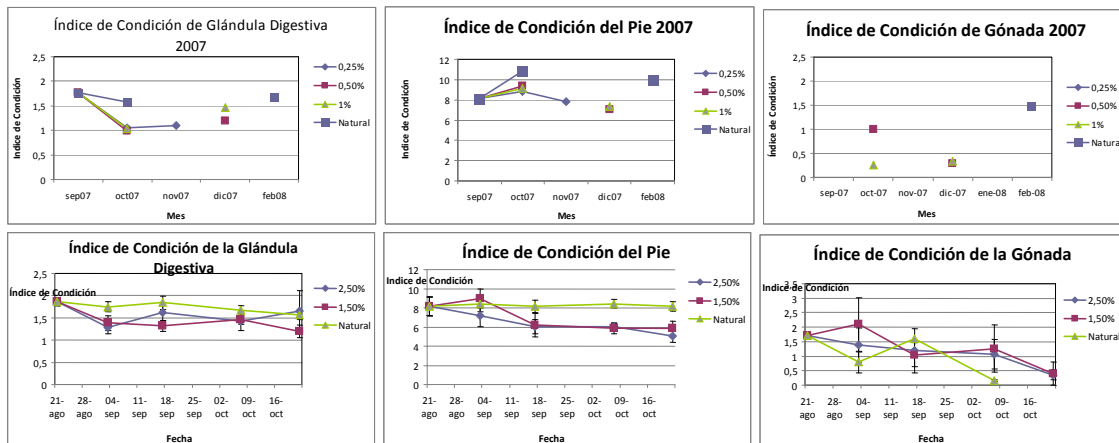


Fig. 96. Índices de condición de gónada, pie y glándula digestiva.

Por el contrario, el análisis de las muestras histológicas de los órganos de reproducción mostró diferencias en los porcentajes de las etapas de desarrollo entre tratamientos (Fig. 97). En el experimento de 2008, el tratamiento de tasa de alimentación más alto (2,5%) mostró una mayor proporción de individuos en estado de puesta (36%) al final del experimento, cuando se compara con los individuos sometidos a un régimen de alimentación escasa (ración del 1,5%) o a los de medio natural (5%). En estos tratamientos, los adultos de longuerón se encontraban en su mayoría en postpuesta o en reposo sexual (95%), mientras que el 64% de los ejemplares alimentados con la ración abundante se encontraban en ese estado. En el final del experimento de 2007 se observó una mayor variabilidad de estados de desarrollo en la ración del 1%: 4% en reposo, 20% en estado I (inicio de gametogénesis), 8% en gametogénesis, 4% maduros, 18% en puesta y 45% en postpuesta, mientras que este último muestreo, el régimen de menor alimentación mostró un 93% de los ejemplares en postpuesta.

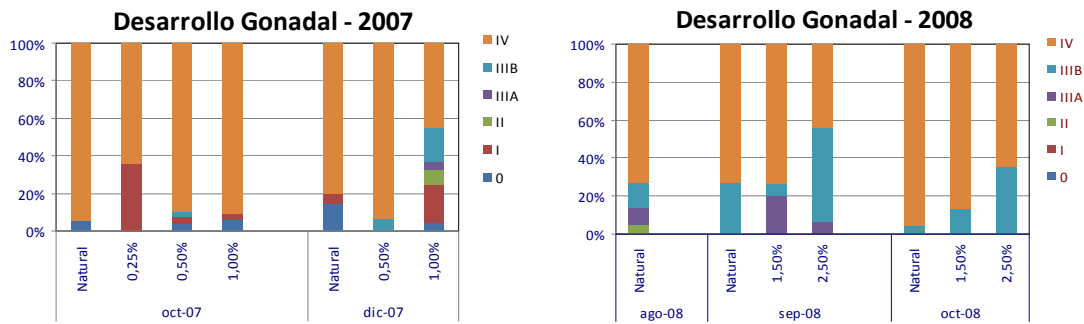


Fig. 97. Proporción de los distintos estadios de maduración en relación a la cantidad de alimento.

Dos estrategias diferentes son posibles en el ciclo reproductivo de los solénidos, de acuerdo con la disponibilidad estacional del alimento (fitoplancton). Por un lado, la acumulación de energía en órganos de reserva como la glándula digestiva o el pie para después desarrollar los órganos reproductores en primavera, y por otro lado, el desarrollo de tejido sexual desde el momento en que la cantidad de alimento aumenta. En este experimento, hemos evaluado el papel que juega la disponibilidad de alimento en el longuerón. Los resultados mostraron que para las raciones de algas consideradas, el alimento no es un factor importante para el desarrollo sexual, ya que no se observó un incremento de reservas, estimado como el índice de condición, o de tejido gonadal. Sin embargo, se observó un ligero efecto sobre la maduración gonadal que se hizo patente en las dietas más altas evaluadas (2,5% Ps/Ps). Ese comportamiento también se ha observado en la concha fina *Callista chione* (Martínez-Pita, en prensa) en la cual el desarrollo de los sucesivos estadios gonadales no implica necesariamente un incremento en el peso del órgano. El descenso de los pesos de la glándula digestiva y del pie durante el experimento, puede implicar la transferencia de nutrientes desde estos órganos a la gónada.



3.1.2. LÍNEA 3. PREENGORDE DE SEMILLA

3.1.2.1. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1.2.1.1. Preengorde en criadero de postlarvas de longueirón *Solen marginatus* Pulteney, 1799)

Según las distintas experiencias llevadas a cabo sobre el cultivo de solénidos, es sabido que a partir de cierto tamaño es necesaria la presencia de sustrato para el cultivo de este grupo de especies, ya que suelen aparecer deformaciones de la concha y aumenta ostensiblemente la mortalidad. Por la presencia de sustrato, los cultivos de preengorde resultan así muy engorrosos en el medio exterior, siendo necesario buscar alternativas en las propias instalaciones en el criadero, pero que no suponga un aumento en los costes de producción.

Con el fin de establecer cuáles son las mejores condiciones esenciales de cultivo de semillas en criadero se han ensayado simultáneamente tres parámetros importantes: densidad del cultivo, tipo de sustrato de tanque y talla inicial de preengorde en el criadero, previo a la siembra en el medio natural.

Se instalaron dos tanques rectangulares de 500 litros de capacidad en lo que se añadió el sustrato.

- En uno de ellos se echó una capa de grava de 10 cm de grosor y sobre ella una capa de arena de otros 10 cm. Estas dos capas se separaron por una membrana permeable de geotextil (BIDIM©). Mediante *air-lifts* se forzó la circulación del agua a través de los dos sustratos, siguiendo un flujo descendente, lo que permitía que el alimento aportado (microalgas) aumentara su tiempo de residencia en el tanque y siguiendo la dirección del agua, estuviera a disposición de la semilla.
- El otro tanque se rellenó con sustrato de arena media con un horizonte de 15 cm.

En cada uno de los tanques se establecieron dos recintos cerrados, limitados por una malla plástica de pequeño tamaño pero que permitiera el libre flujo del agua y las microalgas. Cada uno de estos recintos cuadrados se dividió en otros 3 de distinto tamaño.



Para los dos tanques, (Fig. 98) en cada uno de los recintos principales se sembraron semillas de longuerón de diferente talla: En uno, individuos de $10,63 \pm 1,625$ mm y 0,047 g (talla inicial pequeña) y en el otro de talla $12,78 \pm 1,70$ mm y 0,081 g.

En cada uno de los recintos interiores pequeños se sembró el mismo número de individuos (Fig. 99), de manera que al ser cada una de las cuadrículas de diferente tamaño, las densidades finales resultante fueron de:

- 1: Densidad de 5500 uds/m²
- 2: Densidad de 12000 uds/m²
- 3: Densidad de 18500 uds/m²

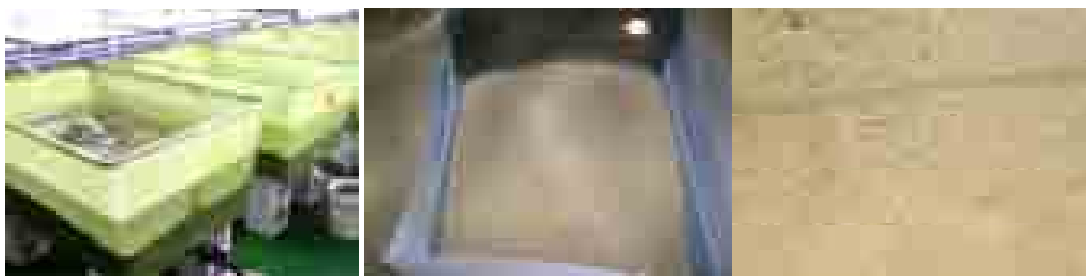


Fig. 98. Tanques y recintos experimentales y semillas de longuerón recién sembradas.

TANQUE CON GRAVA+ARENA		TANQUE CON ARENA	
10,63 mm	12,78 mm	10,63 mm	12,78 mm
18500	18500	18500	18500
12000	12000	12000	12000
5500	5500	5500	5500

Fig. 99. Esquema de los tratamientos de densidad, talla y sustrato en los tanques.

Para los dos tanques el régimen de agua fue en circuito abierto con temperatura constante media de 19°C. La alimentación estaba compuesta por una mezcla de diferentes algas: *Tetraselmis suecica*, *Chaetoceros gracilis* y *Phaeodactylum tricornutum* en proporción de 1:1:1 de peso seco.



Se realizaron muestreo inicial, a los 7, 24 y 42 días de cultivo, valorándose el crecimiento de 30 individuos de cada parcela y mortalidad en cada una de ellas.

3.1.2.2. RESULTADOS

La talla final de los ejemplares sembrados tuvieron de media 16,0 mm para los longuerones de talla inicial mayor (13 mm) y 13 mm para los pequeños (11 mm) (Tabla XXXVIII). Las curvas de crecimiento de los individuos mayores siguió una forma concava observándose una continua reducción de la tasa de crecimiento (Fig. 100). Este comportamiento fue análogo para todos los tratamientos ensayados. Esto indica que en las condiciones del experimento ya no se puede continuar, y es necesario iniciar nuevos sistemas de cultivo en el medio exterior a partir de los 15 mm de longitud AP. Por el contrario, los ejemplares de talla pequeña mostraron un crecimiento constante hasta alcanzar la talla de 13 mm.

Tabla XXXVIII. Crecimiento de las semillas en función de la talla inicial.

TALLA INICIAL	Días de Cultivo			
	0	7	24	42
10,623	10,62	10,24	11,15	13,02
12,779	12,78	13,87	15,41	16,20

No se observaron diferencias significativas en el crecimiento debido al tipo de sustrato empleado para ninguna de las dos tallas iniciales.

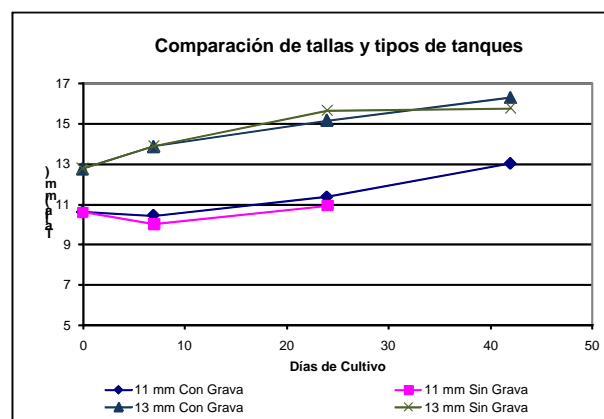


Fig. 100.- Crecimiento de las semillas de longuerón en relación a la talla inicial y al tipo de sustrato del tanque.



No se observaron diferencias significativas en relación a la densidad de cultivo (Fig. 101). En los individuos de talla inicial menor, la densidad más baja fue la que mostró la mayor talla final en el cultivo, pero este comportamiento no se repite en los longuerones de talla mayor, donde precisamente la densidad debería ser el factor limitante, por lo que se puede concluir que, para las condiciones experimentales, se pueden cultivar semillas de longuerón en densidades de hasta 18500 individuos/m².

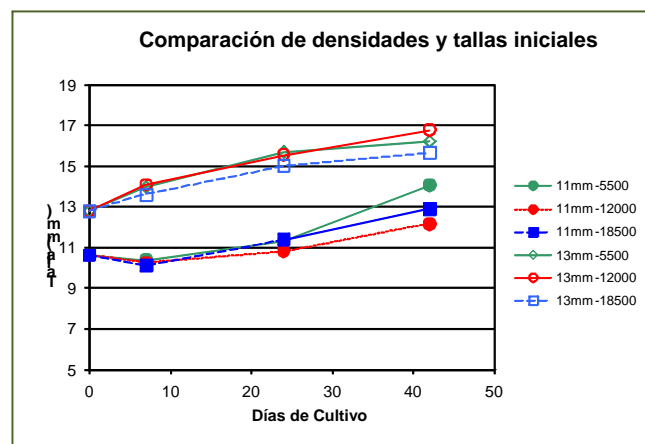


Fig. 101. Crecimiento de las semillas de longuerón en relación a la talla inicial de siembra y a la densidad de cultivo.

Aunque en el crecimiento no se observaron diferencias entre los tratamientos, esto sí fue apreciable en las mortalidades. De hecho, en los individuos de talla inicial pequeña, se produjo una mortalidad total en el tanque sin grava.

En la figura 102 se representan los histogramas de las mortalidades media en función de los diferentes tratamientos considerados.

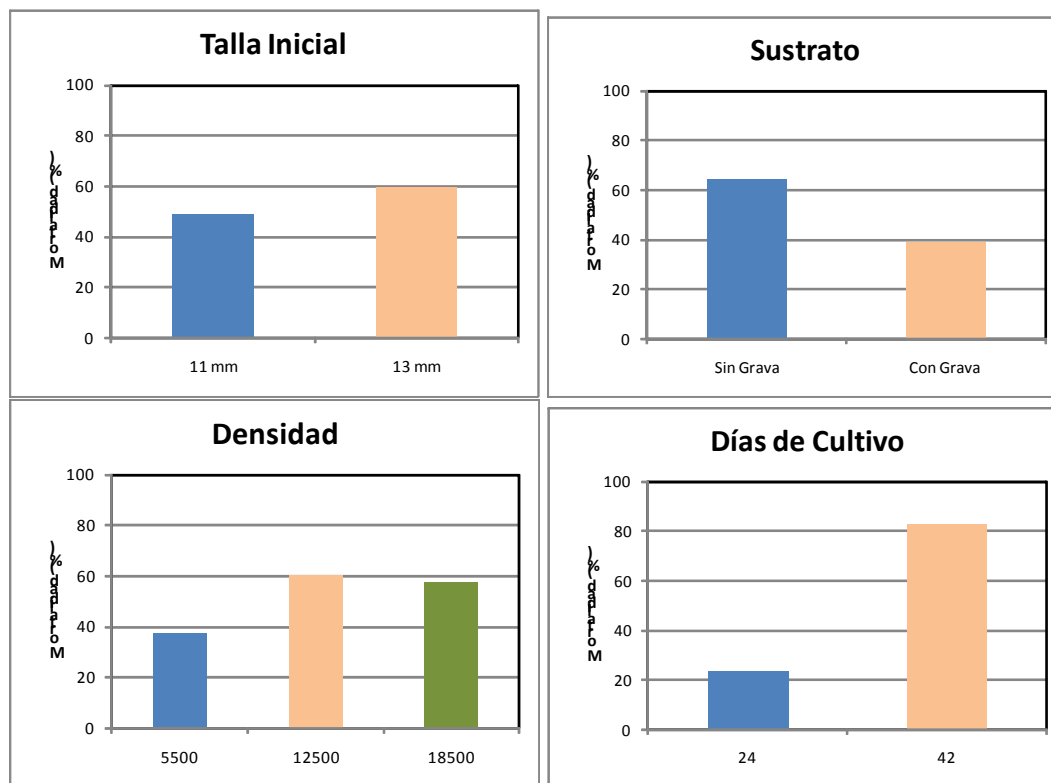


Fig. 102. Mortalidades observadas en las semillas de longuerón para los principales factores ensayados.

Las mortalidades observadas fueron mayores en los individuos de talla inicial mayor, principalmente al final del experimento cuando ya se observa además una disminución de la tasa de crecimiento al alcanzar los 15 mm de longitud. El sustrato ha sido un factor que ha influido sobre la supervivencia, ya que en los tanques con doble fondo y por tanto con mejor calidad de agua, se observó una supervivencia que en el tanque con sustrato simple de arena, en el que la acumulación de residuos y alimento no consumido puede influir sobre la calidad de la arena y sobre la mortalidad. Se observó una mortalidad completa en los ejemplares de menor talla. Como consecuencia de ello, la mortalidad a lo largo del experimento aumentó claramente debido a este episodio.

Sin embargo, no se observaron mortalidades significativamente superiores en las semillas de longuerón cultivadas a mayor densidad para ninguno de los demás tratamientos ensayados.



3.1.3. BIBLIOGRAFÍA

Darriba, S. 2001. Biología de la navaja (*Ensis arcuatus* Jeffreys, 1865) de la Ría de Vigo (N.O. de España): Crecimiento y reproducción. *Tesis Doctoral. Univ. de Vigo*. 283 pp.

Delgado, M. 2001. Maduración sexual en *Ruditapes decussatus* (L.): Implicaciones energéticas y bioquímicas. *Tesis Doctoral. Univ. de Santiago de Compostela*. 307 pp.

Moreno, O.; Palanco, I.; Ruiz, P.; Torres, M.A. 2007. Influencia de la temperatura en la evolución del desarrollo gonadal de reproductores de longueirón *Solen marginatus* (Pulteney, 1799). *XI Congreso Nacional de Acuicultura*. Vigo. 24-28 de septiembre.

Martínez, D. 2002. Estudio de los Solénidos, *Solen marginatus* (Pennánt, 1777) y *Ensis siliqua* (Linné, 1758), de los bancos naturales de la Ría de Ortigueira y Ría del Barquero: ciclo gametogénico, composición bioquímica y cultivo larvario. *Tesis Doctoral. Univ. de Santiago de Compostela*. 240 pp.

Palanco, I.; Moreno, O.; Ruiz Azcona, P.; Royo, A. 2006. Cultivo en criadero del longuerón (*Solen marginatus* L.) en el litoral onubense. *III Jornadas de Acuicultura en el Litoral Suratlántico*. Cartaya (Huelva), España, 21-22 de marzo.



3.2. COQUINA (*DONAX TRUNCULUS*)

3.2.1. LÍNEA 1. ACONDICIONAMIENTO DE REPRODUCTORES Y OBTENCIÓN DE PUESTAS

3.2.1.1. INTRODUCCIÓN

El propósito de este experimento es describir por primera vez la composición de lípidos, incluyendo las clases lipídicas y la composición de ácidos grasos de reproductores de coquina y sus diferencias en relación al sexo. Además, se ha estudiado la posible influencia de su ambiente controlado en el criadero, fundamentalmente en lo que se refiere a la dieta.

3.2.1.2. MATERIAL Y MÉTODOS

En la primavera de 2008, 200 ejemplares de coquina se recogieron de un área intermareal del litoral de Huelva. Una vez en el criadero, 20 individuos (10 machos y 10 hembras) se diseccionaron para analizar ácidos grasos y clases lipídicas. Otros 15 individuos se tomaron para el análisis histológico del ciclo gonadal y otros 15 para determinar el índice de condición, calculado según la expresión:

$$IC = \text{Peso seco de la carne (mg)} / \text{longitud antero-posterior}^3 \text{ (mm)}$$

Seguidamente, el lote de reproductores se estabuló en un tanque de 300 litros con un horizonte de arena fina (200-300 micras), en circuito abierto alimentados con agua filtrada a 25 micras y un flujo de 2 litros/min. La temperatura del agua se mantuvo en $18 \pm 1^\circ\text{C}$. La alimentación se basó en una mezcla 1:1 de *T. suecica* y *C. gracilis*. La ración diaria suministrada fue de 4% del peso seco de algas a peso vivo de coquinas. El muestreo descrito más arriba se repitió transcurrido un mes de estabulación en el criadero.

3.2.1.2.1.1. Análisis histológico

Para el análisis histológico los individuos se fijaron en medio Davidson durante 48 horas, para después ser deshidratados en alcohol al 70%, e incluidos en parafina. Se



realizaron preparaciones de 5 micras de grosor del corte y tinción con Hematoxilina - Eosina.

Los estadios de desarrollo se establecieron según la escala de Gaspar *et al.* (1999), que distingue 6 etapas: Estado 0, inactivo; Estado I, comienzo de maduración; Estado II, maduración avanzada; Estado III, Puesta; Estado IV, puesta parcial; Estado V, postpuesta. Cuando se observaron más de un estadio en la misma preparación, el criterio de elección se basó en aquel estado que ocupaba más superficie de la preparación.

3.2.1.2.1.2. Análisis de lípidos y ácidos grasos

El contenido de humedad se determinó con muestras de 500 mg. Los lípidos totales se extrajeron con una solución de cloroformo–metanol (2:1) con 0,01% de hidroxitolueno butilado como antioxidante. Las clases lipídicas se separaron utilizando un cromatógrafo de capa fina (HPTLC), utilizando metil acetato/isopropanol/cloroformo/metanol/KCl como disolvente polar. Las clases lipídicas se valoraron mediante un densitómetro (CAMAG TLC Scanner 3). Para la determinación de los ácidos grasos se utilizó un cromatógrafo de gases (Shimadzu GC 2010), empleando helio como medio de transporte.



3.2.1.3. RESULTADOS

3.2.1.3.1. Índice de condición y desarrollo gonadal

Los valores de índice de condición fueron de $8,72 \pm 1,36$ en el primer muestreo y descendió ligeramente en el segundo hasta $7,74 \pm 1,33$, pero estas diferencias no son significativas. Por otro lado, el estudio histológico mostró que todos los individuos se encontraban inicialmente en estado II y III pero después de un mes en las instalaciones del criadero, el 100% se encontraba en estado de puesta (Estado III). No se obtuvieron puestas naturales ni se consiguieron puestas inducidas durante el período experimental.

3.2.1.3.2. Composición de clases lipídicas en machos y hembras

El porcentaje de lípido total y de clases lipídicas en machos y hembras se presentan en la Tabla XXXIX. También se recogen los cambios observados en los lípidos totales y en las clases lipídicas después de la estabulación de los ejemplares en las condiciones controladas en el criadero. La proporción de lípido total fue mayor en hembras que en machos. En ambos sexos AGT fue el principal componente lipídico en lípidos neutros y CHO el segundo, siendo los principales lípidos polares los fosfolípidos PC, PE y PS. Sin embargo, se han observado diferencias significativas entre machos y hembras. Los lípidos neutros totales abundaron en hembras y su valor duplicó al de machos. En concreto, los valores de TAG y EE fueron el doble en hembras que en machos, correspondiendo al 25 y 10% respectivamente del lípido total en hembras pero que solo constituyen ambos el 12% en machos. Los lípidos polares predominan en machos y los tres fosfolípidos principales son inferiores en hembras que en machos. Los dos triacilglicéridos encontrados alcanzaron valores tres veces superiores en machos que en hembras. Los porcentajes de PIGM y CHO resultaron similares entre ambos sexos. Además, las tres clases lipídicas, SM, MAG y DAG aparecieron solamente en hembras aunque en escasa cantidad.



Tabla XXXIX. Composición de lípidos totales y clases lipídicas de machos y hembras de coquina (*D. trunculus*). LPC: Lisofosfatidilcolina; SM: esfingomielina; PC: fosfatidilcolina; PS: fosfatidilserina; PI: fosfatidilinositol; PE: fosfatidiletanolamina; DGDG: digalactosil diacilglicerol; MGDG: monogalactosil diacilglicerol; PIGM: pigmentos; MAG: monoacilglicerol; DAG: diacilgliceroles; CHO: colesterol; TAG: triacilglicerinas; SE: ésteres de esterol; TPL: Lípidos polares totales; TNL: Lípidos neutros totales.

	Hembras 1 ^{er} muestreo (n=10)	Hembras 2 ^o muestreo(n=10)	Machos 1 ^{er} muestreo (n=9)	Machos 2 ^o muestreo (n=10)
Lípidos totales	10.00 ± 1.51	11.64 ± 2.44	7.05 ± 0.98*	9.01 ± 1.98 ^a
LPC	1.23 ± 0.29	0.96 ± 0.30	1.09 ± 0.16	1.14 ± 0.22
SM	0.09 ± 0.09	-	-	-
PC	15.91± 0.40	15.71 ± 0.38	18.83 ± 0.90	18.50 ± 0.75
PS	8.70 ± 0.42	7.46 ± 0.41 ^a	14.53 ± 0.89*	12.83 ± 1.07
PI	5.22 ± 0.44	5.11 ± 0.32	5.13 ± 0.35	4.94 ± 0.43
PE	11.52 ± 0.11	10.39 ± 0.46	15.86 ± 0.72*	15.18 ± 0.93
DGDG	2.98 ± 0.54	2.70 ± 0.48 ^a	4.93 ± 0.65*	4.38 ± 0.63
MGDG	1.18 ± 0.10	2.18 ± 0.30 ^a	7.28 ± 0.75*	7.73 ± 0.62
PIGM	2.43 ± 0.73	6.29 ± 0.56 ^a	2.12 ± 0.26	3.06 ± 0.39
MAG	0.34 ± 0.18	-	-	-
DAG	0.11 ± 0.11	0.47 ± 0.47	-	-
CHO	10.24 ± 0.42	13.61 ± 0.92 ^a	9.27 ± 0.40	10.80 ± 0.74
FFA	4.30 ± 0.72	2.53 ± 0.22 ^a	4.46 ± 0.69	2.74 ± 0.41 ^a
TAG	25.25 ± 1.11	20.42 ± 1.43 ^a	9.54 ± 2.06*	9.73 ± 1.13
EE	10.35 ± 0.49	11.44 ± 1.01	4.61 ± 1.04*	6.40 ± 2.16 ^a
TLP	46.82 ± 1.47	44.53 ± 1.06	67.66 ± 2.50	64.70 ± 2.80
TLN	50.59 ± 1.11	48.49 ± 1.06	27.87± 2.41	29.67 ± 2.53

Los valores de lípidos totales se expresan en porcentajes del peso seco total. Los valores de las clases lipídicas corresponden a sus medias ± D.E. en relación al lípido total. n= Número de muestras, * p<0,05 en relación a las hembras, ^a p<0,05 en relación a la muestra inicial.

No se observaron interacciones entre los dos factores: Sexo y muestreo (ANOVA de dos factores). Los lípidos totales aumentaron en ambos sexos pero se mantuvieron



superiores en hembras que en machos. Los FFA disminuyeron en ambos sexos, TAG y PS también disminuyeron en hembras. Las clases lipídicas que aumentaron fueron EE en machos y MGDG, PIG y CHO en hembras.

3.2.1.3.3. Composición de ácidos grasos en machos y hembras

Los ácidos grasos en gónada en machos y hembras de *D. trunculus* se muestran en la Tabla XL, donde los valores se expresan en porcentaje de ácidos grasos de ésteres de metilo. Los ácidos grasos más abundantes en ambos sexos fueron los ácidos grasos saturados 16:0 y los dos PUFAs 20:5n3 y 22:6n3.



Tabla XL. Composición de ácidos grasos de machos y hembras de coquina (*D. trunculus*).

Fatty acids	Females n=10	Males n=9
13:0	0.53 ± 0.17	0.54 ± 0.21
14:0	6.38 ± 0.31	2.15 ± 0.28 ^a
15:0	0.66 ± 0.03	0.76 ± 0.05 ^a
16:0	16.31 ± 0.35	19.80 ± 0.55 ^a
17:0 DMA	0.47 ± 0.03	0.63 ± 0.05 ^a
17:0	0.80 ± 0.02	1.10 ± 0.05 ^a
17:0 iso	0.73 ± 0.02	0.70 ± 0.03
18:0 DMA	4.93 ± 0.20	5.47 ± 0.61
18:0	5.79 ± 0.12	8.32 ± 0.31 ^a
20:0	0.31 ± 0.02	0.18 ± 0.02 ^a
23:0	0.80 ± 0.03	0.83 ± 0.07
14:1n-5	0.24 ± 0.03	0.02 ± 0.01 ^a
14:1	0.25 ± 0.03	0.44 ± 0.08 ^a
15:1	0.62 ± 0.06	1.16 ± 0.16 ^a
16:1n-9	0.74 ± 0.04	0.55 ± 0.04 ^a
16:1n-7	5.61 ± 0.22	2.61 ± 0.36 ^a
16:1n-5	0.64 ± 0.03	0.47 ± 0.02 ^a
17:1n-7	0.24 ± 0.02	0.40 ± 0.17
18:1n-9	2.56 ± 0.14	2.67 ± 0.16
18:1n-7	3.97 ± 0.12	1.81 ± 0.14 ^a
18:1n-5	0.20 ± 0.03	0.18 ± 0.06
20:1n-11	0.50 ± 0.02	0.37 ± 0.03 ^a
20:1n-9	2.04 ± 0.10	1.75 ± 0.09 ^a
20:1n-7	1.35 ± 0.04	0.79 ± 0.02 ^a
18:2n-6	1.93 ± 0.40	1.91 ± 0.52
20:2n-6	1.74 ± 0.05	1.60 ± 0.06
20:3n-6	0.30 ± 0.01	0.30 ± 0.03
20:4n-6	2.63 ± 0.05	2.63 ± 0.05 ^a
22:4n-6	0.64 ± 0.05	0.82 ± 0.04 ^a
22:5n-6	0.26 ± 0.02	0.76 ± 0.25 ^a
16:2n-4	0.52 ± 0.06	0.42 ± 0.07
16:3n-4	0.39 ± 0.02	0.32 ± 0.04
18:2n-4	0.54 ± 0.02	0.27 ± 0.04 ^a
18:3n-4	0.60 ± 0.06	0.27 ± 0.04 ^a
18:3n-3	1.17 ± 0.04	0.89 ± 0.10 ^a
18:4n-3	2.74 ± 0.10	1.62 ± 0.16 ^a
20:3n-3	0.56 ± 0.02	0.25 ± 0.03 ^a
20:4n-3	1.56 ± 0.07	0.80 ± 0.06 ^a
20:5n-3	6.84 ± 0.16	7.54 ± 0.19 ^a
21:5n-3	0.57 ± 0.03	0.80 ± 0.18
22:5n-3	1.27 ± 0.07	1.96 ± 0.34
22:6n-3	12.59 ± 0.40	16.14 ± 0.53 ^a
22_2i	1.94 ± 0.06	1.31 ± 0.10 ^a
22_2j	0.73 ± 0.04	0.44 ± 0.03 ^a
Σ saturated	32.30 ± 0.41	34.37 ± 0.47
Σ monoenoic	18.95 ± 0.36	13.21 ± 0.71 ^a
Σ polyenoic	38.88 ± 0.60	41.06 ± 0.73 ^a

Los valores corresponden a porcentajes medios ± D.E. n= Número de muestras. DMA: dimetilacetal. ^a p<0,05 en relación a las hembras.



Tanto en machos como en hembras los tres ácidos grasos saturados más abundantes fueron el mirístico (14:0), palmítico (16:0) y esteárico (18:0) aunque sus valores fueron diferentes en ambos sexos. Menores porcentajes de 16:0 y 18:0 (ANOVA, $p < 0,001$) y mayores niveles de 14:0 (ANOVA, $p < 0,001$) se encontraron en hembras en comparación con los machos. Estas diferencias fueron más marcadas para 14:0 y 18:0. Los ácidos grasos saturados totales (SFA) fueron ligeramente superiores en hembras que en machos (ANOVA, $p < 0,001$). Dos dimetil acetales, 17 DMA y 18 DMA se detectaron en ambos sexos en niveles similares. Las diferencias más importantes observadas, en relación al sexo en ácidos grasos monosaturados (MUFA) fueron los altos niveles de 16:1n-7, 18:1n-7 y 20:1n-9 en hembras frente a los machos (ANOVA, $p < 0,001$). El ácido graso 16:1n-7 fue el MUFA predominante en ambos sexos, aunque su valor en hembras duplicó a los machos. En conjunto, los valores totales de MUFA fueron superiores en hembras que en machos (ANOVA, $p < 0,001$).

Como se observa en la Tabla XL, en ambos sexos los ácidos poliinsaturados más abundantes fueron el EPA (20:5n-3), DHA (22:6n-3) y AA (20:4n-6). El porcentaje de todos ellos fue superior en machos que en hembras, resultando estas diferencias significativas, mientras que el ácido graso esencial 18:3n-3 así como el 18:4n-3 y el 20:4n-3 mostraron niveles significativamente superiores en hembras. Los otros ácidos grasos esenciales 18:2n-6 y su derivado 20:2n-6 mostraron valores similares en ambos sexos. Los ácidos grasos poliinsaturados totales (PUFA) fueron superiores en machos que en hembras (ANOVA, $p < 0,001$).

Con el objetivo de evaluar el efecto de la dieta controlada, la composición de ácidos grasos de machos y hembras se analizó después de un mes en el criadero. Toda vez que no se observó interacción entre sexo y dieta (ANOVA de dos vías). Cuando se compararon los machos y hembras mantenidos en el criadero, se pudo observar que para los ácidos grasos más importantes, las diferencias debidas al sexo se mantuvieron. Los niveles de 14:0, 16:1n-7, 18:1n-7, 20:1n-9, 18:4n-3 y 20:4n-3 se mantienen superiores en hembras que en machos, al contrario de lo que ocurre con los valores de 16:0, 20:4n-6 y 22:6n-3. Los porcentajes de EPA, fueron superiores en hembras que en machos después de su mantenimiento en el criadero, pero las diferencias no son significativas.

Como se describió con anterioridad, los ejemplares de ambos muestreos mostraron similares diferencias en los ácidos grasos de gónadas entre machos y hembras, pero además, algunas otras diferencias significativas se encontraron en el perfil de ácidos grasos, cuando se compararon los muestreos para ejemplares del mismo sexo. Como se observa en la figura 103, los cambios más importantes observados fueron los bajos niveles de 20:1n-9, 20:2n-6, 18:3n-3, 18:4n-3, 20:4n-3, 22:5n-3 y los PUFA totales y los valores superiores de 18:1n-7, 20:4n-6 y 20:5n-3 encontrados en ambos sexos en el muestreo inicial, recién traídos del medio natural, cuando se comparan tras un mes de estabulación en el criadero. Además, valores inferiores de 16:0 y mayores porcentajes de 18 DMA se observaron sólo en machos mientras que valores superiores de MUFA totales valores inferiores de 18:1n-9 y 18:2n-6 fueron observados en las hembras. El resto de ácidos no mostró alteraciones o en su caso, cambios de escasa importancia.

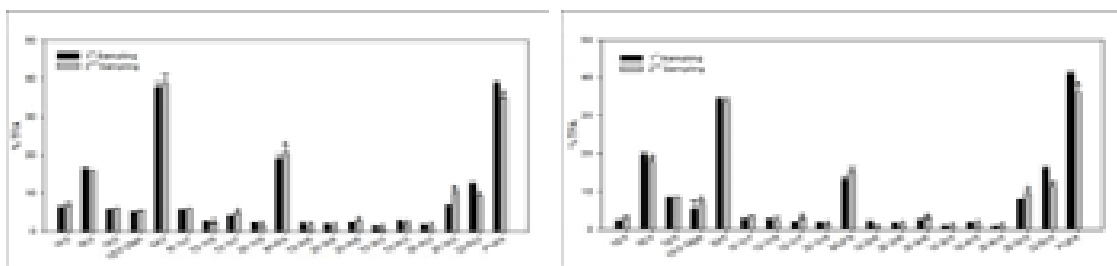


Fig. 103. Perfiles de ácidos grasos de la coquina para machos y hembras.

3.2.1.4. DISCUSIÓN

En general, aunque los valores difieren entre las especies, y están influidos por el ciclo reproductivo y las condiciones ambientales, la clase lipídica más abundante en las especies de bivalvos como en *D. trunculus* son los fosfolípidos, PE en la fracción polar y TAG en la fracción neutra (Pazos *et al.*, 1996, 1997; Soudant *et al.*, 1999; Duinker *et al.*, 2004, Li *et al.*, 2007). En relación a la composición de ácidos grasos, los predominantes son el ácido palmítico, EPA y DHA (Caers *et al.*, 1999; Soudant *et al.*, 1999; Pazos *et al.*, 1997; Saito, 2004; Taylor y Savage, 2006; Alkanani *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2007, Narvaéz *et al.*, 2008), y lo son también en la coquina.

El contenido en lípidos totales de *D. trunculus* es superior en hembras que en machos al igual que otros bivalvos como en los pectínidos *Pecten maximus* (Soudant *et al.*,



1996), *Argopecten purpuratus* (Caers *et al.*, 1999), *Placopecten magellanicus* (Thompson, 1977; Napolitano y Ackman, 1992) y *Crassadoma gigantea* (White *et al.*, 1990). También hemos encontrado diferencias en las clases lipídicas relacionadas con el sexo en *D. trunculus*, siendo el más importante el alto valor de fosfolípidos y los bajos niveles de TAG en machos en comparación con las hembras. En relación con las posibles diferencias en la composición de ácidos grasos entre sexos en *D. trunculus*, hemos observado que los machos mostraron mayores porcentajes de ácido graso saturado mientras que las hembras presentaron mayores niveles de ácidos grasos monoinsaturados. Los porcentajes de los principales ácidos grasos poliinsaturados 20:4n-6, 20:5n-3 y 22:6n-3 son superiores en machos que en hembras de la coquina. Sin embargo, en otras especies, el nivel de 20:4n-6 es normalmente similar en machos que en hembras pero los contenidos de 20:5n-3 y 22:n-3 difieren entre especies. Por ejemplo, los valores de 20:5n-3 son superiores en *P. depressa* y *H. rubra* que en la coquina. Pero inferiores a los de *A. purpuratus* y *P. maximus*, mientras que los valores de 22:6n-3 son semejantes en ambos sexos de *H. rubra* y superiores en hembras de *P. maximus* (Soudant *et al.*, 1996a; Caers *et al.*, 1999; Grubert *et al.*, 2004; Morais *et al.*, 2003).

En suma, se observaron diferencias entre sexos en la composición de ácidos grasos en la coquina, y a raíz de los resultados, estas diferencias pueden deberse a los distintos requerimientos de ácidos grasos en machos y en hembras durante la gametogénesis o en la composición de las gónadas en los ejemplares maduros. Además se ha encontrado influencia de la estabulación en el criadero sobre los ácidos grasos, probablemente relacionadas con la fuente de alimento. La alimentación de reproductores de coquina con *T. suecica* y *C. gracilis* resultó eficaz para la maduración de los individuos, aunque la adición de dinoflagelados en la dieta como fuente de DHA (Joseph, 1975; Servel *et al.*, 1994) puede mejorar la condición de los animales, ya que se ha demostrado que la cantidad de DHA puede afectar a la calidad del huevo y a la supervivencia larvaria (Soudant *et al.*, 1996a, 1996b, 1996c; Berntsson *et al.*, 1997; Utting y Millican 1997, 1998; Caers *et al.*, 1999).



3.2.2. LÍNEA 2. CULTIVO LARVARIO DE *D. TRUNCULUS*

3.2.2.1. MATERIAL Y MÉTODOS

3.2.2.1.1. Ensayo de dietas para la alimentación larvaria de la coquina (*Donax trunculus* Linne, 1758)

Las larvas utilizadas en el experimento se obtuvieron mediante puesta inducida por choque térmico y los tratamientos comenzaron en estado de larva veliger (larva D).

Se establecieron 4 tratamientos por triplicado de dietas para alimentación de larvas de coquina (*D. trunculus*) (Tabla XII).

Tabla XII. Dietas de coquina en el cultivo larvario.

Tratamiento	Dieta
A	<i>I. galbana</i> (T-Iso)
B	<i>T-Iso</i> + <i>S. costatum</i> (SK)
C	<i>T-Iso</i> + SK + <i>C. calcitrans</i> (Cca)
D	<i>T-Iso</i> + <i>T. suecica</i> (TS)

Las dietas se diseñaron tomando como criterio la presencia de alguna diatomea y el posible efecto antibiótico sobre los cultivos de la presencia de *T. suecica* o *S. costatum*. No se consideró la dieta TI+CCa ya utilizada por Ruiz-Azcona *et al.* (1996). La proporción de cada una de las microalgas se determinó en función del peso seco.

La temperatura del agua de cultivo, filtrada 1 μm + U.V, fue de 22°C y el fotoperíodo el natural de esa época del año (mayo-junio). El cultivo se realizó en recipientes de vidrio de 5 L a densidad de 10.000 larvas/L. Cada dos días las larvas se filtraban, se estimó la supervivencia y la talla, y se añadió la alimentación a una densidad de 50 equivalentes de T-Iso en peso seco. Para la adición de *S. costatum* se utilizaron cadenas cortas de células (2-4 unidades). El experimento se extendió hasta el día 23 de cultivo, cuando aparecieron las primeras larvas pediveliger (Louzán, 2008).



3.2.2.1.2. Crecimiento y supervivencia de larvas de *Donax trunculus* (Mollusca, Bivalvia) cultivadas a distintas temperaturas

Durante 2009, como continuación de las experiencias realizadas previamente en larvas de coquina, se ensayó el efecto de 3 temperaturas sobre el crecimiento, la supervivencia y el consumo de algas.

Partiendo de un lote de larvas D procedentes de puesta inducida mediante choque térmico, se repartieron en 12 matraces redondos de 1 litro de capacidad, a una densidad de 8000 larvas L⁻¹. El agua utilizada para los cultivos era previamente filtrada por filtro de 1 micra. La composición del alimento fue una mezcla de 3 microalgas (*I. galbana* T-Iso, *C. gracilis* y *T. suecica*) en proporción de 1:1:1 equivalentes de T-Iso, y la cantidad de fitoplancton suministrado varió entre las 60, 120 y 180 algas μL⁻¹, a lo largo del cultivo larvario. Todos los tratamientos se mantuvieron en oscuridad para reducir el crecimiento de la densidad de las microalgas.

Durante 25 días, hasta alcanzar la fase de pediveliger, se establecieron 3 tratamientos en relación a la temperatura del cultivo larvario: 17, 20 y 24°C. Para ello, los matraces de los diferentes tratamientos se mantuvieron sumergidos en sendos baños con agua que se mantenía a la temperatura deseada mediante recirculación por una bomba de calor. Además, un grupo de 3 matraces se mantuvo sin larvas para cada tratamiento, renovando el agua del cultivo y añadiendo microalgas, con el fin de evaluar el comportamiento del fitoplancton en las condiciones del experimento.

Cada dos días se tomaba una muestra de 1 ml del cultivo larvario para estimar la concentración de microalgas, utilizando un contador Coulter Counter Beckman Multisizer 3. El agua del cultivo era completamente renovada, se evaluaba el crecimiento de las larvas mediante la medición de la talla antero-posterior de 30 larvas y se estimaba la supervivencia mediante muestreo de la densidad de la muestra recogida.



3.2.2.2. RESULTADOS

3.2.2.2.1. Ensayo de dietas para la alimentación larvaria de la coquina (*Donax trunculus* Linne, 1758)

3.2.2.2.1.1. Supervivencia

Las dietas basadas en la combinación de tres especies (C) o en combinación con *Tetraselmis* (D) resultaron las de mayor supervivencia. La dieta basadas en adición exclusiva de *T-Iso* (A) sufrió un incremento de mortalidad a partir del séptimo día cuando esta alimentación es ya claramente insuficiente. La dieta en la que se complementaba el *T-Iso* con una sólo especie de diatomea (*Skeletonema*) (B) también sufrió mortalidad acusada a partir del onceavo día (Fig. 104).

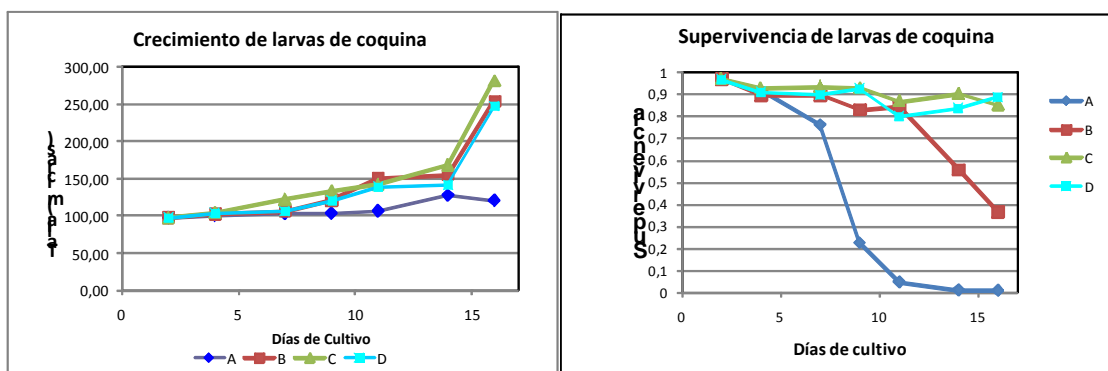


Fig. 104. Crecimiento y supervivencia de larvas de *D. trunculus* sometidas a diferentes dietas. A: *Ti*; B: *Ti+Sc*; C: *Ti+Sc+C*; D: *Ti+Ts*.

3.2.2.2.1.2. Crecimiento

La dieta basada únicamente en *T-Iso* resultó insuficiente, no observándose crecimiento de las larvas a lo largo del experimento. El crecimiento resultó significativamente menor a partir del día 9.

Para todos muestreos, la talla media de las larvas sometidas al tratamiento C (combinación de 3 especies de microalgas) fue significativamente superior a los demás tratamientos (ANOVA, $p < 0,05$).



En general los tres tratamientos de alimentación multiespecífica de larvas de coquina fueron mejores que la dieta basada sólo en *I. galbana*, al igual que lo observado por Ruiz-Azcona (1996). Aunque el crecimiento fue similar en las tres dietas, los resultados de supervivencia permiten concluir que las dietas TI+SK+CCa y TI+TS fueron las mejores para la alimentación de larvas de coquina.

3.2.2.2.2. Crecimiento y supervivencia de larvas de *Donax trunculus* (Mollusca, Bivalvia) cultivadas a distintas temperaturas

Debido a la alta mortalidad que se produjo en todas las réplicas de los matraces a 17°C, los resultados para este tratamiento se refieren sólo a los primeros 12 días de cultivo larvario.

Aunque se mantuvieron todos los matraces en oscuridad durante todo el experimento, en los tratamientos para evaluar la disponibilidad de alimento, se observó un incremento de la concentración de microalgas para todas las temperaturas entre cada cambio de agua (Fig. 105).

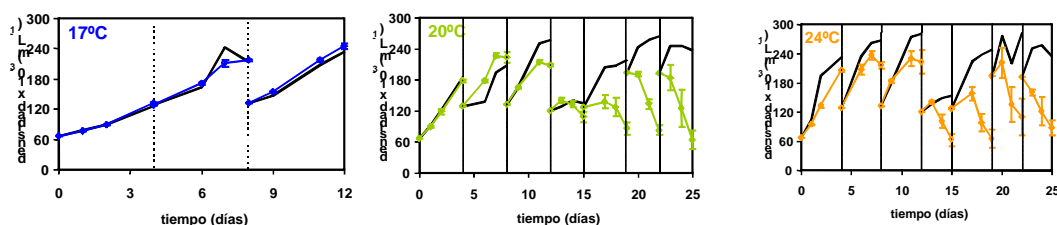


Fig. 105. Evolución temporal de la densidad de algas en cultivos larvarios a distintas temperaturas. — Densidad algal en un cultivo control sin larvas. — Limpieza y cambios del medio de cultivo.

En los matraces con presencia de larvas de coquina, se aprecia, como era de esperar una disminución de la concentración de algas, excepto en el tratamiento de 20°C con larvas de menos de 10 días en los que el aumento de concentración en el cultivo larvario es superior al que se observa sin la presencia de larvas.



Este comportamiento es resultado del balance entre la reproducción de las algas, que parece favorecida por la presencia de larvas, debido a mayor disponibilidad de nutrientes, y el consumo de algas por las larvas. Para el cultivo a 20°C a partir del décimo día se observa un descenso de la concentración de fitoplancton, respecto al control sin larvas ya que el consumo es superior a la producción de algas en oscuridad.

Para los tratamientos de 17 y 24°C en todos los casos, la concentración de algas en el cultivo de larvas es inferior al control, lo que indica un consumo de algas superior a la producción, pero que en los primeros 10 días se manifiesta todavía como un aumento neto de la concentración de algas.

Estos resultados no permiten establecer el consumo real de fitoplancton por parte de las larvas, debido a su aumento de concentración, pero parece indicar que durante los primeros días de cultivo se podría evitar el aporte de nuevo fitoplancton en el medio, ya que la producción de algas permite aportar el alimento necesario. Sin embargo, acumulación de metabolitos y la degradación del medio de cultivo obliga a los cambios periódicos del agua en los cultivos larvarios.

El crecimiento de las larvas fue exponencial durante el experimento para todos los tratamientos. Se observó un crecimiento significativamente superior en los cultivos a 24°C frente a los demás tratamientos, alcanzando la fase de pediveliger (350 micras) en 25 días, aunque la tasa instantánea de crecimiento fue muy similar entre ellos (Fig. 106).

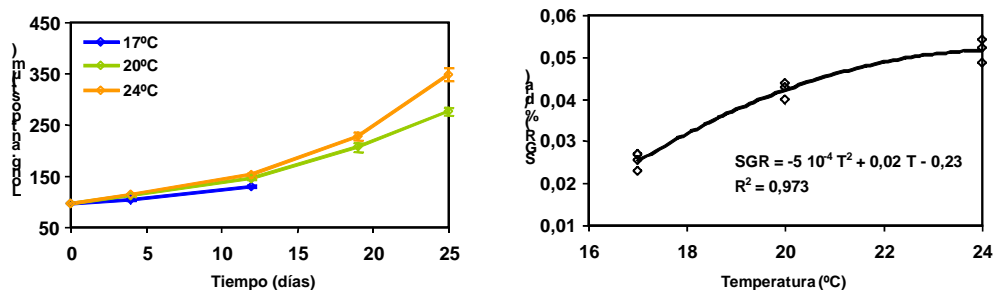


Fig. 106. Crecimiento y supervivencia. A. - Evolución de la media y SD de la talla antero-posterior larvaria. B. - Tasa específica de crecimiento en talla, $SGR = (1/\Delta t) \cdot \ln(L_{FINAL} / L_{INICIAL})$, en función de la temperatura.



Aunque el crecimiento resultó superior en los cultivos a 24°C, también se observó una mayor mortalidad. De hecho a lo largo del experimento se aprecia una disminución constante de la densidad de larvas por litros, que en términos de supervivencia supuso el 25% para el tratamiento a 20°C y del 12,5% para las larvas sometidas a 24°C (Fig. 107). Esta mayor mortalidad en el tratamiento a superior temperatura, permite concluir que, las condiciones idóneas para el cultivo de larvas de *D. trunculus* es de 20°C, ya que un ligero retraso en alcanzar la metamorfosis está compensado con una mayor supervivencia.

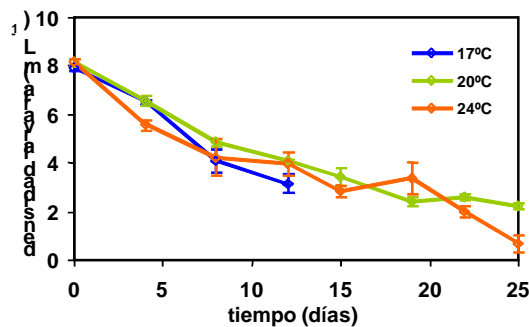


Fig. 107. Evolución de la media y la SD de la densidad larvaria en función de la temperatura.

3.2.3. BIBLIOGRAFÍA

Alkani T.; Parrish C.C.; Thompson R.J.; McKenzie, C.H. 2007. Role of fatty acids in cultured mussels, *Mytilus edulis*, grown in Notre Dame Bay, Newfoundland. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 348: 33-45.

Berntsson K.M.; Jonsson R.R.; Wangberg, S.A.; Carlsson, A.S. 1997. Effects of broodstock diets on fatty acid composition, survival and growth rates in larvae of the European flat oyster, *Ostrea edulis*. *Aquaculture.* 154: 139-153.

Caers M.; Coutteau, P.; Cure, K.; Morales, V.; Gajardo, G.; Sorgeloos, P. 1999. The Chilean scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819): I. Fatty acid composition and lipid content of six organs. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 123: 89-96.

Duinker, A.; Torstensen, B.E.; Lie, O. 2004. Lipid classes and fatty acid composition in female gonads of great scallops. A selective field study. *J. Shellfish Res.* 23: 507-514.

Gaspar, M.B.; Ferreira, C.; Monteiro, C.C. 1999. Growth and reproductive cycle of *Donax trunculus* L., (Mollusca: Bivalvia) off Faro, Southern Portugal. *Fisheries Res.* 41: 309-316.

Grubert, M.A.; Dunstan, G.A.; Ritar, A.J. 2004. Lipid and fatty acid composition of pre- and post-spawning blacklip (*Haliotis rubra*) and greenlip (*Haliotis laevis*) abalone conditioned at two temperatures on a formulated feed. *Aquaculture.* 242: 297-311.



Joseph, J. 1975. Identification of 3, 6, 9, 12, 15-octapentenoic acid in laboratory-cultured photosynthetic dinoflagellates. *Lipids*. 10: 395-403.

Li, D.; Zhang, Y.; Sinclair, A.J. 2007. Seasonal variations of lipid content and composition in *Perna viridis*. *Lipids*. 42: 739-747.

Morais, S.; Boaventura, D.; Narciso, L.; Re, P.; Hawkins, S.J. 2003. Gonad development and fatty acid composition of *Patella depressa* Pennant (Gastropoda: Prosobranchia) populations with different patterns of spatial distribution, in exposed and sheltered sites. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 294: 61-80.

Napolitano, G.E.; Ackman, R.G. 1992. Anatomical distributions and temporal variations of lipid classes in Sea scallops *Placopecten magellanicus* (Gmelin) from George bank (Nova Scotia). *Comp. Biochem. Physiol. B.* 103: 645-650.

Narváez, M.; Freites, L.; Guevara, M.; Mendoza, J.; Guderley, H.; Lodeiros, C.J.; Salazar, G. 2008. Food availability and reproduction affects lipid and fatty acid composition of the brown mussel, *Perna perna*, raised in suspension culture. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 149: 293-302.

Pazos, J.A.; Ruíz, C.; García-Martín, O.; Abad, M.; Sánchez, J.L. 1996. Seasonal variations of the lipid content and fatty acid composition of *Crassostrea gigas* cultured in O Grove, Galicia, N.W. Spain. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 114: 171-179.

Pazos, J.A.; Román, G.; Acosta, C.P.; Sánchez, J.L.; Abad, M. 1997. Lipid classes and fatty acid composition in the female gonad of *Pecten maximus* in relation to reproductive cycle and environmental variables. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 117: 393-402.

Saito, H. 2004 Lipid and fatty acid composition of the Pearl Oyster *Pinctada fucata martensii*: Influence of season and maturation. *Lipids*. 39: 997-1005.

Servel, M.O.; Claire, C.; Derrien, A.; Coiffard, L.; Deroeckhotlzhauer, Y. 1994. Fatty acid composition of some marine microalgae. *Phytochemistry*. 36: 691-693.

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

Soudant, P.; Marry, Y.; Moal, J.; Robert, R.; Quere, C.; Lecoq, J.R.; Samain, J.F. 1996b. Fatty acids and egg quality in great scallop. *Aquaculture International*. 4: 191-200.

Soudant, P.; Marry, Y.; Moal, J.; Robert, R.; Quere, C.; Lecoq, J.R.; Samain, J.F. 1996c. Impact of the quality of dietary fatty acids on metabolism and the composition of polar lipid classes in female gonads of *Pecten maximus* (L.). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 205: 149-163.

Soudant, P.; Van Ryckeghem, K.; Marty, Y.; Moal, J.; Samain, J.F.; Sorgeloos, P. 1999. Comparison of the lipid class and fatty acid compositions between a reproductive cycle in



nature and a standard hatchery conditioning of the pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 123: 209-222.

Taylor, A.C.; Savage, C. 2006. Fatty acid composition of New Zealand green-lipped mussels, *Perna canaliculus*: Implications for harvesting for n-3 extracts. *Aquaculture.* 261: 430–439.

Thompson, R.J. 1977. Blood chemistry, biochemical composition, and the annual reproductive cycle in the giant scallop, *Placopecten magellanicus*, from southeast Newfoundland. *J. Fish. Res. Board. Can.* 34: 2104-2116.

Utting, S.D.; Millican, P.F. 1997. Techniques for the hatchery conditioning of bivalve broodstock and the subsequent effect on egg quality and larval viability. *Aquaculture.* 155: 45-54.

Utting, S.D.; Millican, P.F. 1998. The role of diet in hatchery conditioning of *Pecten maximum* L.: a review. *Aquaculture.* 165: 167-178.

Whyte, J.N.C.; Bourne, N.; Ginther, N.G. 1990. Biochemical and energy changes during embryogenesis in the rock scallop *Crassadoma gigantea*. *Mar. Biol.* 106: 239-244.



3.3. CONCHA FINA (*CALLISTA CHIONE*)

3.3.1. LÍNEA 1. ACONDICIONAMIENTO Y OBTENCIÓN DE PUESTAS

3.3.1.1. INTRODUCCIÓN

El bivalvo *Callista chione* ha sido incluido en el Plan Nacional de Nuevas Especies de Cultivo de Bivalvos en Hatcheries como posible especie de interés comercial. Esta especie se distribuye en las aguas atlánticas y mediterráneas, desde las Islas Británicas hasta la costa marroquí. Vive enterrada en sustratos arenosos en profundidades que oscilan entre la superficie hasta 130 m. Además es una especie económicamente importante en Francia, Portugal, Italia y España. En Andalucía se consume en la región mediterránea siendo un marisco muy apreciado. Como consecuencia de este consumo, sufre una explotación intensa en todo el litoral mediterráneo. Además sus caladeros son objeto de cierres por episodios tóxicos por acumulación debido al consumo de microalgas tóxicas. Por estas razones, la concha fina es objeto de interés en acuicultura con fines de cultivo y de repoblación.

Este estudio representa el primero que se centra en las condiciones de los reproductores de *C. chione*, analizando el efecto de la ración de alimento en la gametogénesis.

3.3.1.2. MATERIAL Y MÉTODOS

3.3.1.2.1. Influencia de la talla sobre la supervivencia en la aclimatación de los reproductores

Durante la primavera de 2006 se estabularon reproductores de esta especie en las instalaciones del Centro IFAPA *Agua del Pino* para observar su aclimatación a las condiciones de laboratorio. Se recibieron 276 ejemplares que se clasificaron en 3 clases de talla (grandes - >60 mm, medianas - 40 < L < 60 mm y pequeñas - <40 mm). Se dispusieron en sendos tanques de 200 litros en circuito abierto con un flujo de 3-4 litros/min, agua a 20°C y alimentación mediante aporte de mezcla de microalgas compuesta por *T. suecica*, *I. galbana*, *C. gracilis* y *P. tricornutum*.



Estos individuos se estabularon durante 2 meses, observándose una importante mortalidad en este método de estabulación. Periódicamente se extraían algunos ejemplares para obtener una valoración del desarrollo gonadal, mediante incisión en la gónada, frotis y observación al microscopio.

Cuando los individuos aparecieron maduros se les sometió a puesta inducida en un baño calentado a 28°C. Antes de la inmersión de los ejemplares en el agua fueron sometidos a dos choques térmicos previos, consistentes en mantener los reproductores durante una hora en seco a temperatura ambiente y otro lote a su inmersión en agua con hielo durante 15 minutos. Estos se compararon con el procedimiento normal en el que los ejemplares se extraen del tanque de acondicionamiento y se sumergen en el agua calentada.

3.3.1.2.2. Análisis de sistemas de estabulación para *Callista chione* (L., 1758)

El objetivo de los primeros experimentos realizados ha sido determinar cuál es el mejor sistema de estabulación de *Callista chione* para conseguir los índices más bajos de mortalidad y así poder acondicionarlos para la puesta en condiciones controladas. Para ello se trajeron al IFAPA Centro *Agua del Pino*, 400 individuos desde la costa de Málaga y se dispusieron en tres lotes de 133 individuos que supusieron una carga de 6 kg por tratamiento. Uno de los lotes se dispuso en 10 bolsas de malla suspendidas desde una barra sobre un tanque de 200 litros, un segundo lote en diez cestillos incluidos en los tanques y por último otro lote con las conchas finas enterradas en un sustrato de arena media, que ocupaba toda la extensión del tanque. La temperatura en todos los casos fue la natural proveniente del mar, de aproximadamente 20°C. Los animales se mantuvieron durante seis semanas en la primavera del 2007, diariamente se contaban los ejemplares muertos de cada lote.



Fig. 108. Sistemas de estabulación de concha fina.

3.3.1.2.3. Acondicionamiento de reproductores de concha fina (*Callista chione*) en relación a la temperatura

Se estabularon un total de 1.200 individuos de talla media de 58,4 mm en 6 tanques de 500 litros de capacidad con una superficie de 1,13 m², considerando 2 tratamientos y tres réplicas por tratamiento. Se rellenaron con un horizonte de arena media lavada de 15-20 cm. El aporte de agua fue en circuito abierto con filtración a 25 µm y un flujo de 2 litros/min.

La alimentación fue mediante un aporte continuo de fitoplancton proveniente de una mezcla de algas formada por *Tetraselmis suecica*, *Skeletonema costatum*, *Chaetoceros gracilis* y *Pavlova lutheri*.

Se testaron dos temperaturas del agua para el acondicionamiento de los reproductores: temperatura natural directamente del tanque de decantación de la instalación y 18°C.

En la figura 109 se representan las temperaturas de los dos tratamientos que tuvieron un valor medio de 20,95±2,08 y 18,83±1,19 (media±DE).



semanas durante 8 semanas, se tomaron 15 individuos para análisis histológicos y otros 15 para obtener el índice de condición que fue calculado como:

CI= peso seco de carne (mg)/longitud(AP)³ (mm).

Coincidiendo con cada muestreo se tomaron 50 individuos del medio natural (grupo control) y se llevaron al laboratorio para comparar con los del experimento.

3.3.1.2.4.1. Análisis histológicos

Para los análisis histológicos se fijaron los individuos sin el manto en solución Davidson durante 48 horas y después fueron deshidratadas en alcohol 70%, entonces se incluyeron en parafina y se seccionaron con un microtomo a 5 µm, los tejidos se tiñeron con hematoxilina y eosina. Se observaron las secciones histológicas bajo un microscopio óptico para identificar el sexo y etapa de desarrollo gametogénico. La etapa asignada a cada espécimen fue acorde con lo establecido por Gaspar y Monteiro (1998), que incluyó 6 fases de desarrollo: Etapa 0, inactivo/reposo; Etapa I, inicio de maduración; Etapa II, madurando; Etapa III, maduro; Etapa IV, puesta; Etapa V, post-puesta. Nosotros hemos añadido una nueva etapa que fue descrita por Alfaro *et al.* (2001) para *Pinna canaliculus*, la etapa de reorganización (Etapa IVR), los folículos no ocupan todo el área de manto disponible y los oocitos restantes se encuentran aislados en el folículo. Nuevos oocitos son visibles a lo largo de la pared folicular. Se evidencia más tejido colectivo en esta etapa que anteriormente en la puesta inicial.

Siempre que dos o más etapas ocurrieron simultáneamente en una misma sección, el criterio de decisión de la etapa se basó en la condición de la mayor parte de la preparación.



3.3.1.2.4.2. Diámetro del oocito

Se midió el diámetro mayor de 30 oocitos de cada hembra de una fotografía tomada con una cámara en un microscopio óptico usando el software Imagen. Se tomaron tres fotografías por hembra y se midieron 10 oocitos en cada fotografía.

3.3.1.2.4.3. Análisis estadístico

Se realizaron análisis estadísticos por ANOVA de una vía y post-hoc Tukey tests. Previo a desarrollar test paramétricos, se probó la asunción de normalidad con el test de Kolmogorov-Smirnov. Se usó el software Sygmastat (v 3.5) para los análisis.

3.3.1.2.4. Inducción a la puesta

Debido a que los métodos de valoración son invasivos, se optó por realizar puestas con individuos recibidos. Se utilizó una bandeja de 100 litros de capacidad en la que se calentaba el agua a la temperatura deseada (Fig. 110), mientras que se disponía de otra con hielo para los choques de temperaturas bajas.



Fig. 110. Bandeja de inducción a la puesta con reproductores de concha fina.



Cronológicamente se sometió a diversos lotes de reproductores a diferentes métodos de choque térmico, tal como se describen en la siguiente tabla XIII.

Tabla XIII. Métodos de inducción a la puesta empleados en la concha fina en condiciones controladas.

Tratamiento previo	Tiempo	Choque térmico (°C)	2º choque	3º choque	4º choque
4 °C	15'	27	20	27	
Hielo	15'	27	20	27	
8 °C	18 h	19	28		
Hielo	15'	19	28		
Hielo	15'	28			
Hielo	15'	28	20	28	
En seco	1 h	30	10	30	
En seco	1 h	26	10	30	
4 °C	30'	30	Alimentación		
4 °C	30'	26	Alimentación		
Hielo	15'	28			
		26	30	28	4 (15')

3.3.1.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1.3.1. Influencia de la talla sobre la supervivencia en la aclimatación de los reproductores

Durante el acondicionamiento se produjo una importante mortalidad de reproductores más acusada durante los 10 primeros días (Fig. 111). La mortalidad fue mayor para los ejemplares mayores (> 60 mm) y en todos los casos se estabilizó durante los siguientes 20 días, para volver a aparecer posteriormente episodios de mortalidades hasta alcanzar el 100%. Al igual que para la C.A. de Cataluña, en nuestro caso se empieza a observar un debilitamiento de los adultos que se traduce en la apertura de las valvas, para terminar muriendo días después. Teniendo en cuenta que los individuos de esta especie tienen ya maduración sexual al segundo año, parece más apropiado utilizar para el acondicionamiento y puesta ejemplares de entre 40 y 60 mm, que coincide con la talla estimada de primera maduración, de 51 mm (Moura *et al.*, 2008).

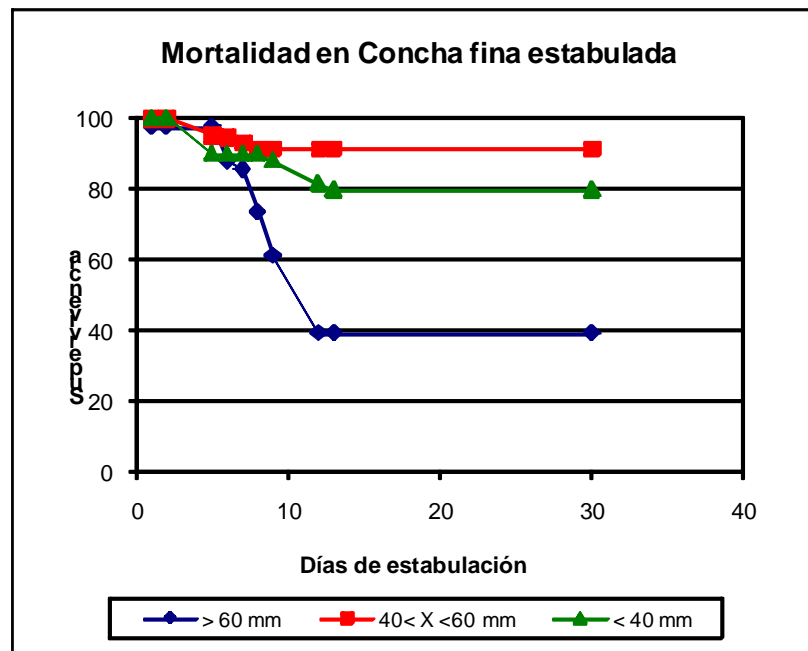


Fig. 111. Mortalidad de concha fina estabulada en tanques en relación al tamaño.

Los dos ensayos de puestas inducidas realizados, utilizando en ambos casos los 3 métodos descritos no dieron resultados satisfactorios, no observándose emisión de gametos.

Como resultado de los ensayos realizados se hizo mas hincapié en los métodos de estabulación de los reproductores con el fin de poder realizar posteriormente ensayos de métodos de inducción.

3.3.1.3.2. Análisis de sistemas de estabulación para *Callista chione* (L., 1758)

La mortalidad total de los lotes alcanzó el 73% (Fig. 112), de este porcentaje el 74,75% provenía de animales colocados en cestillos, el 24,91% del sistema de bolsas y el 0,34% corresponde a los que estaban enterrados en la arena. Al hallar por separado el porcentaje de individuos muertos y vivos en cada sistema de estabulación se observó que en arena sobrevivieron más del 90% mientras que en los cestillos murió el 80% (Fig. 112). El sustrato utilizado ha sido arena media, procedente de sustratos de filtros arena, compuesto por granos limpios de sílice. Este sustrato es fácil de limpiar y sustituir, por lo que este sistema de estabulación resulta adecuado para el mantenimiento en criadero de esta especie. En los siguientes años se utilizó este sustrato en bandejas de 40 litros de



capacidad para la estabulación de concha fina con resultado de supervivencia muy altos, lo cual indica que en circuito abierto el volumen del sistema de mantenimiento de reproductores no ha sido determinante.

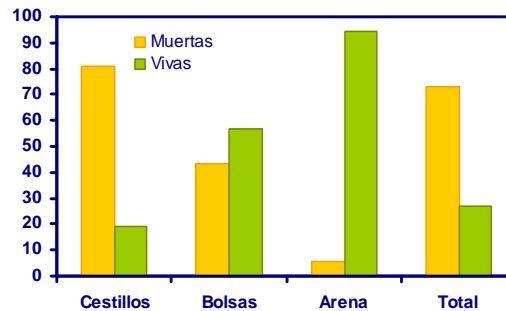


Fig. 112. Mortalidad observada en relación al sistema de estabulación de concha fina.

3.3.1.3.3. Acondicionamiento de reproductores de concha fina (*Callista chione*) en relación a la temperatura

Según resultados previos recogidos de la bibliografía (Tirado *et al.*, 2002), en el litoral sur-mediterráneo esta especie parece encontrarse en un estado de maduración constante a lo largo del año, observándose individuos en maduración, otros en puesta y algunos en postpuesta. En este sentido, los datos del primer muestreo mostraron ya la presencia de gónada en los ejemplares pero con avanzado grado de maduración. El objetivo de la experiencia era favorecer la maduración sexual de los reproductores con el fin de obtener puestas abundantes durante un período del año y obtener la suficiente maduración de la gónada como para que la concha fina responda de diferentes métodos de inducción a la puesta.

Los resultados de los índices de condición mostraron una muy escasa oscilación de los valores de este parámetro a lo largo de los muestreos y para los dos tratamientos ensayados (Fig. 113).

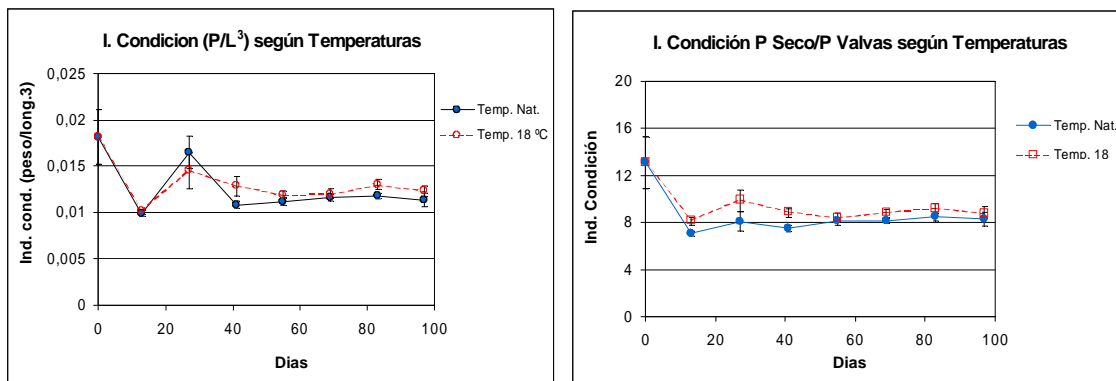


Fig. 113. Evolución de los índices de condición de concha fina sometidas a 2 temperaturas. Se comparan dos métodos de cálculo del índice de condición.

En la inducción a la puesta, se optó por obtener nuevos ejemplares adultos del medio natural debido a que en los frotis de gónada, se obser varon espermias no móviles y ovocitos sin desarrollo completo.

Los ejemplares recibidos del medio presentaron viariabilidad en su estado de maduración, observándose después de sacrificarlos, algunos con una gónada visible y que cubría la masa visceral, mientras que otros se encontraban casi vacios. La observación de frotis al microscopio hizo patente esta misma dispersión con ejemplares en productos sexuales maduros y otros en desarrollo incipiente.

Durante 2008 se ha optado por recibir reproductores antes de la época de máxima maduración (noviembre-diciembre) y acondicionarlos a 20°C de temperatura del agua y alimentación abundante. La estabulación se realiza en tanques de 200 litros con sustrato de arena. En este sistema no se han producido mortalidades destacables y en el desagüe de los tanques se ha instalado un colector para la recogida de puestas espontáneas, sin que se hayan recogido. En este año se ensayarán otros sistemas de inducción.

3.3.1.3.4. Efecto de la dieta en el acondicionamiento de *Callista chione* en criadero

Los cambios en el índice de condición de tres grupos estudiados se muestran en la figura 114. El valor de CI aumentó en el grupo A de 0,0105 al inicio del experimento hasta 0,0126 al final, sin embargo en el grupo B ocurrió lo contrario, CI disminuyó desde 0,0105



a 0,0086. El CI en el grupo C (grupo control) tendió a caer pero aumentó ligeramente en los dos últimos muestreos, de hecho los últimos valores de CI fueron mayores que estos en el grupo B pero menores que estos en el grupo A. Las diferencias a través del experimento fueron significativas en el grupo A (ANOVA $p < 0,001$) pero en el grupo B y C no fueron significativas. Cuando los valores de CI fueron comparados entre los tres grupos en cada muestreo, se encontraron diferencias significativas (ANOVA $p < 0,05$) entre el grupo A y B y entre A y C pero no entre B y C.

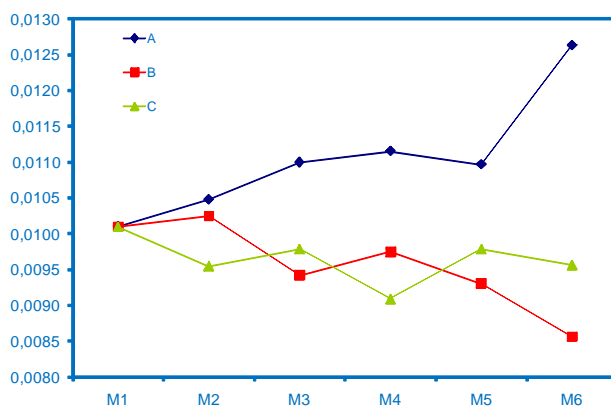


Fig. 114. Valores de los índices de condición (CI) en los tres grupos a lo largo del experimento.

Los porcentajes de individuos de los que se obtuvo la etapa gonadal, después de analizar histológicamente las secciones en machos y hembras por separado, están representados en las figuras 115 y 116.

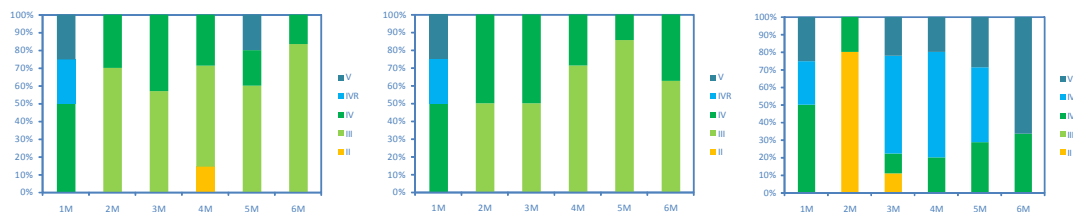


Fig. 115. Porcentaje de los diferentes estados gonadales en hembras. II Activo, III Maduro, IV Puesta parcial, IVR Redesarrollo, V Postpuesta. Tratamientos A, B y C, consecutivamente.

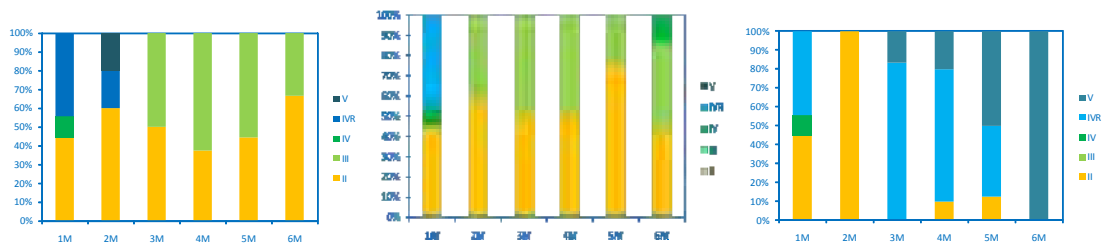


Fig. 116. Porcentaje de los diferentes estados gonadales en machos. II Activo, III Maduro, IV Puesta parcial, IVR Redesarrollo, V Postpuesta. Tratamientos A, B y C, consecutivamente.

Al inicio del experimento la mayor parte de las hembras estaban en la etapa de puesta (IV) o en la etapa de reorganización (IVR) pero dos semanas después, todos ellos estaban madurando o maduros en ambos tratamientos de alimentación (grupos A y B), mientras que los del grupo control estaban en puesta o post-puesta. La tendencia en los siguientes grupos fue similar en ambos grupos siendo la etapa II y III dominante, sin embargo 60 días después, el porcentaje de hembras maduras fue mayor en el grupo A que en el B. Mientras que en el grupo control la etapa gonadal fue muy diferente, los especímenes estaban en los últimos estadios de desarrollo (etapa IV, IVR y V) durante todo el período de estudio, en realidad el 100% de las hembras estaban en post-puesta al término del experimento.

La etapa gonadal en machos a lo largo del experimento fue similar en los grupos A y B. De hecho, el porcentaje de individuos maduros (etapa III) fue el mayor desde el segundo muestreo aunque fueron también detectados animales en etapa IV. Mientras que los machos en el grupo C estaban la mayoría en etapa de reorganización y post-puesta desde el principio. Durante los primeros 30 días la etapa de reorganización dominó aunque el 70% de los especímenes estaban en la etapa post-puesta (etapa V) al final del experimento. En este grupo no se observó ningún macho maduro.

La evolución del diámetro del oocito en los tres grupos durante el período de estudio muestra que, los valores en los grupos de criadero (A y B), incrementaron rápidamente y de forma similar en los primeros 15 días, de hecho los oocitos crecieron más de 20 μm en este período. Esto significa que los valores se mantuvieron durante todo el experimento en el grupo A, pero disminuyeron entre 8 y 11 μm en el grupo B en los dos



últimos muestreos; a este punto, las diferencias entre el diámetro del oocito de ambos grupos fue significativa (ANOVA $p < 0.001$, Tukey $p < 0.001$). El tamaño del oocito mostró una tendencia diferente en el grupo C, los valores medios fueron significativamente más bajos de los observados en los grupos A y B durante el período de estudio. El diámetro medio del oocito disminuyó ligeramente en el grupo C durante 45 días pero cayó de 42.91 μm a 25.86 μm al final del experimento, coincidiendo con la dominancia de la etapa post-puesta.

Tras 45 días de experimento los animales de los dos ensayos fueron inducidos a la puesta con choques térmicos pero el resultado fue negativo en ambos casos. Los individuos reaccionaron filtrando rápidamente pero no liberaron gametos.

Hay muchos estudios que se han centrado en determinar cómo las condiciones ambientales (temperatura, salinidad, fotoperíodo, alimento, etc.) afectan a los procesos reproductivos en bivalvos, ya que juega un papel crítico en el cultivo de cualquier especie. En este estudio, el efecto de la ración de alimento en las condiciones de los reproductores de *Callista chione* han sido estudiadas por primera vez durante 60 días usando técnicas histológicas normalizadas, indicadores cuantitativos (diámetro de oocito) e índice de condición.

El CI en el grupo A muestra una tendencia creciente durante todo el período de estudio, sin embargo en los otros dos grupos ocurrió lo contrario, donde los valores de CI decrecieron, sobre todo en el grupo B cuyos individuos fueron alimentados con una ración de alimento menor. No obstante, los resultados histológicos revelan que la etapa de desarrollo no difiere entre ambos grupos de criadero, estando machos y hembras en las etapas maduras, a pesar de las diferencias significativas en el CI. Por otro lado es destacable que los individuos del grupo C estén en las últimas etapas de desarrollo, la mayoría de ellos en la etapa de post-puesta, pero su CI es similar al del grupo B. La dominancia de la etapa de post-puesta en el grupo C coincide con los datos obtenidos por Tirado *et al.* (2002), en este estudio la mayoría de los individuos estaban en la etapa de puesta y post-puesta en mayo y junio, cuando nuestro estudio se llevó a cabo. Sin embargo, los valores de CI son algo diferentes, siendo nuestros resultados siempre menores que los



de Tirado *et al.* (2002). Se han publicado varios estudios referentes a bivalvos, normalmente hay una correlación entre el CI y el ciclo gametogénico, altos valores de CI coinciden con la etapa madura y un decrecimiento en los valores de CI con la liberación de gametos (Gaspar y Monteiro, 1998; Ceballos-Vázquez *et al.*, 2000; Tirado *et al.*, 2002; Moura *et al.*, 2008; Mohite *et al.*, 2009). Sin embargo los resultados obtenidos en el grupo B muestran lo contrario, y valores bajos de CI coinciden con etapas activas y maduras. Varios estudios (Villarejo y Ceballos, 1996; Martínez y Mettifogo, 1998; Luna *et al.*, 2000) han demostrado que muchos bivalvos son capaces de almacenar energía en el tejido muscular y otros tejidos como la glándula digestiva, y pueden transferir estas reservas a la gónada durante la gametogénesis, aunque este fenómeno no es universal en los bivalvos (Racotta *et al.*, 2001). Así, la maduración de la gónada de *C. chione* en criadero bajo condiciones de baja concentración de alimento puede explicarse si tiene capacidad de transferir nutrientes de otros tejidos del cuerpo a la gónada, aunque deberían realizarse más experimentos en este sentido.

El tamaño del oocito ha sido usado para evaluar el desarrollo gametogénico en algunas especies de bivalvos como *Crassostrea gigas* (Lango-Reinoso *et al.*, 2000), donde se propone una escala basada en estos datos, o *Ruditapes philippinarum* y *Ruditapes decussatus* (Delgado y Pérez-Camacho, 2007), en ambas especies el diámetro del oocito está directamente influenciado por la temperatura, con altas temperaturas se producen mayores oocitos. En este estudio se ha detectado que cuando el diámetro del oocito es observado en los tres grupos durante el experimento, se detectan diferencias significativas entre ellos. El grupo A tiene siempre los valores más altos mientras que, el grupo C, muestra los más bajos. Este hecho coincide con las diferencias observadas en CI y proporcionalmente a la etapa de desarrollo. El tamaño del oocito en el grupo B incrementa al inicio, pero decrece bruscamente al final coincidiendo con el decrecimiento en los valores de CI, aunque, como se mencionó anteriormente los individuos estaban madurando o maduros y la proporción en la etapa de desarrollo apenas cambia durante el período de estudio. La disminución puede deberse probablemente a diferencias en la ración de alimento coincidiendo con Thompson *et al.* (1996) que publicó que el desarrollo de los gametos en bivalvos de clima templado podría estar relacionado con la abundancia de



alimento y temperatura, en nuestro caso la temperatura no es la causa ya que es la misma en ambos ensayos.

Se ha demostrado que la cantidad de alimento es un factor esencial en el acondicionamiento de los reproductores bivalvos, de hecho Sastry (1968) y Heasman *et al.* (1996) demostraron que el tamaño de la gónada y la fecundidad están fundamentalmente determinados por la cantidad de comida disponible. En el presente estudio se usó la ración recomendada por Utting y Millican (1998) y se encontraron diferencias significativas en los valores de CI y el tamaño del oocito. Aunque la inducción fue negativa en ambos casos, las diferencias observadas nos permiten pensar que efectivamente, una alta ración de alimento influencia positivamente en la reproducción de *Callista chione*. Sin embargo, una dieta del 3% es suficiente para que los individuos maduren, pero el acondicionamiento de los individuos parece no ser tan bueno para obtener exitosamente una puesta de gametos cuando se le induce por choque térmico.

En resumen, hemos acondicionado adultos de *Callista chione* por primera vez en criadero proporcionando diferentes raciones en un período de 45 días. Hemos observado que la ración del 6% produce un mayor índice de condición que la ración del 3%. No obstante, en ambos casos, los animales son capaces de madurar sus gónadas aunque el tamaño de los oocitos es mayor en hembras alimentadas con una ración mayor. Por lo tanto parece que *Callista chione* puede transferir nutrientes de otras partes del cuerpo cuando la ración no es suficiente. Mientras que los animales del medio natural estaban en etapas de puesta y post-puesta, últimas etapas del ciclo reproductivo.

3.3.1.3.5. Inducción a la puesta

En ningún caso se obtuvieron resultados positivos de emisión de gametos por los reproductores, aunque en algunos tratamientos sí se observó un comportamiento de filtración activa.



Además de los métodos descritos se optó por la posibilidad de realizar el método de la escarificación, es decir, sacrificar a algunos ejemplares y extraer de ello los productos sexuales. Una vez realizado este ensayo tampoco se obtuvieron ovocitos fecundados.

3.3.2. BIBLIOGRAFÍA

Alfaro, A.C.; Jeffs, A.G.; Hooker, S.H. 2001. Reproductive behavior of the green-lipped mussel, *Perna canaliculus*, in Northern New Zealand. *Bull. Mar. Sci.* 69: 1095-1108.

Ceballos-Vázquez, B.; Arellano-Martínez, M.; García Domínguez, F.; Villalejo-Fuerte, M. 2000. Reproductive cycle of the rugose pen shell, *Pinna rugosa* Sowerby, 1835 (Mollusca: Bivalvia) from Bahía Concepción, Gulf of California and its relation to temperature and photoperiod. *J. Shell. Res.* 19: 95-99.

Dao, J.C. ; Barret, J.; Devauchelle, N.; Fleury, P.G.; Robert, R. 1996. Rearing of scallops *Pecten maximus* in France, from hatchery to intermediate culture: results of a 10-year programme (1983–1993). In: in Gajardo, G. Coutteau, P. (eds). *Improvement of the commercial production of marine aquaculture species. Proceedings of a Workshop on Fish and Mollusc Larviculture*. Impresora Creces, Santiago, Chile, pp.121–134.

Delgado, M.; Pérez-Camacho, A. 2007. Comparative study of gonadal development of *Ruditapes philippinarum* (Adams and Reeve) and *Ruditapes decussatus* (L.) (Mollusca: Bivalvia): Influence of temperature. *Sci. Mar.* 71: 471-484.

Devauchelle, N.; Mingant, C. 1991. Review of the reproductive physiology of the scallop, *Pecten maximus* applicable to intensive aquaculture. *Aquat. Living. Resour.* 4: 41-51.

García, N. 2005. Influencia de los parámetros ambientales en el ciclo gametogénico de la vieira *Nodipecten* (= *Lyropecten*) *nodosus* (L. 1758). *Tesis de maestría en Biología Aplicada*. Univ. de Oriente. Cumaná, Venezuela, 52 pp.

Gaspar, M.B.; Monteiro, C.C. 1998. Reproductive cycles of the razor clam *Ensis siliqua* and the clam *Venus striatula* off Vilamoura, southern Portugal. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 78: 1247-1258.

Heasman, M.P.; O'Connor, W.A.; Frazer, A.W. 1996. Temperature and nutrition as factors in conditioning broodstock of the commercial scallop *Pecten fumatus* Reeve. *Aquaculture*. 143: 75-90.

Lango-Reynoso, F.; Chávez-Villalba, J.; Cochard, J.C.; Le Pennec, M. 2000. Oocyte size, a means to evaluate the gametogenic development of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture*. 190: 183-199.

Lodeiros, C.; Rengel, J.J.; Guderley, E.H.; Nusetti, O.; Himmelman, J.H. 2001. Biochemical composition and energy allocation in the tropical scallop *Lyropecten*



(*Nodipecten*) *nodosus* during the months leading up to and following the development of gonads. *Aquaculture*. 169: 63-72.

Luna, A.; Cáceres, C.; Zúñiga, C.; López, S.; Ceballo, P. 2000. Reproductive cycle of *Argopecten ventricosus* (Sowerby, 1842) (Bivalvia: Pectínidae) in the Rada del Puente de Pichilingüe, B.C.S., México and its relation to temperature, salinity and food. *J. Shell. Res.* 19: 107-112.

Martínez, G.; Mettifogo, L. 1998. Mobilization of energy from adductor muscle for gametogenesis of the scallop, *Argopecten purpuratus* Lamarck. *J. Shell. Res.* 17: 113-116.

Martínez, G.; Aguilera, C.; Mettifogo, L. 2000. Interactive effects of diet and temperature on reproductive conditioning of *Argopecten purpuratus* broodstock. *Aquaculture*. 183: 149-159.

Mohite, S.A.; Mohite, A.S.; Singh, H. 2009. On condition index and percentage edibility of the shortneck clam *Paphia malabarica* (Chemnitz) from estuarine regions of Ratnagiri, west coast of India. *Aquacult. Res.* 40: 69-73.

Moura, P.; Gaspar, M.B.; Monteiro, C.C. 2008. Gametogenic cycle of the smooth clam *Callista chione* on the south-western coast of Portugal. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 88: 161-167.

Pronker, A.E.; Nevejan, N.M.; Peene, F.; Geijssen, P.; Sorgeloos, P. 2008. Hatchery broodstock conditioning of the blue mussel *Mytilus edulis* (Linnaeus 1758). Part I. Impact of different micro-algae mixtures on broodstock performance. *Aquacult. Int.* 16: 297-307.

Racotta, I.; Ramírez J.L.; Ibarra, A.M.; Rodríguez-Jaramillo, M.C.; Carreño D.; Palacios, E. 2003. Growth and gametogenesis in the lion-paw scallop *Nodipecten* (*Lyropecten*) *subnodosus*. *Aquaculture*. 217: 335-349.

Sastry, A.N. 1968. The relationships among food, temperature, and gonad development of the bay scallops, *Aequipecten irradians* Lamarck. *Physiol. Zool.* 41: 44-53.

Tirado, C.; Salas, C.; López, J.I. 2002. Reproduction of *Callista chione* L., 1758 (Bivalvia: Veneridae) in the littoral of Málaga (Southern Spain). *J. Shell. Res.* 21: 643-648.

Thompson, R.; Newell, R.; Kennedy, V.; Mann, R. 1996. *Reproductive processes and early development*. En: Kennedy, V.; Newell, R.; Eble, A. (eds), *The Eastern Oyster Crassostrea virginica*, Maryland Sea Grant Books, Maryland, pp. 335-370.

Utting, S.D.; Millican, P.F. 1998. The role of diet in hatchery conditioning of *Pecten maximus* L.: a review. *Aquaculture*. 165: 167-178.

Velasco, L.A.; Barros, J. 2007. Potential for hatchery broodstock conditioning of the Caribbean scallops *Argopecten nucleus* and *Nodipecten nodosus*. *Aquaculture*. 272: 767-773.



C.A. Andalucía-Subproy. 3. Técnicas de cultivo en criadero de longuerón (*S. marginatus*), coquina (*D. trunculus*) y concha fina (*C. chione*)

Villalejo, M.; Cevallos, B. 1996. Variación de los índices de condición general, gonádico y de rendimiento muscular en *Argopecten circularis* (Bivalvia: Pectinidae). *Rev. Biol. Trop.* 44: 591-594.