

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA

ESCUELA SUPERIOR DE CIENCIAS MARINAS

ACONDICIONAMIENTO DE ADULTOS DE Mytilus  
californianus (MOLLUSCA:BIVALVIA): ALI-  
MENTACION Y SU EFECTO EN LA MADUREZ  
SEXUAL.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE OCEANOLOGO  
PRESENTA:

EUGENIO DE JESUS CARPIZO ITUARTE

Ensenada, B.C., Mayo de 1983.

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer al Oc. Carlos Cáceres M. por su impulso inicial; al Oc. Eliseo Almanza H., por su apreciable colaboración personal y revisión del manuscrito. A la Oc. Imelda Lagos por su participación durante el trabajo experimental, así como a los compañeros Oc. Guillermina Chi Barragán y Oc. Paulino Rojas Guiot por su valiosa orientación para la realización del tratamiento histológico. Por último al Instituto de Investigaciones Oceanológicas (UABC), gracias al cual fué posible realizar el presente trabajo.

## RESUMEN

Se realizaron experimentos de alimentación con el mejillón Mytilus californianus, como experiencia preliminar para implementar una técnica de acondicionamiento con la finalidad de obtener gametos. Se llevaron a cabo dos experimentos, el primero, manteniendo mejillones en laboratorio con diferentes concentraciones de alimento y el segundo, con diferentes dietas. El efecto del alimento sobre la madurez gonadal se evaluó histológicamente. Los resultados histológicos se compararon con el índice gonadal porcentual. No se encontró relación directa entre la concentración de alimento y la madurez gonadal, ni entre el tipo de alimento suministrado y la maduración gonadal. Sin embargo las concentraciones y las diferentes dietas de alimento proporcionadas, no tuvieron un efecto negativo en el estadio de madurez de los organismos a lo largo del período experimental. Se observó un comportamiento diferente en los machos en relación con las hembras, en su condición reproductiva a lo largo de los experimentos. No se encontró correlación entre el índice gonadal porcentual y el índice gonadal medio de Seed, por lo que se recomienda utilizar criterios histológicos para evaluar madurez en M. californianus.

## INDICE

	págs.
I. Introducción.	1
II. Antecedentes.	4
1. El organismo.	4
2. Alimentación.	6
3. Maduración gonadal.	10
III. Objetivos.	14
IV. Metodología.	15
1. Muestreo y transporte.	15
2. Sistema de cultivo.	15
3. Experimento A. Desarrollo gonadal a concentraciones diferentes de una misma dieta.	20
4. Experimento B. Desarrollo gonadal con diferentes dietas.	22
5. Tratamiento histológico.	23
V. Resultados.	28
1. Experimento A. Desarrollo gonadal a concentraciones diferentes de una misma dieta.	28
2. Experimento B. Desarrollo gonadal con diferentes dietas.	37
VI. Discusión.	51
1. Desarrollo gonadal con diferentes concentraciones.	51
2. Desarrollo gonadal con diferentes dietas.	53
3. Relación del <u>índice gonadal porcentual</u> y el <u>índice gonadal medio de Seed</u> .	55
VII. Conclusiones.	60

	págs.
VIII. Recomendaciones.	. . . . 61
IX. Referencias.	. . . . 62

## INDICE DE FIGURAS

	págs.
1. Principales órganos de <u>Mytilus californianus</u> . . . . .	5
2. Sistema de alimentación en <u>Mytilus edulis</u> . . . . .	7
3. Sistema reproductor en <u>M. californianus</u> . . . . .	11
4. Localización del área de muestreo . . . . .	16
5. Sección de acondicionamiento de adultos de <u>M. cali-</u> <u>fornianus</u> . Proyecto Bivalvos de B.C. . . . .	17
6. Sistema de acondicionamiento de adultos de <u>M. cali-</u> <u>fornianus</u> . . . . .	19
7. Canales experimentales durante el experimento A . . .	21
8. Variación del índice gonadal medio de Seed (IGMS) durante el experimento A. . . . .	36
9. Variación del IGMS por sexos durante el experimento A. . . . .	38
10. Variación del IGMS durante el experimento B . . . . .	46
11. Variación del IGMS por sexos durante el experimento B. . . . .	48
12. Comparación del índice gonadal medio de Seed con el índice gonadal para el experimento A. . . . .	56
13. Comparación del IGMS con el índice gonadal para el experimento B. Dietas 1, 2 y 3. . . . .	57
14. Comparación del IGMS con el índice gonadal para el experimento B. Dietas 4 y 5. . . . .	58

INDICE DE TABLAS

	(págs.)
I. Estadios de madurez observados para el inicio del periodo de aclimatación. Experimento A . . . .	29
II. A-B. Estadios de madurez para la fase inicial e intermedia con $10 \times 10^3$ cel/ml. Experimento A . . . .	30
II. C. Estadios de madurez para la fase final con $10 \times 10^3$ cel/ml. Experimento A. . . . .	31
III. A. Estadios de madurez para la fase inicial con $30 \times 10^3$ cel/ml. Experimento A. . . . .	31
III. B-C. Estadios de madurez para la fase intermedia y final con $30 \times 10^3$ cel/ml. Experimento A. . . . .	32
IV. A-B. Estadios de madurez para la fase inicial e intermedia con $60 \times 10^3$ cel/ml. Experimento A. . . .	33
IV. C. Estadios de madurez para la fase final con $60 \times 10^3$ cel/ml. Experimento A. . . . .	34
V. Resultados de la prueba U de Mann-Whitney para el experimento A. . . . .	39
VI. Estadios de madurez para la fase inicial durante el experimento B. . . . .	41
VII. Estadios de madurez para la fase final con la dieta 1. Experimento B. . . . .	42
VIII. Estadios de madurez para la fase final con la dieta 2. Experimento B. . . . .	42
IX. Estadios de madurez para la fase final con la dieta 3. Experimento B. . . . .	43
X. Estadios de madurez para la fase final con la dieta 4. Experimento B. . . . .	43
XI. Estadios de madurez para la fase final con la dieta 5. Experimento B. . . . .	44

	págs.
XII. Resultados de la prueba U de Mann-Whitney para los diferentes tratamientos dietéticos. Experimento B. .	47
XIII. Resultados de la prueba U de Mann-Whitney para los organismos machos entre los diferentes tratamientos dietéticos. Experimento B. . . . .	50

## I. INTRODUCCION

La práctica de la acuicultura, se cree que tuvo sus orígenes en las civilizaciones orientadas hacia el mar, donde el pescado y los mariscos formaban parte de su alimentación. Dentro de ésta, el cultivo de moluscos es ya bastante antiguo; el cultivo de ostras por ejemplo, data desde la antigua Roma (Bardach et al, 1972).

A través del tiempo, la acuicultura se ha venido incrementando con el fin de proporcionar nuevas fuentes de alimento de alto valor proteico (Bardach et al, op. cit.). En relación con el cultivo de moluscos, existe ahora una buena cantidad de investigaciones referentes al tema, como los trabajos de Bayne y Thompson (1970); Bayne et al. (1975); Tsuchiya (1980); Epifanio (1979); Gabbott y Walker (1971); Korringa (1976); Loosanoff y Davis (1963a); Walne (1966, 1970a, 1974) entre otros. La importancia de su cultivo radica en que "los moluscos se encuentran entre los más eficientes convertidores de proteínas vegetales (algas), a proteínas animales" (Pruder et al, 1976).

A pesar de lo anterior, a los mitílidos no se les había prestado mucha atención. El único país con tradición en su cultivo es Francia, en donde los primeros intentos fueron llevados a cabo por un marinero irlandés en el año 1235. Actualmente los avances técnicos han permitido que el cultivo sea uno de los más productivos en agua salada y se lleve a cabo además, en países como España y Filipinas (Bardach et al, 1972).

En Baja California, existen grandes poblaciones del mejillón Mytilus californianus, el cual en algunas regiones es intensamente explotado, por lo que se hace necesario pensar en la posibilidad de su cultivo a nivel comercial como alternativa al deterioro de las poblaciones (HIO., 1979).

Una parte sobresaliente dentro del cultivo de moluscos es la obtención de semilla (Loosanoff y Davis, 1963a), que puede ser por medio de colectores en el medio natural durante la época de desove o mediante su producción en el laboratorio, para lo cual es necesario mantener adultos maduros en el período en que no se encuentren grávidos, para garantizar de esta forma la producción de larvas durante el año, como lo afirman Kinne (1970) y Walne (1966).

Estudios realizados sobre acondicionamiento de adultos bivalvos se han llevado a cabo por Loosanoff y Davis (1963a). En particular para M. californianus la cantidad de trabajos es menos extensa en relación con otros bivalvos; algunos de los trabajos existentes sobre varios aspectos de su biología y fisiología son los de Elvin (1974); Wright y Stephens (1977); Breese et al. (1963); Young (1942); Rojas y Santiago (1982) y Bartlett (1972) entre otros.

Por otra parte, permanece la necesidad de elaborar una técnica para mantener adultos de M. californianus en el laboratorio, que permita la obtención de gametos cuando en el medio natural no se encuentran maduros. De aquí que el presente trabajo tenga como parte de su objetivo, la realización de experimentos preliminares para la elaboración de la técnica. Se hace énfasis en la evaluación de la madurez de los organismos por medio de cortes histológicos, como una manera de afi-

nar los resultados obtenidos con el índice gonadal reportado por Lagos (1982), para los mismos mejillones utilizados en el presente estudio.

El trabajo forma parte del proyecto Bivalvos de Baja California, estudios básicos de dos especies en vías de extinción seccion Mytilus californianus (mejillón). Se realizó en el Instituto de Investigaciones Oceanológicas (UABC), dentro del período 1979-1983.

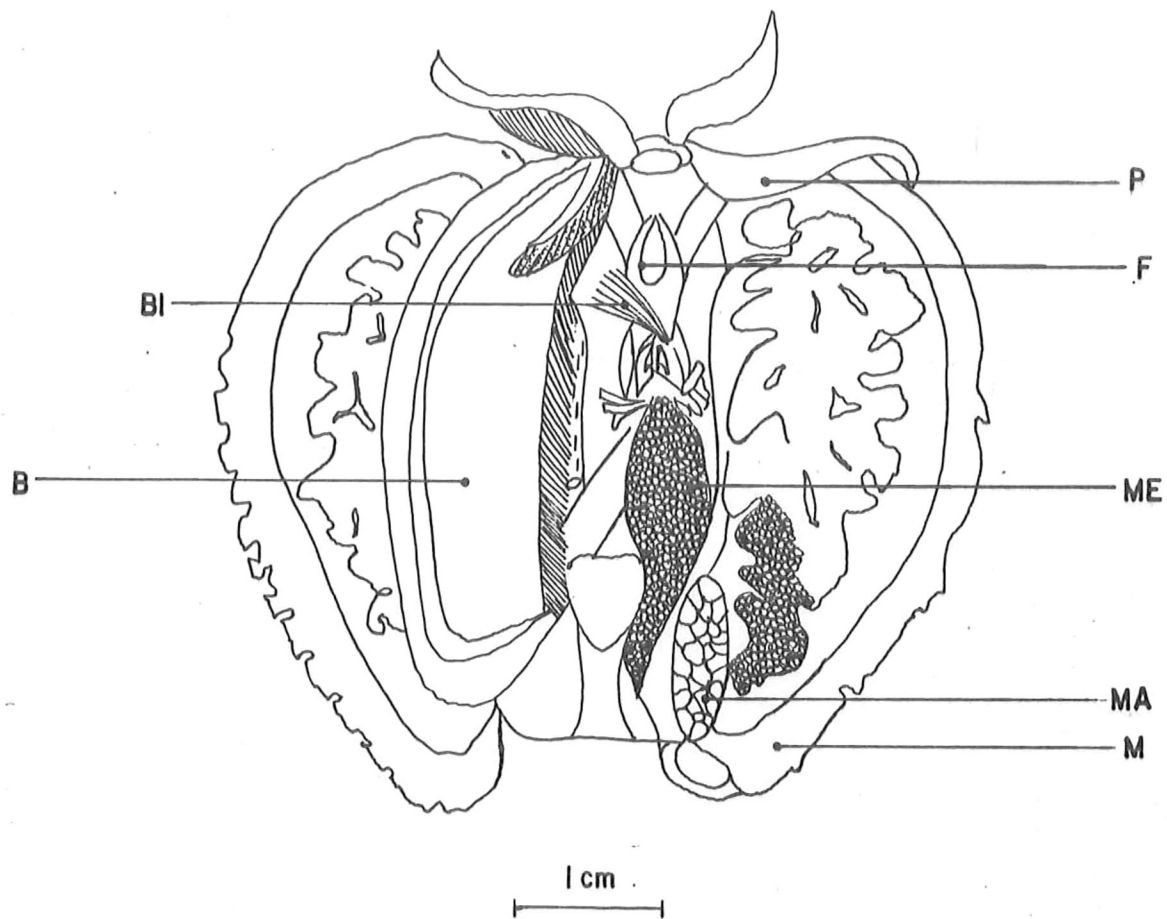
## II. ANTECEDENTES

### 1. El organismo.

El mejillón Mytilus californianus es un molusco bivalvo perteneciente a la familia Mytilidae y se distribuye geográficamente a lo largo de la costa del Pacífico, desde las islas Aleutianas hasta México (Bayne, 1976). Habita la zona de entre mareas en sustrato rocoso, al cual se sujeta por medio del biso. La adherencia de los filamentos del biso a la roca se realiza con ayuda del pie. La formación de filamentos es una manera de observar el grado de actividad del organismo (Van Winkle Jr., 1970).

En los períodos de marea baja, durante el cual los mejillones quedan al descubierto, cierran las valvas por medio de un par de músculos aductores, de los cuales el más sobresaliente es el posterior (fig. 1). Dadas estas condiciones de tensión fisiológica, los mejillones llegan a soportar rangos bastante amplios de condiciones heterosmóticas. Lo anterior fué observado por Fox et al. (1936), quienes concluyen que con aeración suficiente el rango de salinidad soportable se encuentra entre 17 y 45%. El sistema de alimentación es por medio de filtración (Bayne, 1976), la cual se realiza a través de las branquias; el alimento es conducido por los palpos a la boca, los cuales se encargan a su vez de evitar que se acumule alimento en las branquias (Bayne, op. cit.).

Su aparato reproductor consta básicamente de un par de gónadas situadas entre las branquias y la cavidad paleal, - las cuales contienen una serie de folículos con células reproductoras; se comunican al exterior por medio de un con-



P - palpo

BI - biso

F - pie

ME - mesosoma conteniendo gónada

B - branquia

MA - músculo aductor posterior

M - manto

Figura 1. Vista ventral de los principales órganos de Mytilus californianus. (tomado de Elvin, 1974).

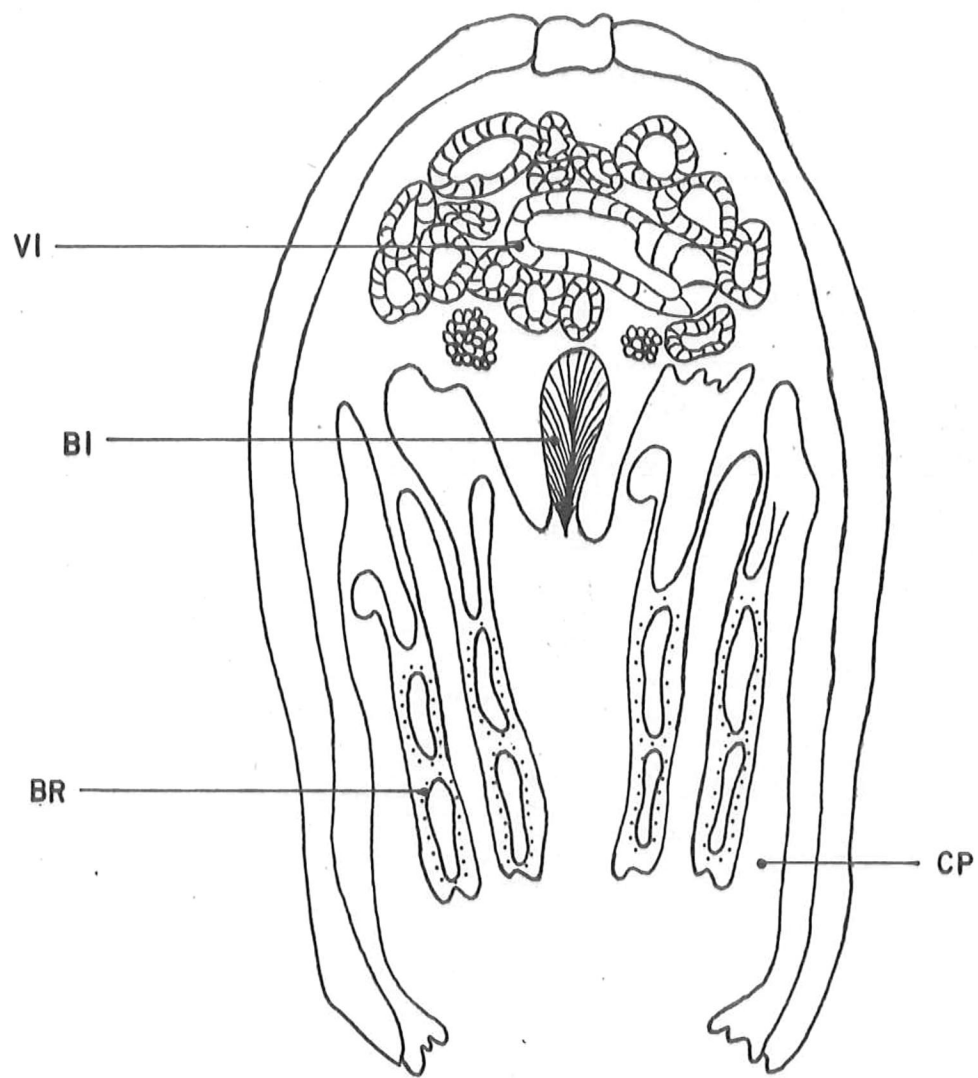
ducto denominado gonoducto y se abren al final en lo que se conoce como apertura genital (Elvin, 1974).

Su época reproductiva es situada por distintos autores a lo largo de diferentes períodos del año. Trabajos recientes realizados por Rojas y Santiago (1982) con mejillones de la misma zona, sitúan los períodos de desove de mayor intensidad entre diciembre y enero, abril y mayo, julio y agosto.

## 2. Alimentación.

En cuanto a los factores más sobresalientes en el manejo de adultos bivalvos en laboratorio, la generalidad de los autores coincide en que la cantidad de alimento disponible y la temperatura, son los que tienen mayor influencia en su desarrollo, algunos trabajos que hacen referencia a lo anterior son los de Sastry y Blake (1971); Bayne (1976); Walne (1966, 1974); Kinne (1970); Bayne y Thompson (1970); Winter y Langton (1975).

Los mitílidos como ya se mencionó, son organismos filtro-alimentadores y estudios histológicos indican que pueden retener partículas de unas cuantas micras (Kinne, 1970). El sistema de alimentación en M. californianus es muy similar al descrito por Bayne (1976) para M. edulis (fig. 2), consta de una serie de branquias formadas por cuatro pares de semibranquias con dos lamelas cada una. Un sistema de cilios en las lamelas provoca el flujo del agua, que penetra a la cavidad paleal por medio de un sifón. Las partículas de alimento son retenidas en una corriente mucosa, para luego ser pasadas a la boca.



VI - vísceras      BI - bisco  
BR - branquias    CP - cavidad paleal

Figura 2. Vista transversal de las branquias en Mytilus edulis (tomado de Bayne, 1976).

El mejillón M. californianus es un animal que digiere constantemente (Olive, 1936). Respecto al tipo de alimento existen diversas opiniones, pero se acepta que el fitoplancton forma parte importante en la composición de su dieta como lo afirman Epifanio y Mootz (1976) y Ukeles (1969). En relación con lo anterior, estudios realizados por Buley (1936) con M. californianus, mostraron que los dinoflagelados desnudos contribuyen en gran manera al abastecimiento de su alimento.

En el cultivo de bivalvos se han venido utilizando de manera particular algunas especies de microalgas, entre las que destacan: Tetraselmis suecica, Isochrysis galbana, Monochrysis lutheri y Cyclotella nana, ésta última con problemas para su cultivo masivo (Kinne, 1970). Su utilización se basa en los buenos resultados obtenidos en el crecimiento de bivalvos en condiciones de cultivo, como lo muestran los trabajos realizados por Walne (1963, 1966, 1974); Flaak y Epifanio (1978); Sung (1964); Loosanoff y Murray Jr. (1973). Con respecto a la composición química del fitoplancton, Parsons et al. (1962) reportan que tiene una composición similar cuando crece bajo condiciones físicas y químicas semejantes. Estudios realizados por Walne (1963) con Ostrea edulis, mostraron que el valor alimenticio de M. lutheri es semejante al obtenido con I. galbana; los resultados se obtuvieron tomando como referencia el crecimiento de las ostras.

Además del tipo de alimento, es importante conocer la cantidad necesaria para poder proporcionar una ración adecuada. Winter y Langton (1975) mostraron que para M. edulis existe un óptimo en la concentración de alimento suministrado, después del cual la eficiencia en el crecimiento decrece. Anteriormente Walne (1974), concluye que la acumulación de alimen

to no digerido era una muestra de excesivo material en suspensión, lo cual ocasiona que se obstruya el mecanismo de alimentación. La misma conclusión fué obtenida por Loosanoff y Murray Jr. (1973) trabajando con el mejillón Perna canaliculus.

Fox (1936) reporta que la cantidad de materia fecal decrece considerablemente en M. californianus, cuando la cantidad de alimento es pequeña. Por otra parte Bayne et al. (1975), en sus trabajos con M. edulis, observaron una reducción en la fecundidad después de haber mantenido a los animales en tensión fisiológica, con bajas raciones de alimento.

Es importante además de la cantidad, tener en cuenta la perioricidad y el tamaño del alimento; al respecto Langton y Mckay (1974) trabajando con Crassostrea gigas, mostraron que usando períodos de seis horas con alimento, seis horas sin alimento se logró un máximo de crecimiento. Epifanio y Ewart (1977) en estudios realizados con Crassostrea virginica, encontraron que la cantidad de alimento ingerido fué inversamente proporcional al tamaño del alga suministrada.

La manera más común de conocer la cantidad de alimento ingerido en el caso de bivalvos, es estimando su actividad filtradora; utilizando para ésto, la razón de filtración, que se define según Bayne (1976) como "el volúmen de agua limpiado de partículas por unidad de tiempo", siendo afectada por el tamaño de la partícula, la concentración, la temperatura y la latitud entre otros factores (Widdows y Bayne, 1971; Epifanio y Ewart, 1977; Winter, 1973; Riisgard y Mohlenberg, 1979; Rao, 1953). Estudios recientes en M. californianus fueron realizados por Lagos (1982).

### 3. Maduración Gonadal.

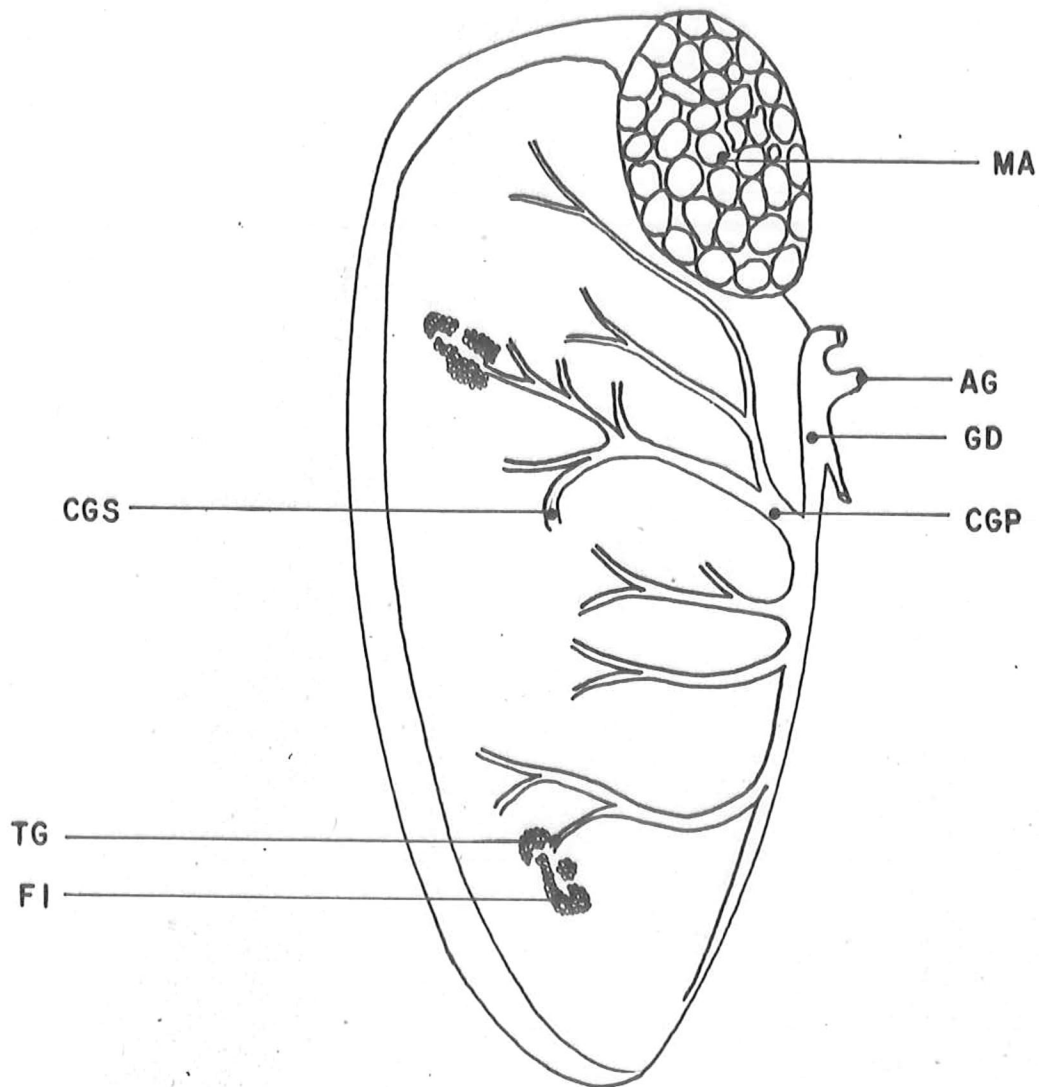
Dada la importancia que tiene la biología reproductiva de bivalvos, tanto en consideraciones ecológicas como de acuicultura, existen bastantes trabajos que hacen referencia a la madurez gonadal, entre los que se pueden citar los de Coe (1943); Tranter (1957); Chipperfield (1953); Lagos (1982); Lucas (1975); Raven (1958); Elvin (1974); Rojas y Santiago (1982); Ruddy et al. (1974) y Loosanoff y Davis (1963a).

En los bivalvos, las gónadas se originan de un grupo de células situadas en la porción posterior del cuerpo (Coe, 1943), y constan de un sistema de túbulos ramificados llamados folículos (fig. 3); el número y tamaño de éstos depende del estado de desarrollo de la gónada.

El exámen de las gónadas en M. californianus realizado por Coe y Fox (1942), mostró que la madurez sexual se alcanza cuando el individuo llega a una talla de 25mm, lo que equivale aproximadamente a cuatro meses de edad. Una vez alcanzada la madurez, el número de desoves en una estación depende en parte de la temperatura y el alimento suministrado (Walne, 1974).

Por otra parte, los ciclos estacionales de la utilización y almacenamiento de glucógeno, refleja la compleja interacción entre el alimento disponible y la temperatura, y entre el crecimiento y el ciclo reproductivo (Bayne, 1976).

Elvin (1974), haciendo experimentos con M. californianus utilizando alimento marcado, encontró que para gónadas maduras en desove parcial, aproximadamente el 10% del material alimenticio fué transferido a la gónada a los tres días de



AG- apertura genital.

GD - gonoducto.

TG - tubo gonadal

FI - folículos.

MA - músculo aductor posterior.

CGP - canal gonadal primario.

CGS - canal gonadal secundario.

Figura 3. Vista lateral del sistema reproductor en el manto de *M. californianus*. (tomado de Elvin, 1974).

suministrado el alimento. Esto le hizo suponer que el control de la razón de transferencia de alimento a la gónada está regulado por la razón de crecimiento del oocito. Lo anterior fué observado también por Sastry y Blake (1971), trabajando con Aequipecten irradians.

Bayne (1976), resumiendo el trabajo de varios autores, afirma que el ciclo estacional de la utilización y almacenamiento de reservas de glucógeno, está íntimamente ligado al ciclo reproductivo anual. El mismo autor concluye, que un incremento en la temperatura tiende a incrementar el costo energético (gametogénesis, alimentación, consumo de oxígeno). Cuando la gametogénesis está procediendo a una razón baja, pero la razón de filtración es alta, un aumento en la temperatura infla marcadamente la razón metabólica elevando el costo de la gametogénesis; en contraste, cuando la gametogénesis esta activa, un incremento en la temperatura acelera la función y limita la capacidad del organismo a aclimatarse. Refiriéndose a lo anterior, Lubet (1959) agrega que una elevación lenta de la temperatura mejora el proceso de la gametogénesis.

Para verificar el estado de madurez gonadal, se han adoptado básicamente dos criterios. El primero, se basa en observar cambios de relación entre la gónada y la carne a lo largo del período de madurez, utilizando índices como el índice gonadal. Es el caso de los trabajos de Gabbott y Stephenson (1974); Bayne y Thompson (1970) y Walne (1966). El segundo, es por medio de cortes histológicos, teniendo como base "la sucesión de estadios durante el desarrollo gonadal a los cuales puede atribuirse un grado determinado de madurez" (Christiansen et al, 1973), para lo cual se han desarrollado escalas como

la de Chipperfield (1953) y Seed (1975), siendo éste último criterio el más adecuado para estudiar el desarrollo gonadal, como lo mencionan Elvin (1974) y Christiansen et al. (1973).

### III. OBJETIVOS

Se plantea la realización de experimentos preliminares con Mytilus californianus en condiciones de laboratorio, con el fin de elaborar una técnica para mantener adultos maduros, que provean de material sexual en los períodos que no sea posible obtenerlo del medio.

El objetivo particular de éste trabajo, es observar el desarrollo gonadal en condiciones de laboratorio manteniendo organismos con concentraciones diferentes de una misma dieta, y con concentraciones iguales de diferentes dietas, evaluando la madurez de los mismos por medio de cortes histológicos.

#### IV. METODOLOGIA

##### 1. Muestreo y Transporte.

Los mejillones fueron colectados de las poblaciones que se encuentran en el ejido Eréndira, Baja California, situado a  $31^{\circ} 19' 30''$  N y  $116^{\circ} 26' 03''$  W, ochenta kilómetros al sur de la ciudad de Ensenada. Este lugar forma parte de la zona de estudio del proyecto Bivalvos de B.C., sección Mytilus californianus (mejillón), (fig. 4).

Se colectaron un total de 134 organismos de los cuales 64 (colectados en febrero de 1981) fueron destinados al experimento A, y 70 (colectados en mayo de 1981) para el experimento B. La colecta se realizó a mano utilizando tijeras para cortar el biso. Fueron transportados en seco al laboratorio para evitar el desove; y limpiados de organismos incrustados en la concha. Posteriormente fueron introducidos al sistema de cultivo, habiendo igualado previamente la temperatura de los recipientes a la temperatura en que se encontraron en el mar. Se trabajó con una talla de  $9.0 \pm 1.0$  cm considerando que "los organismos más grandes responden con mayor rapidez al inducirlos al desove" (Loosanoff y Davis, 1963a) y que "aunque M. californianus alcanza la madurez sexual a una talla de 2.5 cm, no es hasta los 7 cm que ocurre el primer desove sustancial" (Coe y Fox, 1942).

##### 2. Sistema de Cultivo.

Los experimentos fueron realizados dentro del laboratorio de acuicultura del proyecto Bivalvos de B.C., sección "mejillón", en el área de acondicionamiento de adultos (fig. 5).

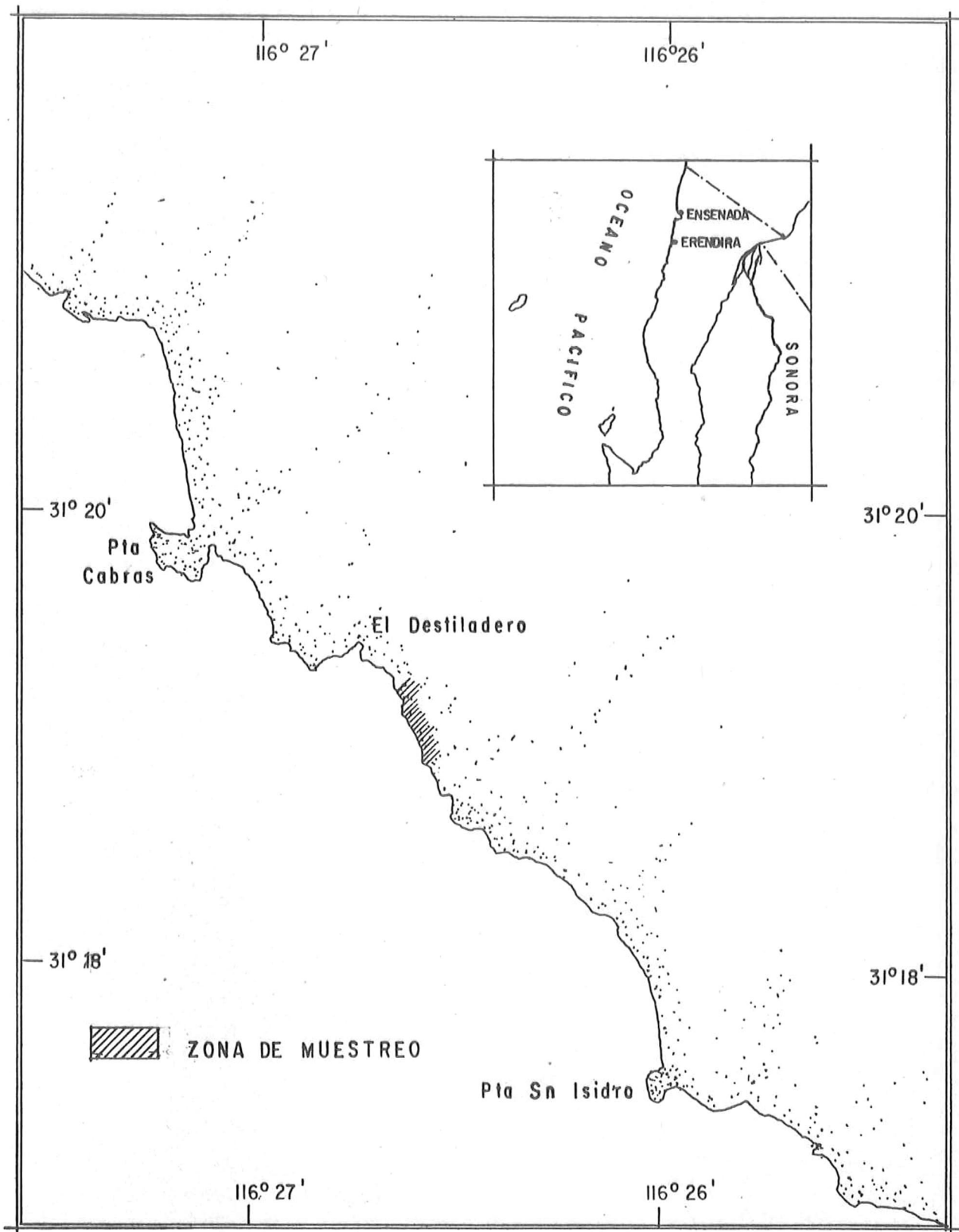
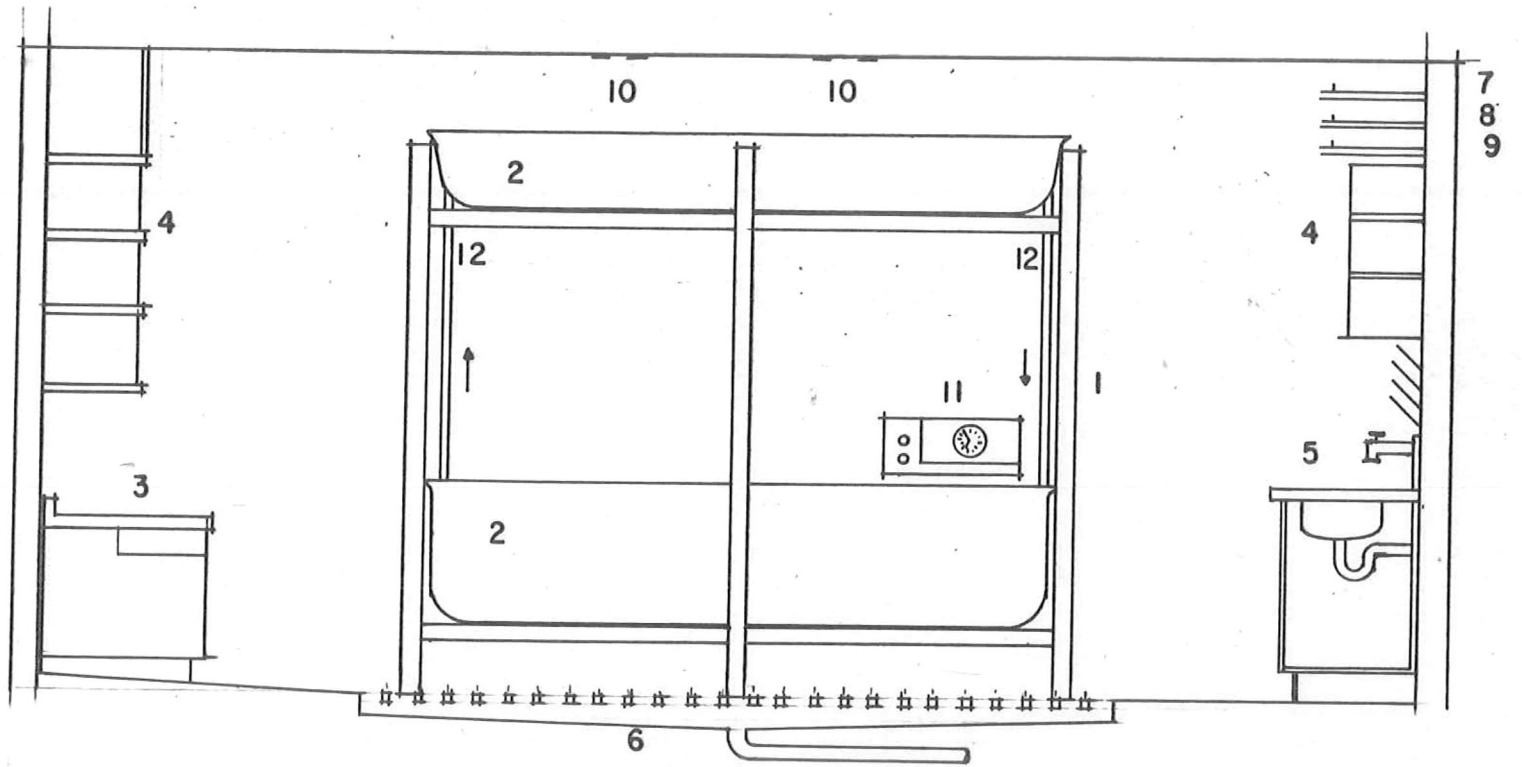


Figura 4. Localización del area de muestreo de Mytilus californianus para los trabajos realizados en el laboratorio.



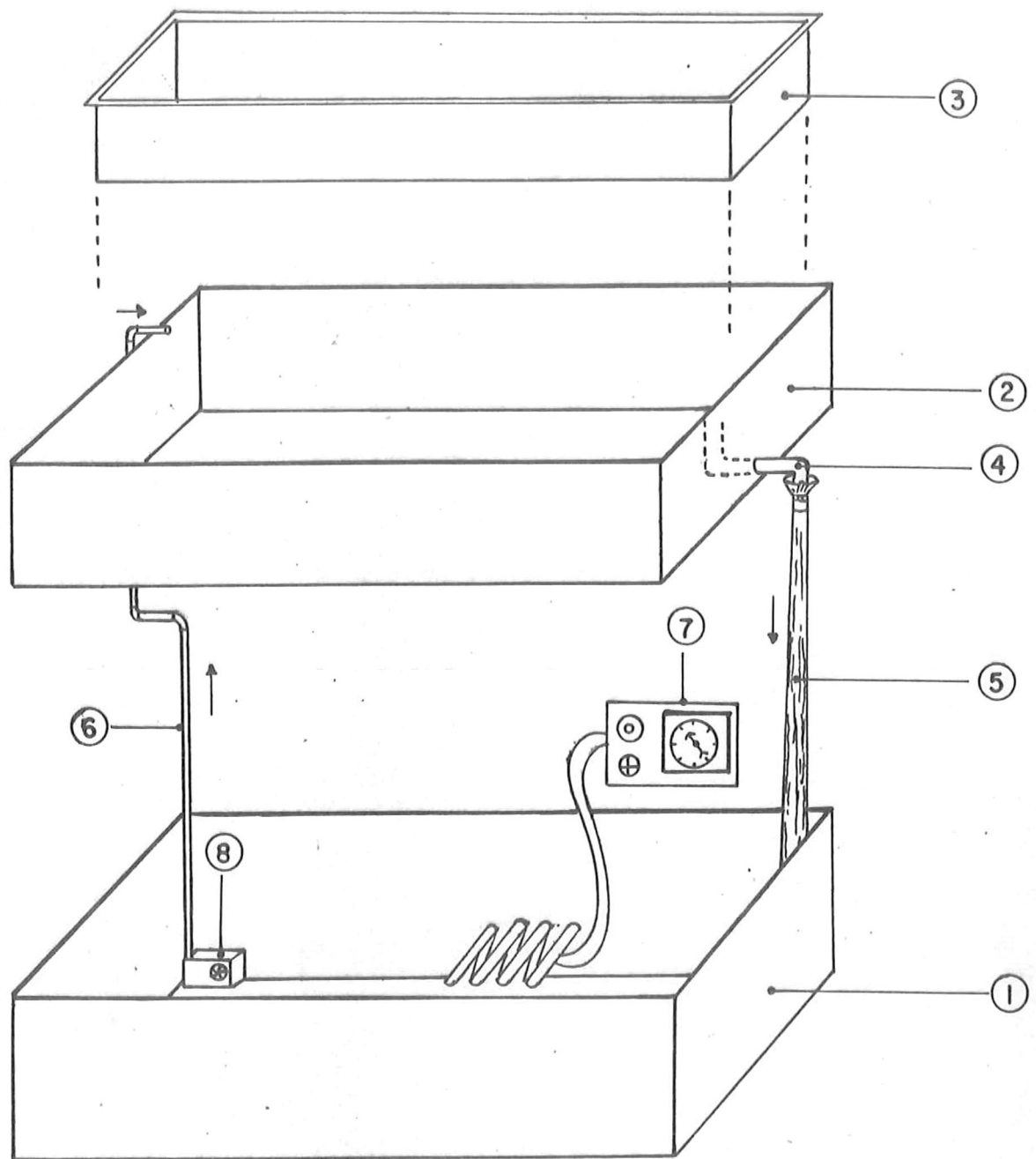
- |                       |                          |                             |
|-----------------------|--------------------------|-----------------------------|
| 1. armazón de acero   | 5. lavadero              | 9. tubería de agua de mar   |
| 2. tanques baño maría | 6. drenaje               | 10. tomas eléctricas (110v) |
| 3. mesa de trabajo    | 7. tubería de aire       | 11. enfriador               |
| 4. estantes           | 8. tubería de agua dulce | 12. tubería de circulación  |

Figura 5. Vista lateral de la sección de acondicionamiento de adultos de M. californianus. Laboratorio de acuicultura del proyecto Bivalvos de B.C.

El sistema de cultivo consistió en dos tanques rectangulares de fibra de vidrio colocados uno sobre el otro, con una separación aproximada de 1.5m entre ambos. Los tanques quedaron soportados por un armazón de acero de dimensiones 2.80 x 2.30 x 0.90m, (fig. 5). Las dimensiones de los tanques fueron: tanque inferior 2.44 x 0.90 x 0.60m de altura; tanque superior 2.40 x 0.90 x 0.45m de altura.

En el tanque inferior se colocó un enfriador (modelo PCC-24A-3; 120V/1HP/60Hz), con rango de temperatura de  $-23^{\circ}\text{C}$  a temperatura ambiente. Dicho enfriador mantuvo la temperatura durante los experimentos. En el mismo tanque se colocó una bomba centrífuga sumergible (modelo 1P809; 120V/0.1HP/60Hz), con el fin de circular el agua y tener un flujo continuo entre los dos tanques. Se utilizó tubería PVC 3/4" de diámetro para el bombeo al tanque superior. El flujo al tanque inferior se consiguió por gravedad utilizando un codo PVC 2" de diámetro en la base del tanque, al cual se sujetó un cilindro de plástico con el fin de encauzar el flujo. Todo el sistema funcionó como baño maría durante los experimentos (fig. 6). Cuando la temperatura ambiente disminuyó más allá de la requerida ( $20^{\circ}\text{C}$ ), se reguló con calentadores marca Ebo-Jager de 75w.

El agua de mar utilizada fué filtrada a una micra y esterilizada con lámpara de luz ultravioleta de acción germicida. El aire provino del compresor general del laboratorio de acuicultura del proyecto "mejillón" (modelo 2Z870; 3/4HP; 115-230V), siendo filtrado con un sistema descrito por Elsworth (1969) y distribuido por medio de tubería PVC 1/2" de diámetro, utilizando como salida llaves metálicas regulables.



- |                                 |                                 |
|---------------------------------|---------------------------------|
| 1. tanque inferior (baño maría) | 5. cilindro de plástico         |
| 2. tanque superior (baño maría) | 6. tubería de PVC 1/2" diámetro |
| 3. canal experimental           | 7. enfriador                    |
| 4. codo PVC 2" diámetro         | 8. bomba sumergible             |
| → circulación de agua           |                                 |

Figura 6. Esquema del sistema de acondicionamiento de adultos de M. californianus.

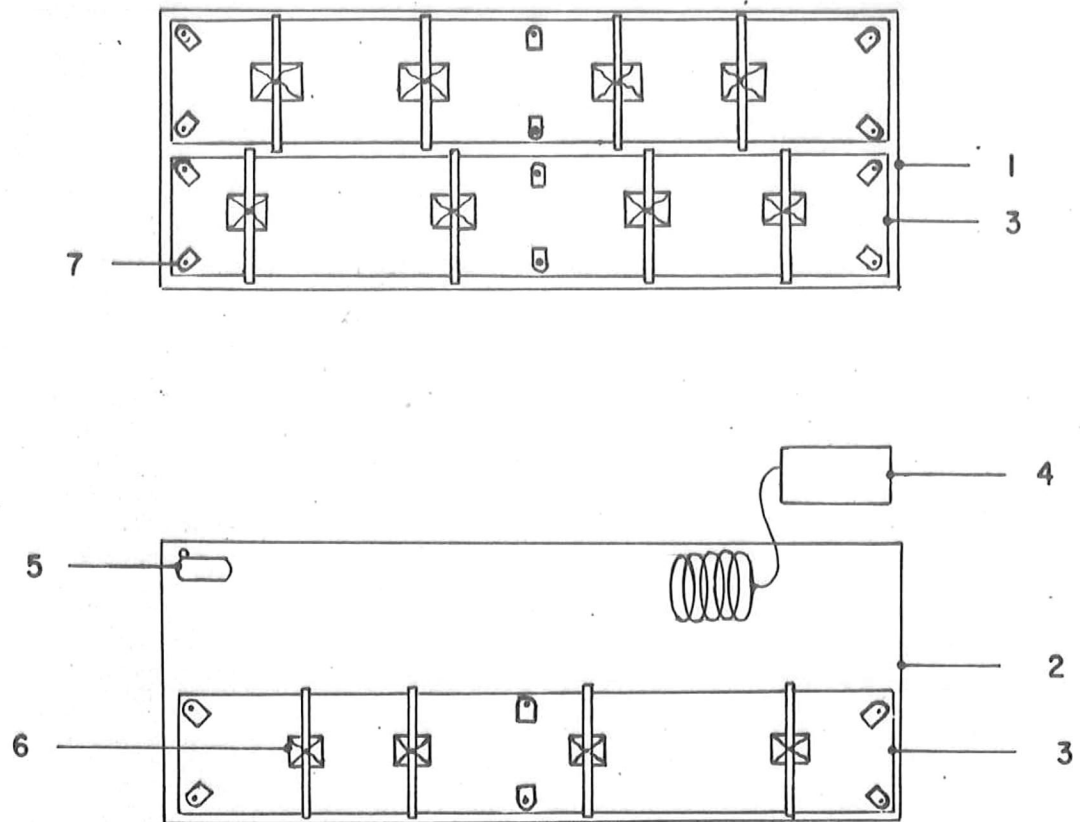
3. Experimento A. Desarrollo gonadal a concentraciones diferentes de una misma dieta.

En los tanques utilizados como baño maría (sistema de cultivo), fueron colocados tres canales de fibra de vidrio de dimensiones de 2.44 x 0.30 x 0.25m de profundidad. Dos en el tanque superior y uno en el tanque inferior (fig. 7). Cada canal con un filtro biológico hecho con fibra de vidrio acanalada y malla de plástico como base. Utilizando grava de playa con grosor de 0.25 a 0.85cm, siendo la profundidad de la cama de 4cm.

Se colocaron un total de 54 mejillones, 18 en cada canal, a los 10 restantes se les extrajo la gónada para su tratamiento histológico, este último grupo fué la muestra inicial del período de aclimatación. Se les aclimató durante 15 días (Widdows y Bayne, 1971) a una temperatura de  $20 \pm 1$  °C y salinidad de 34‰, proporcionándoles durante este período una dieta monoespecífica de Tetraselmis suecica, a una concentración de  $30 \times 10^3$  cel/ml, tres veces al día de acuerdo con Langton y McKay (1974). Durante el período experimental, fueron alimentados con la misma dieta y periodicidad utilizando concentraciones de 10, 30 y  $60 \times 10^3$  cel/ml, cada concentración correspondiente a un tratamiento.

El conteo de las microalgas para determinar la concentración de alimento a proporcionar, se llevó a cabo mediante un hematocitómetro Neubauer (0.1mm de profundidad), fijando la muestra con unas gotas de solución Uthérmol de acuerdo con Stein (1973).

A partir del inicio del experimento, cada 15 días se to-



- |                                 |                              |
|---------------------------------|------------------------------|
| 1. tanque superior (baño maría) | 5. bomba sumergible          |
| 2. tanque inferior (baño maría) | 6. canastilla con mejillones |
| 3. canales experimentales       | 7. aireador                  |
| 4. enfriador                    |                              |

Figura 7. Vista de planta de los canales experimentales dentro de los tanques de baño maría durante el experimento<sup>7</sup> A.

maron muestras al azar de 6 mejillones por tratamiento, para la extracción de la gónada y su posterior análisis histológico, teniéndose al terminar el experimento tres muestras correspondientes a la fase inicial, intermedia y final. El experimento tuvo una duración de cuatro semanas sin contar el período de aclimatación.

#### 4. Experimento B. Desarrollo gonadal con diferentes dietas.

Una vez concluido el experimento A, los canales fueron sustituidos por cinco acuarios con capacidad de 58 litros cada uno, colocándose en cada acuario un filtro biológico con las características ya mencionadas. Cada acuario funcionó como un tratamiento alimenticio diferente.

En cada acuario se colocaron 10 mejillones; al igual que el experimento anterior, a los 20 restantes se les extrajo la gónada para el tratamiento histológico y fueron tomados como muestra inicial del experimento. Fueron aclimatados durante 15 días a una temperatura de  $20 \pm 1$  °C y salinidad de 34‰. El período experimental tuvo una duración de 15 días, siendo la duración total, incluyendo la aclimatación, de 30 días.

A partir del inicio del período de aclimatación, se les proporcionó una dieta mixta de microalgas de acuerdo con lo sugerido por Walne (1974), a base de Tetraselmis suecica, Isochrysis galbana y Monochrysis lutheri. Se utilizó una concentración única de  $30 \times 10^3$  cel/ml (Winter y Langton, 1975) tres veces al día, usando proporciones equivalentes de las

algas para cada tratamiento.

La equivalencia entre las microalgas se obtuvo centrifugando 100ml de cultivo de cada especie ( $20 \times 10^3$  cel/ml) durante 20 minutos a 3,500 rpm según lo descrito por Davis y Guillard (1958). La altura de la columna de sedimento se midió con un vernier de precisión 0.01cm para obtener una relación entre el tamaño de las microalgas, de acuerdo con su volumen sedimentado.

Las dietas proporcionadas fueron las siguientes: 1. sin alimento; 2. T. suecica, I. galbana (50% c/u), almidón (5mg/l/día); 3. T. suecica, I. galbana (50% c/u); 4. T. suecica, I. galbana, M. lutheri (33% c/u), almidón (5mg/l/día); 5. T. suecica, I. galbana, M. lutheri (33% c/u). El suministro de almidón se hizo en base a los resultados de Haven (1965).

Al final del experimento se colectó una muestra única de 10 organismos por acuario para la extracción de la gónada y su tratamiento histológico.

#### 5. Tratamiento Histológico.

Después de extraída la gónada, se fijó en solución bouin y posteriormente se cortó una porción central de 2cm de longitud para ser almacenada en cápsulas plásticas, cada cápsula con su identificación.

Con objeto de deshidratar el tejido, las gónadas fueron tratadas con alcohol etílico al 50, 60, 70, 80, 90 y 100%,

permaneciendo una hora en cada concentración y solo en el caso del alcohol absoluto 1:45hrs. El aclarado se realizó - con tolueno durante 15 minutos, para de aquí pasarlas a dos baños de parafina con duración de una hora cada uno.

Para la inclusión final en parafina se utilizaron moldes de metal, así como barras de Leuckart. Se hicieron cortes de 7 micras de espesor con la ayuda de un microtomo de rotación American Optical (modelo 820), realizándose en total cinco cortes transversales por gónada; se colocaron en portaobjetos con un baño de temperatura constante, para luego ser teñidas con Hematoxilina-Eosina y cubiertos definitivamente con cubreobjetos largos adheridos con resina plástica (Histoclad). La metodología completa para el tratamiento histológico (fijación, inclusión, teñido) se encuentra en Mcmanus y Mowry (1969) y Preece (1972).

La observación de los cortes se realizó con un microscopio compuesto Bausch & Lomb (modelo Galen). Para determinar el estadio de madurez se utilizó la escala de Seed (1975) para M. edulis, así como el índice gonadal medio de Seed (I.G.M.S.), como indicador de los períodos de desarrollo (madurez total cuando el valor es 5) y de desove (en período de reposo total cuando el valor es 0).

El índice se obtuvo multiplicando el número de individuos en cada estadio, por el valor numérico de su estadio de madurez dividiendo el resultado entre el número total de individuos en la muestra (Seed, 1975).

$$I.G.M.S. = \frac{\sum X Y}{Z}$$

X = organismo en el mismo estadio.

Y = valor numérico del estadio.

Z = número total de individuos en la muestra.

A continuación se describe textualmente la escala de madurez de Seed (1975).

#### PERIODO DE REPOSO.

Estadio 0. No se observa ninguna traza de sexualidad. Incluye a los organismos vírgenes en los cuales el sistema reproductivo es rudimentario y aquellos que han desovado completamente. Los mejillones en período de reposo pueden estar delgados y transparentes o gruesos y opacos, de acuerdo a las condiciones locales de alimentación. Durante éste período se acumula en el tejido grasa y glucógeno.

#### PERIODO DE DESARROLLO.

Estadio 1. Caracterizado por el principio de la gametogénesis. Islas de tejido germinal aparecen en la matriz del tejido conectivo. Ovulos y espermias no están presentes en este estadio.

Estadio 2. Gametos maduros comienzan a aparecer en los folículos. Todavía ocupa la mayor parte estadios tempranos de la gametogénesis (gonias).

Estadio 3. Un marcado incremento ocurre en la masa de la gónada, aproximadamente la mitad de cada folículo es ocupada por gametos maduros y la otra mitad por estadios tempranos (gonias). Este es un estadio rápido de la gametogénesis.

Estadio 4. El máximo incremento de la gónada es práctica

mente alcanzado. Predominan los gametos maduros entre los folículos.

Estadio 5. Este representa la gónada completamente madura. Estadios tempranos de la gametogénesis están restringidos a una delgada banda en la periferia de los folículos.

#### PERIODO DE DESOVE.

Estadio 4. No obstante que la gónada se encuentra llena de gametos maduros, el desove activo está ahora en progreso. Esto se refleja en la reducción de la densidad de espermatozoides y el redondeo de los óvulos cuando la presión entre los folículos se reduce.

Estadio 3. Es similar en algunas cosas con el estadio de desarrollo 3. Como en éste, los folículos se encuentran con aproximadamente la mitad de gametos maduros. A diferencia del estadio de desarrollo se encuentran en menor cantidad estadios tempranos de la gametogénesis. Los huevos maduros están redondeados más que en forma poligonal y hay en general, reducción en el área del manto ocupada por el tejido genital.

Estadio 2. Este refleja una mayor reducción en el área ocupada por el tejido genital. Los folículos se encuentran con una cantidad considerablemente menor de la mitad de gametos maduros.

Estadio 1. Ovulos y espermata residuales están presentes. Es posible ver células fagocitando, el centro de los folículos presenta un material amarillo-café resultado de la citólisis.

Mediante la técnica de Hematoxilina - Eosina, debido a la acción de los alcoholes y aclarantes, los lípidos se manifiestan como agujeros redondos que quedan en el citoplasma, indicando los lugares de grasa globular que existían en la célula viva (Ham, 1970).

Para determinar las diferencias estadísticas entre las diferentes concentraciones, las diferentes dietas y los sexos, se utilizó el estadígrafo no paramétrico U de Mann-Whitney; así como el coeficiente de correlación de rango de Kendall, para determinar correlación entre el índice gonadal porcentual reportado por Lagos (1982) y el índice gonadal medio de Seed. El desarrollo de ambas pruebas se detalla en Siegel (1979).

Se utilizó estadística no paramétrica como una alternativa para muestras de tamaño pequeño según Siegel (op. cit.).

## V. RESULTADOS

1. Experimento A. Desarrollo gonadal a concentraciones diferentes de una misma dieta.

Los estadios de madurez encontrados en M. californianus para el inicio del período de aclimatación durante el tratamiento con tres concentraciones de T. suecica, se muestran en la tabla I. Para este período, los mejillones se encontraron en estadio de desarrollo 2, 3 y desove 2 (37.5, 25 y 37.5% respectivamente).

El estadio de desarrollo 2 se caracterizó por folículos pequeños con la mayor parte ocupada en ellos por estadios tempranos de la gametogénesis (gonias). El estadio de desove 2 presentó mayor cantidad de células maduras en relación con las inmaduras adheridas a la pared del folículo. Para el estadio de desarrollo 3, el espacio ocupado por los folículos dentro de la gónada fué mayor que en el estadio de desarrollo 2, aproximadamente se observó la mitad de gametos maduros en relación con los inmaduros.

Las tablas II A, B, C, muestran los estadios de madurez en M. californianus para las diferentes fases del tratamiento con una concentración de  $10 \times 10^3$  cel/ml. Los valores obtenidos para las concentraciones restantes se muestran en las tablas III A, B, C y IV A, B, C, la primera corresponde a la concentración de  $30 \times 10^3$  cel/ml y la última a la concentración de  $60 \times 10^3$  cel/ml.

Para las muestras tomadas de las diferentes concentraciones a lo largo del tratamiento, el 85.18% de los mejillones se encontró en los estadios 3 y 4 de desove, 44.44% para el

Tabla I. Estadios de madurez observados en M. californianus para el inicio del periodo de aclimatación durante el tratamiento con tres concentraciones de ...

Tamaño	Sexo	Estadio de madurez
8.81cm	♂	DESARROLLO 2
8.97	♂	DESARROLLO 3
8.88	♂	DESARROLLO 2
8.78	♂	DESOVE 2
8.74	♂	DESARROLLO 3
8.97	♂	DESARROLLO 2
8.84	♂	DESOVE 2
8.87	♂	DESOVE 2

IGMS = 2.25

DS = 0.4629

DS = desviación estándar

Tabla III. A - B. Estadios de madurez observados en M. californianus para la fase inicial e intermedia del tratamiento con una concentración de  $10 \times 10^3$  cel/ml. Los valores del índice gonadal para los mismos organismos fueron proporcionados por Lagos (1982).

A) fase inicial

TALLA	SEXO	INDICE GONADAL	ESTADIO DE MADUREZ
9.50 cm	♂	32.20	DESOLVE 4
9.30	♂	23.24	DESOLVE 2
8.73	♂	32.01	DESOLVE 4
8.90	♂	12.36	DESARROLLO 3
9.41	♂	17.04	DESOLVE 3
9.09	♂	25.72	DESARROLLO 3 (lípidos)

$$\bar{IG} = 24.26$$

$$DS = 8.679$$

$$IGMS = 3.16$$

$$DS = 0.7528$$

B) fase intermedia

TALLA	SEXO	INDICE GONADAL	ESTADIO DE MADUREZ
8.96 cm	♂	16.04	DESOLVE 3
8.97	♂	21.74	DESOLVE 4
8.68	♂	14.63	DESOLVE 4 (lípidos)
8.54	♂	17.64	DESOLVE 4 (lípidos)
9.54	♂	19.43	DESOLVE 4 (lípidos)
8.84	♂	18.54	DESOLVE 2

$$\bar{IG} = 17.72$$

$$DS = 1.826$$

$$IGMS = 3.50$$

$$DS = 0.8366$$

$\bar{IG}$  = índice gonadal medio

Tabla II. C. Estadios de madurez observados en *M. californianus* para la fase final del tratamiento con una concentración de  $10 \times 10^3$  cel/ml. Los valores del índice gonadal para los mismos organismos fueron proporcionados por Lagos (1982).

TALLA	SEXO	INDICE GONADAL	ESTADIO DE MADUREZ
8.70 cm	♂	18.46	DESOVE 3
9.20	♀	17.35	DESOVE 3
9.28	♀	15.93	DESOVE 3
9.58	♀	27.46	DESOVE 1
8.54	♀	11.43	DESOVE 4 (lípidos)
8.87	♀	10.96	DESOVE 4 (lípidos)

$\bar{IG} = 17.01$   
 $DS = 5.910$

$IGMS = 3.0$   
 $DS = 1.0950$

Tabla III. A. Estadios de madurez observados en *M. californianus* para la fase inicial del tratamiento con una concentración de  $30 \times 10^3$  cel/ml. Los valores del índice gonadal para los mismos organismos fueron proporcionados por Lagos (1982).

TALLA	SEXO	INDICE GONADAL	ESTADIO DE MADUREZ
8.80 cm	♂	15.91	DESOVE 4
9.11	♀	13.07	DESOVE 3
8.39	♀	22.17	DESOVE 3
9.65	♀	19.38	DESOVE 3
9.87	♀	19.21	DESARROLLO 4
8.55	♀	21.49	DESOVE 4

$\bar{IG} = 18.53$   
 $DS = 3.0460$

$IGMS = 3.5$   
 $DS = 0.577$

Tabla III. B - C. Estadios de madurez observados en M. californianus para la fase intermedia y final del tratamiento con una concentración de  $30 \times 10^3$  cel/ml. Los valores del índice gonadal para los mismos organismos fueron proporcionados por Lagos (1982).

B) fase intermedia

TALLA	SEXO	INDICE GONADAL	ESTADIO DE MADUREZ
8.96 cm	♂	16.04	DESOVE 3
8.97	♀	21.74	DESOVE 4
8.68	♀	14.63	DESOVE 4 (lípidos)
8.54	♂	17.64	DESOVE 4 (lípidos)
9.54	♀	19.43	DESOVE 4 (lípidos)
8.85	♀	18.59	DESOVE 2

$\bar{IG} = 18.01$   
 $DS = 2.518$

$IGMS = 3.5$   
 $DS = 0.8366$

C) fase final

TALLA	SEXO	INDICE GONADAL	ESTADIO DE MADUREZ
8.79 cm	♂	19.88	DESOVE 4
8.76	♀	17.95	DESOVE 3
9.50	♀	19.43	DESOVE 3 (lípidos)
9.27	♀	13.64	DESOVE 1
9.31	♀	18.66	DESOVE 4
9.07	♀	19.48	DESOVE 2

$\bar{IG} = 18.17$   
 $DS = 2.325$

$IGMS = 2.83$   
 $DS = 1.1690$

Tabla IV. A - B. Estadios de madurez observados en M. californianus para la fase inicial e intermedia del tratamiento con una concentración de  $60 \times 10^3$  cel./ml. Los valores del índice gonadal para los mismos organismos fueron proporcionados por Lagos (1982).

A) fase inicial

TALLA	SEXO	INDICE GONADAL	ESTADIO DE MADUREZ
8.70 cm	♀	16.00	DESOVE 3
9.44	♂	18.52	DESOVE PARCIAL
9.37	♀	32.44	DESOVE 3
8.70	♂	18.90	DESOVE 4
8.60	♀	16.81	DESOVE 3
9.43	♂	17.15	DESOVE 3

$\bar{IG} = 19.97$   
 $DS = 6.200$

$IGMS = 3.2$   
 $DS = 0.4472$

B) fase intermedia

TALLA	SEXO	INDICE GONADAL	ESTADIO DE MADUREZ
9.41 cm	♀	19.19	DESOVE 4 (lípidos)
9.15	♂	16.39	DESOVE 4 (lípidos)
9.12	♀	16.85	DESOVE 3 (lípidos)
8.96	♂	18.88	DESOVE 4 (lípidos)
8.91	♀	19.72	DESOVE 4 (lípidos)
9.05	♂	15.19	DESOVE 4 (lípidos)

$\bar{IG} = 17.72$   
 $DS = 1.826$

$IGMS = 3.83$   
 $DS = 0.4082$

Tabla IV. C. Estadios de madurez observados en M. californianus para la fase final del tratamiento con una concentración de  $60 \times 10^3$  cel/ml. Los valores del índice gonadal para los mismos organismos fueron proporcionados por Lagos (1982).

TALLA	SEXO	INDICE GONADAL	ESTADIO DE MADUREZ
9.56 cm	♂	15.02	DESOVE 3
9.29	♀	22.41	GONADA PARASITADA
9.15	♂	16.16	DESOVE 3
9.67	♂	17.87	DESOVE 3
9.15	♂	19.39	DESOVE 4
9.39	♀	17.69	DESOVE 2

$\bar{IG} = 18.08$   
 $DS = 2.597$

$IGMS = 3.0$   
 $DS = 0.6324$

primer estadio, con el 54.16% observado en hembras; y 40.74% para el estadio de desove 4 con el 4.54% encontrado en hembras.

Los estadios más avanzados de desove fueron presentados por las hembras a lo largo del tratamiento dentro de las tres concentraciones, encontrándose un 9.25% en desove 2 y un 4.54% en desove 1.

El estadio de desove 3 se caracterizó por aproximadamente la mitad de gametos maduros, en relación con los inmaduros. En el caso de las hembras además, por el redondeo de los óvulos. El estadio de desove 4 presentó la mayor parte de la gónada ocupada por tejido germinal, con algunos espacios dentro de los folículos. El estadio de desove 1 se caracterizó por la presencia de óvulos residuales. Este último estadio no se observó en machos.

La acumulación de lípidos en la gónada se observó principalmente durante la fase intermedia de las tres concentraciones, encontrándose en todos los organismos para la concentración de  $60 \times 10^3$  cel/ml.

Del total de mejillones analizados se encontró un macho en desove parcial para la fase inicial correspondiente a la concentración de  $60 \times 10^3$  cel/ml.

Se estimó el índice gonadal medio de Seed (IGMS), y su variación durante el tratamiento se muestra en la figura 8.

Se encontró un comportamiento similar del IGMS para la misma fase entre las tres concentraciones de alimento (prueba U de Mann-Whitney al 95% de confianza).

Dicho índice mostró un incremento a partir del inicio del

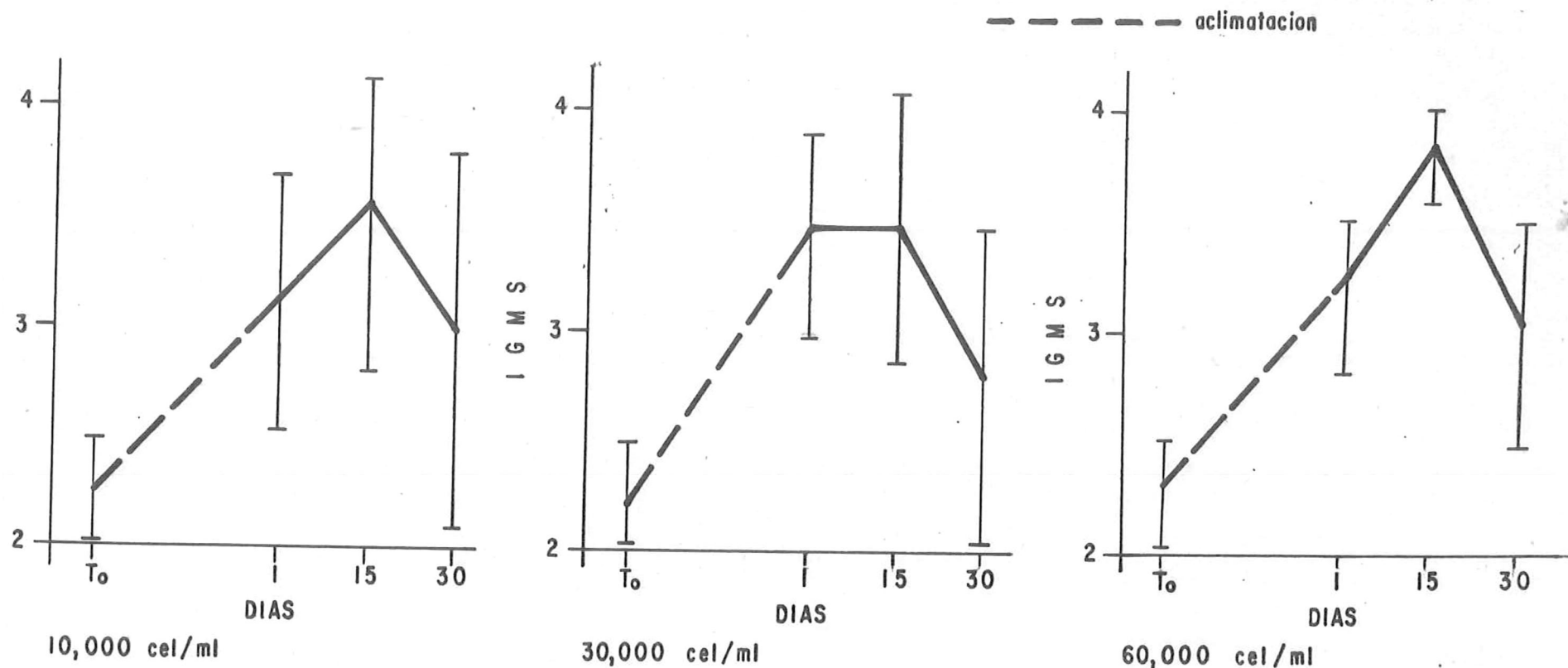


Figura 8. Variación del índice gonadal medio de Seed (IGMS) en M. californianus, durante el tratamiento con tres concentraciones de T. suecica. T<sub>0</sub> = tiempo en el que los mejillones fueron introducidos al sistema de acondicionamiento.

período de aclimatación, alcanzando un valor máximo de 3.5 y 3.8 en las concentraciones de 10 y  $60 \times 10^3$  cel/ml respectivamente a los 15 días del período experimental. Para la concentración de  $30 \times 10^3$  cel/ml, el valor máximo (3.5) se presentó en la fase inicial del período experimental, repitiéndose este valor a los 15 días (fig. 8). En la parte final del tratamiento, de los 15 a los 30 días se observó un decremento en el valor del IGMS para las tres concentraciones. Se observó además, que el IGMS tuvo un valor más alto para los machos en relación con el obtenido para las hembras a lo largo del tratamiento (fig. 9), aunque estas diferencias no fueron significativas al 95% de confianza (prueba U de Mann-Whitney).

Los resultados de las pruebas no paramétricas U de Mann-Whitney para el experimento A, se presentan en la tabla V. Como aspecto sobresaliente destaca, la diferencia significativa al 95% de confianza entre el inicio del período de aclimatación y las fases restantes en las tres concentraciones; así como entre la fase intermedia y final para la concentración de  $30 \times 10^3$  cel/ml; y entre la fase inicial e intermedia, intermedia y final para la concentración de  $60 \times 10^3$  cel/ml.

Comparando el IGMS con el índice gonadal porcentual obtenido por Lagos (1982) para los mismos organismos, no se encontró correlación significativa al 95% de confianza (coeficiente de rango Kendall:  $\tau$ ) para el total de la muestra.

## 2. Experimento B. Desarrollo gonadal con diferentes dietas.

Los estadios de madurez observados en M. californianus para la fase inicial de este segundo experimento se muestran

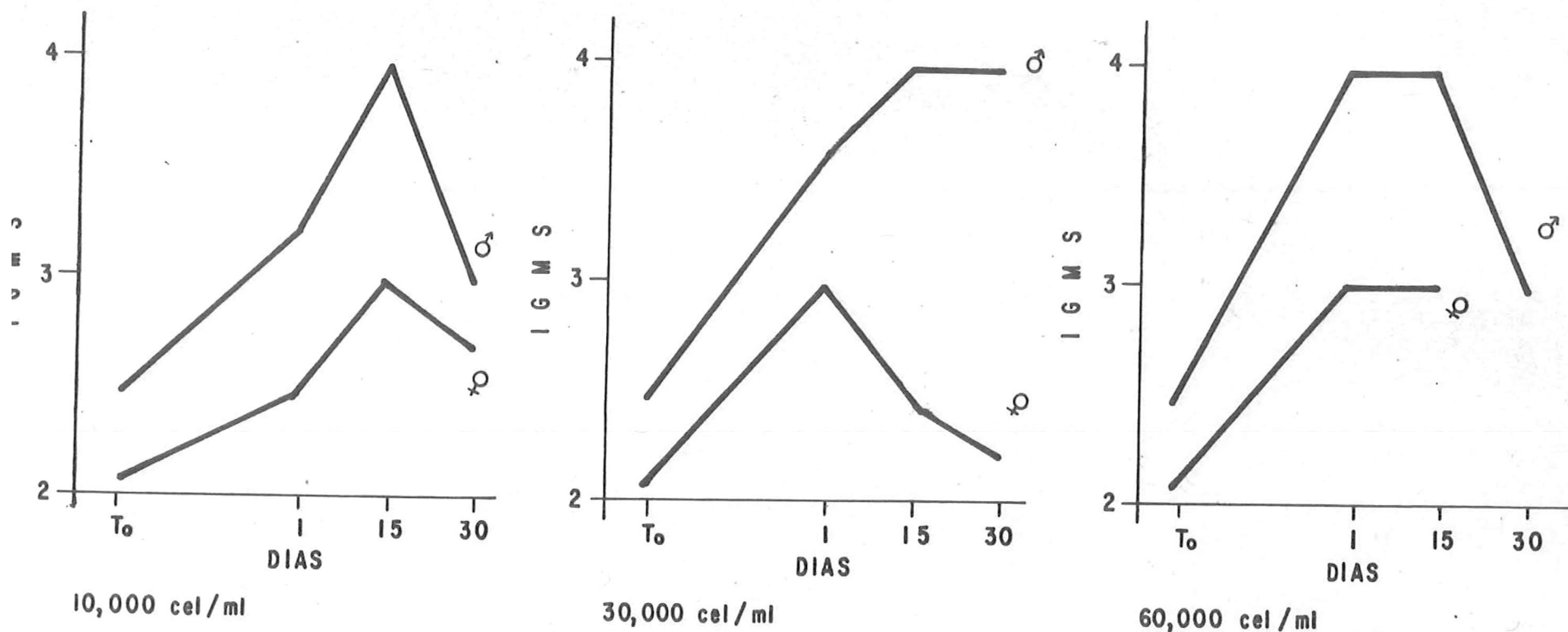


Figura 9. Variación del índice gonadal medio de Seed (IGMS) por sexos en *M. californianus*, durante el tratamiento con tres concentraciones de *T. suecica*. T<sub>0</sub> = tiempo en el que los mejillones fueron introducidos al sistema de acondicionamiento.

Tabla V. Resultados de la prueba U de Mann-Whitney al 95% de confianza para los valores del índice gonadal medio de Seed obtenidos en las diferentes fases, para las tres concentraciones de alimento durante el experimento A. A - aclimatación; período experimental: B - fase inicial, C - fase intermedia, D - fase final. \* - diferencia significativa; NS - no significativamente diferente.

Concentración  $10 \times 10^3$  cel/ml

FASE	A	B	C	D
A		*	*	*
B	B>A		NS	NS
C	C>A	B=C		NS
D	D>A	B=D	C=D	

Concentración  $30 \times 10^3$  cel/ml

FASE	A	B	C	D
A		*	*	*
B	B>A		NS	NS
C	C>A	B=C		*
D	D>A	B=D	C>D	

Concentración  $60 \times 10^3$  cel/ml

FASE	A	B	C	D
A		*	*	*
B	B>A		*	NS
C	C>A	B>C		*
D	D>A	B=D	C>D	

en la tabla VI. Durante éste período, el 85% de los mejillones se encontraron en estadio de desove 4 con el 23.52% observado en hembras y, el 15% restante en estadio de desove 3 con el 10% en hembras.

Los estadios de desove 3 y 4 estuvieron caracterizados - por, aproximadamente la mitad de gametos maduros dentro del folículo para el primero; y con casi el total de células maduras dentro del folículo para el segundo.

Las tablas VII, VIII, IX, X y XI muestran los estadios de madurez observados para la fase final de cada una de las cinco dietas suministradas, en ese orden corresponden: dieta 1) sin alimento; dieta 2) T. suecica, I. galbana, almidón; dieta 3) T. suecica, I. galbana; dieta 4) T. suecica, I. galbana, M. lutheri, almidón; dieta 5) T. suecica, I. galbana, - M. lutheri.

Al finalizar el tratamiento, para la dieta 1 (sin alimento) se observó, un número mayor de hembras en estadio de desove 3 en relación con el inicio, siendo el 33.3% en éste momento y 50% al finalizar. El 75% de los machos se encontró en desove 4 para esta misma dieta, el 25% restante se observó en estadio de desarrollo 5.

El estadio de desarrollo 5 se caracterizó por la gónada completamente madura, con una banda delgada de gonias en la periferia de los folículos; este estadio no se observó en las hembras.

En los tratamientos restantes, las dietas 2, 3, 4 y 5 los estadios fueron similares entre sí, encontrándose el 100% de los machos en estadio de desarrollo 5, exceptuando la dieta 5

Tabla VI. Estadios de madurez observados en M. californianus para la fase inicial del experimento con diferentes dietas. Los valores del índice gonadal para los mismos organismos fueron proporcionados por Lagos (1982).

TALLA	SEXO	INDICE GONADAL	ESTADIO DE MADUREZ
9.05cm	♂	37.58	DESCOVE 4
8.94	♀	27.10	DESCOVE 3
9.32	♀	32.23	DESCOVE 4
9.50	♀	40.79	DESCOVE 4
9.49	♀	31.99	DESCOVE 4
8.59	♀	29.21	DESCOVE 4
8.93	♀	33.84	DESCOVE 4
9.45	♀	34.20	DESCOVE 4
8.91	♀	39.18	DESCOVE 4
9.30	♀	34.15	DESCOVE 3
9.15	♀	34.75	DESCOVE 4
9.60	♀	44.29	DESCOVE 3
9.13	♀	35.42	DESCOVE 4
9.20	♀	32.91	DESARROLLO 4
8.76	♀	30.18	DESCOVE 4
9.50	♀	27.11	DESCOVE 4
9.28	♀	32.46	DESCOVE 4
9.28	♀	32.87	DESCOVE 4
8.81	♀	23.73	DESCOVE 4
9.18	♀	33.40	DESCOVE 4

$\bar{IG} = 33.87$   
 $DS = 4.844$

$IGMS = 3.85$   
 $DS = 0.3663$

Tabla VII. Estadios de madurez observados en M. californianus para la fase final de los mejillones mantenidos sin alimento (dieta 1) durante el experimento con diferentes dietas. Los valores del índice gonadal para los mismos organismos fueron proporcionados por Lagos (1982).

TALLA	SEXO	INDICE GONADAL	ESTADIO DE MADUREZ
8.50cm	♂	29.97	DESOVE 4
8.74	♂	24.60	DESOVE 3
9.45	♂	33.63	DESOVE 3
8.67	♂	17.74	DESOVE 3
9.08	♂	35.26	DESOVE 4
8.67	♂	34.16	DESOVE 4
9.30	♂	34.91	DESOVE 3
8.89	♂	29.88	DESOVE 4
8.90	♂	35.35	DESARROLLO 5
8.72	♂	29.49	DESOVE 3

$\bar{IG} = 30.30$   
 $DS = 5.710$

$IGMS = 3.6$   
 $DS = 0.6992$

Tabla VIII. Estadios de madurez observados en M. californianus para la fase final del tratamiento con T. suecica, I. galbana y almidón (dieta 2). Los valores del índice gonadal para los mismos organismos fueron proporcionados por Lagos (1982).

TALLA	SEXO	INDICE GONADAL	ESTADIO DE MADUREZ
8.97cm	♂	41.78	DESOVE 3
9.50	♂	38.83	DESOVE 3
8.70	♂	32.33	DESARROLLO 5
9.36	♂	46.64	DESARROLLO 5
9.06	♂	29.53	DESOVE 4
9.35	♂	28.03	DESOVE 4
8.81	♂	36.26	DESARROLLO 5
9.02	♂	36.03	DESOVE 3
9.53	♂	35.89	DESOVE 3
8.73	♂	29.81	DESOVE 4

$\bar{IG} = 35.47$   
 $DS = 5.860$

$IGMS = 3.9$   
 $DS = 0.8749$

Tabla IX. Estadios de madurez observados en M. californianus para la fase final del tratamiento con T. suecica e I. galbana (dieta 3). Los valores del índice gonadal para los mismos organismos fueron proporcionados por Lagos (1982).

TALLA	SEXO	INDICE GONADAL	ESTADIO DE MADUREZ
8.50 cm	♂	28.31	DESARROLLO 5
9.49	♂	40.04	DESARROLLO 5
9.48	♀	30.00	DESARROLLO 4
9.00	♂	29.38	DESARROLLO 5
8.90	♂	34.15	DESARROLLO 5
8.77	♂	24.56	DESARROLLO 5
8.59	♂	25.97	DESARROLLO 5
8.84	♂	35.50	DESARROLLO 5
9.70	♂	35.55	DESARROLLO 5
8.79	♀	34.34	DESARROLLO 5

$\bar{IG} = 31.78$   
 $DS = 4.890$

$IGMS = 4.9$   
 $DS = 0.3162$

Tabla X. Estadios de madurez observados en M. californianus para la fase final del tratamiento con T. suecica, I. galbana, M. lutheri y almidón (dieta 4). Los valores del índice gonadal para los mismos organismos fueron proporcionados por Lagos (1982).

TALLA	SEXO	INDICE GONADAL	ESTADIO DE MADUREZ
8.79 cm	♂	34.01	DESARROLLO 5
9.16	♀	34.52	DESOVE 3
8.70	♀	34.88	DESOVE 3
8.94	♀	41.10	DESOVE 4
9.08	♀	34.30	DESOVE 4
8.85	♂	40.57	DESARROLLO 5
9.35	♂	33.53	DESARROLLO 5
8.67	♂	39.18	DESARROLLO 5
8.65	♂	35.85	DESARROLLO 5
9.52	♂	33.42	DESARROLLO 5

$\bar{IG} = 36.13$   
 $DS = 2.978$

$IGMS = 4.4$   
 $DS = 0.8432$

Tabla XI. Estadios de madurez observados en M. californianus para la fase final del tratamiento con T. suecica, I. galbana y M. lutheri (dieta 5). Los valores del índice gonadal para los mismos organismos fueron proporcionados por Lagos (1982).

TALLA	SEXO	INDICE GONADAL	ESTADIO DE MADUREZ
9.05 cm	♀	40.15	DESOVE 4
8.56	♂	31.98	DESARROLLO 5
8.76	♂	31.21	DESARROLLO 5
8.90	♂	38.41	DESARROLLO 5
9.19	♂	17.18	DESOVE 3
9.50	♀	36.33	DESOVE 3
8.75	♀	25.57	DESOVE 3
9.08	♀	37.56	DESOVE 3
8.77	♂	31.77	DESARROLLO 5
8.90	♂	35.38	DESARROLLO 5

$\bar{IG} = 32.55$   
 $DS = 6.890$

$IGMS = 4.1$   
 $DS = 0.9944$

en la que fué el 83.3%; las hembras se encontraron en estadios de desove 3 y 4. Para la dieta 2 el 57% se encontró en desove 3 y el 43% en desove 4. Para las dietas 4 y 5 se encontraron organismos en desove 3 y 4; para la primera 50-50% y para la segunda 75-25% respectivamente. La dieta 3 solo contuvo un organismo hembra, el cual se encontró en estadio de desove 4.

Al igual que el tratamiento anterior, se determinó el IGMS y su variación se muestra en la figura 10.

Se observó un decremento en el IGMS de 3.8 a 3.6 en los mejillones mantenidos sin alimento (dieta 1), esta diferencia no fué significativa al 95% de confianza (prueba U de Mann-Whitney). Para los mejillones a los cuales se les proporcionó alimento, que comprendieron de la dieta 2 a la 5, se encontró un incremento en el IGMS, siendo el más destacado el observado para la fase final de la dieta 3. Esta varió de un valor inicial de 3.8 a un valor final de 4.9 como lo muestra la figura 10.

Los resultados de las pruebas no paramétricas U de Mann-Whitney para el total de la muestra en el experimento B, se muestran en la tabla XII. Destaca la diferencia significativa al 95% de las dietas 3 y 4 en relación con las demás.

Durante este segundo tratamiento, el IGMS mostró al igual que en el experimento A un valor más alto en los machos en comparación con el obtenido para las hembras (fig. 11). Estadísticamente al 95% de confianza, se encontró diferencia significativa entre sexos para los valores de las dietas 1, 2, 4 y 5. La dieta 3 no se analizó ya que solo contenía un organismo hembra.

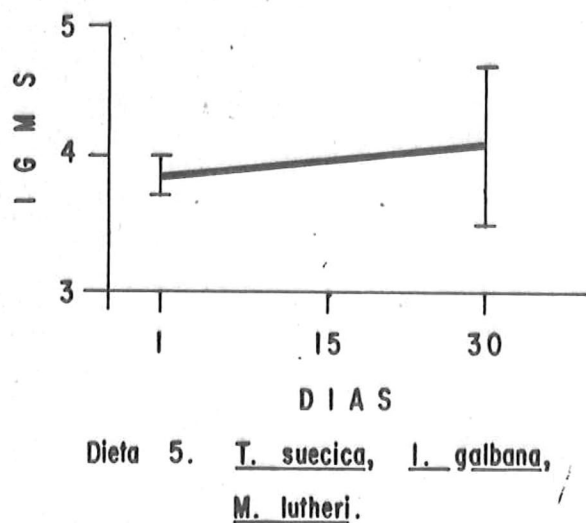
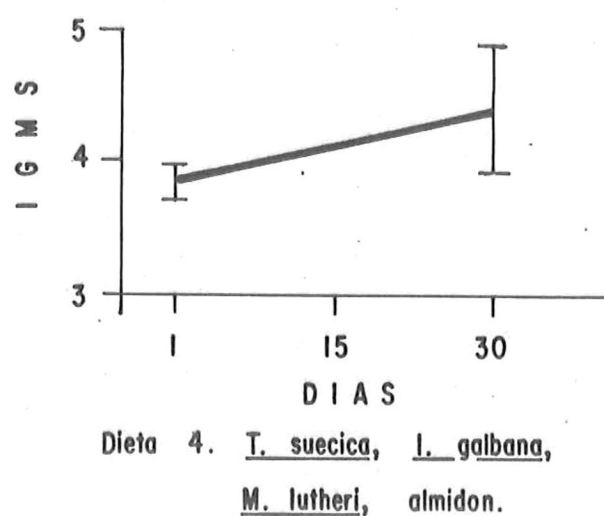
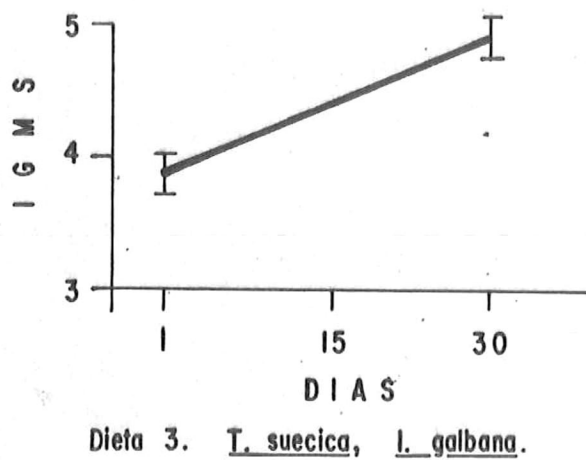
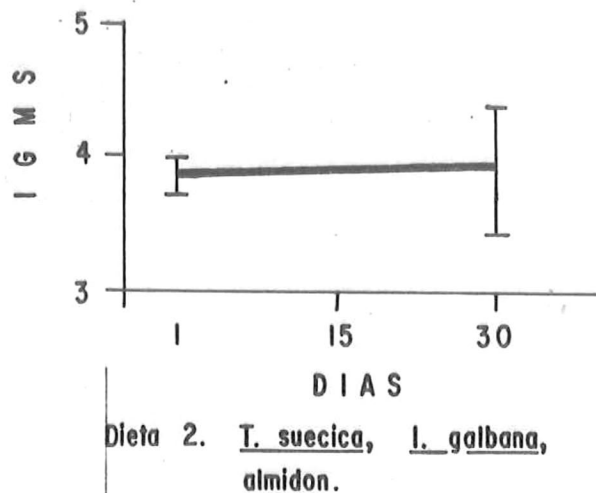
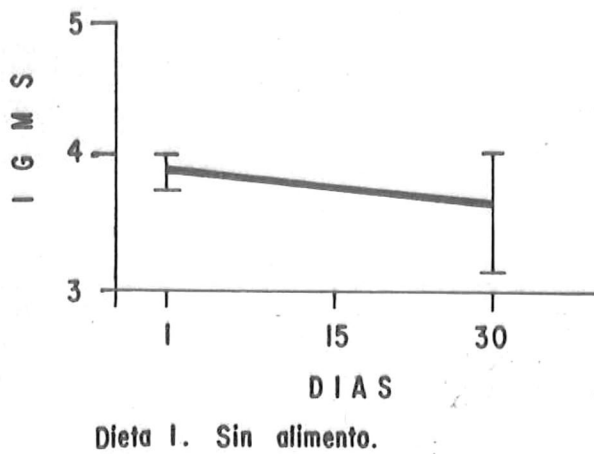
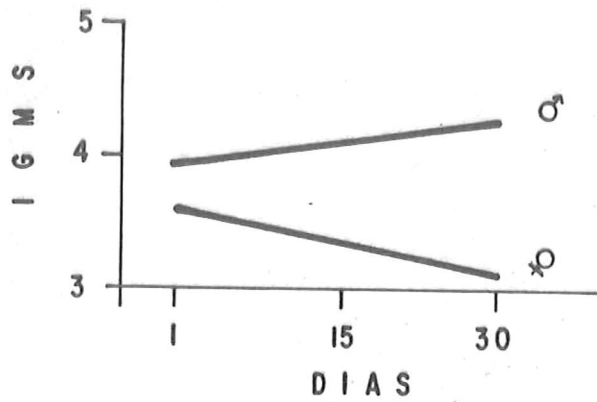


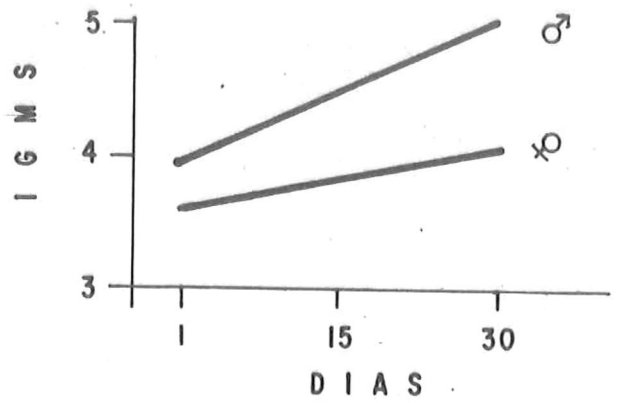
Figura 10. Variación del índice gonadal medio de Seed (IGMS) en M. californianus durante el experimento con diferentes dietas a base de microalgas.

Tabla XII. Resultados de la prueba U de Mann-Whitney al 95% de confianza entre los diferentes tratamientos dietéticos, durante el experimento B. I) muestra inicial; dieta 1) sin alimento; dieta 2) T. suecica, I. galbana, almidón; dieta 3) T. suecica, I. galbana; dieta 4) T. suecica, I. galbana, M. lutheri, almidón; dieta 5) T. suecica, I. galbana, M. lutheri. \* - diferencia - significativa; NS - no significativamente diferente.

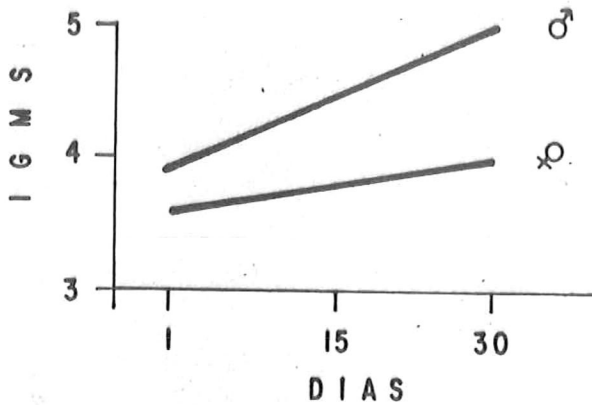
	I	1	2	3	4	5
I		NS	NS	*	*	NS
1	I=1		NS	*	*	NS
2	I=2	2=1		*	*	NS
3	I>3	3>1	3>2		NS	NS
4	I>4	4>1	4>2	4=3		*
5	I=5	5=1	5=2	5=3	5>4	



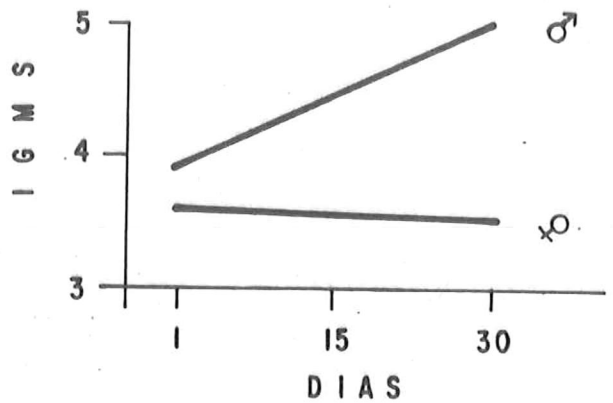
Dieta 1. Sin alimento.



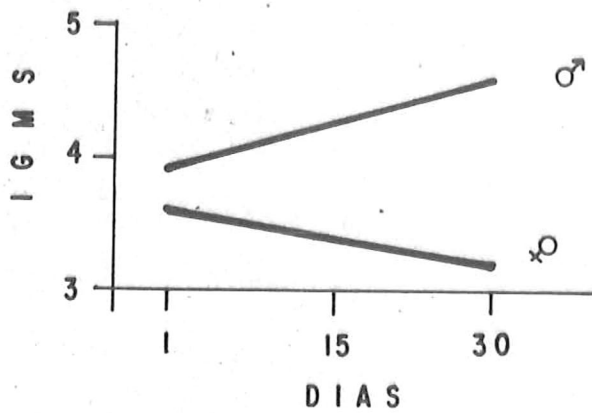
Dieta 2. T. suecica, I. galbana, almidon.



Dieta 3. T. suecica, I. galbana.



Dieta 4. T. suecica, I. galbana, M. lutheri, almidon.



Dieta 5. T. suecica, I. galbana, M. lutheri.

Figura 11. Variación del índice gonadal medio de Seed (IGMS) por sexos en M. californianus durante el experimento con diferentes dietas a base de microalgas.

Los resultados de la prueba U de Mann-Whitney, comparando el IGMS de los organismos machos obtenido en las diferentes dietas se muestran en la tabla XIII. En estos existió diferencia significativa entre el inicio y el final de los diferentes tratamientos dietéticos, así como para el valor final de la dieta 1 en relación con las demás dietas (con la dieta 2, la diferencia fué al 90% de confianza). Para las hembras no existió diferencia significativa al 95% entre ningún tratamiento dietético. La dieta 3 para hembras no pudo ser evaluada.

No se encontró correlación significativa al 95% de confianza (coeficiente de correlación de Kendall:  $\tau$ ) por sexos entre el índice gonadal porcentual, reportado por Lagos (1982) para los mismos organismos y el índice gonadal medio de Seed.

Tabla XIII. Resultados de la prueba U de Mann-Whitney al 95% de confianza para los organismos machos durante el tratamiento con diferentes dietas. I) inicial; 1) dieta 1: sin alimento; 2) dieta 2: T. suecica, I. galbana, almidón; 3) dieta 3: T. suecica, I. galbana; 4) dieta 4: T. suecica, I. galbana, M. lutheri, almidón; 5) dieta 5: T. suecica, I. galbana, M. lutheri.

	I	1	2	3	4	5
I		*	*	*	*	*
1	I≠1		NS	*	*	*
2	I≠2	1=2		NS	NS	NS
3	I≠3	3≠1	3=2		NS	NS
4	I≠4	4≠1	4=2	4=3		NS
5	I≠5	5≠1	5=2	5=3	5=4	

NS - No significativamente diferente.

\* - Diferencia significativa.

## VI. DISCUSION

### 1. Desarrollo gonadal con diferentes concentraciones.

Conociendo por métodos histológicos el grado de madurez en M. californianus mantenido en condiciones de laboratorio, fué posible evaluar el efecto de las tres concentraciones de alimento a base de T. suecica, sobre la madurez gonadal de esta especie.

El incremento significativo (prueba U de Mann-Whitney, 95% de confianza) en el grado de madurez observado durante el período de aclimatación para las tres concentraciones, pudo ser causa del incremento en la temperatura durante este lapso. Se sabe que la temperatura juega un papel importante dentro del ciclo reproductivo (Kinne, 1970; Walne, 1974).

Cuando los organismos fueron mantenidos a una temperatura constante de 20 °C es decir, durante el período experimental, las diferencias significativas al 95% de confianza (prueba U de Mann-Whitney) se observaron entre las fases de la dieta de  $60 \times 10^3$  cel/ml y solamente entre la fase intermedia y final de la dieta de  $30 \times 10^3$  cel/ml. Esto sugiere que la concentración de  $60 \times 10^3$  cel/ml podría ser la que un mejor efecto reflejara en la condición reproductiva de M. californianus. Para esta concentración se encontró durante la fase intermedia el valor más alto del IGMS y todos los organismos en esta fase mostraron gran cantidad de lípidos en la gónada. De acuerdo con Elvin (1974), la cantidad de lípidos aumenta con la madurez de la gónada.

Sin embargo, para la concentración de  $10 \times 10^3$  cel/ml hasta los 15 días del período experimental, no se observó un decre

mento en la condición reproductiva. De acuerdo con lo reportado por Lagos (1982), esta concentración no llenó los requerimientos energéticos de los organismos, por lo que si esta concentración no fué suficiente, el desarrollo de los gametos continuó con cierta independencia a expensas de las reservas nutricionales. Thompson et al. (1974), encontraron que en M. edulis, la glándula digestiva almacena reservas para la gametogénesis o períodos de presión fisiológica. Es posible que algo similar ocurra para M. californianus.

Comparando las tres concentraciones de alimento, no se encontró diferencia significativa (95% de confianza, prueba U de Mann-Whitney) entre ellas. Parece ser que no existe una relación directa entre la concentración de alimento y el crecimiento de óvulos y espermatozoides, al menos durante el período de estudio. Lo anterior coincide con lo observado por Bayne y Thompson (1970) y Loosanoff (1942) para M. edulis y por Young (1942, 1946) en M. californianus.

El haber encontrado para las tres concentraciones que los valores más altos en el IGMS correspondieron a los organismos machos, puede ser debido a que estos presentan desoves parciales y que los nuevos espermatozoides se producen varias veces, no encontrándose estadíos avanzados de desove. La presencia de un organismo macho en desove parcial durante el experimento A, es una muestra aunque incipiente, de que esto ocurre. De cualquier forma, lo anterior fué observado para M. californianus de la misma región por Rojas y Santiago (1982), así como por Moore y Reish (1964) en machos de M. edulis en Alamitos, California.

Otra causa de este comportamiento es que las hembras en

M. californianus necesiten condiciones ambientales mejores que los machos para alcanzar un mejor desarrollo gonadal como ocurre en M. edulis según lo afirman Moore y Reish (1964).

## 2. Desarrollo gonadal con diferentes dietas.

Al igual que con las diferentes concentraciones, por medio de observaciones a nivel celular, fué posible evaluar el efecto de diferentes dietas sobre el grado de madurez en M. californianus mantenido en condiciones de laboratorio.

Examinando el total de los organismos de cada muestra juntos, es decir, sin separar los machos de las hembras, fué observado un decremento en el valor del IGMS en la dieta 1 hacia el final del experimento B. Esto se explicó de principio claramente debido a que los mejillones se mantuvieron sin alimento. A la misma conclusión llegó Lagos (1982) utilizando el índice gonadal para el total de la muestra.

Para el resto de las dietas, se observó un incremento en el IGMS al final del experimento. De acuerdo con el criterio de analizar la muestra total, pareció que la dieta 3 fué la que produjo el mejor efecto en la madurez gonadal. Aunque éste efecto positivo no fué por la composición de la dieta sino debido a que la muestra tomada para la dieta 3, el 90% de los organismos fueron machos. En ambos experimentos (A y B), el valor del IGMS en los organismos machos fué mayor que el obtenido para las hembras. Por lo tanto el incremento en el grado de madurez quedó sesgado debido a la proporción de machos y hembras en cada muestra.

La observación anterior llevó a realizar el análisis del IGMS por sexos, encontrándose diferencia significativa (prue-

ba U de Mann-Whitney, 95% de confianza) entre los valores finales de las hembras y los machos. En el caso del experimento A no se encontraron diferencias (U de Mann-Whitney, 95% de confianza) debido posiblemente al tamaño de la muestra.

Habiendo encontrado diferencias entre sexos para el experimento B, se observó que el único tratamiento dietético que mostró un decremento gonadal en los organismos fué el número 1, es decir, sin alimento. En este, a pesar de que se observó un incremento en el valor del IGMS para los machos este valor fué significativamente diferente (U de Mann-Whitney, 95% de confianza), en relación con el alcanzado por los machos en los demás tratamientos dietéticos, exceptuando el tratamiento 2, en el que la diferencia se observó solo al 90% de confianza. En el caso de las hembras, el decremento más notable fué igualmente observado en la dieta 1 y aunque la diferencia estadística no fué significativa, es posible que la condición de falta de alimento haya repercutido de manera distinta en los machos que en las hembras, suponiendo que éstas requieren mejores condiciones para su desarrollo como lo afirman Moore y Reish (1964).

Para las dietas restantes no existió diferencia significativa (U de Mann-Whitney, 95% de confianza) entre los valores alcanzados por los machos al final del experimento. Lo cual indicó que ninguna de las cuatro dietas proporcionadas, tuvo un efecto sobresaliente sobre la madurez gonadal. Lo que es importante notar, es que a partir del inicio del experimento B, los machos incrementaron su grado de madurez con posibilidades de desovar, al menos hasta transcurridos 30 días. Las hembras se mantuvieron en la misma condición reproductiva.

### 3. Relación del Índice Gonadal Porcentual y el IGMS.

Comparando los resultados del índice gonadal porcentual (IG) obtenido por Lagos (1982) para los mismos organismos con los resultados del IGMS para el experimento A (fig. 12), se observó que no existió una correlación entre ambos (coeficiente de correlación de rango de Kendall: , 95% de confianza). Mientras en algunos casos el primero muestra un incremento y el IGMS un decremento, en otros el comportamiento es diferente.

En el caso del experimento B (figs. 13 y 14) parece que el comportamiento del IGMS se asemeja más al mostrado por el IG, pero habiendo encontrado diferencias entre sexos, resultados de este tipo utilizando el total de la muestra, ocultan las diferencias presentadas entre sexos, al menos en lo referente a la condición reproductiva. De cualquier forma, no se encontró correlación significativa por sexos (coeficiente de correlación de rango de Kendall: , 95% de confianza) entre los valores del IG y el IGMS de este trabajo.

Es importante hacer notar que debido al comportamiento reproductivo de M. californianus (desoves parciales en machos por ejemplo) la utilización de índices como el índice gonadal para evaluar la condición reproductiva, pueden no revelar lo que realmente ocurre a nivel gonadal. Ya antes Hines (1979) ha destacado la incertidumbre que crea la variación del índice gonadal sin información histológica.

Ya que se trata de una relación gónada-carne, un incremento en ésta "puede ser a causa de un decremento en la carne y no un incremento en la gónada" (Elvin, 1974), por lo que una elevación del índice gonadal en un período de tiempo, no siem

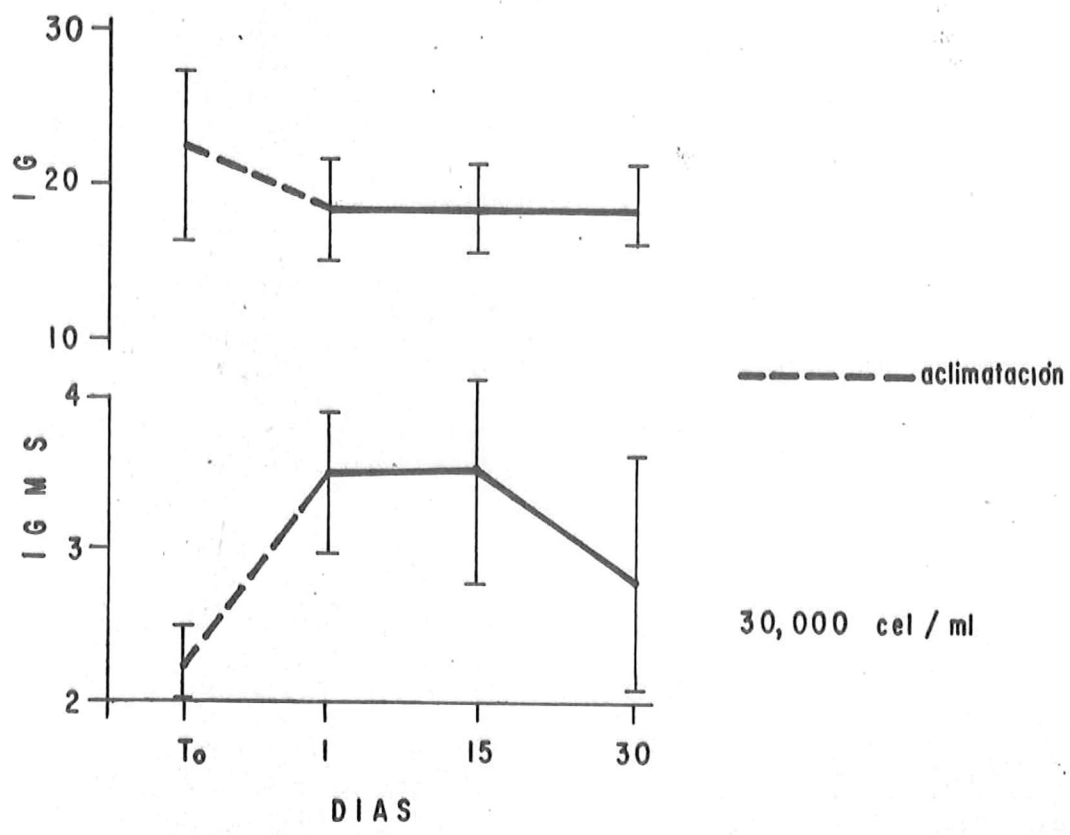
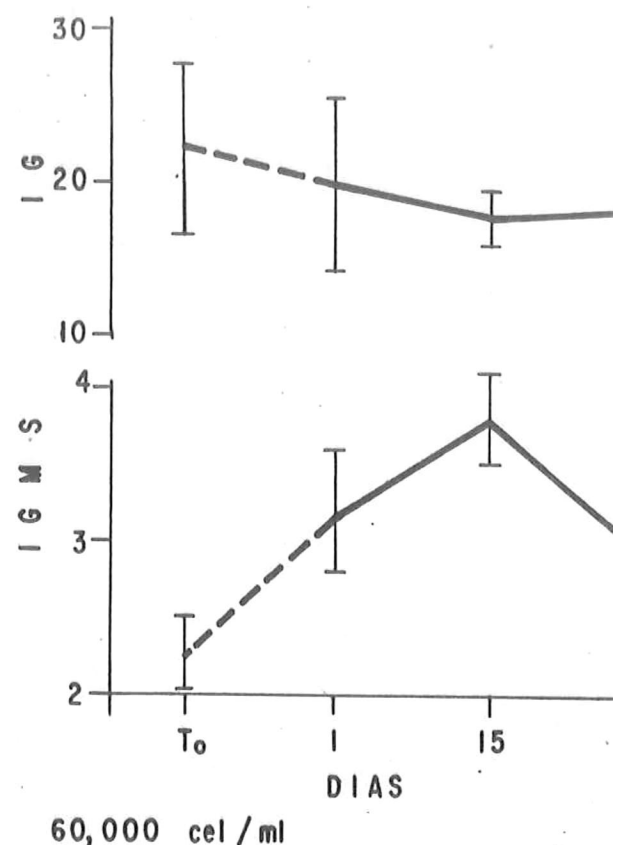
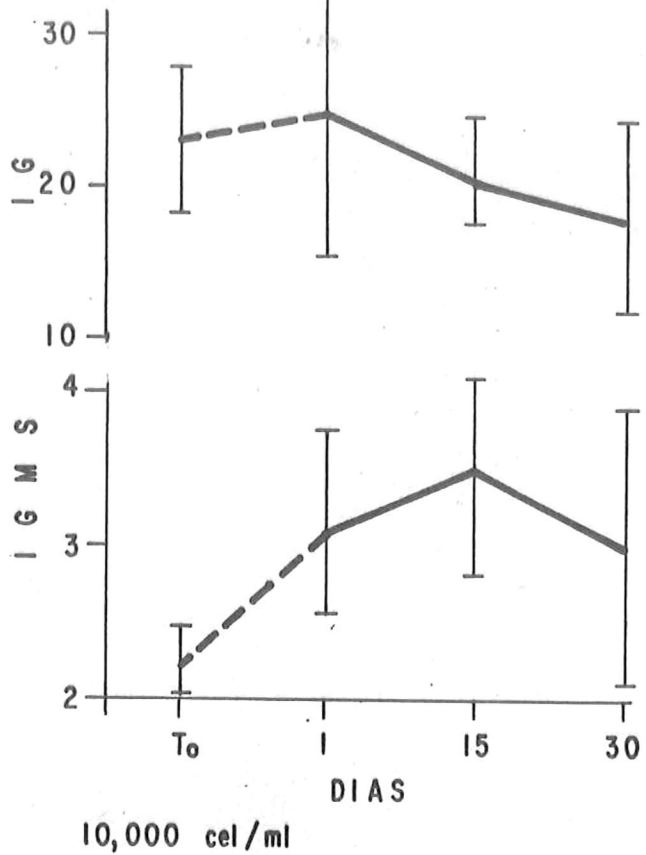
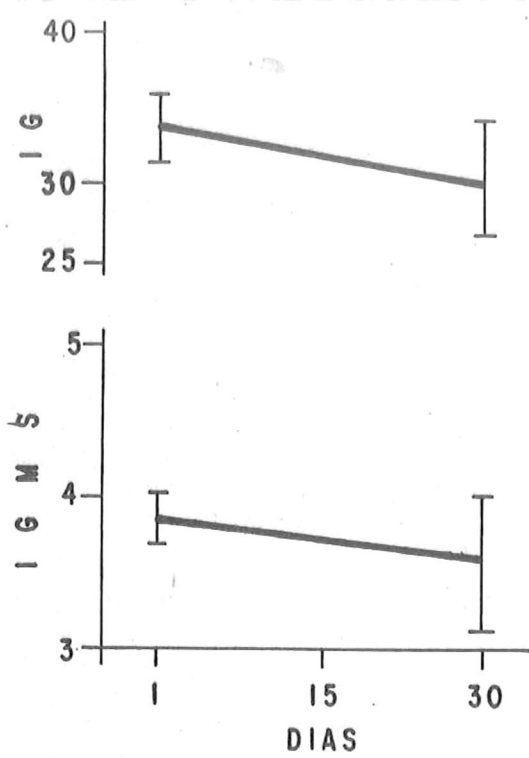
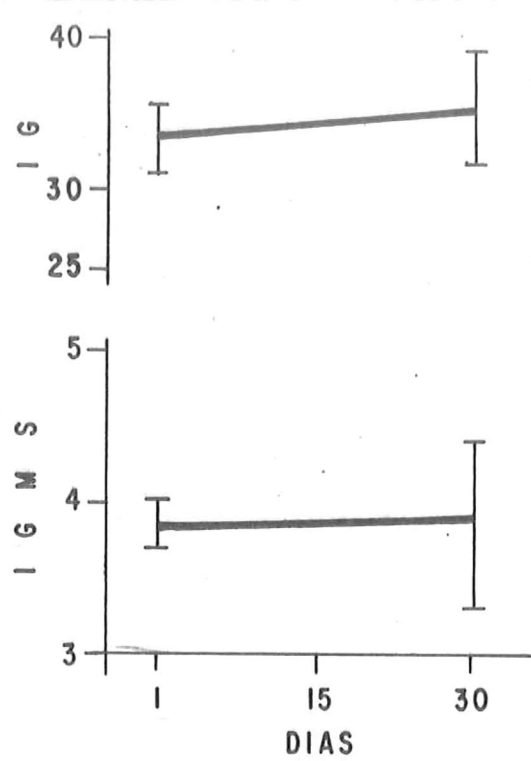


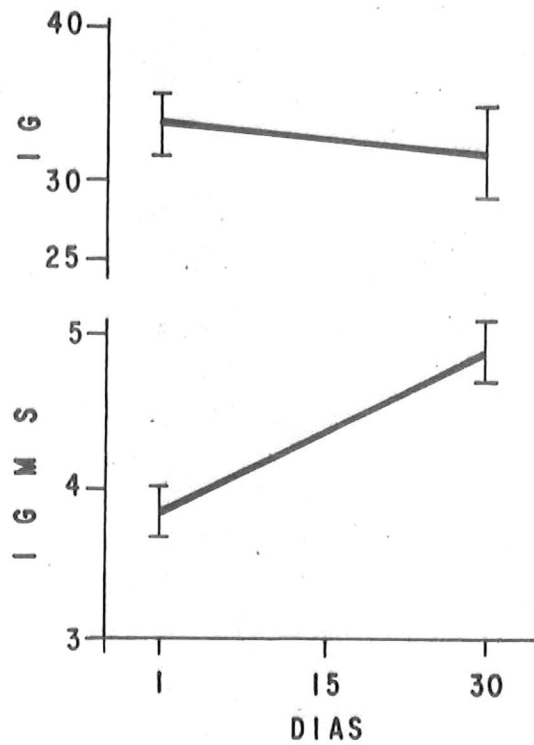
Figura 12. Comparación del índice gonadal medio de Seed (IGMS) con el índice gonadal porcentual (IG) obtenido por Lagos, (1982) para los mismos organismos durante el tratamiento con tres concentraciones de T. suecica.



Dieta 1. Sin alimento.

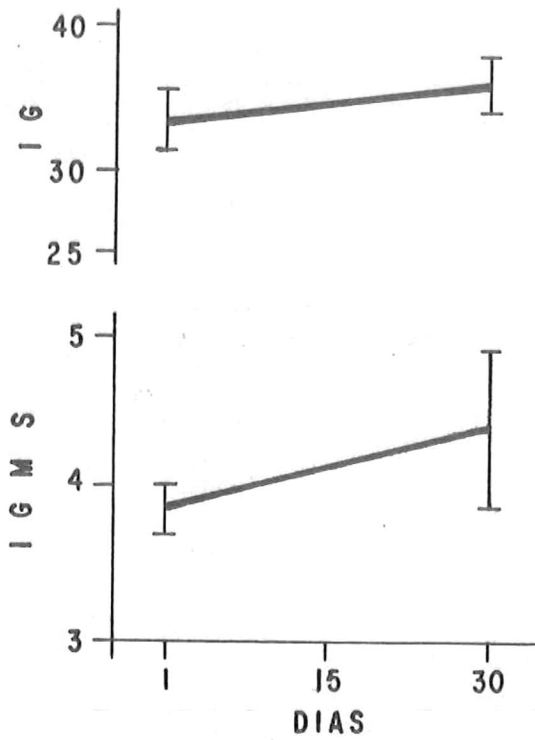


Dieta 2. T. suecica, I. galbana, almidón.

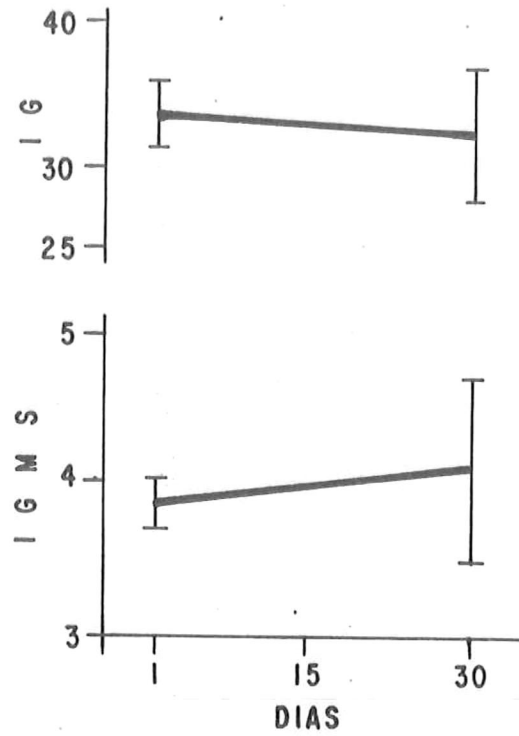


Dieta 3. T. suecica, I. galbana.

Figura 13. Comparación del índice gonadal medio de Seed (IGMS) con el índice gonadal porcentual (IG) obtenido por Lagos, (1982) para los mismos organismos durante el experimento con diferentes dietas a base de microalgas.



Dieta 4. T. suecica, I. galbana,  
M. lutheri, almidón.



Dieta 5. T. suecica, I. galbana,  
M. lutheri.

Figura 14. Comparación del índice gonadal medio de Seed (IGMS) con el índice gonadal porcentual (IG) obtenido por Lagos, (1982) para los organismos durante el experimento con diferentes dietas a base de microalgas.

pre significa un incremento en la condición reproductiva del organismo.

Trabajos anteriores con M. californianus realizados por Rojas y Santiago (1982) mostraron, que para los machos no existió correlación entre ambos índices y para las hembras, solamente en las épocas de desove de mayor intensidad.

Por lo tanto para M. californianus en condiciones experimentales de laboratorio, en donde el tamaño de la muestra es limitado, es conveniente utilizar junto con otros criterios, observaciones histológicas como forma de evaluación de su condición reproductiva y, con mayor razón, si lo que se pretende es acondicionar organismos para la obtención de gametos.

## VII. CONCLUSIONES

- Para Mytilus californianus de  $9.0 \pm 1$  cm mantenido en condiciones de laboratorio, con tres concentraciones de T. suecica, no se observó un decremento significativo en su estado de madurez después de un período de acondicionamiento de 45 días.

- El efecto de las diferentes dietas proporcionadas, fué positivo sobre el estado de madurez en el caso de los organismos machos, y en el caso de las hembras no se observó un decremento significativo después de un período de acondicionamiento de 30 días.

- No hubo una relación directa entre la concentración de alimento suministrado y la madurez gonadal, así como tampoco un efecto sobresaliente de las diferentes dietas proporcionadas sobre la madurez.

- No se encontró correlación entre el índice gonadal porcentual y el índice gonadal medio de Seed, para el total de la muestra en ambos experimentos, y por sexos en el caso del experimento con diferentes dietas.

## VIII. RECOMENDACIONES

Con el fin de completar los estudios que permitan detallar una técnica de acondicionamiento de M. californianus para la obtención de gametos en laboratorio, se recomiendan estudios posteriores, tratar de simplificar lo más posible el sistema de acondicionamiento, con el fin de disminuir la dependencia tecnológica. Es conveniente también, experimentar con variaciones en la temperatura y acondicionamiento durante diferentes épocas del año en que no se encuentren grávidos, con el fin de observar la variación de la influencia de la temperatura sobre el acondicionamiento. Se recomienda la utilización de criterios histológicos para evaluar la madurez gonadal. Si no se cuenta con posibilidades de hacer histología, se debe utilizar el índice gonadal con ciertas precauciones, tratando de acompañarlo con otro tipo de criterios como la evaluación de fecundidad o inducción al desove para aclarar confusiones debido a las variaciones del mismo índice.

## IX. REFERENCIAS

- Bardach, J.E., J.H. Ryther y W.O. Mclarney, 1972. General principles and economics; culture of mussels. En Aquaculture: The Farming and Husbandry of Freshwater and Marine Organisms. John Wiley and Sons, Inc. U.S.A.; 1-28 760-777.
- Bartlett, B. 1972. Reproductive ecology of the californian sea mussel, Mytilus californianus Conrad. M.S. thesis. University of the Pacific. Dept. of Zoology 58 numb, leaves.
- Bayne, B.L. 1976. Marine Mussels: Their Ecology and Physiology. Cambridge University Press. U.K.; 293-356.
- Bayne, B.L. y Thompson, R.J. 1970. Some physiological consequences of keeping Mytilus edulis in the laboratory. Helgolander Wiss. Meeresunters. 20:526-552.
- Bayne, B.L., P.A. Gabbott y J. Widdows. 1975. Some effects of stress in the adult on the eggs and larvae of Mytilus edulis L. J. Mar. Biol. Ass. U.K. 55:675-689.
- Breese, P.W., E.R. Milleman y E.R. Dimick, 1963. Stimulation of spawning in the mussels, Mytilus edulis Linnaeus and Mytilus californianus Conrad, by kraft mill effluent. Biol. Bull. 125(2):197-205.
- Buley, M.H. 1936. Consumption of diatoms and dinoflagellates by the mussel Mytilus californianus. Bull. Scripps. Inst. of Oceanography. Tech. Serv. 4(1):19-27.
- Coe, R.W. 1943. Development of the primary gonads and differentiation of sexuality in Teredo navalis and other pelecypod mollusks. Rep. from Biol. Bull. 84(2):178-186.
- Coe, R.W. y L.D. Fox, 1942. Biology of the California sea-mussel (Mytilus californianus). Influence of the temperature, food supply, sex and age on the rate of growth. J. Jour. of Exper. Zoology. 90(1):1-30.
- Chipperfield, P.N.J. 1953. Observations on the breeding and settlement of Mytilus edulis (L.) in british waters. J. Mar. Biol. Ass. U.K. 32:449-476.

- Christiansen, H.E., S.R. Brodsky y M.E. Cabrera, 1973. La microscopía aplicada con criterio poblacional en el estudio de las gónadas de los vertebrados e invertebrados marinos. *Physis. Secc. A. Buenos Aires.* 32(85):441-446.
- Davis, H.C. y R.R. Guillard, 1958. Relative of ten genera of microorganisms, as food for oysters and clam larvae. *Fish. Bull. U.S. Fish Wildlife Serv.* 58:293-304.
- Elsworth, R. 1969. Treatment of process air deep culture. En *Methods in Microbiology*, London Academic Press. I:123-136.
- Elvin, W.D. 1974. Oogenesis in Mytilus californianus. Ph.D. Dissertation. Oregon St. University 1975, 182pp. Diss. Abs. 35(7):3477-B, 1975. Order No. 74-29, 713.
- Epifanio, C.E. 1979. Comparison of yeast and algal diets for bivalve molluscs. *Aquaculture* 16:187-192.
- Epifanio, C.E. y C.A. Mootz, 1976. Growth of oysters in a recirculating maricultural system. *Proceedings of the National Shellfisheries Association.* 65:32-37.
- Epifanio, C.E. y J. Ewart, 1977. Maximum ration of four algal diets for the oyster Crassostrea virginica (G). *Aquaculture* 11:13-29.
- Flaak, A.R. y C.E. Epifanio, 1978. Dietary protein levels and growth of the oyster Crassostrea virginica. *Mar. Biol.* 45:157-163.
- Fox, L.D., M.N. Graham y A.F. Olive, 1936. The survival period of adult mussels in sea water of various concentrations. *Bull. Scripps Inst. of Oceanogr. Tech. Serv.* 4(1):5-11.
- Gabbott, P.A. y A.J.M. Walker, 1971. Changes in the condition index and biochemical content of adult oysters (Ostrea edulis (L.)) Manteined under Hatchery conditions. *J. Cons. Int. Explor. Mer.* 34:99-106.
- Gabbott, P.A. y R.R. Stephenson, 1974. A note on relationship between the dry weight, condition index and the glycogen content of adult oysters (Ostrea edulis (L.)) kept in the laboratory. *J. Const. Int. Explor. Mer.* 35(3):359-361.

- Ham, W.A. 1970. Interpretación de los cortes en el microscopio. En Histología, cap. 2. Ed. Interamericana. 6a. Ed. Mex. 9-24.
- Haven, S.D. 1965. Supplemental feeding of oysters with starch. Contribution No. 166 from Virginia Institute of Marine Science. 6:45-51.
- Hines, A.H. 1979. Effects of a thermal discharge on reproductive cycles in Mytilus edulis and Mytilus californianus (Mollusca:Bivalvia). Fish. Bull. 77(2): 498-503.
- I.I.O. (UABC). 1979. 2<sup>o</sup> Informe de Avances. Proyecto Bivalvos de Baja California, Sección Mytilus californianus, Instituto de Investigaciones Oceanológicas, UABC. Ensenada, B.C. México.
- Kinne, O. 1970. Bivalvia:Mollusca. Cultivation of animals. En O. Kinne (Ed), Marine Ecology. Vol. III, Cultivation, part 2. J. Wiley & Sons, N.Y. 900-936.
- Korringa, P. 1976. Farming the flat oysters of genus Ostrea. Developments in Aquaculture and Fisheries Science 3; Elsevier Scientific Publishing Co., N.Y. 238pp.
- Lagos, C.I. 1982. Acondicionamiento del mejillón Mytilus californianus en laboratorio y su efecto en el índice gonadal. Tesis UABC. Escuela Superior de Ciencias Marinas.
- Langton, R.W. y G.V. McKay, 1974. The effect of continuous versus discontinuous feeding on growth of hatchery reared spat of Crassostrea gigas Thunberg. J. Cons. Int. Explor. Mer. 3(5):361-363.
- Loosanoff, V.L. 1942. Shell movements of the edible mussel Mytilus edulis (L), in relation to temperature. Ecology. 23:231-234.
- Loosanoff, V.L. y H.C. Davis, 1963a. Rearing of bivalve mollusks. Inf. S. Russel (Ed.) Advances in Marine Biology, Vol. 1. Academic Press. N.Y. 1-26, 90-95.
- Loosanoff, V.L. y T. Murray jr. 1973. Maintaining adult bivalve for long periods on artificially grown phytoplankton. The Velieger, 16(1):93-94.

- Lucas, A. 1975. Sex differentiation and juvenile sexuality in bivalve molluscs. Publ. Staz Zool. Napoli 39, Suppl. 532-541.
- Mcmanus, J.F.A. y R.W. Mowry, 1960. Staining Methods. Histology and Histochemical. Ed. Harper & Row Publishers. 151pp.
- Moore, R.D. y D.J. Reish, 1964. Studies on the Mytilus edulis community in Alamitos Bay, California. IV. Seasonal variation in gametes from different regions in the bay, The Veliger. 11(3):250-255.
- Olive, A.F. 1936. The rate of digestion of ingested diatoms and dinoflagellates. Bull. Scripps. Inst. of Oceanography. Tech. Serv. 4(1):16-17.
- Parsons, T.R., K. Stephens y J.D.H. Strikland, 1962. On the chemical composition of eleven species of marine planktoners. J. Fish. Res. Bd. Canada. 18(6):1001-1016.
- Preece, A.N.T. 1972. A manual for Histological Technicians. Ed. Little, Brown and Company. 428pp.
- Pruder, D.G., E.T. Bolton, E.E. Greenhaugh y E.R. Baggaley, 1976. Oyster growth and nutrient nitrogen cost in bivalve molluscan mariculture. Result of research sponsored by NOAA Office of Sea Grant Department of Commerce and by the State of Delaware College of Marine Studies. University of Delaware. 20pp.
- Rao, K.P. 1953. Rate of water propulsion in Mytilus californianus as a function of latitude. Biol. Bull. Marine Biological Lab. Woods Hole, Mass. 104:171-181.
- Raven, P. 1958. Morphogenesis. The analysis of molluscan development. Vol. 2. Ed: Harris, J.E. y E.W. Yemm (Eds.) International Series of Monographs on Pure and Applied Biology. Pergamon Press. N.Y. 22-199.
- Riisgard, H.V. y F. Mohlenberg, 1979. An improved automatic recording apparatus of determining the filtration rate of Mytilus edulis as a function of size and algal concentration. Mar. Biol. 52:61-67
- Rojas, G.P. y B.R. Santiago, 1982. Determinación del ciclo reproductivo del mejillón Mytilus californianus en el ejido Eréndira, Baja California. Tesis UABC. ESCM. Ensenada B.C.

- Ruddy, G.M., S.Y. Feng y G.S. Campbell, 1974. The effect of prolonged exposure to elevated temperatures on the biochemical constituents, gonadal development and shell deposition of the american oyster Crassostrea virginica. Marine Research Lab. Project No. A-040 Conn. 157-164.
- Sastry, N.A. y N.J. Blake, 1971. Regulation of gonad development in the bay scallop, Aequipecten irradians Lamark'. Biol. Bull. 140:274-283.
- Seed, R. 1975. Reproduction in Mytilus (Mollusca:Bivalvia) in European waters. Publ. Staz. Zool. Napoli 39 Suppl. 317-334.
- Siegel, S. 1979. Estadística No Paramétrica. Ed. Trillas. S.A. México. 346pp.
- Stein, R.J. 1973. Culture methods and growth measurements. En Stein, R.J. (Ed) Phycological Methods. Cambridge Univ. Press. 290-292.
- Sung, K.Y. 1964. Food and growth of the larvae of certain important bivalves. Bull. Pusan. Fish. Coll. 9(2):65-66.
- Thompson, R.J., Ratcliffe, N.A. & Bayne, B.L. 1974. Effects of starvation on structure and function in the digestive gland of the mussel (Mytilus edulis L.). Journal of Mar. Biol. Ass. of the U.K. 54:699-712.
- Tranter, D.J. 1957. Reproduction in Australian Pears Oysters. (Lammelibranchia). I. Pinctada albina (Lamarck): Primary gonad development. J. Mar. Freshw. Res. 9(1):135-157.
- Tsuchiya, M. 1980. Biodeposit production by the mussel Mytilus edulis L. on rocky shores. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 47:208-222.
- Ukeles, R. 1969. Nutritional requirements in shellfish culture. Proc. of the Conference on Artificial Propagation of Commercially Valuable Shellfish Oysters. 43-64.
- Van Winkle, W. jr. 1970. Effect of environmental factors on byssal thread formation, Marine Biology. 7:143-148.

- Walne, P.R. 1963. Observations on the food value of seven - species of algae to the larvae of Ostrea edulis I. Feeding experiments. J. Mar. Biol. Ass. U.K. 43:767-784.
- Walne, P.R. 1966. Experiments in the large scale culture of the larvae of Ostrea edulis L. Fishery Investigations - Series II, V, XXV, No. 4:1-53.
- Walne, P.R. 1970a. The seasonal variation of meat and glycogen content of seven populations of oysters. Ostrea edulis L. and a review of the literature. Fishery Invest. Lond. Ser. 2. 26(3):35pp.
- Walne, P.R. 1974. Culture of Bivalve Molluscs. 50 years experience at Conwy. The Buckland Fund. Whitefriars Press. LTD. 1-31.
- Widdows, J. y B.L. Bayne, 1971. Temperature acclimatation of Mytilus edulis with reference to its energy budget. J. of the Mar. Biol. Ass. of the U.K. 51:827-843.
- Winter, J.E. 1973. The filtration rate of Mytilus edulis and its dependence on algal concentration measured by a continuous automatic recording apparatus. Mar. Biol. 22:317-328.
- Winter, J.E. y R.W. Langton, 1975. Feeding experiments with Mytilus edulis L. at a small laboratory scale. 10th. European Symposium on Marine Biology, Ostend, Belgium. Septe. 17-23, 1975. 1:565-581.
- Wright, H.S. y G.C. Stephens, 1977. Characteristics of influx and net flux of amino acids in Mytilus californianus. - Biol. Bull. 152:295-310.
- Young, R.T. 1942. Spawning season of the California mussel Mytilus californianus. Ecology. 23:490-492.
- Young, R.T. 1946. Spawning and setting season of the mussel Mytilus californianus. Ecology. 27:354-363.