

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS

EVALUACION DEL ACONDICIONAMIENTO Y DESEMPEÑO REPRODUCTIVO
DE *Tivela stultorum* (MAWE, 1823), A DIFERENTES TEMPERATURAS.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

PRESENTA

ERIKA CASTRO ACEVEDO

Ensenada, B. C. a 26 de agosto de 2019

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS

EVALUACION DEL ACONDICIONAMIENTO Y DESEMPEÑO REPRODUCTIVO
DE *Tivela stultorum* (MAWE, 1823), A DIFERENTES TEMPERATURAS

TESIS PROFESIONAL

QUE PRESENTA

ERIKA CASTRO ACEVEDO

APROBADO POR:

DR. SERGIO CURIEL RAMIREZ GUTIERREZ
Presidente del Jurado

DR. ERNESTO CAMPOS GONZALEZ
SECRETARIO

DR. GORGONIO RUIZ CAMPOS
1ER. VOCAL

DEDICATORIA

A mis padres Julián y Letty, por su amor completo. Nunca duden de su labor como padres pues son ustedes quienes me han motivado a cumplir mis metas, son sus valores los que me enseñan a ser un buen ser humano y son sus mimos los que me llenan de felicidad.

A mi padre Julián por enseñarme lo maravillosa que es la biología, por ser una fuente de inspiración y motivarme a crecer académicamente pues no conozco a nadie tan trabajador y dedicado como tú.

A mi madre Leticia por ser incondicional y siempre regalarme tu mejor versión, eres sinónimo de felicidad y amor.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer de manera especial al Dr. Sergio Curiel Ramírez, el director de este proyecto por haberme invitado a trabajar con él, por su asesoría y confianza en mí para que yo terminara este trabajo, pero sobre todo por motivarme a continuar superándome.

Al Dr. Ernesto Campos, co-director de esta tesis por sus valiosas aportaciones y sugerencias, por su excelente actitud y buena disposición en todo momento.

A la Dra. Arlette por haber formado parte del equipo durante el proceso de experimentación y por sus valiosas aportaciones para que todo funcionara de la mejor manera. Asimismo, al Dr. Zaul García que también nos apoyó durante ese proceso, pero sobre porque me acepto en su clase de biotecnología de moluscos y me enseñó las técnicas de la acuicultura.

A la UABC, principalmente a la Facultad de Ciencias y a la Facultad de Ciencias Marinas por apoyar como institución en diversos aspectos en la realización del presente trabajo.

Agradezco al Instituto de Investigaciones Oceanológicas por prestarme sus laboratorios, instalaciones y equipo y sobre todo al personal, técnicos, maestros y doctores que me apoyaron en la realización de múltiples etapas de mi tesis.

Resumen de la tesis de Erika Castro Acevedo presentada como requisito parcial para la obtención de la Licenciatura en Biología. Ensenada, Baja California, México.

La almeja Pismo, *Tivela stultorum* (Mawe 1823) es una especie de molusco bivalvo que habita en las costas del norte del océano pacífico. A pesar de ser una especie con un alto valor tanto nutricional, como económico y ser considerada como una especie sujeta a protección especial no existe ninguna investigación sobre aspectos de acondicionamiento, desarrollo larval y postlarval en laboratorio de la especie. En este experimento se evaluó el efecto de dos regímenes de temperatura sobre el desarrollo y composición de la gónada. Se recolectaron 72 organismos del medio natural los cuales fueron colocados a dos temperaturas: 16 y 20 °C durante un periodo de 8 semanas. Se realizaron biometrías semanales y se tomaron muestras de la gónada durante la semana 0, 3, 6 y 8 mediante las cuales se obtuvieron el índice de condición, índice gonádico, índice somático y estadios de desarrollo gonádico. Al terminal las 8 semanas se realizó una inducción al desove para cada sistema y se realizaron fertilizaciones bajo distintas concentraciones y temperaturas. El sistema de 16°C demostró resultados favorables en el aumento de índices gonadosomáticos, por otro lado, el análisis histológico demostró aumento de gametos maduros y en desarrollo dentro de la gónada.

Título de tesis: Evaluación del acondicionamiento y desempeño reproductivo de *Tivela stultorum* (Mawe, 1823), a diferentes temperaturas.

Resumen aprobado:

Dr. Sergio Curiel Ramírez Gutiérrez

I. INTRODUCCIÓN	
1.1.Importancia y distribución de <i>Tivela stultorum</i>	8
1.2.Características generales	9
1.3.Condición en bivalvos	10
1.4.La importancia del desarrollo de la acuicultura para <i>Tivela stultorum</i>	11
II. ANTECEDENTES	
2.1.Investigaciones anteriores	13
2.2.Aspectos del ciclo reproductivo de los moluscos bivalvos	14
2.3.Factores ambientales durante el acondicionamiento: temperatura y alimento.	15
2.4.Factores endógenos	17
2.5.Inducción al desove, fertilización y desarrollo larval	18
2.6.Índices de condición	19
2.7.Método para evaluar el ciclo gonadal en bivalvos.	19
III. AREA GEOGRAFICA DE ESTUDIOS	21
IV. METODOLOGÍA	
4.1.Sistemas de acondicionamiento	22
4.2.Periodo de acondicionamiento	25
4.3.Inducción al desove	26
4.4.Evaluación de la fertilización y desarrollo larval	29
4.5.Evaluación biométrica	31
4.5.1. Índice de condición y gonadosomático	32

4.6.Estereología cuantitativa	33
4.6.1. Índice gonádico y somático	37
V. RESULTADOS	
5.1.Efectividad de inducción al desove	38
5.2.Fertilización en un periodo de 1 hora	39
5.3.Producción de larvas	41
5.4.Análisis biométrico: Índice de condición y gonadosomático	42
5.5.Análisis histológico	45
5.6.Estereología cuantitativa: Índice gonádico y somático	49
VI. DISCUSIÓN	
6.1.Temperatura y alimento	56
6.2.Efectividad de desove y fertilización	57
6.3.Comparación de índices de condición	59
6.3.1. Evidencia histológica	61
6.4.Recomendaciones	63
VII. CONCLUSIONES	64
VIII. LITERATURA CITADA.	65
IX. APENDICES O ANEXOS.	72

I. INTRODUCCION

1.1.Importancia y distribución de *Tivela stultorum*

La almeja pismo *Tivela stultorum* (Mawe, 1823) es uno de los bivalvos más apreciados en el estado de Baja California, la cual tiene un alto valor gastronómico en el estado especialmente en el municipio de Ensenada. Es una especie que se ha aprovechado desde los inicios de la historia del hombre, prueba de ello son los restos encontrados que corresponden al pleistoceno (25, 000 millones de años) y a los depósitos de conchales de cocinas indias americanas donde fue utilizada por grupos de indios nómadas de la Alta y Baja California desde hace 200 a 2000 años como alimento y la concha como herramienta para escavar raspar y adorno (Fitch, 1961 y Pattison, 2001).

Si bien, durante décadas esta especie representó uno de los primeros lugares en volumen de producción, actualmente su población ha disminuido (Saavedra-Rosas, 1983). Se trata de una especie que se distribuye en la costa occidental americana, desde las playas de Half Moon Bay al norte de San Francisco, California, Estados Unidos, hasta el límite del Estado de Baja California, México, sin embargo, es un recurso que ha sido explotado principalmente en la región de San Quintín, Ensenada Baja California, donde la Playa San Ramón es la de mayor importancia por su producción (Siri y Moctezuma, 1989). La constante sobreexplotación de *Tivela stultorum* en México desde más de la mitad del siglo pasado y la falta de reportes sobre la extracción de la especie (SNIDRUS/ OEIDRUS, 2015) aunque se encuentre en la NOM-059-ECOL-2010 como una especie sujeta a protección especial (Pr).

1.2. Características generales

La almeja Pismo, *Tivela stultorum* (Mawe, 1823), es una especie de molusco bivalvo perteneciente a la familia Veneridae. Habita en playas arenosas con una alta exposición al oleaje, desde la zona intermareal hasta profundidades someras en el sublitoral (Fitch, 1950). Se caracteriza por sus valvas gruesas de forma sub-triangular que pueden llegar a medir hasta los 18 cm de longitud y su coloración, la concha exterior va desde castaño a café oscuro y en algunas ocasiones presentan líneas de color café chocolate que radian desde el umbo (Siri y Moctezuma, 1989, Chávez, 2002). La charnela presenta un diente anterolateral, particularmente en la valva izquierda, además presenta una línea paleal con un seno bien delimitado (Chávez, 2002).

Hay una limitada cantidad de información referente al ciclo reproductivo de la especie, se sabe que es un organismo esencialmente unisexual cuya edad de primera maduración pareciera variar en función de las tasas de crecimiento; desde el final del segundo o tercer año, presentando desoves masivos que ocurren en septiembre y octubre, aunque en algunos casos pueden desovar desde junio (Curiel Ramírez, comunicación personal). La fertilización ocurre de manera externa cuando el macho libera el esperma y la hembra los ovocitos en la columna de agua. En la naturaleza menos del 1 % de los huevos se convertirán en almejas adultas, donde los mecanismos que causan estos índices de mortalidad tan elevada, así como un bajo índice de reclutamiento no están establecidos todavía. Una vez que la larva se ha asentado es menos susceptible, sin embargo, esto no garantiza el éxito de su sobrevivencia; el estadio larval tampoco ha sido establecido aún (Annual status of fisheries report. 2006). La talla comercial de 12.7 cm se adquiere en

playas californianas en unos cinco años, aunque siendo una especie de crecimiento lento y variable, en algunos casos se puede alcanzar hasta en ocho o nueve años (Siri y Moctezuma, 1989). Por otro lado, *Tivela stultorum* es un molusco bivalvo muy longevo que puede vivir más de 50 años (Fitch, 1965).

1.3. Condición en bivalvos

La condición en bivalvos se ha utilizado tradicionalmente tanto con fines comerciales como biológicos (Baird, 1958; Walne, 1970). Según Searcy Bernal (1983), podemos entender la condición como el grado de “gordura” que presenta un organismo. Desde el punto de vista comercial, esta característica se asocia directamente con el rendimiento del producto y en algunos casos, con la mayor preferencia del consumidor por el sabor y consistencia que caracterizan a organismos con condición alta. En este sentido, puede usarse para valorar la calidad del producto según alguna escala predeterminada, o para compararla en distintas épocas del año, localidades o condiciones ambientales (Walne, 1970; Gabbot y Walker, 1971). En este sentido el acondicionamiento de los reproductores es fundamental si se quiere contar con larvas para producir semillas y promover el cultivo a talla comercial para mercados establecidos (Helm et al., 2006 citado por por López, J. 2015).

En términos biológicos, las fluctuaciones de la condición de un bivalvo se asocian generalmente con su estado reproductivo o nutricional; siendo particularmente importante la posibilidad de hacer inferencias generales sobre el ciclo reproductivo de una especie,

en base a mediciones de la condición. (Baird, 1958; Hickman e Illingworth, 1980; Santiago y Rojas, 1982 citado por Searcy Bernal y Saavedra Rosas, 1988).

1.4.La importancia del desarrollo de la acuicultura para *Tivela stultorum*

En las últimas décadas, la acuicultura se ha transformado en una de las actividades productivas con mayor crecimiento, tanto en el mundo entero, como en nuestro país. Ello como resultado de la reducción progresiva de los recursos bióticos por la sobre explotación de las poblaciones naturales de una gran variedad de especies acuáticas, así como por el surgimiento de nuevas y eficientes técnicas de cultivo y el avance e innovación tecnológica y científica (FAO, 2011).

El éxito de la industria de la acuicultura depende en gran medida de la disponibilidad de juveniles de alta calidad que pueden crecer rápidamente hasta un tamaño comercial. Existen muchos factores, tanto endógenos como exógenos, que afectan tanto el desempeño de las larvas como el de los juveniles tempranos y tardíos. Son tres etapas principales en las cuales puede manifestarse el efecto de esos factores:

- Desarrollo de las gónadas y gametos
- Desove y fecundación
- Desarrollo y crecimiento de la progenie

Considerando que los factores endógenos son más difíciles de manejar experimentalmente, los esfuerzos destinados a controlar la producción de semillas se han dirigido a los de naturaleza exógena, principalmente a aquellos que se refieren a la dieta y temperatura. (Martínez-Guzmán, G. 2008)

Actualmente, aún no se conocen todos los aspectos técnicos del cultivo de los reproductores de *Tivela stultorum*, incluyendo el acondicionamiento para la maduración, los métodos de inducción al desove, fertilización y cultivo larvario. La limitada cantidad de información sobre esta especie ya sea de experimentos realizados in situ o laboratorio nos indican la falta de conocimiento sobre la fisiología de reproducción, por lo tanto, es necesario conocer los factores endógenos y exógenos que intervienen en el desarrollo gametogénico de *Tivela stultorum*. Sobre todo, resulta indispensable conocer el desarrollo gonádico de esta especie a diferentes temperaturas en condiciones experimentales y su efecto en el desarrollo y expulsión de gametos. Lo anterior, con la finalidad de comprender la fisiología de reproducción y así definir la temperatura ideal de acondicionamiento en la que se consigue un desarrollo gonádico óptimo. Así, el objetivo de este trabajo es evaluar dos diferentes temperaturas en el acondicionamiento de los reproductores de *Tivela stultorum*, así como el desempeño reproductivo de los reproductores acondicionados, en aspectos de fecundación, fertilización y producción de larvas de los reproductores, en las temperaturas de acondicionamiento.

II. ANTECEDENTES

2.1. Investigaciones anteriores

Las investigaciones sobre este molusco se han enfocado principalmente en estudios poblacionales, debido a que desde principios del siglo pasado *Tivela stultorum* fue motivo de intensa explotación comercial en las costas de California en Estados Unidos, que se incrementó durante las guerras mundiales (cita?). Tan alta fue la intensidad de explotación, en comparación con la velocidad de recuperación del recurso, que el gobierno norteamericano tuvo que prohibir la explotación comercial en 1947 (Siri y Moctezuma, 1989). Según Sautto y Searcey (1981) después de la sobre-explotación en California las empresas empezaron a explotar este recurso en las costas de Baja California como fuente de materia prima. Pese a su alta demanda existe muy poca información referente a su registro histórico e incluso actual de extracción de la especie. Asimismo, los estudios en laboratorio son escasos, aunque existen algunos estudios publicados durante 1983-1984 por el Dr. Ricardo Searcey Bernal sobre aspectos poblacionales, índice de condición y modelos de crecimiento. Sin embargo, ninguno de ellos tuvo como objetivo aspectos de acondicionamiento y fertilización. Alvarado-Alvarez (1996) describió la inducción al desove mediante la inyección de serotonina; así mismo en estudios más recientes Silberfeld & Gros 2006 describió el desarrollo embrionario de *Tivela mactroides*, que funcionan como modelo para *Tivela stultorum*.

2.2.Aspectos del ciclo reproductivo de los moluscos bivalvos

La gametogénesis incluye un conjunto de procesos que controlan la maduración gonadal de hembras (ovogénesis) y machos (espermatogénesis). Depende de estímulos ambientales como la temperatura, fotoperiodo, disponibilidad de alimento, etc., los cuales activan factores endógenos de la señalización, y estos a su vez estimulan las rutas metabólicas involucradas en el almacenamiento y movilización de reservas energéticas, entre otros factores, hacia la gónada (Aguilleiro-Gozalbo, 2007).). Como resultado de la variación de algunos de los estímulos ambientales antes mencionados la reproducción de los moluscos bivalvos en su medio natural puede producir ciclos gametogénicos anuales, semianuales, o continuos (Sastry 1979); aunque no está completamente clara la forma en que dichos factores regulan la sincronización del desarrollo gametogénico de las especies (Sastry 1979, Pearse et al.1971).

Evidencias aportadas por Giese (1959) indican que las especies que habitan en latitudes altas presentan ciclos reproductivos anuales con desoves principalmente durante primavera-verano, mientras que en latitudes bajas los periodos de desove son largos y pueden ocurrir de forma semianuales o continua (Oyarzún Cabañas et al 2010). En moluscos bivalvos se puede lograr la madurez artificial fuera del periodo reproductivo natural de campo mediante el control de la temperatura y el alimento (Loosanoff y Davis, 1963). Para ello, es necesario conocer el umbral de temperatura óptima en donde ocurra la transferencia de nutrientes necesaria para el crecimiento de los ovocitos durante la vitelogénesis (Sastry, 1968; 1970; Sastry y Blake, 1971; Blake, 1972; Sastry, 1979)

La reproducción en los bivalvos está asociada a ciclos de almacenamiento complejos de reservas energéticas y utilización de energía de los diferentes tejidos, ayudando a sostener la gametogénesis cuando la disponibilidad de alimento en el medio es baja. Estos varían de acuerdo a la influencia de diverso factores exógenos y endógenos entre especies e incluso entre poblaciones de la misma especie (Epp et al., 1988, Barber y Blake, 1991). Gabbott (1975) estudió la relación entre el metabolismo del glucógeno y la gametogénesis y concluyó que parte del glucógeno almacenado se transforma en lípidos, movilizados durante la vitelogénesis para su almacenamiento, sobre todo, en los gametos femeninos. Así, para el éxito de los desoves, es necesario conocer el ciclo reproductor de esta especie y la evolución y distribución de sus reservas energéticas y aplicar estos conocimientos a la mejora del proceso de acondicionamiento. (Ojea, J. et al., 2002)

2.3. Factores ambientales durante el acondicionamiento: temperatura y alimento

Dentro de los factores exógenos se incluyen marea, oleaje, fotoperíodo, disponibilidad de alimento y temperatura, siendo estos dos últimos los más importantes (Sastry, 1963; Loosanoff y Davis, 1963; Sastry, 1966, 1968; Giese y Pearse, 1974; Lowe et al., 1982; Taylor y Capuzzo, 1983; Barber y Blake, 1991).

La temperatura del agua es de suma importancia en el acondicionamiento de moluscos bivalvos ya que actúa como un disparador o regulador de eventos reproductivos, además de ser capaz de influenciar la velocidad con la que se lleva a cabo la gametogénesis (Fearman & Moltschanivskyj, 2010). El patrón de ciclo reproductivo y los cambios que

lo acompañan son afectados por la temperatura dependiendo de la historia térmica de las especies y de su distribución regional (Martínez-Guzmán, G. 2008).

Sastry (1979), ha establecido que el crecimiento gonadal y la gametogénesis en varias especies de bivalvos se correlacionan positivamente con cambios estacionales de la temperatura, en algunos casos con la declinación de la temperatura en el otoño o con su incremento en primavera y verano. Existen estudios que muestran que aumentos en la temperatura del agua no dan por resultado necesariamente una mejoría en el desempeño reproductivo de los bivalvos, por ejemplo, en *Ostrea chilensis*, temperaturas bajas mostraron ser importantes en estimular tanto la ovogénesis temprana como la espermatogénesis (Jeffs et al., 2002). Sin embargo, Chavez-Villalba et al. (2002) examinando el efecto de esta variable sobre el acondicionamiento reproductivo de *Crassostrea gigas*, detectaron que efectivamente el crecimiento de los ovocitos se acelera entre 16 y 22 °C pero, decrece significativamente a 25 °C. En los estudios en ostión *A. purpuratus* (Martínez et al., 2000a), además de probar dietas, se ensayaron dos temperaturas para el acondicionamiento de reproductores, y se encontraron mejores resultados, tanto en porcentaje de maduración como en respuesta a estímulos desovantes, en aquellos individuos mantenidos a 16 °C que en aquellos a 20 °C. (Martínez-Guzmán, G. 2008)

Por otro lado, la dieta por excelencia empleada en el acondicionamiento de moluscos bivalvos a nivel mundial es a base de microalgas, por encontrarse relacionadas con la fecundidad (Pronker et al., 2008). Esta dieta da buenos resultados en la maduración de los

organismos, especialmente cuando se emplea más de una sola especie de microalgas como alimento (Wilson et al., 1996; Berntsson et al., 1997; Gonzales-Araya et al., 2012).

2.4. Factores endógenos:

Los factores endógenos son los que determinan la respuesta a las variables ambientales en las distintas etapas del ciclo reproductivo en los bivalvos. Entre dichos factores endógenos debemos considerar aquellos inherentes a la biología de la especie, como serían su estrategia reproductiva, su genética misma y los relacionados con la regulación de sus funciones. Luego de alcanzar cierto estado fisiológico, en un organismo expuesto a las condiciones ambientales adecuadas, se inicia el crecimiento de la gónada y la gametogénesis. (Martínez-Guzmán, G. 2008)

Existen pocos estudios sobre los mecanismos endógenos de control de la gametogénesis en moluscos. Se sabe que los bivalvos poseen un sistema nervioso relativamente simple que consta de un osfradio (parche sensorial cerca de las branquias) y tres pares de ganglios principales (cerebral, pedal y visceral) unidos por cordones nerviosos. En algunas ocasiones pueden presentar quimio o termo receptores, así como también órganos de equilibrio. (Beninger et al., 1995; Zaixo, 2003; Nurai et al., 2010).

Para desarrollar una metodología para el acondicionamiento gonádico de bivalvos reproductores es necesario conocer los factores que estimulan el desarrollo gonádico. La maduración sexual en bivalvos es producto de una compleja interacción de factores exógenos (ambientales) y de factores endógenos (Mackie, 1984; Román et al., 2001; Barber & Blake, 2006) los cuales se sincronizan y regulan los eventos reproductivos.

2.5.Inducción al desove, fertilización y desarrollo larval

En la mayoría de los casos el desove se lleva a cabo durante un periodo de climatización sin el uso de agentes externos. Sin embargo, Loosanoff y Davis (1963) mencionaron que en algunas ocasiones, es necesario estimular a los organismos agregando huevos o espermias. (Reverol et al., 2004).

Por otro lado, existen numerosos estudios indicando que la serotonina es en general un inductor efectivo del desove. No obstante, esta inducción en pectínidos gonocóricos, requiere mayores dosis para liberar gametos femeninos que para la expulsión de los masculinos (Matsutani, 1990) y en los hermafroditas funcionales tales como *A. irradians* (Gibbons y Castagna, 1984), *P. ziczac* (Vélez et al., 1990), y *A. purpuratus* (Martínez et al., 1996) sólo induce liberación de espermatozoides y no de ovocitos. (Martínez-Guzmán, G. 2008).

Existe una limitada cantidad de información sobre el proceso de fertilización de *Tivela stultorum*. Sin embargo, un estudio realizado por Reverol et al., (2004) describió el desarrollo larval de *Tivela mactroides*, la cual nos da una perspectiva sobre el proceso larval de *Tivela stultorum*. Esta especie tiene un desarrollo embriológico completo en cinco horas y un ciclo larval de 20 a 22 días. Tras 1.05 horas de haber sido fecundado el ovulo ocurre la primera división. La segunda y tercera división ocurren a las 1.22 y 1.39 horas. La cuarta división ocurre a las 1.62 horas. En las primeras 5 horas la mayoría de los embriones estarán en blástula y gástrula. La larva trocofora se observó aproximadamente 10 horas después de la fertilización; 8 días más tarde pasa a la etapa

veliger y 22 días después de la fertilización se observará la larva pediveliger. Los resultados durante este experimento sugirieron que *Tivela mactroides* tiene un ciclo larval más corto en comparación con otros bivalvos. (Reverol et al., 2004). En el presente trabajo solo se mantuvieron las larvas durante un proceso de 24 horas.

2.6. Índices de condición

Jaramillo et al. (1993) y Rodríguez (1992), utilizan el índice gonadosomático como un método alternativo y complementario para caracterizar el ciclo gonádico y determinar los periodos de reproducción, por otro lado, Gabbott y Walker (1971) mencionan que los índices de condición también son útiles para caracterizar el ciclo sexual, pero que se utilizan principalmente para determinar el estado de salud del organismo como respuesta al estrés. Bayne (1975), define el estrés como una alteración medible del estado estable o real de los organismos. Esta alteración puede ser de tipo citológico, bioquímico, fisiológico o de conducta, y puede ser producida por cambios ambientales, enfermedades, inanición y reproducción, por lo tanto, el rendimiento del organismo es más vulnerable a cambios ambientales. Los valores elevados de estos índices corresponden a cambios en el peso seco del tejido y pueden indicar periodos de madurez o liberación de gametos (Zetina et al., 2000).

2.7. Método para evaluar el ciclo gonadal en bivalvos:

Según las experiencias en la aplicación de diversas metodologías para el estudio de la biología reproductiva en otros moluscos, el conocimiento de los mecanismos naturales de regulación y de las estrategias reproductivas de las especies, ha implicado el uso de

diversos métodos de estudio que van desde la determinación de índices gonádicos y de condición, utilización de escalas morfocromáticas de desarrollo gonádico, hasta el análisis histológico de la gónada. Este último es considerado como el más adecuado para determinar la cinética del desarrollo gamético (Giese y Pearse, 1974).

El análisis de los tipos celulares del sistema reproductor proporciona la mejor información sobre el estado del ciclo reproductivo ya que pueden hacerse observaciones muy precisas de la fase de desarrollo y de los tipos celulares que conforman la gónada. Cuando además de analizar los tipos celulares del tejido gonadal, estos se cuantifican, se obtiene información cuantitativa del ciclo gonadal. Esta técnica se le conoce como estereología cuantitativa, la cual se ha utilizado con buenos resultados en numerosos estudios (Bayne et al. 1978; Newell et al. 1982; Lowe et al. 1982; Brouseua, 1983; Ferrán et al. 1990, Ferrán, 1991, Seed y Suchanek, 1992, Cáceres-Martínez et al. 1998a).

III. AREA GEOGRAFICA DE ESTUDIOS

Los reproductores fueron extraídos de su medio natural y traídos al laboratorio. Un total de 93 organismos adultos de *Tivela stultorum* fueron recolectados manualmente el 16 de abril de 2018 en el predio ZF-DGVS-150-BC, localizado en la playa El Pabellón en San Quintín, Baja California ($30^{\circ}20.640' N$ y $115^{\circ}50.243' W$) (permiso SEMARNAT SGPA/DGVS/07148/17). Los organismos fueron transportados a $4^{\circ}C$ a la Unidad de Investigación y Capacitación para la Producción y Engorda de Semillas Marinas (INCAPESM) en el Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la Universidad Autónoma de Baja California.

IV. METODOLOGIA

4.1.Sistemas de acondicionamiento

Se instalaron dos sistemas de acondicionamiento cerrados (RAS por sus siglas en inglés Recirculation Aquaculture System) exactamente iguales. Los componentes del sistema incluían equipo que está directamente implicado en el cultivo de moluscos y peces para sistemas de recirculación. Los sistemas estaban compuestos por los siguientes elementos:

- **Tanques:** Cada sistema utilizaba tres tanques cónicos de 50 lts, dos tanques de 200 l, un reservorio cuadrado de 400 l y un tanque externo de 200 l de capacidad.

Los tanques cónicos (Tc1, Tc2, Tc3) albergaban a las almejas que se colocaron en cajas de plástico permitiendo mantener a los organismos en posición vertical con el sifón hacia arriba; esta posición se estableció durante la prueba piloto que se menciona en la sección de anexos. Tc1, Tc2, Tc3 se conectaban a un tanque sedimentador (Ts4) de 200 l que permitía la captación de heces de fondo. Ts4 se enlazaba a un tanque-filtro biológico (Tfb5) de 200 l con cuentas flotantes de 0.6 ft³ de capacidad (FBF por sus siglas en inglés) que controlaban el nivel de amonio en cada sistema. Por último, Tfb5 estaba vinculado a un reservorio cuadrado (Tr6) dentro del cual se colocó una bomba de 1/16 HP la cual se encargaba de transportar el agua a los sistemas de enfriamiento.

Cada sistema contaba con un tanque externo (Ta7) que suministraba alimento diariamente.

- Generador de oxígeno o fuente de aeración: Tc1, Tc2 y Tc3 contenían un ventilador que funcionaba como fuente de aeración.
- Filtración mecánica: Un filtro mecánico es utilizado para remover los sólidos suspendidos obtenidos de las heces y de alimento no consumido, esto es importante para evitar que se tapen las tuberías además de que dichos sólidos consumen oxígeno, por lo que puede afectar su disponibilidad para los moluscos. El Ts4 funcionaba como sedimentador para la captación de heces de fondo. Todos los días se retiraban las heces que se acumulaban en el fondo mediante una extracción manual.
- Filtración biológica: El Tfb5 funcionaba como filtro biológico de cuentas flotantes de 0.6 ft³ de capacidad que permitía mantener un nivel de amonio constante y no dañino en cada sistema.
- Calefacción y enfriamiento: Cada sistema contenía una bomba de 1/16 HP en el Tr6, la cual transportaba el agua a los sistemas de enfriamiento y permitía mantener una temperatura constante en cada sistema de $16 \pm 1^{\circ}\text{C}$ y $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$ respectivamente.
- Bombas y tubos: Estos son requeridos para mover el agua dentro del sistema, por lo que resulta importante considerar el tamaño correcto, de tal forma que permita el adecuado flujo de agua a través de los tanques.

Durante el periodo de acondicionamiento se registraron los siguientes parámetros fisicoquímicos:

1. Temperaturas máximas y mínimas: En el Tc1 y Tr6 de cada sistema se colocó un termómetro que registraba las temperaturas máximas y mínimas diarias de cada sistema, esto nos permitía monitorear de forma sencilla las temperaturas durante el día y la noche. Además, se colocó un sensor de salinidad y temperatura en el Tr6 de cada sistema que se retiró al terminar el acondicionamiento y permitió corroborar la información.
2. Salinidad: Se medía semanalmente utilizando un refractómetro, además con el sensor que se mencionó previamente se obtuvo el valor de la salinidad al finalizar el acondicionamiento.
3. Nivel del agua: El Tr6 estaba marcado cada 10 litros; diariamente se anotaba el nivel y en dado cambio de hacer un recambio de agua siempre se tenía que dejar al mismo nivel (140 litros).
4. Niveles de amonio, nitratos y nitritos: Se utilizaba un kit para medir las concentraciones mediante una prueba colorimétrica tres veces a la semana.
5. pH del agua: El pH del agua se medía 3 veces a la semana utilizando un potenciómetro.

Los valores de temperatura, salinidad, amonio, nitratos y nitritos, así como el pH se pueden encontrar en la sección de anexos.

Por otra parte, para mantener la calidad del agua de ambos sistemas, diariamente, las heces eran extraídas por sifón y de manera periódica se realizaban retrolavados del 50% y del 100%.

De ahora en adelante para identificar a cada sistema nos referiremos como Sistema 1 al de 16°C y Sistema 2 al de 20°C. Es importante aclarar que los valores de temperatura de 16 y 20 °C se establecen tomando en cuenta las temperaturas máximas y mínimas registradas en las bases de datos históricas para la localidad la playa el Pabellón de San Quintín, así como de resultados de trabajos previos realizados en el laboratorio dentro de la Unidad del INCAPESM del Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la UABC (Curiel-Ramírez datos por publicar).

Una vez instalados y probados los sistemas de los reproductores de *Tivela stultorum* se dio inicio al acondicionamiento.

4.2.Periodo de acondicionamiento

Una vez se sacaron los adultos del mar se les llevo al criadero en donde se restregaron y lavaron las conchas meticulosamente para retirar la epifauna (incrustaciones) y sedimentos adheridos. Una vez limpias se marcaron numéricamente con un mini taladro en la parte externa de ambas valvas para su identificación a lo largo del experimento. El experimento inicio con un total de 93 almejas de las cuales se colocarán 36 en cada sistema; cada tanque cónico contenía 12 almejas dispuestas en cajas de plástico que permitían mantener el umbo en dirección vertical de tal manera que el sifón quedara libre.

De manera inicial se registró la longitud total y peso húmedo; asimismo semanalmente se realizaba una biometría del peso húmedo de todos los organismos de cada sistema.

4.3.Inducción al desove

Los desoves se realizaron en días distintos para cada sistema debido a la disponibilidad del equipo y tiempo. Con un día de anticipación se llenaron dos reservorios de 200 l con agua de mar filtrada y pasada por rayos UV. En cada reservorio se colocó un sistema de enfriamiento o calentamiento de tal manera que la temperatura del agua para los organismos del Sistema 1 fuera de 11°C en un tanque y de 21°C en el otro; para los organismos del Sistema 2 las temperaturas eran de 15°C en uno y de 25°C en otro. Antes de iniciar los ciclos se realizó la última biometría de peso húmedo a las almejas que se utilizaron para el desove, estas fueron se talladas con una fibra y se limpiaron con agua dulce para evitar el ingreso otros organismos al sistema. Finalmente se colocaron de manera vertical dentro de la bandeja de desove. A continuación, en las Tablas 1 y 2 se describen los ciclos durante la inducción al desove.

FASE	HORA	OBSERVACIONES
PRIMER CICLO		
Fase fría	9:25 am	Se dio inicio al primer ciclo. Al menos 7 almejas estaban activas con el sifón de fuera.
Fase templada	10:03 am 10:05 am	Se agregaron 2.5 litros de alimento. Dos almejas se encontraban con el sifón de fuera y 11 de 19 almejas estaban filtrando.
SEGUNDO CICLO		
Fase fría	10:37 am 10:43 am	Se dio inicio al segundo ciclo. 14 de 19 almejas se encontraban filtrando.
Fase templada	10:12 am 11:42 am	Se sacaron algunas almejas de sus cajas para ver si esto podía estar afectando el desove. 2 de 3 almejas sacaron el sifón casi de manera instantánea. No se vio segregación de mucosidad como en las almejas del sistema 2. Comenzó a desovar la #36 (macho).
TERCER CICLO		
Fase fría	12:55 pm	Se dio inicio al tercer ciclo (desovo la #17)
Fase templada	12:30 pm	Iniciando el ciclo desovo la #21. Se inyectaron con 1ml de serotonina a todas las almejas y desovo la #23. Se dio una hora del ciclo de agua caliente y desovaron 6 organismos. Se sacrificó a la almeja #2 (hembra) y la almeja #30 (macho) para agregarles serotonina y que ayudaran a inducir el desove al resto de los organismos.
CUARTO CICLO		
Fase fría	1:50 pm 2:08 pm	Se dio inicio al cuarto ciclo. Comenzó a desovar la #20 (hembra).
Fase templada	2:17 pm	Se inició el cuarto ciclo de agua templada. Se realizó la fertilización con las almejas que habían desovado.

Tabla 1. Bitácora de desove del Sistema 1. La temperatura del agua en la fase fría se encontraba 11°C y en la fase templada a 21°C.

FASE	HORA	OBSERVACIONES
PRIMER CICLO		
Fase fría	10:28 am 10:37 am	Se dio inicio al primer ciclo. La almeja #67 y #71 se inyectaron con serotonina y se colocaron por separado en recipientes de 1 l fuera de la bandeja de desove durante 30 min.
Fase templada	10:59 am	Se agregaron 2 litros de alimento.
SEGUNDO CICLO		
Fase fría	11:31 am 11:55 am	Se dio inicio al segundo ciclo. Se volvió a inyectar la #67 y se colocó en el baño de 25°C.
Fase templada	12:03 pm 12:06 pm	Se dio inicio a la fase templada del 2do ciclo. Se inyectó 1ml de serotonina a la #71 y se colocó en el baño de 25°C.
TERCER CICLO		
Fase fría	12:33 pm	Se dio inicio al tercer ciclo.
Fase templada	1:08 pm 1:33 pm	Se agregaron 2 litros de alimento. Se inyectaron con 1ml de serotonina a todas las almejas Se sacó la almeja #41 (macho) ya parecía estar desovando. El desove tenía una consistencia extraña y no era continuo.
CUARTO CICLO		
Fase fría	1:50 pm 1:53 pm	Se dio inicio al cuarto ciclo. Se sacó la almeja #63 (macho) ya que parecía estar desovando. El desove tenía una consistencia extraña y no era continuo sin embargo los espermatozoides estaban muy activos. Se le inyectaron 2 ml de serotonina a la almeja #53.
Fase templada	2:21 pm	Todas las almejas están inyectadas con al menos 1ml de serotonina, la almeja #66 (hembra) se sacó porque empezó a desovar.
*Se hizo un último ciclo y con las almejas que habían desovado se hizo una fertilización		

Tabla 2. Bitácora de desove del Sistema 2. La temperatura del agua en la fase fría se encontraba 15°C y en la fase templada a 25°C.

4.4. Evaluación de la fertilización y desarrollo larval

Se realizaron dos fertilizaciones durante cada desove, una en donde se evaluó la cantidad de huevos fertilizados a distintas concentraciones y otra para evaluar la cantidad de larvas D en un periodo de 24 horas.

Una vez que los organismos comenzaron a desovar fueron colocados individualmente en un recipiente de 2 L (En el recipiente se rotuló el No. de organismo, el sexo y la hora de inicio de desove). En el caso de los machos si el desove era constante se cambiaba al organismo a un vaso nuevo al transcurso de una hora, esto permite obtener un esperma nuevo para utilizar en la fertilización. Al transcurrir dos horas desde el inicio del desove se dio inicio a la fertilización, a continuación, se muestran los pasos que se llevaron a para realizar la fertilización:

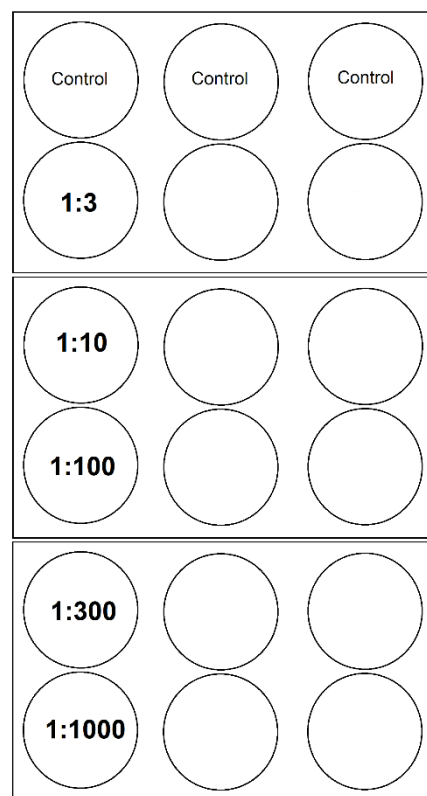


Figura 1. Placa para la evaluación de la fertilización.

1. Se hizo una estimación de la producción de huevos o espermatozoides de cada almeja.
2. Una vez los huevos y el esperma fueron contados, con la ayuda de un tamiz de 36 μm se depositaron de manera separada en vasos de 800 ml.

3. Se homogenizaron respectivamente óvulos y esperma con un agitador de acrílico horadado.
4. Con una micropipeta de 10 y 100 μL se fecundaron las siguientes concentraciones: 3, 10, 100, 300 y 1000 espermatozoides por huevo.
5. La fecundación se realizó en placas multipocillos de seis compartimientos de 10 ml de capacidad cada uno como se muestra en la Figura 1; para cada concentración se realizaron tres réplicas de 1ml. En total se obtuvieron 15 fertilizaciones más 3 muestras control que solo contenían huevos.
6. Para cada sistema se probaron tres temperaturas de fertilización: 16, 18 y 20 °C. Al transcurrir 2 horas las muestras fueron transferidas a tubos de ensayo y fijadas con lugol.
7. Cada muestra se analizó en el microscopio y con la ayuda de una cámara Sedgewick Rafter se contabilizaron los huevos no fecundados y los huevos fecundados.

El procedimiento para evaluar la cantidad de larvas D en un periodo de 24 horas fue similar al anterior:

1. Se hizo una estimación de la producción de huevos o espermatozoides de cada almeja.
2. Una vez los huevos y el esperma fueron contados, con la ayuda de un tamiz de 36 μm se depositaron de manera separada en vasos de 800 ml.

3. Se homogenizaron respectivamente óvulos y esperma con un agitador de acrílico horadado.
4. Los huevos fueron fertilizados en una concentración de 100 espermatozoides por ovulo en un litro de agua.
5. Para esta evaluación se colocaron en tinas de agua a distintas temperaturas: 16, 20 y 22 °C, en cada una de ellas se colocaron las 4 réplicas, teniendo en total 12 muestras por desove.
6. Pasadas 24 horas cada réplica se pasó por un tamiz de 28 μm para ser colocadas en recipientes más pequeños y fijarse con lugol.
7. Posteriormente, las muestras se analizaron en el microscopio, con la ayuda de la cámara Sedgewick Rafter se contaron el total de óvulos fecundados y no fecundados, con un micrómetro ocular se midieron y se categorizaron por tamaño. De 30 a 40 μm , de 50 a 90 μm y de 100 μm .

4.5. Evaluación biométrica

Previo al inicio de acondicionamiento, de los 93 organismos se tomaron 21 almejas para realizar la primera evaluación biométrica en donde se registraron las siguientes medidas morfométricas:

1. Longitud total
2. Peso total
3. Peso de la carne
4. Peso de la concha
5. Peso de la gónada y sistema digestivo (GDG)

Durante el periodo de acondicionamiento se realizaron además tres evaluaciones biométricas al azar en distintas fechas: al concluir la semana 3 (6 organismos por sistema), al final de la semana 7 (5 organismos por sistema) y al final de la semana 8 (6 organismos por sistema), este últimos se realizó un día después del desove de cada sistema. Estos muestreos permitieron obtener información sobre grado de madurez gonádica de *Tivela stolturum* durante el periodo de acondicionamiento que fue determinado con los índices de condición, así como con la técnica de estereología cuantitativa mediante la realización de cortes histológicos en la sección de la gónada. Es importante aclarar que las almejas seleccionadas para la evaluación biométrica no participaron durante el desove.

4.5.1. Índice de condición y gonadosomático

Las medidas morfométricas que se obtuvieron al realizar las biometrías permiten calcular el Índice de Condición e Índice Gonadosomático.

a) Índice de Condición:

$$IC = \left(\frac{\text{Peso Carne}}{\text{Peso Total} - \text{Peso Concha}} \right) * 100$$

b) Índice Gonadosomático:

$$IGS = \left(\frac{\text{Peso GDG}}{\text{Peso Carne}} \right) * 100$$

*En donde GDG: Peso de la gónada y Sistema digestivo

4.6. Estereología cuantitativa:

La estereología cuantitativa se basa en el principio de Delesse, el cual establece que una sección bidimensional o fracción de volumen (V_v) de una roca o cualquier otro compuesto sólido (tejido) la naturaleza y distribución de los componentes seccionados está relacionada cuantitativamente con su naturaleza tridimensional y su distribución en la estructura de un todo (Briarty, 1975). Este principio parte de que la fracción del volumen (VV) de los diversos componentes "i" de un sólido compuesto, se puede estimar midiendo, sobre secciones tomadas aleatoriamente, las áreas relativas de sus perfiles y su expresión matemática es ($A_{ai}=V_{vi}$). Siguiendo el protocolo utilizado por Moguel-García et al. (2016), la fracción del volumen del componente "i" (V_{vi}) se define como el volumen del componente "i" en la unidad del volumen del espacio de referencia, y se estima mediante una retícula con una serie de puntos alineados (Weibel 1969), de tal forma que se obtiene contando el número de puntos que se encuentran sobre los perfiles del componente "i". Es necesario para esta estimación delimitar el espacio de referencia y sus componentes, en este caso es el manto. En consecuencia, la fracción de volumen de los componentes del manto que estudiamos las representamos como:

- V_{VGM} = Fracción del volumen ocupada por los gametos maduros.
- V_{VD} = Fracción del volumen ocupada por los gametos en desarrollo.
- V_{VCVT} = Fracción del volumen ocupada por células vesiculares del tejido conectivo.
- V_{VE} = Fracción del volumen desocupada dentro de los folículos.

Para la obtención de los cortes histológicos, al hacer la evaluación biométrica a cada organismo se le realizó un corte transversal en la sección gonadal cercana al intestino de aproximadamente 5mm de ancho, estas muestras fueron fijadas en líquido Davidson durante un tiempo mínimo de 24 h (con una relación entre el volumen de la muestra y el líquido de 1:5). Terminado este tiempo el tejido se introdujo en cassetes para histología, en el cual se realizó el proceso de deshidratación mediante el uso de un Histokinet, finalmente se incluyeron en parafina (punto de fusión 60 – 62°C) con ayuda del aparato Tissue Teck.

Se obtuvieron los cortes transversales de las gónadas del orden de 5 µm en un micrótopo de rotación y se montaron en portaobjetos previamente etiquetados. Una vez obtenidos los cortes se desparafinaron se tiñeron mediante la técnica de hematoxilina-eosina. Las preparaciones se montaron en un portaobjeto con resina sintética para su posterior análisis microscópico.

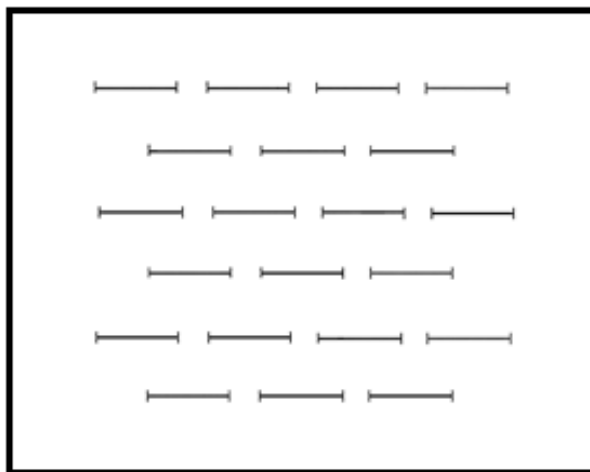


Figura 2. Retícula de Weibel utilizada para el conteo de los componentes del manto.

Para realizar el estudio estereológico se utilizó un microscopio binocular. Con la ayuda de una retícula de Weibel (1969) (Figura 2) colocada en uno de los lentes y utilizando siempre el objetivo 40x se contó la variación de los componentes celulares del manto: Gametos en Desarrollo (GM), Gametos Maduros (GD), Espacio Foliculares (EF) y Células Vesiculares del Tejido Conectivo (CVTC), en la tabla 3 se describen sus características. En total se obtuvieron 42 puntos de conteo, este procedimiento se repitió cinco veces, obteniendo 210 puntos de conteo al azar sobre el corte histológico de la gónada de cada almeja, esto permitió obtener una representatividad del estado de madurez de cada organismo. Para aplicar una técnica estereológica es importante que la sección del tejido analizado sea representativa de la totalidad del tejido gonadal (Lowe et al. 1982).

COMPONENTES CELULARES/SEXO	HEMBRA	MACHO
Gametos en Desarrollo (GD)	Ovocitos ovalados unidos a la pared del folículo	Encontrados ya sea solos o en grupos, entre la pared del folículo y el lumen, son células de gran tamaño que a su vez se dividirán de seis a nueve veces para dar origen a los gametos maduros.
Gametos Maduros (GM)	Ovocitos libres dentro de los folículos, pueden o no tener núcleo visible	Folículos llenos de espermatozoides con orientación radial, cercanos al lumen y de tamaño pequeño
Espacios Foliculares (EF)	Área vacía dentro del folículo	Área vacía dentro del folículo
Células Vesiculares del Tejido Conectivo (CVTC)	Células de almacenamiento con forma de redes intrincadas ubicadas fuera del tejido	Células de almacenamiento con forma de redes intrincadas ubicadas fuera del folículo

Tabla 3. Descripción de los componentes celulares del manto en el ostión *Cassostrea virginica*. Tomado de Moguel, Marieliza & Curiel-Ramírez, Sergio. (2014).

4.6.1. Índice gonádico y somático

Una representación muy clara del ciclo gonádico y del tejido de reserva, se obtiene mediante los índices gonádico (IG) y somático (IS) (Ferrán, 1991), que no son más que la suma de las fracciones de volumen ocupadas por gametos maduros y en desarrollo en el primer caso y por células adipogranulares y por células vesiculares del tejido conectivo en el segundo caso, en ambos casos el total se expresa en porcentaje:

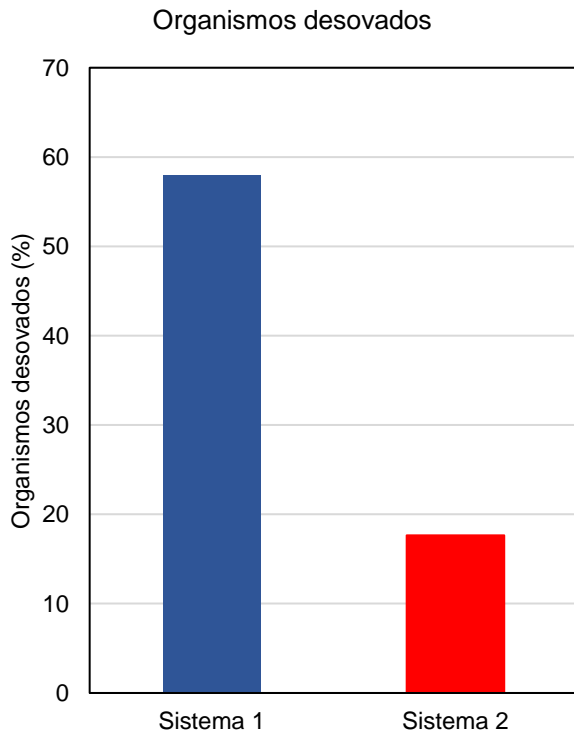
- $IG = V_{VGM} + V_{VD}$
- $IS = V_{VCVT}$

Independiente de que la representación gráfica de la fluctuación de las fracciones del volumen de los componentes del manto permite inferir la ocurrencia de la gametogénesis, la emisión de gametos y los procesos de acumulación de reserva, un aumento en el índice gonádico denota la ocurrencia de la gametogénesis y un aumento en el índice somático denota la acumulación de energía de reserva (Moguel-García et al. 2016)

5. RESULTADOS

5.1.Efectividad de inducción al desove

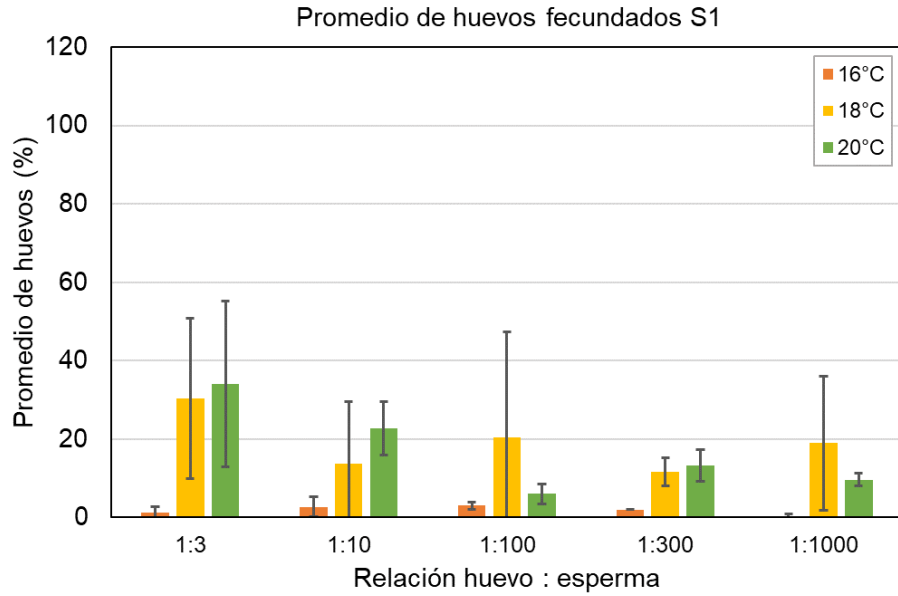
Los resultados de la efectividad durante el desove (Grafica 1) indicaron un mayor porcentaje de organismos desovados en el Sistema 1. De 19 organismos que fueron utilizados para el desove, 11 organismos desovaron, que representan el 57.89% de éxito de desove, incluso un organismo desovó sin necesidad de inyectar serotonina. Sin embargo, en el Sistema 2 solo 3 de las 17 almejas desovaron, que representó un 17.64% de éxito de desove. Es importante mencionar que durante el experimento del sistema 2 un total de 5 organismos mostraron una mucosidad que contenía espermas u óvulos, esta mucosidad se observó durante un lapso corto de tiempo y no fue suficiente como para obtener gametos y realizar una fertilización.



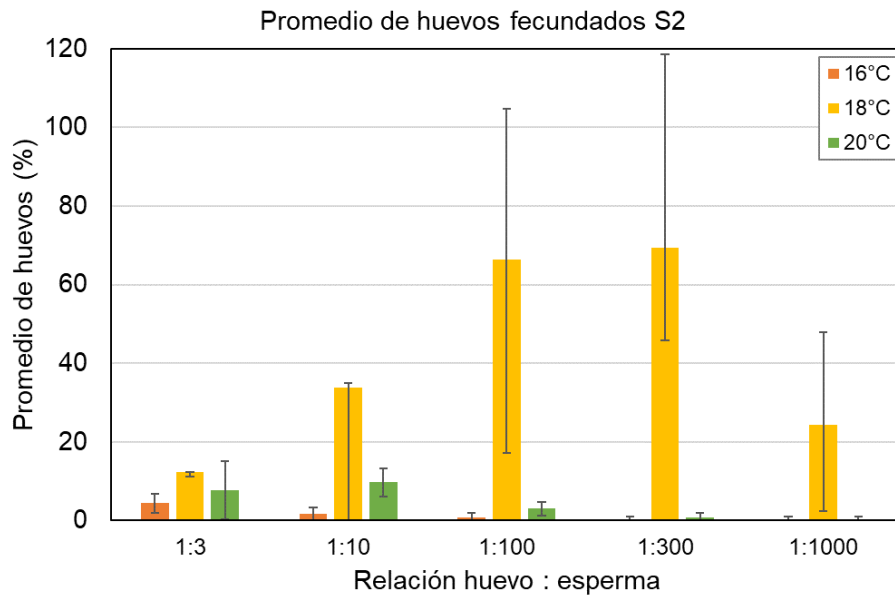
Grafica 1. Porcentaje de organismos desovados en ambos sistemas. En color azul se observa el Sistema 1 con un porcentaje de 57.89% de éxito de desove; en color amarillo se observa el Sistema 2 con un porcentaje de 17.64% de éxito de desove.

5.2.Fertilización en un periodo de 1 hora

El resultado obtenido de la fertilización no fue el esperado debido a que la cantidad de óvulos por esperma no fue la adecuada, producto de una incorrecta homogenización de los óvulos, en muy pocas muestras se obtuvo un conteo cercano a los 100 ovocitos (casi todas se encontraban por debajo de esta cantidad). Como se observa en las graficas 2 y 3 en el S1 es donde hubo un mayor índice de huevos fecundados en las relaciones “bajas” es decir la relación 1:3, 1:10 y 1:100, y son las temperaturas de 18 y 20 °C las que sobresalen, por otro lado, en el S2 se obtuvo un mayor índice de huevos fecundados en la relación 1:300, seguido por 1:100 y 1:10; en estos resultados, la temperatura de 18 °C fue la que sobresalió sobre las otras temperaturas.



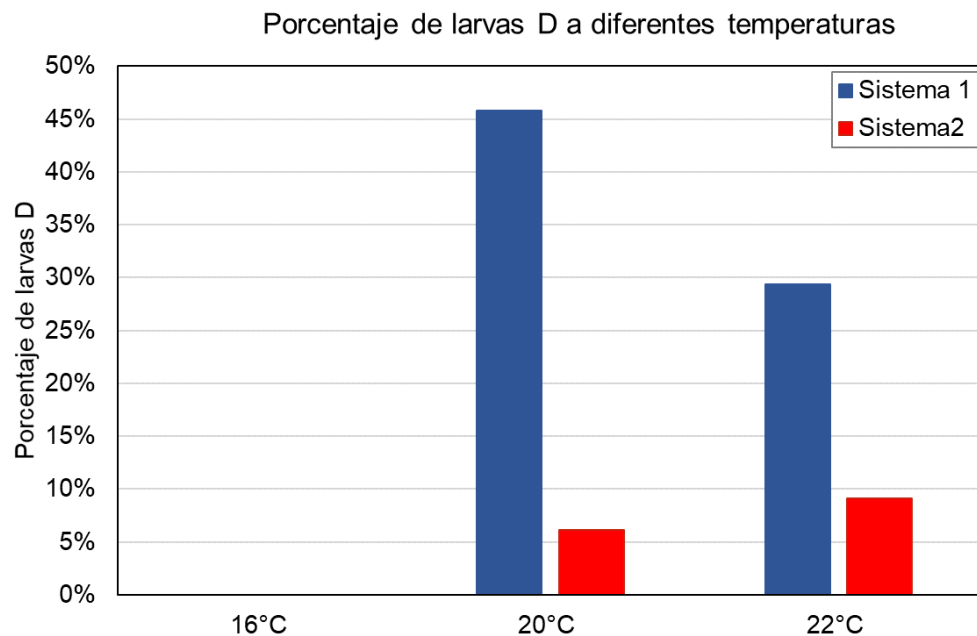
Grafica 2. Promedio y desviación estándar de huevos fecundados utilizando a los reproductores del sistema 1. En color naranja se observan los resultados para la muestra que se mantuvo a 16 °C, en color amarillo la de 18 °C y en color verde la de 20 °C.



Grafica 3. Promedio y desviación estándar de huevos fecundados utilizando a los reproductores del sistema 2. En color naranja se observan los resultados para la muestra que se mantuvo a 16 °C, en color amarillo la de 18 °C y en color verde la de 20 °C.

5.3. Producción de larvas

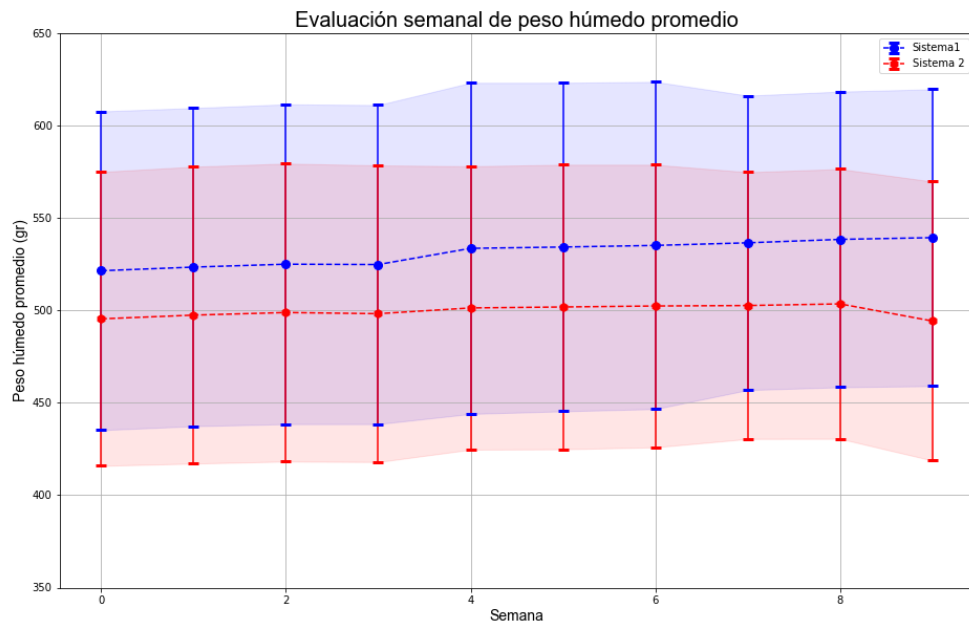
Durante la fertilización de 24 horas, en el S1 se encontraron más resultados positivos que en el S2. Como se observa en la gráfica 4 la temperatura de 20° C del S1 es en donde se presentó mayor porcentaje de larvas D, seguido por la temperatura de 22° C. En las muestras de 16° C no se encontró ninguna larva D en ninguno de los casos, sin embargo, en esta temperatura se encontró una gran cantidad de huevos fertilizados entre 50 y 90 μm .



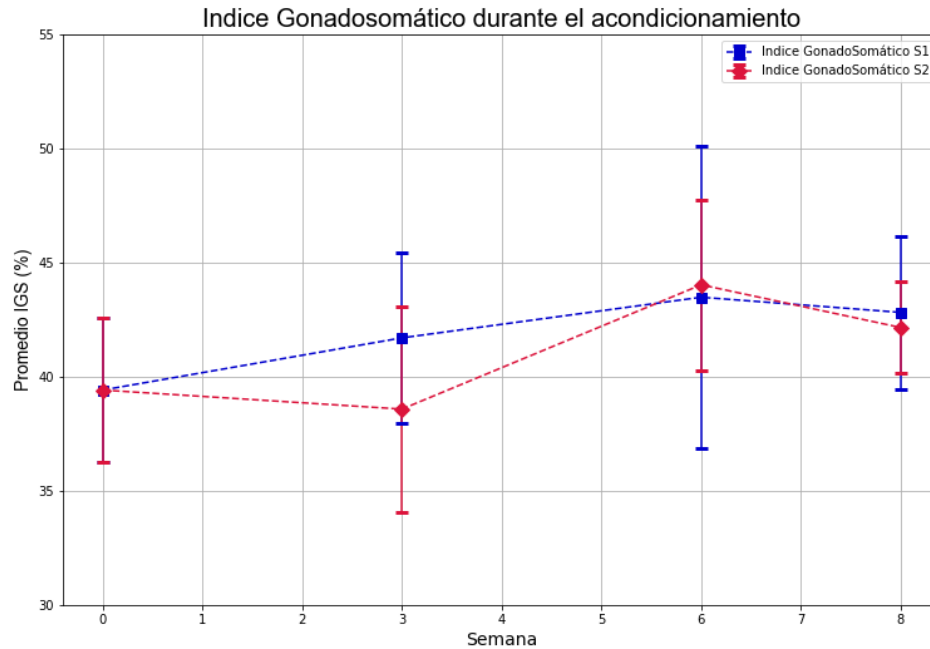
Grafica 4. Porcentaje de larvas D a 16 o, 20 o y 22 o °C. En color azul se muestra el S1 y en color rojo el S2.

5.4. Análisis biométrico: Índice de condición y gonadosomático

Durante cada una de las ocho semanas del periodo de acondicionamiento, se registró la ganancia del peso húmedo de los organismos en el sistema 1 y 2 (Gráfica 5). En el sistema 1 hubo un aumento de más de 10 gr de peso húmedo promedio desde la semana 1 hasta la semana 8, en cambio los organismos del sistema 2 aumentaron en promedio menos de 1 gr de peso húmedo. En la gráfica 5, en los resultados del S1 durante la semana 4 se observa un aumento de peso de los organismos y continúa aumentando durante el resto del acondicionamiento. Para el S2, el aumento de peso es lento, llega a su punto más alto durante la semana 8 y para el día del desove el promedio decae por debajo de los 500 gr.

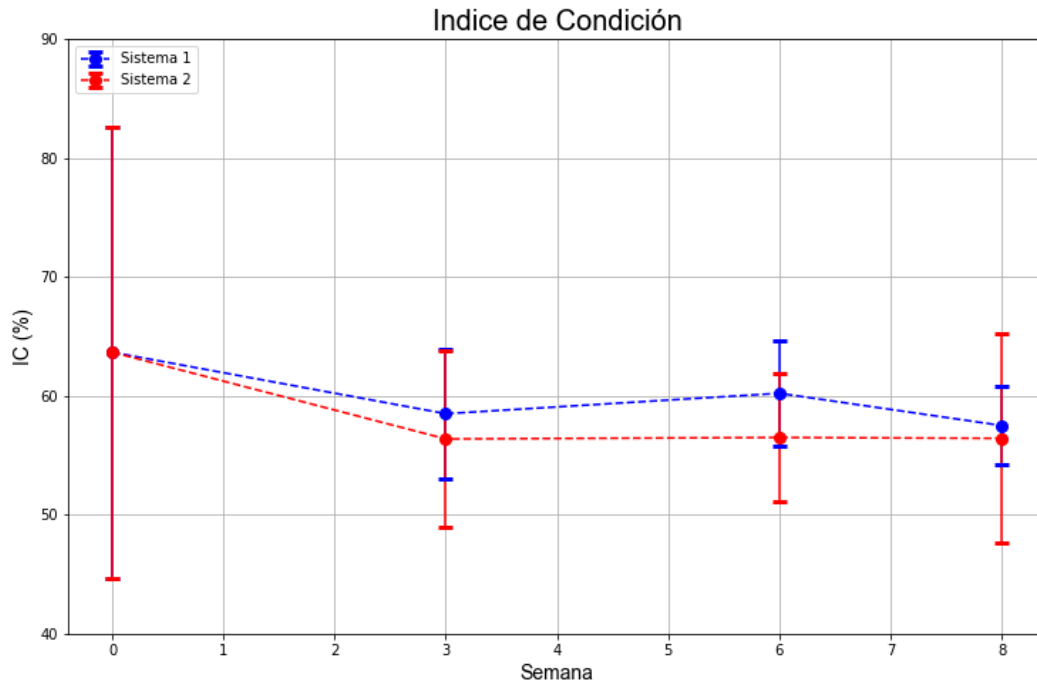


Gráfica 5. Evaluación semanal del peso húmedo promedio (en gramos) y desviación estándar para cada sistema durante el periodo de acondicionamiento. En color azul se observan los resultados para el S1 y en color rojo para el S2.



Grafica 6. Índice gonadosomático del S1 (color azul) y S2 (color rojo). En el eje de las X se observa el periodo de tiempo dado durante el acondicionamiento de 8 semanas mientras que en el eje de las Y se refiere al valor promedio de IGS.

El índice gonadosomático nos indica el estado de la gónada con respecto al peso total de la carne del animal. Al iniciar el acondicionamiento el IGS tenía un valor promedio de 39.41, para el S1 este valor aumentó durante la segunda semana y llegando a su valor más alto en la semana 6, para luego decrecer ligeramente en la semana 8 (Grafica 6). Para el S2 el IGS decae a 38.58 en la semana 3, sin embargo, después tiene un comportamiento similar al S1 llegando a su punto más alto en la semana 6 y disminuyendo nuevamente durante la semana 8.



Grafica 7. Índice de condición del S1(color azul) y S2 (color rojo). En el eje de las Y se observa el valor del Índice de condición y en el eje de las X el periodo de tiempo.

Los resultados del índice de condición se observan en la gráfica 7, al iniciar el acondicionamiento el IC se observa más elevado que en el resto de las biometrías, sin embargo, los resultados también muestran una desviación muy alta. En el caso del S1 no decayó tanto como el S2 y parece crecer para la semana 6 pero vuelve a caer durante la semana 8. En el caso del S2 se mantuvo prácticamente igual desde la semana 3 a la semana 8.

5.5. Análisis histológico

Mediante la utilización del microscopio compuesto se logró observar una gametogénesis activa e identificar los distintos estadios durante el periodo de acondicionamiento. Un análisis histológico “cualitativo” de las muestras reveló la localización de la gónada y por ende los folículos femeninos y masculinos de *Tivela stultorum*. En la figura 2 se observan los resultados de dicho análisis, en donde se señalan las células presentes en la gónada de un organismo hembra y de macho de *Tivela stultorum*; que comprende a los Gametos Maduros, Gametos en Desarrollo, Células Vegetativas del Tejido Conectivo y el Espacio entre Folículos.

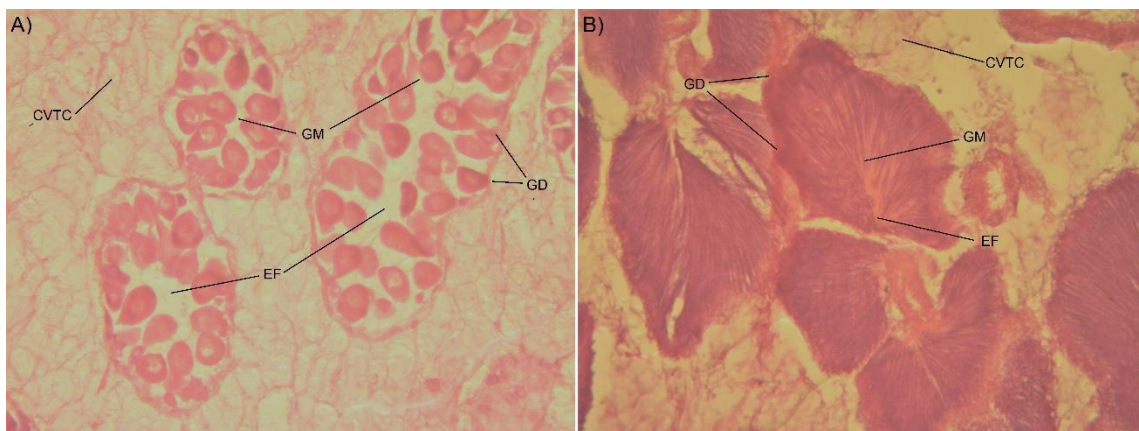


Figura 2. En la imagen de la izquierda (A) se observa parte de la gónada de hembra mientras que la imagen de la derecha (B) se puede observar a un macho de *Tivela stultorum*. Se indican a los gametos maduros (GM), gametos en desarrollo (GD), espacio entre folículos (EF) y células vegetativas del tejido conectivo (CVTC). 10X. Tinción hematoxilina-eosina.

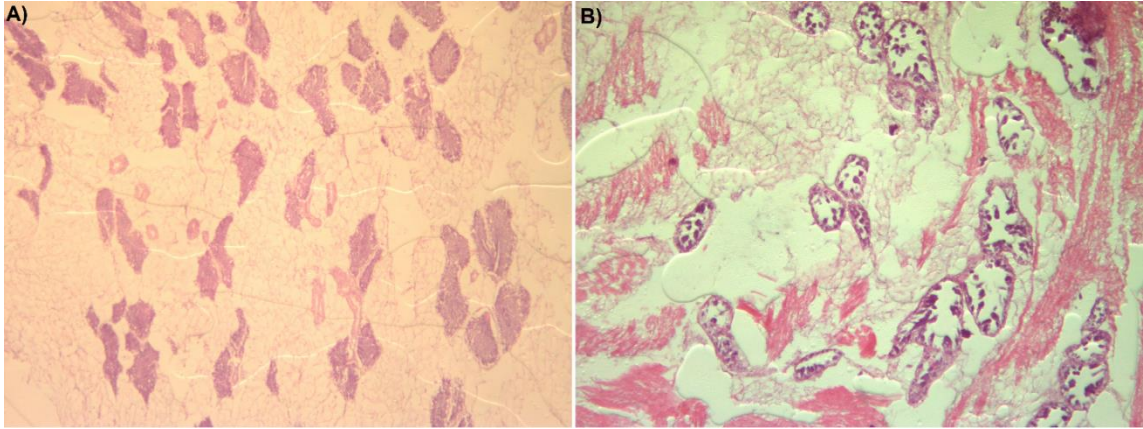


Figura 3. Desarrollo gametogénico: folículos con células germinales previo al inicio de acondicionamiento, estas fotografías pertenecen a organismos utilizados durante la biometría de la “Semana 1”, en la imagen A se puede observar un macho mientras que en la imagen B se observa una hembra. 4X. Tinción Hematoxilina-eosina.

En las muestras obtenidas al realizar la biometría inicial previa al inicio de acondicionamiento (figura 3) se muestran folículos vacíos con células no diferenciadas, la mayoría de estos folículos eran pequeños y se podía apreciar un espacio amplio entre folículos por lo que había una gran cantidad de CVTC.

Estos resultados previos al acondicionamiento encierran a ambos sistemas. En las siguientes biometrías ya se obtienen resultados individuales de cada sistema en donde se observa un crecimiento paulatino de los componentes de la gónada, en la figura 4 se comparan estos resultados.

Desde la tercera semana podemos observar que en el sistema 2 se aprecia una menor cantidad de folículos. En la semana 6 para el sistema 1 casi todos los folículos son alargados, grandes y con gametos maduros presentes mientras que para el sistema 2 aún se aprecian folículos pequeños e indiferenciados, y existe una gran cantidad de CVTC.

Finalmente, en la última biometría, para el sistema 1 se observan gametos femeninos y masculinos en estado de madurez con poco espacio folicular entre gametos, los folículos se aprecian más grandes y por ende con menor espacio entre ellos. En el caso del sistema 2 también hay gran cantidad de folículos, pero se aprecian más pequeños que a comparación que el sistema 1.

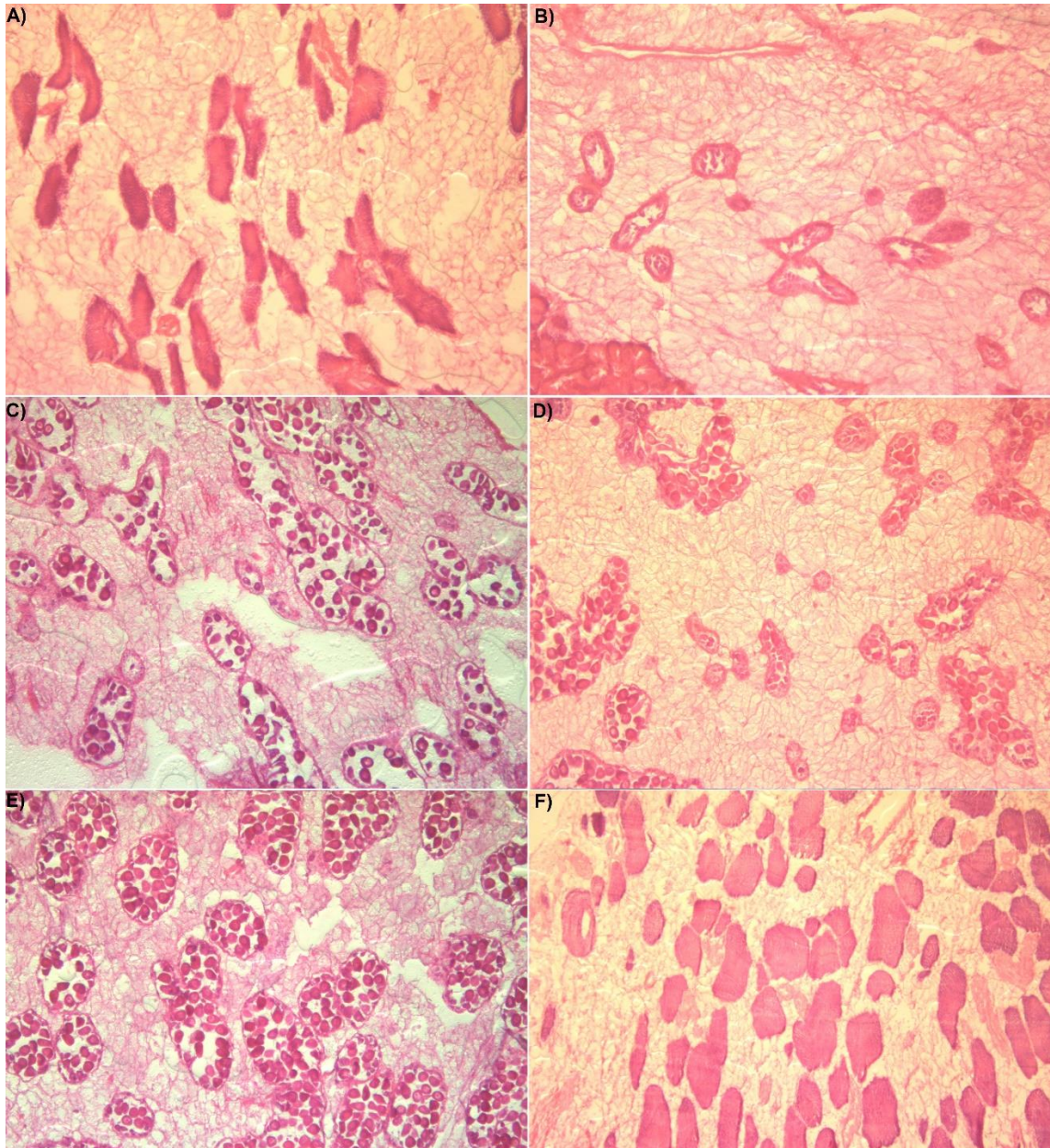
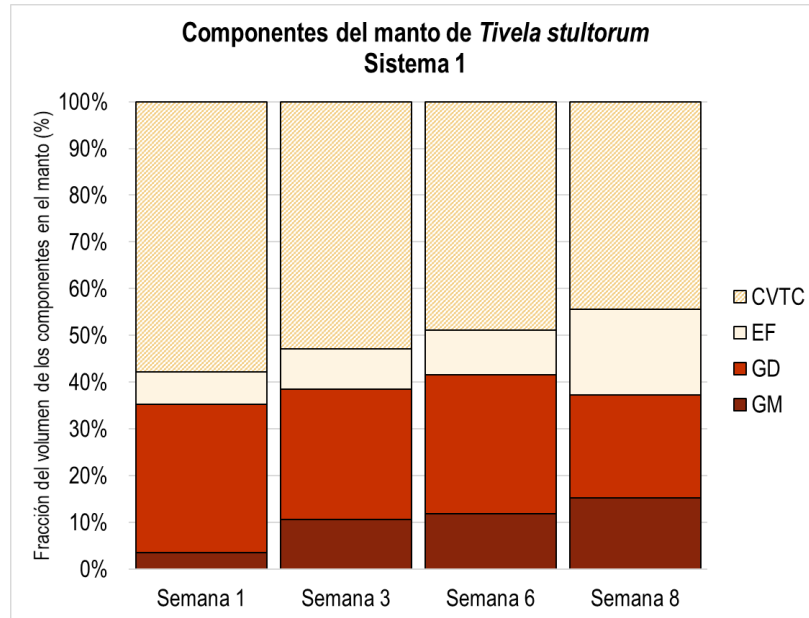


Figura 4. Desarrollo gametogénico: folículos con células germinales durante el periodo de acondicionamiento. Las imágenes del lado izquierdo (A, C y E) pertenecen a organismos del Sistema 1 y las del lado derecho (B, D y F) del Sistema 2. En relación con las figuras 1 y 2 los organismos A y B pertenecen a la biometría de la “semana 3”, C y D pertenecen a la biometría de la “semana 6” y las imágenes E y F a la “semana 8” de acondicionamiento. Todas las imágenes fueron tomadas con el objetivo 4x y teñidos con la técnica de H-E.

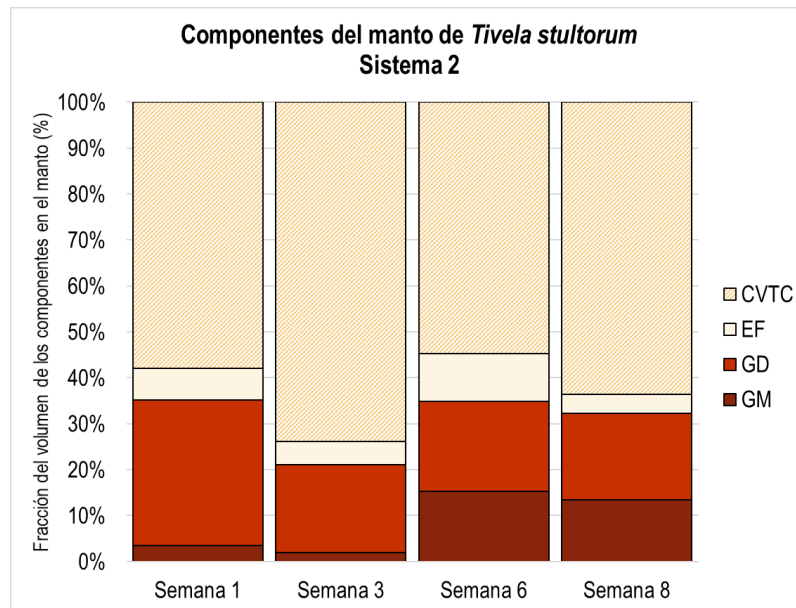
5.6. Estereología cuantitativa: Índice gonádico y somático

Los resultados obtenidos mediante la técnica de estereología cuantitativa que fue utilizada en cada uno de los cortes histológicos indican la presencia del volumen de los componentes del manto. En la gráfica 8 y 9 se observa el volumen de los componentes del manto de *Tivela stultorum* durante el periodo de acondicionamiento, en los resultados obtenidos durante la semana 1 (previa al acondicionamiento) se observa que los GM se presentan en el punto más bajo durante el acondicionamiento, representando el 3.4% de los componentes del manto. Los GD representan un 31.7%, los EF el 6.9% y las CVTC el 57.8%.

Para el Sistema 1 el porcentaje de GM fue incrementando con el paso de las semanas llegando su nivel máximo de 15% durante la semana 8, los GD también se incrementaron, aunque en la última semana su porcentaje bajó del 29% al 21%. Por otra parte, el EF fue aumentando constantemente desde el inicio, pero en la Semana 8 aumentó de 9% a 18%; mientras que las CVTC pasaron de ser el 57% del volumen de los componentes del manto en la Semana 1 a ser el 44% en la Semana 8 (Gráfica 8). Por el contrario, en el Sistema 2 la presencia de los GM y GD se muestran más bajos en la Semana 3, disminuyendo casi a 2% de GM y no es hasta la Semana 6 que se observó un incremento del 15%. Los GD disminuyeron del 31% al 18% de la primera a la última semana, el EF varió muy poco durante este periodo pasando de 6% a 4% de volumen. Por último, las CVTC aumentaron del 57% al 63% del volumen del tejido (Gráfica 9).



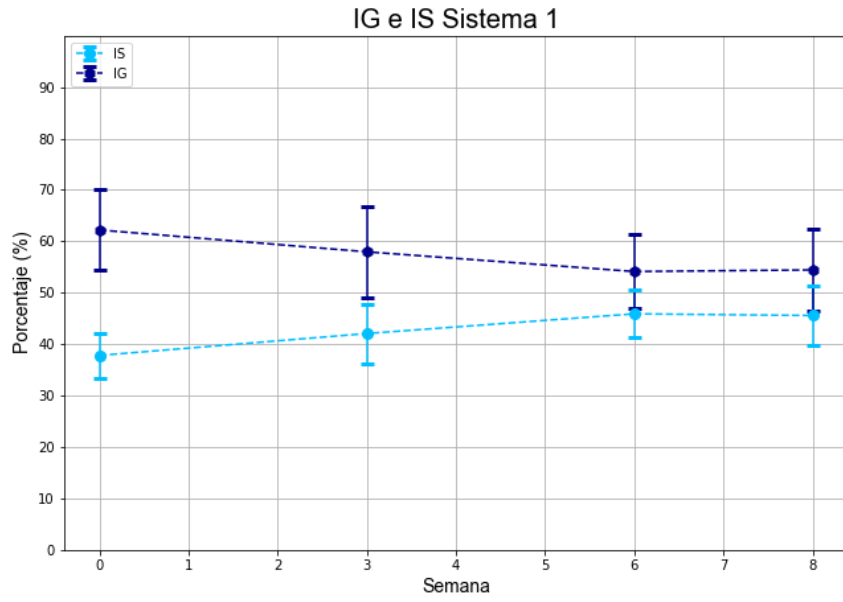
Grafica 8. Variación en el porcentaje de volumen de los componentes del manto de *Tivela stultorum* durante el periodo de acondicionamiento del S1. Gametos maduros (GM), gametos en desarrollo (GD), espacio entre folículos (EF) y células vegetativas del tejido conectivo (CVTC).



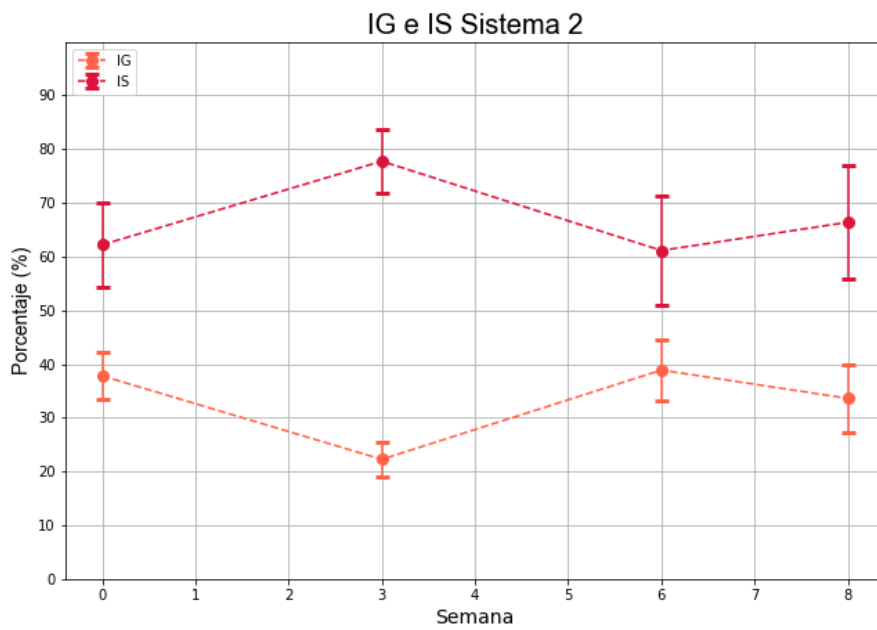
Grafica 9. Variación en el porcentaje de volumen de los componentes del manto de *Tivela stultorum* durante el periodo de acondicionamiento del S2. Gametos maduros (GM), gametos en desarrollo (GD), espacio entre folículos (EF) y células vegetativas del tejido conectivo (CVTC).

En el caso del Índice Gonádico (IG) en el Sistema 1 aumentó del 37% al 45 % de la Semana 1 a la 8, por otro lado, el índice somático (IS) disminuyó del 62% al 54% en la Semana 1 a la 8 (Grafica 10). Para el Sistema 2 en la Semana 3 se presenta una disminución del IG del 37% al 22% aunque en la última semana aumentó a 33%, el IS por el contrario aumento en la Semana 3 a 77% y en la semana 8 bajo a 66% (Grafica 11).

Los resultados de los componentes del manto se ven reflejados en las gráficas 10 y 11 en donde observamos el porcentaje del IG e IS resultante en los organismos de cada sistema. Estos índices aparecen separados durante la semana cero significando un bajo índice de gametos en la gónada y un alto índice de CVTC, en el S1 (Grafica 10) al pasar las semanas estos valores empiezan a aparecer más cercanos indicando una gametogénesis activa que nos permite observar una gónada más madura durante la semana 6. Para el S2 (Grafica 11) al igual que las gráficas anteriores, durante la semana 3 se observa una disminución del IG y un valor muy alto de IS, para la semana 6 al igual que en el S1 es cuando se aprecia una mayor madurez sin embargo durante la semana 8 volvemos a observar que las CVTC empiezan a aumentar y los GM a disminuir.

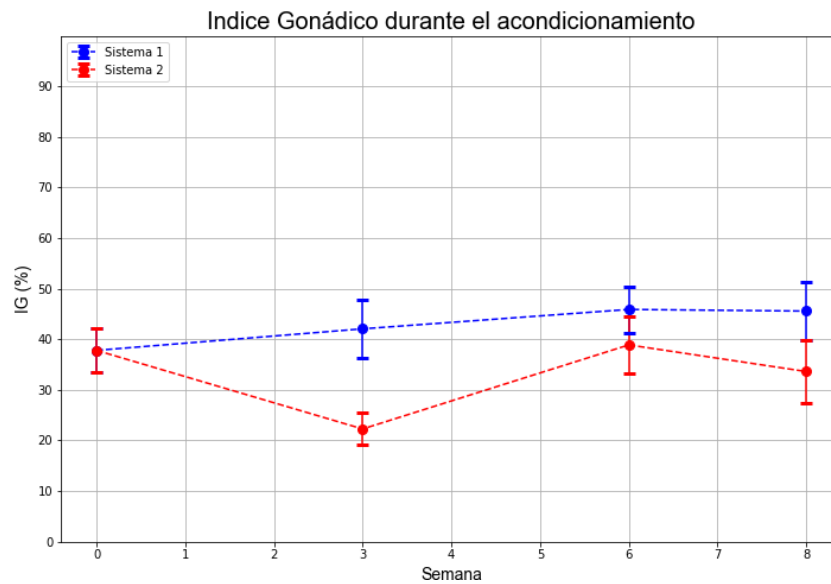


Grafica 10. Variaciones del Porcentaje del índice gonádico (IG) e índice somático (IS) de *Tivela stultorum* durante el periodo de acondicionamiento del S1.

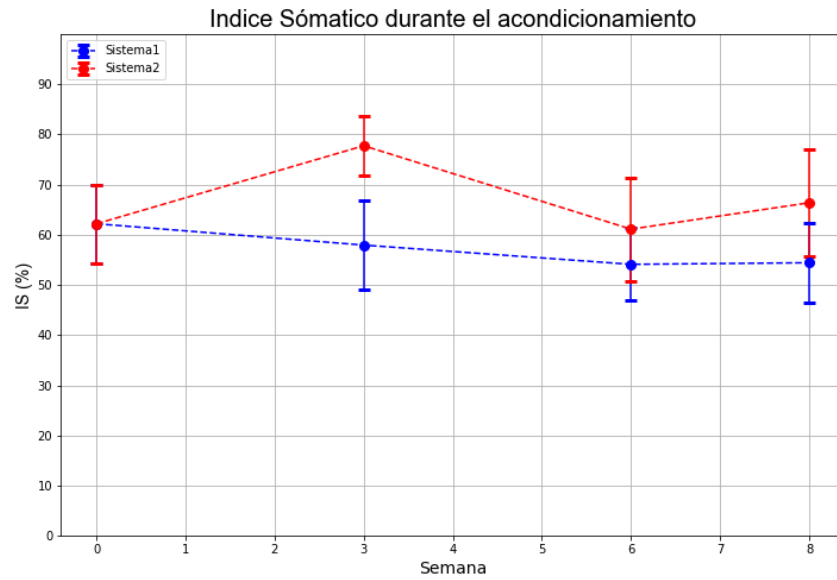


Grafica 11. Variaciones del Porcentaje del índice gonádico (IG) e índice somático (IS) de *Tivela stultorum* durante el periodo de acondicionamiento del S2.

Como se observa en la gráfica 12, al comparar de forma directa el IG de un sistema y otro se observa más claramente una gametogénesis activa en el S1 desde la semana 3 que llega a su valor máximo durante la semana 6; en el caso del IS (Grafica 13) también se aprecia una disminución de CVTC en el S1 a comparación del S2. En ambas graficas podemos observar que los resultados más significativos se encuentran durante el periodo de la semana 6.

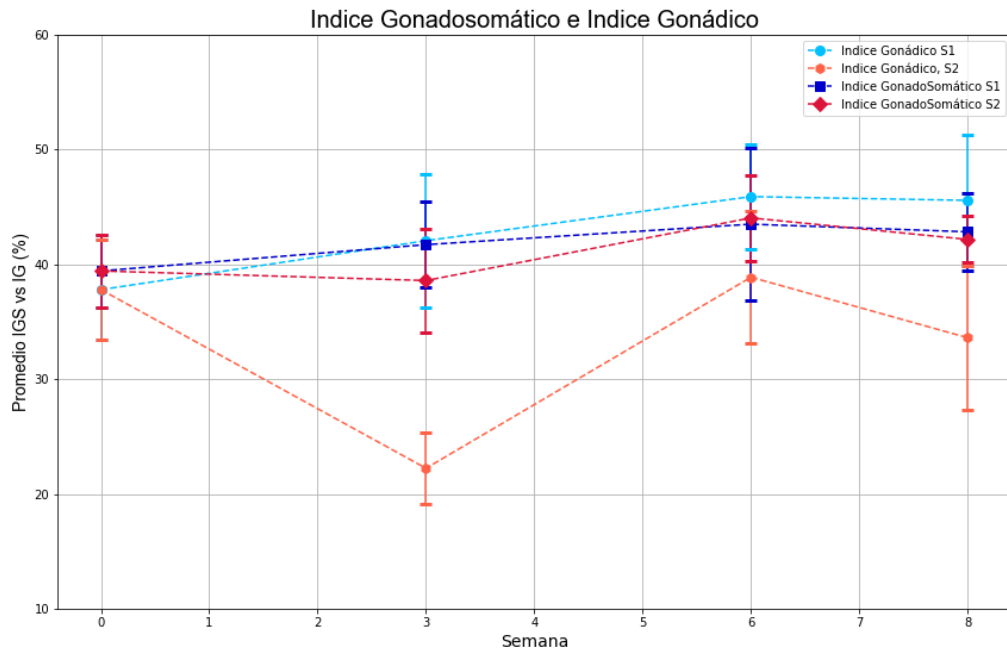


Grafica 12. Variaciones del Porcentaje del índice gonádico (IG) *Tivela stultorum* durante el periodo de acondicionamiento del S1 y S2. En color azul se observan los resultados del S1 y en color rojo el S2.



Grafica 13. Variaciones del Porcentaje del índice somático (IS) *Tivela stultorum* durante el periodo de acondicionamiento del S1 y S2. En color azul se observan los resultados del S1 y en color rojo el S2.

La comparación del IG y el IGS del sistema 1 y 2 se muestran en la gráfica 14. El IG y el IGS son semejantes en el S1 y aparecen en una mayor proporción. Contrario, en el S2 el IG está muy por debajo del IGS, incrementando su valor hacia la semana 6 y volviendo a disminuir hacia la semana 8.



Grafica 14. Comparación de los resultados de IGS e IG durante el periodo de acondicionamiento de 8 semanas. En color azul claro se observa el IG del S1, en color naranja se observa el IG del S2; por otro lado, en color azul oscuro se observa el IGS del S1 y en color rojo el IGS del S2.

6. DISCUSION

6.1. Temperatura y alimento

El presente estudio estuvo dirigido a evaluar el efecto la temperatura en el desarrollo gonádico de los reproductores de *Tivela stultorum* . Esto considerando que la temperatura es uno de los factores exógenos que más impacto ejerce sobre la fisiología reproductiva de los organismos marinos, controlando el inicio o término de los principales eventos reproductivos, como la diferenciación de células germinales, maduración y liberación de gametos y reabsorción de nutrientes (Giese y Pearse, 1974; Sastry, 1979; Freitas et al., 2010). La literatura sobre el efecto de la temperatura en el crecimiento de bivalvos está enfocada principalmente hacia los mejillones y ostras; y son escasos los trabajos donde se han utilizado almejas, principalmente de las Veneridae (Albentosa et al. 1994). Las gráficas con registros de las temperaturas durante el acondicionamiento se pueden observar en el anexo 2 y 3 e indican una temperatura constante de $16.5 \pm ^\circ\text{C}$ para el S1 y de $20.5 \pm ^\circ\text{C}$ para el S2

Sin embargo, se sabe que la temperatura no es el único factor importante en la regulación del ciclo reproductivo, pues existen otros: como el estado fisiológico de los individuos, la abundancia, calidad y disponibilidad de alimento (Sastry 1968), la duración del fotoperiodo (Fabioux et al., 2005) y la periodicidad lunar (Giese y Pearse 1974, Mackie 1984).

En el presente experimento se mantuvo una dieta *C. calcitrans* e *I. galbana* la cuales se han reportado como adecuadas para la alimentación de moluscos bivalvos en condiciones

de cultivo experimental piloto o comercial, ya que presentan un efecto complementario entre diferentes especies de flagelados y diatomeas, con diferente calidad nutricional (Ojeda et al., 2008; González-Jiménez, 2012).

6.2.Efectividad de desove y fertilización:

Los resultados de efectividad de inducción al desove indican un mayor éxito para el S1 ya que ningún organismo del S2 desovó previo a la inyección de serotonina y hubo un mayor índice de organismos desovados en el S1 (Grafica 1). Por otro lado, en el S2 al inyectar la serotonina 3 de los organismos comenzaron a desovar pero con muy baja productividad y frecuencia., incluso se observó la presencia de un fluido de textura mucosa que se formaba en el sifón de las almejas el cual al ser observado en el microscopio contenía gametos activos por lo que esta mucosidad nos hace creer que aunque los organismos parecían estar maduros sexualmente no estaban preparados para expulsar los gametos, estos resultados podrían estar indicando que los organismos no se encontraban aun lo suficiente maduros o habían comenzado ya con la reabsorción de gametos.

En el caso de los 3 organismos que desovaron pudimos observar que los periodos de desove se mostraron cortos y no tan constantes como en el S1. Por otro lado, durante el desove del S1 un organismo desovó sin necesidad de inyección de serotonina, el resto de los organismos que desovaron lo hicieron después de la inyección de serotonina obteniendo un total de 11 organismos desovados.

Los resultados de efectividad de desove de duración de una hora indican un mayor índice de huevos fecundados en las relaciones 1:3, 1:10 y 1:100. La incorrecta homogenización

de los óvulos representa un error dentro de la fertilización por este motivo son pocas las muestras donde encontramos cerca de 100 ovocitos. En la fecundación del Sistema 1 son las temperaturas altas las que tienen un mayor índice de huevos fecundados.

En la relación 1:3 donde encontramos el índice mayor es la temperatura de 20 °C en donde se encontró un mayor índice de fecundación, seguido por la temperatura de 18 °C. En este sistema, aunque si hay un mayor número de huevos fecundados en la relación 1:3 otro dato que sobresale es que para todas las fertilizaciones de 16°C todos los resultados se muestran muy por debajo de las otras dos temperaturas.

Teniendo en cuenta que este sistema es el que se mantuvo a una temperatura fría es interesante que prefiera las temperaturas “altas” sobre las bajas, aunque también no proporciona información sobre la fisiología del organismo en medio natural. Como ya se mencionó los desoves masivos ocurren en septiembre, lo que confirma el hecho de que los organismos realizan una gametogénesis durante el periodo de temperatura frías y es durante el cambio de temperatura el momento ideal para la inducción al desove y por lo tanto la fertilización.

Por otro lado, en los resultados del Sistema 2 sobresale la fertilización realizada a 18°C en donde la relación 1:300 espermas por huevo es la que tuvo un mayor éxito, debido a la falta de antecedentes en esta área y a la cantidad de huevos y no solo de larvas D presentes en la muestra estos resultados indican una incorrecta homogenización de la muestra por lo que no son del todo viables.

Durante la fertilización de 24 horas el S1 también demostró resultados favorables, obteniendo mayor cantidad de larvas D en la temperatura de fertilización de 20 °C. Podemos relacionar que esta fue la temperatura utilizada para la inducción al desove y es la temperatura del agua en medio natural durante el periodo de desove de junio de Tivela.

Aunque no se encontraron larvas D en la temperatura de 16 °C si había larvas de entre 50 y 90 um que permiten inferir nuevamente un crecimiento lento. También podemos observar que, aunque los reproductores del S2 no estaban listos para la expulsión de los gametos la columna de agua, ya sea por las temperaturas utilizadas para la inducción o por algún factor fisiológico que permita la expulsión; los gametos si se encontraban viables para realizar una fertilización, aunque con menor índice de éxito.

6.3.Comparación de índices de condición

Durante el periodo de acondicionamiento hubo una ganancia de peso húmedo mayor en el S1 que en el S2. En la gráfica 5 de evaluación de peso húmedo promedio podemos observar los resultados de ganancia de peso húmedo para ambos sistemas, y aunque el S1 presenta un peso húmedo promedio mayor desde el inicio del acondicionamiento en ninguno momento se seleccionó a los organismos que se colocarían en los sistemas ya que estos fueron elegidos de manera aleatoria. Fue en el S1 donde hubo un aumento de peso mayor del inicio al final del acondicionamiento. Aunque se consideró que las diferencias de peso húmedo inicial entre sistemas es una muy mala coincidencia para los propósitos de este experimento es de importancia mencionar que la tasa de crecimiento de *Tivela stoltorum* es bastante lenta, puesto que el resultado de peso húmedo no representa que los

organismos se encuentren o no maduros ya que según los resultados obtenidos en este experimento a mayor cantidad de masa no significa organismos más maduros.

Por otro lado, es importante considerar que estamos trabajando con organismos vivos que al ser sacados de su ambiente conservan agua en su interior y esta cantidad de agua puede variar y cambiar los resultados del peso del organismo. Si bien, aunque el peso húmedo de un organismo puede dar una perspectiva del peso de la carne y funcionar como un indicador de ganancia de peso durante el experimento, no es de gran ayuda al momento de inferir sobre el grado de madurez de un organismo.

Por otro lado, los resultados del índice gonadosomático (Grafica 6) indican una gametogénesis activa, en el S1 observamos un aumento desde la semana 3 llegando a su valor máximo en la semana 6, estos primeros resultados son donde empezamos a observar que la semana 6 determina un periodo de tiempo ideal para la realización de un desove que se verá confirmado más adelante con los datos histológicos. Jaramillo et al. (1993) y Rodríguez (1992), mencionan que el IGS está directamente relacionado con el estado de desarrollo gonádico, ya que relaciona el peso de la gónada con el peso total del organismo. Este índice alcanza un valor máximo justo antes del desove y cada pico indica el número de desoves posibles en un año.

Por otro lado, Webber y Giese (1969) concluyeron que en gasterópodos el índice de condición es un buen indicador del estado de madurez, ya que estos organismos no almacenan sus reservas en la gónada, sino en la glándula digestiva y en el musculo, por lo tanto, el incremento en volumen de la gónada es un incremento de gametos en maduración.

Sin embargo, para propósitos de esta investigación, el índice de condición no resultó ser una medida determinante para evaluar el estado la gónada. Si bien nos puede dar una estimación del peso de la carne y el estado de gordura del organismo los resultados no demostraron ser un indicador del aumento del tejido en la gónada. Así mismo Nair & Appukuttan (2003) afirman que la temperatura puede modificar la eficacia de digestión, para algunos bivalvos, y Corraze et al., 1999 señalan que puede afectar la eficiencia de algunas enzimas involucradas en la neosíntesis o transporte de lípidos, además, el almacenamiento de lípidos parece ser más pronunciado a bajas temperaturas lo que podría explicar una influencia positiva en el metabolismo de los organismos en el Sistema 1 que se encontraban a temperaturas más bajas, Thompson et al., 1996 menciona que el desarrollo gamético en bivalvos de climas templados puede estar relacionado con la abundancia de comida y las temperaturas ambientales durante la primavera. Así, podemos definir que la temperatura es un factor de suma importancia en la maduración de los reproductores de *Tivela stultorum* siendo las temperaturas bajas (16.5 ± 0.5 °C) más efectivas que las altas (20.5 ± 0.5 °C) en términos de rapidez de madurez gonádica.

6.3.1. Evidencia histológica

Con lo anterior, la evidencia histológica permitió cuantificar los componentes del manto, en las gráficas 8 y 9 se observa la fracción del volumen de los componentes en el manto de *Tivela stultorum* en donde la masa de las gónadas presenta variaciones durante el periodo de acondicionamiento que se pueden asociar con la actividad reproductiva y el estadio de madurez gonádica. En el presente estudio los resultados histológicos indican

un aumento constante para el Sistema 1 en Gametos Maduros y Gametos en Desarrollo y una disminución en las CVTC lo que significa folículos más grandes y en mayor abundancia. Mientras que los resultados del Sistema 2 demuestran un crecimiento en el porcentaje de gametos maduros al final del acondicionamiento al menos hasta la Semana 3 se mantuvieron por debajo de los datos iniciales (Semana 1) lo que puede estar indicando que a temperaturas más altas la gametogénesis es más lenta; asimismo a diferencia del Sistema 1 hubo mayor volumen de CVTC lo que podría indicar que, aunque ya había GM y GD había una cantidad menor en folículos.

Desde otra perspectiva, el índice gonádico e índice somático permiten realizar una comparación directa entre los resultados histológicos y los resultados obtenidos por las biometrías, podemos observar en la gráfica 14 que el IG tiene un comportamiento similar al IGS en los resultados del S1. En donde la semana 6 también indica un valor más alto en comparación con los otros resultados. De manera similar, en los resultados del S2 se presenta un periodo de adaptación muy grande en las primeras 3 semanas, es así que durante la semana 6 el IG aumenta y el IS disminuye confirmando otra vez la importancia de este periodo de tiempo para los organismos, además, para la semana 8 los resultados muestran una gónada que aún no estaba preparada para la realización de un desove. Al comparar los resultados del IG e IS de cada sistema como se muestra en las gráficas 12 y 13 observamos más detalladamente el aumento del IG que para el S1 se muestra paulatino y con resultados favorables mientras que para el S2 se sugiere nuevamente un periodo de adaptación, aunque para la semana 6 en definitiva ambos sistemas estaban en el momento

más adecuado para realizar un desove sigue siendo el S1 el sistema que presento resultados más viables.

Es evidente que el S1 presenta resultados significativamente favorables en comparación con el S2; tanto para los resultados del aumento de peso húmedo e índices de condición como para los resultados histológicos. No obstante, los resultados no indican que los organismos acondicionados en el Sistema 2 no maduraron, sino que lo hicieron en un periodo de tiempo más lento

6.4.Recomendaciones

Pese a que se tiene poca información sobre esta almeja en ambientes naturales, se sabe que son organismos que se mantienen enterrados la mayor parte del tiempo con el sifón hacia arriba (en posición vertical) y es con la ayuda del pie como se “desplazan”. Uno de los aspectos clave que establecimos durante este experimento es la posición en la que el organismo desempeña mejor su funcionamiento; a partir de este experimento y del proyecto piloto (Anexo 1) pudimos observar que *Tivela stultorum* es un molusco que no tolera estar en posición horizontal ya que necesita que las valvas estén verticalmente y con el sifón hacia arriba, solo así la almeja puede llevar a cabo sus funciones exhalantes e inhalantes, otra característica importante es que necesita conservar una presión constante para que los músculos abductores no se debiliten y terminen por abrirse. Esto se logró mediante la utilización de cajas de plástico en las que se disponían a las almejas de forma vertical cuidando siempre que el sifón quedara libre.

7. CONCLUSIONES

- Los resultados de la presente investigación demuestran que los reproductores de *Tivela stultorum* pueden ser acondicionados en laboratorio, alcanzar su madurez sexual y desovar en periodos menores a 8 semanas, preferentemente en un transcurso de tiempo de 6 semanas
- *Tivela stultorum* es una especie que prefiere aguas frías durante su periodo de gametogénesis, pero su umbral de temperatura para la iniciación a desove es al entrar en contacto con temperaturas templadas.
- El periodo de acondicionamiento para *Tivela stultorum* no debe de ser más largo de 6 semanas, puesto que llegar a su grado de madurez a la semana 6 y posteriormente empezara un periodo de reabsorción.
- Los organismos del S2 si maduraron, solo que lo hicieron en un periodo de tiempo mayor ya que al inicio del experimento entran en un periodo de adaptación previo al inicio de la gametogénesis.
- Así mismo, los reproductores del S2 aunque no estaban preparados para desovar como los del S1, sus gametos si eran viables y se pudieron utilizar para una fertilización aunque el éxito de larvas D fue menor.

8. LITERATURA CITADA

1. Aguilheiro-Gozalbo, M. J. 2007. Fisiología de la reproducción del lenguado senegales (*Solea senegalensis*): Mecanismos endocrinos y aplicaciones en acuicultura. Tesis de Doctorado. Universitat de Valencia. Valencia, España. 248pp.
2. Albentosa, M., R. BEIRAS Y A. PEREZ CAMACHO. 1994. Determination of optimal thermal conditions for growth of clam (*Venerupis pullastra*) seed. *Aquaculture* 126: 315-328.
3. Anual status of fisheries report. 2006 documento en internet
4. Baird, R. H. 1958. Measurement of condition in mussels and oysters. *J. Cons. Perrrz. Explor. Mer.* 23~249-251.
5. Beninger P.G., A. Donval & M. Le penec. 1995. The osphradium in *Placopecten magellanicus* and *Pecten maximus* (*Bivalvia*, *Pectinidae*): histology, ultrastructure, and implications for spawning synchronization. *Marine Biology* 123:121-129.
6. Cáceres-Martínez J. 1997. Mussel fishery and culture in Baja California, México: History, present status, and future. NOAA Techinal Report NMFS 128. 41-55 pp.
7. Chávez Ortiz, E. A. 2002. *Tivela stultorum*. Análisis de la situación de algunas especies de invertebrados marinos de tres Phyla (*Cnidaria*, *Molusca*, *Echinodermata*). Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, Instituto Politécnico Nacional. Bases de datos SNIB-
8. CONAPESCA, 2011. Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca. 311 p.

9. Curiel-Ramírez G. S., y Cáceres-Martínez J. 2012. Asentamiento y dispersión de mejillones en Baja California, México. Editorial Académica Española. 133 p. ISBN: 978-3-659-04772-5.
10. Durán, N. C., Acuña, C. R., y Santiago, C. J. 1990. El mejillón. Biología, cultivo y comercialización. Fundación Caixa Galicia (aula del mar) La Coruña. 183 pp.
11. Fabioux Caroline, Huvet Arnaud, Le Souchu Pierrick, Le Pennec Marcel, Pouvreau Stephane (2005). Temperature and photoperiod drive *Crassostrea gigas* reproductive internal clock. *Aquaculture*, 250(1-2), 458-470.
12. FAO. 2006. Estado mundial de la acuicultura y pesca. Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma. 198 pp. ISSN: 1020-5500.
13. FAO. 2012. Anuario. Estadísticas de pesca y acuicultura. Roma. 76 pp.
14. Fearman, J.A., C.J.S. Bolchand & N.A. Moltshaniwskyj. 2009. Energy storage and reproduction in mussels, *Mytilus galloprovincialis*: the influence of diet quality. *J. Shellfish Res.*, 28: 305-312.
15. Fitch, J.E. (1950) The Pismo Clam. *Calif. Fish and Game* 36(3):285-312.
16. Food and Agriculture Organization (FAO). 2011. Yearbook. of Fishery and Aquaculture 2009. <http://www.fao.org/fishery/statistics/fr>, 78 p.
17. Gabbott, P. A. 1975. Storage cycles in marine bivalve molluscs: A hypothesis concerning the relationship between glycogen metabolism and gametogenesis. En: *The biochemistry, physiology and behaviour of marine organisms in relation to their ecology: Proceedings 9th European Marine Biology Symposium* (2-8

- octubre, 1974. Oban, Escocia). H. Barnes (ed.): 199- 211. Aberdeen University Press. Aberdeen, Escocia: 760 pp
18. Gabbott, P.A. y A. J. M. Walker. 1971. Changes in the condition index and biochemical content of adult oysters (*Ostrea edulis* L.) maintained under hatchery conditions. *J. Cons. int. Explor. Mer.* 34 (1): 99- 106.
 19. Gibbons, M.C. y Castagna, M. 1984. Serotonin as an inducer of spawning in six bivalve species. *Aquaculture*, (40): 189–191.
 20. Granados, A. 2012. Efecto de la temperatura en el desarrollo y composición gonadal en la concha nácar *Pteria sterna* (Gould 1951) en condiciones controladas de laboratorio. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional.
 21. Guevara, E., Sáenz, G, L., Garcia, H. R y Tapia, V, O.M. 2010. Situación actual de los laboratorios de producción comercial de moluscos bivalvos en el Noroeste de México. Comité Estatal de Sanidad Acuícola e Inocuidad de Baja California, A.C. 50 p.
 22. Jeffs, A.G., Dunphy, B.J. y Wells, M.G. 2002. Experimental effects of water temperature on the gametogenic development of broodstock in the oyster, *Ostrea chilensis*. *J Shellfish Res.*, (21): 743–747
 23. Lannan, J.E., Robinson, A.K., Breese, W.P. (1980) Broodstock management of *Crassostrea gigas*: II. Broodstock conditioning to maximise larval survival. *Aquaculture* 21, 337-345.
 24. Loosanoff, V. L. y H. C. Davis. 1963. Rearing of bivalve molluscs. *Adv. Mar. Biol.* 1:1-36.

25. López, J. 2015. Efecto de la temperatura y alimentación en la maduración sexual del mejillón *Modiolus capax* (Conrad, 1837) en condiciones de laboratorio. Tesis de maestría. Centro de investigaciones biológicas del noroeste, S.C.
26. Martínez, G., Aguilera, C. y Mettifogo, L. 2000a. Interactive effects of diet and temperature on reproductive conditioning of *Argopecten purpuratus* broodstock. *Aquaculture*, (183): 149–159.
27. Martínez, G., Garrote, C., Mettifogo, L., Pérez, H. y Uribe, E. 1996. Monoamines and prostaglandin E2 as inducers of the spawning of the scallop, *Argopecten purpuratus* Lamarck. *J. Shell. Res.*, (15): 245-249
28. Martínez-Guzmán, G. 2008. Control de la reproducción y producción de semillas de bivalvos en sistemas controlados. En A. Lovatelli, A. Farías e I. Uriarte (eds). Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sostenibilidad en América Latina. Taller Técnico Regional de la FAO. 20-40 de agosto de 2007, Puerto Montt, Chile. FAO Actas de Pesca y Acuicultura. No. 12. Roma, FAO. Pp. 267-275.
29. Matsutani, T. 1990. Endogenous factors controlling spawning in marine bivalves. En: M. Hoshi y O. Yamashita, eds. *Advances in Invertebrate Reproduction* , vol. 5, pp. 231–37. Amsterdam, Netherlands, Elsevier Science
30. Moguel-García, M., y Curiel-Ramírez, G. S. 2016. *Crassostrea virginica*: Datos preliminares del ciclo reproductivo y asentamiento en Laguna larga de Mandinga Veracruz. Agro Veracruzano; Instituto Tecnológico Superior de San Andres Tuxtla., 625 p

31. Muranaka, M.S., Lannan, J.E. (1984) Broodstock management of *Crassostrea gigas* : Environmental influences on broodstock conditioning. *Aquaculture* 39, 217-228.
32. Norzagaray-Campos, M., P. Muñoz-Sevilla, L. Sánchez-Velasco, L. Capurro-Filigrasso, y O. Llánes-Cárdenas. 2012. Acuicultura: estado actual y retos de la investigación en México. *Revista AquaTIC* 37:20-25.
33. Nurai, P., Poljaroen J. Tikikul Y., Cummins S., Sretarugsa P., Hannaa P., Wanichanon C. & Sobhon P. 2010. The existence of gonadotropin-releasing hormone-like peptides in the neural ganglia and ovary of the abalone, *Haliotis asinina* L. *Acta histochemical* 112:557-566
34. Ojea, J. Martínez, D., Novoa, S., Pazos, A., J. Abad, M. 2002. Contenido y distribución de glucógeno en relación con el ciclo gametogénico de *Ruditapes decussatus* (L., 1758) en una población natural de las lagunas de Baldaio (Galicia, noroeste de España). *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.* 18 (1-4). 307-313
35. Oyarzún, P., J.E. Toro, R. Jaramillo, R. Guíñez, C. Briones & M. Astorga. 2010. Análisis comparativo del ciclo gametogénico de *Perumytilus purpuratus* (Bivalvia: Mytilidae), en las localidades de Taltal y Huasco, norte de Chile. *Rev. Biol. Mar. Oceanogr.*, 45(1): 43-58
36. Reverol, Yinett M, Delgado, José G, de Severeyn, Yajaira G, & Severeyn, Héctor J. (2004). Embryonary and larval development of the marine clam *Tivela mactroides* (Bivalvia: Veneridae) in Zulia State, Venezuela. *Revista de Biología Tropical*, 52(4), 903-909

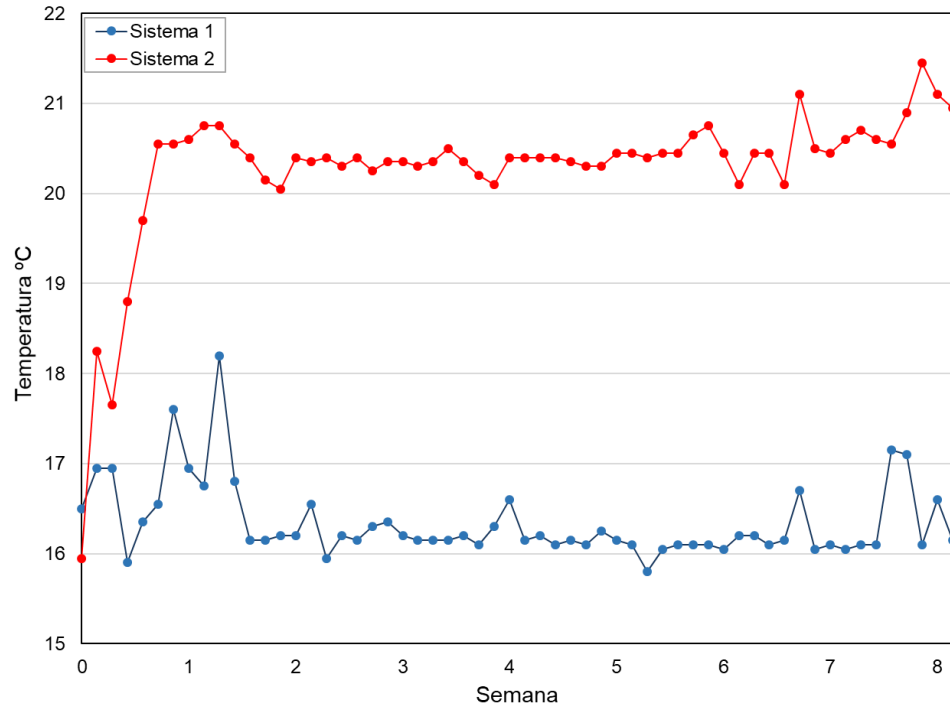
37. Rodríguez, M. 2004. Efecto de la temperatura sobre la gametogénesis en el callo de hacha *Atrina maura* (Sowerby, 1835) (Bivalvia: Pinnidae). Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional.
38. Saavedra Rosas, O.A. (1983) Distribución espacial de juveniles de almeja pismo (*Tivela stultorum*) en Playa San Ramón, Baja California, México. Tesis de licenciatura. Escuela Superior de Ciencias Marinas UABC.
39. Searcy Bernal, R., 1983. Un estudio sobre la condición de la almeja Pismo *Tivela stultorum* con datos de longitud y peso de la carne de capturas comerciales. *Ciencias Marinas*, 9 (2): 19-30.
40. Searcy-Bernal Ricardo y Saavedra Rosas, A. 1988. Estudios poblacionales sobre la almeja pismo *Tivela stultorum* en una playa de Baja California, México. *Ciencias Marinas* 14(2): 1-14.
41. Searcy-Bernal, R. 1989. Dinámica de una población explotada de la almeja pismo (*Tivela stultorum*) p.193-226 en: Rosa-Vélez, J. y González, F. (eds). *Temas de Oceanografía Biológica en México*, UABC-UNAM, Mexicali, B.C., México.
42. Searcy-Bernal, R., Juárez-Romero, R., 1991. Length and age structure in commercial catch samples of the pismo clam *Tivela stultorum* (Mawe, 1823), from Playa San Ramon, B.C., México. *Ciencias Marinas*. 17: 71-82.
43. Seed, R. 1976. Ecology. En: B. L. Bayne (Ed). *Marine mussels: their ecology and physiology*. Cambridge University Press, Cambridge. 13-66 pp.
44. Siri Chiesa, M y Patricia Moctezuma. 1989. La pesca en Baja California Universidad Autónoma de Baja California. ISBN: 986-6260-08-0. 217 pp.

45. SNIDRUS/OEIDRUS, 2015. Informe estadístico de producción pesquera y acuícola de Baja California. 5 p.
46. Utting, S.D., Millican, P.F. (1997) Techniques for the hatchery conditioning of bivalve broodstocks and the subsequent effect on egg quality and larval viability. *Aquaculture* 155, 47-56.
47. Vélez, A., Alifa, A. y Aguaje, O. 1990. Induction of spawning by temperature and serotonin in the hermaphroditic tropical scallop, *Pecten ziczac*. *Aquaculture*, (84): 307–313.
48. WALNE, P. R. 1970. The seasonal variation of meat and glycogen content of seven populations of oysters *Ostrea edulis* L. and review of the literature. *Fishery Invest. Lond. Ser. 2*, 26 (3): 35 pp.
49. Weymouth, F.W. (1923). The life history and growth of the pismo clam (*Tivela stultorum*, Mawe 1823). *Calif. Fish and Game. Fish. Bull.*, 7: 120 pp.
50. Zaixo, H. E. 2003. Sistema nervioso y receptores en la cholga, *Aulacomya atra atra* (Bivalvia: Mytilidae). *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 38(2):43-56.
51. Zetina A. I., Aldana D., Brule T., y Baqueiro E., 2000. Ciclo reproductor e índices de condición usados en *Melongena corona* (Mollusca: Gastropoda) *Rev. Biol. Trop.* 48 Supl. 1: 77-86,2000

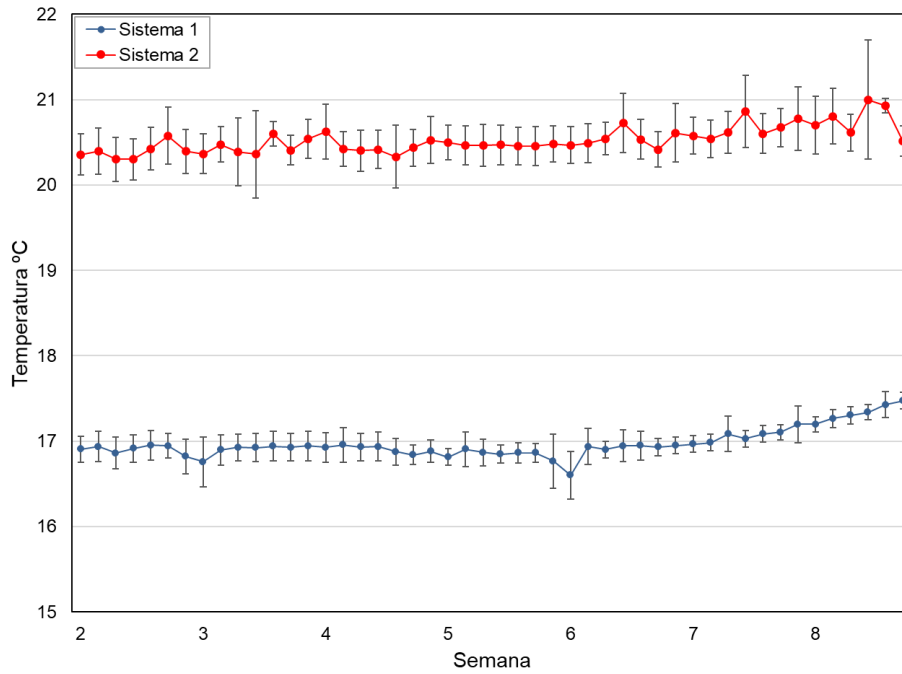
9. APENDICES O ANEXOS:

1. Anexo 1: Prueba piloto.

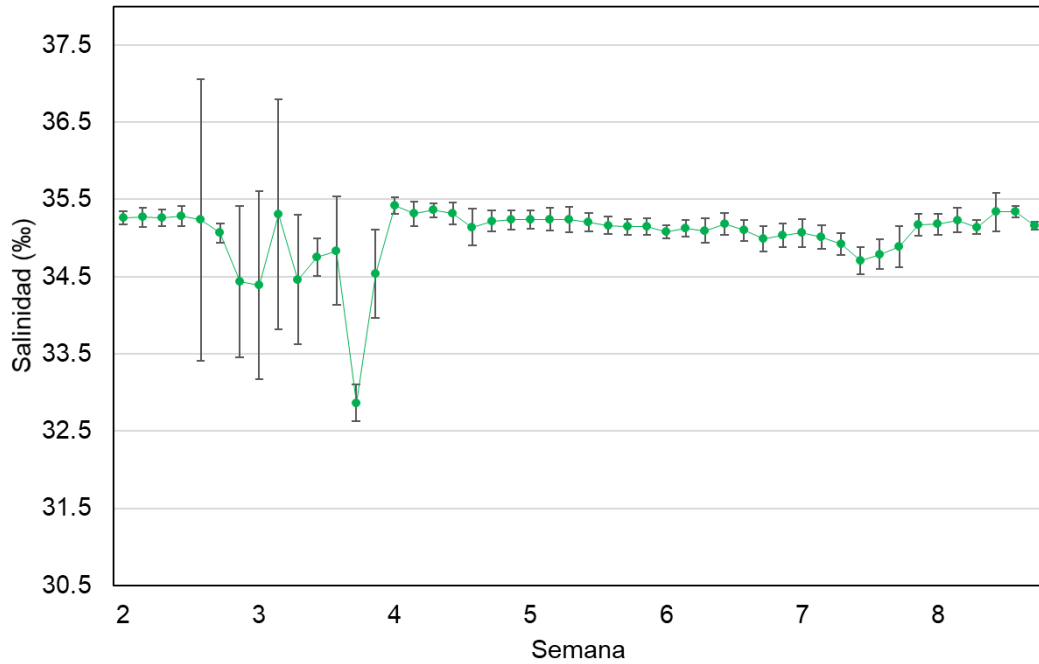
Previo a este experimento se realizó una prueba piloto en donde fueron acondicionados 72 organismos de la especie *Tivela stultorum*. El sistema utilizado fue la base para el diseño del prototipo final que se utilizó durante este experimento; pues se fueron agregando distintos componentes del sistema según las necesidades de los organismos. Durante este periodo las almejas fueron acondicionadas a temperaturas constantes de 18 y 22°C. Otro de los cambios más importantes fue el cómo se disponían las almejas, ya que de manera inicial se acomodaron en posición horizontal sobre una rejilla y se mantenían “cerradas” con ligas que las atravesaban a la mitad del umbo, durante ese periodo de tiempo varias almejas murieron a la brevedad. Posteriormente se colocaron en cajas como en el prototipo final y de forma observacional pudimos concluir que se encontraban en una posición más cómoda debido a que el sifón lo mantenían constantemente expuesto y filtrando de manera continua. En una ocasión durante las pruebas de acondicionamiento una de las almejas se colocó inversamente y al darnos cuenta horas más tarde la almeja se mostró débil y murió al día siguiente. Al final del experimento hubo una mayor sobrevivencia en el sistema de 18°C. Los resultados de este experimento no fueron publicados, pero nos dieron la pauta para la realización del prototipo final y tomar en cuenta aquellas características de los organismos importantes durante el acondicionamiento.



Anexo 2. Datos de temperatura durante las 8 semanas de acondicionamiento. Se promedió la temperatura máxima y mínima que se registró en los termómetros colocados en cada sistema. En color azul se observan los resultados del S1 y en color rojo se observan los resultados del Sistema 2.



Anexo 3. Datos de temperatura durante 7 de las 8 semanas de acondicionamiento. Se promedió los datos obtenidos por los sensores de temperatura, cada sensor registraba la temperatura por minuto, en la gráfica se observa también la desviación estándar. En color azul se observan los resultados del S1 y en color rojo se observan los resultados del Sistema 2.



Anexo 4. Datos de salinidad del agua. Se promedió los datos obtenidos por el sensor de salinidad, cada sensor registraba la salinidad por minuto, en la gráfica se observa también la desviación estándar.

		NH4+ mg/L	NO3 mg/L	NO2 mg/L	pH
Sistema 1	Promedio	0.09	64.71	0.21	8.001
	SD	0.07	26.01	0.08	0.044
Sistema 2	Promedio	0.09	68.24	0.49	8.039
	SD	0.07	23.51	0.36	0.055

Anexo 5. Promedio y desviación estándar de los valores de amonio, nitratos, nitritos y pH de ambos sistemas

Fecha	Sistema 1			Sistema 2		
	NO3 mg/L	NO2 mg/L	pH	NO3 mg/L	NO2 mg/L	pH
23 abril	40	0.125	7.967	40	0.250	8.000
25 abril	60	0.125	7.956	40	0.250	7.943
27 abril	80	0.250	8.009	80	0.250	8.003
30 abril	40	0.250	7.982	80	0.250	7.995
2 mayo	40	0.000	8.096	60	0.000	8.110
7 mayo	120	0.125	7.987	120	0.250	8.058
9 mayo	80	0.250	8.042	80	0.500	8.053
11 mayo	60	0.250	8.012	60	0.500	8.073
14 mayo	80	0.250	7.981	80	0.750	8.018
16 mayo	80	0.250	7.966	80	0.500	8.033
18 mayo	80	0.250	7.993	80	0.500	8.074
21 mayo	80	0.250	-	80	0.750	-
23 mayo	60	0.250	7.999	40	0.500	8.028
25 mayo	60	0.250	7.950	60	0.250	7.987
28 mayo	60	0.250	7.991	80	1.000	8.013
30 mayo	80	0.250	7.985	80	1.500	8.066
1 junio	0	0.125	8.099	20	0.250	8.173

Anexo 6. Tabla de valores de nitratos, nitritos y pH de ambos sistemas.

		GM (%)	GD (%)	EF (%)	CVTC (%)
Semana 1	Biometría inicial	3.5	31.67	6.93	57.9
Semana 3	Sistema 1	10.63	27.78	8.65	52.94
	Sistema 2	1.9	19.24	4.95	73.9
Semana 6	Sistema 1	11.81	29.62	9.52	48.86
	Sistema 2	15.24	19.52	10.38	54.67
Semana 8	Sistema 1	15.24	21.9	18.25	44.37
	Sistema 2	13.41	18.81	4.13	63.65

Anexo 7. Porcentaje de los componentes del manto de ambos sistemas.