



**Estudio del desarrollo gametogénico  
de la almeja fina, *Ruditapes  
decussatus* (Linné, 1758) en el medio  
natural y optimización de las  
condiciones del acondicionamiento  
en criadero**

Memoria presentada por:

**Justa Ojea Martínez**

Para optar al grado de Doctora en Biología

**2013**



Las doctoras Marcelina Abad Caeiro (Profesora Titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, de la Universidad de Santiago de Compostela) y Dorotea Martínez Patiño (Investigadora del Centro de Cultivos Mariños de Ribadeo-CIMA. Xunta de Galicia),

INFORMAN:

Que el trabajo titulado “Estudio del desarrollo gametogénico de la almeja fina, *Ruditapes decussatus* (Linné, 1758) en el medio natural y optimización de las condiciones del acondicionamiento en criadero”, presentado por Justa Ojea Martínez para optar al Título de Doctora en Biología, ha sido realizado bajo su dirección y considerándolo finalizado, autorizan su presentación y defensa.

Ribadeo, a 5 de marzo de 2013

Fdo: Dra. Marcelina Abad Caeiro  
Directora de la Tesis Doctoral

Fdo: Dra. Dorotea Martínez Patiño  
Codirectora de la Tesis Doctoral





**XUNTA DE GALICIA**  
CONSELLERÍA DO MEDIO RURAL  
E DO MAR



**CIMA**  
CENTRO DE  
INVESTIGACIÓNS  
MARIÑAS



**JACUMAR**  
JUNTA NACIONAL  
ASESORA DE CULTIVOS MARINOS

Esta tesis ha sido realizada en el Centro de Cultivos Mariños de Ribadeo, CIMA. Los trabajos llevados a cabo se realizaron gracias a la financiación recibida bajo el marco de diferentes proyectos de investigación desarrollados a lo largo de varios años. Estos proyectos han sido tanto Acciones promovidas por la propia Consellería do Medio Rural e do Mar (Xunta de Galicia), como Planes Nacionales financiados por la Junta Nacional Asesora de Cultivos Marinos (JACUMAR), y Proyectos I+D.



## AGRADECIMIENTOS

He de reconocer que esta tesis hace mucho tiempo que debería estar presentada, la culpa de que haya tardado tanto, por supuesto, es sólo mía, pero como se suele decir más vale tarde que nunca. Tengo que agradecer en primer lugar a mi directora y codirectora de tesis, las doctoras Marcelina Abad y Dorotea Martínez, por su “infinita paciencia” a pesar de que creo que en algún momento debieron de temer que nunca llegaría a presentarla, (en honor a la verdad diré que en más de una ocasión quise tirar la toalla). Sin su ayuda y su apoyo para que la terminara, seguramente nunca llegaría a presentar esta tesis.

Por supuesto también quiero agradecerle a todos mis compañeros de Ribadeo que siempre me han dado ánimos para continuar. En especial a Tea, nuestra directora, por todo lo que hace por este Centro de Ribadeo, que en estos años hemos ido mejorando día a día tanto en equipamiento como en personal y todo gracias a su empeño y tesón.

Cuando aterricé en este Centro, hace ya 18 años no había estado nunca en un criadero, así que entre todos me enseñaron sus entresijos: José María, que aún sin estar ya con nosotros, está presente en cada rincón; con él aprendí el funcionamiento de las instalaciones; Tea, Menel, Javi, María José y Merchi que me enseñaron a trabajar en un criadero de moluscos, desde cultivar el fitoplancton y las larvas, hasta mi primer contacto con la histología. Pero lo más importante que me enseñaron es que se puede tener una gran familia que está ahí cuando la necesitas sin que compartamos ni un solo cromosoma.

Susana, amiga y compañera desde la facultad y que al llegar juntas a Ribadeo hizo que el comienzo, en un lugar nuevo lleno de gente desconocida, fuera más llevadero. También le agradezco su ayuda en esta tesis, en especial con la bioquímica y los ácidos grasos.

Las chicas de la oficina: Mercedes por ayudarme a conocer este pueblo y su gente y ser mi amiga todos estos años; Ana, mi “secretaria particular”, por acordarse de todas mis dietas y llevar la cuenta de mis vacaciones y moscosos (Anita, este año será más fácil porque para lo que nos dejan.....) y por supuesto Conchita por su inestimable ayuda en la corrección ortográfica de esta tesis, que estoy segura que se la ha leído más veces que nadie.

Quiero también agradecer a otros compañeros y ahora también amigos que llegaron detrás de mí a trabajar en Ribadeo: Fiz por su ayuda con la estadística y que aunque ahora está lejos, siempre está presente; Ana Cerviño por acompañarme por las tardes mientras ella también escribía su tesis y regañarme si no trabajaba, además de su ayuda con el formato final de este trabajo; Viki, Andrea, Escudero, Curro, Jana y los últimos en llegar Jesús, Pol y Rocío.

La doctora Eugenia Rodríguez, por el tiempo que dedicó a compartir conmigo sus conocimientos en histología, y a otros muchos que fueron compañeros y amigos durante su corta estancia en Ribadeo, porque cada nueva persona que llega es como un soplo de brisa fresca que hace que el lugar de trabajo sea un sitio agradable y divertido.





A mis padres, Manuel y Alicia



## ABREVIATURAS UTILIZADAS

abr	Abril
ago	Agosto
C	Control
cc	Centímetros cúbicos
CH	Carbohidratos
cm	Centímetro
CT	Temperatura Constante
D	Desviación
dic	Diciembre
E0	Estadio de reposo sexual
E1	Estadio de inicio de la gametogénesis
E2	Estadio de gametogénesis avanzada
E3	Estadio de madurez sexual
E4	Estadio de puesta
E5	Estadio de postpuesta o puesta reciente
ene	Enero
feb	Febrero
FID	Detector de ionización de llama
Fig.	Figura
g	Gramo
GR	Gradiente de temperatura o subida gradual de la temperatura
HE	Hembra
ICF	Índice de Condición Poblacional
ICG	Índice de Condición Gonadal
ICS	Índice de Condición Seco
IN	Indeterminado
jun	Junio
jul	Julio
kg	Kilogramo
LI	Lípidos
m <sup>2</sup>	Metro cuadrado
M	Media
MA	Macho
mar	Marzo
may	Mayo

mg	Miligramo
ml	Mililitro
mm	Milímetro
MN	Medio natural
MV	Masa visceral
N	Normal
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros
NMID	no metilen-interrumpidos
oct	Octubre
P	Peso
PF	Peso fresco
PFT	Peso fresco total
PFC	Peso fresco de la concha
PFG	Peso fresco de la gónada-masa visceral
PFV	Peso fresco de la vianda
PR	Proteínas
PS	Peso seco
PSC	Peso seco de la concha
PSG	Peso seco de la gónada-masa visceral
PSV	Peso seco de la víscera
RC	Ración de comida
RD	Ración doble
RN	Ración normal
Rpm	Revoluciones por minuto
RT <sup>a</sup>	Rango de temperatura
sep	Septiembre
Tm	Tonelada
µg	Microgramo
µl	Microlitro
°C	Grado centígrado



## ÍNDICE

---



<b>1.- INTRODUCCIÓN GENERAL</b>	<b>3</b>
-1.1.- Taxonomía y descripción de la especie.....	3
-1.2.- Hábitat, distribución geográfica y principales países productores.....	9
-1.3.- La explotación de esta especie en Galicia.....	10
<b>2.- OBJETIVOS</b>	<b>19</b>
<b>3.- CICLO REPRODUCTIVO EN EL MEDIO NATURAL</b>	<b>23</b>
-3.1.- Introducción.....	23
-3.2.- Material y métodos.....	26
3.2.1.- Descripción de la zona de muestreo.....	26
3.2.2.- Condiciones medioambientales.....	27
3.2.3.- Datos biométricos.....	27
3.2.4.- Índices de Condición.....	28
3.2.5.- Determinación del animal estándar.....	29
3.2.6.- Métodos histológicos.....	29
3.2.7.- Métodos bioquímicos.....	31
3.2.7.1.- Determinación de proteínas.....	31
3.2.7.2.- Determinación de carbohidratos.....	32
3.2.7.3.- Determinación de lípidos.....	33
3.2.7.4.- Determinación de ácidos grasos.....	34
3.2.8 Métodos estadísticos.....	36
- 3.3.- Resultados.....	37
3.3.1.- Datos biométricos.....	37
3.3.2.- Índices de Condición.....	39
3.3.3.- Ciclo gametogénico.....	42
3.3.4.- Composición bioquímica mayoritaria.....	46
3.3.5.- Variaciones estacionales en la composición de ácidos grasos de la gónada-masa visceral.....	51
- 3.4.- Discusión.....	55
<b>4.- ACONDICIONAMIENTO EN CRIADERO: EFECTO DE LA TEMPERATURA</b>	<b>65</b>
- 4.1.- Introducción.....	65
- 4.2.- Material y métodos.....	69
4.2.1.- Condiciones experimentales.....	69
4.2.2.- Muestras durante el acondicionamiento.....	70
4.2.3.- Obtención de desoves.....	70
4.2.4.- Índices de Condición.....	71
4.2.5.- Métodos estadísticos.....	71

- 4.3.- Resultados.....	73
4.3.1.- Acondicionamiento de otoño.....	73
4.3.1.1.- Datos biométricos.....	73
4.3.1.2.- Índices de Condición.....	74
4.3.1.3.- Ciclo gametogénico.....	77
4.3.1.4.- Composición bioquímica mayoritaria.....	78
4.3.2.- Acondicionamiento de invierno.....	81
4.3.2.1.- Datos biométricos.....	82
4.3.2.2.- Índices de Condición.....	83
4.3.2.3.- Ciclo gametogénico.....	85
4.3.2.4.- Composición bioquímica mayoritaria.....	86
4.3.3.- Acondicionamiento de primavera.....	89
4.3.3.1.- Datos biométricos.....	89
4.3.3.2.- Índices de Condición.....	90
4.3.3.3.- Ciclo gametogénico.....	93
4.3.3.4.- Composición bioquímica mayoritaria.....	94
- 4.4.- Discusión.....	97
<b><u>5.- ACONDICIONAMIENTO EN CRIADERO: EFECTO DE LA RACIÓN DE ALIMENTO</u></b>	<b>105</b>
- 5.1.- Introducción.....	105
- 5.2.- Material y métodos.....	110
5.2.1.- Diseño de las experiencias.....	110
5.2.2.- Muestras durante el acondicionamiento.....	110
5.2.3.- Cultivo de las microalgas.....	111
5.2.3.1.- Cultivo de microalgas en matraces.....	112
5.2.3.2.- Cultivo de microalgas en bolsas.....	112
5.2.3.3.- Métodos bioquímicos.....	113
5.2.3.4.- Cálculo del peso seco de las microalgas.....	114
- 5.3.- Resultados.....	115
5.3.1.- Composición bioquímica de las microalgas.....	115
5.3.2.- Datos biométricos.....	117
5.3.3.- Índices de Condición.....	119
5.3.4.- Ciclo gametogénico.....	121
5.3.5.- Composición bioquímica mayoritaria.....	122
- 5.4.- Discusión.....	126
<b><u>6.- CONCLUSIONES</u></b>	<b>133</b>
<b><u>7.- BIBLIOGRAFÍA</u></b>	<b>137</b>
<b><u>8.- ANEXOS: PUBLICACIONES</u></b>	<b>159</b>



## INTRODUCCIÓN

---



## 1.- INTRODUCCIÓN GENERAL

### 1.1.- TAXONOMÍA Y DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE



La almeja fina, *Ruditapes decussatus* (Linné, 1758), es un molusco perteneciente a la clase de los Lamelibranquios o Bivalvos, éstos tienen una organización muy sencilla. Son metazoos celomados protostomados, con simetría bilateral, cuerpo blando no segmentado en el que se pueden reconocer tres regiones: los sifones, el pie y la masa visceral. Están comprimidos lateralmente, poseen una concha formada por dos valvas que se unen dorsalmente y que cubren totalmente el cuerpo del animal. Éste tiene una simetría típica con respecto a un plano que pasa entre las dos valvas, pero a veces dadas las diferencias entre ellas, esta simetría se pierde. El manto está formado por dos grandes repliegues que encierran la cavidad paleal y segregan la concha bivalva. La cabeza no está diferenciada, pero tiene una boca flanqueada por un par de palpos labiales. Dos potentes músculos aductores atraviesan el cuerpo y cierran la concha.

### **Anatomía externa**

La concha de los bivalvos, está constituida por dos valvas, similares entre sí, convexas y más o menos ovaladas, articuladas una a la otra por su región dorsal (Fig. 1.1) y se empieza a formar en el estado de larva veliger. Cada valva posee una protuberancia dorsal denominada umbo o zona de la charnela, donde se unen las valvas, es la parte dorsal del animal y la región en el lado opuesto es el margen ventral, las dos valvas están unidas por una banda no calcárea de una proteína elástica que forma el ligamento. Las valvas se cierran por la acción de unos grandes músculos dorsales, llamados músculos aductores, cuya acción es antagónica con respecto a la del ligamento. Están formadas principalmente de carbonato cálcico y tienen tres capas: la capa interna o nacarada, la capa intermedia o brillante que forma la práctica totalidad de la concha y la capa externa o periostraco, una capa pardusca y áspera que los animales más viejos suelen perder debido a la abrasión o al desgaste. El exterior de la concha en la almeja fina, es rugoso con surcos poco profundos tanto lineales (que van desde la parte dorsal a la ventral), como anillos concéntricos alrededor de la concha y paralelos a la charnela. En la cara interna de la concha se pueden apreciar las impresiones de los músculos aductores y del manto (seno y línea paleal).

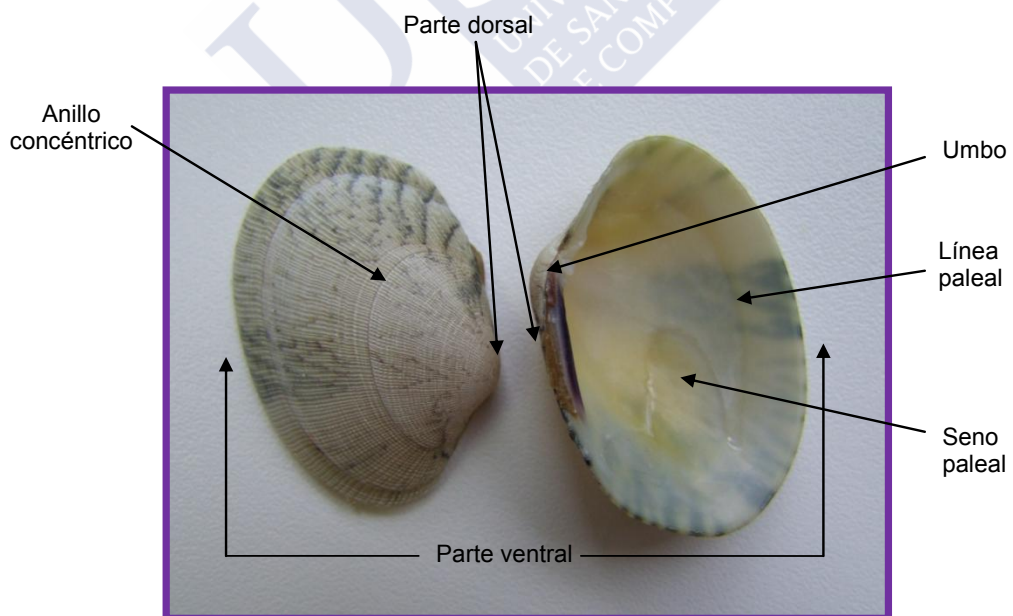


Fig. 1.1. Valvas de una concha de almeja fina por su cara interna y externa.

### ***Anatomía interna***

**Manto:** las partes blandas de los bivalvos están recubiertas por el manto, que consiste en dos láminas delgadas de tejido conectivo con los bordes más gruesos. Las dos mitades del manto están unidas a la concha por la charnela, en posición ventral respecto de la línea paleal, pero sueltas en los bordes. El borde del manto suele tener tentáculos, que en la almeja se encuentran localizados en los extremos de los sifones (Fig. 1.2). La función principal del manto es segregar la concha pero también cumple otros propósitos: posee una función sensorial, puede iniciar el cierre de las valvas como respuesta a condiciones desfavorables en el entorno; controlar la entrada de agua en la cavidad corporal y además juega un papel importante dirigiendo las partículas hacia las branquias.

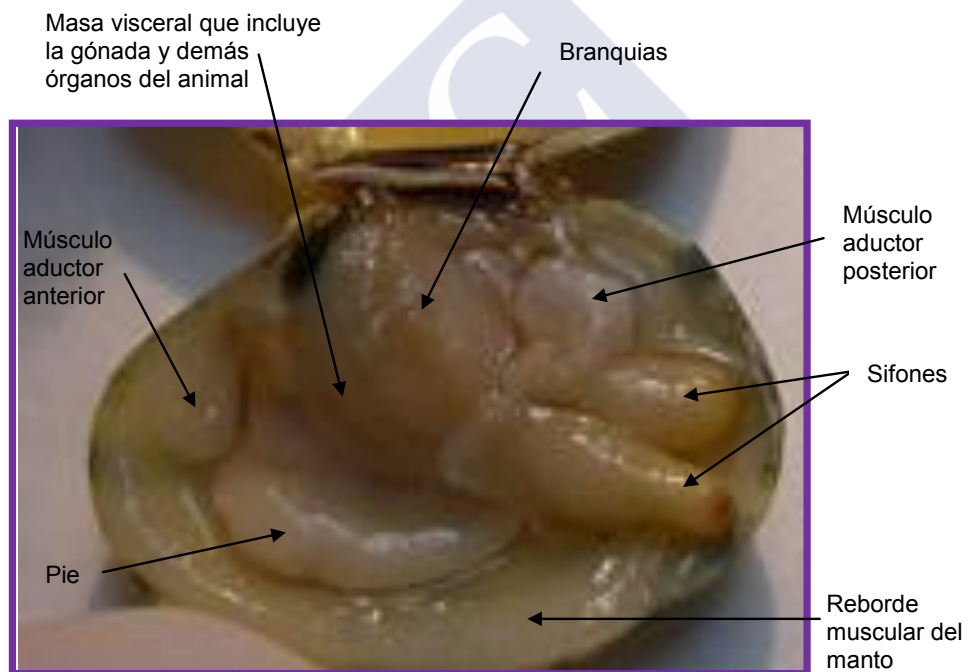


Fig. 1.2. Anatomía interna de una almeja fina.

**Músculos aductores:** están insertados en las valvas, se oponen a la acción mecánica del ligamento y cierran la concha. Determinan en la cara interna de las valvas y en su punto de inserción las llamadas “impresiones”.

**Pie:** se encuentra en la base de la masa visceral, se trata de un órgano bien desarrollado que el animal utiliza para excavar en el sustrato y desplazarse.

Aparato respiratorio: entre cada uno de los lados del manto y el cuerpo se inserta una branquia o ctenidio, formado por dos líneas de filamentos más o menos largos y originados a partir de un eje longitudinal. El conjunto de filamentos de una misma línea forman una lámina branquial. Las branquias son órganos con una gran superficie en forma de hoja que se utilizan en parte para la respiración y en parte, para filtrar el alimento del agua.

Aparato digestivo: son organismos filtradores, las corrientes ciliares pasan a lo largo de las branquias y llevan el alimento hacia los palpos labiales donde se clasifica antes de pasar a la boca, ésta va directamente a un esófago corto que transporta el alimento hasta el estómago. Parte del alimento es rechazado por los palpos y eliminado en forma de las denominadas "pseudoheces". Cuando las partículas llegan al estómago, entran en las glándulas digestivas para ser digeridas intracelularmente, las partículas finas que salen de estas glándulas pasan hacia el intestino a lo largo del surco intestinal. Generalmente el intestino es largo y acaba en un ano situado muy cerca de la abertura exhalante. Los bivalvos poseen un estilete cristalino, contenido en un ciego, que se abre en el estómago, o en un canal profundo de la parte inicial del intestino. Este estilete es translúcido o amarillento y tiene un tamaño considerable, gira sobre sí mismo, tritura los alimentos y contiene enzimas que libera en el estómago.

Aparato circulatorio: los bivalvos tienen un sistema circulatorio simple que es bastante difícil de localizar. El corazón se halla en un saco transparente, el pericardio, y tiene dos aurículas de forma irregular y un ventrículo. La aorta anterior y la posterior salen del ventrículo y llevan la sangre a todo el cuerpo. El sistema venoso consta de una serie vaga de senos de pared fina a través de los cuales vuelve la sangre al corazón.

Sistema nervioso: tiene simetría bilateral y consta de tres pares de ganglios y varios pares de nervios. Los ganglios cerebropleurales supraesofágicos (resultantes de la fusión de los ganglios cerebroides con los pleurales), estos ganglios inervan los palpos, el músculo aductor posterior y parte del manto. Los ganglios pedios situados en la base del pie controlan su movimiento y los ganglios viscerales, situados detrás del pie y ventralmente en relación al intestino, controlan la mayor parte del animal: las branquias, el corazón, el tracto digestivo, la gónada, el músculo aductor posterior, parte del manto y los sifones.

## **Reproducción**

Las gónadas son los órganos reproductores de los animales encargadas de producir los gametos, en los lamelibranquios se originan a partir de células mesodérmicas localizadas en la región posterior del cuerpo, próxima a los ganglios viscerales y por debajo del pericardio formando un sistema de tubos y folículos, característico de los bivalvos, Coe (1943a). El desarrollo de la gónada es muy precoz en estos animales, hasta el punto de que en especies como la almeja fina, aparece ya una gónada primaria en ejemplares de 4-5 mm de longitud (Vilela, 1950). En su proceso de desarrollo, estas células primordiales se multiplican profusamente, separándose en dos grupos que se disponen simétricamente a ambos lados del cuerpo, las gónadas son estructuras pares formadas por una serie de folículos que comunican con una tupida red de canales secundarios, que se unen a su vez en una serie de conductos principales o gonoductos. Estos canales están constituidos por un epitelio ciliado monoestratificado y carecen de estructuras musculares, realizándose la expulsión de los gametos mediante el movimiento de los cilios (Iwata, 1952).

La almeja fina es una especie gonocórica y la gónada es una estructura difusa que en estado de reposo sexual prácticamente desaparece, y en su fase de máximo desarrollo envuelve la glándula digestiva y demás órganos, ocupando toda la masa visceral, extendiéndose entre los músculos y por todo el espacio ocupado por el tejido conjuntivo (Vilela, 1950).

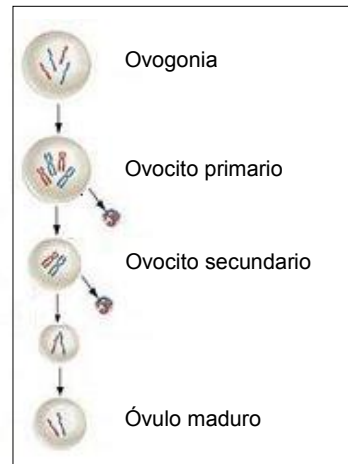
La fecundación se realiza en el medio marino y tiene lugar al azar, (Grassé, 1976). Las hembras elaboran en sus ovarios una sustancia que, al pasar al agua de mar, provoca la eyaculación en los machos próximos. A su vez, el esperma emitido al agua desencadena la puesta de las hembras. Se ha demostrado que el sistema nervioso interviene en la puesta, la ablación de los ganglios cerebroides la adelanta, mientras que la supresión de los ganglios viscerales la retarda o la inhibe totalmente.

Su ciclo reproductor es anual y básicamente incluye tres períodos: gametogénesis, desove y reposo o recuperación gonadal.

La gametogénesis es el proceso que conduce a la formación de gametos por medio de la meiosis a partir de células germinales. En las hembras la formación de los gametos femeninos u óvulos se denomina ovogénesis y en los machos, la formación de los gametos masculinos o espermatozoides, se denomina espermatogénesis.

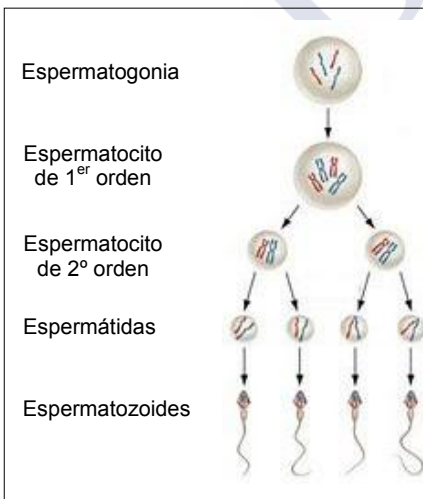
La gametogénesis depende de varios factores como el tamaño del bivalvo, la temperatura y la cantidad y calidad de alimento que recibe.

La ovogénesis propiamente dicha, comienza con la aparición de ovogonias primarias en el epitelio germinal, una vez formadas, parte quedan en reposo en las paredes de los folículos, mientras que las otras se dividen rápidamente dando lugar a ovogonias secundarias o terminales. Éstas sufren un profundo cambio en apariencia y tamaño dando lugar a los ovocitos primarios, que se preparan para realizar la meiosis en dos fases.



Fase previtelogénesis: los ovocitos aumentan lentamente de tamaño y no se observa acumulación de sustancias de reserva.

Fase vitelogénesis: el ovocito crece muy rápidamente y acumula en su citoplasma gránulos de mucopolisacáridos, gotas de lípidos y plaquetas de proteínas. Al final del proceso de maduración el ovocito es completamente redondo y presenta un diámetro de  $67,43 \pm 3,62$  micras en la almeja fina, (Aranda-Burgos, 2010).



Durante la espermatogénesis, las espermatogonias primarias se disponen formando una capa sobre la pared del folículo. Después de una serie de divisiones se originan las espermatogonias secundarias que darán lugar a espermatocitos de primer orden.

Éstos se transforman en espermatocitos de segundo orden, quedando libres en los folículos formando una banda concéntrica sobre la capa de espermatogonias (Sastry, 1979).

Luego se transforman en espermátidas y posteriormente en espermatozoides, que forman una capa de falsos núcleos en la luz de los folículos. El conjunto que forman la cabeza y la parte media del espermatozoide en la almeja fina mide 8 micras. (Aranda-Burgos, 2010).

## 1.2.- HÁBITAT, DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA Y PRINCIPALES PAÍSES PRODUCTORES

La almeja fina vive enterrada en sustratos de arena gruesa limpia o mezclada con cascajo; actualmente también se puede encontrar en sustratos algo fangosos debido al cambio progresivo de la naturaleza de los fondos de nuestras rías. Preferentemente ocupan la zona intermareal, aunque también se pueden encontrar bancos submareales. Su desarrollo varía mucho dependiendo de la temperatura del agua y de la riqueza del plancton, suele alcanzar la talla comercial (40 mm en su eje mayor) al cabo de tres o cuatro años.

Está presente en todo el litoral atlántico europeo, incluye el Mar del Norte, el Canal de la Mancha, y toda la cuenca mediterránea (Argelia, Túnez, Italia, Grecia y Egipto) con excepción del Mar Negro; hacia el este alcanza el Mar Rojo (Mars, 1966; Fischer y Metivier, 1971), y por el sur llega hasta las costas africanas a Senegal. (Fig. 1.3).



Fig. 1.3. Distribución geográfica y principales países productores de almeja fina.

Los principales países productores en cuanto a la cantidad de capturas, son:

Túnez, Francia, España y Portugal (Fig. 1.3). En la tabla I.1, se muestran las capturas (expresadas en toneladas) durante los años 2008 y 2009, según datos de capturas de la FAO.

Tabla I.1. Producción anual de almeja fina en los principales países productores.

	2008	2009
TÚNEZ	537	481
FRANCIA	483	19
ESPAÑA	276	827
PORTUGAL	54	118

### 1.3.- LA EXPLOTACIÓN DE ESTA ESPECIE EN GALICIA

La almeja fina (*R. decussatus*) es, de las distintas especies de almeja comercializadas en Galicia, la que alcanza un valor más elevado de venta en lonja. Por ser una especie que vive sobre todo en la zona intermareal, el método de pesca mayoritario es el marisqueo a pie, aunque también se pesca a flote desde embarcación en los bancos submareales.



*Fig.1.4. Mariscadoras de Cambados recogiendo almeja fina con angazo durante la bajamar.*

También se extrae este molusco a pie en zonas que, aún con bajamar, quedan cubiertas por una capa de agua de poca profundidad; las artes más utilizadas son el “rastros” y el “raño”. Básicamente consisten en un rastriillo o angazo, que lleva unido un cuerpo hecho de red de cuerda (en el rastros) o de varillas metálicas (en el raño) y dotado de una vara larga o mango.

El marisqueo a pie se basa en extraer el molusco presente en la playa durante las fases de bajamar; suele ser con un “sacho”, “angazo” o “fouciño” cuando la zona queda completamente seca. Entonces las mariscadoras cavan en la arena guiándose por los agujeros que los sifones dejan en ella.



*Fig. 1.5. Mariscadora de Campelo extrayendo almeja fina con raño.*

En Galicia se comercializan cinco especies de almejas: almeja fina (*R. decussatus*); almeja babosa (*Venerupis pullastra*); almeja japonesa (*Tapes philippinarum*); almeja rubia (*V. rhomboides*) y almeja bicuda (*V. aurea*). La producción anual de estas especies varía de unas a otras (Fig. 1.6), hasta el año 2005, la almeja babosa era la que alcanzaba las producciones más altas, superando las 1.000 toneladas en todos los años, a partir de aquí se observa un aumento considerable de la producción de almeja japonesa, que en 2008 llega a sobrepasar las 2.000 toneladas. La almeja fina se mantiene con valores similares que oscilan entre 500 a 800 toneladas, siendo los años de menor producción durante 2005-2006 que no llega a las 600 Tm. La almeja rubia experimenta a partir del año 2006 un incremento en sus capturas, superando a la almeja fina, aunque a partir de 2009 comienza a notarse un ligero descenso. La almeja bicuda, no se representa en la gráfica porque al ser su producción tan pequeña (no llega a las 40 toneladas por año), apenas se vería su representación en la gráfica.

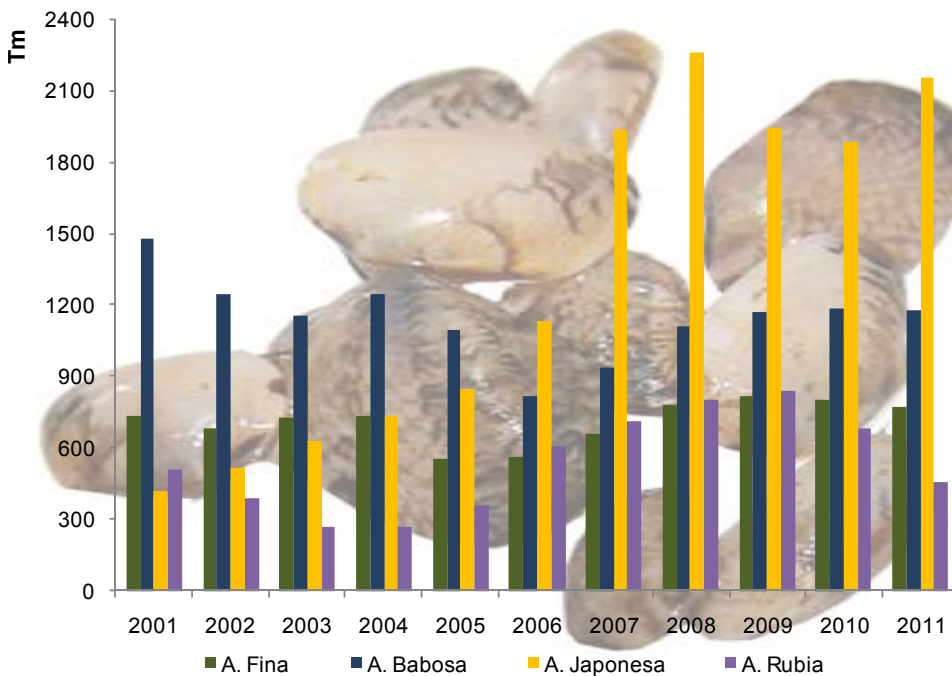


Fig. 1.6. Producción anual de las diferentes almejas comercializadas en Galicia.

Si nos fijamos en el precio medio anual que estas almejas alcanzaron en lonja (Fig. 1.7) desde el año 2001, la almeja fina es, con diferencia, la que alcanza los máximos precios aunque desde el año 2005 se produce un descenso paulatino; el valor medio anual más bajo de los últimos nueve años se sitúa por encima de 17 euros el kilo, en el 2009, aunque en años como 2005 y 2006, este valor medio se situó en los 28-30

euros/kg. La siguiente en cotización es la almeja babosa que se sitúa con valores entre 11-15 euros/kg, el resto de las especies no llegan a los 10 euros/kg como media anual.

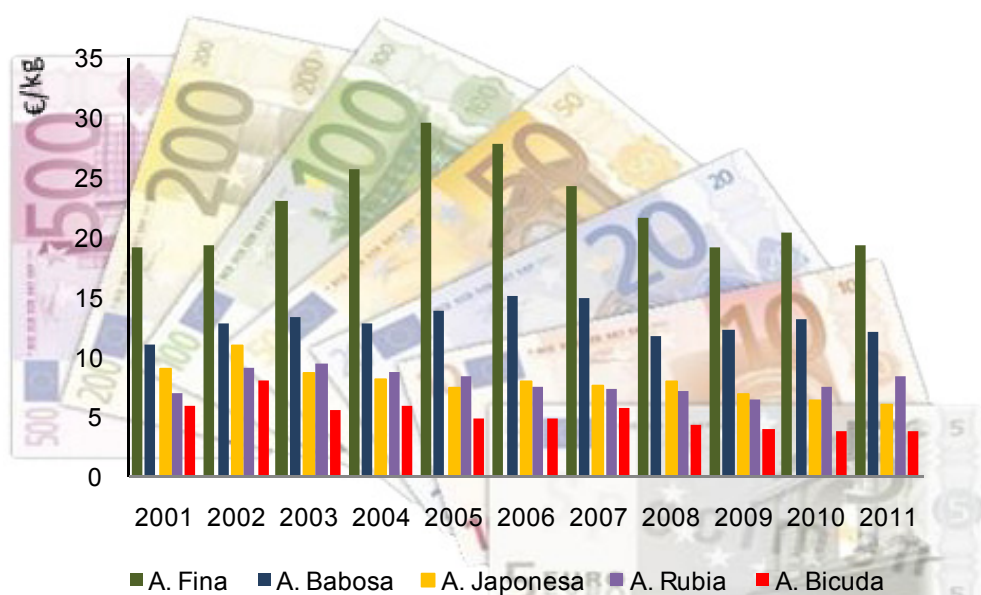


Fig. 1.7. Evolución del precio medio anual en lonja de las distintas especies comercializadas en Galicia.

Teniendo en cuenta las producciones y el precio medio por kg alcanzado en lonja, la especie que más volumen de negocio maneja al año es también la almeja fina, después la babosa y a partir del año 2006 la japonesa, debido al gran aumento de producción de esta especie (Fig. 1.8). Aunque como se vio en la gráfica anterior, la almeja bicuda mantiene un valor medio anual en lonja no demasiado inferior a otras especies como la almeja rubia o japonesa, pero debido a la baja producción de esta especie, el volumen de negocio es tan bajo (no llega a los 200.000 euros al año) que no se representa en la gráfica porque apenas se aprecia, al igual que ocurre en la gráfica de la producción.

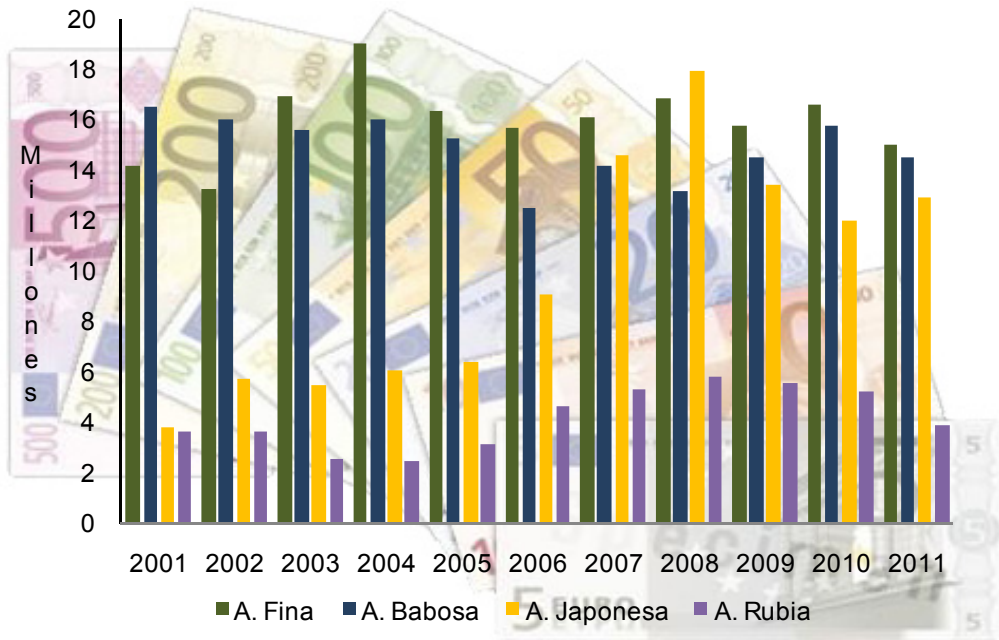


Fig. 1.8. Cantidad total de euros anuales movilizados en lonja para las cinco almejas comercializadas en Galicia.

Las lonjas que movilizan las mayores cantidades de almeja fina son: Campelo en la Ría de Pontevedra, Noia en la Ría de Muros-Noia y O Grove, Illa de Arousa, Vilanova y Cambados en la Ría de Arousa. Estas zonas producen en conjunto más del 57% de toda la almeja fina producida en Galicia. La mayoría de ellas mantienen una producción estable de este recurso. Fig. 1.9.

Destaca sobre todo el Campelo por el brusco descenso que sufre desde el año 2004, que pasa de ser la primera productora de toda Galicia consiguiendo ella sola más del 30% de toda la producción en los años 2001-2003, hasta ocupar el octavo y noveno lugar en la actualidad, representando su producción tan sólo el 3% entre el 2007-2009; el descenso sufrido en el año 2004 se debió a una mortandad masiva (90%) que sufrieron los bancos naturales debido a una infección por Perkinsus. Desde agosto del 2006 hasta febrero del 2009 tuvieron que cerrar algún banco natural como el de Placeres por zona "C" o el de Combarro por causa de las riadas. Los dos últimos años ha subido algo su producción aunque sin llegar a las cantidades de los años 2001-2003, debido también al aumento de las capturas de almeja japonesa que aprovechó el descenso de la almeja fina para acaparar sus hábitats desplazando a ésta última.

Por el contrario la zona de Noia desde el año 2003 experimenta un aumento en sus capturas, en el año 2007 y sobre todo en el 2008 se observa un pico de extracción

representando el 28% de toda Galicia, siendo esto un hecho puntual ya que del 2009 en adelante se vuelve a las producciones que presentaban antes de este pico.

En la figura 1.9 se representa la evolución que ha sufrido la producción de almeja fina en las seis localidades antes mencionadas.

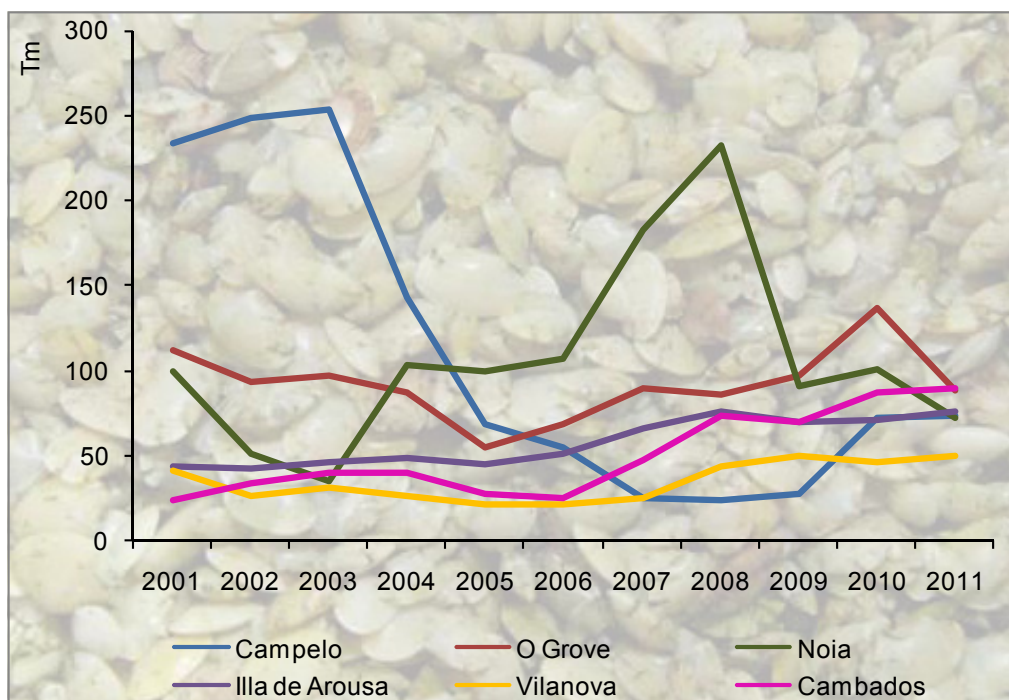
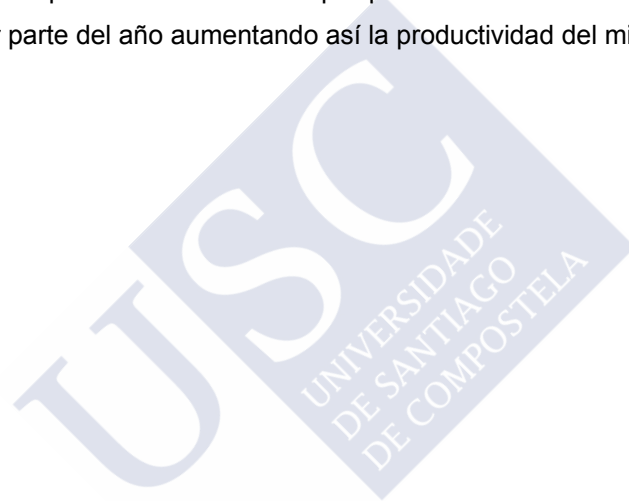


Fig. 1.9. Evolución en la producción de almeja fina en seis localidades gallegas.

Para poder mantener o aumentar la producción, además de establecer vedas y topes de captura mediante los Planes de Explotación, es importante poder contar con aporte de semilla cultivada en criadero, suficiente para garantizar una buena explotación del recurso. El coste de producción de la semilla es elevado, debido principalmente al mantenimiento de las instalaciones de un criadero y a la necesidad de producir microalgas para alimentar a los moluscos en todas sus fases (adultos, larvas y semilla), esta producción de microalgas representa uno de los principales costes de explotación de los criaderos industriales de bivalvos (Persoone y Claus, 1980; De Paw, 1981), lo que conlleva que el precio de venta de la semilla sea alto, sobre todo para la almeja fina debido a los problemas intrínsecos que plantea su cultivo si se compara con otras especies como la almeja babosa o japonesa. En Galicia, aparte de los criaderos privados que pueden ofertar semilla, algunas cofradías como la de Noia ya

se plantean tener su propio suministro de semilla contando con un criadero propio, con lo cual se evitan también los problemas derivados de la importación de semilla de otros países.

Para un criadero que se dedique a la producción de semilla de bivalvos, es importante que la especie con la que trabaje pueda producir gametos el mayor tiempo posible a lo largo del año. En especies como la almeja fina, cuyo período de desove es estacional y concentrado en unos pocos meses (de mayo a agosto), es muy interesante el acondicionamiento de los reproductores. Acondicionar reproductores significa estabularlos bajo unas condiciones determinadas dentro del criadero para conseguir su maduración sexual y la obtención de desoves fuera de su época natural, ampliando así el tiempo de disponibilidad de larvas que permitan tener cultivos en el criadero durante la mayor parte del año aumentando así la productividad del mismo.







## OBJETIVOS

---



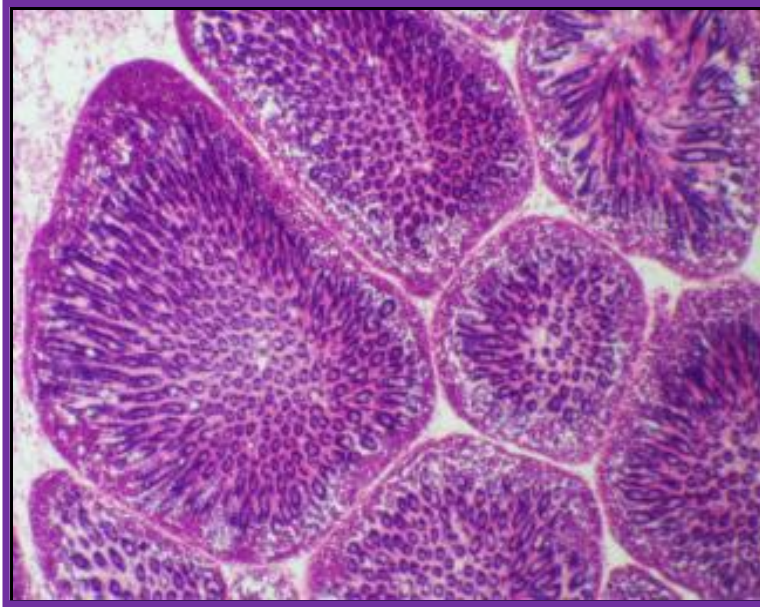
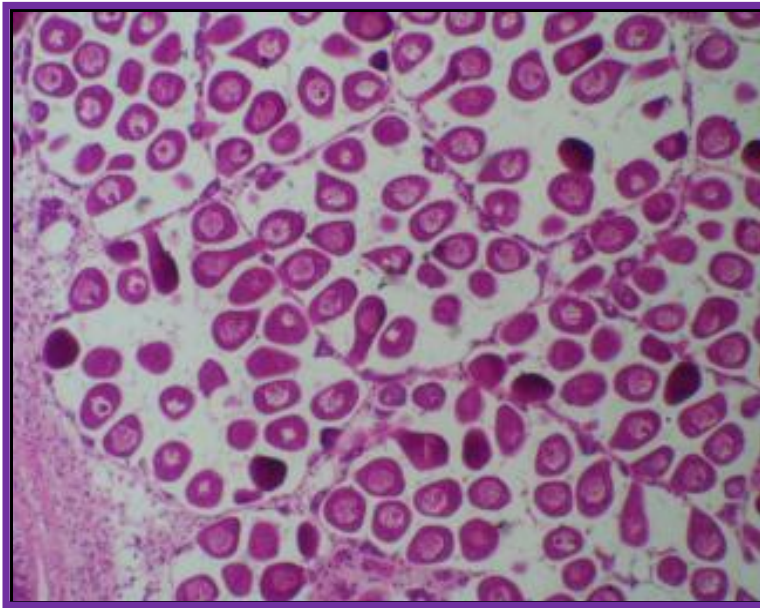
## 2.- OBJETIVOS

El objetivo fundamental de esta tesis es optimizar el proceso de acondicionamiento en criadero de la almeja fina, *Ruditapes decussatus*, para poder estandarizar el proceso e intentar conseguir larvas la mayor parte del año, para su cultivo hasta semilla de un tamaño adecuado y poder disponer de ésta para su siembra en el medio natural, en diferentes épocas del año. Los experimentos a realizar se harán trabajando con volúmenes similares a los criaderos industriales para que los resultados puedan ser válidos para su aplicación en este tipo de criaderos.

Se tratará de conseguir este objetivo final a través de los siguientes objetivos parciales:

- Seguimiento de la población de origen de los progenitores en su medio natural para establecer su patrón anual de desarrollo gonadal: para ello se establecerá su ciclo gametogénico mediante un estudio histológico y de composición bioquímica de la gónada-masa visceral. Esto nos permitirá disponer de un patrón al que referir los resultados obtenidos a través de la manipulación que se realiza durante el acondicionamiento.
- Estudiar el acondicionamiento de esta especie en criadero, atendiendo sobre todo a la influencia de dos factores externos importantes: el efecto de la temperatura y de la ración del alimento durante el proceso de acondicionamiento, sobre el desarrollo gametogénico.
- Transferir los conocimientos adquiridos en el desarrollo de esta tesis a los criaderos, con el fin de que puedan mejorar y optimizar la producción de semilla.





CICLO REPRODUCTIVO EN EL MEDIO  
NATURAL

---



### 3.- CICLO REPRODUCTIVO EN EL MEDIO NATURAL

#### 3.1.- INTRODUCCIÓN

El conocimiento del ciclo reproductivo de las especies es un aspecto fundamental en acuicultura para poder mejorar los métodos de cultivo en criadero. El ciclo gametogénico en los bivalvos suele ser anual y está influenciado por factores exógenos y endógenos; el factor exógeno más importante es la temperatura y ésta, está íntimamente asociada con la localización geográfica. Es importante conocer las distintas fases del ciclo gametogénico (inicio, maduración, puesta y período de reposo) así como la actividad metabólica de sus tejidos de reserva y almacenamiento.

La actividad metabólica estacional en los moluscos depende de complejas interacciones entre la disponibilidad de alimento, las condiciones ambientales, el crecimiento y la reproducción (Gabbott, 1983). Los bivalvos marinos presentan ciclos estacionales de almacenamiento y utilización de la energía (ciclos bioquímicos) que están estrechamente relacionados con la actividad reproductiva (Giese, 1969; Bayne, 1976; Gabbott, 1976, Sastry, 1979; Barber y Blake, 1981, 1985). En general, la energía se almacena antes de la gametogénesis, cuando la comida es abundante en forma de hidratos de carbono, lípidos y proteínas. Bayne (1976) muestra que los ciclos de almacenamiento de energía y la producción de gametos pueden estar ligados en el tiempo (*Cardium edule*, *Chlamys septemradiata* y *Tellina tenuis*) o separados (*Macoma balthica*, *Mytilus edulis* y *Pecten maximus*). Mackie y Ansell (1993) dicen que los factores ambientales juegan un papel principal en los ciclos de almacenamiento.

Varios investigadores han descrito los ciclos gametogénicos determinando la duración y distribución en el tiempo de las distintas fases (reposo, actividad gametogénica, madurez y desove) de diferentes especies en distintas áreas geográficas. El estudio del ciclo se puede hacer en base al cálculo de los Índices de Condición y/o del estudio histológico y estereológico de la gónada: como han hecho en la almeja japonesa (*Ruditapes philippinarum*), Holland and Chew, 1974, en EEUU; Sbrenna y Campioni, 1994 y Meneghetti *et al.*, 2004, en Italia; Drummond *et al.*, 2006 en Irlanda; en el mejillón (*M. edulis*), Lowe *et al.*, 1982 en Inglaterra; en *Mercenaria mercenaria* y *Crassostrea virginica* Heffernan *et al.*, I y II, 1989 en Georgia; en *Cerastoderma glaucum*, Derbali *et al.*, 2009, en Túnez; en la almeja rubia, *Tapes rhomboides*, Morvan y Ansel, 1988, en Francia y Yamuza-Clavijo *et al.*, 2010 en España; en *Chamelea*

*gallina*, Rodríguez de la Rúa *et al.*, 2003 en España; en *Solen marginatus*, López *et al.* y Remacha-Triviño, 2005 en España; en *Ensis siliqua* y *Venus striatula* (Gaspar y Montero, 1998) en Portugal. También se determina el ciclo reproductor por el estudio de las variaciones de los componentes bioquímicos (proteínas, lípidos y carbohidratos) a lo largo del mismo: Beukema y De Bruin, 1977 en la especie *Macoma balthica*, y Zandee *et al.*, 1980 en *M. edulis*, en Holanda; *C. edule* (Navarro *et al.*, 1989) en España; Joaquim *et al.*, 2011 en almeja babosa, *Venerupis senegalensis*, en Portugal.

En Galicia se han hecho estudios de ciclo gametogénico de varias especies de bivalvos de interés comercial como Solénidos (Rodríguez Moscoso *et al.*, 1996; Martínez-Patiño *et al.*, 1997; Martínez-Patiño, 2002; Darriba *et al.*, 2004); Pectínidos (Pazos *et al.*, 1996; Román *et al.*, 2002; De La Roche Cadavid, 2009); Mitílidos (Ferrán *et al.*, 1990; Villalba, 1995); Donácidos (Martínez-Patiño *et al.*, 1993; Louzán, 2008); Ostreidos (Fernández-Castro y Mattio, 1987; Ruíz *et al.*, 1992; De La Parra Valenzuela, 2004); Gliciméridos (Rodríguez-Moscoso *et al.*, 2007) y diferentes especies de almejas como *R. philippinarum*: Gimeno *et al.*, 1990; Rodríguez-Moscoso *et al.*, 1992; Ojea *et al.*, 2005; *V. pullastra*: Villalba *et al.*, 1993a; Jara-Jara *et al.*, 2000; Cerviño-Otero 2011 y *V. rhomboides*: Villalba *et al.*, 1993a; Cerviño-Otero *et al.*, 2012.

La almeja fina tiene un alto valor comercial en Galicia y es una de las especies de moluscos más consumidos en el mundo. Debido a su considerable importancia económica y a la alta demanda en los mercados, se ha producido una sobreexplotación en los bancos naturales, por lo cual se hace necesario promover su cultivo. El cultivo intensivo de este bivalvo está claramente limitado por la disponibilidad de semilla, por eso es muy importante el conocimiento de su ciclo reproductor para mejorar la producción de la misma en los criaderos.

Esta especie es abundante en la costa europea y el mediterráneo y diferentes investigadores han descrito las fases de su ciclo gametogénico en varias localidades: Shafee y Daoudi, 1991, en Marruecos; Urrutia *et al.*, 1999 en el País Vasco (España); Hamida, L., 2004 en Francia; Chryssanthakopoulou y Kaspiris, 2005 en Grecia; Smaoui-Damak *et al.*, 2007 en Túnez; Serdar *et al.*, 2010 en Turkía.

Otros autores además de describir las fases del ciclo gametogénico, estudian las variaciones de la composición bioquímica a lo largo del ciclo: Serdar y Lök, 2009; Aníbal, J. *et al.*, 2011 en Portugal. En la costa gallega los trabajos que se han hecho del ciclo reproductor de *Ruditapes decussatus* están localizados en poblaciones

naturales en la Ría de Arousa (Pontevedra): Villalba *et al.*, 1993a; Pérez Camacho *et al.*, 2003; Rodríguez Moscoso, 2000; Blanco, M.J. 2010.

En este capítulo se estudia el ciclo reproductivo de una población natural de almeja fina en las Lagunas de Baldaio (A Coruña). El lugar de muestreo fue elegido porque presentaba unas buenas condiciones medioambientales desde el punto de vista sanitario, y no se han detectado infecciones parasitarias en la población de almejas. Con los individuos muestreados, se determina su biometría y se calculan varios Índices de Condición. Se realiza el estudio histológico de la gónada, para determinar cómo se distribuyen a lo largo del año las diferentes fases del desarrollo gonadal y se estudian los cambios estacionales en la composición bioquímica (carbohidratos, proteínas y lípidos) de varias partes del cuerpo, en relación con el ciclo gametogénico. Este estudio permite la identificación de los lugares de almacenamiento de nutrientes y el uso de éstos durante la reproducción o durante los períodos en que escasea el alimento.

En este trabajo también se determina la composición en ácidos grasos de la gónada-masa visceral, porque éstos tienen un papel determinante en el proceso de la gametogénesis. Los lípidos tienen dos funciones fundamentales en el metabolismo: como reserva de energía, en forma de triacilgliceroles (lípidos neutros), y como componentes estructurales de las células y membranas en forma de fosfolípidos (lípidos polares), pero también, en algunos casos, los fosfolípidos pueden ser utilizados como reserva energética para los ovocitos. Analizar cada fracción por separado, permite una interpretación fisiológica de las variaciones en la composición de ácidos grasos mucho más reveladora que cuando se realiza sobre los lípidos totales (Beninger y Lucas, 1984). Existen una serie de factores que van a influir sobre la composición de los lípidos en los organismos marinos. Hay factores endógenos como la edad y la reproducción y factores exógenos como la salinidad, temperatura y nutrición.

El conocimiento del papel específico de los distintos compuestos bioquímicos en diferentes tejidos, así como la determinación de su función en la reproducción, ayudará en los criaderos a determinar la mejor estrategia para producir elevadas cantidades de semilla.

## 3.2.- MATERIAL Y MÉTODOS

### 3.2.1.- Descripción de la zona de muestreo

La agrupación de mariscadores “Fonte de Santa Helena” realiza su actividad marisquera en las Lagunas de Baldaio, que están situadas en el litoral del Concejo de Carballo (A Coruña). La playa y marismas de Baldaio están situadas en un entorno rural, rodeadas de núcleos de población. Se pueden observar diversos ecosistemas: la playa, formaciones dunares, las lagunas, las marismas y la junquera. La actividad marisquera en Baldaio tiene lugar en el entorno de las lagunas, situadas en la parte más oriental de la depresión posterior al cordón de dunas. Son dos lagunas y están separadas por un espigón artificial (Fig. 3.1).

La laguna exterior tiene forma rectangular y ocupa una superficie aproximada de 500.000 m<sup>2</sup>. Su capacidad varía sensiblemente con el régimen de mareas. Presenta dos zonas de desagüe, una por la que se establece contacto a través de un canal principal con mar abierto y otra por la que se comunica con la laguna interior. Ésta, con una forma casi triangular, ocupa una extensión menor que la exterior y presenta una menor renovación del agua.



*Fig. 3.1. Vista general de las Lagunas de Baldaio (A Coruña).*

### 3.2.2.- Condiciones medioambientales

El clima de la zona no supone un factor limitante para la actividad marisquera, la temperatura media anual es de 12,4°C y la precipitación media anual es de 1.231,5 mm. Los datos de la temperatura del agua, la salinidad y la concentración de clorofila *a*, fueron suministrados por el INTECMAR, Instituto Tecnológico do Medio Mariño, (Consellería do Medio Rural e do Mar, Xunta de Galicia), (Fig. 3.2). La temperatura mensual media varía desde 11,4°C en enero a los 23,4°C en junio. Las variaciones estacionales en la clorofila *a* son similares a las variaciones en temperatura y se alcanzan concentraciones máximas en junio de 3,2 µg/l. La salinidad fluctúa entre un mínimo de 29 en el mes de diciembre y un máximo de 36‰ en el mes de agosto.

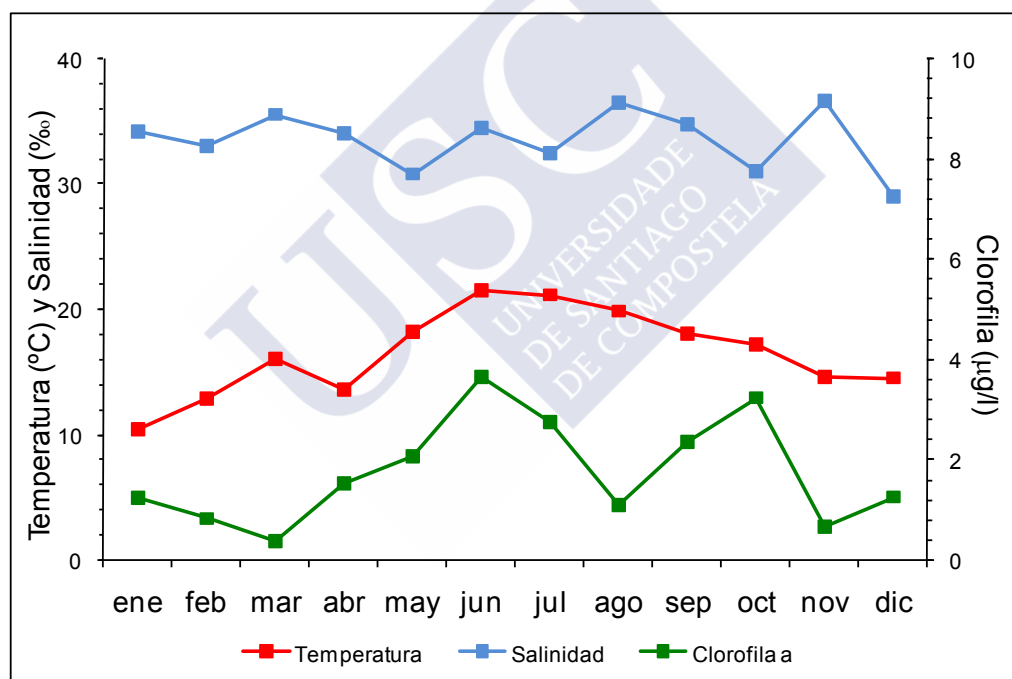


Fig. 3.2. Variaciones mensuales de la temperatura del agua, la salinidad y la concentración de clorofila *a* en las Lagunas de Baldaio.

### 3.2.3.- Datos biométricos

Las almejas se recogen en el medio natural con una periodicidad mensual durante 15 meses, desde octubre a diciembre del siguiente año; una vez recogidas, se separa una muestra de diez individuos y en primer lugar se determinan varios parámetros biométricos: longitud o eje antero-posterior, altura o eje dorso-ventral, grosor o eje

lateral y peso fresco total. Seguidamente se abren las almejas y se obtiene el peso fresco de la concha y el peso fresco de la vianda. A continuación se diseccionan las almejas separando las siguientes partes (Figura 3.3): branquias, músculos aductores, pie, reborde muscular del manto, sifones y gónada-masa visceral que incluye el aparato digestivo, palpos labiales, ganglios nerviosos y región renopericárdica.

La gónada-masa visceral fue analizada como una unidad por la dificultad física de separar los dos órganos. Se obtiene el peso fresco de cada una de las partes. Una vez que se obtienen estos datos, la concha se deja en estufa a 100°C durante 24 horas para poder obtener su peso seco; las partes blandas se congelan a -80°C para posteriormente liofilizarlas y obtener el peso seco de cada parte diseccionada. La suma de todas ellas nos da el peso seco total de la vianda.

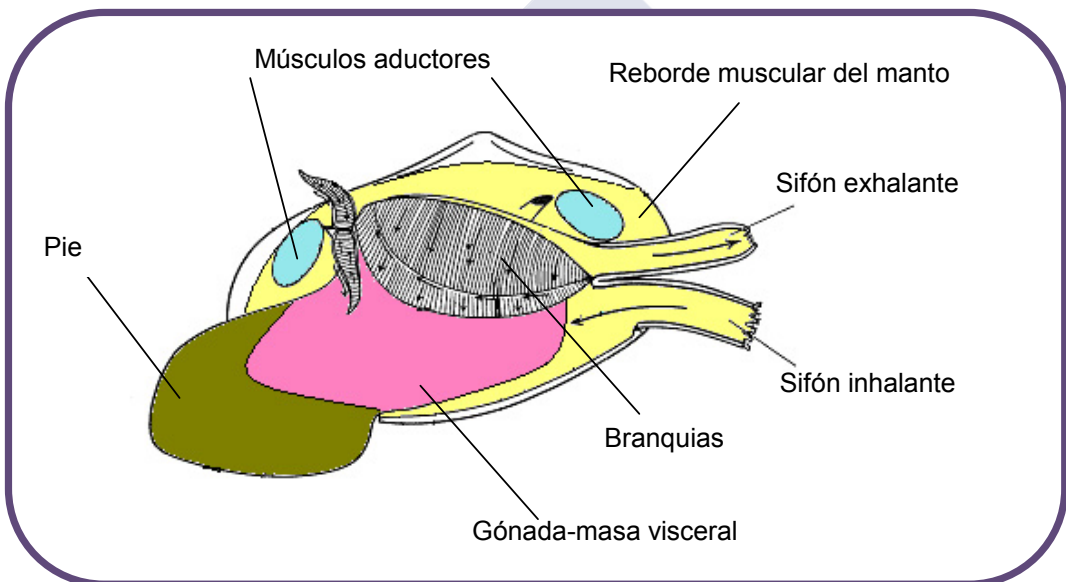


Fig. 3.3. Esquema de la anatomía interna de una almeja fina, mostrando las partes en que se disecciona.

### 3.2.4.- Índices de Condición

Con los datos biométricos antes obtenidos, se calculan los siguientes Índices de Condición:

Índice de Condición poblacional (ICF) de acuerdo con la fórmula de Ansell, Loosmore y Lander (1964), que relacionan el peso fresco de la vianda (PFV), con el peso total del animal (PTF).

$$\text{ICF} = \text{PFV} / \text{PFT} \times 100$$

Con los datos de los pesos secos se calculan otros dos Índices de Condición:

ICS descrito por Walne (1976) y Benninger y Lucas (1984), entre otros, que relaciona el peso seco de la vianda (PSV), con el peso seco de la concha (PSC).

Índice de Condición gonadal, ICG que relaciona el peso seco de la gónada-masa visceral (PSG), frente al peso seco de la vianda (PSV).

$$\text{ICS} = \text{PSV} / \text{PSC} \times 100$$

$$\text{ICG} = \text{PSG} / \text{PSV} \times 100$$

### 3.2.5.- Determinación del animal estándar

El animal estándar de la población es un individuo teórico que se determina para discriminar las variaciones en peso debidas al crecimiento de aquéllas imputables al ciclo gametogénico. El cálculo se realiza a partir de valores medios del peso fresco total registrados mensualmente durante el período de estudio, obteniéndose así, una primera estandarización que establece un individuo medio poblacional con un peso fresco total teórico. A este individuo le son aplicados los porcentajes de los valores hallados en cada muestreo para el individuo medio y también los obtenidos para cada una de las partes en que éste se disecciona. En esta segunda estandarización se obtienen los valores medios de los pesos frescos y secos del individuo estándar total y de las correspondientes partes en que fue diseccionado.

### 3.2.6.- Métodos histológicos

Una vez que se obtiene el dato del peso fresco de la gónada-masa visceral, se divide ésta longitudinalmente y una de las partes se utiliza para la determinación del ciclo gametogénico.

Se introduce el tejido gonadal en fijador "Davidson" de 24 a 48 horas, dependiendo del tamaño de las piezas. A continuación se ponen las muestras en un procesador de tejidos que las someten a una serie de deshidrataciones en etanol de diferente

graduación, desde 70° hasta absoluto, el siguiente paso sería un par de baños en xileno, para terminar en parafina.

Posteriormente las muestras se incluyen en bloques de parafina como paso previo a la realización de cortes en un microtomo de un grosor entre 5 y 7 micras. Cuando los cortes del tejido gonadal están ya fijados en un portaobjetos, se procede a su tinción para poder observar en el microscopio el estado de desarrollo gonadal. La tinción usada es hematoxilina-eosina y, una vez que están teñidas, se montan usando "Histomount" como revelador.



La determinación del ciclo gametogénico se hace por observación de los cortes en un microscopio óptico y siguiendo una escala cualitativa basada en la descrita por Wilson y Seed, 1974, pero con algunas modificaciones. Se diferencian seis estadios en el desarrollo gonadal:

**Estadio E0:** de reposo sexual, donde el sexo no se puede distinguir, la gónada está compuesta sobre todo por tejido conectivo y no se observan folículos.

**Estadio E1:** inicio del desarrollo gametogénico, aparecen folículos con células germinales adheridas a las paredes, hay abundancia de células vesiculares y musculares consideradas en la almeja fina como lugares de almacenamiento de reservas (Medhioub, 1986). El sexo es difícilmente determinable.

**Estadio E2:** desarrollo gametogénico, en los folículos masculinos aparece una larga banda centrípeta de espermatogonias, espermatocitos y espermátidas, con algunos espermatozoides libres en el lumen, en los folículos femeninos los ovocitos acumulan vitelo, los ovocitos jóvenes están pegados al contorno folicular, pero ya hay algunos maduros libres en el lumen.

**Estadio E3:** madurez morfológica, los folículos ocupan casi toda la superficie de la gónada, recubriendo así el tejido conjuntivo, en los machos aparecen los folículos con

células germinales por la parte externa, los espermatozoides están en todo el folículo en disposición radial o formando bandas alargadas; las hembras presentan ovocitos pedunculados, células jóvenes pegadas a la pared folicular que se van a ir desarrollando y también hay algunos ovocitos libres en el lumen.

**Estadio E4:** puesta, en los machos los espermatozoides pierden su disposición radial y la densidad de los folículos disminuye, en las hembras los ovocitos toman una forma esférica y se empiezan a ver lugares vacíos en los folículos.

**Estadio E5:** puesta reciente o postpuesta, los folículos se deshacen y degeneran, aparecen restos de gametos y los amebocitos atacan los gametos no expulsados, el animal entra en reposo sexual.

### 3.2.7.- Métodos bioquímicos

#### 3.2.7.1.- Determinación de proteínas

La determinación de las proteínas se hace por el método espectrofotométrico de Lowry (Lowry *et al.*, modificado (1951)) con la seroalbúmina bovina como estándar.

#### Reactivos utilizados

- Reactivo 1: preparado extemporáneamente con: 25 volúmenes de NaOH, 0,8M; 18 volúmenes del reactivo A (0,2 g de tartrato disódico, 10 g de carbonato sódico y 69 ml de NaOH, 0,8M enrasados a 100 ml de agua Milli-Q) y 2 volúmenes del reactivo B (2 g de tartrato disódico, 1 g de sulfato de cobre II y 12,5 ml de NaOH, 0,8M enrasados a 100 ml de agua Milli-Q)
- Reactivo 2: preparado de forma extemporánea mezclando en las proporciones 1:2 (V/V) el reactivo del fenol (Folin-Ciocalteu) y agua Milli-Q

#### Procedimiento

En tubos de ensayo se pesan por duplicado entre 1 y 2 mg de muestra liofilizada y pulverizada. Se hidrolizan con NaOH, 5N y agua destilada en un sonicador. La reacción tiene lugar en un baño de agua a 56°C durante 30 minutos.

Se agitan y centrifugan para decantar los restos del tejido. Del sobrenadante se recogen por triplicado 100 microlitros para pasarlos a viales eppendorf, donde se añaden los reactivos: 450 microlitros del reactivo 1 y 600 microlitros del reactivo 2.

Se realiza una agitación intensa para favorecer la reacción, se deja en oscuridad durante 45 minutos y posteriormente se leen las absorbancias en un espectrofotómetro a 750 nm.

#### Recta de calibración

El rango de concentraciones empleado para la construcción de la recta de calibración es de 5 a 30 microgramos del estándar de seroalbúmina bovina disueltos en un volumen de 100 microlitros de agua destilada desionizada. El número de concentraciones diferentes fue de seis, siendo el número de réplicas de cada concentración de 3.

#### 3.2.7.2.- Determinación de carbohidratos

Los carbohidratos se analizan por el método espectrofotométrico del reactivo de antrona (Fraga, 1956), usando la glucosa como estándar. Sin diferenciar azúcares libres y glucógeno; se cuantifica el resultado en términos de glucosa total. Es un método colorimétrico basado en la reacción de Dreywood (1946), que es específica de carbohidratos.

#### Reactivos utilizados

- Ácido sulfúrico  $\text{SO}_4\text{H}_2$
- Antrona  $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{O}$

Para preparar el reactivo de antrona se disuelven 0,17 g de antrona en 100 cc de ácido sulfúrico al 84%.

- Hidróxido de potasio KOH en pastillas
- Ácido benzoico  $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_2$
- El estándar utilizado fue: D (+) glucosa anhidra

### Procedimiento

Se pesan por duplicado entre 2-3 mg de muestra liofilizada y pulverizada en tubos de ensayo, se añaden 2 ml de hidróxido de potasio 3N y se homogeneiza en un sonicador durante 30 segundos. La reacción de hidrólisis se lleva a cabo en un baño de agua a 90°C, durante una hora. Se deja enfriar y después se neutraliza con ácido sulfúrico 1N, se agita y se centrifuga durante 10 minutos a 2.000 rpm.

Del sobrenadante (que es donde están los carbohidratos disueltos) se pipetea 3 alícuotas de 1 ml para tubos de ensayo y se someten a la reacción de la antrona, añadiendo 5 ml del reactivo a cada tubo. A continuación se introducen los tubos en un baño de agua a 90°C durante 16 minutos con agitación continua. Se retiran del baño, se dejan enfriar y se leen en el espectrofotómetro a 625 nm.

### Recta de calibración

Se hace empleando como estándar la glucosa. Se prepara el patrón madre disolviendo 300 mg de glucosa sólida en 100 ml de ácido benzoico. A partir de él se preparan los patrones, conteniendo diferentes concentraciones de glucosa.

El rango de concentraciones empleado para la elaboración de la recta fue de 15 a 105  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . El número mínimo de concentraciones diferentes fue de cuatro, siendo el número de réplicas de cada concentración de tres.

### 3.2.7.3.- Determinación de lípidos

Para la determinación de los lípidos totales primero se extraen de los tejidos, según el método clásico de Folch *et al.* (1957), con las modificaciones de nuestro laboratorio y después se determinan por un método gravimétrico.

### Reactivos utilizados

- Cloroformo
- Metanol
- Cloruro sódico

Procedimiento

En tubos de centrifuga se pesan 200 mg de tejido liofilizado y pulverizado haciendo dos réplicas por muestra. Se añade a cada tubo 4 ml de cloroformo-metanol (2:1), se sonica durante dos minutos y se centrifuga; el sobrenadante (que es donde están disueltos los lípidos) se echa en un tubo y esta operación se repite tres veces más para extraer todos los lípidos del tejido.

Para separar los lípidos se utilizan ampollas de decantación. En cada una de ellas se echa el contenido de un tubo, se añade cloruro sódico (0,6%), se agitan muy bien las ampollas y se dejan 24 horas. El contenido de las ampollas está separado en dos fases, se recoge la inferior que corresponde a la fracción lipídica. Se vuelve a echar en las ampollas 16 ml de cloroformo metanol y 4 ml de cloruro sódico, se agita enérgicamente y se deja reposar entre 2-3 horas, después de este tiempo se recoge otra vez la fracción lipídica.



Se separan los lípidos del cloroformo-metanol por evaporación. Se redisuelven en cloroformo y se determina el contenido de lípidos, pesando tres alícuotas de 300 microlitros antes y después de evaporar el cloroformo.

#### 3.2.7.4.- Determinación de ácidos grasos

Para la determinación de los ácidos grasos se sigue en general el método empleado por Marty *et al.* (1992).

Reactivos utilizados

- Gel de sílice 60
- Boro-trifluoruro-metanol (15%)
- Disulfuro de carbono
- Hexano

- Como estándares se utilizó una mezcla de 37 ácidos grasos metilados y como patrón interno el ácido tricosanoico (C23:0)

### Procedimiento

Del total de lípidos extraídos según el apartado anterior, en primer lugar se realiza la separación de lípidos neutros (triglicéridos y esteroides) y lípidos polares (glucolípidos y fosfolípidos). El **método de separación** consiste en una **cromatografía de adsorción** empleando como fase estacionaria gel de sílice (se usa como soporte sólido una pipeta Pasteur rellena de este gel) previamente incinerada a 450°C durante 24 horas e hidratada al 6% con agua Milli-Q. Se extraen los lípidos mediante el empleo de fases móviles (solventes de distinta polaridad).

Los lípidos se retiran secuencialmente: primero se usa como fase móvil cloroformo/metanol (2%) para la extracción de lípidos neutros y segundo, metanol para la extracción de lípidos polares.

La **identificación y cuantificación** de los ácidos grasos se hace por **cromatografía de gases**, previamente esterificados. La esterificación les proporciona un grupo metilo que les confiere una menor polaridad y una mayor volatilidad.

La **transesterificación** se lleva a cabo empleando trifluoruro de boro-metanol (20%) durante 10 minutos en baño a 100°C. (Metcalf y Schmitz, 1961). Una vez esterificados, se extraen con disulfuro de carbono.

Los ácidos grasos metilados se pueden identificar y cuantificar por **cromatografía de gases** utilizándose una columna HP-Innowax (30 m x 0.25 mm DI, y 0,25 micras de espesor), y empleando un cromatógrafo de gases HP-6890 series con inyector split/splitless, un detector de ionización de llama (FID), gas vector hidrógeno y una rampa de temperatura programada.



Condiciones cromatográficas: la temperatura del inyector fue de 220°C; la temperatura de la columna se mantuvo a 60°C durante un minuto después de la inyección y se incrementó con un rango de subida de 50°C por minuto hasta 150°C, en esta temperatura se mantuvo durante 2 minutos, a partir de los cuales se vuelve a subir paulatinamente a razón de 3°C por minuto hasta alcanzar 240°C, manteniéndose en esta temperatura durante 20 minutos.

Los picos obtenidos se identifican comparando sus tiempos de retención con un patrón estándar (Sigma Chemical 189-19), consistente en una mezcla de 37 ácidos grasos metilados y además se utilizan extractos lipídicos de tres microalgas (*Paulova lutheri*, *Skeletonema costatum* e *Isochrysis aff. galbana*, clon T-iso) cuyas composiciones en ácidos grasos son conocidas (Delaunay, 1992).

#### Recta de calibración

La cuantificación de los distintos ácidos grasos se hace mediante sus rectas de calibración, empleando para ello, la mezcla de ácidos grasos del patrón estándar a distintas concentraciones. Se determinaron a partir de la inyección por duplicado de 50; 125; 250 y 500 ng de dicho patrón diluido en hexano.

Además se hace necesaria la utilización de un ácido graso elegido como patrón interno (ácido tricosanoico, C23:0), que no se encuentra presente en los organismos marinos.

Las analíticas se realizan por duplicado dando como resultado la media de los dos datos obtenidos. Los diferentes ácidos grasos se nombran de una forma abreviada con la siguiente fórmula: C: X (n-Y), donde C es el número de átomos de carbono, X es el número de dobles enlaces e Y es la posición del primer doble enlace contado desde el grupo metilo terminal.

### 3.2.8.- Métodos estadísticos

Para calcular la relación entre las medidas biométricas y la composición bioquímica con el ciclo gametogénico y las condiciones medioambientales se usó el coeficiente de correlación de Pearson. El análisis estadístico se llevó a cabo con la ayuda del programa informático SPSS.

### 3.3.- RESULTADOS

#### 3.3.1.- Datos biométricos

En la tabla III.1, se muestran los datos biométricos medios mensuales de la población estudiada. La talla media anual es de 47,14 mm de largo (eje antero-posterior) por 34,28 mm de alto (eje dorso-ventral); el peso fresco total medio de 24,37 gramos y el peso fresco de la víscera 5,42 g. La talla media mensual máxima se obtuvo en el muestreo de abril (largo: 52,82 mm; peso total: 33,27 g y peso víscera: 7,73 g) y la talla media mensual mínima se obtuvo en el muestreo de agosto (largo: 41,7 mm; peso total: 9,97 g y peso víscera: 3,95 g). El peso fresco de la concha representa por término medio el 55% del peso total del individuo. Todos los individuos muestreados están siempre por encima de la talla mínima legal (40 mm).

Tabla III.1. Datos biométricos mensuales de la población de almeja fina *Ruditapes decussatus* de Baldaio. M= media y D= desviación. El largo, alto y grosor se expresa en mm y los pesos (P) en g.

	LARGO		ALTO		GROSOR		PESO TOTAL		P.CONCHA		P.VÍSCERA	
	M	D	M	D	M	D	M	D	M	D	M	D
06-oct	48,79	4,84	34,92	3,42	23,27	2,53	26,47	7,98	14,31	4,53	6,98	2,02
29-oct	43,09	2,49	31,84	1,87	21,02	2,23	19,68	4,40	11,56	2,95	3,91	0,65
11-dic	45,56	3,94	32,97	1,99	21,85	1,36	22,29	4,24	12,53	2,08	5,29	1,32
11-feb	50,91	2,78	36,84	1,87	24,48	1,92	29,62	5,45	16,20	3,19	6,77	1,26
30-mar	50,57	1,83	36,11	1,22	23,80	1,25	27,78	3,69	14,97	2,32	6,44	1,12
26-abr	52,82	4,11	38,61	3,64	25,85	2,08	33,27	8,04	17,65	4,54	7,73	1,73
26-may	45,95	6,91	33,77	4,27	22,61	2,95	24,19	10,75	13,52	5,92	5,53	2,53
10-jun	43,99	4,47	32,15	2,87	21,46	2,36	20,83	6,02	11,96	3,22	4,43	1,32
24-jun	48,79	2,14	34,76	1,26	23,05	0,62	24,83	3,29	13,31	1,97	4,69	0,57
09-jul	45,37	2,88	33,73	2,30	21,59	1,56	20,85	4,50	11,19	2,65	5,34	0,95
07-ago	41,70	6,97	30,96	5,07	20,30	3,92	18,02	10,54	9,97	6,12	3,95	2,10
30-sep	47,11	3,23	33,94	1,75	22,79	1,38	23,35	3,67	12,73	2,15	5,16	0,89
15-nov	47,54	2,89	34,93	2,49	23,17	1,63	24,82	6,31	14,28	3,64	5,31	1,42
07-dic	47,86	4,17	34,36	2,69	23,01	1,97	25,16	6,07	14,14	3,54	4,40	1,55

## RESULTADOS

Las matrices de correlación de Pearson muestran una relación directa entre las medidas de la talla de las almejas (largo, alto y grosor) y los pesos (carne y concha frescos y secos) ( $P < 0.01$ ). Sin embargo no están relacionados significativamente con los Índices de Condición, excepto para el peso fresco y seco de la carne,  $P < 0,05$  y  $P < 0,01$ , respectivamente.

Los pesos frescos y secos de las diferentes partes en que se diseccionan las almejas, para el animal estándar se presentan en la tabla III.2. El peso fresco del pie está entre 0,28-0,57 g; el reborde entre 0,56-1,14 g; la gónada-masa visceral 1,21-2,48 g; el músculo 0,6-0,97 g; los sifones 0,62-1,26 g y las branquias 0,68-0,94 g. Los diferentes tejidos estudiados muestran un patrón similar de las variaciones, tanto del peso fresco como seco.

Tabla III.2. Evolución del peso fresco (PF) y seco (PS) expresado en g, para el animal estándar, en las diferentes partes en que se diseccionan las almejas. GON-MV: gónada-masa visceral.

	PIE		REBORDE		GÓNADA		MÚSCULO		SIFONES		BRANQUIAS	
	PF	PS	PF	PS	PF	PS	PF	PS	PF	PS	PF	PS
06-oct	0,57	0,14	1,14	0,32	1,74	0,45	0,78	0,18	1,26	0,31	0,94	0,17
29-oct	0,40	0,08	0,90	0,17	1,18	0,29	0,75	0,17	0,85	0,18	0,75	0,14
11-dic	0,44	0,12	1,13	0,23	1,55	0,44	0,84	0,23	0,98	0,23	0,83	0,20
11-feb	0,40	0,09	1,08	0,21	1,55	0,39	0,97	0,22	0,83	0,18	0,74	0,14
30-mar	0,33	0,07	1,02	0,19	1,76	0,41	0,94	0,20	0,83	0,19	0,77	0,15
26-abr	0,35	0,08	0,97	0,17	1,85	0,44	0,93	0,20	0,77	0,17	0,79	0,14
26-may	0,36	0,07	0,89	0,15	1,96	0,44	0,86	0,16	0,76	0,15	0,74	0,12
10-jun	0,35	0,07	0,88	0,14	1,81	0,40	0,83	0,16	0,63	0,13	0,68	0,11
24-jun	0,35	0,09	0,56	0,12	1,67	0,41	0,48	0,11	0,84	0,20	0,70	0,14
09-jul	0,35	0,08	0,95	0,17	2,48	0,57	0,93	0,18	0,96	0,20	0,78	0,13
07-ago	0,41	0,07	0,90	0,15	1,93	0,58	0,60	0,13	0,80	0,18	0,70	0,12
30-sep	0,34	0,08	0,97	0,18	1,44	0,36	0,88	0,19	0,96	0,22	0,79	0,14
15-nov	0,37	0,09	0,97	0,18	1,52	0,39	0,91	0,21	0,67	0,15	0,79	0,13
07-dic	0,28	0,07	0,82	0,14	1,21	0,29	0,62	0,15	0,62	0,14	0,71	0,12

La gónada con la masa visceral, es la parte que representa el mayor porcentaje en peso fresco respecto al peso fresco total de la vianda, con un valor medio del 31%. La parte que representa menos cantidad es el pie, con un valor medio del 7%. Las partes

restantes se corresponden con valores intermedios: 17% el reborde, 15% los sifones y los músculos aductores y 14% las branquias (Fig. 3.4). También es la gónada la parte que presenta mayores variaciones en su peso a lo largo del ciclo con una desviación media de 0,39. El pie es la parte de las almejas cuya proporción se mantiene más constante respecto al resto del cuerpo a lo largo del período muestreado, con una desviación media de 0,08. El reborde y el músculo presentan una desviación de 0,21 y 0,22, respectivamente y las branquias fluctúan menos con una desviación media de 0,14.

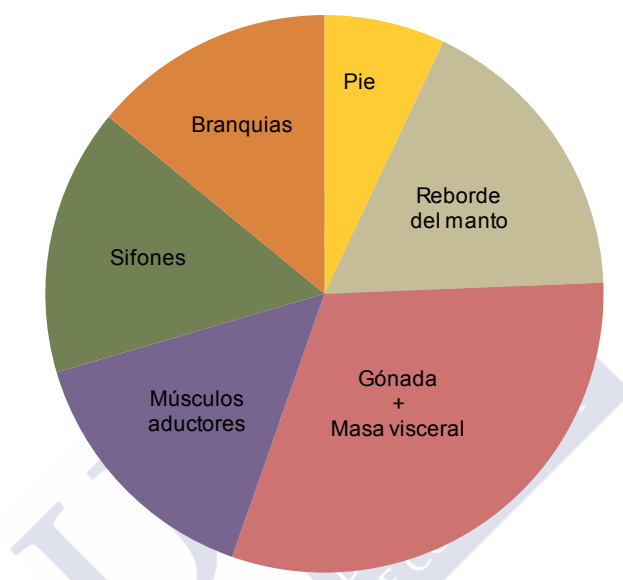


Fig. 3.4. Distribución proporcional del peso fresco de las diferentes partes en que se diseccionan las almejas, en relación al peso fresco total de la vianda.

### 3.3.2.- Índices de Condición

En la figura 3.5, se representan los tres Índices de Condición descritos en el apartado de Material y Métodos. El ICF, relaciona el peso fresco de la vianda con el peso fresco total (PFV/PFT), el ICS, relaciona el peso seco de la vianda con el peso seco de la concha (PSV/SC) y el ICG, relaciona el peso seco de la gónada con el peso seco de la víscera (PSG/PSV).

Los dos primeros tienen una evolución similar: al inicio de los muestreos (octubre del primer año), se parte de valores muy altos, 26,38% y 10,08% para el primer y segundo índice respectivamente; se produce una bajada muy importante en noviembre, pero a partir de diciembre, se estabilizan con unos valores medios que se mantienen altos durante el desarrollo gametogénico: para el ICF entre 22-23% y 8-9% para el ICS;

estos valores descienden en la madurez hasta valores en junio de 18,89% para el primero y de 6,83% para el segundo, se recuperan en julio, pero a partir de agosto los valores descienden coincidiendo con el desove masivo del verano y siguen bajando hasta los mínimos de diciembre (17,49% para el ICF y 5,58% para el ICS).

El Índice gonadal (ICG), presenta un ascenso gradual desde el primer muestreo en octubre (28,25%) hasta el máximo valor obtenido a primeros de agosto (47,5%). A finales de septiembre se observa un brusco descenso hasta el 31,25%, que indica el fin del período de desove.



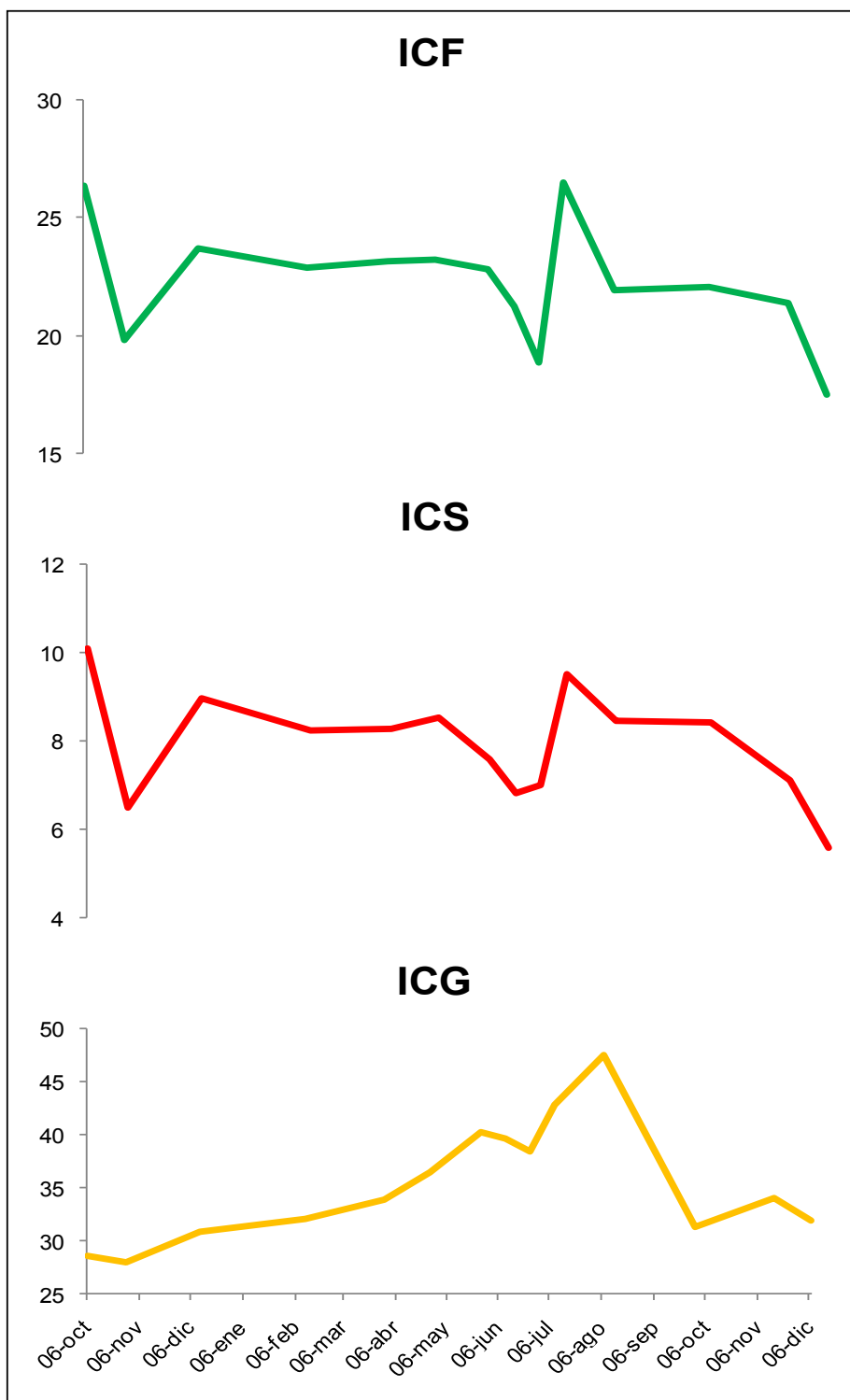


Fig. 3.5. Evolución de los Índices de Condición visceral con pesos frescos y secos (ICF, ICS) y gonadal (ICG).

### 3.3.3.- Ciclo gametogénico

El porcentaje de distribución observado para los diferentes estadios gametogénicos durante el período de estudio, se representa en la figura 3.6.

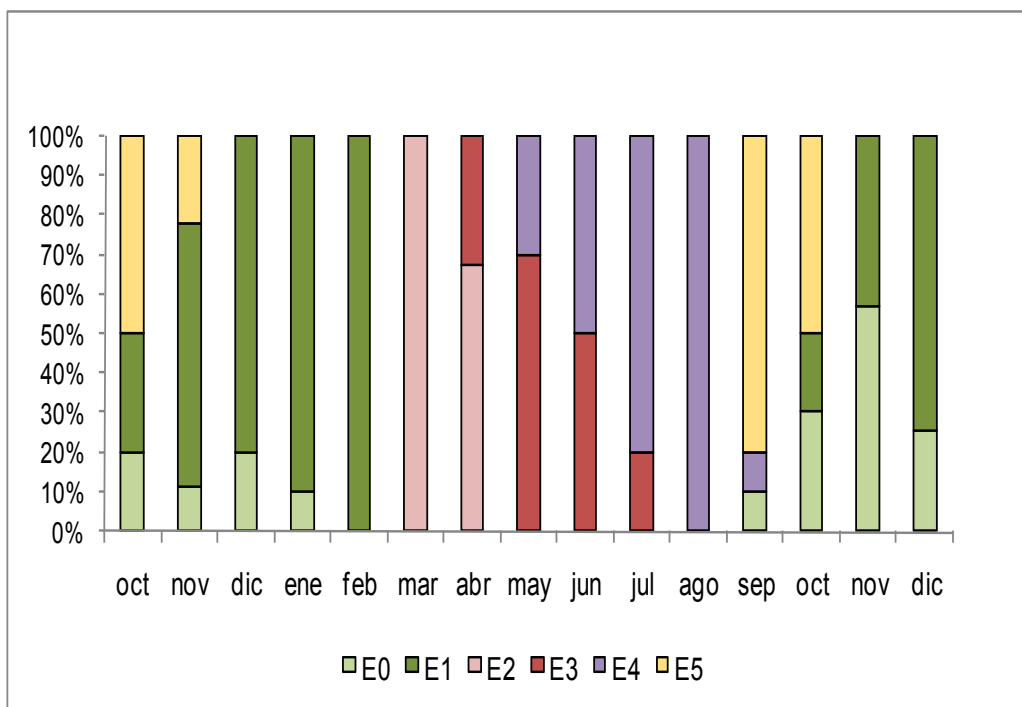


Fig. 3.6. Ciclo gametogénico de la población de *Ruditapes decussatus*, de un banco natural en la zona de Baldaio (A Coruña). E0= reposo; E1= inicio de la gametogénesis; E2= gametogénesis avanzada; E3= madurez; E4= puesta y E5= postpuesta.

La distribución de la población, según la fase del ciclo gametogénico en que se encuentran, no es algo que esté perfectamente definido y se suelen encontrar en el mismo mes almejas en diferentes estados gametogénicos, incluso hay diferencias para los mismos meses de un año a otro, esto es lógico ya que las condiciones medioambientales varían y éstas influyen en el desarrollo gonadal. Lo que sí podemos observar es una evolución en el tiempo del avance de este desarrollo. Así a partir del mes de septiembre las almejas entran en fase de reposo, se encuentran individuos en esta fase entre los meses de septiembre a enero; a partir del mes de octubre podemos encontrar también individuos que inician la gametogénesis (E1), va aumentando el porcentaje de individuos que se encuentran en esta fase hasta el muestreo del 11 de febrero (100%). El 30 de marzo todas las almejas diseccionadas están ya en una fase avanzada de desarrollo gonadal (E2). En abril comenzamos a ver los primeros individuos maduros (33%) y, a partir de mayo, se empiezan a encontrar individuos

parcialmente desovados. Durante el período de puesta (que dura hasta septiembre) se producen desoves parciales y las almejas pueden seguir produciendo gametos; a principios de agosto el 100% de las almejas están en fase de puesta. A finales de septiembre todavía se pueden encontrar un 10% de almejas que están desovando, pero el 80% de las almejas ya han desovado completamente y se encuentran en el estado de postpuesta; además se encuentra un 10% de la población entrando ya en reposo gonadal para recuperarse en el otoño y comenzar un nuevo ciclo.

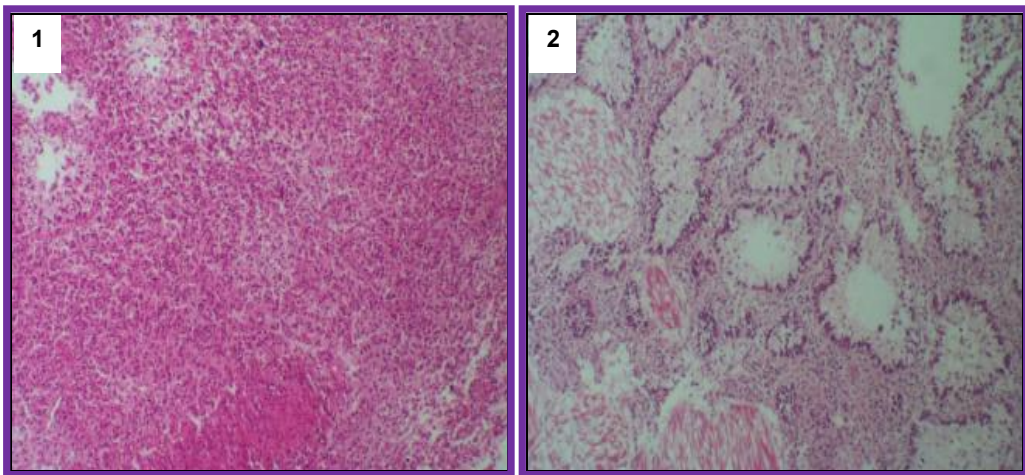
Resumiendo todo lo anterior, se pueden diferenciar dos etapas en el ciclo gonadal de la almeja fina en las Lagunas de Baldaio: una fase de reposo entre octubre y diciembre y otra de actividad gametogénica durante el resto del año, que incluiría la fase de puesta desde mayo a agosto (Figura 3.7).



Fig. 3.7. Distribución anual de la actividad gonadal.

Las siguientes fotografías: figura 3.8.A (1 y 2); 3.8.B (1 y 2); 3.8.C (1 y 2); 3.8.D (1 y 2) y 3.8.E (1 y 2), ilustran el estado de desarrollo gonadal a lo largo del ciclo gametogénico en las distintas fases.

En las fases de reposo sexual (E0) e inicio de la gametogénesis (E1) es muy difícil determinar el sexo de los individuos porque, o todavía no se han formado los folículos gonadales, o aunque se vean ya los folículos, las células germinales están indiferenciadas.

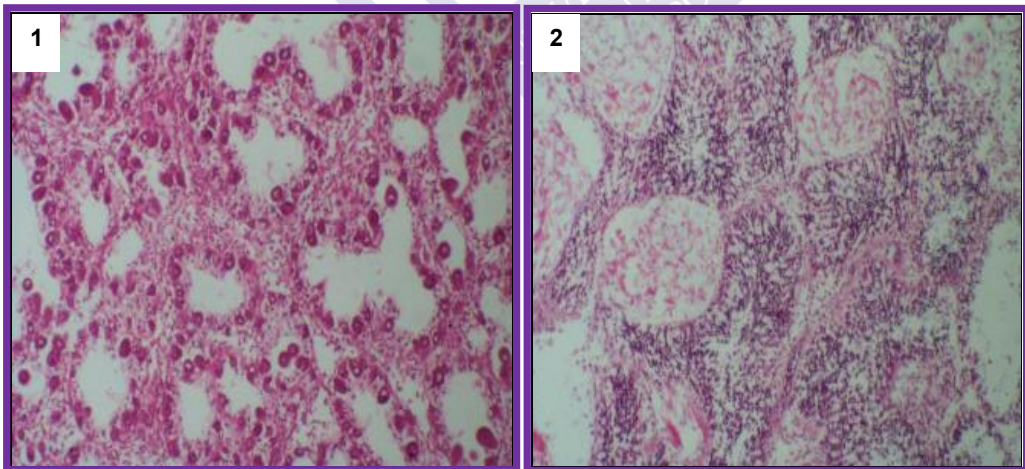


*E0: Reposo gonadal*

*E1: Inicio de la gametogénesis*

*Fig. 3.8.A. 1, Reposo gonadal y 2, Inicio de la gametogénesis.*

E2: Desarrollo gametogénico: folículos con células germinales en los primeros estadios de desarrollo.



*Hembra*

*Macho*

*Fig. 3.8.B. Desarrollo gametogénico. 1, hembra y 2, macho.*

E3: Madurez morfológica: la gónada está llena de óvulos y espermatozoides maduros en disposición radial.

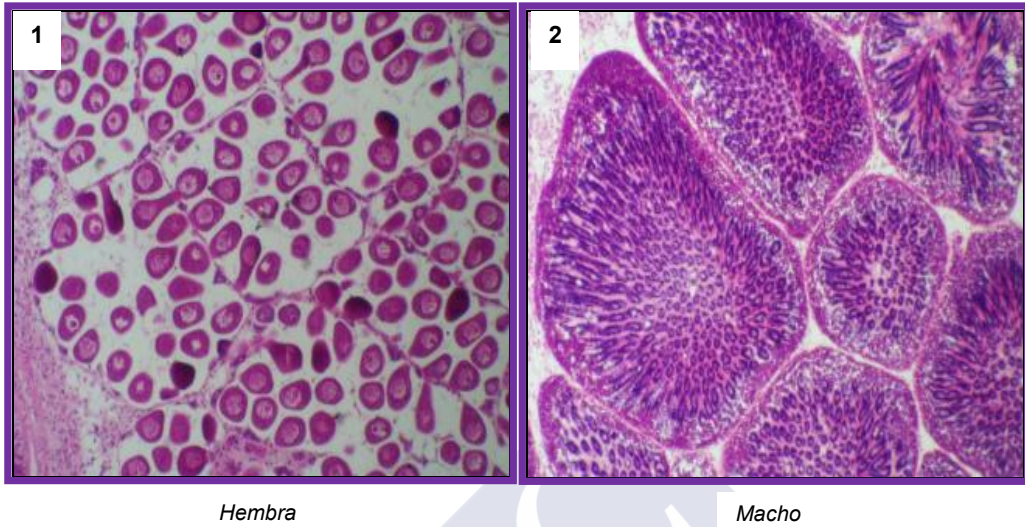


Fig. 3.8.C. Madurez morfológica. 1, hembra y 2, macho.

E4: Puesta: los ovocitos se desprenden de las paredes y los espermatozoides pierden su disposición radial.

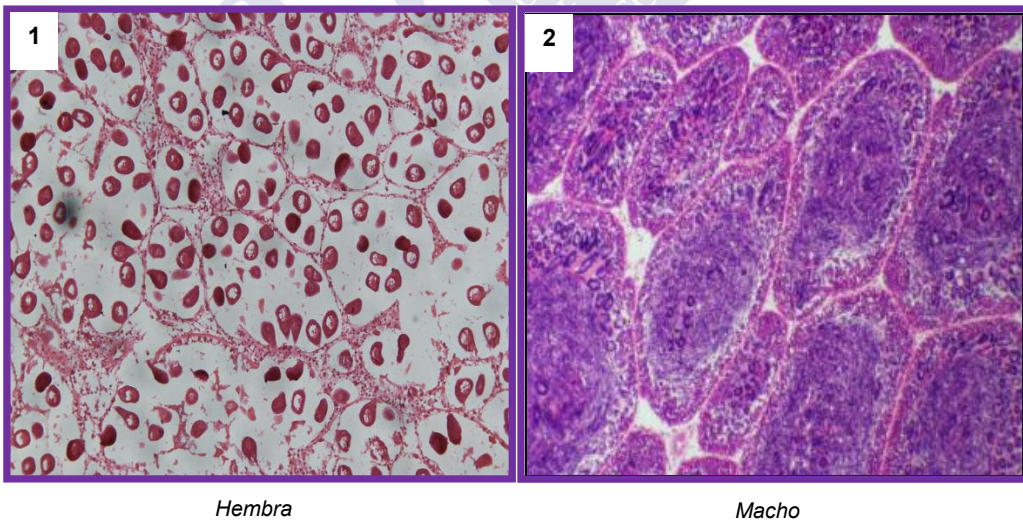


Fig. 3.8.D. Puesta. 1, hembra y 2, macho.

E5: Postpuesta: los folículos se deshacen y aparecen sólo restos de gametos, el animal entra en reposo sexual.

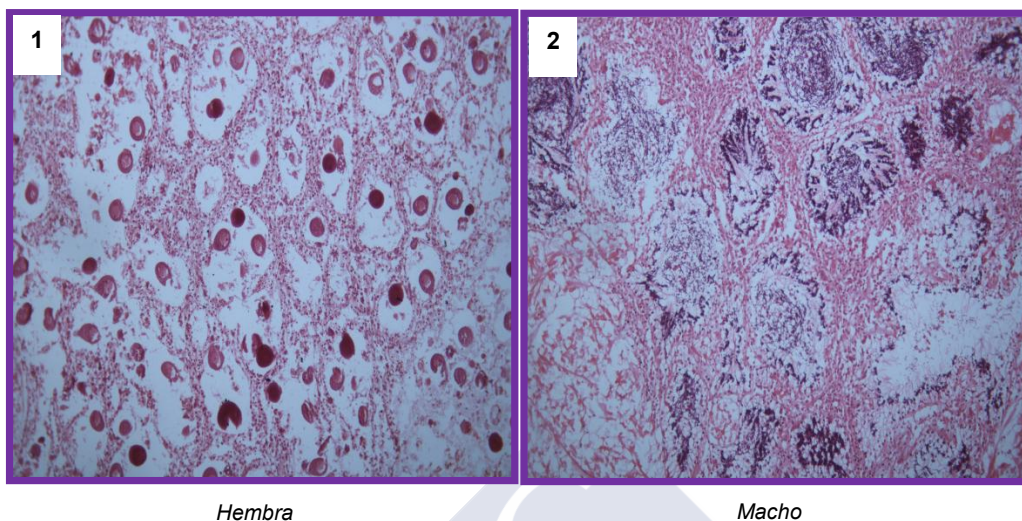


Fig. 3.8.E. Postpuesta. 1, hembra y 2, macho.

### 3.3.4.- Composición bioquímica mayoritaria

La evolución en la composición de carbohidratos, proteínas y lípidos totales expresados en porcentaje, en toda la víscera del animal a lo largo del ciclo gametogénico, se representa en la figura 3.9.

El componente con mayor porcentaje son las proteínas, con un valor medio anual del 48,11%, que presentan variaciones moderadas a lo largo del año, con valores mínimos del 44% y máximos del 50%. El contenido medio en carbohidratos está en 14,74% y es el componente que presenta las mayores variaciones a lo largo del ciclo, el valor más alto se encuentra en octubre del primer año de muestreo, con un 22,75%, cuando las almejas están en reposo gametogénico, valores de este orden se mantienen hasta febrero (20,05%), a partir de aquí, sufre un descenso progresivo durante el período de máxima actividad gametogénica, hasta el valor mínimo del 7% a principios de agosto; después se vuelve a producir un aumento progresivo de este componente. Los lípidos son el componente minoritario, su valor medio es de 5,57% y no presenta muchas variaciones a lo largo del año, aunque desde finales de junio con un valor de 5,61% sufre un ascenso muy importante hasta alcanzar el máximo valor (6,88%) a principios de agosto, después empieza a descender registrándose en diciembre su valor mínimo (4,83%).

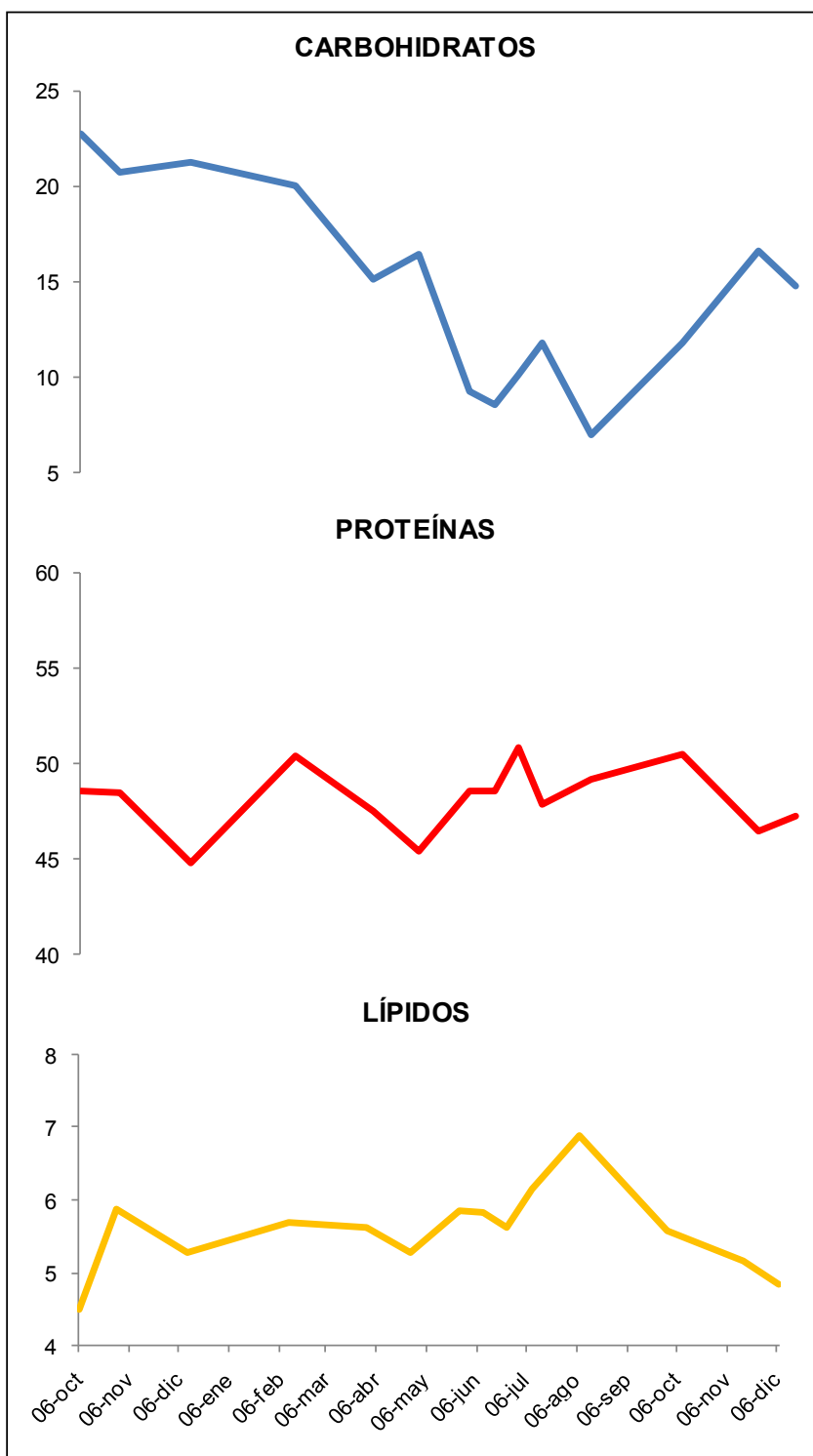


Fig. 3.9. Variaciones de los porcentajes de carbohidratos, proteínas y lípidos totales encontradas en *Ruditapes decussatus* a lo largo del ciclo gametogénico.

Al igual que ocurre cuando se dan los resultados de la composición bioquímica para la víscera completa; son las proteínas las que alcanzan las máximas concentraciones en las diferentes partes en que se diseccionaron las almejas (Fig. 3.10), seguido por los carbohidratos y los lípidos que son los componentes minoritarios.

Las concentraciones medias de las proteínas son más altas en los músculos aductores (67,81%), seguido por los sifones (65,78%) y el pie (51,15%). La concentración media más baja se encuentra en la gónada-masa visceral (33,15%).

Los carbohidratos, que son en importancia debido a su concentración el segundo componente, se encuentran en mayor concentración en la gónada-masa visceral con un 20,28% de media anual y las mínimas se obtienen en los sifones (6,86%) y branquias (9,29%).

Por lo que respecta a los lípidos, los valores medios son bajos en todas las partes analizadas, el valor mínimo se obtiene en los músculos (2,3%), seguido del pie (4,69%) y los sifones (4,75%). La gónada-masa visceral es la parte del animal que tiene una mayor concentración de lípidos (7,31%), seguido de las branquias (6,8%).

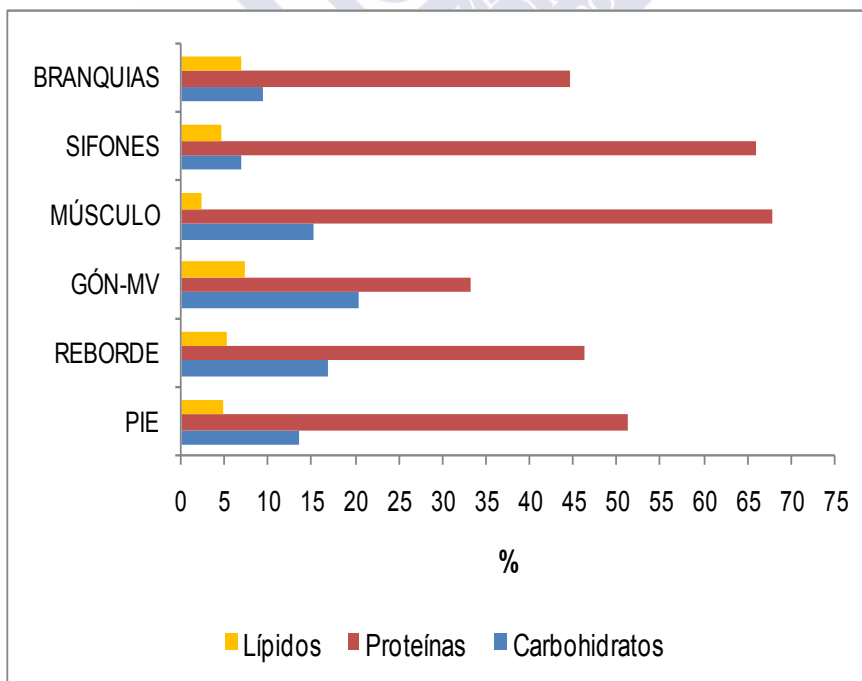


Fig. 3.10. Valores medios de los principales componentes bioquímicos en las diferentes partes en que se diseccionan las almejas.

La composición bioquímica (carbohidratos, lípidos y proteínas) de las diferentes partes en que se disecciona el cuerpo del animal (pie, reborde muscular del manto, gónada-masa visceral, músculos aductores, sifones y branquias) a lo largo del período muestreado, se expresan en porcentaje y se muestran en la tabla III.3 (A y B).

La gónada-masa visceral es la parte del cuerpo que presenta mayores variaciones durante el ciclo gametogénico, las concentraciones de carbohidratos alcanzan los valores máximos en la fase de reposo e inicio de la gametogénesis, entre octubre del primer año (36,56%) y febrero (29,57%), para ir descendiendo durante la gametogénesis hasta los niveles más bajos en la madurez sexual y la puesta, entre mayo (10,27%) y agosto (6,42%). Su recuperación comienza después del desove. Las concentraciones de lípidos fueron más bajas en octubre del primer año (4,99%) y noviembre y diciembre del segundo año (5,97% y 5,45%, respectivamente) y se observa el valor más alto que coincide en noviembre del primer año y septiembre del segundo año (9,42%).

A lo largo del ciclo anual las concentraciones de lípidos y proteínas están inversamente relacionadas con las de carbohidratos; las concentraciones mínimas de carbohidratos se obtienen durante los meses de la fase de reposo o inicio de la gametogénesis y se corresponden con las concentraciones mínimas de lípidos, mientras que las concentraciones mínimas de carbohidratos se obtienen con la madurez gonadal cuando se alcanzan las máximas concentraciones de lípidos. La gónada-masa visceral tiene concentraciones más bajas de proteínas que las otras partes del animal, con concentraciones mínimas en diciembre del primer año (25,67%) y máximas en febrero (40,15%).

En el reborde muscular del manto es donde se observan unas variaciones más aleatorias en el tiempo, los carbohidratos presentan dos picos de valores máximos del 25% en octubre del primer año y julio, mientras que los mínimos valores del 8% se obtienen a principios de junio y en diciembre del segundo año; los lípidos totales presentan un valor mínimo del 4,16% en octubre del primer año y un máximo del 7,25% a finales de septiembre del segundo año y las proteínas son el componente que menos variaciones presenta con valores entre 41,26% en octubre del primer año y 49,04% a finales de junio.

En el pie las proteínas y los lípidos presentan muy pocas variaciones anuales entre 46-54% para las proteínas y 4-5% para los lípidos. Los carbohidratos oscilan entre valores

de un mínimo a principios de agosto de 9,38% y máximo de 19,99% en octubre del primer año de muestreo.

En los músculos aductores que son el componente con mayor proporción de proteínas, éstas varían entre 63,11% en diciembre del primer año y 72,27% en agosto. Los carbohidratos varían entre máximos de 20,93% en diciembre del primer año y 9,5% en agosto, teniendo una evolución paralela con las proteínas. Los lípidos, que en esta parte del animal se obtienen los valores más bajos, apenas sufren variaciones, los valores oscilan entre 2,87% en noviembre del primer año y 1,79% en diciembre del segundo año de muestreo.

Los sifones muestran también altas concentraciones de proteínas (62,4%-68,8%), mientras que la concentración de los hidratos de carbono es baja, variando entre 3,86% en agosto y 9,57% en octubre del primer año. Los lípidos permanecen entre el 4-5% a lo largo de todo el período muestreado.

Tabla III.3 (A y B). Variaciones estacionales en el contenido en carbohidratos (CH), lípidos (LI) y proteínas (PR) expresados en porcentaje (%), de las diferentes partes en que se disecciona el animal.

A	PIE			REBORDE			GÓNADA - MV		
	CH	PR	LI	CH	PR	LI	CH	PR	LI
06-oct	19,99	49,69	4,59	25,66	41,26	4,16	36,56	32,35	4,99
29-oct	13,76	46,70	4,42	21,32	45,47	4,66	36,56	32,35	9,42
11-dic	17,95	52,97	4,45	22,75	46,32	4,55	30,49	25,67	7,17
11-feb	15,53	49,95	4,65	20,83	43,90	4,74	29,57	40,15	8,15
30-mar	12,64	51,03	4,45	16,72	47,86	5,04	20,25	28,99	7,64
26-abr	14,13	52,09	4,79	16,27	47,24	4,93	21,50	26,80	6,53
26-may	9,95	49,58	4,50	9,45	47,29	5,16	10,27	36,04	7,92
10-jun	11,89	49,77	4,67	8,38	48,61	4,81	8,21	35,77	7,97
24-jun	12,84	54,14	4,93	14,41	49,04	5,24	9,77	37,64	7,00
09-jul	11,39	53,57	4,67	25,17	44,31	5,66	10,43	36,06	8,08
07-ago	9,38	54,08	4,83	11,23	46,30	5,01	6,42	40,01	9,42
30-sep	12,91	50,10	5,00	13,02	46,30	7,25	18,42	35,73	6,70
15-nov	14,95	51,46	5,01	20,28	45,68	5,38	21,00	27,00	5,97
07-dic	12,18	50,99	4,73	8,95	45,84	5,10	24,48	29,55	5,45

B	MÚSCULOS			SIFONES			BRANQUIAS		
	CH	PR	LI	CH	PR	LI	CH	PR	LI
06-oct	19,97	63,90	1,91	9,57	68,80	4,44	9,95	50,77	6,51
29-oct	16,87	64,84	2,87	8,48	64,99	4,76	12,36	44,51	5,95
11-dic	20,93	63,11	2,38	9,04	64,66	4,41	15,16	36,80	6,63
11-feb	18,16	67,48	2,70	7,76	62,40	4,55	13,65	46,70	7,01
30-mar	15,82	68,37	2,27	6,76	66,31	4,71	10,38	43,73	6,94
26-abr	15,69	64,64	2,48	8,89	67,88	4,50	12,21	41,64	6,94
26-may	10,73	67,36	2,02	5,87	67,55	4,53	7,25	45,53	6,74
10-jun	12,61	69,38	2,00	4,40	63,63	4,56	6,73	45,15	7,27
24-jun	12,97	71,47	2,60	6,73	67,56	4,52	8,98	47,90	6,18
09-jul	14,16	69,39	2,75	5,71	65,79	4,38	6,47	42,68	6,62
07-ago	9,50	72,27	2,08	3,86	66,61	4,38	5,10	43,27	6,90
30-sep	10,45	68,39	2,10	4,78	66,30	4,34	5,36	45,64	7,28
15-nov	17,06	68,93	2,28	7,94	65,86	4,94	8,57	44,62	7,27
07-dic	16,40	69,85	1,79	6,28	62,58	4,64	7,85	43,83	7,03

Las branquias son la parte del animal que tiene mayor concentración de lípidos después de la gónada-masa visceral, con valores máximos superiores al 7% (7,01-7,28) y mínimos entre 5,95% y 6,18%. Los carbohidratos presentan valores superiores al 10% desde finales de octubre del primer año hasta abril y los valores más bajos se obtienen en los meses de agosto y septiembre del segundo año (5,10% y 5,36%, respectivamente). Los valores de las proteínas oscilan entre 36,80% en diciembre del primer año y 50,77% en octubre del primer año.

### 3.3.5.- Variaciones estacionales en la composición de ácidos grasos de la gónada-masa visceral

La composición en ácidos grasos de los lípidos polares y neutros en la gónada-masa visceral se muestra en las tablas III.4 y III.5.

En los lípidos neutros, el 16:0; 16:1(n-7); 18:1(n-7); 22:6(n-3) y 20:5(n-3) son los ácidos grasos predominantes. En los primeros muestreos se encontró un alto porcentaje de 22:5(n-3), posiblemente debido a un bloom de fitoplancton rico en este ácido graso. En la fracción de lípidos polares, los ácidos grasos poliinsaturados son el

tipo más importante especialmente la serie n-3 con predominio del 22:6(n-3) y 20:5(n-3), seguidos por los ácidos grasos saturados, principalmente 16:0 y 18:0. Los ácidos grasos monoinsaturados están representados principalmente por el 16:1(n-7) y el 18:1(n-9). En los lípidos polares no se encontraron los ácidos grasos 20:0 y 18:3(n-6), sin embargo el 16:1(n-9) está presente en un porcentaje mayor que en los lípidos neutros. El ácido palmítico y el 18:1(n-9) muestran variaciones más altas en la fracción de lípidos neutros y los poliinsaturados en los lípidos polares.

Tanto en la fracción de lípidos neutros como en los polares, se encuentran dos tipos de ácidos dienóicos C22, el 22:2i y 22:2j, los cuales consideramos que son el 22:2 $\Delta$ 7,13 y 22:2 $\Delta$ 7,15, respectivamente (Klingensmith, 1982). Los porcentajes de estos ácidos grasos en la fracción polar son considerablemente más altos que en la fracción neutra. Durante el período del desove, los niveles de las principales clases de ácidos grasos en los lípidos polares de la gónada ( $\mu$ g de ácidos grasos/mg de gónada) permanecen más o menos constantes, excepto para los poliinsaturados n-3, los cuales aumentan de mayo a junio y después disminuyen ligeramente. Las clases de ácidos grasos en los lípidos neutros experimentan las mismas variaciones durante el desove; todas las clases aumentan entre el 26 de mayo y el 10 de junio y después disminuyen progresivamente.

Tabla III.4. Variaciones estacionales en la composición de ácidos grasos en la gónada-masa visceral de *R. deccusatus* expresado en %, en la fracción de lípidos polares.

	Oct	Nov	Dic	Feb	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Ago	Sep	Oct	Nov	Dic
14:00	1,02	1,14	0,97	0,66	0,64	0,79	0,59	0,68	0,72	0,94	0,75	0,89	1,21	0,92
16:00	15,1	16,1	14,2	14,2	14,3	14,7	14,8	16,1	15,3	16,7	17,5	14,6	16,5	16,8
18:00	7,86	8,70	7,50	6,11	9,02	8,40	9,39	7,34	7,93	7,21	8,95	6,19	10,1	12,2
<b>TOT. SAT.</b>	<b>24,0</b>	<b>25,9</b>	<b>22,7</b>	<b>21,0</b>	<b>23,9</b>	<b>23,9</b>	<b>24,8</b>	<b>24,2</b>	<b>23,9</b>	<b>24,8</b>	<b>27,2</b>	<b>21,7</b>	<b>27,8</b>	<b>29,9</b>
16:1(n-9)	3,24	3,59	3,37	3,91	2,78	3,48	2,06	2,61	3,35	3,28	3,15	5,59	0,00	0,00
16:1(n-7)	1,43	2,88	2,50	1,75	2,29	2,62	2,27	2,67	4,39	3,67	3,23	1,52	3,13	2,67
18:1(n-9)	3,69	3,99	4,24	4,22	3,05	3,05	3,24	2,49	2,81	2,70	3,25	3,34	5,37	4,41
18:1(n-7)	2,16	2,96	2,57	7,09	2,52	2,76	2,53	2,04	3,34	3,57	3,94	1,84	3,08	2,98
20:1(n-9)	1,25	1,26	1,22	0,88	1,09	1,14	1,24	1,04	0,86	0,83	0,99	0,91	1,73	1,30
20:1(n-11)	1,78	2,05	1,69	1,55	1,70	1,32	1,40	1,44	1,82	1,92	1,83	3,23	4,99	2,68
<b>TOT.MONOINS.</b>	<b>11,8</b>	<b>14,7</b>	<b>13,9</b>	<b>17,9</b>	<b>11,7</b>	<b>13,1</b>	<b>11,3</b>	<b>10,9</b>	<b>14,8</b>	<b>14,1</b>	<b>14,6</b>	<b>13,2</b>	<b>13,3</b>	<b>11,4</b>
18:2(n-6)	0,50	0,52	0,45	0,28	0,31	0,57	0,80	0,49	0,34	0,31	0,56	0,32	0,35	0,55
18:3(n-3)	1,10	0,98	0,85	0,91	1,34	1,42	1,63	0,89	0,81	1,34	1,81	0,64	3,32	2,45
20:2(n-6)	2,68	2,56	2,18	1,56	1,64	1,81	2,10	1,84	1,69	1,56	2,16	2,93	3,31	2,24
20:3(n-6)	0,23	0,17	0,09	0,12	0,26	0,12	0,29	0,1	0,12	0,27	0,21	0,32	0,40	0,34
20:4(n-6)	3,42	4,56	3,88	4,42	4,28	4,31	3,99	3,79	4,08	3,06	3,60	2,91	2,61	3,97
20:5(n-3)	7,79	12,8	10,8	7,85	11,9	12,5	13,0	17,1	14,9	13,0	11,7	7,36	4,02	6,80
22:5(n-6)	1,65	2,17	1,83	2,16	2,08	1,81	1,44	1,39	1,52	1,91	1,69	1,84	0,00	1,91
22:5(n-3)	3,78	4,34	3,74	4,06	4,36	4,02	4,11	3,72	3,31	3,51	3,06	4,10	4,59	5,19
22:2i	2,75	1,94	2,49	2,44	2,30	2,08	2,04	1,93	1,54	1,17	1,52	3,14	3,93	2,32
22:2j	6,80	8,65	7,32	9,25	7,45	6,89	5,43	5,11	6,13	5,15	5,32	10,7	14,8	9,77
22:6(n-3)	31,8	18,6	28,2	26,6	26,7	26,1	27,6	27,2	25	27,9	24,8	27,7	16,6	20,5
<b>TOT. POLIINS.</b>	<b>62,5</b>	<b>57,3</b>	<b>61,8</b>	<b>59,6</b>	<b>62,6</b>	<b>61,7</b>	<b>62,4</b>	<b>63,6</b>	<b>59,5</b>	<b>59,2</b>	<b>56,4</b>	<b>61,9</b>	<b>53,9</b>	<b>56,0</b>
TOT. (n-3)	44,4	36,7	43,5	39,4	44,3	44,1	46,3	48,9	44,1	45,8	41,3	39,8	28,6	34,9
TOT. (n-6)	8,49	10,0	8,44	8,53	8,59	8,63	8,63	7,62	7,75	7,11	8,23	8,32	6,68	9,02
(n-3)/(n-6)	5,23	3,67	5,15	4,62	5,16	5,11	5,37	6,41	5,68	6,43	5,02	4,78	4,27	3,87
<b>TOTAL</b>	<b>41,2</b>	<b>44,0</b>	<b>49,9</b>	<b>57,6</b>	<b>52,7</b>	<b>58,7</b>	<b>59,9</b>	<b>50,4</b>	<b>56,7</b>	<b>64,8</b>	<b>64,6</b>	<b>39,7</b>	<b>33,2</b>	<b>57,1</b>

RESULTADOS

Tabla III.5. Variaciones estacionales en la composición de ácidos grasos en la gónada-masa visceral de *R. decussatus* expresado en %, en la fracción de lípidos neutros.

	Oct	Nov	Dic	Feb	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Ago	Sep	Oct	Nov	Dic
14:00	3,82	2,34	2,89	2,57	3,90	2,83	6,90	7,40	7,58	8,12	8,83	5,17	4,71	4,76
16:00	17,3	15,2	19,2	19,3	21,0	19,4	22,1	26,3	25,5	24,4	27,3	21,7	29,9	26,5
18:00	4,33	6,40	7,69	7,09	6,39	5,36	7,50	4,27	5,33	4,91	5,20	9,75	11,4	6,71
20:00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,21	0,00
<b>TOT. SAT.</b>	<b>25,4</b>	<b>23,9</b>	<b>29,8</b>	<b>28,9</b>	<b>31,3</b>	<b>27,6</b>	<b>36,5</b>	<b>37,9</b>	<b>38,5</b>	<b>37,4</b>	<b>41,4</b>	<b>36,7</b>	<b>46,1</b>	<b>37,9</b>
16:1(n-9)	0,78	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
16:1(n-7)	6,39	12,2	9,47	12,4	13,5	11,9	11,4	16,7	20,7	17,2	16,6	10,9	11,1	10,5
18:1(n-9)	4,94	3,91	5,42	5,74	5,77	5,81	6,15	5,03	5,25	4,27	5,93	5,04	5,17	4,94
18:1(n-7)	6,00	5,35	8,45	9,63	9,04	9,82	8,65	7,64	8,45	9,01	8,82	6,32	9,61	10,8
20:1(n-9)	1,16	1,23	1,33	1,26	1,13	1,09	0,87	0,84	0,94	0,88	0,98	1,00	2,11	1,70
20:1(n-11)	0,88	1,24	1,64	1,95	1,80	1,13	1,45	1,48	1,92	1,67	1,59	1,59	1,50	2,42
<b>TOT. MONOINS.</b>	<b>19,3</b>	<b>22,7</b>	<b>24,7</b>	<b>29,0</b>	<b>29,5</b>	<b>28,6</b>	<b>27,1</b>	<b>30,1</b>	<b>35,3</b>	<b>31,4</b>	<b>32,4</b>	<b>23,3</b>	<b>28,5</b>	<b>28,4</b>
18:2(n-6)	1,96	0,93	1,28	1,25	1,14	1,77	1,89	1,59	0,85	0,94	1,93	1,21	1,18	1,91
18:3(n-6)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,19	0,34
18:3(n-3)	2,02	0,83	1,10	1,24	1,87	2,01	1,85	1,75	1,06	1,75	2,35	1,43	1,57	1,93
20:2(n-6)	2,03	1,65	2,36	2,21	1,65	1,91	2,42	1,36	1,11	1,20	1,22	1,38	1,57	2,24
20:3(n-6)	0,23	0,18	0,32	0,31	0,26	0,32	0,21	0,23	0,25	0,29	0,26	0,32	0,27	0,35
20:4(n-6)	1,50	2,45	2,75	2,78	2,15	2,53	2,13	1,58	1,65	1,53	1,48	3,14	2,09	2,33
20:5(n-3)	8,53	7,92	10,5	10,9	11,6	12,4	9,48	9,70	8,09	8,54	6,19	10,8	5,06	7,85
22:5(n-6)	0,57	0,64	0,79	0,92	0,81	0,73	0,50	0,33	0,42	0,67	0,44	0,68	0,34	0,64
22:5(n-3)	20,1	22,9	4,34	1,86	1,94	2,07	1,50	1,65	1,21	1,67	1,04	1,64	1,27	1,68
22:2i	0,79	0,49	0,74	0,96	0,52	0,58	0,71	0,71	0,48	0,45	0,57	0,94	1,02	0,63
22:2j	1,65	1,44	2,17	2,48	1,99	2,60	2,23	1,69	1,75	1,87	2,49	2,56	3,25	2,25
22:6(n-3)	15,1	12,7	17,5	15,2	13,5	15,7	12,0	9,94	7,44	10,6	6,71	14,3	5,98	9,09
<b>TOT. POLIINS.</b>	<b>54,4</b>	<b>52,2</b>	<b>43,9</b>	<b>40,1</b>	<b>37,4</b>	<b>42,6</b>	<b>34,9</b>	<b>30,5</b>	<b>24,3</b>	<b>29,5</b>	<b>24,7</b>	<b>38,4</b>	<b>23,8</b>	<b>31,3</b>
TOT. (n-3)	45,7	44,4	33,5	29,2	28,9	32,2	24,8	23,0	17,8	22,6	16,3	28,2	13,9	20,6
TOT. (n-6)	6,29	5,84	7,50	7,46	6,02	7,26	7,15	5,09	4,28	4,64	5,34	6,72	5,63	7,81
(n-3)/(n-6)	7,26	7,60	4,46	3,91	4,80	4,44	3,48	4,53	4,16	4,87	3,05	4,19	2,46	2,63
<b>TOTAL</b>	<b>58,8</b>	<b>55,9</b>	<b>50,1</b>	<b>42,4</b>	<b>47,3</b>	<b>41,4</b>	<b>40,2</b>	<b>49,6</b>	<b>43,3</b>	<b>35,2</b>	<b>35,4</b>	<b>60,3</b>	<b>66,8</b>	<b>42,7</b>

### 3.4.- DISCUSIÓN

Según la bibliografía existente, tanto la evolución anual de los pesos frescos y secos de la víscera, como los Índices de Condición poblacional y gonadal, reflejan la actividad reproductiva de *Ruditapes decussatus* a lo largo del año. (Pérez-Camacho, 1980; Beninger y Lucas, 1984; y Laruelle *et al.*, 1994).

Los valores del Índice de Condición para la población de almeja fina de las Lagunas de Baldaio, fueron más bajos a finales de octubre y coincidió con los valores mínimos en el peso fresco y seco de las diferentes partes en que se diseccionan los animales. El peso de estos tejidos aumenta gradualmente durante el invierno y la primavera (máximos valores en abril), mientras que el Índice de Condición permanece más o menos constante, porque las variaciones en el peso de la concha y la víscera oscilan paralelamente durante este período. Al empezar el período del desove (junio-julio), se produce un rápido descenso en el peso de los tejidos y el Índice de Condición. En verano y principios de otoño, la abundancia de comida disponible permite recuperar el peso de los tejidos, especialmente de la gónada-masa visceral (se obtienen los máximos valores en el Índice de Condición gonadal), indicando que las condiciones son favorables para que se produzca el desove. Cuando la comida es abundante, el exceso de energía es usado por los animales para el crecimiento somático de los tejidos y también para el desarrollo gonadal (Urrutia *et al.*, 1999). La recuperación en el peso de los tejidos es acompañada por un aumento en los valores de los Índices de Condición que alcanzan máximos en julio y a partir de aquí, descienden durante el resto del verano y el otoño. Aún cuando el fitoplancton no es abundante, el crecimiento puede ser soportado en parte, por otras fuentes de materia orgánica, tales como detritos, porque la almeja fina se alimenta también de sedimentos. (Figueras, 1957; Bodoy y Plante-Cuny, 1984).

Beninger y Lucas (1984) obtienen los máximos valores del Índice de Condición para esta especie (*R. decussatus*) en una población del sur de Bretaña, desde mediados de abril a mediados de junio. Laruelle *et al.* (1994) en dos localizaciones del oeste y sur de Bretaña, encuentran que el Índice de Condición en la zona oeste aumenta entre mayo y julio y después vuelve a disminuir, mientras que en la zona sur el aumento se observa entre marzo y junio, sufre un descenso en julio y, a partir de aquí, vuelve a aumentar hasta septiembre. Serdar y Lök, 2009, en Sufa Lagoon (Turkía) encuentran que, durante el desarrollo gametogénico, el rendimiento de la carne alcanza los

máximos valores y disminuye cuando las almejas están en el período de desove. El valor más alto del Índice de Condición lo obtienen en abril y el más bajo en octubre. Chryssanthakopoulou y Kaspiris, 2005, estudian dos poblaciones situadas al norte (estuario de Evinos) y sur (laguna de Araxos) del golfo de Patraikos (Grecia) y obtienen valores medios del ICS de 9,8 para la población del sur, con valores máximos entre febrero y mayo, se produce un descenso en junio (que indicaría el inicio del desove) y observan un repunte en agosto, probablemente debido al redesarrollo de las gónadas; en la población del norte el valor medio es de 4,4 y observan los valores mínimos en noviembre y diciembre y máximo en agosto. La evolución del índice que obtienen es similar a lo obtenido en este trabajo, aunque en las Lagunas de Baldaio el valor medio está en 7,93.

El ciclo gametogénico de esta almeja muestra dos fases distintivas: una fase de reposo o recuperación en octubre-diciembre y otra fase de actividad gametogénica que incluye la madurez y el desove en el verano. La mayoría de las almejas pertenecientes a la familia Veneridae suelen desovar en el verano, aunque se encuentran variaciones inter e intraespecíficas (Shafee y Daoudi, 1991). Partridge (1977) observa, por la literatura disponible, que en *R. decussatus* la duración del ciclo gametogénico y, en particular, la duración del período de desove, está directamente influenciado por la latitud geográfica debido a la temperatura de la zona. Laruelle *et al.* (1994) revisaron datos de patrones reproductivos de almeja fina a lo largo de su rango de distribución geográfica y concluyen que la temperatura tiene un efecto positivo en la gametogénesis y que puede afectar directamente en la tasa metabólica del animal, o indirectamente en la disponibilidad del alimento, ya que la máxima tasa de incremento en peso ocurre durante la primavera, cuando ambos factores, temperatura del mar y alimento se incrementan rápidamente.

Del mismo modo encontramos que la temperatura y la clorofila *a* están íntimamente relacionadas ( $0,851$ ;  $P < 0,01$ ) y el Índice de Condición gonadal está también relacionado con la temperatura ( $0,585$ ;  $P < 0,05$ ) y la clorofila *a* ( $0,541$ ;  $P < 0,05$ ). El ciclo gametogénico de la almeja fina en las Lagunas de Baldaio se parece mucho al ciclo descrito por otros investigadores para la misma especie en Galicia (Figueras, 1957; Pérez-Camacho, 1980; Rodríguez S. *et al.*, 1993 y Rodríguez-Moscoso, 2000). En todos hay un corto período de inactividad durante el invierno, cuando la actividad reproductiva es mínima, seguido por un rápido desarrollo y proliferación de la gónada, acompañado de un incremento en el peso de los tejidos (especialmente la gónada-masa visceral) durante la primavera. También coincide con los resultados encontrados

para esta especie en la costa atlántica francesa (región de Bretaña) de Benninger y Lucas (1984), que no observan ovocitos en la gónada de las hembras después de mediados de septiembre, y el comienzo del desarrollo gametogénico se produce a principios de abril, aunque en este trabajo se observan ya en el muestreo de marzo.

En Grecia, Chryssanthakopoulou y Kaspiris, (2005) comparan el ciclo reproductivo de *R. decussatus* en dos zonas situadas al norte (estuario de Evinos) y al sur (laguna de Araxos), del Golfo de Patraikos: en esta última, el período de reposo va desde noviembre a enero, a partir de febrero empieza la actividad gonadal y en abril se pueden ver las primeras almejas maduras, el desove abarca desde junio hasta octubre, aunque la mayoría de las almejas completan el desove a partir de agosto. En el estuario de Evinos, las almejas entran en reposo en noviembre y se observan los primeros individuos iniciando la gametogénesis en enero; la madurez abarca desde mayo hasta junio y a partir de este mes, se observan los desoves que terminarían en octubre.

En Turkía, Serdar *et al.* (2010), comparan el ciclo gonadal de *R. decussatus* en dos poblaciones situadas dentro y fuera de la Laguna de Cakalburnu, observaron que el estado de reposo se encontró sólo entre el 3-5% de las almejas entre los meses de noviembre a enero para los dos sitios y se encontraron almejas maduras durante todo el año que duró el estudio, excepto en noviembre para la zona interior y diciembre para la exterior. Dentro de la Laguna se encontraron almejas en fase de desove durante todo el año y fuera de la misma desde abril a enero. Además en enero, dentro de la Laguna, se encontraron almejas en cinco estadios diferentes (reposo, inicio y desarrollo gametogénico, madurez y parcialmente desovadas).

En Túnez, Smaoui-Damak *et al.* (2007) estudian el ciclo natural basándose sobre todo en la medida de los ovocitos en la gónada y observan que no existe un período de reposo, la gónada muestra actividad durante todo el año, aunque ésta es baja en períodos como enero y febrero, correspondiéndose con el inicio de la gametogénesis; desde marzo y abril se acelera la actividad que durará hasta noviembre-diciembre. El período de desove se concentra en tres épocas: la primera a principios de junio; la segunda desde principios de julio a octubre y la última, en diciembre, (Hamida, 2004).

Como en *Crassostrea gigas* y *C. virginica* (Gabbott, 1975), el crecimiento gonadal en *R. decussatus* se produce gracias al alimento existente en primavera y a la disminución del contenido de glucógeno en los tejidos. Hay un extenso período

reproductivo durante el verano cuando se produce un crecimiento de la concha y la víscera, que es simultáneo con la gametogénesis y el desove; este período abarcaría hasta el final del otoño en que terminaría la recuperación gonadal y comienza de nuevo un período de inactividad. De acuerdo con Laruelle *et al.* (1994), *R. decussatus* no muestra una acumulación de ovocitos maduros hasta su emisión, como ocurre en otras especies de almejas, y parece que se produce una emisión regular de los ovocitos maduros.

El Índice de Condición de las almejas está directamente relacionado con el contenido total de proteínas (0,920;  $P < 0,01$ ) y lípidos totales (0,792;  $P < 0,01$ ), pero no lo está con el contenido total de glucógeno. En términos de almacenamiento de nutrientes para suministrar energía para la gametogénesis, el papel del glucógeno es predominante en la mayoría de los bivalvos, aunque la acumulación de proteínas también es importante (Mathieu y Lubet, 1993). Rodríguez S. *et al.* (1993) concluyen que el glucógeno es la principal energía de reserva para la gametogénesis en *R. decussatus* y *R. philippinarum* en poblaciones de la Ría de Muros y Noia. Está generalmente aceptado que el ciclo gametogénico está íntimamente ligado a los ciclos estacionales de almacenamiento y utilización de las reservas del glucógeno en bivalvos. Varios autores han encontrado concentraciones máximas de glucógeno en bivalvos justo antes y durante la proliferación de los gametos (Ansell, 1972; Ansell *et al.*, 1980; Barber y Blake, 1985).

Los resultados del presente estudio coinciden con estas apreciaciones, se observa cómo el contenido en glucógeno desciende después de la fase de reposo y alcanza los valores mínimos durante el período de desove, recuperándose los valores una vez que éste termina. Beninger y Lucas (1984) hacen observaciones similares ya que encuentran concentraciones máximas de glucógeno en *R. decussatus* y *R. philippinarum* justo antes del inicio de la gametogénesis. Nosotros observamos un descenso en el contenido de glucógeno durante la gametogénesis en todos los tejidos de *R. decussatus* que se estudiaron, principalmente en la gónada-masa visceral en la cual el glucógeno está negativamente relacionado con el Índice de Condición gonadal (-0,574;  $P < 0,05$ ). En la Ría de Pasaje (A Coruña), González (1975) encuentra que el porcentaje de glucógeno en peso seco alcanza valores máximos del 21% en otoño y mínimos del 6,3% en primavera. Estos porcentajes se asemejan a los obtenidos en este estudio, con el valor máximo de 22,75% en octubre y mínimos en junio de 8,57% y en agosto, de 6,99%. La gónada-masa visceral es la parte (de las seis en que se diseccionan las almejas) que más cantidad de glucógeno presenta a lo largo del año,

eso también coincide con lo obtenido por Rodríguez-Moscoso *et al.*, en 1993. Estos resultados nos permiten concluir que la estrategia reproductiva de la almeja fina en Galicia puede ser descrita como una estrategia conservativa, porque el almacenamiento de glucógeno tiene lugar antes de la gametogénesis, y los cambios estacionales en el contenido de glucógeno están relacionados negativamente con el desarrollo gonadal.

En bivalvos, el desarrollo gonadal puede implicar la conversión metabólica del glucógeno en lípidos (Gabbott, 1975). Este es posiblemente uno de los mayores usos del almacenamiento de glucógeno en la gónada-masa visceral de la almeja fina. Las principales variaciones estacionales en los componentes bioquímicos se producen en esta parte de la almeja, el contenido en glucógeno y proteínas son los que más varían, mientras que el contenido en lípidos permanece bajo durante todo el año, por lo que no está claro que existan cambios estacionales. Giese *et al.* (1967) encuentran que en la almeja *Tivela stultorum*, la gónada acumula reservas nutricionales para la gametogénesis, independientemente de otras partes del cuerpo. En pectínidos, la energía para la maduración de los gametos procede de reservas de glucógeno y proteínas almacenadas en el músculo aductor debido a la ausencia de tejidos específicos de reserva, pero en venéridos existen células intragonadales de almacenamiento que contienen gotas lipídicas y glucógeno (Mathieu y Lubet, 1993). Kraeuter y Castagna (2001) encuentran que la cantidad de energía necesaria para la actividad gametogénica en *Mercenaria mercenaria*, depende más de la disponibilidad de comida que de los nutrientes almacenados en diferentes partes del animal, tales como el pie y el músculo aductor.

Los lípidos se mantienen entre valores de 4-6% a lo largo del año, pero en julio y agosto sufren un ascenso importante, llegando a máximos de 6,88% a principios de agosto, después del desove la concentración vuelve a caer hasta mínimos de 4,48% a primeros de octubre el primer año de muestreo y de 4,83% en diciembre del segundo año. Serdar y Lök (2009). obtienen los mínimos valores en junio (4,9%) y máximos en abril (7,1%). En la gónada-masa visceral, seguido de las branquias son las partes donde se encuentran las mayores concentraciones de lípidos, siendo en la gónada-masa visceral donde se producen las mayores movilizaciones de este componente a lo largo del año. También Rodríguez-Moscoso, 2000 encuentra que durante el ciclo gametogénico, la mayor concentración de lípidos totales ocurre en las branquias y la masa visceral y es en ésta donde se produce el máximo recambio de este componente.

Las variaciones en la composición de ácidos grasos para los lípidos neutros y polares puede tener un origen endógeno (ciclo gametogénico) o exógeno (temperatura, dieta, etc.). En las experiencias realizadas en esta tesis, encontramos una relación entre las variaciones en los ácidos grasos totales en los lípidos neutros y polares de la gónada-masa visceral y el ciclo gametogénico, especialmente cuando se analizan los datos expresados por mg de tejido analizado. El incremento, tanto en lípidos neutros como en polares en el período de máxima madurez, y la disminución durante el desove, indica esta relación. Los ácidos grasos poliinsaturados especialmente en los lípidos polares, siguen un ciclo estacional relacionado con el ciclo reproductivo, los contenidos máximos corresponden con los ovocitos maduros y los contenidos mínimos con el período después del desove. Los ácidos grasos saturados totales y poliinsaturados de los lípidos polares están estrechamente correlacionados con el Índice de Condición gonadal (0,820 y 0,800, respectivamente,  $P < 0,01$ ). Las variaciones en los lípidos neutros parecen estar relacionadas con la disponibilidad de alimento, especialmente en los meses de octubre-noviembre, donde la recuperación de los niveles de lípidos neutros se observó asociada a un incremento en la concentración de clorofila *a* en el agua de mar. De hecho, las variaciones estacionales en el total de ácidos grasos saturados en los lípidos neutros, están positivamente relacionadas con las concentraciones de clorofila *a* (0,562;  $P < 0,05$ ).

Los ácidos grasos dienólicos 22:2 no-metilen-interrumpidos (NMID) están aparentemente omnipresentes en los componentes lipídicos de los moluscos pero las cantidades varían bastante de unas especies a otras (Paradis y Ackman, 1975; Zhukova, 1986; Abad *et al.*, 1995 y Pazos *et al.*, 1996, 2003). Aunque su función específica en bivalvos no es claramente conocida, el predominio en los lípidos polares sugiere que pueden jugar un papel estructural en el mantenimiento de la fluidez en las membranas. Whyte (1988) encuentra que para *C. gigas* el incremento en 22:2j coincidía con bajos niveles de 20:5(n-3) y Klingensmith (1982) encontró una relación inversa entre los ácidos grasos poliinsaturados n-3, especialmente 20:5(n-3) y 22:6(n-3) y los niveles de ácidos grasos (NMID) en almejas. Similarmente nosotros encontramos que el 22:2i y el 22:2j en los lípidos polares están correlacionados negativamente con 20:5(n-3) (-0,795 y -0,823, respectivamente,  $P < 0,01$ ) y el 22:2j está también relacionado negativamente con 22:6(n-3) (-0,638;  $P < 0,05$ ). Así, es posible que cuando hay una deficiencia de ácidos grasos poliinsaturados en la dieta, los ácidos grasos NMID pueden ser incorporados a los lípidos por la dieta o biosintetizados por los moluscos, NMID es el único ácido graso poliinsaturado sintetizado por moluscos marinos.

La predominancia del ácido palmítico y ácidos grasos poliinsaturados 20:5(n-3) y 22:6(n-3) en *R. decussatus* es característica de especies marinas (Beninger y Stephan, 1985; Besnard *et al.*, 1989) y está ampliamente aceptado que esto es una adaptación a las temperaturas relativamente bajas del medio ambiente marino. El alto porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados en los lípidos neutros durante los meses de octubre-diciembre puede ser explicado por la abundancia de fitoplancton, que se corresponde con un incremento en la concentración de clorofila *a* y también porque los porcentajes de ácidos grasos poliinsaturados disminuyen de forma paralela con las concentraciones de clorofila *a*. Beninger y Stephan (1985) concluyen también que los cambios en la composición de los ácidos grasos parecen estar más íntimamente relacionados con la dieta que con respuestas internas a la temperatura medioambiental.







ACONDICIONAMIENTO EN CRIADERO:  
EFECTO DE LA TEMPERATURA

---



## 4.- ACONDICIONAMIENTO EN CRIADERO: EFECTO DE LA TEMPERATURA

### 4.1.- INTRODUCCIÓN

El objetivo de acondicionar reproductores es maximizar la fecundidad de los mismos manteniendo la calidad y viabilidad larvaria (Utting y Millican, 1997). Gallager y Mann (1986) observan que el crecimiento y supervivencia de las larvas de *Mercenaria mercenaria* y *Crassostrea gigas* está directamente asociada con el inicio y la duración del acondicionamiento y muestra la importancia de la época de inicio del acondicionamiento en la supervivencia de los reproductores durante el mismo.

La temperatura se considera como el primer factor medioambiental que regula la reproducción en bivalvos (Sastry, 1968). El período de crecimiento gonadal y la gametogénesis en varias especies de bivalvos han sido relacionados con cambios en la temperatura del agua y en algunos casos, parecen ocurrir con disminuciones de las temperaturas en otoño o con incrementos en primavera y verano (Sastry, 1979).

La temperatura del agua influye también en la tasa de ingestión de las microalgas presentes. Heasman *et al.*, 1996, estudiaron la tasa de ingestión en el acondicionamiento de *Pecten fumatus*, bajo diferentes temperaturas (11°; 14°; 18° y 21°C) y obtienen que las especies *Paulova lutheri*, *Tahitian Isochrysis aff. galbana*, *Chroomonas salina* y *Chaetoceros gracilis*, son ingeridas en tasas similares a 14°; 18° y 21°C pero lo hacen más lentamente a 11°C. Las especies *P. lutheri* y T-ISO, fueron las que se consumieron más rápidamente, seguidas de *C. salina*, *Tetraselmis. suecica* y *C. gracilis*, respectivamente. El número de células consumidas después de cuatro horas fue más alto a 14° y 18°C excepto para *T. suecica*, donde su consumo no presentó diferencias significativas con la temperatura.

Los procedimientos para acondicionar reproductores en el criadero incluyen someter a los animales a un cambio brusco de temperatura con el objetivo de acelerar el desarrollo gonadal (Loosanoff y Davis, 1950; Sastry, 1966; Mann, 1979). Sin embargo, los cambios bruscos en la temperatura pueden provocar estrés y variaciones en los ciclos de almacenamiento y utilización de las reservas energéticas, además de producir mortalidades en los individuos y la producción de gametos de inferior calidad.

La gametogénesis está directamente relacionada con la temperatura a la que están expuestos los reproductores y al tiempo de esta exposición. Mann, 1979 estudió el desarrollo gonadal de *Ruditapes philippinarum* con diferentes temperaturas y observó que el desarrollo es lento a 12°C, se encontraron machos maduros a las 19 semanas pero no se observó desove. Individuos maduros de ambos sexos se encontraron a las 15 semanas y a una temperatura de 15°C; la fase de puesta fue evidente a partir de las 13 semanas con una temperatura de 18°C y a partir de las 11 semanas si la temperatura es de 21°C.

Las diferencias en la velocidad del desarrollo gonadal están relacionadas con el origen geográfico, el aumento de temperatura y el tiempo de exposición. Chávez-Villalba *et al.* (2002), estudian el efecto de diferentes temperaturas sobre el desarrollo de los ovocitos en *C. gigas* y encuentran que los primeros ovocitos maduros se detectan después de 27 días cuando los reproductores están a 16°C; 23 días a 19°C; 19 días a 22°C y 22 días a 25°C.

Es posible inducir la gametogénesis en algunas especies de vieiras fuera de su época normal de reproducción, sometiéndolas a un régimen apropiado de temperaturas. Saout *et al.* (1999), estudian la influencia de factores medioambientales sobre la reproducción en *Pecten maximus* simulando en el criadero condiciones de primavera y de invierno y observan que las condiciones de primavera favorecen el crecimiento gonadal, mientras que las condiciones de invierno favorecen el crecimiento somático en la glándula digestiva y el músculo aductor.

No siempre el acondicionamiento implica someter a los reproductores a una subida de temperatura, Gloria Martínez y Hernán Pérez (2003) ensayan diferentes regímenes de temperatura en el acondicionamiento de reproductores de *Argopecten purpuratus*, temperatura constante a 15°C, subida gradual de la temperatura desde 15°C a 19°C, temperatura constante a 19°C y descenso gradual de la temperatura de 19°C a 15°C. Obtienen que los reproductores mantenidos a altas temperaturas (19°C) durante todo el proceso de acondicionamiento, no producen mayor porcentaje de desoves ni se obtienen más gametos, y los ovocitos liberados fueron más pequeños que los de aquellos reproductores que se mantuvieron a bajas temperaturas (15°C).

Da Costa *et al.*, 2005, acondicionaron reproductores de navaja (*Ensis arcuatus*) sometiéndolos a dos regímenes de temperatura, un lote a 15°C y otro lote con subida gradual de 15° a 20°C. Los reproductores estaban en fase de inicio y

desarrollo gametogénico, con un Índice de Condición gonadal de 0,026. A los dos meses del inicio, los reproductores del agua fría, estaban la mayoría en fase de madurez y puesta con un índice gonadal de 0,18, mientras que los de subida gradual de temperatura aún estaban la mayoría en desarrollo gametogénico, con un valor del índice gonadal de 0,14.

Helm, Bourne y Lovatelli (2006) observan que el acondicionamiento puede ser un proceso en dos partes, al principio del ciclo, en climas templados de agua fría, cuando los adultos en la naturaleza están preparados para desarrollar los gametos, es beneficioso proporcionarles abundante alimento a una temperatura intermedia entre la ambiente y la necesaria para el acondicionamiento. El objetivo es estimular los niveles de reservas alimenticias en los adultos, que más adelante se movilizarán durante el desarrollo de los gametos. Esto es más importante para las hembras que para los machos, porque el desarrollo y maduración de los óvulos requiere mucha más energía. Tras 4 ó 6 semanas de recibir una ración rica y un régimen de temperaturas moderadas, se incrementa gradualmente la temperatura (1 a 2°C por día) y se reduce algo la ración alimenticia (de 4-6% a 2-3% por día).

El tiempo necesario para el desarrollo de ovocitos maduros depende del origen del animal, del estado de maduración gonadal en el momento en que los reproductores son recogidos del medio natural y especialmente de la época del año (Robinson, 1992; Chávez-Villalba *et al.*, 2002 y Matias, D. *et al.*, 2009). Es necesario el conocimiento de los efectos de la temperatura sobre la gametogénesis en especies de importancia comercial para mejorar los procesos de acondicionamiento en los criaderos. El incremento de temperatura acelera el desarrollo gonadal en especies como *R. philippinarum* (Delgado y Camacho, 2007).

Muchos bivalvos que proceden de climas de aguas templadas y frías, requieren un período de acondicionamiento de entre 4 y 8 semanas para alcanzar la madurez suficiente para desovar a finales del invierno y a principios de la primavera. Conforme avanza la época de reproducción natural, el período necesario se irá acortando progresivamente.

El proceso de acondicionamiento tal como se realiza habitualmente, supone una brusca modificación de la temperatura con el objetivo de promover y acelerar el desarrollo gametogénico, siguiendo un principio de lógica metabólica no es difícil considerar que pueda estar ocurriendo una alteración importante en los ciclos de

almacenamiento y movilización de reservas que conduzcan a la producción de gametos de menor calidad. Por otra parte existen estudios que muestran que estos organismos disponen de juegos de enzimas con constantes cinéticas adaptadas a la temperatura estacional. Quiere ello decir que un cambio repentino de temperatura será inevitablemente un factor de estrés, ya que sus sistemas enzimáticos tardarán más de un mes en adaptarse a la nueva situación. Por estas razones deberá estudiarse con detalle el régimen adecuado de temperaturas que permitan acelerar el desarrollo sexual y respeten la lógica metabólica de estos organismos.

El objetivo de este estudio es determinar qué régimen de temperatura experimentado (temperatura alta y constante a 20°C o un aumento gradual desde la temperatura que hay en el medio natural, cuando se recogen los reproductores hasta una temperatura de acondicionamiento a 20°C), es el más apropiado en el acondicionamiento de reproductores de almeja fina en diferentes períodos del año para optimizar el proceso y conseguir mejores larvas, con unos costes de producción menores. Estos costes se basarían principalmente en el tiempo de duración del acondicionamiento necesario para la obtención de gametos, a más tiempo más gasto en el calentamiento del agua, en la producción de las microalgas necesarias para alimentarlos y el mantenimiento general del criadero.

## 4.2.- MATERIAL Y MÉTODOS

### 4.2.1.- Condiciones experimentales

Se recogen individuos de almeja fina de talla comercial del medio natural, de la misma zona donde previamente se hizo el seguimiento del ciclo gametogénico: Lagunas de Baldaio, A Coruña. Se realizan tres experiencias de acondicionamiento en tres épocas diferentes del año:

- 1º- acondicionamiento de “otoño”, empieza en octubre, la mayoría de las almejas están en reposo gonadal.
- 2º- acondicionamiento de “invierno”, empieza en febrero, la mayoría de las almejas están iniciando la gametogénesis.
- 3º- acondicionamiento de “primavera”, empieza en abril, la mayoría de las almejas están en fase avanzada de la gametogénesis y madurez.

Las almejas se acondicionan en tanques de 150 litros a una densidad de 100 almejas por tanque. El agua se renueva continuamente a razón de 50 litros por hora. Las almejas fueron alimentadas con una dieta mixta de microalgas (*Isochrysis sp.*, *Paulova lutheri*, *Skeletonema costatum*, *Chaetoceros calcitrans* y *Tetraselmis suecica*).

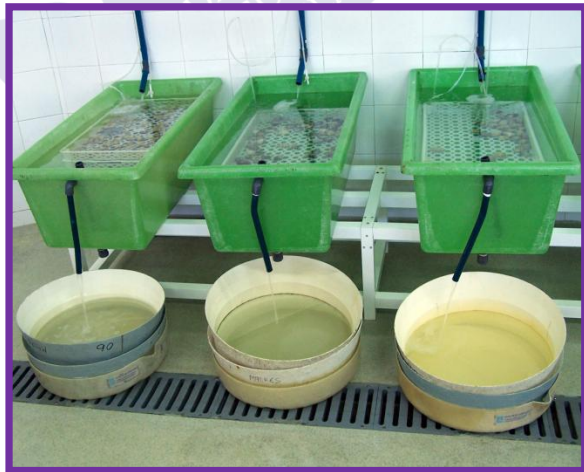


Fig. 4.1. Tanques de acondicionamiento de reproductores.

La cantidad de alimento suministrado diariamente se estableció en peso seco de microalgas como el 4% del peso seco de la vianda de los reproductores, consiguiendo este peso con un aporte proporcional de cada una de las especies, contribuyendo al mismo todas por igual. Se decidió suministrar esta ración de alimento porque según Helm, Bourne y Lovatelli, 2006, la ración alimenticia necesaria para los reproductores

normalmente oscila entre el 2% y el 4%, y las raciones que sobrepasan el 6% no suponen un éxito en el acondicionamiento.

Cada experiencia se realizó por triplicado (Fig. 4.1) y los reproductores se estabularon en el criadero bajo dos regímenes de control de temperatura: uno de ellos con gradiente, subiendo la temperatura de manera progresiva a razón de 0,1°C por día aproximadamente desde la temperatura ambiente hasta los 20°C y el otro régimen con temperatura constante a 20°C desde que empieza el acondicionamiento.

### 4.2.2.- Muestreos durante el acondicionamiento

Antes de empezar cada acondicionamiento, de los reproductores que se recolectan del medio natural, primeramente se separa una muestra de 30 individuos para determinar las condiciones iniciales de partida. Con esta muestra se obtienen los datos biométricos, se calculan los Índices de Condición y se diseccionan las almejas para separar la gónada-masa visceral del resto de la víscera. Con la gónada se hace el estudio histológico para definir la fase del ciclo gonadal y las analíticas bioquímicas para determinar su composición en proteínas, carbohidratos y lípidos. Este estudio se hace siguiendo los mismos pasos descritos en Material y métodos en el capítulo 3 del Ciclo Reprodutor en el Medio Natural.

Después se estabulan las almejas en tanques donde se llevará a cabo el acondicionamiento. A lo largo del proceso, y con una periodicidad mensual, se recoge una muestra de 30 individuos de cada tanque para realizar el seguimiento y se llevan a cabo los mismos estudios y análisis que al inicio de la experiencia. La duración del acondicionamiento se determina por la madurez gonadal y la experiencia se da por terminada cuando se produce el desove de los tanques.

### 4.2.3.- Obtención de desoves

Cuando finaliza el acondicionamiento y las almejas están maduras, los desoves se producen de forma espontánea o inducida (Fig. 4.2). Los tanques donde se realizan las pruebas de acondicionamiento están en circuito abierto, la salida del agua se recoge



Fig. 4.2. Reproductor de almeja fina desovando.

en dos tamices superpuestos, el superior de 120 micras, donde se recogen los desechos producidos por las propias almejas y el inferior de 45 micras, donde quedarían retenidos los huevos o larvas, en caso de un desove espontáneo de los reproductores. Si después de determinar histológicamente que las almejas están maduras no se produce un desove espontáneo, se realiza la inducción a la puesta para provocar el desove.

La técnica de la inducción a la puesta consiste en colocar los reproductores en una bandeja circular de 5 cm de altura y 60 cm de diámetro (Fig. 4.3). Las almejas se colocan sobre un fondo negro que nos facilita la observación de la emisión de gametos de color blanco.



Fig. 4.3. Inducción a la puesta.

Se somete a las almejas a cambios bruscos de temperatura a intervalos de media hora cada uno. Se empieza con agua fría (10°C) y después agua caliente (28°C). Cuando la temperatura baja a 22-24°C, se añaden microalgas para estimular el desove. Si pasado un tiempo (1-2 horas) no se produce la emisión de gametos, se repiten los ciclos de agua fría y caliente.

#### 4.2.4.- Índices de Condición

Se calculan los mismos Índices de Condición que se usaron en el capítulo del Ciclo Reproductivo en el Medio Natural.

ICF= relaciona el peso fresco de la carne con el peso fresco total.

ICS= relaciona el peso seco de la carne con el peso seco de la concha.

ICG= relaciona el peso seco de la gónada con el peso seco de la carne.

#### 4.2.5.- Métodos estadísticos

El análisis estadístico de los resultados se realizó utilizando el paquete estadístico SPSS® para Windows, versión 15.0. El Índice de Condición somático fresco en los

acondicionamientos, con dos regímenes de temperatura en las distintas épocas del año, se han comparado mediante un test de análisis de varianza (ANOVA). Se utilizó el test de Kolmogorov-Smirnov para el estudio de la normalidad de los datos y, para comprobar la homogeneidad de varianzas, se realizó un test de Barlett. Los Índices de Condición somático y gonadal seco se han comparado mediante el test no paramétrico U de Mann-Whitney debido al tamaño muestral.



## 4.3.- RESULTADOS

### 4.3.1.- Acondicionamiento de otoño

El primer acondicionamiento comienza el 25 de octubre cuando la temperatura del agua de mar estaba en 16,3°C, se realiza un control inicial al día siguiente de su llegada al criadero y dos controles durante el acondicionamiento, uno el 30 de noviembre y otro el 8 de enero.

En la tabla IV.1, se muestra la fecha y la temperatura de los tanques al inicio y durante los controles del acondicionamiento, así como la temperatura que hay en esos momentos en el medio natural (MN) donde se recogen los reproductores. Se muestra también la fecha en que se producen los desoves, que es la que se considera como final de la experiencia.

La mortalidad de los reproductores al final del acondicionamiento fue del 5% y 6%, respectivamente para los tanques con subida gradual y con temperatura constante. Desde el inicio del acondicionamiento hasta el primer desove pasaron 100 días. Se obtuvieron 8.765.000 huevos de las almejas sometidas a subida gradual de la temperatura y 6.520.000 de las que estuvieron a temperatura constante.

*Tabla IV.1. Datos de los muestreos y temperatura del agua durante el acondicionamiento. Temperatura del agua en el medio natural (MN), al inicio del acondicionamiento y en el primer (1<sup>er</sup> C) y segundo control (2<sup>o</sup> C).*

	Temperatura (°C)				Fecha de los controles			Fecha desoves
	MN	Inicio	1 <sup>er</sup> C	2 <sup>o</sup> C	Inicio	1 <sup>er</sup> C	2 <sup>o</sup> C	
Gradiente	16,3	15	18	20	26-oct	30-nov	08-ene	5/6/8-feb
Constante	16,3	20	20	20		01-dic	11-ene	5/12-feb

#### 4.3.1.1.- Datos biométricos

La tabla IV.2 muestra la media y desviación de los datos biométricos (largo, peso fresco total, peso fresco y seco de la concha, peso fresco y seco de la víscera y peso fresco y seco de la gónada) de los reproductores, tanto al inicio como en los dos controles posteriores bajo los dos regímenes de temperatura estudiados.

Todas las almejas utilizadas en el acondicionamiento tienen una talla media superior a 40 mm que es la talla mínima comercial.

Para realizar este acondicionamiento se procesaron 389 almejas, la sex-ratio entre machos y hembras fue de 1:1, sin contar los indeterminados. Al inicio del acondicionamiento el porcentaje de indeterminados era del 59%, este porcentaje fue bajando en los dos controles siguientes: en el primer control los reproductores presentaron un porcentaje medio de indeterminados del 19% y 18% para los tanques con subida gradual de la temperatura y con temperatura constante, respectivamente. En el segundo control este porcentaje fue del 8% en los tanques con subida gradual de la temperatura y del 4% en los tanques con temperatura constante.

La talla media de las almejas es de 43 mm y el peso fresco total de 18,24 g. El peso fresco medio de la gónada al inicio del acondicionamiento era de 0,81 g y al final (dos meses y medio después), fue de 1,69 g para las almejas sometidas a subida gradual de la temperatura y de 1,64 g para las que están a temperatura constante.

Tabla IV.2. Datos biométricos de los reproductores al inicio y sucesivos controles (1<sup>er</sup> C y 2<sup>o</sup> C) durante el acondicionamiento. PFT (peso fresco total); PFC y PSC (peso fresco y seco de la concha); PFV y PSV (peso fresco y seco de la víscera); PFG y PSG (peso fresco y seco de la gónada-masa visceral). RT<sup>a</sup> (régimen de temperatura); GR (subida gradual de la temperatura) y CT (temperatura constante). M=media y D=desviación.

		LARGO (mm)		PFT (g)		PFC (g)		PFV (g)		PFG (g)		PSC (g)		PSV (g)		PSG (g)	
	RT <sup>a</sup>	M	D	M	D	M	D	M	D	M	D	M	D	M	D	M	D
Inicio		43,2	2,97	17,6	3,37	9,69	1,83	3,68	0,82	0,81	0,24	9,20	1,70	0,66		0,21	
1 <sup>er</sup> C	GR	43,5	3,05	19,1	4,51	10,7	2,74	5,09	1,12	1,42	0,38	10,1	2,60	1,01	0,06	0,37	0,03
	CT	43,7	3,34	19,2	4,79	10,7	2,73	4,96	1,30	1,36	0,38	10,2	2,60	1,03	0,07	0,37	0,03
2 <sup>o</sup> C	GR	42,6	2,65	17,9	3,44	10,1	1,99	5,29	1,08	1,69	0,41	9,60	1,90	1,07	0,05	0,45	0,02
	CT	42,1	2,81	17,4	3,72	9,9	2,23	5,05	1,00	1,64	0,46	9,80	1,70	1,03	0,06	0,43	0,01

#### 4.3.1.2.- Índices de Condición

La figura 4.4 representa la evolución de los Índices de Condición frescos y secos durante el acondicionamiento.

Durante este acondicionamiento, los desoves no se producen hasta después de haber realizado el segundo control. En general los Índices de Condición aumentan durante el acondicionamiento y este aumento se observa en los dos muestreos realizados; éste es algo mayor en las almejas que están sometidas a subida gradual de la temperatura que en las que están a temperatura constante, aunque las diferencias entre los dos regímenes de temperatura no son significativas según los análisis estadísticos realizados a un nivel del 95% de confianza. De los tres índices el que más aumenta, en proporción a su valor inicial, es el ICS.

Los valores del Índice de Condición fresco (ICF) aumentan desde 20,89 al inicio del acondicionamiento, hasta 29,6 al final del mismo en los reproductores con gradiente de temperatura, lo que supone un incremento del 41,69%. El incremento en los reproductores con temperatura constante fue del 38,87%. El porcentaje de subida en el primer mes, de finales de octubre a finales de noviembre, es el doble que en el segundo.

El Índice de Condición seco (ICS) aumenta en un 66,81% para los reproductores con gradiente, desde 6,84 al inicio hasta 11,41 al final del acondicionamiento y un 60,38% para los de temperatura constante, donde el valor alcanzado es de 10,97.

Por lo que respecta al Índice de Condición gonadal (ICG) los valores que se obtienen van desde 31,75 al inicio hasta valores de 42,5 y 41,67, en los tanques con gradiente de temperatura y con temperatura constante, respectivamente. Esta subida representa un 33,86% con subida gradual de la temperatura y un 31,24% con temperatura constante.

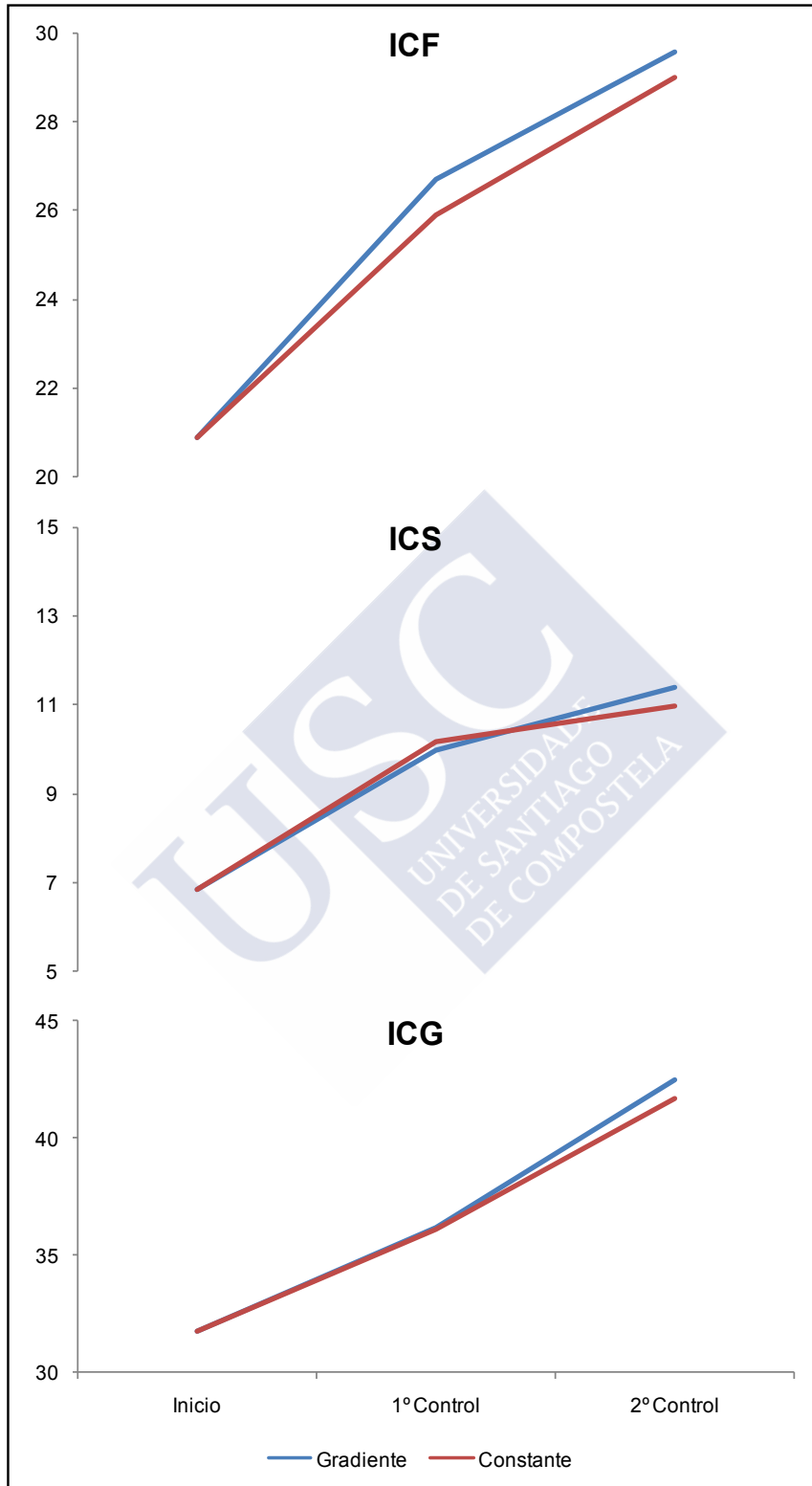


Fig. 4.4. Evolución de los Índices de Condición de las almejas durante el acondicionamiento en el criadero al inicio del mismo y en los dos controles posteriores. ICF e ICS (Índices de Condición Fresco y Seco). ICG (Índice de Condición Gonadal).

### 4.3.1.3.- Ciclo gametogénico

El porcentaje de distribución de los diferentes estadios gonadales observados durante la experiencia de acondicionamiento se representa en la figura 4.5, tanto para los tanques con aumento gradual de la temperatura como los de temperatura constante.

Al inicio del acondicionamiento, más del 50% de las almejas están en fase de reposo (E0), un 34% tienen todavía gametos residuales que quedan en la gónada después de los desoves y sólo un 10% están iniciando la gametogénesis. Un mes más tarde, se observa que algunas almejas están ya maduras (E3), las que tienen un régimen de temperatura constante van más adelantadas que las de gradiente de temperatura con un 35% y 22,3%, respectivamente. Estas últimas tienen todavía un 5% de individuos en fase de reposo.

En el segundo control la mayoría de las almejas están ya en fase de madurez y puesta, están más adelantadas las almejas con temperatura constante, donde se observa que en el 4% de los individuos se pueden ver folículos en fase de postpuesta.

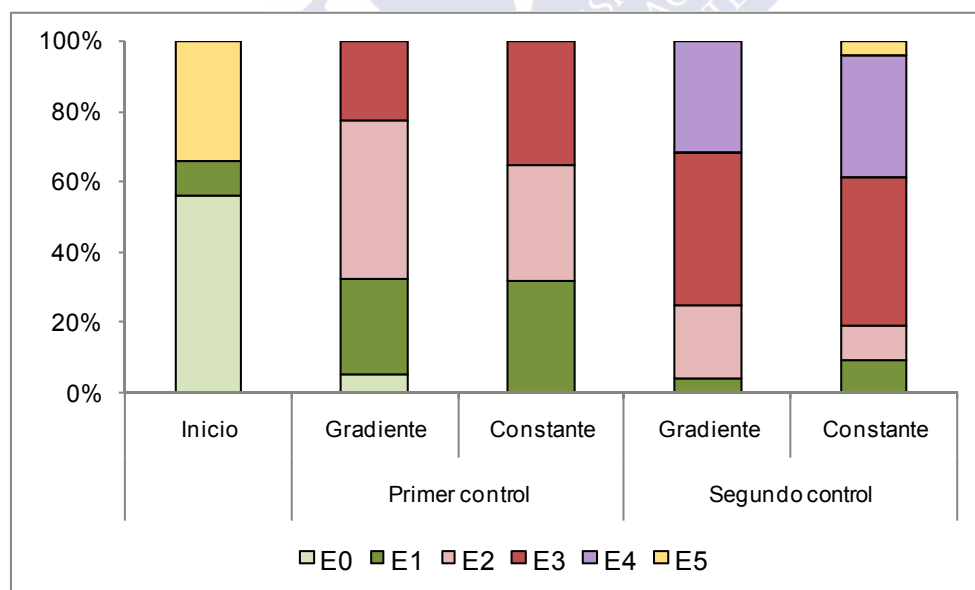


Fig. 4.5. Estadios gonadales al inicio y durante el acondicionamiento bajo las condiciones de temperatura constante o aumento gradual. E0, reposo; E1, inicio de la gametogénesis; E2, desarrollo gametogénico; E3, madurez; E4, puesta y E5, postpuesta.

4.3.1.4.- Composición bioquímica mayoritaria

La tabla IV.3 muestra los contenidos de carbohidratos, proteínas y lípidos (expresado en mg por mg de tejido seco) obtenidos en la gónada-masa visceral. Se analizaron por separado las gónadas de los machos, hembras e individuos de sexo indeterminado (cuando no es posible determinar el sexo por observación al microscopio óptico de un frotis gonadal). Al inicio del acondicionamiento sólo se separaron machos e individuos con sexo indeterminado, en el primer control se separaron los tres grupos y en el control final, sólo machos y hembras.

El componente mayoritario son las proteínas cuyos valores están entre 107,01 y 185,04 mg por gónada-masa visceral. Los valores de los carbohidratos están entre 83,45 y 128,55 mg. Los lípidos son los componentes minoritarios y sus valores oscilan entre 23,68 y 77,07 mg por gónada. En general, y sin tener en cuenta los indeterminados, los machos tienen valores inferiores a las hembras para los tres componentes principales, aunque las mayores diferencias entre sexos se presentan en el contenido en lípidos, le siguen los carbohidratos y por último las proteínas. Las diferencias encontradas entre los dos sexos y bajo los dos regímenes de temperatura, no son estadísticamente significativas al 95% de confianza.

*Tabla IV.3. Composición bioquímica de la gónada-masa visceral de Ruditapes decussatus durante el acondicionamiento, al inicio y en los sucesivos controles (1<sup>er</sup>C y 2<sup>o</sup>C) y con dos regímenes de temperatura: subida gradual "gradiente" y temperatura "constante". El sexo se expresa como: MA= macho, HE= hembra, IN= indeterminado.*

	Sexo	Carbohidratos				Proteínas				Lípidos			
		Gradiente		Constante		Gradiente		Constante		Gradiente		Constante	
		M	D	M	D	M	D	M	D	M	D	M	D
Inicio	MA	83,45	8,67	83,45	8,67	130,69	1,86	130,69	1,86	23,68	0,61	23,68	0,61
	IN	109,01	8,67	109,01	8,67	185,04	0,22	185,04	0,22	34,36	1,43	34,36	1,43
1 <sup>er</sup> C	MA	99,16	6,94	91,93	5,36	140,13	1,97	138,17	9,77	54,21	4,25	46,77	5,24
	HE	128,55	15,26	99,98	8,87	178,41	7,70	143,96	5,70	77,07	9,97	50,01	5,68
	IN	86,08	13,13	105,49	9,13	107,01	3,13	145,48	6,31	43,36	2,51	45,47	6,14
2 <sup>o</sup> C	MA	91,98	8,62	100,72	2,32	166,41	8,85	160,64	8,83	55,46	9,89	55,47	7,04
	HE	100,25	4,10	93,27	4,74	148,84	17,20	150,02	12,33	58,09	1,82	62,27	9,81

En la figura 4.6 se representan las variaciones en la composición bioquímica durante el acondicionamiento, sin diferenciar por sexos y expresadas en porcentaje.

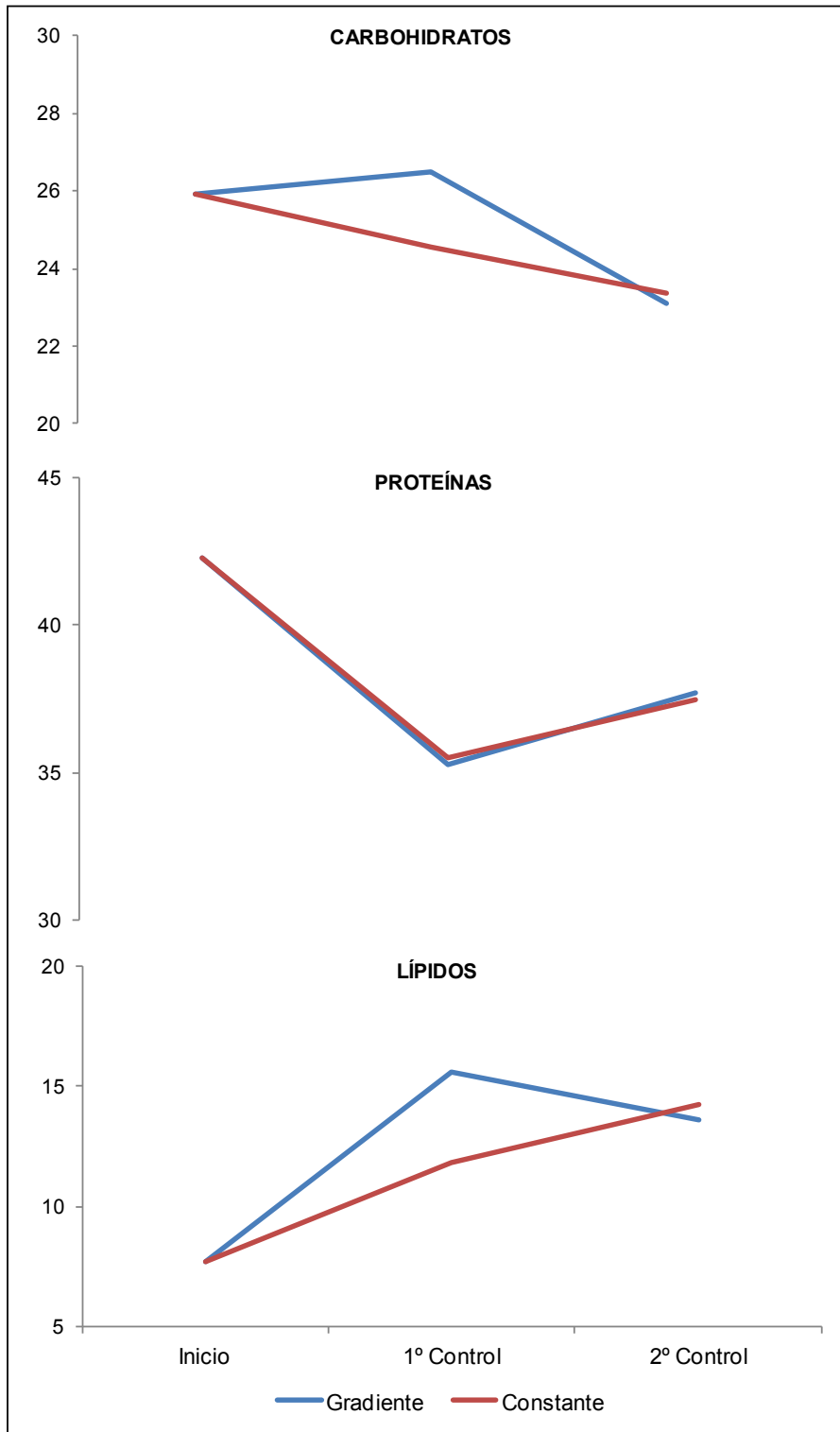


Fig. 4.6. Evolución en la composición bioquímica de la gónada-masa visceral, para los tres componentes mayoritarios durante el acondicionamiento bajo dos regimenes de temperatura diferentes, con subida gradual y con temperatura constante.

Los carbohidratos disminuyen durante el acondicionamiento, esta disminución es del orden del 10-11%. El valor inicial del 25,92% pasa al 23,1% y 23,38% en las almejas con gradiente de temperatura y con temperatura constante, respectivamente.

La evolución de las proteínas es igual que la de los carbohidratos disminuyendo al final del acondicionamiento, desde el 42,26% inicial al 37,72% en las almejas con subida gradual de la temperatura y 37,45% en las almejas con temperatura constante.

En los lípidos hay un fuerte incremento desde el inicio al final del acondicionamiento, prácticamente se duplica su valor desde el 7,7% inicial hasta el 13,64% para las almejas acondicionadas con subida gradual de la temperatura y el 14,26% para las de temperatura constante.



### 4.3.2.- Acondicionamiento de invierno

En el segundo acondicionamiento, los reproductores se llevan al criadero el 2 de febrero cuando la temperatura del agua en el mar es de 12,8°C, se realiza el control inicial y comienza el proceso de acondicionamiento. Se llevan a cabo otros dos controles a lo largo del acondicionamiento, el primero el 5 de marzo y el segundo el 4 de abril. Se consiguen los desoves entre el 15 y el 27 de marzo, por lo que cuando se hace el segundo control las almejas ya habían desovado. La duración del acondicionamiento es de 40 días para las almejas que desovan el 15 de marzo y de 52 días para las que desovan el día 27. Se obtuvieron 13.385.000 huevos de las almejas sometidas a una subida gradual de la temperatura y 33.694.000 de las que estuvieron a temperatura constante.

En la siguiente tabla (Tabla IV.4) se exponen las fechas de muestreo y la temperatura de los tanques al inicio y durante los controles del acondicionamiento que, al igual que en el acondicionamiento de otoño, tres tanques se someten a un aumento gradual de la temperatura y los otros tres, se mantienen a temperatura constante (20°C). También se muestra la temperatura que había en ese momento en el medio natural. Se añade además la fecha en que se producen los desoves, que es la que se considera como final de la experiencia.

La mortalidad de los reproductores al final del acondicionamiento fue de 11% para los tanques con subida gradual de la temperatura y de 19% para los tanques con temperatura constante.

*Tabla IV.4. Muestreos y temperatura del agua durante el acondicionamiento, al inicio y en los dos controles posteriores (1<sup>er</sup> C y 2<sup>o</sup> C) y temperatura del agua del mar en el medio natural (MN) cuando se recogen los reproductores.*

	Temperatura (°C)				Fecha de los controles			Fecha desoves
	MN	Inicio	1 <sup>er</sup> C	2 <sup>o</sup> C	Inicio	1 <sup>er</sup> C	2 <sup>o</sup> C	
Gradiente	12,8	14	17	20	05-feb	05-mar	04-abr	27-mar
Constante	12,8	20	20	20		08-mar	09-abr	15-mar

4.3.2.1.- Datos biométricos

La tabla IV.5 muestra los datos biométricos de los reproductores tanto al inicio como en los dos controles posteriores. Al hacer la prueba por triplicado para cada condición de temperatura, el dato que se muestra es la media y la desviación de los tres tanques.

Todas las almejas utilizadas en el acondicionamiento tienen una talla media superior a 40 mm que es la talla mínima comercial.

Para la realización de este acondicionamiento se procesaron 367 almejas, siendo la sex-ratio de 1:1; sólo se encontraron individuos indeterminados al inicio del acondicionamiento (100%), en los sucesivos controles el sexo ya se diferenciaba perfectamente en la observación en fresco de un frotis gonadal.

*Tabla IV.5. Datos biométricos medios de los reproductores al inicio y sucesivos controles (1<sup>er</sup> C y 2<sup>o</sup> C) durante el acondicionamiento. PFT (peso fresco total); PFC y PSC (peso fresco y seco de la concha); PFV y PSV (peso fresco y seco de la víscera); PFG y PSG (peso fresco y seco de la gónada-masa visceral). RT<sup>a</sup> (régimen de temperatura), GR (con subida gradual de la temperatura) y CT (con temperatura constante). M= media y D= desviación.*

		LARGO		PFT		PFC		PFV		PFG		PSC		PSV		PSG	
		(mm)		(g)		(g)		(g)		(g)		(g)		(g)		(g)	
RT <sup>a</sup>		M	D	M	D	M	D	M	D	M	D	M	D	M	D	M	D
Inicio		41,7	2,56	16,4	2,76	9,01	1,35	3,48	0,91	0,79	0,25	8,51	1,28	0,63		0,20	
1 <sup>er</sup> C	GR	42,4	2,88	16,7	3,10	9,27	1,69	4,24	0,97	1,29	0,38	8,78	1,61	0,81	0,00	0,32	0,01
	CT	41,3	2,88	15,5	3,29	8,55	1,93	3,99	0,86	1,46	0,38	8,11	1,85	0,72	0,05	0,34	0,03
2 <sup>o</sup> C	GR	43,3	3,46	18,0	4,18	9,76	2,13	4,78	1,42	1,87	0,64	9,25	2,05	0,99	0,18	0,44	0,06
	CT	43,5	3,72	18,5	4,36	10,1	2,28	4,66	1,17	1,84	0,51	9,42	2,14	0,86	0,11	0,39	0,04

La talla media de las almejas es de 42,46 mm y el peso fresco total 17,05 g. El peso fresco de la gónada al inicio del acondicionamiento era de 0,79 g y al finalizar, dos meses después, era de 1,87 g en las almejas con gradiente de temperatura y de 1,84 g en las almejas con temperatura constante.

#### 4.3.2.2.- Índices de Condición

La figura 4.7 representa la evolución de los Índices de Condición frescos y secos durante el acondicionamiento.

Los valores alcanzados al final del acondicionamiento para el ICF e ICS son más altos en las almejas con subida gradual de la temperatura que en las que tienen temperatura constante, estas diferencias se producen sobre todo entre el primer y segundo control, coincidiendo además con el desove de las almejas. El valor del ICG final es el mismo en ambos regímenes de temperatura aunque en el primer control, antes del desove, existe una gran diferencia entre las dos: 40,08 con subida gradual y 48,54 con temperatura constante; a partir de aquí, en las primeras sigue aumentando el índice mientras que en las segundas, el valor desciende.

El Índice de Condición Fresco (ICF), aumenta desde un valor inicial de 21,23% hasta 26,46% en las almejas con subida gradual de temperatura y al 25,16% para las que están con temperatura constante. Las diferencias en el primer control entre ambos regímenes no son significativas, pero en el segundo control sí lo son ( $P= 0,02$ ).

El Índice de Condición Seco (ICS), aumenta un 45,39% en las almejas con subida gradual de la temperatura desde el 7,05 inicial hasta el 10,25 final y un 23,97% en las que tienen temperatura constante, alcanzando un valor de 8,74. Estas diferencias no son significativas al 95% de confianza.

El aumento en el valor del Índice de Condición Gonadal (ICG) al final del acondicionamiento, es similar para todas las almejas acondicionadas en los dos regímenes de temperatura, pasando del 31% inicial al 45% final. Aunque al final del acondicionamiento prácticamente se obtiene el mismo valor, en el primer control las almejas con gradiente de temperatura aumentaron su valor hasta el 39,19% y las de temperatura constante llegaron a 47,54%, esta diferencia entre ambos regímenes es significativa ( $P= 0,000$ ).

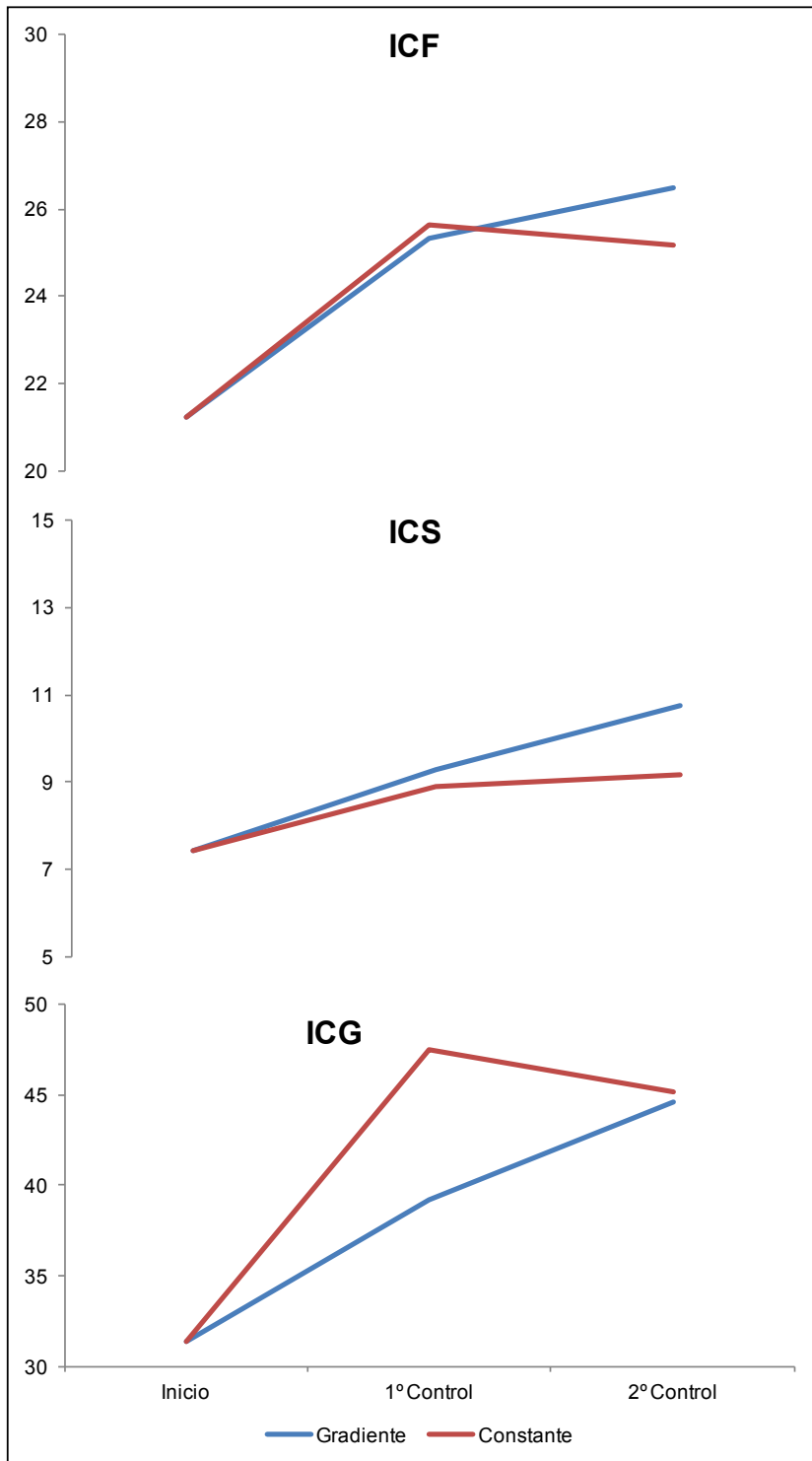


Fig. 4.7. Evolución de los Índices de Condición de las almejas durante el acondicionamiento, al inicio del mismo y en los dos controles posteriores. ICF e ICS (Índices de Condición Fresco y Seco). ICG (Índice de Condición Gonadal).

### 4.3.2.3.- Ciclo gametogénico

Cuando empieza el acondicionamiento en el mes de febrero, casi la totalidad de las almejas están en fase de inicio de la gametogénesis (96%), en el primer control un mes más tarde, las almejas que están con subida gradual de la temperatura tienen un 35% de individuos en fase de madurez, el resto, salvo un 1,7% que está todavía en fase de inicio, están en fase avanzada de desarrollo gonadal. Las almejas mantenidas con temperatura constante están más adelantadas en su madurez ya que el 93% de los individuos están maduros.

En el segundo control que se realiza después de que las almejas hayan desovado, el estado gonadal es prácticamente el mismo, tanto en las almejas con subida gradual de la temperatura como con temperatura constante. La mayoría de las almejas están en fase de desove y un porcentaje pequeño (13,7% para las almejas con gradiente de temperatura y 11,7% para las almejas con temperatura constante), están ya en fase de postpuesta (Fig. 4.8).

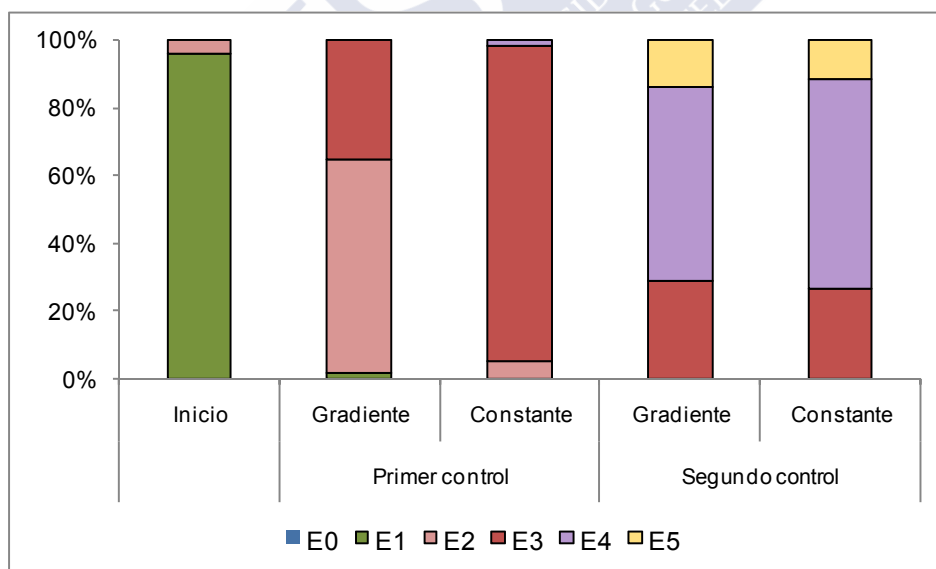


Fig. 4.8. Representación de los estadios gonadales al inicio y durante el acondicionamiento bajo las condiciones de temperatura constante o con aumento gradual. E0, reposo; E1, inicio de la gametogénesis; E2, desarrollo gametogénico; E3, madurez; E4, puesta y E5, postpuesta.

**4.3.2.4.- Composición bioquímica mayoritaria**

La tabla IV.6 muestra los contenidos de carbohidratos, proteínas y lípidos (expresado en mg por mg de peso seco) obtenidos en la gónada-masa visceral. Se analizaron por separado las gónadas de los machos, hembras e individuos de sexo indeterminado (cuando no es posible determinar el sexo en un frotis gonadal).

*Tabla IV.6. Composición bioquímica de la gónada-masa visceral de Ruditapes decussatus durante el acondicionamiento, tanto al inicio como en los sucesivos controles (1<sup>er</sup>C y 2<sup>o</sup> C) y con dos regímenes de temperatura: subida gradual de la temperatura "gradiente" y temperatura "constante". El sexo se expresa como: MA= macho, HE= hembra, IN= indeterminado.*

	Sexo	Carbohidratos				Proteínas				Lípidos			
		Gradiente		Constante		Gradiente		Constante		Gradiente		Constante	
		M	D	M	D	M	D	M	D	M	D	M	D
Inicio	IN	40,50	4,30	40,50	4,30	74,99	3,24	74,99	3,24	12,28	0,84	12,28	0,84
1 <sup>er</sup> C	MA	40,71	2,76	25,36	3,73	163,84	3,38	211,99	6,85	46,30	4,62	46,68	8,18
	HE	40,87	1,07	22,05	1,89	124,73	9,78	184,94	14,73	46,46	3,78	62,83	7,86
2 <sup>o</sup> C	MA	25,46	2,97	14,03	0,23	191,46	14,89	204,93	11,40	40,13	5,33	38,73	3,75
	HE	29,76	2,10	16,09	0,45	182,88	7,25	190,47	16,19	62,76	5,33	62,59	5,39

Al inicio del acondicionamiento, todos los individuos se clasifican como indeterminados ya que al estar en fase de inicio de la gametogénesis, es muy difícil diferenciar el sexo. El contenido en carbohidratos al inicio está en 40,5 mg y al finalizar, el contenido en las hembras es de 29,76 mg y 25,46 mg en los machos para las almejas con gradiente de temperatura. Los valores en las almejas con temperatura constante son de 16,09 mg en las hembras y 14,03 mg en los machos.

Las proteínas son el componente mayoritario subiendo su valor durante el acondicionamiento, pasando de 74,99 mg al inicio del mismo, hasta valores de 191,46 y 182,88 mg para machos y hembras, respectivamente en las almejas con gradiente de temperatura y de 204,93 y 190,47 mg en las almejas con temperatura constante.

Los lípidos presentan al final del acondicionamiento las diferencias más grandes entre machos y hembras, partiendo de un valor inicial de 12,28 mg, los valores finales son similares en ambos regímenes de temperatura; en las almejas con temperatura

constante 38,73 mg en machos y 62,59 mg en hembras y en las almejas con subida gradual de la temperatura 40,13 mg para machos y 62,76 para hembras.

En el primer control las diferencias entre los dos regímenes de temperatura son significativas para las hembras en los tres componentes analizados ( $P < 0.05$ ), y para los machos sólo lo son las proteínas. Al final del acondicionamiento, tanto en hembras como en machos, sólo en la composición en carbohidratos se obtienen diferencias significativas ( $P = 0,10$  y  $0,03$  para hembras y machos, respectivamente).

En la figura 4.9 se representa las variaciones obtenidas en la composición bioquímica de la gónada-masa visceral en los reproductores durante el acondicionamiento, sin diferenciar por sexos. Está expresado en porcentaje.

Los carbohidratos durante el acondicionamiento sufren disminuciones importantes, más acusadas en las almejas con temperatura constante, que pasan de 23,54% al inicio al 3,97% al final. Las almejas con subida gradual de la temperatura terminan el acondicionamiento con un valor del 7,4%.

La composición en proteínas al contrario que los carbohidratos, aumentan su composición desde el 43,59% al inicio del acondicionamiento hasta un 49,86% en las almejas acondicionadas con subida gradual de temperatura y un 51,79% en almejas acondicionadas con temperatura constante.

Los lípidos son el componente bioquímico que más aumenta durante el acondicionamiento, pasando del valor inicial de 7,14% al valor final de 13,28% en almejas con subida gradual y de 11,53% en almejas con temperatura constante.

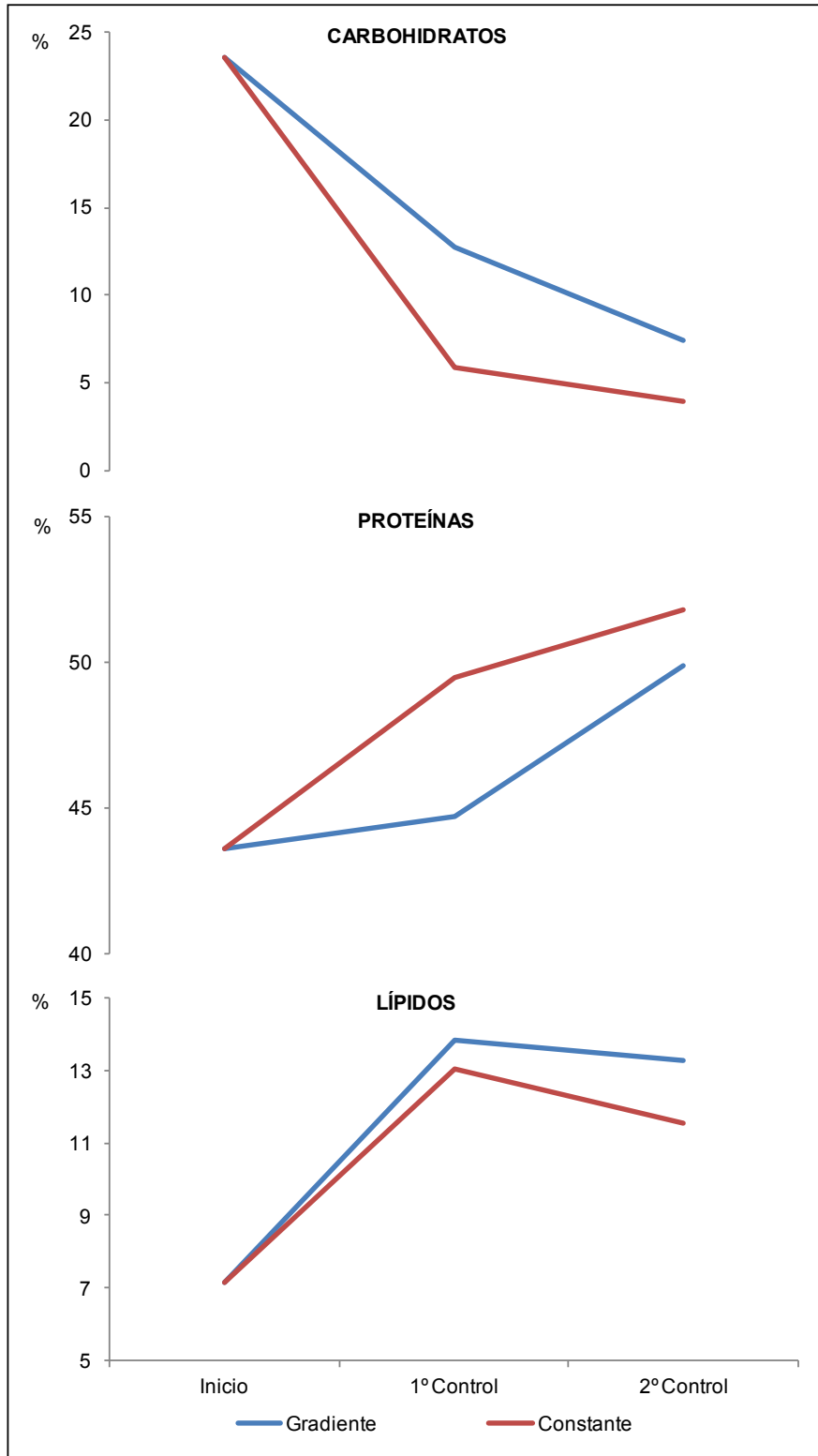


Fig.4.9. Evolución en la composición bioquímica (expresada en porcentaje) de la gónada-masa visceral en reproductores acondicionados en el criadero con dos regímenes de temperatura: constante y con subida gradual (gradiente).

### 4.3.3.- Acondicionamiento de primavera

El tercer acondicionamiento comienza el 16 de abril, cuando la temperatura del agua en el mar es de 14,6°C, se hace el control inicial en el criadero al día siguiente, el primer muestreo, el 11 de mayo y el último, el 8 de junio. Se consiguieron desoves de todos los tanques entre el 28 de mayo y el 7 de junio, por lo tanto, cuando se hace el segundo control, algunas almejas ya habían desovado. La duración media del acondicionamiento fue de 45 días. Se obtuvieron 11.640.000 huevos de las almejas sometidas a una subida gradual de la temperatura y 9.560.000 de las almejas con temperatura constante.

En la siguiente tabla se exponen las fechas de muestreo y la temperatura de los tanques al inicio y durante los controles del acondicionamiento, que al igual que en los dos acondicionamientos anteriores, tres tanques se someten a un aumento gradual de la temperatura y los otros tres se mantienen a temperatura constante (20°C). También se muestra la temperatura que había en ese momento en el medio natural.

En los tanques con subida gradual de la temperatura la mortalidad de los reproductores, al final del acondicionamiento fue del 3%, mientras que en los tanques con temperatura constante, la mortalidad fue del 29%.

*Tabla IV.7. Datos de los muestreos y temperatura del agua durante el acondicionamiento. Empezando con la temperatura del agua en el medio natural (MN), al inicio del acondicionamiento y en el primer y segundo control.*

	Temperatura (°C)				Fecha de los controles			Fecha desoves
	MN	Inicio	1 <sup>er</sup> C	2 <sup>o</sup> C	Inicio	1 <sup>er</sup> C	2 <sup>o</sup> C	
Gradiente	14,6	15	18	20	17-abr	11-may	05-jun	28-may; 4/5-jun
Constante	14,6	20	20	20		16-may	08-jun	2/5/7-jun

#### 4.3.3.1.- Datos biométricos

La siguiente tabla muestra los datos biométricos de los reproductores, tanto al inicio como en los dos controles posteriores.

Todas las almejas utilizadas en el acondicionamiento tienen una talla media superior a 40 mm que es la talla mínima comercial. Se procesaron 388 almejas, en todas fue

posible su determinación sexual en machos y hembras y la sex-ratio fue en este caso de 1,3:1 a favor de los machos.

La talla media de las almejas empleadas en la experiencia es de 41,96 mm y el peso fresco total de 16,78 g. El peso fresco de la gónada-masa visceral era de 0,78 g al inicio del acondicionamiento y de 1,36 g para las almejas con gradiente de temperatura y 1,38 g para las almejas con temperatura constante.

Tabla IV.8. Datos biométricos medios de los reproductores al inicio y sucesivos controles (1<sup>er</sup> C y 2<sup>o</sup> C) durante el acondicionamiento. PFT (peso fresco total); PFC y PSC (peso fresco y seco de la concha); PFV y PSV (peso fresco y seco de la víscera); PFG y PSG (peso fresco y seco de la gónada-masa visceral). RT<sup>a</sup> (régimen de temperatura); GR (con subida gradual de la temperatura) y CT (con temperatura constante). M= media y D= desviación.

	RT <sup>a</sup>	Largo		PFT		PFC		PFV		PFG		PSC		PSV		PSG	
		(mm)		(g)		(g)		(g)		(g)		(g)		(g)		(g)	
		M	D	M	D	M	D	M	D	M	D	M	D	M	D	M	D
Inicio		40,6	2,98	15,2	3,23	8,57	1,80	3,05	0,91	0,78	0,32	8,26	1,63	0,47		0,18	
1 <sup>er</sup> C	GR	42,3	2,98	17,5	3,11	9,76	1,67	4,02	0,89	1,40	0,37	9,29	1,60	0,76	0,05	0,32	0,01
	CT	41,5	2,29	16,4	2,37	9,18	1,38	3,85	0,73	1,48	0,36	8,77	1,33	0,71	0,03	0,35	0,02
2 <sup>o</sup> C	GR	43,4	3,04	18,3	3,58	10,35	2,13	4,03	1,06	1,36	0,41	9,94	2,09	0,73	0,09	0,32	0,05
	CT	41,9	2,47	16,6	2,65	9,47	1,51	4,10	2,85	1,38	0,92	9,03	1,42	0,68	0,07	0,32	0,04

#### 4.3.3.2.- Índices de Condición

La siguiente gráfica (Fig. 4.10) representa la evolución de los Índices de Condición frescos y secos durante el acondicionamiento. ICF= relaciona el peso fresco de la carne con el peso fresco total. ICS= relaciona el peso seco de la carne con el peso seco de la concha. ICG= relaciona el peso seco de la gónada con el peso seco de la carne.

Los tres índices al finalizar el acondicionamiento presentan valores más altos que al comienzo del mismo, aunque la subida se produce durante el primer mes, ya que en el segundo control los valores descienden ligeramente, quizás debido a que las almejas ya habían desovado. Los valores iniciales son similares a los acondicionamientos de

otoño e invierno, lo que indica que en las almejas del medio natural, los valores de los Índices de Condición se mantienen prácticamente en los mismos valores desde octubre a abril.

El Índice de Condición Fresco (ICF), sube desde 20,1 hasta 22,16 para las almejas con subida gradual de la temperatura y 24,53 para las que están con temperatura constante.

La evolución del Índice de Condición Seco (ICS) es prácticamente igual en los dos regímenes de temperatura, incrementando su valor desde 5,45 hasta 7,03 en las almejas con subida gradual y 7,19 en las almejas con temperatura constante y no existen diferencias significativas al 95% de confianza.

En el Índice de Condición Gonadal (ICG) es donde se producen mayores diferencias entre los dos regímenes de temperatura, siendo las almejas con temperatura constante las que presentan los valores más altos en los dos controles del acondicionamiento. En el primer control, la subida de este índice es del 9,65% para las almejas con subida gradual de la temperatura y del 23,73% para las de temperatura constante, estas diferencias son significativas con un valor  $P= 0,014$ . Las diferencias al final del acondicionamiento no son tan grandes porque las primeras almejas suben el valor del índice un poco (1,19%), mientras que en las segundas este índice desciende (2,93%), por eso, al finalizar el acondicionamiento las diferencias no son significativas.

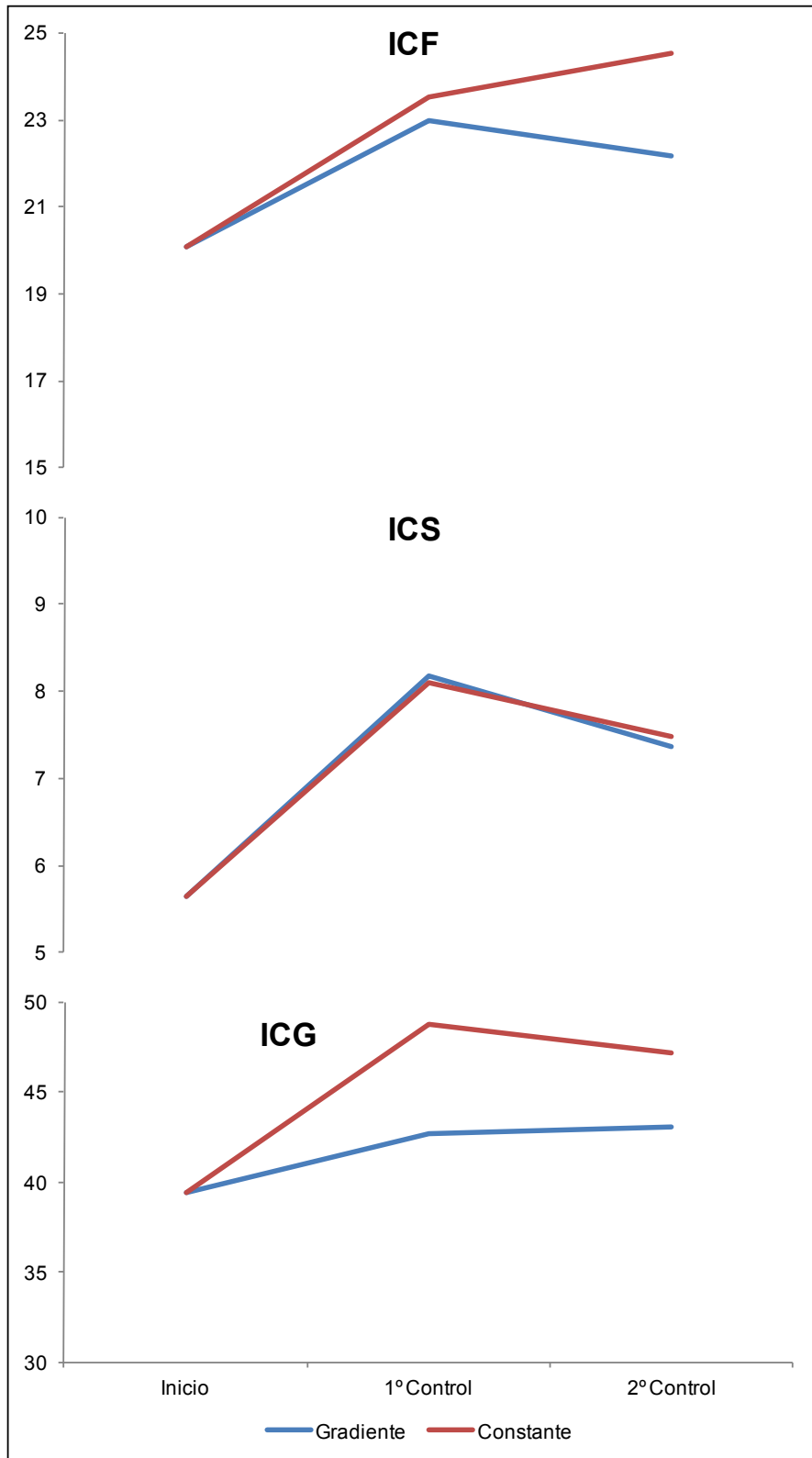


Fig. 4.10. Evolución de los Índices de Condición de las almejas durante el acondicionamiento en el criadero al inicio y en los dos controles posteriores. ICF e ICS (Índices de Condición Fresco y Seco). ICG (Índice de Condición Gonadal).

### 4.3.3.3.- Ciclo gametogénico

Al inicio del acondicionamiento en el mes de abril, la mayoría de las almejas llegaron al criadero en fase de madurez (59%), un 38% estaban en desarrollo gametogénico avanzado y sólo se encontraron un 3% de almejas en el inicio de la gametogénesis.

En el primer control del acondicionamiento realizado un mes después, la situación es similar en los dos regímenes de temperatura (con subida gradual y con temperatura constante). La mayoría de las almejas están ya en fase de puesta (56% y 64% para la subida gradual y la temperatura constante, respectivamente) el resto están en fase de madurez, salvo un porcentaje pequeño que aún permanece en fase avanzada de desarrollo gametogénico: 12% en las almejas con subida gradual de la temperatura y 2% para las que están a temperatura constante.

Cuando se realiza el segundo control del acondicionamiento, algunas almejas ya habían desovado y esto se ve en los cortes histológicos de la gónada, donde el 20% y 24% de las almejas están en fase de postpuesta para las acondicionadas con subida gradual de la temperatura y con temperatura constante, respectivamente.

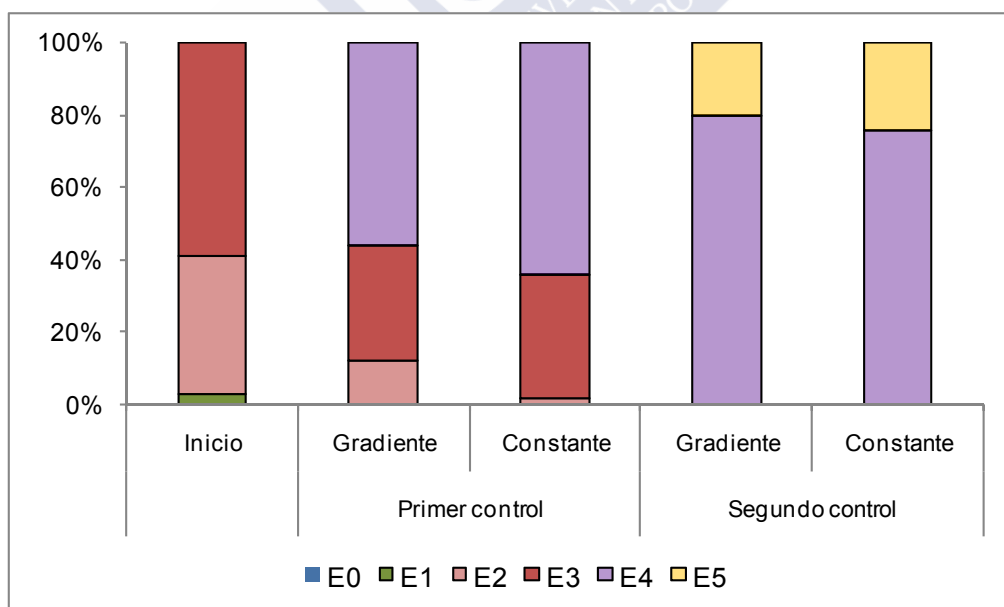


Fig. 4.11. Representación de los estadios gonadales al inicio y durante el acondicionamiento bajo las condiciones de temperatura constante o con aumento gradual (gradiente). E0, reposo; E1, inicio de la gametogénesis; E2, desarrollo gametogénico; E3, madurez; E4, puesta y E5, postpuesta.

#### 4.3.3.4.- Composición bioquímica mayoritaria

La tabla IV.9 muestra el contenido en carbohidratos, lípidos y proteínas en la gónada-masa visceral, expresado en mg por mg de tejido para ambos regímenes de temperatura. Las gónadas de machos y hembras se analizaron separadamente y a diferencia con los otros acondicionamientos, el sexo se diferencia perfectamente en todos los casos por observación al microscopio de un frotis gonadal.

El valor en carbohidratos y lípidos presenta diferencias entre los sexos, siendo siempre más altos en las hembras que en los machos. En las proteínas sucede lo contrario, casi siempre el contenido es mayor en los machos. En los carbohidratos estas diferencias entre sexos se van haciendo más pequeñas conforme avanza el acondicionamiento y los valores totales van disminuyendo, desde unas diferencias del 77% al inicio hasta sólo el 7% en el último control, esto sucede tanto en las condiciones de subida gradual de temperatura como con temperatura constante. Se pasa de valores iniciales de 25,13 mg en los machos y 44.67 mg en las hembras hasta 17,5 mg en machos y 18,8 mg en hembras al final del acondicionamiento, con subida gradual de temperatura y 16,08 mg y 17,47 mg para machos y hembras, respectivamente para las almejas acondicionadas a temperatura constante.

En los lípidos los valores totales aumentan durante el acondicionamiento y las diferencias entre sexos también aumentan, desde el 18% al inicio al 46% al final del mismo. Al inicio los machos tienen 22,49 mg y las hembras 26,61 mg y al final estos valores llegan a 28,74 mg y 36,11 mg para los machos, con aumento gradual de la temperatura y temperatura constante, respectivamente. Las hembras presentan unos valores mucho más altos: 41,97 mg con gradiente de temperatura y 49,74 mg con temperatura constante.

Los resultados de los análisis estadísticos muestran que las diferencias entre ambos regímenes de temperatura, sólo son significativas para las hembras en el primer control en los tres componentes analizados y para los machos sólo en las proteínas. En el control final no existen diferencias ( $P > 0,05$ ).

Tabla IV.9. Composición bioquímica de la gónada-masa visceral de *Ruditapes decussatus* durante el acondicionamiento con dos regímenes de temperatura: subida gradual (gradiente) y temperatura constante. MA= macho, HE= hembra, IN= indeterminado. 1<sup>er</sup> C= primer control y 2<sup>o</sup> C= segundo control.

		Carbohidratos				Proteínas				Lípidos			
		Gradiente		Constante		Gradiente		Constante		Gradiente		Constante	
		Sexo	M	D	M	D	M	D	M	D	M	D	M
Inicio	MA	25,13	1,85	25,13	1,85	139,67	14,27	139,67	14,27	22,49	2,17	22,49	2,17
	HE	44,67	2,70	44,67	2,70	139,05	2,30	139,05	0,00	26,61	4,70	26,61	4,70
1 <sup>er</sup> C	MA	19,80	1,65	17,58	2,13	153,71	5,69	179,69	1,72	32,77	4,00	32,62	3,22
	HE	26,08	1,22	21,40	1,92	134,90	3,63	162,99	7,27	43,85	3,44	57,57	5,47
2 <sup>o</sup> C	MA	17,50	2,46	16,08	1,82	158,42	5,37	170,99	5,32	28,74	4,50	36,11	7,00
	HE	18,80	0,76	17,47	1,63	137,73	7,16	154,17	9,25	41,97	7,27	49,74	3,55

La figura 4.12 representa la evolución de los tres componentes bioquímicos a lo largo del acondicionamiento, usando una media poblacional sin diferenciar por sexos.

En la evolución de la composición de carbohidratos se observa un descenso a lo largo del acondicionamiento, este descenso es más pronunciado desde el inicio al primer control: entre un 38% en las almejas acondicionadas con subida gradual de la temperatura y un 54% en almejas sometidas a temperatura constante.

Los valores de las proteínas se mantienen constantes en un 49% tanto al inicio como al final del acondicionamiento. La tendencia en la evolución de los lípidos es a aumentar, pasando de valores del 8,71% al 12,03% con la subida gradual de temperatura y 13,45% con temperatura constante.

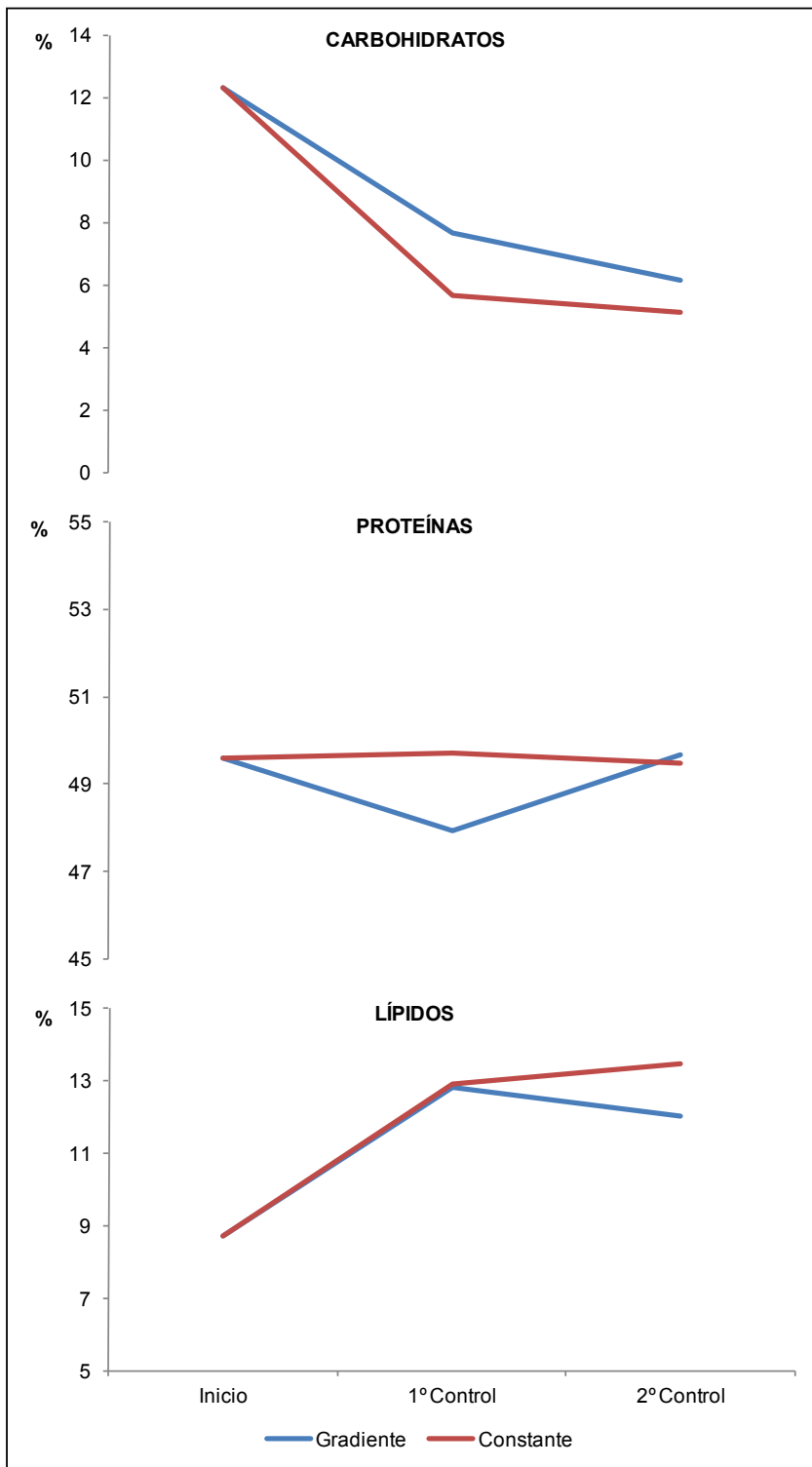


Fig. 4.12. Evolución en la composición bioquímica (expresada en porcentaje) de la gónada-masa visceral en reproductores acondicionados en el criadero con dos regimenes de temperatura.

#### 4.4.- DISCUSIÓN

La temperatura es uno de los principales factores que afectan al ciclo gametogénico de los bivalvos (Mann, 1979; Sastry, 1979; Utting y Millican, 1997). La temperatura parece definir el punto de comienzo y el ritmo del desarrollo gonadal. Está ampliamente aceptado que un aumento en la temperatura del agua de mar puede llevar a la fase de desove (Sastry, 1966; Hamida *et al.*, 2004; Helm, Bourne y Lovatelli, 2006), sin embargo, el tiempo que le lleve alcanzar esta fase depende del estado de maduración gonadal en que se encuentren cuando empieza el acondicionamiento y está influido por la disponibilidad de alimento, así como por la calidad de la dieta y las condiciones del agua de mar durante el acondicionamiento (Sastry, 1966; Lubet, 1981; Utting y Millican, 1997; Delgado y Pérez Camacho, 2003; Helm, Bourne y Lovatelli, 2006).

Existe un umbral mínimo de temperatura para el inicio de la actividad reproductiva en varias especies (Sastry, 1968; Mann, 1979; Shpigel *et al.*, 1992; Chávez-Villalba *et al.*, 2002; Fabioux *et al.*, 2005). Delgado *et al.*, 2007 y Blanco, M.J. en 2010, estudian la influencia de la temperatura en el desarrollo gonadal de *Ruditapes decussatus* de una población de la Ría de Arousa, para determinar la temperatura mínima necesaria a la cual se produce la maduración sexual y concluyen que, el umbral térmico para el desarrollo gonadal en la almeja fina se sitúa a 10°C, temperatura a la que se produce la proliferación de células germinales pero sin que alcancen la maduración (al menos en un período de acondicionamiento ensayado de 66 días), ésta se consigue cuando las almejas se acondicionan a 14°C; en *R. decussatus* a 8°C no se produce desarrollo gonadal, incluso con un adecuado suministro de alimento, confirmándose que una temperatura inferior a 10°C limita el desarrollo gonadal.

Los grados-día (D°) (Mann, 1979) son una unidad que combina temperatura y tiempo y a menudo se utiliza para medir la duración del período de acondicionamiento en bivalvos (Utting y Millican, 1997; Helm, Bourne y Lovatelli, 2006). Si asumimos que el “cero biológico” para la gametogénesis en *Ruditapes decussatus* es de 10°C y que la temperatura media del acondicionamiento es de 20°C, por cada día que transcurre el número de grados-día aumenta en  $20 - 10 = 10$ . En este trabajo, las almejas acondicionadas en octubre desovaron después de 1.030 D° cuando están sometidas a temperatura constante y 937,5 D° cuando están sometidas a un aumento gradual de temperatura. Las almejas acondicionadas en febrero y abril con temperatura

constante, desovaron después de 410 D° y 470 D°, respectivamente; mientras que un incremento gradual de la temperatura rebaja estos datos en 383 D° y 337,5 D°, respectivamente. En los tres acondicionamientos, las almejas que necesitaron menos grados-día fueron las que se sometieron a una subida gradual de la temperatura. Las diferencias en los grados-día dependen de las condiciones de inicio de los reproductores y de la fase de la gametogénesis en que se encuentran cuando se empieza el acondicionamiento.

En las Lagunas de Baldaio, la gametogénesis de *Ruditapes decussatus* comienza en diciembre-enero, después de un período de reposo en noviembre-diciembre; la gónada comienza a madurar a partir de abril, y el principal período de desove ocurre entre junio y agosto, (Ojea *et al.*, 2004). En base a esto, cuando comienza la primera experiencia de acondicionamiento, las almejas están en una fase de reposo gonadal y se necesitó un tiempo bastante largo (14 semanas) para la obtención del desove, aún así se obtuvieron larvas en febrero, cuatro meses antes que en el medio natural donde los primeros desoves se suelen observar en junio. Rodríguez Moscoso *et al.* (1993) constatan que es posible que *R. decussatus* desove en marzo después de 2-3 meses de acondicionamiento.

Además de la temperatura, es importante en el resultado del acondicionamiento el origen geográfico de los reproductores y el momento del año en que se recogen (Matias *et al.*, 2009) ya que esto va a determinar el estado gametogénico de los mismos cuando llegan al criadero.

En el segundo y tercer acondicionamiento el tiempo necesario para el desove fue menor (6-7 semanas) porque la gametogénesis, en los reproductores acondicionados, estaba más avanzada cuando se empezó el experimento, esto concuerda con el trabajo de Helm, Bourne y Lovatelli (2006), donde encuentran que *R. decussatus*, con un adecuado aporte de alimento, necesita entre 4 y 8 semanas (350-650 D°) desde el comienzo del acondicionamiento, al final del invierno o al principio de la primavera, para llegar a desovar. Además del estado fisiológico de las almejas, en el momento de empezar el acondicionamiento, influye también la temperatura a la que se acondicionan (Blanco, 2010), según este trabajo, en un acondicionamiento a 14°C, 18°C y 22°C la aparición de individuos maduros de ambos sexos, se produce a los 27 días a 22°C, a los 33 días a 18°C y a los 60 días a 14°C.

Da Costa *et al.*, 2009, estudiaron el efecto del estadio gametogénico inicial en el acondicionamiento de tres especies de solénidos: *Ensis arcuatus*, *Ensis siliqua* y *Solen marginatus*. Los resultados del acondicionamiento son diferentes dependiendo de la fase del ciclo gametogénico en que se encuentren los reproductores en el momento de comenzar el acondicionamiento. Partiendo de reposo gonadal, en las tres especies no se consigue adelantar la madurez respecto al medio natural, sin embargo si se comienza el acondicionamiento cuando los reproductores están en fase avanzada de la gametogénesis, en las especies *Ensis siliqua* y *Solen marginatus*, se consigue adelantar la madurez en uno o dos meses respecto al medio natural.

Los resultados de esta tesis, junto con otros acondicionamientos llevados a cabo en años anteriores, muestran que la mortalidad es más alta en reproductores acondicionados directamente a 20°C. La mortalidad más baja de los reproductores se obtuvo en el primer acondicionamiento: un 5% en los tanques con subida gradual de la temperatura y un 6% con temperatura constante. En el segundo acondicionamiento, la mortalidad de las almejas fue del 11% en tanques con gradiente de temperatura y un 19% con temperatura constante. En el tercer acondicionamiento la mortalidad fue bastante más alta en los tanques con temperatura constante (29%), mientras que en los tanques con subida gradual fue de un 3%.

De los tres acondicionamientos, en el de otoño las almejas desovan después del último control, por eso, tanto en el primer control como en el segundo, los Índices de Condición van aumentando su valor y aunque las diferencias entre los dos regímenes de temperatura son pequeñas, siempre los valores al final del acondicionamiento son más altos con la subida gradual de la temperatura que con la temperatura constante. En los otros dos acondicionamientos las almejas desovan antes del segundo control y esto se refleja en los índices; entre el inicio y el primer control se produce un desarrollo continuado de la gónada junto con un incremento de los índices, este aumento para el índice gonadal es más grande en las almejas acondicionadas con temperatura constante que las que se someten a una subida gradual de la temperatura, lo que indica que las primeras alcanzan antes la madurez, aunque estos valores al final del acondicionamiento de primavera, reducen las diferencias y son iguales en el acondicionamiento de invierno, esto puede ser debido a que una disminución en los tejidos somáticos en paralelo con un aumento en la gónada, puede llevar a una subestimación del crecimiento gonadal (Laruelle *et al.*, 1994).

Todas las almejas acondicionadas bajo los dos regímenes de temperatura estudiados, aceleraron su maduración sexual respecto a las almejas en el medio natural, ya que en éstas, el índice gonadal permaneció sin apenas variaciones entre los meses de octubre a febrero y hay que esperar hasta el mes de abril para que la mayoría de las almejas estén en fase de madurez.

Delgado y Pérez-Camacho (2007), observan que almejas acondicionadas en el mes de febrero y mantenidas a 14°C en dos meses y medio, sólo el 37% alcanzan la madurez, mientras que a 18°C en el mismo tiempo, el 100% de ellas estarían maduras. Matias *et al.* (2009) realizan dos acondicionamientos en octubre y febrero con almejas procedentes de dos zonas distintas, Galicia y sur de Portugal; el proceso de maduración en octubre fue más rápido en las almejas procedentes de Galicia que de Portugal y más rápido también que en febrero para las dos poblaciones, a diferencia de lo que sucede en los acondicionamientos llevados a cabo en esta tesis, donde el que más tiempo necesitó fue el de octubre.

La tendencia general en la evolución de los componentes bioquímicos durante el acondicionamiento es una bajada de los carbohidratos y una gran subida de los lípidos. En el primer acondicionamiento, los carbohidratos sufren un ligero ascenso hasta el primer control y luego descienden. Mann, 1979, estudió el efecto de la temperatura en la gametogénesis de la almeja japonesa, realizó varios acondicionamientos que empezaron en el mes de noviembre a diferentes temperaturas (12°; 15°; 18° y 21°C) y obtuvo un aumento inicial en el porcentaje de carbohidratos en todas las temperaturas, seguido por un descenso de los mismos asociado al avance de la gametogénesis; además el paso de aumento a disminución de la cantidad de glucógeno, fue más rápido con el incremento de la temperatura.

Las proteínas aunque, en las gráficas se aprecian subidas y bajadas en todos los acondicionamientos, estas oscilaciones son porcentualmente pequeñas (19% como máximo), siendo este componente el que menos varía. Pérez-Camacho *et al.*, 2003 comprueban que la diferenciación sexual es importante en la composición bioquímica de las almejas y está ligada a los procesos de maduración sexual, sobre todo en proteínas y lípidos. En los resultados obtenidos en este trabajo, en general los machos presentan valores inferiores a las hembras sobre todo en los lípidos, las diferencias que existen en este componente entre machos y hembras aumentan a medida que avanza el acondicionamiento; mientras que las diferencias que existen en la composición de carbohidratos entre machos y hembras se hacen menores. Blanco,

2010, concluye que existe una clara diferenciación sexual en la composición bioquímica de *R. decussatus*, que se manifiesta principalmente con un mayor contenido, tanto relativo como absoluto, de lípidos en hembras. Así mismo, en una situación de balance energético cero o moderadamente positivo, se observa un mayor porcentaje de proteínas en machos, diferencias que desaparecen con balances energéticos negativos. Además, un aumento de temperatura durante el acondicionamiento incrementa las diferencias de contenido en lípidos que se producen entre machos y hembras.

Martínez y Pérez, 2003, cuando ensayan 4 regímenes de temperatura (constante a 15°C y 19°C; subida gradual de 15° a 19°C y descenso de 19° a 15°C) en *Argopecten purpuratus*, obtienen que los niveles de proteínas y carbohidratos en el músculo aductor no presentan variaciones significativas entre los cuatro regímenes. Sin embargo los lípidos mostraron patrones diferentes dependiendo del tratamiento. Los individuos mantenidos a temperatura constante de 15°C, presentaron un aumento significativo de lípidos a los 38 días del inicio del acondicionamiento manteniéndose hasta el final; en el tratamiento de la subida gradual de temperatura de 15° a 19°C se observó un incremento de los lípidos a los 54 días. El grupo mantenido a temperatura constante de 19°C mostró un incremento de los lípidos al día 24 y 54, mientras que los individuos sometidos al descenso gradual de temperatura de 19° a 15°C, sólo mostraron un incremento de los lípidos al día 38.

Da Costa *et al.*, 2005, estudiaron la evolución del glucógeno y las proteínas en el acondicionamiento de *Ensis arcuatus* bajo dos regímenes de temperatura y obtuvieron que el glucógeno muestra una tendencia decreciente durante la maduración, sin diferencias entre temperaturas ni sexos. Las proteínas aumentan al madurar la gónada en ambas temperaturas, siendo más importante el aumento en las hembras.





ACONDICIONAMIENTO EN CRIADERO:  
EFECTO DE LA RACIÓN DEL ALIMENTO

---



## 5.- ACONDICIONAMIENTO EN CRIADERO: EFECTO DE LA RACIÓN DEL ALIMENTO

### 5.1.- INTRODUCCIÓN

La gametogénesis es un proceso que se inicia por un aumento en la temperatura del agua, pero el alimento disponible es un factor importante dentro del ciclo reproductivo de los bivalvos, ya que el desarrollo de la gónada es un proceso que requiere energía y la movilización de los nutrientes del alimento ingerido hacia la gónada, es esencial para el desarrollo de los gametos. Además la fecundidad de los bivalvos y la calidad de los huevos producidos aumentan cuando a los reproductores se les proporciona un suplemento de microalgas.

Generalmente una sola especie microalgal es incapaz de satisfacer todos los requerimientos nutritivos de las diferentes especies a alimentar (Abalde y Herrero, 2004), normalmente debido a carencias en compuestos esenciales como aminoácidos o ácidos grasos, por lo que se utilizan dietas con mezclas de varias especies. Aunque algunos trabajos como el de Marín Solórzano *et al.*, 2011, realizado durante los meses de abril-julio del 2010 con la ostra *Crassostrea iridescens* y evaluando diferentes regímenes de alimentación para su acondicionamiento, obtienen mejores resultados con dietas monoespecíficas de las microalgas *Chaetoceros gracilis* y *Tetraselmis maculata*, que con una dieta mixta de las dos algas anteriores, junto con *Isochrysis galbana*.

Diversos autores han estudiado el efecto de la alimentación con microalgas en el acondicionamiento de diferentes moluscos bivalvos: Da Costa *et al.*, 2009, estudiaron el efecto de la alimentación en el acondicionamiento del solénido, *Ensis siliqua* sometiendo a los reproductores a tres raciones diferentes (3%; 6% y 9% del peso seco de las microalgas en relación al peso seco de la carne) de una dieta mixta de varias especies microalgales (*T. suecica*, *I. galbana*, *Paulova lutheri*, *C. calcitrans*, *Phaeodactylum tricornutum* y *Skeletonema costatum*). Martínez-Pita *et al.*, 2011, estudiaron, el efecto de dos raciones (3% y 6%) de una dieta mixta con *T. suecica*, *Chaetoceros* sp. e *I. galbana*, en el desarrollo gonadal de *Callista chione*. Heasman *et al.*, 1996, en *Pecten fumatus* estudiaron el rango de ingestión de varias especies de microalgas (*P. lutheri*, Tahitian *Isochrysis* aff. *galbana*, *Chroomonas salina* y *C. gracilis*). Madrones-Ladja *et al.*, 2002, en *Placuna placenta*, ensayaron dietas con diferentes

concentraciones de *I. galbana* y *T. tetrahele*. Matias *et al.*, 2010, en *Ruditapes decussatus* ensayaron dietas monoespecíficas y mixtas con *I. galbana* y *C. calcitrans*.

El valor nutritivo de una especie microalgal es función de su composición bioquímica. Un mejor conocimiento de la composición química de las microalgas permite una utilización más adecuada y rentable. Se ha estudiado la composición bioquímica de determinadas especies de microalgas usadas como alimento en la acuicultura marina (Mourente *et al.*, 1990; Herrero *et al.*, 1991). La composición bioquímica de las microalgas puede variar sustancialmente de una especie a otra y en función de las condiciones de cultivo y de la propia fase de crecimiento en que se encuentre la microalga al ser cosechada (Webb y Chu, 1983; Fábregas *et al.*, 1985; Nóvoa *et al.*, 1997). Las microalgas poseerán una mayor calidad nutricional cuando se encuentren en fase exponencial (López-Ruiz *et al.*, 1995), ya que en esta fase los ácidos grasos poliinsaturados 20:5(n-3) y 16:3(n-4) están presentes en una mayor proporción.

También se ha observado una variabilidad muy importante en la composición de ácidos grasos de las microalgas marinas (Ackman *et al.*, 1968; Ben-Amotz *et al.*, 1987). Paralelamente a esta variabilidad interespecífica en la composición de ácidos grasos, se ha observado una variabilidad intraespecífica, la cual está afectada por las condiciones del cultivo (Enright *et al.*, 1986a; Mortensen *et al.*, 1988; James *et al.*, 1989; Sukenik *et al.*, 1989). Es conocido en algunas especies el incremento de los ácidos grasos poliinsaturados, concretamente el 22:6(n-3), dependiendo de la tasa de nitrógeno suplementada (Sukenik y Wahnon, 1991).

Los ácidos grasos poliinsaturados de la familia del linolénico (serie n-3) son característicos de los lípidos marinos, mientras que los de la familia del linoléico (serie n-6) predominan en los aceites vegetales y en los animales terrestres. La alta proporción n-3/n-6 en animales marinos puede ser una adaptación a la vida marina (exposición a temperaturas relativamente bajas y constantes a través de su vida), además la presencia de ácidos grasos de la serie n-3 puede asegurar que las biomembranas tengan una fluidez adecuada y puedan realizar sus funciones fisiológicas a bajas temperaturas.

Se sabe que los organismos eucariotas fotosintéticos biosintetizan ácidos grasos poliinsaturados de estas dos series rápidamente por conversión de 18:0, sintetizado *de novo* en 18:1n-9 y, las microalgas marinas igualmente, pueden transformar el ácido graso saturado 16:0 a 16:1n-7 y continuar el proceso de elongación y desaturación a

18:2n-6 ó 18:3n-3 (ácidos linoléico y linolénico, respectivamente). Sin embargo, la bibliografía indica que la mayoría de especies de animales marinos, son incapaces o muy poco capaces de bioconvertir estos dos ácidos grasos y deben proceder de la alimentación, tanto si se trata de peces como de moluscos (De Moreno *et al.*, 1976; Waldock y Holland, 1984). Por lo tanto, estos ácidos grasos son considerados esenciales para la supervivencia, crecimiento y reproducción de moluscos bivalvos marinos (Cowey *et al.*, 1976; Langdon y Waldock, 1981; Uki *et al.*, 1986) y a ellos también hay que unir: el ARA (20:4n-6); EPA (20:5n-3) y DHA (22:6n-3) (Ibeas *et al.*, 1994; Castell, 1983; Chu y Greaves, 1991).

Nóvoa, S. 2007, estudia el metabolismo lipídico en el cultivo larvario de la almeja babosa y en relación a la calidad ovocitaria concluye que un exceso de EPA y DHA (ácidos grasos mayoritarios de la serie n-3) en las reservas ovocitarias y, por lo tanto procedentes de la dieta de los progenitores, podría afectar negativamente al desarrollo larvario, inhibiendo procesos lipogénicos en los que se encuentran implicados enzimas responsables de la síntesis de ácidos grasos de membrana.

El almacenamiento de nutrientes que serán después utilizados en los procesos de desarrollo gonadal, varía según el hábito reproductivo de las especies, (Mann, 1979). Durante la vitelogénesis, utilizan las reservas de glucógeno almacenadas para la síntesis *de novo* de lípidos, (Gabbott, 1983). En especies como *R. philippinarum* y *C. gigas*, la acumulación de carbohidratos es previa a la gametogénesis, y su contenido en los individuos decrece a lo largo del ciclo gametogénico.

En general el glucógeno se considera como la principal fuente de energía en bivalvos como en *Mytilus edulis*, De Zwaan y Zandee, 1972; en *Argopecten irradians concentricus*, Barber y Blake, 1981 o en *C. gigas*, (De La Parra, 2004), donde su consumo total en la reactivación de la gametogénesis indica la utilización de las reservas glucídicas en la síntesis de lípidos durante esta etapa. Los lípidos se usan principalmente durante la gametogénesis y se acumulan sobre todo en los gametos femeninos de los bivalvos adultos (Gabbott, 1983).

En *Pecten maximus*, las proteínas, carbohidratos y lípidos de reserva del músculo aductor y los lípidos de la glándula digestiva, se movilizan y utilizan en el desarrollo gonadal durante el acondicionamiento (Soudant *et al.*, 1996) en respuesta al aumento de temperatura del agua; pero aunque la temperatura inicia los procesos de la gametogénesis, la fecundidad de esta especie y la calidad de los huevos producidos,

aumentan cuando se les da un suplemento de microalgas (Devauchelle y Mingant, 1991).

En *R. decussatus*, el almacenamiento de reservas para sustentar el desarrollo gonadal tiene lugar en el tejido muscular, con ambas fracciones de glucógeno  $\alpha$  y  $\beta$ ; en las células vesiculares, con glucógeno  $\beta$  e inclusiones lipídicas neutras (triacilglicéridos) y en la glándula digestiva con triacilglicéridos, (Rodríguez Moscoso, 2000).

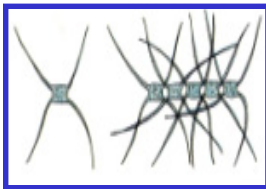
La tasa de ingestión en las almejas resulta ser una función directa de la cantidad de alimento disponible y las variaciones en esta tasa están relacionadas con las fases del ciclo gametogénico, Delgado Fernández, 2001. Las diferencias en las tasas de ingestión procuradas por distintas condiciones alimenticias, son más evidentes al inicio de la experiencia de acondicionamiento, y tienden a desaparecer conforme avanza el mismo; el inicio de la gametogénesis puede implicar un aumento de los requerimientos nutricionales de las almejas y consecuentemente, de su tasa de ingestión de alimento, pero una vez que la gónada alcanza un elevado grado de desarrollo, los requerimientos disminuirían y las tasas de ingestión descenderían paulatinamente. Según Utting y Millican, 1998, en la especie *P. maximus* el porcentaje de partículas filtradas del agua en los tanques de acondicionamiento, decrece al aumentar la ración del alimento suministrado, con una dieta del 3% de peso seco de algas en relación al peso seco de la carne, el porcentaje de filtración fue del 75,3% frente al 40% en una dieta del 9%.

Algunos autores (Martínez *et al.* y Navarro *et al.*, 2000) han estudiado el efecto de la alimentación sobre el acondicionamiento de *A. purpuratus* usando además de las microalgas, suplementos de carbohidratos y lípidos, ya que estos dos componentes bioquímicos tienen gran importancia como fuente de energía durante la gametogénesis para la formación de gametos en casi todos los bivalvos y los mejores resultados, basados en el porcentaje obtenido de animales maduros, los obtienen con la mezcla de microalgas y lípidos.

Uriarte *et al.* (2004), estudiaron el acondicionamiento de *A. purpuratus* y *C. gigas*, usando dietas que contenían microalgas (*I. galbana* y *C. neogracile*), enriquecidas en su composición proteica y mezclas de las mismas microalgas con su composición normal de proteínas y emulsiones lipídicas. Para ambas especies se obtienen mejores resultados en el índice gonadal y en el crecimiento posterior de las larvas, con la alimentación basada en las microalgas con alto valor proteico.

En este capítulo se va a estudiar la influencia de la cantidad de comida en el desarrollo gonadal de la almeja fina, usando una dieta mixta de varias especies microalgales, utilizadas habitualmente en los criaderos de moluscos y que son cultivadas habitualmente en nuestro criadero: *Isochrysis sp.*, y *Monochrysis sp.*, consideradas como básicas para la cría larvaria de moluscos bivalvos (Abalde y Herrero, 2004). *T. suecica*, que es una de las microalgas más utilizadas en acuicultura por sus excelentes cualidades nutritivas y su óptimo crecimiento y también varias especies de diatomeas: *C. calcitrans*, *Skeletonema costatum* y *Phaeodactylum tricornutum*; las dos primeras tienen un gran valor nutricional, mientras que *P. tricornutum*, aunque es más fácil de cultivar, tiene menor valor nutritivo.

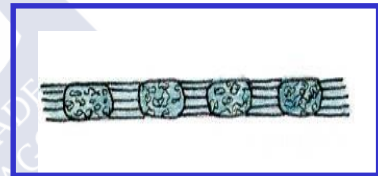
## BACILLARIOPHYCEAE



*Chaetoceros  
calcitrans*



*Phaeodactylum  
tricornutum*



*Skeletonema  
costatum*

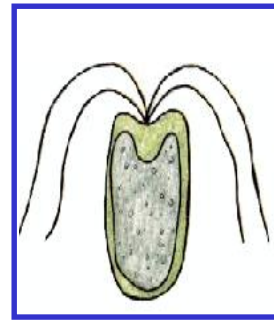
## HAPTOPHYCEAE    CHRYSOPHYCEAE    PRASINOPHYCEAE



*Isochrysis galbana*



*Monochrysis luteri*



*Tetraselmis suecica*

## 5.2.- MATERIAL Y MÉTODOS

### 5.2.1.- Diseño de las experiencias

Las almejas llegan a la planta de cultivo para acondicionar a principios de octubre y son sometidas a los mismos estudios que las usadas para determinar el ciclo gametogénico en el medio natural. De todo el lote se extrae una muestra y en primer lugar, se toman los datos biométricos para el cálculo de los Índices de Condición, luego se separa la concha de la víscera y ésta se disecciona para separar la gónada-masa visceral y someterla al estudio histológico para determinar el momento del ciclo gametogénico en que se encuentran y la determinación bioquímica de los principales componentes: carbohidratos, proteínas y lípidos.

El resto de los reproductores se distribuyen en los tanques de acondicionamiento, donde son sometidos a unas condiciones determinadas. Estos tanques tienen una capacidad de 150 litros, se colocan 112 individuos por tanque, lo que supone 2.000 gramos de peso fresco total en cada tanque. El peso seco de la vianda es el 5% del peso total fresco, lo que implica que en cada tanque tenemos 100 g en peso seco de vianda. La experiencia se realiza por triplicado. Se mantienen en circuito abierto, con una renovación de agua de 32 l/h. La temperatura del agua es de  $19^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Con la misma dieta, en cuanto a composición de microalgas (*Isochrysis sp.*, *Monochrysis sp.*, *Tetraselmis suecica*, *Chaetoceros calcitrans*, *Phaeodactylum tricornutum* y *Skeletonema costatum*), se ensayan dos raciones diarias: a tres tanques se les da una dieta del 3% de peso seco de microalgas, en relación al peso seco de los reproductores y a los otros tres tanques se les da dieta doble (6% de microalgas). Como en cada tanque el peso seco de la vianda son 100 g, para la dieta del 3% hay que aportar 3 g de peso seco de microalgas y 6 g en la dieta del 6%.

### 5.2.2.- Muestreos durante el acondicionamiento

Además del control inicial antes de comenzar el acondicionamiento, se hacen controles periódicos, en noviembre, diciembre y enero, para determinar la evolución del desarrollo gonadal a lo largo del acondicionamiento. Estos controles incluyen, igual que en los acondicionamientos de temperatura, la toma de datos biométricos (largo, alto, grosor, peso total, pesos frescos y secos de la vianda y la concha).

Con estos datos se calculan los Índices de Condición (ICF, relaciona el peso fresco de la carne con el peso fresco total; ICS, relaciona el peso seco de la carne con el peso seco de la concha e ICG, relaciona el peso seco de la gónada con el peso seco de la carne). Los índices son calculados según lo descrito en el apartado 3.2.4 de Material y Métodos dentro del capítulo 3: Ciclo Reproductivo en el Medio Natural.

Se realiza el estudio histológico del ciclo gametogénico y los análisis bioquímicos de la gónada-masa visceral, según el procedimiento descrito en los apartados 3.2.6 y 3.2.7 de Material y métodos del capítulo 3: Ciclo Reproductivo en el Medio Natural.

El acondicionamiento se considerará finalizado no sólo cuando las almejas alcancen la madurez sexual, sino cuando se consigan desoves. Una vez que se comprueba que las almejas están maduras, se comienza a hacer inducción a la puesta mediante shock térmico, con oscilaciones de temperatura de 30°C a 15°C de forma alternativa, tal y como se describe en el apartado 4.2.3 del capítulo 4: Acondicionamiento en Criadero: Efecto de la Temperatura. Se pueden obtener también desoves espontáneos en el propio tanque y para evitar que se pierdan, se colocan tamices a la salida del agua para recoger las larvas.

Los métodos estadísticos usados para el tratamiento de los datos son los mismos que se describen en el apartado 4.2.5 del capítulo 4: Acondicionamiento en Criadero: Efecto de la Temperatura.

### 5.2.3.- Cultivo de las microalgas

La necesidad de cultivar microalgas surge porque el contenido en fitoplancton natural del agua de mar utilizada en el criadero, es insuficiente para garantizar el crecimiento óptimo de las grandes densidades de larvas y juveniles que se cultivan, así como para realizar el acondicionamiento de los reproductores. Además en un criadero, los tratamientos utilizados para limpiar el agua cruda que entra del mar, eliminan prácticamente todo el fitoplancton natural, que luego tiene que ser sustituido por cultivos de las especies preferidas de mayor valor alimenticio.

Cuando se realizan las experiencias de acondicionamiento, el Centro de Cultivos Marinos de Ribadeo dispone básicamente de tres sistemas de cultivo de microalgas: cultivo a pequeña escala, en matraces en una cámara isoterma; cultivo a media escala, en bolsas de plástico de 30-40 litros situadas tanto en una sala dentro del

criadero como en un invernadero y cultivo a gran escala en tanques de fibra de vidrio de 1.500 litros, también situados en el invernadero. El cultivo tiene lugar en dos fases: una fase previa de cultivo en cámara isoterma y la fase definitiva del cultivo, en bolsa de 40 litros.

### 5.2.3.1.- Cultivo de microalgas en matraces

El cultivo se realiza dentro de una cámara isoterma (Fig. 5.1) que mantiene la temperatura ambiente constante entre 18 y 20°C, con luz artificial permanente proveniente de lámparas fluorescentes y un flujo continuo de aire enriquecido con CO<sub>2</sub> al 1%. El agua y los matraces se esterilizan en autoclave a 120°C y se añade un medio de cultivo comercial denominado “algal” compuesto de macroelementos (nitrato potásico y fosfato monosódico), oligoelementos (citrato férrico, cloruro de zinc y de



*Fig. 5.1. Cultivo de fitoplancton en matraces y cámara isoterma.*

manganeso, molibdato sódico, cloruro de cobalto y sulfato de cobre) y vitaminas (tiamina, biotina y cianocobalamina). El cultivo se realiza de forma escalonada, empezando con tubos de 20 ml que se usan para inocular matraces de dos litros, con éstos se inoculan los matraces de 6 y 10 litros. Finalmente el fitoplancton de estos matraces se emplea para inocular las bolsas de plástico.

### 5.2.3.2.- Cultivo de microalgas en bolsas

Dentro del criadero hay una sala destinada al cultivo de fitoplancton en bolsas de plástico de un volumen entre 30-40 litros (Fig. 5.2). Dentro de esta sala la temperatura ambiente es variable, dependiendo de la época del año; la luz es en parte natural y también artificial con el uso de lámparas fluorescentes, y la aireación es normal sin enriquecer con CO<sub>2</sub> con dos flujos continuos en la base de cada bolsa. El agua está filtrada por filtro de arena y cartucho y para favorecer el crecimiento de las microalgas, se usan como nutrientes una solución de traza de metales (hierro, manganeso, zinc, cobre y cobalto), nitrato potásico, fosfato potásico bibásico y EDTA, todo ello disuelto



Fig. 5.2. Cultivo de microalgas en bolsas.

en agua destilada. Además, y en ambos tipos de cultivo, para las especies de microalgas diatomeas o “Bacillariophyceae”, se le añade una solución de silicatos (metasilicato sódico).

### 5.2.3.3.- Métodos bioquímicos

Se ha estudiado la calidad nutritiva de las seis especies de microalgas utilizadas como alimento en los tres sistemas de cultivo empleados en nuestro criadero (matraces, bolsas y tanques de cultivo) Ojea *et al.*, 1999. Las microalgas se recogen para su análisis en la fase exponencial de su curva de crecimiento y los análisis se realizan sobre alícuotas liofilizadas; se determina la composición bioquímica mayoritaria: proteínas, lípidos y carbohidratos, así como la composición en ácidos grasos de los lípidos totales.

La determinación de las proteínas se hace por el método espectrofotométrico de Lowry *et al.* (1951) modificado con la seroalbúmina como estándar, según el procedimiento descrito en el apartado 3.2.7.1. del capítulo 3: Ciclo Reproductivo en el Medio Natural.

Los carbohidratos se analizan por el método espectrofotométrico de la antrona (Fraga, 1956), usando la glucosa como estándar y según el procedimiento descrito en el apartado 3.2.7.2. del capítulo 3: Ciclo Reproductivo en el Medio Natural.

En la cuantificación de los lípidos totales se usa el método espectrofotométrico de Marsh y Weinstein, 1966, con la tripalmitina como estándar, en un rango de concentraciones de 5-50 microgramos para establecer la recta de calibración. La absorbancia se midió a 375 nm en un espectrofotómetro (Perkin Elmer. UV/VIS. Lambda 25).

Los lípidos totales se someten a metilación y los ácidos grasos metilados se inyectan en cromatografía de gases para su posterior identificación y cuantificación, según el método empleado por Marty *et al.*, 1992, según el procedimiento descrito en el apartado 3.2.7.4. del capítulo 3: Ciclo Reproductivo en el Medio Natural.

#### 5.2.3.4.- Cálculo del peso seco de las microalgas

Se calcularon los pesos secos de las seis especies de microalgas que se van a utilizar como alimento en la prueba de acondicionamiento. Las muestras de las microalgas se recogen de la bolsa de cultivo cuando éstas están en su fase exponencial de crecimiento. Se usan tubos de plástico previamente tarados, válidos para introducirlos en una centrífuga. Se hace un recuento de las microalgas presentes en la muestra recogida, usando una cámara de contaje de células y se añade un volumen conocido a los tubos de centrífuga. Se añade también a cada tubo una pequeña cantidad de formiato amónico al 3%, que ayuda a precipitar las células de las microalgas y también sirve para eliminar las sales del agua. A continuación se ponen en la centrífuga a 3.000 rpm, durante 5 minutos, al terminar se retira el sobrenadante y las microalgas precipitadas se guardan en el congelador para su posterior liofilizado. Una vez liofilizadas se pesan los tubos y obtenemos el peso seco de las microalgas.

### 5.3.- RESULTADOS

Desde que se inició el acondicionamiento el primero de octubre se realizaron controles el 8 y 9 de noviembre, el 20 y 21 de diciembre y el 31 de enero. Se consiguieron desoves inducidos el 7 de febrero para las almejas con ración doble y entre el 19 y 21 para las almejas con ración normal. Se obtuvieron 12.817.000 huevos de las almejas alimentadas con la ración del 3% y 22.738.000 de las almejas alimentadas con la ración del 6%.

#### 5.3.1.- Composición bioquímica de las microalgas

Por los resultados obtenidos del análisis bioquímico en los tres sistemas de cultivo se concluye, que el cultivo en bolsa es el más adecuado para su empleo en el criadero. Aunque la concentración celular alcanzada en este sistema es menor que en matraces, la calidad nutricional de las microalgas es mucho mejor, la biomasa microalgal tiene un mayor contenido en proteínas y una mayor riqueza en ácidos grasos poliinsaturados, considerados esenciales para el desarrollo de los moluscos, por este motivo se eligió el fitoplancton cultivado en bolsas para la alimentación de los reproductores durante el acondicionamiento.

En la figura 5.3 se representan los porcentajes en la composición de carbohidratos, proteínas y lípidos para las seis especies de microalgas cultivadas para la alimentación de los reproductores durante el acondicionamiento. En cada una de ellas el componente mayoritario son las proteínas con una media de 46%, la microalga que presenta el porcentaje más alto es *Phaeodactylum* con un 54% y el más bajo es *Chaetoceros* con un 35%. Los lípidos son el segundo componente con un porcentaje medio de 20%, con un valor máximo de 30% para *Isochrysis sp.*, y mínimo de 13% para *Skeletonema*. Los carbohidratos son el componente minoritario en las microalgas, con un valor medio de 6%, siendo *Skeletonema* la microalga que presenta el valor más bajo (3%) y *Monochrysis* el valor más alto (11%).

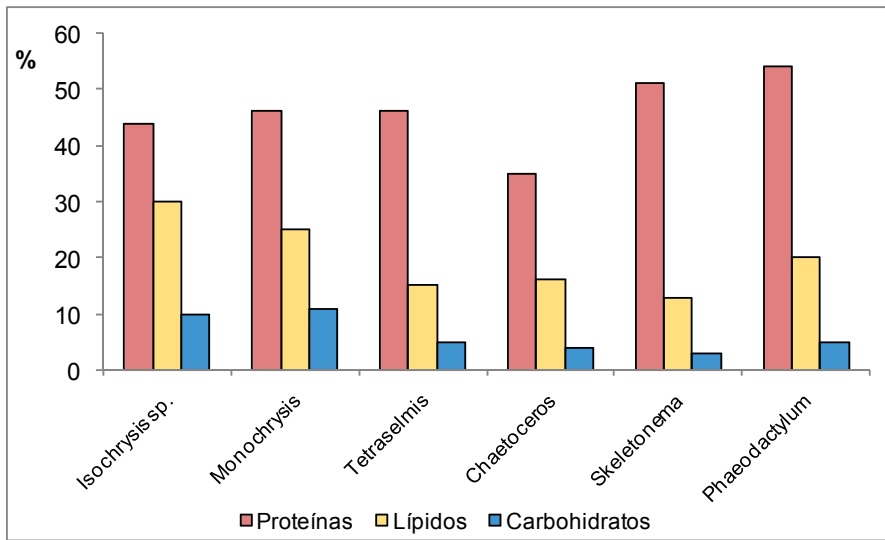


Fig. 5.3. Composición bioquímica de las seis especies de microalgas usadas como alimento durante el acondicionamiento de reproductores.

En la figura 5.4 se representa la composición en ácidos grasos de la mezcla de microalgas utilizada como alimento, destacando el porcentaje elevado de poliinsaturados cuyo ácido graso más importante en esta dieta es el 20:5(n-3). El 22:6(n-3) considerado también esencial, está presente pero en menor proporción.

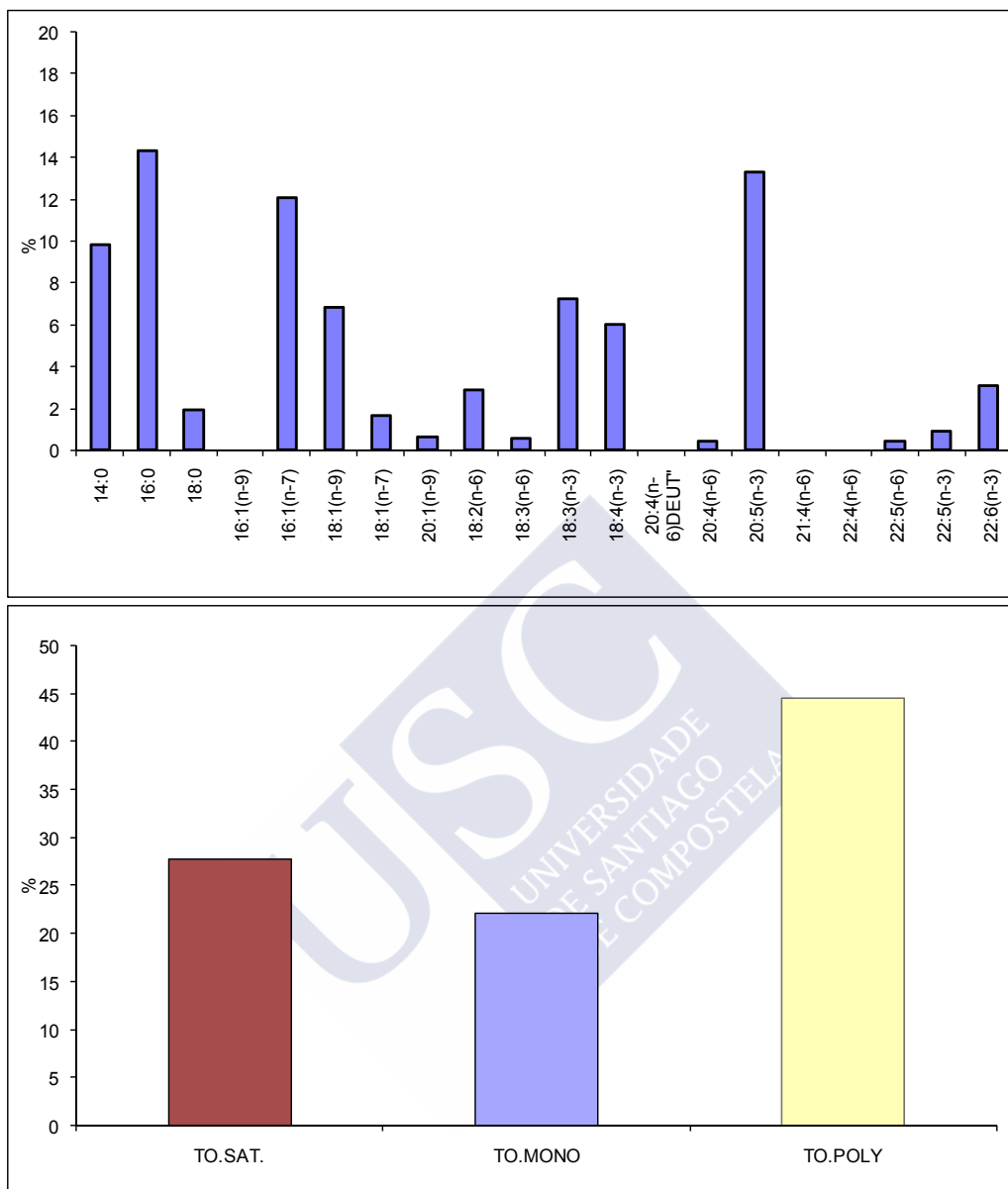


Figura 5.4. Representación de la composición de ácidos grasos en los lípidos totales encontrados en la mezcla de microalgas utilizada para la alimentación de reproductores durante el acondicionamiento.

### 5.3.2.- Datos biométricos

En la siguiente tabla se muestran los datos biométricos de los reproductores empleados en el acondicionamiento, tanto los del control inicial, al comienzo de la experiencia, como los tres controles posteriores. Los reproductores usados son todos de una talla media superior a la talla mínima comercial que está en 40 mm.

## RESULTADOS

Para llevar a cabo este acondicionamiento se procesaron 440 almejas, de las cuales la sex-ratio entre machos y hembras (determinación sexual por observación al microscopio de un frotis gonadal) fue 1:1, sin contar con los indeterminados. Al inicio del acondicionamiento, el 11% de las almejas se clasificaron como indeterminados. En el primer control (un mes después), el porcentaje de indeterminados era del 54% en las almejas con ración normal y de 48% las que tenían ración doble. A los dos meses, mientras que en las almejas con ración normal siguen aumentando los indeterminados (79%), en las que tienen ración doble, bajaron a un 16%. Al finalizar el acondicionamiento, como las almejas están ya maduras, se pueden separar todas en machos y hembras.

*Tabla V.1. Datos biométricos de los reproductores al inicio y sucesivos controles (1<sup>er</sup> C, 2<sup>o</sup> C y 3<sup>er</sup> C) durante el acondicionamiento con diferente ración de comida (RC). PFT (peso fresco total); PFC y PSC (peso fresco y seco de la concha); PFV y PSV (peso fresco y seco de la víscera); PFG y PSG (peso fresco y seco de la gónada-masa visceral). R3 (ración del 3% de microalgas) y R6 (ración del 6% de microalgas). M= media y D= desviación.*

	RC	LARGO		PFT		PFC		PFV		PFG		PSC		PSV		PSG	
		M	D	M	D	M	D	M	D	M	D	M	D	M	D	M	D
Inicio		43,5	1,88	19,0	2,69	10,8	1,52	4,11	0,78	1,08	0,27	10,2	1,51	0,71		0,26	
1 <sup>er</sup> C	R3	42,8	0,11	17,6	1,03	10,4	0,30	4,38	0,14	1,14	0,05	9,84	0,29	0,90	0,04	0,30	0,04
	R6	43,8	0,53	19,3	0,57	10,7	0,74	5,01	0,42	1,42	0,13	10,1	0,99	1,05	0,07	0,37	0,04
2 <sup>o</sup> C	R3	45,2	0,36	21,1	0,58	11,9	0,37	5,47	0,14	1,52	0,11	11,4	0,33	1,19	0,14	0,39	0,03
	R6	44,2	0,53	20,8	0,45	11,8	0,12	6,54	0,47	1,96	0,05	11,3	0,20	1,44	0,02	0,56	0,01
3 <sup>er</sup> C	R3	42,5	0,42	18,7	0,49	10,8	0,27	5,90	0,10	2,07	0,13	10,2	0,25	1,26	0,03	0,55	0,03
	R6	41,7	1,25	18,2	1,90	10,4	1,02	6,16	0,66	2,39	0,35	9,8	0,94	1,37	0,15	0,63	0,09

La talla media de las almejas es de 43,38 mm y el peso fresco total 19,25 g. El peso fresco de la gónada, al inicio del acondicionamiento, es de 1,08 gramos y al final (cuatro meses después), es de 2,07 gramos para los reproductores con dieta 3% y de 2,39 gramos los que tienen dieta 6%. En el primer control a los 30 días del inicio, el peso seco de la gónada aumenta en un 15% para las almejas con ración 3% y un 42% para las almejas con ración 6%. Al final del acondicionamiento (tres meses después) el incremento con la ración normal fue del 111% y de 142% con la ración 6%, aunque en el primer caso el incremento va aumentando mes a mes (15%; 30% y 41%), en el caso

de la ración 6%, el aumento producido en el último control es pequeño en relación con los anteriores (42%; 51% y 12,5%) y en el caso del peso seco de la víscera entera, aunque el resultado final del acondicionamiento es un aumento del mismo, con la ración 6% del segundo al tercer mes, este valor disminuye en un 5%.

### 5.3.3.- Índices de Condición

La figura 5.5 representa la evolución de los tres Índices de Condición estudiados a lo largo del acondicionamiento con las dos raciones alimenticias ensayadas.

Los Índices de Condición de los reproductores sometidos a acondicionamiento sufren un ascenso gradual desde el inicio al final del mismo, el ascenso es mayor para el ICS que aumenta un 76,68% en los reproductores con ración 3% y un 100,72% en los reproductores con ración 6%. Las diferencias en el ICS entre una y otra ración son significativas en los tres controles realizados ( $P < 0,05$ ). Para los tres índices calculados el valor siempre es mayor en los reproductores con ración del 6% de alimento. Para el ICF las diferencias entre los reproductores de una u otra ración de alimento no son significativas ( $P = 0,089$ ) en el primer control, sí lo son tanto en el segundo como en el tercero, con un valor  $P = 0,000$  y  $0,001$  en el segundo y tercer control, respectivamente.

En el ICG en el primer muestreo que se realiza al mes del inicio, se produce un descenso del mismo para las dos raciones, el descenso es de un 6,28% en las almejas con ración 3% y de un 3,4% en las almejas con ración 6%. En este primer control las diferencias encontradas entre las dos raciones no son significativas ( $P = 0,394$ ). En los próximos controles estas diferencias aumentan y hace que sean diferencias significativas con una confianza del 95%. En el segundo control, un mes más tarde, el índice gonadal para las almejas con ración 3% sigue disminuyendo (3,4%) mientras que las de ración 6% aumentan un 21,79% respecto al mes anterior; es en este muestreo cuando las diferencias para el valor de este índice son mayores entre las dos raciones. En el muestreo final las diferencias entre ambas raciones se reducen, ya que las almejas con ración 3% aumentan su índice gonadal un 29,71% respecto al mes anterior, mientras que las que tienen ración 6% sólo lo aumentan en un 6,42%, aún así el valor final es más alto para las almejas con ración 6%.

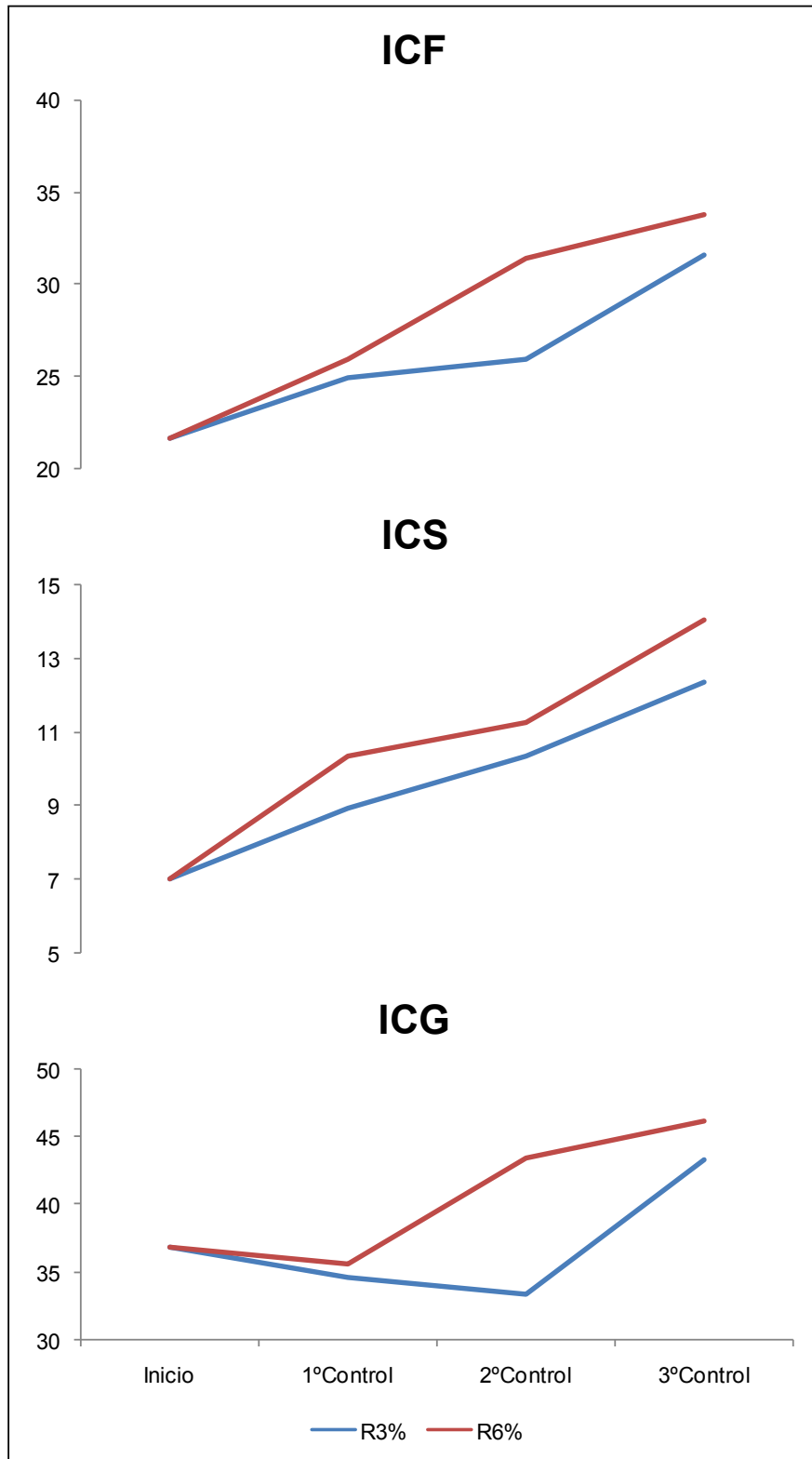


Fig. 5.5. Evolución de los Índices de Condición de las almejas durante el acondicionamiento en el criadero, al inicio del mismo y en los tres controles posteriores. ICF e ICS (Índices de Condición Fresco y Seco). ICG (Índice de Condición Gonadal).

### 5.3.4.- Ciclo gametogénico

La siguiente gráfica representa la evolución del desarrollo gametogénico durante el acondicionamiento, desde las condiciones de los reproductores al inicio del mismo y los cambios producidos en los controles realizados, tanto para los tanques con dieta del 3% como para los tanques con dieta del 6%. En el primer control realizado un mes después del inicio, no se procesaron las muestras para histología ni para las analíticas bioquímicas, porque después de una observación microscópica de frotis gonadal, apenas se veía avance en su desarrollo y se decide no sacrificar más reproductores para que quede un número suficiente al final del acondicionamiento que pueda desovar. Por eso en las gráficas del ciclo gametogénico, así como de la composición bioquímica, se pasa del control inicial al 2º control realizado a los dos meses de empezar el acondicionamiento y el 3º control, a los tres meses desde el inicio.

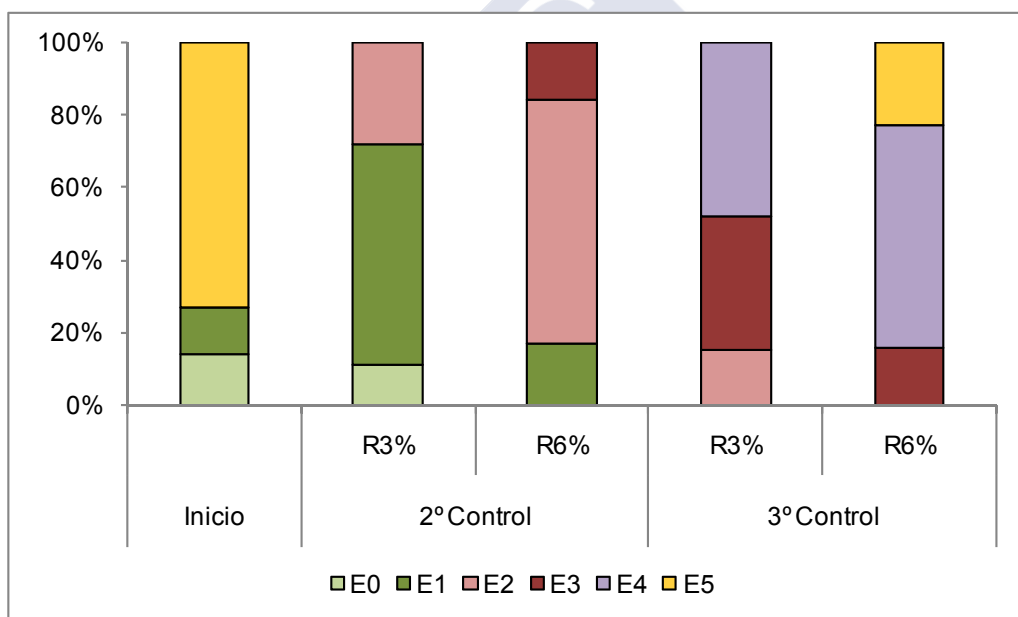


Fig. 5.6. Representación de la evolución del desarrollo gametogénico durante el acondicionamiento. E0 (reposo); E1 (inicio); E2 (desarrollo); E3 (madurez); E4 (puesta) y E5 (postpuesta). Ración de microalgas del 3% y 6%.

Al inicio de la experiencia del acondicionamiento, a principios de octubre, la mayoría de los reproductores (73%) estaban en estado de postpuesta, con la gónada vacía después de los desoves, un 14% estaban en reposo gonadal y un 13% en el inicio de la gametogénesis. En el segundo control, que se hizo después de dos meses y medio de comenzar el acondicionamiento, en los tanques con ración 3%, el 60,67% de las almejas estaban iniciando el desarrollo gonadal, el 28,33% estaban en fase avanzada

de desarrollo gametogénico y el 11% restante permanece aún en reposo gonadal. Las almejas con ración 6% están más avanzadas en su desarrollo, no se encontraron individuos en fase de reposo y sólo entre el 17,33% estaban iniciando la gametogénesis, la mayoría (67%) están en fase avanzada de desarrollo gonadal y se encontraron un 15,67% de los reproductores maduros. En el control final, tres meses después de empezar el acondicionamiento, los reproductores con ración 3% de microalgas, tienen la mayoría de sus individuos (85%) en fase de madurez (37%) y puesta (48%) y queda un 15% en fase avanzada de gametogénesis. Las almejas con ración 6% de microalgas, tienen todos los individuos en las fases de madurez, puesta e incluso, un 23% están ya en fase de postpuesta.

### 5.3.5.- Composición bioquímica mayoritaria

La tabla V.2 muestra los contenidos de carbohidratos, proteínas y lípidos (expresado en mg totales) obtenidos en la gónada-masa visceral. Se analizaron por separado las gónadas de los machos, hembras e individuos de sexo indeterminado (cuando no fue posible determinar el sexo por observación al microscopio óptico de un frotis gonadal). Al inicio del acondicionamiento el sexo se pudo determinar porque en los folículos quedaban células germinales residuales y se separaron machos y hembras; en el primer control, a los dos meses, en las almejas con ración 3% se separaron machos, hembras e indeterminados, mientras que en las almejas alimentadas con ración 6% al estar el desarrollo gonadal más avanzado, ya se pudo observar el sexo en todas las almejas analizadas; en el control final y en las dos raciones utilizadas se separaron machos y hembras.

Desde el inicio al final del acondicionamiento, los tres componentes bioquímicos analizados, aumentan su valor y los valores son siempre mayores para las almejas con ración del 6%. Al inicio del acondicionamiento la cantidad de carbohidratos es mayor en machos (70,92 mg) que en hembras (57,92 mg); con una ración del 3% de microalgas, en el control realizado a los dos meses del inicio, las hembras aumentan los carbohidratos llegando a los 96,01 mg mientras que los machos siguen igual (70,12 mg), al final del acondicionamiento, un mes más tarde, los dos sexos tienen prácticamente la misma cantidad, 104,38 mg los machos y 106,54 mg las hembras. Con una ración del 6%, las cantidades finales son de 146,04 mg y 133,97 mg para machos y hembras, respectivamente.

Tabla V.2. Composición bioquímica de la gónada-masa visceral de *Ruditapes decussatus* durante el acondicionamiento, tanto al inicio como en los sucesivos controles (2<sup>o</sup> C y 3<sup>er</sup> C), con ración del 3% de microalgas y con ración 6%. Expresado en mg totales por gónada. El sexo se expresa como: MA= macho, HE= hembra, IN= indeterminado.

	Sexo	Carbohidratos				Proteínas				Lípidos			
		R3%		R6%		R3%		R6%		R3%		R6%	
		M	D	M	D	M	D	M	D	M	D	M	D
Inicio	MA	70,9	0,48	70,9	0,48	100,3	14,64	100,3	14,64	25,90	4,00	25,90	4,00
	HE	57,9	6,17	57,9	6,17	95,9	9,32	95,90	9,32	27,70	3,46	27,70	3,46
2 <sup>o</sup> C	MA	70,1	7,47	107,3	5,18	87,24	5,33	119,1	3,84	31,82	6,63	45,13	7,53
	HE	96,0	8,54	117,8	14,1	96,17	3,03	129,2	8,67	40,01	7,56	54,39	8,64
	IN	85,8	4,16			101,7	1,82			36,28	4,96		
3 <sup>er</sup> C	MA	104,4	24,6	146,0	8,64	147,8	9,96	196,1	3,63	54,62	11,93	67,16	12,15
	HE	106,5	4,88	133,9	14,4	152,3	6,25	195,9	8,44	61,83	11,59	79,31	11,13

Las proteínas son el componente mayoritario y los mg obtenidos en la gónada-masa visceral son prácticamente los mismos en machos que en hembras, y esto se mantiene desde el inicio al final del acondicionamiento; lo que varía es la cantidad final alcanzada en las dos raciones: en la ración 3% el aumento producido es de media un 53% frente al 100% que aumentan con la ración del 6%.

Los lípidos son el componente minoritario en la gónada-masa visceral con un valor inicial de 25,9 mg en los machos y 27,7 mg en las hembras, pero a lo largo del acondicionamiento es el que proporcionalmente sufre un aumento más elevado, al igual que en las proteínas y carbohidratos, el aumento es mayor en las almejas con una ración del 6% frente al 3% y además las hembras, que al inicio tenían un 7% más de lípidos que los machos, durante el acondicionamiento estas diferencias van aumentando y al final del mismo las hembras con ración 3% tienen un 13% más de lípidos que los machos y las que se alimentaron con ración 6% tienen un 18% más.

Según el análisis estadístico realizado, en el primer control las diferencias en la composición bioquímica de la gónada-masa visceral entre reproductores alimentados con las dos raciones estudiadas son significativas ( $P < 0,05$ ) en los machos para los tres componentes analizados, pero no lo son en las hembras ( $P > 0,05$ ). En el segundo

control las diferencias en machos siguen siendo significativas ( $P= 0,002$ ) para los tres componentes bioquímicos, mientras que en las hembras, son significativas en el caso de proteínas y lípidos, pero no lo son en los hidratos de carbono ( $P=0,132$ ).

En la figura 5.7 se representan las variaciones en la composición bioquímica durante el acondicionamiento, sin diferenciar por sexos y expresadas en porcentaje.

Las proteínas no presentan diferencias entre las almejas con ración normal y doble, en ambos casos sufren oscilaciones durante el acondicionamiento, un descenso del 11% durante los dos primeros meses de acondicionamiento y un aumento del 7% en el tercer mes, se pasa de unos valores iniciales de 36,39% a unos valores finales de 34,46 y 34,70% para las almejas con ración 3% y 6%, respectivamente.

La evolución de los carbohidratos es inversa a las proteínas, en el primer control realizado a los dos meses del inicio del acondicionamiento, se produce un aumento del 15,63% para las almejas con ración 3% y del 22,13% para las almejas con ración 6% y una disminución durante el tercer mes, que hace que las almejas que se alimentan con ración 3% terminen al final del acondicionamiento con los mismos valores que al inicio, mientras que las que se alimentan con una ración doble, terminan con un 6% más de carbohidratos.

Los lípidos durante el acondicionamiento aumentan desde el 10,01% al inicio hasta el 13,41% al final para las almejas con ración 3% y 12,71% con ración 6%. El comportamiento es diferente en ambas raciones alimenticias, las almejas con ración 3% sufren un aumento constante a lo largo del acondicionamiento, un 16% en los dos primeros meses y un 15% en el tercer mes; las almejas con ración 6%, a los dos meses del inicio presentan un aumento del 26,87%, pero en el último mes se mantienen sin aumentar.

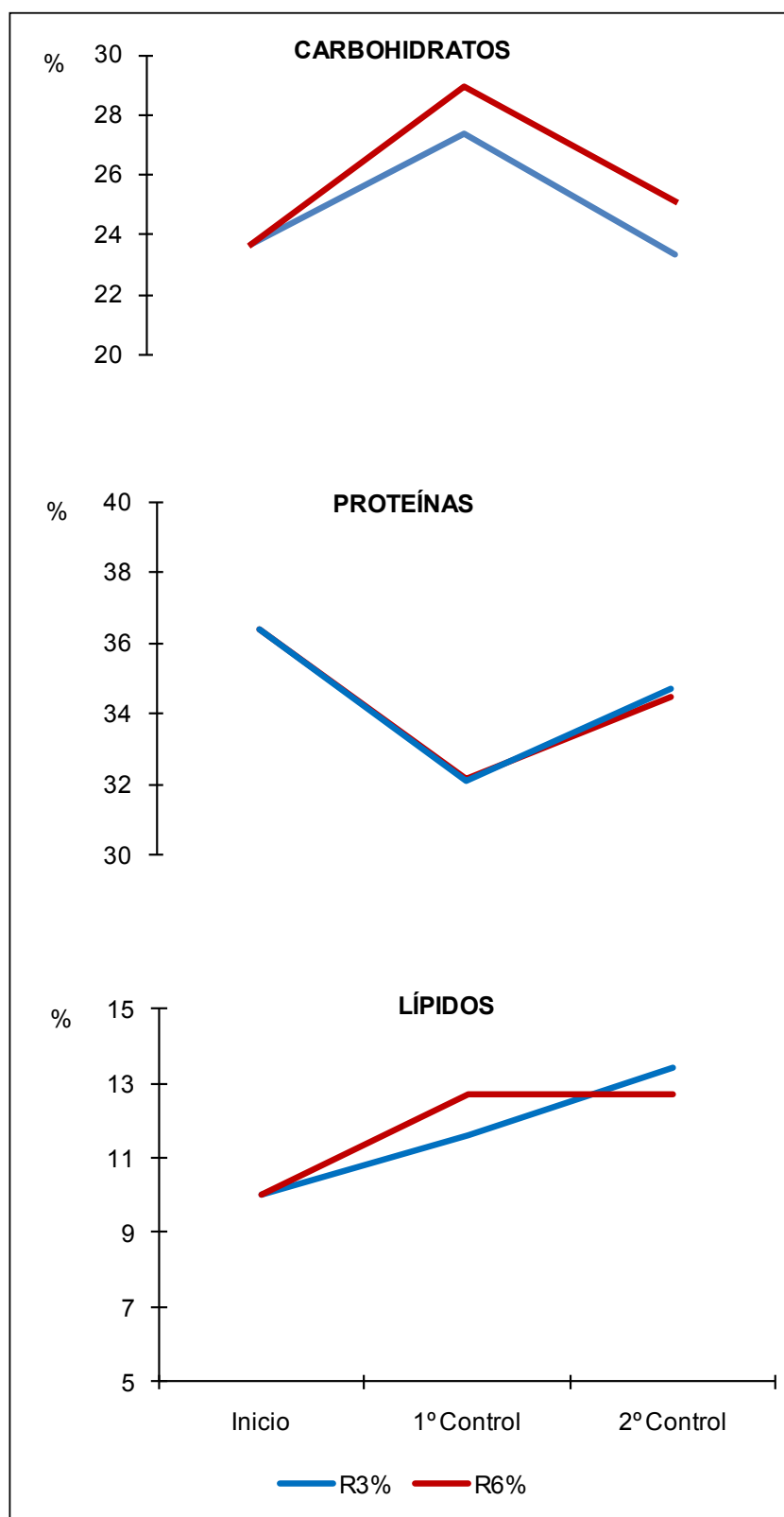


Fig. 5.7. Representación de la evolución en la composición bioquímica de la gónada-masa visceral, para los tres componentes mayoritarios durante el acondicionamiento con ración 3% y 6% de microalgas.

## 5.4.- DISCUSIÓN

Aunque la temperatura, en moluscos bivalvos, inicie el proceso de la gametogénesis, la fecundidad y la calidad de los huevos producidos aumentan cuando se suplementa su acondicionamiento con la adición de microalgas (Devauchelle y Mingant, 1991).

En este estudio se utilizó una dieta mixta de seis microalgas (*Isochrysis sp.*, *Monochrysis sp.*, *Tetraselmis suecica*, *Chaetoceros calcitrans*, *Phaeodactylum tricornutum* y *Skeletonema costatum*) con un alto contenido en proteínas, entre un 46% y un 54%. El contenido en carbohidratos variaba entre el 3% y el 11% y el porcentaje de lípidos variaba entre el 30% y el 11%, con un elevado porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados, fundamentalmente 20:5(n-3). Para obtener un rendimiento óptimo en el cultivo de bivalvos se recomienda una dieta mixta con dos o tres especies diferentes para suministrar todos los nutrientes esenciales. Matias D. *et al.* (2010) han estudiado la influencia de diferentes dietas en el acondicionamiento de la almeja fina y ensayaron varios tipos de alimentación: dietas monoalgales de *I. galbana* y *C. calcitrans* y dietas mixtas con estas dos especies. La microalga *Isochrysis* que cultivan tiene altos contenidos de proteínas y *Chaetoceros* tiene altos contenidos de carbohidratos. Todos los reproductores presentaron un rápido desarrollo gonadal pero los Índices de Condición más altos se consiguieron en aquellos alimentados con la dieta mixta.

Aunque Whyte *et al.* (1990) subrayaban la relevancia de los carbohidratos en la dieta y relacionaban el estado nutricional de las larvas con el mismo, más que con el contenido en lípidos y proteínas, la importancia del contenido en proteínas de las dietas durante el desarrollo gonadal ha sido puesta de manifiesto por diversos autores.

Uriarte *et al.* (2004) ensayaron cuatro tipos de dietas, todas ellas basadas en una dieta mixta de las especies *I. galbana* y *C. neogracile* sobre el acondicionamiento de *Argopecten purpuratus* y *Crassostrea gigas*. Cultivaron estas algas con unas condiciones determinadas para obtener niveles altos, normales o bajos de proteínas. En una cuarta dieta utilizaron una mezcla del 70% de las microalgas con una concentración de proteínas normal y le añadieron un 30% de una emulsión lipídica enriquecida con EPA y DHA. La mejor dieta de todas, para las dos especies, fue la de las microalgas enriquecidas en proteínas, seguido por la mezcla de microalgas y emulsión lipídica que mejoraban la supervivencia y el crecimiento larvario.

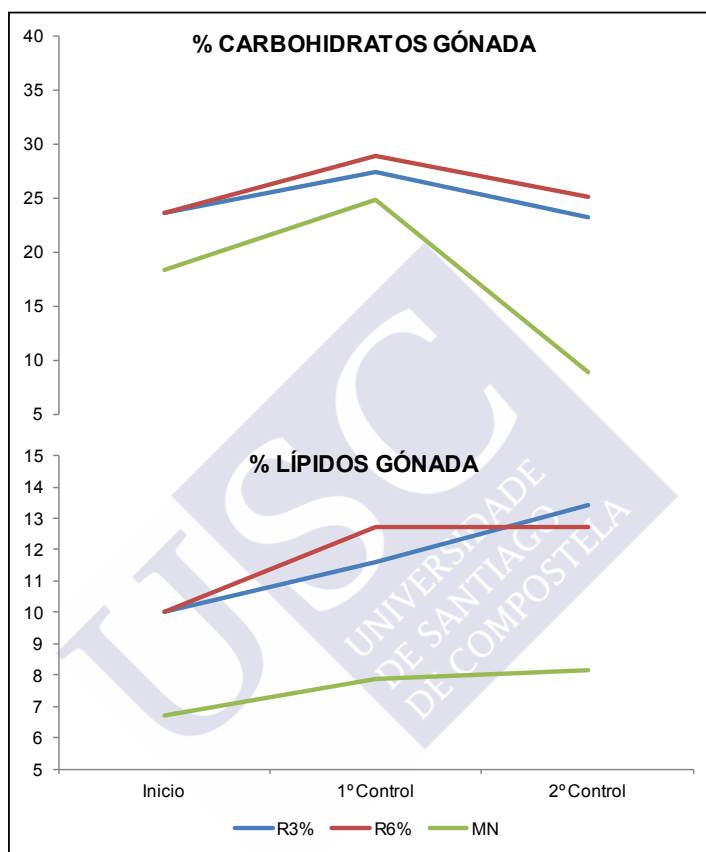
Las dos raciones empleadas en esta tesis se corresponden con una situación de balance energético positivo, ya que en ambas aumenta el peso seco de la víscera. Al final del acondicionamiento el aumento del peso seco fue del 77% en las almejas con ración normal y del 93% en las almejas con ración doble, esto concuerda con lo obtenido por Delgado y Pérez-Camacho, 2003 donde ensayan cinco raciones con diferentes concentraciones de la microalga *I. galbana* (Clone T-Iso) en la almeja fina y observan que el incremento de peso seco de la carne, está directamente relacionado con la cantidad de comida disponible. Las almejas, con una dieta de balance energético positivo, dedican la mayoría de la energía al desarrollo gonadal y el porcentaje de ovocitos maduros aumenta de acuerdo con la cantidad de comida disponible.

El valor de los Índices de Condición en este acondicionamiento fue siempre mayor en los reproductores con ración doble de alimento, así el Índice de Condición Gonadal aumentó un 17,41% con la ración normal y el 25,21% con la ración doble. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por otros autores como Da Costa *et al.*, (2009) que en un estudio sobre el efecto de la alimentación sobre el acondicionamiento del solénido *Ensis siliqua*, utilizando una dieta mixta de seis microalgas y tres concentraciones diferentes: 3%; 6% y 9%, se encontró que los mayores valores del Índice de Condición fueron obtenidos con la dieta del 6% y el mayor porcentaje de individuos en estado de madurez, después de dos meses de acondicionamiento, también se obtuvo con la dieta del 6%.

Martínez-Pita *et al.* (2011) que también estudian el efecto de raciones del 3% y 6% para acondicionar reproductores de *Callista chione* usando una dieta mixta de las especies: *T. suecica*, *Chaetoceros*. sp., e *I. galbana*, llegan a la conclusión de que la ración del 6% es mejor porque se consiguen unos valores del Índice de Condición superiores y, aunque con ambas raciones se produce la maduración gonadal, los ovocitos son más grandes en las hembras alimentadas con una ración del 6%. Además comparan los reproductores acondicionados con reproductores del medio natural y obtienen diferencias significativas para el valor del Índice de Condición entre el grupo alimentado con la ración del 6% respecto a los otros dos grupos, pero no hallan diferencias entre el grupo alimentado con una ración del 3% y los reproductores del medio natural.

En nuestro caso sí encontramos diferencias significativas con el medio natural en el porcentaje de carbohidratos y lípidos de la gónada (Fig. 5.8) que siempre fue más alto en los reproductores acondicionados. Esto puede deberse a una baja concentración

de fitoplacton en el agua de mar en esta época del año, lo que hace que el contenido en carbohidratos en el medio natural disminuya de forma notable durante la maduración gonadal de las almejas, mientras que en las almejas acondicionadas este descenso es mucho menor.



*Fig.5.8. Representación de los porcentajes de carbohidratos y lípidos totales encontrados en la gónada-masa visceral, en el acondicionamiento con dos raciones de alimento y comparándolo con el medio natural.*

En los diferentes acondicionamientos realizados en esta tesis, se pudo comprobar que el estado gametogénico de los reproductores al inicio del acondicionamiento, es primordial ya que va a influir en la duración del mismo. Así, en el acondicionamiento realizado para estudiar el efecto de la ración de alimento y el realizado en otoño para estudiar la influencia del régimen de temperatura, los reproductores se recolectaron en octubre de dos años consecutivos, pero con una diferencia de casi un mes; el de temperatura fue el 25 de octubre y el de alimentación fue el primero de octubre del año siguiente. El estado reproductivo de las almejas era distinto y los resultados del acondicionamiento también fueron diferentes; en el de temperatura, cuando las

almejas llegan al criadero, el 56% están en fase de reposo, un 34% están en fase de postpuesta y el 10% restante en fase de inicio; en el de alimentación, el 73% estaban en fase de postpuesta, un 14% en fase de reposo y un 13% en fase de inicio, lo que significa que, en general, van más atrasadas en su ciclo que las primeras, esto se refleja en la duración de ambos acondicionamientos: en el de temperatura se tardan 100 días en conseguir desoves y en el de alimentación se tardan 140 días con una "ración normal" de microalgas (3%) y 127 días con una "ración doble" (6%).

Siempre que la temperatura sea favorable, la cantidad de comida suministrada a los reproductores de almeja fina, no condiciona el desarrollo gonadal y siempre se produce la maduración gonadal, aunque sí influye en el tiempo que tardan los reproductores en alcanzar esa madurez y la cantidad de gónada generada (Delgado y Camacho, 2005), produciéndose una aceleración en el desarrollo bajo unas condiciones nutricionales más favorables. Partiendo de almejas en reposo o inicio de la gametogénesis, con la dieta más alta se observa desarrollo gonadal a los 21 días de empezar la experiencia, mientras que con una dieta reducida todavía la mitad de los individuos estaban en las fases iniciales del desarrollo gametogénico. Esto también se observa en las dos raciones empleadas en nuestro acondicionamiento ya que después de mes y medio de comenzar, en las almejas alimentadas con ración normal, sólo el 28,33% llegaban a la fase de desarrollo gonadal, mientras que en las alimentadas con ración doble, la mayoría (67%) están en esa fase e incluso se encuentra un 15,67% de reproductores maduros.

En este acondicionamiento, las almejas acumulan carbohidratos durante los dos primeros meses y lo gastan en el último mes. La cantidad de carbohidratos acumulada es siempre mayor en los reproductores alimentados con dieta doble. Cuando se inicia el acondicionamiento los reproductores estaban en fase de postpuesta (73%) y durante los dos primeros meses, apenas se produce avance en la maduración sexual, porque necesitan de un período de reposo para reponerse del desove anterior y prepararse para iniciar de nuevo el ciclo gametogénico. Como ya se indicó en el capítulo 3 de esta tesis, la almeja fina en Galicia tiene una estrategia reproductiva de tipo conservador, el almacenamiento de glucógeno tiene lugar antes de que se inicie la gametogénesis, por eso y aunque la disponibilidad de comida sea buena, primero necesitan acumular energía en forma de carbohidratos para después poder emplearla en la gametogénesis.

Esto concuerda con los resultados de Pérez Camacho *et al.* (2003) estudiando el desarrollo gonadal y la composición bioquímica de la almeja fina. En almejas alimentadas con una dieta de balance energético positivo, los niveles de carbohidratos se incrementan hasta el día 35 en proporción a la ración de comida suministrada y también se incrementan los lípidos, según va avanzando la maduración gonadal sobre todo en las hembras, este incremento es directamente proporcional a la cantidad de alimento disponible, por lo que demuestra el papel de los lípidos como una reserva metabólica en la reproducción, sobre todo de las hembras de almeja fina.

En los acondicionamientos de esta tesis, los lípidos son el otro componente que aumenta considerablemente durante la gametogénesis y el que presenta más diferenciación entre machos y hembras y también entre las almejas alimentadas con ración normal y doble. Con la dieta normal el aumento del porcentaje de lípidos es gradual durante todo el acondicionamiento, mientras que con la dieta doble, los lípidos aumentan en mayor proporción durante los dos primeros meses y después se mantienen alcanzando el mismo nivel que con la dieta normal al final del acondicionamiento. Delgado *et al.* (2004) estudian el papel de los lípidos en el desarrollo gonadal de *Ruditapes decussatus*, y también observan que el contenido de lípidos totales en los tejidos blandos se incrementan con la maduración sexual, las hembras siempre acumulan una mayor cantidad que los machos. También acumulan una mayor cantidad de fosfolípidos, sin embargo, contrariamente el porcentaje de fosfolípidos con respecto a los lípidos totales es siempre más grande en machos, quizás debido a la mayor acumulación de triacilglicéridos en hembras.

Las proteínas durante nuestro acondicionamiento tuvieron un comportamiento inverso a los carbohidratos, en el primer control sufrieron un descenso del 11% y después un aumento del 7% y no hubo diferencias en la cantidad de proteínas entre los reproductores alimentados con dieta normal y dieta doble.



CONCLUSIONES

---



## 6.- CONCLUSIONES

- ❖ La almeja fina en las Lagunas de Baldaio, tiene un ciclo reproductivo anual con un período de reposo de octubre a diciembre. En enero la mayoría de las almejas empiezan la gametogénesis y el período de puesta abarca desde mayo a agosto.
- ❖ El Índice de Condición gonadal va aumentando durante la gametogénesis hasta alcanzar los valores máximos en agosto antes del desove final.
- ❖ Las proteínas son el componente bioquímico mayoritario en todas y cada una de las partes en que se diseccionan las almejas, que son en orden descendente: músculos aductores, sifones, pie, reborde muscular del manto, branquias y gónada-masa visceral.
- ❖ Los carbohidratos son cuantitativamente el segundo componente y la máxima concentración se encuentra en la gónada-masa visceral seguido del reborde muscular del manto, músculo aductor, pie, branquias y sifones.
- ❖ Los lípidos son los componentes minoritarios, la mayor concentración se encuentra en la gónada-masa visceral y la menor, en el músculo aductor.
- ❖ La almeja fina es una especie que, en general, responde bien al acondicionamiento en criadero, consiguiendo adelantar la época del año en que se pueden obtener desoves a partir del mes de febrero.
- ❖ De los factores estudiados en esta tesis, la influencia de los mismos, por orden de importancia, son: el estado inicial de los reproductores, que viene determinado por la época del año en que se recogen del medio natural; la temperatura de acondicionamiento y la alimentación.
- ❖ El otoño no es un buen momento para iniciar los acondicionamientos, los reproductores aún están en reposo gonadal y el tiempo de acondicionamiento necesario para conseguir la maduración de los reproductores es muy largo (entre 100 y 140 días). A partir de enero en el medio natural las almejas empiezan la gametogénesis y es un buen momento para su traslado al criadero y realizar el acondicionamiento.

- ❖ Las almejas acondicionadas a temperatura alta y constante (20°C), presentan un desarrollo gonadal más rápido que las almejas con subida gradual de la temperatura, sobre todo durante el primer mes del acondicionamiento, aunque las diferencias al final, tanto en los Índices de Condición como en los componentes bioquímicos, en general no son estadísticamente significativas.
- ❖ Con raciones de microalgas que supongan un balance energético positivo, todos los reproductores acondicionados maduran y desovan. Aunque los reproductores alimentados con una ración más alta alcanzan mayores valores en sus Índices de Condición, tanto somáticos como gonadales; el desarrollo gametogénico también es más rápido y la cantidad de carbohidratos acumulados es mayor en las almejas con mayor ración de alimento.





## BIBLIOGRAFÍA

---



## 7.- BIBLIOGRAFÍA

- ABAD, M.; RUÍZ, C.; MARTÍNEZ, D.; MOSQUERA, G. y SÁNCHEZ J.L. 1995. Seasonal variations of lipid classes and fatty acids in flat oyster, *Ostrea edulis* from San Cibrao (Galicia, Spain). *Comp. Biochem. Physiol.* 110C: 109-118.
- ABALDE, J. y HERRERO, C. 2004. Microalgas en acuicultura: calidad nutricional. *Algas* 32: 16-18.
- ACKMAN, R.G.; TOCHER, C.S. y LACHLAN, J. 1968. Marine phytoplankton fatty acids. *J. Fish. Res. Board. Canada*, 25 (8): 1603-1620.
- ANÍBAL, J.; ESTEVES, E. y ROCHA, C. 2011. Seasonal variations in gross biochemical composition, percent edibility, and condition index of the clam *Ruditapes decussatus* cultivated in the Ria Formosa (South Portugal). *J. Shellfish Res.* 30, Nº 1: 17-23.
- ANSELL, A.D. 1972. Distribution, growth and seasonal changes in biochemical composition for the bivalve *Donax vittatus* (Da Costa) from Kames Bay, Millport. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 10: 137-150.
- ANSELL, A.D.; LOOSMORE, F.A. y LANDER, K.F. 1964. Studies on the hard-shell clam, *Venus mercenaria*, in the British waters. Vol II. Seasonal cycle in condition and biochemical composition. *J. Appl. Ecol.* 1: 83-95.
- ANSELL, A.D.; FRANKIEL, L. y MOUEZA, L. 1980. Seasonal changes in tissue weight and biochemical composition for the bivalve *Donax trunculus* L. on the Algerian coast. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 45: 105-116.
- ARANDA-BURGOS, J.A. 2010. Desarrollo embrionario y larvario de almeja fina, *Ruditapes decussatus* (Linné, 1758): estudio al microscopio óptico y electrónico de barrido. Trabajo Fin de Máster (TFM). Universidad de Santiago de Compostela. España.

- BARBER, B.J. y BLAKE, N.J. 1981. Energy storage and utilization in relation to gametogenesis in *Argopecten irradians concentricus* (Say). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 52: 121-134.
- BARBER, B.J. y BLAKE, N.J. 1985. Intra-organ biochemical transformations associated with oogenesis in the bay scallop, *Argopecten irradians concentricus* (Say), as indicated by <sup>14</sup>C incorporation. *Biol. Bull.* 168: 39-49.
- BAYNE, B.L. 1976. Aspects of reproduction in bivalve molluscs. In: Viley, M.L. (Ed.), Estuarine processes. *Academic press, New York*, 432-448.
- BEN-AMOTZ, A.; FISHLER, R. y SHNELLER, A. 1987. Chemical composition of dietary species of marine unicellular algae and rotifer with emphasis on fatty acids. *Marine Biology*, 95: 31-36.
- BENINGER, P.G. y LUCAS, A. 1984. Seasonal variations in condition, reproductive activity and gross biochemical composition of two species of adult clam reared in a common habitat: *Tapes decussatus* L. (Jeffreys) and *Tapes philippinarum* (Adams and Reeve). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 79: 19-37.
- BENINGER, P.G. y STEPHAN, G. 1985. Seasonal variations in the fatty acids of the triacylglycerols and phospholipids of two populations of adult clam (*Tapes decussatus* L. and *T. philippinarum*) reared in a common habitat. *Comp. Biochem. Physiol.* 81B: 591-601.
- BESNARD, J.Y.; LUBET, P. y NOUVELOT, A. 1989. Seasonal variations of the fatty acid content of the neutral lipids and phospholipids in the female gonad of *Pecten maximus* L. *Comp. Biochem. Physiol.* 93B: 21-26.
- BEUKEMA, J.J. y DE BRUIN, W. 1977. Seasonal changes in dry weight and chemical composition of the soft parts of the tellinid bivalve *Macoma balthica* in the dutch Wadden Sea. *Netherlands J. Sea. Res.*, 11 (1): 42-45.
- BLANCO, M.J. 2010. Influencia de la temperatura en el desarrollo gonadal y la movilización de reservas de la almeja fina (*Ruditapes decussatus* (L.)). Tesis doctoral. Universidad de A Coruña. España.

- BODOY, A. y PLANTE-CUNY, M.R. 1984. Relations entre l'évolution saisonnière des populations de palourdes (*Ruditapes decussatus*) et celle des microphytes benthiques et planctoniques (Golfe de Fos, France). *Haliotis* 14: 71-78.
- CASTELL, J.D. 1983. Fatty acid metabolism in crustaceans. Proceedings of the Second International Conference on Aquaculture Nutrition. *Biochemical and Physiological Approaches to Shellfish Nutrition*. Baton Rouge, Louisiana.
- CERVIÑO-OTERO, A. 2011. Ciclo reproductivo, cultivo en criadero y en el medio natural de la almeja babosa *Venerupis pullastra* (Montagu, 1803). Tesis doctoral. Universidad de Santiago de Compostela. España.
- CERVIÑO-OTERO, A.; OJEA, J.; ARANDA-BURGOS, J.A.; NÓVOA, S. y MARTÍNEZ-PATIÑO, D. 2012. Gametogenic cycle of *Venerupis rhomboides* (Pennant, 1777) in Cangas (Ría of Vigo, NW Spain). *Physiomar 12 International Meeting*. Book of Abstracts, 88.
- COE, W.R. 1943a. Sexual differentiation in mollusks. I. Pelecypods. *Q. Re. Biol.*, 18: 154-164.
- COWEY, C.B.; OWEN, J.M. y MIDDLETON, C. 1976. Studies on the nutrition of marine flatfish. The effect of different dietary fatty acids on the growth and fatty acid composition of turbot (*Scophthalmus maximus*). *British Journal of Nutrition*, 36 (3), 479-486.
- CHÁVEZ-VILLALBA, J.; POMMIER, J.; ANDRIAMISEZA, J.; POUVREAU, S.; BARRET, J.; COCHARD, J-C. y LE PENNEC, M. 2002. Broodstock conditioning of the oyster *Crassostrea gigas*: origin and temperature effect. *Aquaculture* 214: 115-130.
- CHRYSSANTHAKOPOULOU, V. y KASPIRIS, P. 2005. Reproductive cycle of the carpet shell clam *Ruditapes decussatus* (Linnaeus, 1758) in Araxos lagoon (NW Peloponnisos, Greece) and in Evinos estuary (south Aitolokarnania, Greece). *Fres. Environ. Bull.* 14: 999-1005.
- CHU, F. y GREAVES, J. 1991. Metabolism of palmitic, linoleic and linolenic acids in adult oysters, *Crassostrea virginica*. *Marine Biology*, 110 (2): 229-236.

- DA COSTA, F.; NÓVOA, S.; OJEA, J. y MARTÍNEZ, D. 2005. Acondicionamiento del solénido *Ensis arcuatus* en dos regímenes de temperatura: relación con las proteínas y el glucógeno. *Libro de Resúmenes del X Congreso Nacional de Acuicultura*. Gandía, España. 2005. 608-609.
- DA COSTA, F.; OJEA, J.; NÓVOA, S. y MARTÍNEZ-PATIÑO, D. 2009. Efecto del estadio gametogénico inicial en el acondicionamiento de tres especies de solénidos: *Ensis arcuatus*, *E. siliqua* y *Solen marginatus*. *Libro de Resúmenes del XII Congreso Nacional de Acuicultura*, Madrid, España. 2009. 540-541.
- DA COSTA, F.; NÓVOA, S.; OJEA, J. y MARTÍNEZ-PATIÑO, D. 2009. Investigating the effect of feeding regimens on gametogenesis of broodstock of razor clam *Ensis siliqua* under hatchery conditions. *Aquaculture Europe*, 2009. Thronheim. Noruega. 388-389.
- DARRIBA, S.; SAN JUAN, F. y GUERRA, A. 2004. Reproductive cycle of the razor clam *Ensis arcuatus* (Jeffreys, 1865) in northwest Spain and its relation to environmental conditions. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* Vol. 311, Issue 1: 101-115.
- DE LA PARRA-VALENZUELA, A.M. 2004. Variación de la reservas energéticas de *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1794) en relación a la gametogénesis. Tesis doctoral. Universidad de Vigo. España.
- DE LA ROCHE-CADAVID, J.P. 2009. Ciclo reproductor y anatomía funcional de la gónada de *Chlamys varia* (Linnaeus, 1758). Tesis doctoral, Universidad de Santiago de Compostela. España.
- DE MORENO, J.E.; MORENO V.J. y BRENNER, R.R. 1976. Lipid metabolism of the yellow clam, *Mesodesma mactroides*: 2-Polyunsaturated fatty acid metabolism. *Lipids*, 11: 561-566.
- DE PAUW, N. 1981. Use and production of microalgae as food for nursery bivalves. En: *Nursery Culturing of Bivalve Molluscs*. Special Publication. C. Claus, N. de Pauw y E. Jaspers (eds.) 7: 35-69. *Euro. Mar. Soc.* Ostende, Bélgica.

- DE ZWAAN, A. y ZANDEE, D.I. 1972. Body distribution and seasonal changes in glycogen content of the common sea mussel *Mytilus edulis*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 43 A: 53-58.
- DELAUNAY, F. 1992. Nutrition lipidique de la coquille Saint-Jacques *Pecten maximus* (L) au cours du développement larvaire. Thèse de doctorat de L'Université de Brest. Francia.
- DELGADO-FERNÁNDEZ, 2001. Maduración sexual en *Ruditapes decussatus* (L.): implicaciones energéticas y bioquímicas. Tesis doctoral. Universidad de Santiago de Compostela. España.
- DELGADO, M. y PÉREZ-CAMACHO, A. 2003. A study of gonadal development in *Ruditapes decussatus* (L.) (Mollusca, Bivalvia), using image analysis techniques: Influence of food ration and energy balance. *J. Shellfish Res.* 22: 435-441.
- DELGADO, M.; PÉREZ-CAMACHO, A.; LABARTA, U. y FERNÁNDEZ-REIRIZ, M.J. 2004. The role of lipids in the gonadal development of the clam *Ruditapes decussatus* (L.). *Aquaculture* 241: 395-411.
- DELGADO, M. y PÉREZ-CAMACHO, A. 2005. Histological study of the gonadal development of *Ruditapes decussatus* (L.) (Mollusca, Bivalvia) and its relationship with available food. *Sci. Mar.* 69: 87-89.
- DELGADO, M. y PÉREZ-CAMACHO, A. 2007. Comparative study of gonadal development of *Ruditapes philippinarum* (Adams and Reeve) and *Ruditapes decussatus* (L.) (Mollusca: Bivalvia): Influence of temperature. *Sci. Mar.* 71 (3): 471-484.
- DELGADO, M.; BLANCO, M.J. y PÉREZ-CAMACHO, A. 2007. Umbral térmico para la maduración sexual de la almeja fina (*Ruditapes decussatus*, L.). *Libro de Actas del XI Congreso Nacional de Acuicultura*. Vigo. España. 403-406.
- DERBALI, A.; JARBOUI, O. y GHORBEL, M. 2009. Biología reproductiva del berberecho *Cerastoderma glaucum* (Mollusca: Bivalvia) de la costa norte de Sfax (Golfo de Gabes, Túnez). *Ciencias Marinas*, 35(2): 141-152.

- DEVAUCHELLE, N. y MINGANT, D. 1991. Review of the reproductive physiology of the scallop, *Pecten maximus*, applicable to intensive aquaculture. *Aquat. Living Resourc.* 4: 41-51.
- DREYWOOD, R. 1946. Qualitative test for carbohydrate material. *Ind. Eng. Chem. (Anal. Ed)*, 18:499.
- DRUMMOND, L.; MULCAHY, M. y CULLOTY, S. 2006. The reproductive biology of the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, from the North-West of Ireland. *Aquaculture*. 254: 256-340.
- ENRIGHT, C.T.; NEWKIRK, G.F.; CRAIGIE, J.S. y CASTELL, J.D. 1986a. Evaluation of phytoplankton as diet for juvenile *Ostrea edulis* L. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 96: 1-13.
- FABIOUX, C.; HUVET, A.; LE SOUCHU, P.; LE PENNEC, M. y POUVREAU, S. 2005. Temperature and photoperiod drive *Crassostrea gigas* reproductive internal clock. *Aquaculture*, 250: 458-470.
- FÁBREGAS, J.; HERRERO, C.; ABALDE, J. y CABEZAS, B. 1985. Growth, chlorophyll  $\alpha$  and protein of the marine microalga *Isochrysis galbana* Parke in batch cultures with different salinities and high nutrient concentrations. *Aquaculture* 50: 187-199.
- FERNÁNDEZ-CASTRO, N. y DI MATTIO, N.V. 1987. Biochemical composition, condition index, and energy value of *Ostrea puelchana* (D'Orbigny): Relationships with the reproductive cycle. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 108: 113-126.
- FERRÁN, E.; TREVIÑO, M.; MANCEBO, M.J.; CRESPO, C. y ESPINOSA, J. 1990. Estudio del ciclo gonadal anual en *Mytilus galloprovincialis*: Cinética de poblaciones celulares en el manto y reservas bioenergéticas. *Actas III Congreso Nacional de Acuicultura*. 467-472.
- FIGUERAS, A. 1957. Moluscos de las playas de la ría de Vigo: II. Crecimiento y reproducción. *Investig. Pesq.* 7: 49-97.

- FISCHER-PIETTE, E. y METIVIER, B. 1971. Révision des Tapetinae (Mollusques Bivalves). *Mém. Mus. Nati. Hist. Nat.*, París, 71: 1-106.
- FOLCH, J.; LESS, M. y SLOANE-STANLEY, C.H. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 266: 497-509.
- FRAGA, F. 1956. Determinación de glucógeno en moluscos con el reactivo de antrona. *Investig. Pesq.* 3: 69-74.
- GABBOTT, P.A. 1975. Storage cycles in marine bivalve molluscs: an hypothesis concerning the relation between glycogen and gametogenesis. In: Barnes, H. (Ed.), *Proceedings of the Ninth Eur. Mar. Biol. Symp.*, Aberdeen Univ. Press, Aberdeen, Scotland: 191-211.
- GABBOTT, P.A. 1976. Energy metabolism. In: Bayne, B.L. (Ed.), *Marine Mussels: Their Ecology and Physiology*. Cambridge Univ. Press, Cambridge: 293-335.
- GABBOTT, P.A. 1983. Developmental and seasonal metabolic activities in marine molluscs. In: Hochachka, P.W. (Ed.), *The Mollusca. Environmental Biochemistry and Physiology*, 2. Academic Press, New York: 165-217.
- GALLAGER, S.M. y MANN, R. 1986. Growth and survival of larvae of *Mercenaria mercenaria* (L.) and *Crassostrea virginica* (Gmelin) relative to broodstock conditioning and lipid content of eggs. *Aquaculture* 56: 105-121.
- GASPAR, M.B. y MONTERO, C.C. 1998. Reproductive cycles of the razor clam *Ensis siliqua* and the clam *Venus striatula* of Vilamoura, southern Portugal. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 78: 247-258.
- GIESE, A.C. 1969. A new approach to the biochemical composition of the mollusc body. *Oceanogr. Mar. Biol.* 7: 175-229.
- GIESE, A.C.; SMITH, M.A. y CHEUNG, M.A. 1967. Seasonal changes in body component indices and chemical composition in the pismo clam *Tivela stultorum*. *Comp. Biochem. Physiol.* 22: 549-561.

- GIMENO, S.; SARASQUETE, M.C. y GONZÁLEZ DE CANALES, M.L. 1990. Histoquímica de proteínas y carbohidratos en la gónada de *Ruditapes philippinarum* (Adams y Reeve, 1850) durante la gametogénesis. *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.* 6 (1): 81-86.
- GRASSÉ, P.P. 1976. Zoología. Tomo 1. Invertebrados. Ed. Masson.
- GONZÁLEZ, N. 1975. Composición bioquímica y medio ambiente de *Venerupis decussata* y *Venerupis pullastra* en la Ría del Pasaje, La Coruña. *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.* 194: 45.
- HAMIDA, L. 2004. Reproduction de la palourde *Ruditapes decussatus*, en milieu naturel (sud Tunisie) et en milieu contrôlé (écloserie expérimentale): relation avec le système immunitaire. Tesis doctoral. Universidad de Bretaña Occidental. Francia.
- HAMIDA, L.; MEDHIOUBAND, M.N.; COCHARD, J.C.; ROMDHANE, M.S. y LE PENNEC, M. 2004. Étude comparative du cycle de reproduction de la palourde *Ruditapes decussatus* en milieu naturel (sud Tunisie) et contrôlé (écloserie). *Cah. Biol. Mar.* 45:291-303.
- HEASMAN, M.; O'CONNOR, W. y FRAZER, A. 1996. Temperature and nutrition as factors in conditioning broodstock of the commercial scallop *Pecten fumatus* Reeve. *Aquaculture*, 143: 75-90.
- HEFFERNAN, P.B.; WALKER, R.L. y CARR, J.L., 1989. Gametogenic cycles of three bivalves in Wassaw Sound, Georgia: I. *Mercenaria mercenaria* (Linnaeus, 1758). *J. Shellfish Res.* 8, N° 1: 51-60.
- HEFFERNAN, P.B.; WALKER, R.L. y CARR, J.L. 1989. Gametogenic cycles of three bivalves in Wassaw Sound, Georgia: II. *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791). *J. Shellfish Res.* 8, N° 1: 61-70.
- HELM, M.M.; BOURNE, N. y LOVATELLI, A. 2006. Cultivo de bivalvos en criadero. Un manual práctico. FAO Documento Técnico de Pesca. N°. 471. Roma.

- HERRERO, C.; CID, A.; FÁBREGAS, J. y ABALDE, J. 1991. Yields in biomass and chemical constituents of four commercially important marine microalgae with different culture media. *Aqua. Engin.* 10: 99-110.
- HOLLAND, D.A. y CHEW, K.K. 1974. Reproductive cycle of the manila clam (*Venerupis japonica*) from Hood Canal. Washington. *Proceedings of the Nati. Shellf. Asso.* Volume 64.
- IBEAS, C.; IZQUIERDO, M.S. y LORENZO, A. 1994. Effect of different levels of n-3 highly unsaturated fatty acids on growth and fatty acid composition of juvenile gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 127 (2-3): 177-188.
- IWATA, K.S. 1952. Spawning of *Mytilus edulis*. *Bull. Tohoku. Reg. Fish. Res. Lab.* 3-4 (nº 28, 29 y 50).
- JAMES, C.M.; AL-HINTY, S. y SALMAN, A.E. 1989. Growth and  $\omega$ 3 fatty acid and amino acid composition of microalgae under different temperature regimes. *Aquaculture*, 77: 337-351.
- JARA-JARA, R.; ABAD, M.; PAZOS, A.J.; PÉREZ-PARALLÉ, M.L. y SÁNCHEZ, J.L. 2000. Growth and reproductive patterns in (*Venerupis pullastra*) seed reared in wastewater effluent from a fish farm in Galicia (N.W. Spain). *J. Shellfish Res.* 19, Nº 2: 949-956.
- JOAQUIM, S.; MATIAS, D.; MATIAS, A.M.; MOURA, P.; ARNOLD, W.S.; CHÍCHARO, L. y GASPAS, M.B. 2011. Reproductive activity and biochemical composition of the pullet carpet shell *Venerupis senegalensis* (Gmelin, 1791) (Mollusca: Bivalvia) from Ria de Aveiro (northwestern coast of Portugal). *Scien. Mar.* 75 (2): 217-226.
- KLINGENSMITH, J.S. 1982. Distribution of methylene and nonmethylene-interrupted dienoic fatty acids in polar lipids and triacylglycerols of selected tissue of the hardshell clam (*Mercenaria mercenaria*). *Lipids* 17: 976-981.
- KRAEUTER, J.N. y CASTAGNA, M. 2001. Biology of the hard clam. In: Kraeuter, J.N., Castagna, M. (Eds.), *Devel. Aquac. Fish. Scien.*, 31. New York: Elsevier Science, 751.

- LANGDON, C.J. y WALDOCK, M.J. 1981. The effect of algal and artificial diets on the growth and fatty acid composition of *Crassostrea gigas* spot. *J. Mar. Biol. Ass. U. K.*, 61: 431-448.
- LARUELLE, F.; GUILLOU, J. y PAULET, Y.M. 1994. Reproductive pattern of the clams, *Ruditapes decussatus* and *R. philippinarum* on intertidal flats in Brittany. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 74: 351-366.
- LOOSANOFF, V.L. y DAVIS, H.C. 1950. Conditioning of *Venerupis mercenaria* for spawning in winter and breeding its larvae in the laboratory. *Biol. Bull.* 98:60-65.
- LÓPEZ, J.; RODRÍGUEZ, C. y CARRASCO, J.F. 2005. Comparación del ciclo reproductor de *Solen marginatus* (Pulteney, 1799) (Mollusca: Bivalvia) en las Rías del Eo y Villaciosa (Asturias, noroeste de España) relación con las variables ambientales. *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.* 21 (1-4): 317-327.
- LÓPEZ-RUÍZ, J.L.; GARCÍA, R.; SOLEDAD, M. y ALMEDA, F. 1995. Marine microalgae culture: *Chaetoceros gracilis* with zeolitic product ZESTEC-56 and a comercial fertilizer as a nutrient. *Aquacultural engineering*. Vol. 14, Issue 4, 367-372.
- LOUZÁN, A. 2008. Ciclo reproductor, composición bioquímica y patología de los progenitores de *Donax trunculus* (Linné, 1758), de un banco natural de Valdoviño (NO Galicia), para la obtención de semilla en criadero. Diploma de Estudios Avanzados. Universidad de Santiago de Compostela. España.
- LOWE, D.M.; MOORE, M.N. y BAYNE, B.L. 1982. Aspects of gametogenesis in the marine mussel *Mytilus edulis* L. *J. Mar. Biol. Ass. U. K.*, 62: 133-145.
- LOWRY, O.; ROSENBOUGH, N.M.; FARR, A.L. y RANDALL, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- LUBET, P. 1981. Action de la température sur le cycle de reproduction des lamellibranches. *Bull. Soc. Zool. Fr.* 106: 283-292.

- MACKIE, L.A. y ANSELL, A.D. 1993. Differences in reproductive ecology in natural and transplanted populations of *Pecten maximus*: evidence for the existence of separate stocks. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 169: 57-75.
- MANN, R. 1979. The effect of temperature on growth, physiology, and gametogenesis in the Manila clam *Tapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 38:121-133.
- MADRONES-LADJA, J.; DE LA PEÑA, M. y PARAMI, N. 2002. The effect of micro algal diet and rearing condition on gonad maturity, fecundity and embryonic development of the window-pane Shell, *Placuna placenta*, Linnaeus. *Aquaculture* 206: 313-321.
- MARÍN-SOLÓRZANO, H.; MUÑOZ-NARANJO, M.; ARGUELLO-GUEVARA, W. y COBO, M.L. 2011. Evaluación de diferentes regímenes de alimentación para el acondicionamiento reproductivo de la ostra nativa *Crassostrea iridescens* (Hanley, 1854). Escuela superior politécnica del litoral. Centro de investigación científica y tecnológica. Ecuador.
- MARS, P. 1966. Recherches sur quelques étangs du littoral méditerranéen français et sur leurs faunes malacologiques. *Vie Milieu. Suppl.*, 20: 1-359.
- MARSH, J.B. y WEINSTEIN, D.B. 1966. Simple charring method for determination of lipids. *J. Lipid Res.* 7: 574-576.
- MARTÍNEZ-PATIÑO, D. 2002. Estudio de los Solénidos, *Solen marginatus* (Pennant, 1777) y *Ensis siliqua* (Linné, 1758), de los bancos naturales de la Ría de Ortigueira y Ría del Barquero: ciclo gametogénico, composición bioquímica y cultivo larvario. Tesis doctoral. Universidad de Santiago de Compostela. España.
- MARTÍNEZ-PATIÑO, D.; RODRÍGUEZ-MOSCOSO, E.; ARNAIZ, R.; ALONSO de LANDA, J.L. y CAMIÑO, J.M. 1993. Ciclo reproductor de la coquina, *Donax trunculus*, relaciones con su contenido en proteínas, glucógeno, lípidos y ácidos grasos poliinsaturados. *Libro de Actas del IV Congreso Nacional de Acuicultura*. Illa de Arousa, España. 347-352.

- MARTÍNEZ-PATIÑO, D.; RODRÍGUEZ-MOSCOSO, E.; ARNÁIZ, R.; NÓVOA, S. y OJEA, J. 1997. Gametogénesis y composición bioquímica en una población de *Ensis siliqua* (Linné, 1758) en la Ría del Barquero (N. Galicia). *Actas VI Congreso Nacional Acuicultura*. Cartagena, España. 155-157.
- MARTÍNEZ, G.; AGUILERA, C. y METTIFOGO, L. 2000. Interactive effects of diet and temperature on reproductive conditioning of *Argopecten purpuratus* broodstock. *Aquaculture* 183: 149-159.
- MARTÍNEZ, G. y PÉREZ, H. 2003. Effect of different temperature regimes on reproductive conditioning in the scallop *Argopecten purpuratus*. *Aquaculture* 228: 153-167.
- MARTÍNEZ-PITA, I.; SÁNCHEZ-LAZO, C.; PRIETO, E. y MORENO, O. 2011. The effect of diet on gonadal development of the smooth venus clam *Callista chione* (mollusca: bivalvia). *J. Shellfish Res.* 30(2): 295-301.
- MARTY, Y.; DELAUNAY, F.; MOAL, J. y SAMAIN, J.F. 1992. Changes in the fatty acid composition of *Pecten maximus* (L) during larval development. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 163: 221-234.
- MATHIEU, M. y LUBET, P. 1993. Storage tissue metabolism and reproduction in marine bivalves—a brief review. *Invertebr. Reprod. Dev.* 23: 123-129.
- MATIAS, D.; JOAQUIM, S.; LEITAO, A. y MASSAPINA, C. 2009. Effect of geographic origin, temperature and timing of broodstock collection on conditioning, spawning success and larval viability of *Ruditapes decussatus* (Linné, 1758). *Aquacult. Int.*, 17: 257-271.
- MATIAS, D.; JOAQUIM, S.; RAMOS, A.M.; SOBRAL, P. y LEITAO, A. 2010. Hatchery broodstock conditioning of the European clam *Ruditapes decussatus*: Influence of different diets on broodstock performance. *Abstracts Aquaculture Europe, 2010, Porto, Portugal.* 797-798.
- MEDHIOUB, M.M. 1986. Recherches cytologiques sur le cycle de reproduction et l'évolution des réserves chez la palourde japonaise *Ruditapes philippinarum* (Adams et Reeve), (Mollusque Lamelibranche). These Univ. Caen.

- MENEGHETTI, F.; MOSCHINO, V. y DA ROS, L. 2004. Gametogenic cycle and variations in oocyte size of *Tapes philippinarum* from the Lagoon of Venice. *Aquaculture* 240. Issues 1-4: 473-488.
- METCALFE, L.D. y SCHMITZ, A.A. 1961. The rapid preparation of fatty acid esters for gas chromatographic analysis. *Anal. Chem.* 33: 363-364.
- MORTENSEN, S.H.; BORSHEIM, K.Y.; RAINUZZO, J.R. y KNUTSEN, G. 1988. Fatty acid and elemental composition of the marine diatom *Chaetoceros gracilis* Schütt: Effect of silicate deprivation, temperature and light intensity. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 122: 173-185.
- MORVAN, C. y ANSELL, A.D. 1988. Stereological methods applied to reproductive cycle of *Tapes rhomboides*. *Mar. Biol.* 97: 355-364.
- MOURENTE, G.; LUBIÁN, L.M. y ODRIOZOLA, J.M. 1990. Total fatty acid composition as a taxonomic index of some marine microalgae used as food in marine aquaculture. *Hidrobiología*, 203, nº 3: 147-154.
- NAVARRO, E.; IGLESIAS, J.I.P. y LARRAÑAGA, A. 1989. Interannual variation in the reproductive cycle and biochemical composition of the cockle *Cerastoderma edule* from Mundaca Estuary (Biscay, North Spain). *Mar. Biol.* 101: 503-511.
- NAVARRO, J.M.; LEIVA, G.E.; MARTÍNEZ, G. y AGUILERA, C. 2000. Interactive effects of diet and temperature on the scope for growth of the scallop *Argopecten purpuratus* during reproductive conditioning. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 247: 67-83.
- NÓVOA-VÁZQUEZ, S. 2007. Metabolismo lipídico, ácidos grasos en el cultivo larvario de almeja babosa, *Venerupis pullastra* (Montagu, 1803). Calidad ovocitaria, larvaria y nutricional con una aproximación al uso de la microencapsulación lipídica. Tesis doctoral. Universidad de Santiago de Compostela. España.
- NÓVOA, S.; MARTÍNEZ, D.; MIRANDA, A.; OJEA, J. y RODRÍGUEZ, J.L. 1997. Calidad nutricional del alga marina *Chaetoceros gracilis*. Evolución de la composición en ácidos grasos durante su ciclo de cultivo. *Actas del VI Congreso Nacional de Acuicultura*. Cartagena. España. 131-136.

- OJEA, J.; NÓVOA, S.; MARTÍNEZ, D. y RODRÍGUEZ, J.L. 1999. Evaluación de la calidad nutritiva del fitoplancton en tres sistemas de cultivo empleados en criaderos de moluscos. *Actas del VII Congreso Nacional de Acuicultura*. Las Palmas. Canarias. España. 317-322.
- OJEA, J.; PAZOS, A.J.; MARTÍNEZ, D.; NÓVOA, S.; SÁNCHEZ, J.L. y ABAD, M. 2004. Seasonal variation in weight and biochemical composition of the tissues of *Ruditapes decussatus* in relation to the gametogenic cycle. *Aquaculture* 238: 451-468.
- OJEA, J.; MARTÍNEZ, D.; NÓVOA, S. y CERVIÑO OTERO, A. 2005. Ciclo gametogénico de una población de almeja japonesa *Ruditapes philippinarum* (Adams y Reeve, 1850) en la Ría de Camariñas (NO España) y relación con la composición bioquímica mayoritaria. *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.* 21 (1-4): 337-342.
- PARADIS, M. y ACKMAN, R.G. 1975. Occurrence and chemical structure of non-methylene-interrupted dienoic fatty acids in American oyster *Crassostrea virginica*. *Lipids* 10: 12-16.
- PARTRIDGE, J.K. 1977. Littoral and benthic investigations on the west coast of Ireland: IV. Section A: faunistic and ecological studies (annotated bibliographies of the genus *Tapes*) (Bivalvia: Veneridae). Part I: *Tapes decussatus* (L.). Part II: *Tapes semidecussatus* Reeve. *Proc. R. Ir. Acad., B Biol. Geol. Chem. Sci.* 77: 1-63.
- PAZOS, A.J.; ROMÁN, G.; ACOSTA, C.P.; ABAD, M. y SÁNCHEZ, J.L. 1996. Estereological studies on the gametogenic cycle of the scallop, *Pecten maximus*, in suspended culture in Ría de Arousa (Galicia, NW Spain). *Aquaculture* 142: 119-135.
- PAZOS, A.J.; RUÍZ, C.; GARCÍA-MARTÍN, O.; ABAD, M. y SÁNCHEZ, J.L. 1996. Seasonal variations of the lipid content and fatty acid composition of *Crassostrea gigas* cultured in O Grove, Galicia, N.W. Spain. *Comp. Biochem. Physiol.* 114B: 171-179.

- PAZOS, A.J.; SÁNCHEZ, J.L.; ROMÁN, G.; PÉREZ-PARALLÉ, M.L. y ABAD, M. 2003. Seasonal changes in lipid classes and fatty acid composition in the digestive gland of *Pecten maximus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 134B: 367-380.
- PÉREZ-CAMACHO, A. 1980. Biología de *Venerupis pullastra* (Montagu, 1803) y *Venerupis decussata* (Linné, 1767) (Mollusca, Bivalvia), con especial referencia a los factores determinantes de la producción. *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.* 281: 43-76.
- PÉREZ-CAMACHO, A.; DELGADO, M.; FERNÁNDEZ-REIRIZ, M.J. y LABARTA, U. 2003. Energy balance, gonad development and biochemical composition in the clam *Ruditapes decussatus*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 258: 133-145.
- PERSOONE, G. y CLAUS, C. 1980. Mass culture of algae, a bottleneck in the nursery culturing of molluscs. En: *Algal Biomass*. G. Shelef y C.J. Soeder (eds.): 265-285. *Elsevier*. Ámsterdam.
- REMACHA-TRIVIÑO, A. 2005. Ciclo reproductivo de *Solen marginatus* (Pulteney, 1799) (Molusca: Bivalvia) en la Ría del Eo (noroeste de España). *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.* 21(1-4): 375-385.
- ROBINSON, A. 1992. Dietary supplements for the reproductive conditioning of *Crassostrea gigas kumamoto* (Thunberg): II. Effects on glycogen, lipid and fatty acid content of broodstock oysters and eggs. *J. Shellfish Res.*, 11: 443-447.
- RODRÍGUEZ DE LA RÚA, A.; PRADO, M.A. y BRUZÓN, M.A. 2003. Estudio del ciclo reproductor de *Chamelea gallina* (L., 1758) (Mollusca: Bivalvia) en tres poblaciones del litoral andaluz. *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.* 19(1-4): 57-63.
- RODRÍGUEZ-MOSCOSO, E. 2000. Histofisiología de la reproducción de la almeja fina *Ruditapes decussatus* (Linné, 1758) en la Ría de Arosa (población natural y población de cultivo). Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela, España.
- RODRÍGUEZ-MOSCOSO, E.; PAZÓ, E.J.; GARCÍA, A. y FERNÁNDEZ-CORTÉS, F. 1992. Reproductive cycle of Manila clam, *Ruditapes philippinarum* (Adams and Reeve, 1850) in Ría de Vigo (NW Spain). *Sci. Mar.* 56 (1): 61-67.

- RODRÍGUEZ-MOSCOSO, E.; ARNAIZ, R.; DE COO, A.; MARTÍNEZ, D.; SILVA, A. y VARELA, J.A. 1993. Proceso de maduración y acondicionamiento de *Tapes decussatus* (Linné, 1787), fuera de época natural: I. Histoquímica, histología y composición bioquímica. *Actas del IV Congreso Nacional de Acuicultura*. Illa de Arousa. España. 335-340.
- RODRÍGUEZ-MOSCOSO, E.; MARTÍNEZ, D.; ARNAIZ, R.; MOSQUERA, G.; CERVIÑO, A.; DE COO, A.; GARCÍA, A. y RUA, N. 1996. Gametogénesis, reservas energéticas y desarrollo larvario en el longueirón, *Solen marginatus* (Pennant, 1777). *IX Simp. Iber. Est. Bentos*. 164-166.
- RODRÍGUEZ-MOSCOSO, E.; OJEA, J.; ARNÁIZ, R.; MARTÍNEZ, D. y NÓVOA, S. 2007. Estrategia de reproducción del rabioso (*Glycymeris glycymeris*, Linnaeus, 1758). *Actas del XI Congreso Nacional de Acuicultura*. Vigo. España. 931-934.
- RODRÍGUEZ, S.; QUINTANA, R.; LAMAS, L.; AYENSA, G.; VELASCO, F.J. y PASCUAL, C. 1993. Etude comparative du cycle gamétogénique et composition biochimique de *Tapes decussatus* et *Ruditapes philippinarum* dans la Ría de Muros y Noya. In: Bernabe, G., Kestemont, P. (Eds.), Bordeaux Aquaculture 92. Production, Environment and Quality. *Special Publication-Eur. Aquaculture Soc.*, 18: 503-511.
- ROMÁN, G.; CAMPOS, M.J.; CANO, J.; ACOSTA, C.P.; IGLESIAS, P. y GARCÍA, O. 2002. Reproductive and reserve storage cycles in *Aequipecten opercularis* (L., 1758) in Galicia, NW Spain. *J. Shellfish Re.* 21:577-584.
- RUÍZ, C.; ABAD, M.; SEDANO, F.; GARCÍA-MARTÍN, L.O. y SÁNCHEZ, J.L. 1992. Influence of seasonal environmental changes on the gamete production and biochemical composition of *Crassostrea gigas* (Thunberg) in suspended culture in O Grove, Galicia, Spain. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 155: 249-262.
- SAOUT, C.; QUÉRÉ, C.; DONVAL, A.; PAULET, Y.M. y SAMAIN, J.F. 1999. An experimental study of the combined effects of temperature and photoperiod on reproductive physiology of *Pecten maximus* from the Bay of Brest (France). *Aquaculture*, 172: 301-314.

- SASTRY, A.N. 1966. Temperature effects in reproduction of the bay scallop *Aequipecten irradians* Lamarck. *Biol. Bull.* 130:118-134.
- SASTRY, A.N. 1968. The relationship among food, temperature, and gonad development of the bay scallop, *Aequipecten irradians* Lamarck. *Physiol. Zool.*, 41: 44-53.
- SASTRY, A.N. 1979. Pelecypoda (excluding Ostreidae). In: Giese, A.C.; Pearse, J.S. (Eds.), Reproduction of Marine Invertebrates, vol. 4. *Academic Press, New York*. 113-292.
- SBRENNNA, G. y CAMPIONI, D. 1994. Gametogenic and spawning patterns of manila clams *Tapes philippinarum* (Bivalvia: Veneroidea) in two lagoons of the river Po delta, Italy. *J. Shellfish Res.* 13, N° 1: 37-46.
- SERDAR, S. y LÖK, A. 2009. Gametogenic cycle and biochemical composition of the transplanted carpet Shell clam *Tapes decussatus*, Linnaeus 1758 in Sufa (Homa) Lagoon, Izmir, Turkey. *Aquaculture* 293: 81-88.
- SERDAR, S.; LÖK, A.; ACARLI, S.; KÜÇÜKDERMENCI, A.; GÜLER, M. y YIGITKURT, S. 2010. Comparison of Gonadal Development of Carpet Shell Clam (*Tapes decussatus*, Linnaeus 1758) in Inside and Outside of Çakalburnu Lagoon, Izmir Bay. *Turkish J. Fish. Aqua. Scien.* 10: 395-401.
- SHAFEE, M.S. y DAOUDI, M. 1991. Gametogenesis and spawning in the carpet-shell clam, *Ruditapes decussatus* (L.) (Mollusca: Bivalvia), from the Atlantic coast of Morocco. *Aquac. Fish. Manage.* 22: 203-216.
- SHPIGEL, M.; BARBER, B. y MANN, R. 1992. Effects of elevated temperature on growth, gametogenesis, physiology and biochemical composition in diploid and triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* Thunberg. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 161: 15-25.
- SMAOUI-DAMAK, W.; MATHIEU, M.; REBAI, T. y HAMZA-CHAFFAI, A. 2007. Histology of the reproductive tissue of the clam *Ruditapes decussatus* from the gulf of Gabès (Tunisia). *Invert. Reprod. Develop.*, 50: 117-126.

- SOUDANT, P.; MARTY, Y.; MOAL, J.; ROBERT, R.; QUEVE, C.; LE COZ, J.R. y SAMAIN, J.F. 1996. Effect of food fatty acid and sterol quality on *Pecten maximus* gonad composition and reproduction process. *Aquaculture*, 143, nº 3-4: 361-378.
- SUKENIK, A.; CARMELI, Y. y BERNER, T. 1989. Regulation of fatty acid composition by growth irradiance level in the eustigmatophyte *Nannochloropsis* sp. *J. Phycol.*, 25: 686-692.
- SUKENIK, A. y WAHNON, R. 1991. Biochemical quality of marine unicellular algae with special emphasis on lipid composition. I. *Isochrysis galbana*. *Aquaculture*, 97: 61-72.
- UKI, N.; SIGIURA, M. y WATANABLE, T. 1986. Requirement of essential fatty acids in the abalone *Haliotis discus hannai*. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 52: 1013-1023.
- URIARTE, I.; FARÍAS, A.; HERNÁNDEZ, J.; SCHÄFER, C. y SORGELOOS, P. 2004. Reproductive conditioning of Chilean scallop (*Argopecten purpuratus*) and the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*): effects of enriched diets. *Aquaculture* 230: 349-357.
- URRUTIA, M.B.; IBARROLA, I.; IGLESIAS, J.I.P. y NAVARRO, E. 1999. Energetics of growth and reproduction in a high-tidal population of the clam *Ruditapes decussatus* from Urdabai Estuary (Basque Country, N. Spain). *J. Sea Res.* 42: 35-48.
- UTTING, S.D. y MILLICAN, P.F. 1997. Techniques for the hatchery conditioning of bivalve broodstocks and the subsequent effect on eggs quality and larval viability. *Aquaculture* 155: 45-54.
- UTTING, S.D. y MILLICAN, P.F. 1998. The role of diet in hatchery conditioning of *Pecten maximus* L.: a review. *Aquaculture*, Vol. 165, Issues 3-4, 167-178.
- VILELA, H. 1950. Vida bentónica de *Tapes decussatus*. *Arq. Mus. Boc.*, 21: 1-114.
- VILLALBA, A. 1995. Gametogenic cycle of cultured mussel, *Mytilus galloprovincialis*, in the bays of Galicia (NW. Spain). *Aquaculture*, 130: 269-277.

- VILLALBA, A.; CARBALLAL, M.J. y LÓPEZ, M.C. 1993a. Estudio del ciclo gonadal de tres especies de almeja, *Ruditapes decussatus*, *Venerupis pullastra* y *Venerupis rhomboides*, de las rías gallegas. *Actas IV Congreso Nacional de Acuicultura*. Illa de Arousa. España. 341-346.
- WALDOCK, M.J. y HOLLAND, D.L. 1984. Fatty acid metabolism in young oysters, *Crassostrea gigas*: polyunsaturated fatty acids. *Lipids*, 19: 332-336.
- WALNE, P.R. 1976. Experiments on the culture in the sea of the butterfish *Venerupis decussata* L. *Aquaculture* 8: 371-381.
- WEBB, K.L. y CHU, F. 1983. Phytoplankton as food source for bivalve larvae. *Proc. 2<sup>nd</sup> Intern. Conf. on Aquaculture Nutrition, Spec.*, 2: 272-289.
- WHYTE, J.N.C. 1988. Fatty acid profiles from direct methanolysis of lipids in tissue of cultured species. *Aquaculture* 75: 193-203.
- WHYTE, J.N.C.; ENGLAR, J.R. y CARSWELL, B.L. 1990. Biochemical composition and energy reserves in *Crassostrea gigas* exposed to different levels of nutrition. *Aquaculture* 90: 157-172.
- WILSON, J.H. y SEED, R. 1974. Reproduction in *Mytilus edulis* L. (Mollusca: Bivalvia) in Carlingford Lough, Northern Ireland. *Ir. Fish. Invest., Series B (Marine)* 15: 1-30.
- YAMUZA-CLAVIJO, M.P.; RODRÍGUEZ-RÚA, A. y BRUZÓN-GALLEGO, M.A. 2010. Ciclo gametogénico de *Venerupis rhomboides* Pennant, 1777 en el litoral andaluz (sur España). *Hidrobiológica* 20 (3): 195-202.
- ZANDEE, D.I.; KLUYTMANS, J.H. y ZURBURG, W. 1980. Seasonal variations in biochemical composition of *Mytilus edulis* with reference to energy metabolism and gametogenesis. *Nether. J. Sea Res.* 14(1): 1-29.
- ZHUKOVA, N.V. 1986. Biosynthesis of non-methylene-interrupted dienoic fatty acids from <sup>14</sup>C-acetate in molluscs. *Biochim. Biophys. Acta* 878: 131-133.





## ANEXOS: PUBLICACIONES

---



## 8.- PUBLICACIONES

Parte del trabajo de esta Tesis ha dado lugar a las siguientes publicaciones:

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).

Ojea, J.; Martínez, D.; Nóvoa, S.; Pazos, A.J. y Abad, M.

*Boletín del Instituto Español de Oceanografía*, 18 (1-4), 2002: 307-313.

Seasonal variation in weight and biochemical composition of the tissues of *Ruditapes decussatus* in relation to the gametogenic cycle.

Ojea, J.; Pazos, A.J.; Martínez, D.; Nóvoa, S.; Sánchez, J.L. y Abad, M.

*Aquaculture* 238 (2004) 451-468.

Effects of temperatura regime on broodstock conditioning of *Ruditapes decussatus*.

Ojea, J.; Pazos, A.J.; Martínez, D.; Nóvoa, S.; García-Martínez, P.; Sánchez, J.L. y Abad, M.

*Journal of Shellfish Research*, Vol. 27, Nº. 5, 1093-1100, 2008.



# 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)

J. Ojea<sup>1</sup>, D. Martínez<sup>1</sup>, S. Novoa<sup>1</sup>, A. J. Pazos<sup>2</sup> y M. Abad<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Centro de Cultivos Marinos de Ribadeo. Centro de Investigaciones Mariñas (CIMA). Consellería Pesca, Marisqueo y Acuicultura. Xunta de Galicia. Muelle de Porcillán, s/n. E-27700 Ribadeo (Lugo), España. Correo electrónico: [justaom@cimacoron.org](mailto:justaom@cimacoron.org)

<sup>2</sup> Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Instituto de Acuicultura. Universidad de Santiago de Compostela. Campus Sur. E-15782 Santiago de Compostela (A Coruña), España

Recibido en julio de 2001. Aceptado en febrero de 2002.

## RESUMEN

La reproducción en bivalvos está asociada a ciclos complejos de almacenamiento de reservas energéticas. Se ha estudiado la gametogénesis de la almeja fina *Ruditapes decussatus* (L., 1758), y la variación en ella de la composición de glucógeno, con ejemplares de una población natural de las lagunas de Baldaio (A Coruña). La gametogénesis se inicia entre diciembre y enero, después de un periodo de reposo sexual durante noviembre y diciembre, y la madurez sexual se alcanza desde mediados de mayo hasta agosto; la puesta tiene lugar de junio a agosto y va seguida de un periodo de postpuesta. Para el estudio del contenido en glucógeno y su distribución, se diseccionaron las siguientes partes de las almejas: el pie, el reborde muscular del manto, las branquias, los sifones, el músculo aductor y la gónada con la masa visceral, que incluye el aparato digestivo, los palpos labiales, los ganglios nerviosos y la región reno-pericárdica.

El contenido en glucógeno más bajo se obtiene en la madurez y, sobre todo, en época de puesta. La gónada y la masa visceral acumulan entre el 36 y el 50 % del glucógeno total existente en el animal, mientras que los valores más bajos se encuentran en el pie, con el 6 %.

**Palabras clave:** Almeja fina, *Ruditapes decussatus*, acondicionamiento, reproducción, reservas energéticas.

## ABSTRACT

**Content and distribution of glycogen in relation to the gametogenic cycle of a natural population of *Ruditapes decussatus* (L., 1758) located in the Baldaio lagoons (Galicia, northwestern Spain)**

Bivalve reproduction is associated with complex cycles of energy reserve storage. We studied the gametogenic cycle of the clam *Ruditapes decussatus* (L., 1758), as well as variations in its glycogen composition, using individuals from a natural population located in the Baldaio lagoons (Galicia, northwestern Spain). The gametogenic cycle, as well as variations in glycogen composition, were studied throughout the life cycle of the clam *Ruditapes decussatus* (L., 1758), using individuals from a natural population located in the Baldaio lagoons (Galicia, northwestern Spain). The gametogenesis begins in December and January, after a period of sexual inactivity during the months of November and December. This population reaches sexual maturity during a period extending from mid-May until August, and spawning takes place from June to August, followed by a post-spawning period. To study of glycogen content and its distribution, the clams were dissected out into different parts: foot, ledge of the mantle, gills, adductor muscle and gonad-digestive gland. The

*lowest content of glycogen was found at maturity, especially during spawning. The gonad and the visceral mass accumulate between 36 and a 50 % of the total glycogen present in the animal, whereas the lowest values are in the foot, which contains 6 %.*

**Keywords:** *Ruditapes decussatus*, conditioning, reproduction, energetic reserves.

## INTRODUCCIÓN

La almeja fina *Ruditapes decussatus* (L., 1758) es una de las especies de bivalvos de mayor valor comercial en Galicia y potenciar su cultivo es importante para aumentar la producción natural de las rías gallegas. Para ello hay que disponer de semilla cultivada en criadero en cantidad suficiente para su siembra y engorde en el medio natural. Esto se consigue aprovechando la época de madurez sexual de los reproductores (primavera y verano), induciéndoles a desovar en el criadero; también es fundamental controlar el proceso de acondicionamiento, para obtener desoves a lo largo de todo el año y satisfacer los criterios requeridos de calidad y cantidad.

La reproducción en los bivalvos está asociada a complejos ciclos de almacenamiento de reservas energéticas. Gabbott (1975) estudió la relación entre el metabolismo del glucógeno y la gametogénesis y concluye que parte del glucógeno almacenado se transforma en lípidos, movilizados durante la vitelogenénesis 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. Para la realización de este estudio se hizo el seguimiento durante 15 meses de una población natural de almeja fina y en él se presentan el ciclo gametogénico de esta especie en su medio y la variación de los niveles de glucógeno en este ciclo, así como su distribución en las partes diferentes en que se diseccionaron los ejemplares.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Los muestreos se realizaron en un banco natural de almeja fina situado en las lagunas de Baldaio (A Coruña) con periodicidad mensual, desde octubre de 1998 hasta diciembre de 1999. En cada muestreo se recogían diez individuos y se realizaba un estudio biométrico de talla (L) (o eje antero-posterior) y pe-

so fresco total (PFT); a continuación, se abrían los ejemplares y se separaban la concha y la vianda, registrándose el peso fresco de ambas (PFC y PFV). Se calculaba, entonces, un índice de condición poblacional (ICF) de acuerdo con la fórmula de Ansell, Loosmore y Lander (1964), que relaciona el peso fresco de la carne con el peso total del animal

$$IC = 100 \text{ PFV/PFT}$$

Posteriormente, se diseccionaban las almejas, separando las partes siguientes: el pie, el reborde muscular del manto, las branquias, los sifones, el músculo aductor y la gónada con la masa visceral, que incluye el aparato digestivo, los palpos labiales, los ganglios nerviosos y la región reno-pericárdica. Se registraba el peso fresco de cada una de las partes diseccionadas, que se liofilizaban para obtener los pesos secos respectivos; la suma de todos ellos proporcionaba el peso seco total de la vianda. El peso seco de la concha se calculaba tras 24 horas en estufa a 100 °C. Con estos datos se calculaba el índice de condición (ICS) descrito por Walne (1976) y Benninger y Lucas (1984), entre otros, que relaciona el peso seco de la vianda con el peso seco de la concha

$$IC = 100 \text{ PSV/PSC}$$

## Estudio histológico

La gónada se introducía en fijador de Davidson de 24 a 48 horas, según el tamaño de la pieza, y se continuaba con una serie de deshidrataciones, terminando el proceso con la inclusión de las muestras en parafina. Finalmente, se hacían cortes de 7 µm de grosor y se teñían con la coloración de hematoxilina-eosina, que permite establecer el estado de desarrollo gonadal. En el estudio del ciclo gametogénico se utilizó la escala de Wilson y Seed (1974), que diferencia varios estados: estado 0 (E0), de reposo sexual; estado 1 (E1), de comienzo del desarrollo gametogénico; estado 2 (E2), de desarrollo gametogénico pleno; estado 3A (E3A), de madurez morfológica; estado 3B

(E3B), de puesta; estado 3C (E3C), de redesarrollo, y estado 3D (E3D), de puesta reciente.

### Composición bioquímica

Las muestras de tejido empleadas en el análisis bioquímico del glucógeno se congelaban a  $-80^{\circ}\text{C}$ ; seguidamente eran liofilizadas para permitir su almacenamiento hasta la continuación del análisis. Ya liofilizadas, se pesaban de nuevo para obtener el peso seco. Estas muestras se pulverizaban finamente y se efectuaba la determinación del glucógeno con el método espectro-fotométrico de la antrona (Fraga, 1956), utilizando la glucosa como estándar.

### Determinación del animal estándar

El animal estándar de la población es un individuo teórico que se determina para discriminar las variaciones en peso debidas al crecimiento de aquéllas imputables al ciclo gametogénico. El cálculo se realizaba a partir de los valores medios del peso fresco total registrados mensualmente durante el periodo de estudio, obteniéndose, así, una primera estandarización que establece un individuo medio poblacional con un peso fresco total teórico. A este individuo le eran aplicados los porcentajes de los valores hallados en cada muestreo para el individuo medio y también los obtenidos para cada una de las partes en que éste se diseccionaba. En esta segunda estandarización se obtienen los valo-

res medios de los pesos frescos y secos del individuo estándar total y de las correspondientes partes en que era diseccionado. A los pesos secos calculados se les aplicaban los porcentajes obtenidos en la determinación bioquímica del glucógeno para conocer el peso de éste en las diferentes partes del individuo, expresándolo en miligramos de glucógeno por gramo de peso seco.

### RESULTADOS

En la tabla I, se muestran los datos biométricos medios mensuales de la población estudiada, así como los índices de condición: el primero, ICF, relaciona el peso fresco de la vianda con el peso fresco total, y el segundo, ICS, relaciona el peso seco de la vianda con el peso seco de la concha. Ambos siguen una evolución similar: el primero fluctúa entre el 26,38 % de octubre de 1998 y el 17,49 % de diciembre de 1999, mientras que el segundo varía entre 10,08 y 5,58 % en las mismas fechas. Durante el desarrollo gametogénico los dos índices se mantienen en valores altos de 22-23 % y 8 % respectivamente, descendiendo en la madurez hasta valores en junio de 18,89 % para el primero y de 6,82 % para el segundo; se recuperan entre julio y agosto, para volver a descender en septiembre y octubre, después del desove masivo de finales del verano.

Los pesos frescos y secos de las diferentes partes en que se diseccionan las almejas, referidos al animal estándar, se presentan en la tabla II; la gónada, con la masa visceral, es la que constituye el mayor

Tabla I. Datos biométricos medios mensuales de la población de almeja fina *Ruditapes decussatus* de Baldaio. (L): longitud o eje antero-posterior; (PFT): peso fresco total; (PFC): peso fresco concha; (PFV): peso fresco vianda; (ICF): índice de condición relativo a los pesos frescos; (ICS): índice de condición relativo a los pesos secos.

Fecha	L (mm)	PFT (g)	PFC (g)	PFV (g)	ICF (%)	ICS (%)
06-10-1998	48,79	26,46	14,30	6,98	26,38	10,08
01-11-1998	43,09	19,67	11,56	3,90	19,83	6,48
11-12-1998	45,56	22,29	12,53	5,28	23,69	8,97
11-02-1999	50,91	29,61	16,20	6,77	22,86	8,24
30-03-1999	50,56	27,78	14,96	6,44	23,18	8,29
26-04-1999	52,81	33,26	17,65	7,73	23,24	8,51
26-05-1999	45,94	24,19	13,52	5,53	22,86	7,58
10-06-1999	43,99	20,83	11,96	4,42	21,22	6,82
24-06-1999	48,78	24,83	13,31	4,69	18,89	7,00
09-07-1999	45,37	20,85	11,19	5,53	26,52	9,52
07-08-1999	41,70	18,01	9,96	3,95	21,93	8,45
30-09-1999	47,11	23,35	12,73	5,16	22,10	8,41
15-11-1999	47,54	24,82	14,28	5,31	21,39	7,12
07-12-1999	47,85	25,16	14,14	4,40	17,49	5,58

Tabla II. Evolución de los pesos fresco (PF) y seco (PS) en gramos, determinados para un animal estándar, de las diferentes partes de la almeja diseccionadas: el pie, el reborde, la gónada con la masa visceral (Gónada-MV), el músculo, los sifones y las branquias.

Fecha	Pie		Reborde		Gónada-MV		Músculo		Sifones		Branquias	
	PF	PS	PF	PS	PF	PS	PF	PS	PF	PS	PF	PS
06-10-1998	0,56	0,13	1,14	0,32	1,73	0,44	0,78	0,17	1,25	0,31	0,94	0,16
01-11-1998	0,39	0,08	0,94	0,17	1,17	0,28	0,74	0,17	0,84	0,18	0,74	0,14
11-12-1998	0,44	0,10	1,12	0,22	1,54	0,44	0,84	0,22	0,98	0,22	0,84	0,19
11-02-1999	0,43	0,08	1,07	0,20	1,54	0,38	0,96	0,21	0,82	0,17	0,73	0,13
30-03-1999	0,38	0,08	1,07	0,19	1,85	0,42	0,99	0,20	0,86	0,19	0,48	0,15
26-04-1999	0,34	0,08	0,95	0,16	1,84	0,43	0,92	0,19	0,76	0,16	0,78	0,13
26-05-1999	0,36	0,07	0,89	0,15	1,97	0,44	0,86	0,16	0,75	0,15	0,74	0,12
10-06-1999	0,35	0,07	0,88	0,14	1,80	0,40	0,83	0,16	0,63	0,12	0,67	0,10
24-06-1999	0,34	0,09	0,56	0,11	1,67	0,40	0,47	0,11	0,84	0,19	0,69	0,14
09-07-1999	0,34	0,07	0,95	0,16	2,49	0,57	0,93	0,18	0,95	0,20	0,77	0,12
07-08-1999	0,41	0,07	0,90	0,15	1,94	0,70	0,59	0,13	0,79	0,17	0,69	0,12
30-09-1999	0,34	0,07	0,96	0,17	1,45	0,36	0,88	0,19	0,95	0,21	0,79	0,13
15-11-1999	0,36	0,09	0,97	0,18	1,52	0,39	0,90	0,21	0,67	0,15	0,78	0,12
07-12-1999	0,28	0,07	0,83	0,14	1,13	0,27	0,64	0,15	0,64	0,14	0,72	0,12

porcentaje de peso fresco respecto al peso fresco total de la vianda, con un valor medio del 28 % a lo largo del ciclo. La parte que representa menos cantidad es el pie, con un valor medio del 6 %. Las partes restantes se corresponden con valores intermedios: 16 % el reborde, 14 % los sifones y 13 % el músculo y las branquias.

El ciclo gametogénico de la población objetivo del estudio se representa en la figura 1. Desde octubre a febrero de 1998 habría individuos en periodo de reposo gonadal (E0), aunque es en noviembre y, sobre todo, en diciembre cuando la mayoría de la población se encuentra en esta fase. Desde el muestreo de noviembre, algunos individuos estarían comenzando la gametogénesis (E1),

que empezaría en febrero para la mayoría de la población y alcanzaría su plenitud (E2) en marzo; esta fase de desarrollo gametogénico abarcaría hasta el mes de abril para un amplio porcentaje de individuos, mientras que otros estarían ya en la fase de madurez morfológica, que para la mayoría de la población llega entre abril y mayo. La fase de puesta (E3B) comprendería los meses de junio, julio y agosto, aunque se puede observar que algunos individuos entrarían en esta fase ya en mayo, para terminar con gametos residuales (E3D) en la mayoría de la población a finales de septiembre. En noviembre y diciembre de 1999 la mayoría de los individuos entrarían nuevamente en la fase de reposo gonadal; en noviembre queda todavía un porcenta-

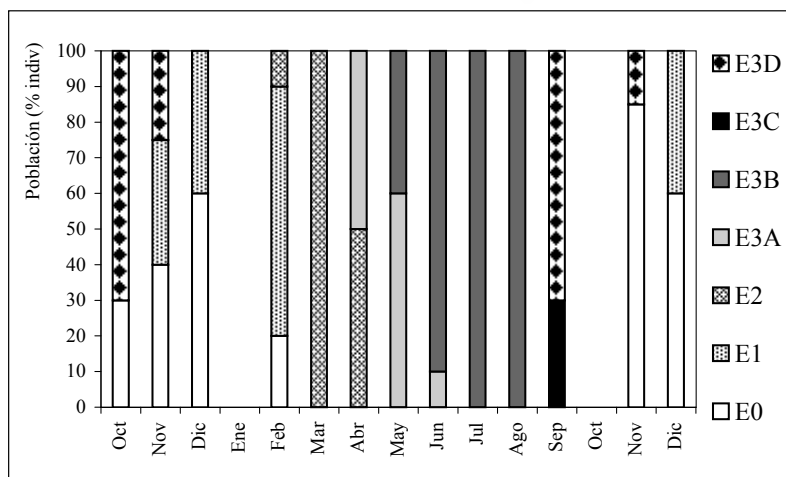
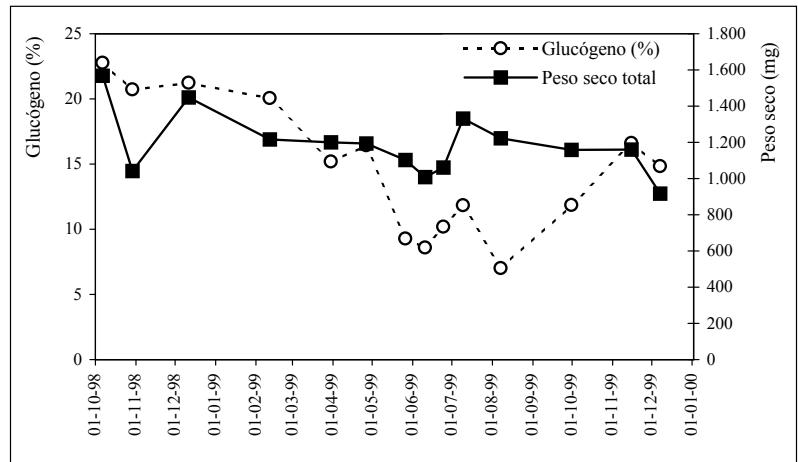


Figura 1. Representación del ciclo gametogénico de la población de *Ruditapes decussatus* de un banco natural en la zona de Baldaio (A Coruña). (E): estado de desarrollo.

Figura 2. Representación de las variaciones del peso seco total de la viande y porcentaje de glucógeno total. Cálculos para el animal estándar.



je pequeño de individuos con gametos residuales y, en diciembre, ya habría individuos que comenzarán otro ciclo con la gametogénesis (E1).

En la figura 2 se presentan las variaciones del contenido en glucógeno y del peso seco total de la viande para el individuo estándar. La evolución del glucógeno en porcentaje de peso seco varía desde el 22,75 % obtenido en octubre, hasta los mínimos de 8,57 % en junio y de 6,99 % en agosto, para volver a recuperarse después del desove. Las variaciones del peso seco total siguen un patrón similar al del glucógeno, con valores elevados durante la gametogénesis (1321 mg), que van descendiendo hasta mínimos (833 mg) en agosto.

Las variaciones a lo largo del ciclo gametogénico de las cantidades de glucógeno en los distintos tejidos y órganos diseccionados se representan en la figura 3. Se observa que las mayores variaciones se

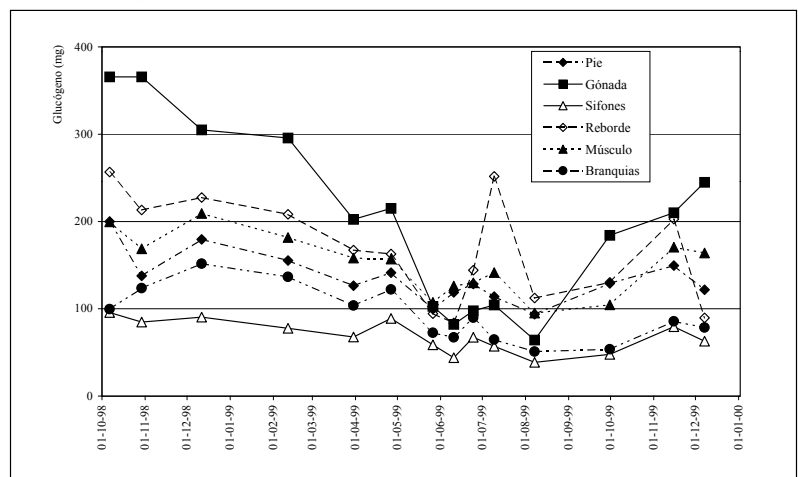
producen en el reborde muscular del manto y, sobre todo, en la gónada con la masa visceral; en ésta se aprecia cómo los valores máximos se alcanzan en la fase de reposo (365 mg de glucógeno por gramo de tejido seco), para ir descendiendo, durante la gametogénesis, hasta los niveles más bajos de la madurez sexual y la puesta (64,1 mg). Su recuperación comienza después del desove.

También es en la gónada, con la masa visceral, donde se acumulan las mayores cantidades de glucógeno: el valor medio es del 45 % de su peso seco; mientras, los valores más bajos se localizan en el pie (6,73 %), los sílfones (7,54 %) y las branquias (7,51 %).

### DISCUSIÓN

En la población estudiada, el ciclo gonadal de *Ruditapes decussatus* y sus dos fases diferenciadas, el

Figura 3. Variaciones en las cantidades de glucógeno, expresadas en miligramos de glucógeno por gramo de peso seco de tejido, en las diferentes partes de la almeja y referidas al animal estándar.



reposo gonadal (noviembre y diciembre) y la gametogénesis (resto del año, incluidas la madurez sexual y la puesta durante el verano), coincide con el observado por otros autores para la misma especie en Galicia (Figueras, 1957; Pérez Camacho, 1980; Rodríguez *et al.*, 1993; Villalba, Carballal y López, 1993; Rodríguez Moscoso, 2000).

También coincide con los resultados para esta especie en la costa atlántica francesa (región de Bretaña) de Benninger y Lucas (1984), que no observan ovocitos en la gónada de las hembras después de mediados de septiembre, y el comienzo del desarrollo gametogénico se produce a principios de abril, aunque en este estudio se observa ya en el muestreo de marzo.

En cuanto al contenido en glucógeno y su relación con el ciclo gametogénico se observa un incremento después del reposo sexual, y alcanza valores máximos antes de la fase de madurez; a continuación, se produce un descenso que conduce a los valores más bajos en plena madurez, para volver a recuperarse después de la puesta. Esto concuerda con lo publicado por Benninger y Lucas (1984), que encuentran que los valores máximos de glucógeno se registran inmediatamente antes de la gametogénesis.

Rodríguez *et al.* (1993), en un estudio en la ría de Muros y Noya, también concluyen que el glucógeno es utilizado como fuente energética principal para la síntesis de gametos. Este autor coincide con Ansell (1972), que también asocia los cambios en el peso de la carne y en la composición bioquímica a la formación de gametos.

En la ría de Pasaje (A Coruña), González García-Estrada (1975) encuentra que el porcentaje de glucógeno en peso seco alcanza valores máximos del 21 % en otoño y mínimos del 6,3 % en primavera. Estos porcentajes se asemejan a los obtenidos en este estudio, con el valor máximo de 22,75 % en octubre y mínimos en junio de 8,57 % y en agosto de 6,99 %.

En cuanto a las cantidades de glucógeno almacenadas en las partes diseccionadas, los resultados obtenidos se corresponden, en su mayoría, con los obtenidos por Rodríguez Moscoso (2000); la gónada, con la masa visceral, es el órgano en el que la cantidad de glucógeno almacenado es mayor, variando desde el 36 al 47 %, seguido del reborde muscular del manto (9-26 %) y el músculo aductor (10-23 %). En las restantes partes diseccionadas las

variaciones en el contenido de glucógeno son pequeñas a lo largo del año.

En estudios realizados sobre otras especies de moluscos bivalvos se encuentra que para *Solen marginatus* (Pennant, 1777) el ciclo del glucógeno es similar al observado aquí para *Ruditapes decussatus*: se acumula en otoño-invierno, antes de iniciarse la gametogénesis, y se hace mínimo durante el periodo de maduración; también coincide en que es en la gónada, con la masa visceral, donde se acumula la mayor cantidad de glucógeno (Rodríguez Moscoso *et al.*, 1996).

Mann (1979a,b) encuentra que el almacenamiento de nutrientes varía según el hábito reproductivo de las especies. Así, en las ovíparas, como *Tapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850) y *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793), la acumulación de carbohidratos es previa a la gametogénesis, y su contenido en los individuos decrece a lo largo del ciclo gametogénico, mientras que en las especies vivíparas, como *Ostrea edulis* (Linnaeus, 1758), no se constata esta interdependencia. Sin embargo, Román (1992), trabajando con esta especie, observa que el glucógeno previamente almacenado disminuye durante el periodo de reproducción, y esto hace verosímil esta interdependencia.

Los datos obtenidos permiten concluir que la estrategia reproductiva de la almeja fina en Galicia se ajusta al modelo conservador, pues la acumulación de glucógeno es previa a la gametogénesis, y su ciclo, inverso al desarrollo gametogénico.

## AGRADECIMIENTOS

Al personal del Centro de Cultivos Marinos de Ribadeo y a la Agrupación de Mariscadoras de Baldaio.

## BIBLIOGRAFÍA

- Ansell, A. D. 1972. Distribution, growth and seasonal changes in biochemical composition for the bivalve *Donax vitatus* (Da Costa) from Kames Bay, Milport. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 10: 137-150.
- Ansell, A. D., F. A. Loosmore y D. F. Lander. 1964. Studies on the hard-shell clam, *Venus mercenaria*, in the British waters. II. Seasonal cycle in condition and biochemical composition. *J. Appl. Ecol.* I: 83-95.
- Benninger, P. G. y A. Lucas. 1984. Seasonal variations in condition, reproductive activity, and gross biochemical composition of two species of adult clam reared in a common

- habitat: *Ruditapes decussatus* L (Jeffreys) and *Tapes philippinarum* (Adams & Reeve). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 79: 19-37.
- Figueras, A. 1957. Moluscos de las playas de la ría de Vigo. II. Crecimiento y reproducción. *Inv. Pesq.* VII: 49-97.
- Fraga, F. 1956. Determinación de glucógeno en moluscos con el reactivo de antrona. *Inv. Pesq.* III: 69-74.
- 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.
- González, N. 1975. Composición bioquímica y medio ambiente de *Venerupis decussata* y *Venerupis pullastra* en la Ría del Pasaje, La Coruña. *Boletín del Instituto Español de Oceanografía* 194: 45 pp.
- Mann, R. 1979a. The effect of temperature on growth, physiology, and gametogenesis in the manila clam *Tapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 38: 121-133.
- Mann, R. 1979b. Some biochemical and physiological aspects of growth and gametogenesis in *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis* sustained at elevated temperatures. *J. Mar. Biol. Ass. (UK)* 59: 95-110.
- Pérez Camacho, A. 1980. Biología de *Venerupis pullastra* (Montagu, 1803) y *Venerupis decussata* (Linné, 1758) (Mollusca, Bivalvia), con especial referencia a los factores determinantes de la producción. *Boletín del Instituto Español de Oceanografía* 281: 43-76.
- Rodríguez Moscoso, E. 2000. *Histofisiología de la reproducción de almeja fina Ruditapes decussatus (Linné, 1758) en la Ría de Arosa (Población natural y población de cultivo)*. Tesis doctoral. Universidad de Santiago de Compostela: 202 pp.
- Rodríguez Moscoso, E., D. Martínez, R. Arnaiz, G. Mosquera, A. Cerviño, A. de Coó, A. García y N. Rúa. 1996. Gametogénesis, reservas energéticas y desarrollo larvario en el longueirón *Solen marginatus* (Pennat, 1777). En: *Libro de resúmenes del IX Simposio Ibérico de Estudios del Bentos Marino* (19-23 de febrero, 1996. Alcalá de Henares, Madrid). J. M. Viéitez y J. Junoy (eds.): 164-165. Departamento de Biología Animal, Universidad de Alcalá de Henares. Alcalá de Henares, Madrid: 164-165.
- Rodríguez, S., R. Quintana, L. Lamas, G. Ayensa, F. J. Velasco y C. Pascual. 1993. Etude comparative du cycle gamétogénique et composition biochimique de *Tapes decussatus* et *Ruditapes philippinarum* dans la Ría de Muros y Noya. En: *Bordeaux Aquaculture 92. Production, Environment and Quality* (Special Publication). G. Barnabé y P. Kestemont (eds.) 18: 503-511. European Aquaculture Society. Ghent, Bélgica.
- Román, G. 1992. Efecto del ciclo reproductivo y el acondicionamiento en el desarrollo larvario, la fijación y el posterior crecimiento de la semilla de *Ostrea edulis* Linné, 1758. *Publicaciones Especiales. Instituto Español de Oceanografía* 9: 172 pp.
- Villalba, A., M. J. Carballal y M. C. López. 1993. Estudio del ciclo gonadal de tres especies de almeja, *Ruditapes decussatus*, *Venerupis pullastra* y *Venerupis rhomboides*, en las rías gallegas. En: *Actas del IV Congreso Nacional de Acuicultura* (21-24 de septiembre, 1993. Illa de Arousa, Pontevedra, España). A. Cerviño et al. (eds.): 341-346. Centro de Investigaciones Mariñas. Vilagarcía de Arousa (Pontevedra), España: 804 pp.
- Walne, P. R. 1976. Experiments on the culture in the sea of the butterfish *Venerupis decussata* L. *Aquaculture* 8: 371-381.
- Wilson, J. H. y R. Seed. 1974. Reproduction in *Mytilus edulis* L. (Mollusca: Bivalvia) in Carlingford Lough, Northern Ireland. *Irish Fisheries Investigations B* (15): 1-30.





ELSEVIER

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

SCIENCE @ DIRECT®

Aquaculture 238 (2004) 451–468

**Aquaculture**

[www.elsevier.com/locate/aqua-online](http://www.elsevier.com/locate/aqua-online)

## Seasonal variation in weight and biochemical composition of the tissues of *Ruditapes decussatus* in relation to the gametogenic cycle

J. Ojea<sup>a</sup>, A.J. Pazos<sup>b</sup>, D. Martínez<sup>a</sup>, S. Novoa<sup>a</sup>,  
J.L. Sánchez<sup>b</sup>, M. Abad<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup>Centro de Cultivos Mariños de Ribadeo, Centro de Investigaciones Mariñas (CIMA), Consellería Pesca, Marisqueo e Acuicultura, 27700-Ribadeo, Spain

<sup>b</sup>Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Instituto de Acuicultura, Universidad de Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Spain

Received 19 August 2003; received in revised form 6 May 2004; accepted 11 May 2004

### Abstract

Seasonal variations in the body weight and biochemical composition of the bivalve *Ruditapes decussatus* were studied over a period of 15 months. Separate analyses were made of foot, mantle edge, siphons, gills, adductor muscle and gonad-visceral mass. Variations in weight, body growth, gonad growth and spawning depended on environmental conditions, especially food availability. The gametogenic cycle comprised two phases: a resting phase (November–December) and gametogenesis, including ripeness and spawning, during the rest of the year. Gametogenesis usually took place during the spring, and spawning in summer (June–August). The highest variation in biochemical composition was largely attributable to a change in the glycogen content (average  $14.7\% \pm 5.1$  S.D. of dry weight). Protein ( $48.1\% \pm 1.8$ ) and lipid contents ( $5.6\% \pm 0.6$ ) remained relatively constant throughout the year. Adductor muscle, foot and siphons contained mainly proteins (67.8%, 51.2% and 65.8% of the dry tissue weight, respectively) and gonad-visceral mass and gills contained the highest amount of lipids ( $\approx 7\%$ ). The gonad-visceral mass showed the largest variations in all components during the gametogenic cycle. Lipid and glycogen concentrations in the gonad-visceral mass were inversely related: maximum concentrations of glycogen occurred during the resting phase or initial gametogenesis and corresponded with minimum concentrations of lipids, and minimum concentrations of glycogen occurred at maturity when lipids reached maximum concentrations. The gonad-visceral mass contained lower amounts of proteins ( $<40\%$ ) than the other body parts. Variations in total fatty acid content in neutral and polar lipids of the gonad-visceral mass followed a seasonal cycle

\* Corresponding author. Tel.: +34-981563100x14931; fax: +34-981594912.

E-mail address: [bnlina@usc.es](mailto:bnlina@usc.es) (M. Abad).

related to the gametogenic cycle, with increases during the period of maximum ripeness and decreases during spawnings. Maximal contents of polyunsaturated fatty acids, especially in the polar lipids corresponded with oocyte maturation and minimal contents with the post-spawning period. However, variations in the neutral lipids appeared to be related to the available food, in association with an increase in the chlorophyll *a* concentration.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

*Keywords:* Gametogenic cycle; Glycogen; Lipid; Protein; *Ruditapes decussatus*; Seasonal variations

---

## 1. Introduction

The clam *Ruditapes decussatus* is commercially very important in Galicia (NW Spain), which has one of the highest rates of consumption of this mollusc species in the world. Because of its considerable economic importance and the high market demand, over-exploitation of the species has largely depleted the natural stocks, thereby boosting the aquaculture industry (Beiras et al., 1993). Culture of this marine bivalve species is clearly limited by the availability of seed. The clam *R. decussatus* is abundant in European estuaries, but information on its biology is limited (Partridge, 1977; Pérez-Camacho, 1980, Beninger and Lucas, 1984; Shafee and Daoudi, 1991; Rodríguez et al., 1993; Jara-Jara et al., 1997; Urrutia et al., 1999; Chícharo and Chícharo, 2001). To be able to improve the methods of cultivating *R. decussatus*, detailed knowledge of the reproductive cycle and spawning periods is fundamental.

Seasonal metabolic activities in molluscs result from complex interactions among food availability, environmental conditions, growth and reproduction (Gabbott, 1983). Marine bivalves show seasonal cycles of energy storage and utilization (= biochemical cycles) that are closely related to reproductive activity (Giese, 1969; Bayne, 1976; Gabbott, 1976, Sastry, 1979, Barber and Blake, 1981, 1985). Several studies of biochemical cycles in bivalves have been carried out in relation to reproduction (Giese, 1969; Gabbott, 1975, 1983; Bayne, 1976; Barber and Blake, 1981, 1985; Ruíz et al., 1992). In general, energy is stored prior to gametogenesis, when food is abundant, in the form of glycogen, lipid and protein. The particular importance of these substrates, where they are stored and the timing of their use varies among species, as well as among populations of the same species (Giese, 1969; Bayne, 1976; Sastry, 1979). Bayne (1976) showed that the cycles of energy storage and of gamete production may be closely linked in time (*Abra alba*, *Cardium edule*, *Chlamys septemradiata* and *Tellina tenuis*) or clearly separated (*Macoma balthica*, *Mytilus edulis* and *Pecten maximus*). Mackie and Ansell (1993) reported that environmental factors apparently play a dominant role in determining events in the storage cycles.

In this study, seasonal changes in the biochemical composition and allometric relationships of various body parts of *Ruditapes decussatus* from a population in the Lagunas de Baldaio (Galicia, N.W. Spain) were examined in relation to the gametogenic cycle. Study of the biochemical composition of separate organs allows the identification of nutrient storage sites and determination of nutrient use during

reproduction or during periods when there is a lack of food. We also determined the fatty acid composition of triacylglycerols and phospholipids from the gonad-visceral mass, because these have a determining role in the process of gametogenesis. Lipids have two fundamental roles in metabolism: as stores of energy, in the form of triacylglycerols and as membrane components in the form of phospholipids. Knowledge of the specific role of different biochemical components in various tissues as well evaluation of their role in reproduction will help hatchery managers to determine the best strategy for producing large quantities of seed.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Sampling of clams

Samples of *R. decussatus*—between 20 and 24 adult clams—were collected at approximately monthly intervals between October 1998 and December 1999, from a natural bank situated in the Lagunas de Baldaio (Galicia, N.W. Spain). The sampling site was chosen because of its optimal sanitary environmental conditions and the lack of parasitic infections and other diseases in the clam population.

The environmental conditions of the area are shown in Fig. 1. Data on water temperature, salinity and chlorophyll *a* concentration were supplied by the Centro de Control de Mareas Rojas under the auspices of the Conselleria de Pesca y Asuntos Marítimos de Galicia. The mean monthly temperature ranged from 11.4 °C in February to 23.4 °C in August. Seasonal variations in chlorophyll *a* were similar to variations in

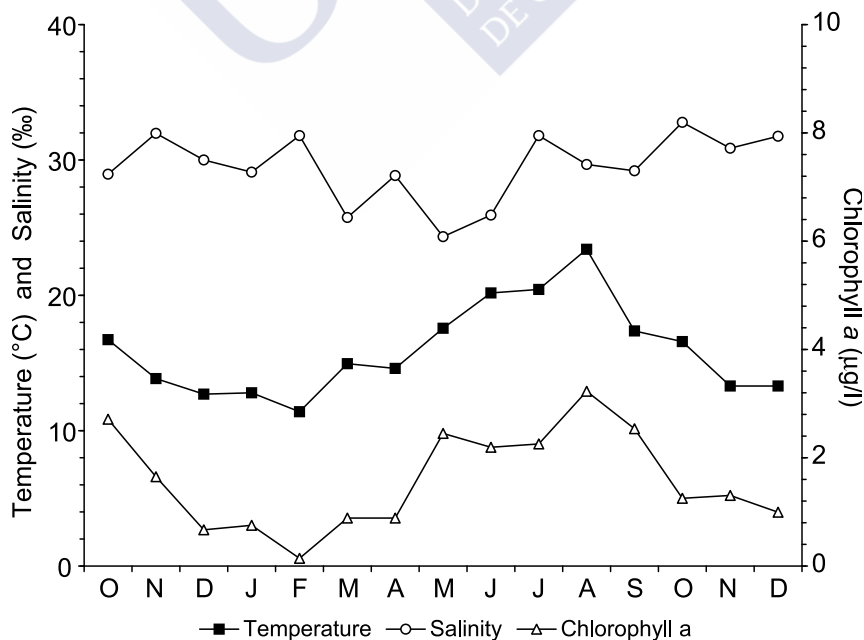


Fig. 1. Monthly average values of water temperature, salinity and chlorophyll *a* in the Lagunas de Baldaio.

temperature and reached a maximum concentration of ( $3.2 \mu\text{g l}^{-1}$ ) in August, several phytoplanktonic blooms occurred in autumn and the average concentration of chlorophyll *a* was  $2.7 \mu\text{g l}^{-1}$ . Salinity fluctuated between 29‰ and 32‰.

## 2.2. Biometric measurements

Clams were immediately transported to the laboratory, where the fresh weights and linear dimensions (length, height and width) were determined. Clams were then opened, damp-dried and the soft tissues removed, and shell and soft tissues weighed. The soft tissues were immediately dissected and separated into: foot, mantle edge, siphons, gills, adductor muscle and gonad-visceral mass (including digestive system, labial palps, nerve ganglia, kidney-pericardium region). The gonad-visceral mass was analysed as a unit because of the physical difficulty in separating the two organs. The wet weight of each part was recorded. Between 1 and 2 g of each homogenized tissue was weighed out and the dry weight of shell and each tissue was determined after drying at  $100^\circ\text{C}$  for 24 h.

## 2.3. Condition indices

The condition index of the clams (CI) was calculated as the ratio of the dry weight of the soft parts/dry weight of shell  $\times 100$  (Walne, 1976).

The gonad condition index (GCI) was calculated as the ratio of the dry weight of the gonad-visceral mass/dry weight of shell  $\times 100$ .

## 2.4. Standard animal

To evaluate the seasonal variations in weight and biochemical composition of *R. decussatus* tissues independently of growth, the live weight corresponding to a standard animal was calculated as the mean of the live weight of the whole samples. The wet weight of the flesh and the wet weight of the different tissues were estimated from the fresh weight of the standard animal. Then, the dry weight of each tissue was standardized in accordance with its due percentage in each sample. The biochemical constituents were then expressed in percentage and in absolute values as derived from the weight of the standard animal.

## 2.5. Gametogenic activity

Gonadal tissue from each clam was fixed in Davison's fluid for 24–28 h according to the size of the piece. The tissues were dehydrated in series of alcohols, and embedded in wax. Sections,  $7 \mu$  thick, were prepared, stained with haematoxylin and counter-stained with eosin. The different gametogenic stages were then identified in the stained sections, according to Wilson and Seed (1974): stage 0 = resting stage, stage 1 = early gametogenic development, stage 2 = gametogenic development, stage 3A = morphologically ripe, stage 3B = spawning, stage 3C = redevelopment and stage 3D = recently spent. When two or more stages occurred simultaneously in a single section, classification of the stage was based upon the condition of the majority of follicles present in the section.

## 2.6. Biochemical determinations

Each determination of biochemical compounds was carried out in duplicate on pooled, lyophilized material: 2–3 mg for glycogen and protein determinations and 200 mg for lipid determination. Glycogen, total protein and total lipid contents were determined in the whole animal and in each dissected part using the methods of anthrone (Fraga, 1956; Lowry et al., 1951; Marsh and Weinstein, 1966; respectively). Anthrone, bovine serum albumin and tripalmitin were used as standards for quantifying glycogen, proteins and lipids respectively. For fatty acid analyses, total lipids were first extracted from 200 mg of gonad-visceral mass tissue or gametes, using the method of Folch et al. (1957), as modified by Beninger and Lucas (1984). The neutral and polar lipids (mainly corresponding to triglycerides and phospholipids, respectively) were separated on a silica gel column using chloroform–methanol (98:2) and methanol, respectively as eluents. Each lipid fraction was then directly transesterified with boron-trifluoride (20%) in methanol at 100 °C for 10 min. The fatty acid methyl esters were analysed in a HP-6890 gas chromatograph equipped with an Hp-Innowax capillary column (30 m × 0.25 mm, 0.25 µm film thickness), a flame ionization detector (FID) and hydrogen as carrier gas. The injector temperature was set at 220 °C and the temperature of the column was maintained at 60 °C for 1 min, and then increased from 60 to 150 °C at a rate of 50 °C min<sup>-1</sup>, then maintained at 150 °C for 2 min before increasing again up to 240 °C at 3 °C min<sup>-1</sup> followed by a 20-min plateau at 240 °C. The fatty acid 23:0 was added to each sample as an internal standard for quantitative determinations. The fatty acids were identified by their retention times in comparison with those of standards (Sigma Chemical 189-19); peaks comprising less than 0.2% of the total area were not considered. The following shorthand notation was used C:X(n-Y), where C is the number of carbon atoms, X is the number of double bonds and Y is the position of the first double bond counted from the terminal methyl group.

Biochemical constituents were expressed for a standard animal as percentages of tissue dry weight and also as the total weight of each constituent present in the average tissue. The number of the replicate samples necessary to obtain repeatable results was determined by a Student's *t*-test, and the values for the coefficient of variation in the replicate determinations were <0.05 around the mean. Pearson's correlations were used in order to assess the association of biometric measurements and biochemical composition with gametogenic cycle and environmental parameters. Statistic analyses were carried out with the aid of the SPSS computer software programme.

## 3. Results

### 3.1. Biometric measurements

The biometric measurements and condition indices are shown in Table 1. The CI varied between 5.6 and 10.1. During gametogenic development, the CI remained high (8.0) decreasing to 6.8 at ripeness (June). The values of CI recovered between July and August,

Table 1

Biometric measurements of the sampled individuals of *R. decussatus*: length, height, width, fresh weight (TW), shell dry weight (SDW), flesh weight (FW), flesh dry weight (FDW) and condition indices (CI and GCI)

Date	Length (mm)		Height (mm)		Width (mm)		TW (g)		SDW (g)		FW (g)		FDW (g)	CI	GCI
	Mean	S.D.	Mean	S.D.	Mean	S.D.	Mean	S.D.	Mean	S.D.	Mean	S.D.			
10/6/1998	48.79	2.42	34.92	1.71	23.27	1.26	26.47	3.99	14.17	2.24	6.98	1.01	1.43	10.1	2.9
10/29/1998	43.09	1.25	31.84	0.94	21.02	1.11	19.68	2.20	11.45	1.46	3.91	0.33	0.74	6.5	1.8
12/11/1998	45.56	1.97	32.97	0.99	21.85	0.68	22.29	2.12	12.40	1.03	5.29	0.66	1.11	9.0	2.8
2/11/1999	50.91	1.39	36.84	2.80	24.48	0.96	29.62	2.72	16.04	1.58	6.77	0.63	1.32	8.2	2.6
3/30/1999	50.57	0.91	36.11	0.61	23.80	0.62	27.78	1.85	14.82	1.15	6.49	0.59	1.23	8.3	2.8
4/26/1999	52.82	2.06	38.61	1.82	26.85	1.81	33.27	4.02	17.47	2.24	7.73	0.86	1.49	8.5	3.1
5/26/1999	45.95	3.45	33.77	2.14	22.61	1.48	24.19	5.37	13.38	2.93	5.53	1.26	1.01	7.6	3.1
6/10/1999	43.99	2.23	32.15	1.44	21.46	1.18	20.83	3.01	11.84	1.60	4.43	0.66	0.81	6.8	2.7
6/24/1999	48.79	1.07	34.76	0.63	23.05	0.31	24.83	1.65	13.18	0.98	4.69	0.29	0.92	7.0	2.7
7/9/1999	45.37	1.44	33.73	1.15	21.59	0.78	20.85	2.25	11.08	1.31	5.33	0.55	1.05	9.5	4.1
8/7/1999	41.70	3.48	30.96	2.54	20.30	1.96	18.02	5.27	9.87	3.03	3.95	1.05	0.83	8.5	4.0
9/30/1999	47.11	1.62	33.93	0.87	22.79	0.69	23.35	1.84	12.61	1.07	5.16	0.45	1.06	8.4	2.6
11/15/1999	47.54	1.44	34.93	1.24	23.17	0.81	24.82	3.30	14.14	1.80	5.31	0.70	1.01	7.1	2.4
12/7/1999	47.86	2.08	34.36	1.34	23.01	0.99	25.16	3.04	14.00	1.75	4.40	0.78	0.78	5.6	1.8

and then decreased again in September and October, after massive spawning at the end of the summer. The wet and dry weights of the different tissues of the clams, expressed as g in a standard animal (fresh weight = 24.39 g), are shown in Table 2. The variations in clam body tissues were mainly accounted for by the gonad-visceral mass, mantle edge and adductor muscle, which showed large variations over the course of the study.

Pearson's correlation matrices showed a direct relationship between the clam size measurements (length, height and width) and all total weights (live, shell, wet and dry

Table 2

Changes in mean wet weight (WW) and mean dry weight (DW) of six tissues of standard animal of *R. decussatus*

Date	Foot		Mantle edge		Gonad-VM		A. muscle		Siphons		Gills	
	WW (g)	DW (g)	WW (g)	DW (g)	WW (g)	DW (g)	WW (g)	DW (g)	WW (g)	DW (g)	WW (g)	DW (g)
10/6/1998	0.52	0.13	1.04	0.29	1.58	0.41	0.71	0.16	1.14	0.28	0.86	0.15
10/29/1998	0.29	0.06	0.64	0.12	0.84	0.21	0.53	0.12	0.61	0.13	0.54	0.10
12/11/1998	0.34	0.09	0.87	0.18	1.19	0.34	0.65	0.17	0.75	0.18	0.64	0.15
2/11/1999	0.44	0.10	1.17	0.22	1.68	0.42	1.06	0.23	0.91	0.19	0.80	0.15
3/30/1999	0.34	0.08	1.04	0.19	1.80	0.41	0.97	0.20	0.85	0.19	0.78	0.15
4/26/1999	0.43	0.10	1.21	0.21	2.31	0.54	1.16	0.25	0.96	0.21	0.99	0.17
5/26/1999	0.33	0.07	0.82	0.14	1.81	0.41	0.79	0.15	0.70	0.14	0.69	0.11
6/10/1999	0.28	0.06	0.71	0.11	1.45	0.32	0.66	0.13	0.51	0.10	0.54	0.08
6/24/1999	0.30	0.08	0.49	0.10	1.45	0.35	0.41	0.10	0.73	0.18	0.61	0.12
7/9/1999	0.28	0.06	0.75	0.14	1.96	0.45	0.74	0.14	0.76	0.16	0.62	0.10
8/7/1999	0.28	0.05	0.61	0.10	1.32	0.40	0.41	0.09	0.55	0.12	0.48	0.08
9/30/1999	0.31	0.07	0.88	0.16	1.32	0.33	0.81	0.17	0.88	0.20	0.72	0.13
11/15/1999	0.32	0.08	0.84	0.16	1.32	0.34	0.79	0.18	0.58	0.13	0.68	0.12
12/7/1999	0.24	0.06	0.70	0.12	1.03	0.25	0.53	0.13	0.53	0.12	0.61	0.10

flesh) ( $P < 0.01$ ) however, none correlated significantly with the condition indices, except for wet flesh weight ( $P < 0.05$ ) and dry flesh weight ( $P < 0.01$ ). The different tissues studied showed a similar pattern of variations in wet and dry weight.

### 3.2. Gametogenic cycle

The percentage distribution of different gametogenic stages observed during the period of study is shown in Fig. 2 and the changes in GCI in Table 1. Gametogenesis began in December or January, after a period of a sexual inactivity during the months of November and especially December. In February, more than 70% of the individuals were at stage 1 of gametogenic development and, in March, 100% of the clams were at stage 2. Gonads became ripe from April onwards. Although some individuals were at stage 3B in May, the main spawning activity (stage 3B) was observed in June (90%), July (100%) and August (100%); by September, 30% of the clams were at stage 3C, the rest were at stage 3D of gametogenic development. Between November and December of 1999 most of the clams returned to the resting phase; however, in November, a small percentage of individuals (14%) had residual gametes, whereas in December gametogenesis had already begun in 40% of the clams (stage 1). We could therefore distinguish two phases in the gonadal cycle of *R. decussatus* in the Lagunas de Baldaio population: a resting phase in November–December and gametogenesis during the rest of the year, including ripeness and spawning in the summer.

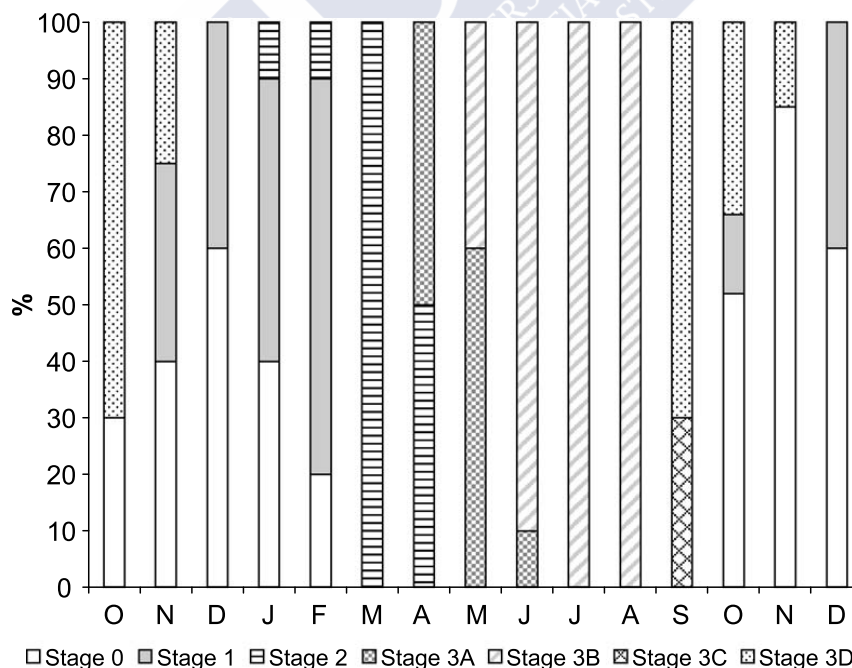


Fig. 2. Seasonal distribution of *R. decussatus* at different stages of gonad development, according to Wilson and Seed (1974): stage 0=resting stage, stage 1=early gametogenic development, stage 2=gametogenic development, stage 3A=morphologically ripe, stage 3B=spawning, stage 3C=redevelopment and stage 3D=recently spent.

### 3.3. Gross biochemical composition

Seasonal variations in the content of glycogen, total lipids and proteins of the whole flesh are shown in Table 3 expressed as mg per g of dry flesh weight in a standard animal. Protein content underwent few variations during the experimental period, and reached a maximum (50.8%) in June 1999 and fell to a minimum (44.7%) in December 1998. Glycogen content varied between 22.7% in October 1998 when the clams were in a reproductively inactive phase, and 7.0% in August 1999 following the spawning period. The percentage of lipids remained low and relatively unchanged

Table 3

Seasonal variations in glycogen, lipid and protein contents (mg/g dry weight) of the whole animal flesh and different tissues of *R. decussatus*

	10/6/ 1998	10/29/ 1998	12/11/ 1998	2/11/ 1999	3/30/ 1999	4/26/ 1999	5/26/ 1999	6/10/ 1999	6/24/ 1999	7/9/ 1999	8/7/ 1999	9/30/ 1999	11/15/ 1999	12/7/ 1999
<i>Whole flesh</i>														
Glycogen	227.5	207.2	212.3	200.5	151.7	164.2	92.6	85.7	101.9	118.2	70.0	118.4	165.9	148.2
Lipids	44.8	58.7	52.7	56.9	56.1	52.6	58.5	58.2	56.1	61.4	68.8	55.6	51.6	48.3
Proteins	485.3	484.0	447.4	503.6	474.4	453.3	484.9	485.1	507.6	478.0	491.3	504.5	464.2	471.8
<i>Foot</i>														
Glycogen	199.9	137.6	179.5	155.3	126.4	141.3	99.5	118.9	128.4	113.9	93.8	129.1	149.5	121.8
Lipids	45.9	44.2	44.5	46.5	44.5	47.9	45.0	46.7	49.3	46.7	48.3	50.0	50.1	47.3
Proteins	496.9	467.0	529.7	499.5	510.3	520.9	495.8	497.7	541.4	535.7	540.8	501.0	514.6	509.9
<i>Edge</i>														
Glycogen	256.6	213.2	227.5	208.3	167.2	162.7	94.5	83.8	144.1	251.7	112.3	130.2	202.8	89.5
Lipids	41.6	46.6	45.5	47.4	50.4	49.3	51.6	48.1	52.4	56.6	50.1	72.5	53.8	51.0
Proteins	412.6	454.7	463.2	439.0	478.6	472.4	472.9	486.1	490.4	443.1	463.0	463.0	456.8	458.4
<i>Gonad-visceral mass</i>														
Glycogen	365.6	365.6	304.9	295.7	202.5	215.0	102.7	82.1	97.7	104.3	64.2	184.2	210.0	244.8
Lipids	49.9	94.2	71.7	81.5	76.4	65.3	79.2	79.7	70.0	80.8	94.2	67.0	59.7	54.5
Proteins	323.5	323.5	256.7	401.5	289.9	268.0	360.4	357.7	376.4	360.6	400.1	357.3	270.0	295.5
<i>Adductor muscle</i>														
Glycogen	199.7	168.7	209.3	181.6	158.2	156.3	107.3	126.1	129.7	141.6	95.0	104.5	170.6	164.0
Lipids	19.1	28.7	23.8	27.0	22.7	24.8	20.2	20.0	26.0	27.5	20.8	21.0	22.8	17.9
Proteins	639.0	648.4	631.1	674.8	683.7	646.4	673.6	693.8	714.7	693.9	722.7	683.9	689.3	698.5
<i>Siphons</i>														
Glycogen	95.7	84.8	90.4	77.6	67.6	88.9	58.7	44.0	67.3	57.1	38.6	47.8	79.4	62.8
Lipids	44.4	47.6	44.1	45.5	47.1	45.0	45.3	45.6	45.2	43.8	43.8	43.4	49.4	46.4
Proteins	688.0	649.9	646.6	624.0	663.1	678.8	675.5	636.3	675.6	657.9	666.1	663.0	658.6	625.8
<i>Gills</i>														
Glycogen	99.5	123.6	151.6	136.5	103.8	122.1	72.5	67.3	89.8	64.7	51.0	53.6	85.7	78.5
Lipids	65.1	59.5	66.3	70.1	69.4	69.4	67.4	72.7	61.8	66.2	69.0	72.8	72.7	70.3
Proteins	507.7	445.1	368.0	467.0	437.3	416.4	455.3	451.5	479.0	426.8	432.7	456.4	446.2	438.3

(4.5–6.9%) during the study. Pearson's correlations revealed a direct relationship among total proteins, lipids and glycogen of the standard animal ( $P < 0.01$ ).

Variations in the biochemical composition of the different body parts (foot, mantle edge; siphons, gills, adductor muscle and gonad-visceral mass) expressed as mg per g of dry tissue in the standard animal are shown in Table 3. The gonad-visceral mass showed the largest variations in all components during the gametogenic cycle. Glycogen concentrations were minimal in June (82.8 mg/g) and August (64.2 mg/g) and maximal in October–November (365.6 mg/g). Lipids concentrations were lowest in October–December and highest in May–August, and decreased after spawning. During the annual cycle, lipid and glycogen concentrations were inversely related. Maximum concentrations of glycogen occurred during the resting phase or initial gametogenesis, and corresponded with minimum concentrations of lipids. Minimum concentrations of glycogen occurred at maturity when maximum concentrations of lipids were reached. The gonad-visceral mass contained lower amounts of proteins than the other clam parts, with minimum concentrations in November (27.0%) and maximum in February (40.2%).

Proteins were the major biochemical constituents of the adductor muscle, varying between 63.1% in December and 72.3% in August. The percentage of lipid was low  $\approx 2\%$  and with scarcely any variations. Glycogen varied from 9.5% in August to 20.9% in December. Siphons were also showed high of protein contents (62.4–68.8%), whereas the glycogen content was low varying between 3.9% in August and 9.6% in October. Lipids remained around 4–5% throughout the experimental period. In mantle edge, glycogen averaged 17% (range = 8.3–25.7%), total lipids varied from 4.2% in October to 7.2% in September and proteins averaged 46%, with minor variations during the annual cycle. Proteins were the major biochemical constituents in the foot, with a mean of 51% (range = 46.7–54.1%), glycogen varied between a minimum of 9.4% in August and a maximum of 20.0% in October, total lipids remained almost constant (4.4–5.0%). Gills contained the highest percentage of lipids (mean value of 6.8%) of the tissues examined except the gonad-visceral mass (mean value of 7.3%).

### 3.4. Seasonal variations in the fatty acid composition of gonad-visceral mass

The fatty acid compositions of total neutral and polar lipids from the gonad-visceral mass are shown in Table 4. In the neutral lipids, the 16:0, 16:1(n-7), 18:1(n-7), 22:6(n-3) and 20:5(n-3) fatty acids predominated; in October of 1998 there was a high percentage of 22:5(n-3), possibly due to a bloom of phytoplankton rich in this fatty acid. In the polar lipid fraction, the polyunsaturated fatty acids were the most important fatty acid type, especially the n-3 series—dominated by 22:6(n-3) and 20:5(n-3)—followed by total saturated fatty acids, principally 16:0 and 18:0. The monounsaturated fatty acids were mainly represented by 16:1(n-7) and 18:1(n-7) and 18:1(n-9). Polar lipids lacked 20:0 and 18:3(n-6) fatty acids, however 16:1(n-9) fatty acid was present at a higher percentage than neutral lipids. The palmitic acid and 18:1(n-9) showed higher variations in the neutral lipid fraction and the polyunsaturated fatty acids in the polar lipids.

In both neutral and polar fractions, we found two C22 dienoic acids, 22:2i and 22:2j, which we considered to be 22:2 $\Delta$ 7,13 and 22:2 $\Delta$ 7,15, respectively (Klingensmith, 1982). The percentages of these fatty acids in the polar fraction were considerably higher than in

Table 4  
Seasonal variations of fatty acid composition in the gonad-visceral mass of *Ruditapes decussatus* expressed in % of the total fatty acids in the neutral and polar lipid fraction. 22:2i and 22:2j are possible non-methyl/ene-interrupted fatty acids

	10/6/98	10/29/98	12/11/98	2/11/99	3/30/99	4/26/99	5/26/99	6/10/99	6/24/99	7/9/99	8/7/99	9/30/99	11/15/99	12/7/99
<i>Neutral lipid fraction</i>														
14:0	3.82	2.34	2.89	2.57	3.90	2.83	6.90	7.40	7.58	8.12	8.83	5.17	4.71	4.76
16:0	17.27	15.17	19.23	19.29	21.01	19.41	22.12	26.25	25.54	24.37	27.33	21.76	29.92	26.50
18:0	4.33	6.40	7.69	7.09	6.39	5.36	7.50	4.27	5.33	4.91	5.20	9.75	11.35	6.71
16:1(n-9)	0.78	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
16:1(n-7)	6.39	12.17	9.47	12.36	13.51	11.90	11.42	16.56	20.67	17.23	16.62	10.97	11.08	10.51
18:1(n-9)	4.94	3.91	5.42	5.74	5.77	5.81	6.15	5.03	5.25	4.27	5.93	5.04	5.17	4.94
18:1(n-7)	6.00	5.35	8.45	9.63	9.04	9.82	8.65	7.64	8.45	9.01	8.82	6.32	9.61	10.82
20:1(n-9)	1.16	1.23	1.33	1.26	1.13	1.09	0.87	0.84	0.94	0.88	0.98	1.00	2.11	1.70
20:1(n-11)	0.88	1.24	1.64	1.95	1.80	1.13	1.45	1.48	1.92	1.67	1.59	1.59	1.50	2.42
18:2(n-6)	1.96	0.93	1.28	1.25	1.14	1.77	1.89	1.59	0.85	0.94	1.93	1.21	1.18	1.91
18:3(n-6)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.19	0.34
18:3(n-3)	2.02	0.83	1.10	1.24	1.87	2.01	1.85	1.75	1.06	1.75	2.35	1.43	1.57	1.93
20:2(n-6)	2.03	1.65	2.36	2.21	1.65	1.91	2.42	1.36	1.11	1.20	1.22	1.38	1.57	2.24
20:3(n-6)	0.23	0.18	0.32	0.31	0.26	0.32	0.21	0.23	0.25	0.29	0.26	0.32	0.27	0.35
20:4(n-6)	1.50	2.45	2.75	2.78	2.15	2.53	2.13	1.58	1.65	1.53	1.48	3.14	2.09	2.33
20:5(n-3)	8.53	7.92	10.50	10.92	11.58	12.36	9.48	9.70	8.09	8.54	6.19	10.76	5.06	7.85
22:5(n-6)	0.57	0.64	0.79	0.92	0.81	0.73	0.50	0.33	0.42	0.67	0.44	0.68	0.34	0.64
22:5(n-3)	20.05	22.97	4.34	1.86	1.94	2.07	1.50	1.65	1.21	1.67	1.04	1.64	1.27	1.68
22:2i	0.79	0.49	0.74	0.96	0.52	0.58	0.71	0.71	0.48	0.45	0.57	0.94	1.02	0.63
22:2j	1.65	1.44	2.17	2.48	1.99	2.60	2.23	1.69	1.75	1.87	2.49	2.56	3.25	2.25
22:6(n-3)	15.08	12.70	17.53	15.18	13.51	15.75	12.02	9.94	7.44	10.62	6.71	14.34	5.98	9.09
Total SFA	25.43	23.91	29.81	28.95	31.30	27.61	36.52	37.92	38.45	37.40	41.36	36.37	46.19	37.97
Total MUFA	19.28	22.66	24.67	29.00	29.46	28.63	27.09	30.07	35.31	31.40	32.36	23.33	28.54	28.36
Total PUFA	54.42	52.18	43.88	40.10	37.44	42.63	34.94	30.53	24.32	29.53	24.69	38.40	23.78	31.25
Total (n-3)	45.68	44.41	33.47	29.20	28.91	32.20	24.85	23.04	17.80	22.58	16.29	28.18	13.87	20.56

Total (n-6)	6.29	5.84	7.50	7.46	6.02	7.26	7.15	5.09	4.28	4.64	5.34	6.72	5.63	7.81
(n-3)/(n-6)	7.26	7.60	4.46	3.91	4.80	4.44	3.48	4.53	4.16	4.87	3.05	4.19	2.46	2.63
<i>Polar lipid fraction</i>														
14:0	1.02	1.14	0.97	0.66	0.64	0.79	0.60	0.68	0.72	0.95	0.76	0.90	1.21	0.92
16:0	15.08	16.09	14.17	14.20	14.27	14.74	14.83	16.12	15.27	16.66	17.49	14.58	16.48	16.79
18:0	7.86	8.70	7.50	6.11	9.02	8.40	9.39	7.34	7.93	7.21	8.95	6.19	10.05	12.21
16:1(n-9)	3.24	3.59	3.38	3.91	2.78	3.48	2.06	2.62	3.35	3.28	3.15	5.60	0.00	0.00
16:1(n-7)	1.43	2.88	2.50	1.75	2.29	2.62	2.67	2.67	4.39	3.68	3.23	1.52	3.13	2.67
18:1(n-9)	3.70	3.99	4.24	4.23	3.05	3.05	3.24	2.49	2.81	2.70	3.25	3.34	5.37	4.42
18:1(n-7)	2.17	2.96	2.57	7.09	2.52	2.76	2.53	2.04	3.35	3.58	3.94	1.84	3.08	2.98
20:1(n-9)	1.25	1.26	1.22	0.88	1.09	1.14	1.24	1.04	0.86	0.83	0.99	0.91	1.73	1.30
20:1(n-11)	1.78	2.05	1.69	1.55	1.71	1.32	1.40	1.44	1.82	1.92	1.83	3.23	5.00	2.68
18:2(n-6)	0.50	0.52	0.46	0.28	0.31	0.57	0.80	0.49	0.34	0.31	0.56	0.32	0.35	0.55
18:3(n-6)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
18:3(n-3)	1.10	0.98	0.85	0.91	1.34	1.42	1.63	0.89	0.82	1.34	1.82	0.64	3.32	2.46
20:2(n-6)	2.68	2.56	2.19	1.56	1.64	1.81	2.10	1.84	1.70	1.56	2.16	2.93	3.31	2.24
20:3(n-6)	0.23	0.18	0.09	0.12	0.26	0.12	0.29	0.10	0.12	0.27	0.21	0.32	0.41	0.34
20:4(n-6)	3.42	4.57	3.88	4.42	4.29	4.31	4.00	3.80	4.08	3.06	3.60	2.91	2.61	3.97
20:5(n-3)	7.80	12.82	10.75	7.85	11.86	12.54	12.95	17.12	14.93	12.97	11.67	7.37	4.02	6.80
22:5(n-6)	1.66	2.18	1.83	2.16	2.09	1.81	1.44	1.39	1.52	1.91	1.70	1.84	0.00	1.91
22:5(n-3)	3.78	4.34	3.74	4.06	4.36	4.02	4.11	3.72	3.31	3.51	3.06	4.10	4.59	5.19
22:2i	2.75	1.94	2.49	2.44	2.30	2.08	2.04	1.93	1.54	1.17	1.52	3.14	3.93	2.32
22:2j	6.80	8.65	7.32	9.25	7.45	6.90	5.44	5.11	6.13	5.15	5.33	10.67	14.76	9.77
22:6(n-3)	31.76	18.59	28.17	26.56	26.74	26.10	27.64	27.16	25.01	27.93	24.77	27.66	16.63	20.47
Total SFA	23.96	25.93	22.65	20.97	23.93	23.93	24.82	24.14	23.92	24.82	27.19	21.67	27.75	29.93
Total MUFA	11.78	14.69	13.91	17.86	11.73	13.06	11.34	10.86	14.76	14.07	14.57	13.21	13.31	11.36
Total PUFA	62.48	57.33	61.75	59.61	62.63	61.69	62.44	63.56	59.50	59.19	56.40	61.89	53.94	56.03
Total (n-3)	44.44	36.73	43.50	39.39	44.29	44.09	46.33	48.89	44.07	45.75	41.32	39.77	28.56	34.92
Total (n-6)	8.49	10.00	8.44	8.53	8.59	8.63	8.63	7.62	7.75	7.12	8.23	8.32	6.68	9.02
(n-3)/(n-6)	5.23	3.67	5.16	4.62	5.16	5.11	5.37	6.41	5.68	6.43	5.02	4.78	4.28	3.87

the neutral fraction. During the spawning period, levels of main fatty acid classes in the polar lipids of the gonad ( $\mu\text{g}$  fatty acids/mg gonad) remained more or less constant, except for the n-3 polyunsaturated fatty acids, which increased from May to June and then decreased slightly. Fatty acid classes in the neutral lipids undergo the same variations during spawning period, all classes increased between 26 May and 10 June and then decreased gradually.

The fatty acid composition of the eggs of *R. decussatus* from natural spawnings is shown in Table 5. The total polyunsaturated fatty acid levels in the polar lipid were nearly twice as high as the level in the neutral lipids. The percentages of monounsaturated fatty acids (especially 16:1(n-7)) and the 16:0 fatty acid were higher in the

Table 5

Fatty acid composition of unfertilized eggs of *Ruditapes decussatus* (% of total fatty acids and  $\mu\text{g}$  in 100,000 eggs)

Fatty acid	Neutral lipid		Polar lipid	
	%	$\mu\text{g}$	%	$\mu\text{g}$
14:0	7.04	11.01	0.65	0.93
16:0	26.85	41.98	14.95	21.21
18:0	4.66	7.29	7.85	11.15
16:1(n-7)	13.88	21.70	1.85	2.63
18:1(n-9)	4.50	7.04	1.25	1.77
18:1(n-7)	5.10	7.98	1.28	1.82
20:1(n-11)	1.13	1.76	1.04	1.48
20:1(n-9)	0.60	0.94	0.95	1.34
20:1(n-7)	0.44	0.69	1.58	2.24
18:2(n-6)	1.33	2.08	0.37	0.52
18:2(n-4)	0.54	0.84	0.21	0.30
18:3(n-6)	0.18	0.28	0.12	0.16
18:3(n-3)	0.83	1.30	0.81	1.15
18:4(n-3)	1.89	2.95	1.10	1.56
20:2(n-6)	0.80	1.25	1.34	1.90
20:3(n-6)	0.27	0.42	0.13	0.19
20:4(n-6)	0.76	1.20	2.36	3.35
20:4(n-3)	0.49	0.76	0.42	0.59
20:5(n-3)	6.46	10.10	15.94	22.62
21:4(n-6)	0.00	0.00	0.22	0.31
21:5(n-3)	0.77	1.21	1.15	1.63
22:2i	0.63	0.97	1.22	1.73
22:2j	1.17	1.82	2.42	3.46
22:4(n-6)	0.00	0.00	0.65	0.92
22:5(n-6)	0.25	0.39	0.85	1.21
22:5(n-3)	1.51	2.36	2.97	4.22
22:6(n-3)	6.66	10.42	17.08	24.23
Total SFA	40.00	62.54	24.05	34.12
Total MUFA	28.33	44.29	9.16	13.00
Total PUFA	27.76	43.41	55.49	78.73
Total (n-3)	19.98	31.24	40.10	56.90
Total (n-6)	3.64	5.69	3.68	5.19
(n-3)/(n-6)	5.49	5.49	10.90	10.90

neutral lipids than in the polar lipids. The n-3/n-6 ratio in the polar lipids was twice than in neutral lipids, mainly due to the higher levels of 20:5(n-3) and 22:6(n-3).

Separate analyses of spermatozoa and oocytes showed that spermatozoa were rich in polyunsaturated fatty acids mainly n-3 (57% of total fatty acids), while oocytes showed a higher percentage of monounsaturated fatty acids (31%) than the spermatozoa (7%). The percentage of n-6 polyunsaturated fatty acids was the same in both (5%). The percentage of saturated fatty acids was 31% in spermatozoa and 41% in oocytes.

#### 4. Discussion

The dry body condition index of *R. decussatus* in the Lagunas de Baldaio reflects its reproductive activity during most of the year. In autumn, immediately after spawning, the CI may be related to the gonad index, due to accumulation of reserves. The relationships between size and weight measurements of the clam *R. decussatus*, were found to be isometric. All linear measurements correlated significantly with tissue weights ( $P < 0.01$ ). We found that variations in weight, body growth, gonad growth and spawning may occur together in response to changes in environmental conditions, especially in the food availability. When food is abundant, surplus energy is used by animals for growth of somatic tissues and also for gonad development (Urrutia et al., 1999). The values of condition index were lowest on 29/10/1998 and coincided with the minimum values of wet and dry weight for the different tissues. The tissue weights increased gradually during winter and spring (maximum values on 26/04/1999), while the condition indices remained more or less constant because the shell and body growth varied together throughout this period. At the start of the spawning period (June–July) there was a rapid decrease in the tissue weights and condition index. In the summer and at the beginning of autumn, the abundance of food available allowed recovery of tissue weight, especially of the gonad-visceral mass (maximum values of GCI), indicating that conditions were favorable for breeding. The recovery of the tissue weight was accompanied by an increase in the values of the condition indices (CI and GCI) and reached a maximum on 09/07/1999 and thereafter decreased, at first rapidly, during summer and autumn. Even when phytoplankton was not abundance, growth could be sustained partly through other sources of organic matter, such as detritus, because *R. decussatus* is an extensive deposit-feeder (Figueras, 1957; Bodoy and Plante-Cuny, 1984).

The gametogenic cycle of *R. decussatus* showed two distinctive phases: a resting phase in November–December and gametogenesis, including maturity and spawning, in the summer. Most clams belonging to the family Veneriadae seem to be summer spawners, although certain inter- and intra-specific variations have been found (Shafee and Daoudi, 1991). Partridge (1977) deduced from the available literature that in *R. decussatus* the duration of gametogenic cycle and, in particular, the duration of the spawning period is directly influenced by the geographical latitude, because of the temperature of the area. Laruelle et al. (1994) reviewed data on reproductive patterns in *R. decussatus* throughout its geographical range and concluded that temperature has a positive effect on gametogenesis that may directly affect the metabolic rate of the

animal, or indirectly affect the availability of food, as the maximum rate of increase in weight occurs during the spring, when both the sea temperature and food supply increase rapidly. In the same way, we found that temperature and chlorophyll *a* were closely related (0.851,  $P < 0.01$ ) and GCI was also related to temperature (0.585,  $P < 0.05$ ) and chlorophyll *a* (0.541,  $P < 0.05$ ). The gametogenic cycle of *R. decussatus* in the Lagunas de Baldaio closely resembles the cycle described by other investigators for the same species in Galicia (Figueras, 1957; Pérez-Camacho, 1980; Rodríguez et al., 1993; Rodríguez Moscoso, 2000). Thus, there is a short period of inactivity during the winter when reproductive activity is minimal, following by rapid development and proliferation of the gonad, accompanied by rapid increase in tissue weight—especially gonad-visceral mass—during the spring. As in *Crassostrea gigas* and *C. virginica* (Gabbott, 1975), gonadal growth in *R. decussatus* was supported by springtime feeding and decreased glycogen content of the tissues. There is an extended reproductive period during the summer when body and shell growth, gametogenesis and spawning may all occur together; this period is brought to an end in the autumn by the cessation of gonadal recovery, marking a return to inactivity. According to Laruelle et al. (1994) *R. decussatus* did not show accumulation of the ripe oocytes until emission, as occurs in other clam species, and ripe oocytes appeared to be spawned regularly.

The clam CI was directly related to total protein content (0.920,  $P < 0.01$ ) and also total lipid content (0.792,  $P < 0.01$ ), but not total glycogen content. In terms of nutrient storage for supplying energy for gametogenesis, the role of glycogen is predominant in most of bivalves, although protein storage is also important (Mathieu and Lubet, 1993). Rodríguez et al. (1993) concluded that glycogen is the main energy reserve for gametogenesis in *Tapes decussatus* and *Ruditapes philiphinarum* from the Ría de Muros y Noya (Galicia, Spain). It is generally accepted that the gametogenic cycle is closely linked to the seasonal cycle of storage and utilization of glycogen reserves in bivalves. Several authors have reported maximum glycogen content in bivalves immediately preceding, and during gamete proliferation (Ansell, 1972, Ansell et al., 1980, Barber and Blake, 1985). The results of the present study are consistent with this as the glycogen content decreased after the resting phase and reached minimum values during the spawning period and then recovered after spawning. Similar observations have been made by Beninger and Lucas (1984) who found maximum concentrations of glycogen in *T. decussatus* and *T. philiphinarum* just before gametogenesis. We observed a decrease in the glycogen content during gametogenesis in all tissues of *R. decussatus* studied, and mainly in the gonad-visceral mass, in which glycogen was negatively related to the gonadal condition index ( $-0.574$ ,  $P < 0.05$ ). These results allow us to conclude that the reproductive strategy of the clam *R. decussatus* in Galicia can be described as a conservative strategy, because storage of glycogen occurs before gametogenesis, and glycogen seasonal changes are negatively correlated with gonad development.

In bivalves, gonad development may involve the metabolic conversion of glycogen to lipid (Gabbott, 1975). This is possibly one of the major uses of stored glycogen in the gonad-visceral mass of *R. decussatus*. The main seasonal variations in the biochemical compounds were shown in the gonad-visceral mass, the glycogen and

protein contents varied most, whilst the lipid content remained low throughout the year and showed no clear seasonal changes. Giese et al. (1967) found that in the clam *Tivela stultorum*, the gonads accumulated nutritional reserves for gametogenesis independently of other body components. In Pectnidae, energy for the maturation of gametes comes from reserves of glycogen and protein stored in the adductor muscle, because of the absence of specific storage tissues, but in Veneridae there are intragonadal storage cells which contain many lipid droplets and glycogen (Mathieu and Lubet, 1993). Kraeuter and Castagna (2001) reported that the amount of energy for gametogenesis activity in *Mercenaria mercenaria* depends more on the available food than on nutrient storage sites such as the foot and adductor muscle.

The variations in the fatty acid composition of neutral and polar lipids may have an endogenous origin (gametogenic cycle, etc.) or exogenous origin (temperature, diet, etc.). In our study, we found a relationship between variations in the total fatty acids in the neutral and polar lipids of gonad-visceral-mass and the gametogenic cycle, especially when we analyzed the data expressed as mg of tissue analyzed. The increase in both neutral and polar lipids in the period of maximum ripeness and the decrease with the spawning indicated this relationship. Polyunsaturated fatty acids, especially in polar lipids, followed a seasonal cycle related to the reproductive cycle, maximal contents corresponded with oocyte maturation and minimal contents with the post-spawning period. Total saturated fatty acids and total polyunsaturated fatty acids of polar lipids (expressed as  $\mu\text{g}$  per standard gonad) were closely correlated with the gonadal condition index (0.820, and 0.800, respectively,  $P < 0.01$ ). However, variations in the neutral lipids also appeared to be related to the available food, especially in the months of October–November, where recovery of neutral lipid levels was observed in association with the increase in the chlorophyll *a* concentration in seawater. In fact, seasonal variations in total saturated fatty acids in the neutral lipids were positively correlated with chlorophyll *a* concentrations (0.562,  $P < 0.05$ ). The 22:2 non-methylene-interrupted dienoic fatty acids (NMID) are seemingly ubiquitous lipid mollusc components but the amounts of these vary widely from species to species (Paradis and Ackman, 1975; Zhukova, 1986; Abad et al., 1995; Pazos et al., 1996, 2003). Although their specific function in bivalves is not clearly understood, the predominance in the polar lipids suggests that they may play a structural role maintaining membrane fluidity. Whyte (1988) reported for *Crassostrea gigas* that the increase in 22:2j coincided with low levels of 20:5n-3 and Klingensmith (1982) found an inverse relationship between the n-3 polyunsaturated fatty acids, especially 20:5(n-3) and 22:6(n-3), and NMID fatty acid levels in clams. Similarly, we found that 22:2i and 22:2j in the polar lipids were negatively correlated with 20:5(n-3) ( $-0.795$  and  $-0.823$ , respectively,  $P < 0.01$ ) and 22:2j was also negatively correlated with 22:6(n-3) ( $-0.638$ ,  $P < 0.05$ ). Thus, it is possible that when there is a deficiency of polyunsaturated fatty acids in the diet, NMID fatty acids may be incorporated into the lipids from the diet or biosynthesized by the molluscs, as NMID is the only polyunsaturated fatty acid synthesized by marine molluscs.

The predominance of palmitic acid and 20:5(n-3) and 22:6(n-3) polyunsaturated fatty acids in *R. decussatus* is characteristic of marine species (Beninger and Stephan, 1985; Besnard et al., 1989) and it is generally accepted that this is an adaptation to

the relatively low temperatures of the marine environment. The high percentage of polyunsaturated fatty acids in the neutral lipids during October–December may be explained by the abundance of phytoplankton, corresponding with an increase in the concentration of chlorophyll *a* and after that the percentages of polyunsaturated fatty acid decreased in a parallel form to chlorophyll *a* concentrations. As also concluded by Beninger and Stephan (1985), changes in the fatty acid composition appear to be more closely related to diet rather than to endogenous responses to environmental temperature.

## Acknowledgements

This research was carried out with the financial assistance of the Xunta de Galicia (PGIDTT00MAR23501PR).

## References

- Abad, M., Ruíz, C., Martínez, D., Mosquera, G., Sánchez, J.L., 1995. Seasonal variations of lipid classes and fatty acids in flat oyster, *Ostrea edulis* from San Cibrán (Galicia Spain). *Comp. Biochem. Physiol.* 110C, 109–118.
- Ansell, A.D., 1972. Distribution, growth and seasonal changes in biochemical composition for the bivalve *Donax vittatus* (Da Costa) from Kames Bay, Millport. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 10, 137–150.
- Ansell, A.D., Frenkiel, L., Moueza, L., 1980. Seasonal changes in tissue weight and biochemical composition for the bivalve *Donax trunculus* L. on the Algerian coast. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 45, 105–116.
- Barber, B.J., Blake, N.J., 1981. Energy storage and utilization in relation to gametogenesis in *Argopecten irradians concentricus* (Say). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 52, 121–134.
- Barber, B.J., Blake, N.J., 1985. Intra-organ biochemical transformations associated with oogenesis in the bay scallop, *Argopecten irradians concentricus* (Say), as indicated by <sup>14</sup>C incorporation. *Biol. Bull.* 168, 39–49.
- Bayne, B.L., 1976. Aspects of reproduction in bivalve molluscs. In: Viley, M.L. (Ed.), *Estuarine processes*. Academic press, New York, pp. 432–448.
- Beiras, R., Pérez-Camacho, A., Albentosa, M., 1993. Influence of food concentration on energy balance and growth performance of *Venerupis pullastra* seed reared in an open-flow system. *Aquaculture* 116, 353–365.
- Beninger, P.G., Lucas, A., 1984. Seasonal variations in condition, reproductive activity and gross biochemical composition of two species of adult clam reared in a common habitat: *Tapes decussatus* L. (Jeffreys) and *Tapes philippinarum* (Adams and Reeve). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 79, 19–37.
- Beninger, P.G., Stephan, G., 1985. Seasonal variations in the fatty acids of the triacylglycerols and phospholipids of two populations of adult clam (*Tapes decussatus* L. and *T. philippinarum*) reared in a common habitat. *Comp. Biochem. Physiol.* 81B, 591–601.
- Besnard, J.Y., Lubet, P., Nouvelot, A., 1989. Seasonal variations of the fatty acid content of the neutral lipids and phospholipids in the female gonad of *Pecten maximus* L. *Comp. Biochem. Physiol.* 93B, 21–26.
- Bodoy, A., Plante-Cuny, M.R., 1984. Relations entre l'évolution saisonniere des populations de palourdes (*Ruditapes decussatus*) et celle des microphytes benthiques et planctoniques (Golfe de Fos, France). *Haliotis* 14, 71–78.
- Chícharo, L., Chícharo, M.A., 2001. Effects of environmental conditions on planktonic abundances, benthic recruitment and growth rates of the bivalve mollusc *Ruditapes decussatus* in a Portuguese coastal lagoon. *Fish. Res.* 53, 235–250.
- Figueras, A., 1957. Moluscos de las playas de la ría deVigo: II. Crecimiento y reproducción. *Investig. Pesq.* 7, 49–97.

- Folch, J., Less, M., Sloane-Stanley, C.H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 266, 497–509.
- Fraga, F., 1956. Determinación de glucógeno en moluscos con el reactivo de antrona. *Investig. Pesq.* 3, 69–74.
- Gabbott, P.A., 1975. Storage cycles in marine bivalve molluscs: an hypothesis concerning the relation between glycogen and gametogenesis. In: Barnes, H. (Ed.), *Proceedings of the Ninth Eur. Mar. Biol. Symp.*, Aberdeen Univ. Press, Aberdeen, Scotland, pp. 191–211.
- Gabbott, P.A., 1976. Energy metabolism. In: Bayne, B.L. (Ed.), *Marine Mussels: Their Ecology and Physiology*. Cambridge Univ. Press, Cambridge, pp. 293–335.
- Gabbott, P.A., 1983. Developmental and seasonal metabolic activities in marine molluscs. In: Hochachka, P.W. (Ed.), *The Mollusca. Environmental Biochemistry and Physiology*, vol. 2. Academic Press, New York, pp. 165–217.
- Giese, A.C., 1969. A new approach to the biochemical composition of the mollusc body. *Oceanogr. Mar. Biol.* 7, 175–229.
- Giese, A.C., Smith, M.A., Cheung, M.A., 1967. Seasonal changes in body component indices and chemical composition in the pismo clam *Tivela stultorum*. *Comp. Biochem. Physiol.* 22, 549–561.
- Jara-Jara, R., Pazos, A.J., Abad, M., García-Martín, L.O., Sánchez, J.L., 1997. Growth of clam seed (*Ruditapes decussatus*) reared in the wastewater effluent from a fish farm in Galicia (N.W. Spain). *Aquaculture* 158, 247–262.
- Klingensmith, J.S., 1982. Distribution of methylene and nonmethylene-interrupted dienoic fatty acids in polar lipids and triacylglycerols of selected tissue of the hardshell clam (*Mercenaria mercenaria*). *Lipids* 17, 976–981.
- Kraeuter, J.N., Castagna, M., 2001. Biology of the hard clam. In: Kraeuter, J.N., Castagna, M. (Eds.), *Developments in Aquaculture and Fisheries Science*, vol. 31. New York: Elsevier Science, 751 pp.
- Laruelle, F., Guillou, J., Paulet, Y.M., 1994. Reproductive pattern of the clams, *Ruditapes decussatus* and *R. philippinarum* on intertidal flats in Brittany. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 74, 351–366.
- Lowry, O., Rosenbrough, N.M., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Mackie, L.A., Ansell, A.D., 1993. Differences in reproductive ecology in natural and transplanted populations of *Pecten maximus*: evidence for the existence of separate stocks. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 169, 57–75.
- Marsh, J.B., Weinstein, D.B., 1966. Simple charring method for determination of lipids. *J. Lipid Res.* 7, 574–576.
- Mathieu, M., Lubet, P., 1993. Storage tissue metabolism and reproduction in marine bivalves—a brief review. *Invertebr. Reprod. Dev.* 23, 123–129.
- Paradis, M., Ackman, R.G., 1975. Occurrence and chemical structure of non-methylene-interrupted dienoic fatty acids in American oyster *Crassostrea virginica*. *Lipids* 10, 12–16.
- Partridge, J.K., 1977. Littoral and benthic investigations on the west coast of Ireland: IV. Section A: faunistic and ecological studies (annotated bibliographies of the genus *Tapes*) (Bivalvia: Veneridae). Part I—*Tapes decussatus* (L.). Part II—*Tapes semidecussatus* Reeve. *Proc. R. Ir. Acad., B Biol. Geol. Chem. Sci.* 77, 1–63.
- Pazos, A.J., Ruíz, C., García-Martín, O., Abad, M., Sánchez, J.L., 1996. Seasonal variations of the lipid content and fatty acid composition of *Crassostrea gigas* cultured in El Grove, Galicia, N.W. Spain. *Comp. Biochem. Physiol.* 114B, 171–179.
- Pazos, A.J., Sánchez, J.L., Román, G., Pérez-Parallé, M.L., Abad, M., 2003. Seasonal changes in lipid classes and fatty acid composition in the digestive gland of *Pecten maximus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 134B, 367–380.
- Pérez-Camacho, A., 1980. Biología de *Venerupis pullastra* (Montagu, 1803) y *Venerupis decussata* (Linne, 1767) (Mollusca, Bivalvia), con especial referencia a los factores determinantes de la producción. *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.* 281, 43–76.
- Rodríguez Moscoso, E., (2000). Histiofisiología de la reproducción de la almeja fina *Ruditapes decussatus* (Linné, 1758) en la Ría de Arosa (Población natural y población de cultivo). Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela, Spain. 202 pp.
- Rodríguez, S., Quintana, R., Lamas, L., Ayensa, G., Velasco, F.J., Pascual, C., 1993. Etude comparative du cycle gamétogénique et composition biochimique de *Tapes decussatus* et *Ruditapes philippinarum* dans la Ría de

- Muros y Noya. In: Bernabe, G., Kestemont, P. (Eds.), Bordeaux Aquaculture 92. Production, Environment and Quality. Special Publication-European Aquaculture Society, vol. 18, pp. 503–511.
- Ruíz, C., Abad, M., Sedano, F., García-Martín, L.O., Sánchez, J.L., 1992. Influence of seasonal environmental changes on the gamete production and biochemical composition of *Crassostrea gigas* (Thunberg) in suspended culture in El Grove, Galicia, Spain. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 155, 249–262.
- Sastry, A.N., 1979. Pelecypoda (excluding Osteidae). In: Giese, A.C., Pearse, J.S. (Eds.), Reproduction of Marine Invertebrates, vol. 4. Academic Press, New York, pp. 113–292.
- Shafee, M.S., Daoudi, M., 1991. Gametogenesis and spawning in the carpet-shell clam, *Ruditapes decussatus* (L.) (Mollusca: Bivalvia), from the Atlantic coast of Morocco. *Aquac. Fish. Manage.* 22, 203–216.
- Urrutia, M.B., Ibarrola, I., Iglesias, J.I.P., Navarro, E., 1999. Energetics of growth and reproduction in a high-tidal population of the clam *Ruditapes decussatus* from Urdabai Estuary (Basque Country, N. Spain). *J. Sea Res.* 42, 35–48.
- Walne, P.R., 1976. Experiments on the culture in the sea of the butterfish *Venerupis decussata* L. *Aquaculture* 8, 371–381.
- Whyte, J.N.C., 1988. Fatty acid profiles from direct methanolysis of lipids in tissue of cultured species. *Aquaculture* 75, 193–203.
- Wilson, J.H., Seed, R., 1974. Reproduction in *Mytilus edulis* L. (Mollusca: Bivalvia) in Carlingford Lough, Northern Ireland. *Ir. Fish. Invest., B Mar.* 15, 1–30.
- Zhukova, N.V., 1986. Biosynthesis of non-methylene-interrupted dienoic fatty acids from  $^{14}\text{C}$ -acetate in molluscs. *Biochim. Biophys. Acta* 878, 131–133.

## EFFECTS OF TEMPERATURE REGIME ON BROODSTOCK CONDITIONING OF *RUDITAPES DECUSSATUS*

J. OJEA,<sup>1</sup> A. J. PAZOS,<sup>2</sup> D. MARTÍNEZ,<sup>1</sup> S. NOVOA,<sup>1</sup> P. GARCÍA-MARTÍNEZ,<sup>2</sup>  
J. L. SÁNCHEZ<sup>2</sup> AND M. ABAD<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Centro de Cultivos Mariños de Ribadeo. Centro de Investigaciones Mariñas (CIMA). Consellería Pesca, Marisqueo e Acuicultura, 27700-Ribadeo, Spain; <sup>2</sup>Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Instituto de Acuicultura, Universidad de Santiago de Compostela, 15782-Santiago de Compostela, Spain

**ABSTRACT** To optimize the conditioning procedure to obtain better larvae with lower production costs, *Ruditapes decussatus* broodstock was conditioned at different periods during the year [October (C1), February (C2), and April (C3)] under two different controlled temperature regimes: a constant temperature (CT, 20°C) and a gradual increase in temperature from ambient to 20°C (GT). Samples (30 adult clams) were collected randomly every month from a control group and from each conditioning tank (three tanks for each temperature treatment). A section of the gonad-visceral mass was sampled for gonadal histology and the remaining tissue was used for biochemical analyses. Gonadal developmental stages were determined based on the classification proposed by Wilson and Seed (1974), and fertilized eggs were reared after the method of Walne (1966). In the three conditioning experiments fewer degree-days were required to successfully spawn clams in tanks with the gradual increase of temperature. Clams conditioned in October spawned in February, four months prior to spawning under natural conditions after 1,030 degree-days (D°) in CT tanks and 937.5 D° in GT tanks. Clams conditioned in February and April spawned after 410 D° and 470 D° when held at constant temperature respectively, whereas a gradual increase of temperature shortened this to 383 D° and 337.5 D° respectively. The most important difference between the two temperature regimes was the higher condition index of clams conditioned under the GT regime. The percentage of larvae that survived metamorphosis was higher in clams conditioned at GT, maximum survival ranged from 25% in C3 at CT to 40% in C1 at GT, except for CT tanks in C2 where it was less than 10%. Results showed that *Ruditapes decussatus* conditioned with a gradual increase in temperature, enhanced larval production and also reduced overall hatchery production costs.

**KEY WORDS:** broodstock, clam, hatchery, conditioning, *Ruditapes decussatus*, temperature

### INTRODUCTION

The clam, *Ruditapes decussatus* is most preferred by consumers in Galicia (NW Spain) and also the most valuable. Culture of this marine bivalve is clearly limited by the availability of seed (juveniles). There are obvious advantages to manipulating the gonadal cycle and spawning period of the clams so that adults can be spawned either earlier or later than occurs naturally. This would allow for a more efficient use of larval and nursery systems by extending the period when larvae are available. Clam gonads ripen naturally as ambient water temperature and food levels increase. Early gonadal development can be achieved by collecting mature adults and subjecting them to higher temperatures while providing them with adequate amounts of suitable food in a process known as broodstock conditioning. The objectives of bivalve broodstock conditioning are to maximize the fecundity of parent animals, while maintaining larval quality and viability (Utting & Millican 1997). Gallager & Mann (1986) noticed that growth and survival of *Mercenaria mercenaria* and *Crassostrea gigas* larvae were directly associated with initiation and duration of conditioning and showed the importance of season in the timing of broodstock collection for artificial conditioning. Procedures for hatchery-conditioning of broodstock usually involve subjecting the animal to an abrupt change in temperature with the aim of speeding up gonadal development (Loosanoff & Davis 1950, Sastry 1966, Mann 1979). However, abrupt changes in temperature may lead to stress and distort the cycles of storage and utilization of energy reserves, thereby leading to high mortality

of adult clams, as well as production of gametes of inferior quality. Helm & Bourne (2004) reported that when adults in the wild have yet to start gamete development, it can be advantageous to acclimate bivalves during 4–6 wk under a moderate temperature regime and a high food ration and then the temperature is gradually raised (1–2°C per day) and food ration is reduced, but this extends the overall conditioning period and cost. The objective of this study was to investigate if conditioning at a high constant temperature (20°C) or a gradual increase of temperature from ambient to the conditioning temperature (20°C) is most appropriate for conditioning *R. decussatus* broodstock at different periods of the year to optimize conditioning and to obtain better larvae at lower production costs.

### MATERIALS AND METHODS

#### Experimental Conditions

Adult clams, *Ruditapes decussatus*, were collected from a natural stock in Lagunas de Baldaio (Galicia, N.W. Spain). The sampling site was chosen because of clean environmental conditions and the lack of parasitic infections and other diseases in the clam population. Three conditioning experiments were carried out at different times of the year with broodstock collected from the same origin: October 2000 (first conditioning, C1), February 2001 (second conditioning, C2), and April 2001 (third conditioning, C3). Clams were conditioned in tanks (150 L) at a density of 100 clams/tank. Seawater in the tanks was continually replaced at a rate of 50 L/h. Clams were fed a mixed algal diet (*Isochrysis* sp. Clone T-iso, *Pavlova lutheri*, *Skeletonema*

\*Corresponding author: E-mail: marcelina.abad@usc.es

*costatum*, *Chaetoceros calcitrans* and *Tetraselmis suecica* at a ratio of 1:1:1:1 on a volume basis). The daily dry weight of algae supplied was established at 4% of the mean dry flesh weight of clams. Clams were maintained in one of two controlled temperature regimes: a constant temperature (CT, 20°C) or a gradual increase in temperature (GT,  $\approx 0.1^\circ\text{C}$  per day) from seawater temperatures at the time of collection (15°C first and third conditioning, 14°C second conditioning) to 20°C. Three tanks were assayed for each temperature treatment.

### Sampling

Samples of 30 clams were collected at random every month during the conditioning period, from a tank with ambient seawater (control) and from each conditioning tank; the duration of conditioning was determined by gonadal ripening, the experiment ended when evident spawning occurred in the three replicate tanks (on 12-02-01 in C1, on 27-03-01 in C2 and on 09-06-01 in C3). Dates and seawater temperatures when clams were sampled during each conditioning experiment are shown in Table 1. Weights and linear dimensions (length, height, and width) of whole animals were determined. Clams were then opened, damp-dried, the soft tissues removed, and shell and soft tissues weighed. The anatomical features of the gonad in this species make it difficult to separate the gonad from the rest of the body, thus the gonad together with visceral mass were immediately dissected and a section was taken for gonadal histology, the remaining tissue was homogenized, freeze-dried and stored at  $-80^\circ\text{C}$  for further biochemical analyses. Sex of each clam was determined by smear techniques and the clams were categorized as male, female, or indeterminate. Tissue (1–2 g homogenized) and shells were dried separately at  $100^\circ\text{C}$  in an oven to constant weight (24 h).

TABLE 1.

Dates of sampling and water temperature during the study.

Sample	Date	Temperature ( $^\circ\text{C}$ )
<b>First conditioning (C1):</b>		
T0	25/10/2000	15
Gradual increase in temperature		
T1	30/11/2000	18
T2	08/01/2001	20
Constant temperature		
T1	01/12/2000	20
T2	11/01/2001	20
<b>Second conditioning (C2):</b>		
T0	02/02/2001	14
Gradual increase in temperature		
T1	05/03/2001	17
T2	04/04/2001	20
Constant temperature		
T1	08/03/2001	20
T2	09/04/2001	20
<b>Third conditioning (C3):</b>		
T0	16/04/2001	15
Gradual increase in temperature		
T1	11/05/2001	18
T2	05/06/2001	20
Constant temperature		
T1	16/05/2001	20
T2	08/06/2001	20

### Condition Indices

Condition index of the clams (CI) was calculated as the ratio of dry weight of flesh/dry weight of shell  $\times 100$  (Walne 1976).

Gonadal condition index (GCI) was calculated as the ratio of dry weight of the gonad-visceral mass/dry weight of the flesh  $\times 100$ .

### Gametogenic Activity

Gonad tissue from each clam was fixed in Davison's solution, dehydrated in alcohol, and embedded in paraffin. Slices 7- $\mu\text{m}$  thick were prepared and then stained with haematoxylin and counter-stained with eosin. Gonadal developmental stages were determined based on the classification proposed by Wilson & Seed (1974): Stage 0 = Resting stage; Stage 1 = Early gametogenic development; Stage 2 = Gametogenic development; Stage 3A = Morphologically ripe; Stage 3B = Spawning; Stage 3C = Redevelopment, and Stage 3D = Recently spent. When two or more stages occurred simultaneously in a single section, classification of the stage was based on the condition of the majority of follicles present in the section.

### Obtaining Gametes and Larvae

Gametes were obtained by inducing ripe clams to spawn by temperature shock treatment. Fertilization took place during mass spawning. Fertilized eggs were collected on a sieve, washed with filtered seawater and redistributed in a known volume of filtered seawater, subsampled and counted. Size of eggs was measured by an image analyzer. To evaluate the effect of temperature regimes and date of conditioning on the larvae, samples of fertilized eggs were reared in tanks after the method of Walne (1966), three tanks per conditioning experiment and temperature regime. Larvae were sampled every two days to measure shell length and to evaluate mortality.

### Biochemical Analysis

Glycogen, total protein, and total lipid contents were determined in the gonad visceral-mass. Glycogen was quantified as glucose after precipitation with 100% ethanol (Fraga 1956). Protein content was calculated using the method of Lowry et al. (1951) and lipids using the method of Marsh & Weinstein (1966). Each determination of biochemical compounds was carried out on pooled, lyophilized material: 2–3 mg for glycogen and protein determinations and 200 mg for lipid determination. Anthrone, bovine serum albumin, and tripalmitin were used as standards for quantifying glycogen, proteins, and lipids respectively.

### Statistical Methods

Analysis of variance (ANOVA) and multifactorial ANOVA were used to compare temperature regimes, time of conditioning or sexes. Statistical analyses were carried out with the SPSS computer software program.

## RESULTS

### Biometric Measurements

Biometric measurements and condition index during the three conditioning experiments (C1, C2, and C3) are shown in

Table 2. All clams were larger than 40 mm. In the first and second conditioning experiments, the condition index of clams subjected to gradual increases in temperature increased gradually, whereas in tanks held at constant temperatures the condition index increased from the first sampling (T0) to the second sampling (T1) and then remained at the same level or increased slightly from T1 to T2 (third sampling). Values of the condition index in C1 and C2 were higher for clams held in tanks with a gradual increase of temperature than those at a constant temperature regime although there were no significant differences. In C3 the condition index values for clams were similar under both temperature regimes, increasing in T1 and decreasing in T2.

#### Gametogenic Activity

The percent distribution of different gametogenic stages observed during the three conditioning experiments are shown in Table 3 and changes in the gonadal condition index (GCI) in Figure 1. In the first conditioning experiment, more than 50% of the clams were in the resting stage (0) when the experiment began, the rest of the clams showed residual gametes and a small percentage (10%) had started gametogenesis (1). One month later gametogenic development took place more quickly in clams held at a constant temperature, and no clams were found at stage 0, whereas in the tanks subjected to a gradual increase in temperature, 10% of the clams remained in the resting stage. Two months later, most of the clams had reached the ripe stage (3A) and spawning (3B) occurred under both temperature regimes, some clams in the tanks at a constant temperature even exhibited a redevelopment stage (3C). Under natural environmental conditions, gametogenesis progressed very slowly, in the second sampling only a few clams had reached stage 2, the rest were at stages 0 or 1.

When the second conditioning experiment started most of the clams were at stage 1 and one month later, gametogenesis was more advanced in clams held at a constant temperature

(clams at stage 3A) than in clams held in tanks subjected to a gradual increase in temperature (>50% of clams at stage 2). Two months later, gonadal development was similar under both temperature regimes.

When clams were collected for the third conditioning experiment more than 50% were ripe (3A), and one month later clams held at a constant temperature exhibited more advanced gametogenic development; however by the end of the experiment the clams reached the same stage of gametogenic development under both temperature regimes.

In C2 and C3, the presence of clams at stage 3D suggested the possibility of partial release of gametes between T1 and T2.

#### Obtaining Gametes and Larvae

The major spawning activity in the first conditioning experiment was observed on February 5, 6, and 8 in clams from the GT tanks, and on February 5 and 12 in CT tanks; in the second conditioning experiment on March 27 in GT tanks and on March 15 in CT tanks; in the third conditioning experiment on May 30, June 4 and 7 in GT tanks, and on June 2, 7 and 9 in CT tanks. Mean oocyte diameter did not differ significantly ( $P > 0.05$ ) with the different temperature regimes and it was similar for the three conditioning experiments:  $64 \pm 8 \mu\text{m}$  in GT and  $62 \pm 10 \mu\text{m}$  in CT for C1,  $63 \pm 11 \mu\text{m}$  in GT and  $64 \pm 8 \mu\text{m}$  in CT for C2,  $67 \pm 11 \mu\text{m}$  in GT, and  $64 \pm 9 \mu\text{m}$  in CT for C3. Differences in the number of eggs produced between the two temperature regimes were highly significant ( $P < 0.0001$ , ANOVA test) in the three conditioning experiments. In the first conditioning experiment, an average of 0.362 million eggs per female was produced from clams conditioned at CT and 0.487 in GT, in the second conditioning experiment 1.871 million eggs per female in CT and 0.743 in GT and in the third conditioning experiment 0.540 million eggs per females in CT and 0.750 in GT. The number of eggs is the mean of the three tanks of each experimental condition, it was higher in clams in tanks subjected to a gradual increase in temperature in the first

TABLE 2.

Biometric measurements and condition indices of *Ruditapes decussatus* in the three conditioning experiments (C1, C2, C3) at constant temperature (CT) and gradual increase in temperature (GT). T0: first sampling, T1: second sampling, T2: third sampling. WW = set weight, DW = dry weight.

Conditioning	Temperature Regime	Sample	Length (mm)		Live weight (g)		Flesh WW (g)		Gonad DW (g)		Shell DW (g)		Flesh DW (g)	Gonad DW (g)	CI
			Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	(g)	(g)	
C1	GT	T0	43.2	3.0	17.6	3.4	3.7	0.8	0.8	0.2	9.2	1.7	0.7	0.2	7.2
		T1	43.5	3.1	19.1	4.5	5.1	1.1	1.4	0.4	10.1	2.6	1.0	0.4	10.0
	CT	T2	42.6	2.6	17.9	3.4	5.3	1.1	1.7	0.4	9.6	1.9	1.1	0.5	11.1
		T1	43.7	3.3	19.2	4.8	5.0	1.3	1.4	0.4	10.2	2.6	1.0	0.4	10.2
C2	GT	T2	42.1	2.8	17.4	3.7	5.1	1.0	1.6	0.5	9.8	1.7	1.0	0.4	10.5
		T0	41.7	2.6	16.4	2.8	3.5	0.9	0.8	0.3	8.6	1.3	0.6	0.2	7.4
	CT	T1	42.4	2.9	16.8	3.1	4.2	1.0	1.3	0.4	8.8	1.6	0.8	0.3	9.2
		T2	43.3	3.5	18.0	4.2	4.8	1.4	1.9	0.6	9.2	2.1	1.0	0.4	10.7
C3	GT	T1	41.3	2.9	15.5	3.3	4.0	0.9	1.5	0.4	8.1	1.9	0.7	0.3	8.9
		T2	43.5	3.7	18.5	4.4	4.7	1.2	1.8	0.5	9.4	2.1	0.9	0.4	9.2
	CT	T0	40.6	3.0	15.2	3.2	3.1	0.9	0.8	0.3	8.3	1.6	0.5	0.2	5.6
		T1	42.3	3.0	17.5	3.1	4.0	0.9	1.4	0.4	9.3	1.6	0.8	0.3	8.2
GT	T2	43.4	3.0	18.3	3.6	4.0	1.1	1.4	0.4	9.9	2.1	0.7	0.3	7.4	
	CT	T1	41.5	2.3	16.4	2.4	3.9	0.7	1.5	0.4	8.8	1.3	0.7	0.3	8.1
T2		41.9	2.5	16.6	2.7	4.1	0.8	1.4	0.5	9.0	1.4	0.7	0.3	7.5	

TABLE 3.

Gonadal development of *Ruditapes decussatus* in the natural habitat (NH) and in conditioning experiments (C1, C2, C3) at constant temperature (CT) and gradual increase in temperature (GT). T0: first sampling, T1: second sampling, T2: third sampling. Stages according to Wilson and Seed (1974): 0 = Resting stage; 1 = Early gametogenic development; 2 = Gametogenic development; 3A = Morphologically ripe; 3B = Spawning; 3C = Redevelopment, and 3D = Recently spent.

Conditioning	Temperature Regime	Sample	Development Stages of Gonad (%)							
			0	1	2	3A	3B	3C	3D	
C1	NH	T0	56.0	10.0						34.0
		T1	60.0	40.0						
	GT	T1	5.3	27.3	45.0	22.3				
		T2		32.0	32.7	35.3				
	NH	T2	40.0	50.0	10.0					
		T2		3.7	21.0	43.3	32.0			
CT	T2		9.3	10.3	41.7	35.0		3.7		
	T2			4.0						
C2	NH	T1			100.0					
		T1		1.7	63.3	35.0				
	GT	T1			5.3	93.0	1.7			
		T2			50.0	50.0				
	NH	T2				29.0	57.3			13.7
		T2				26.7	61.7			11.7
CT	T2			3.0	38.0	59.0				
	T2									
C3	NH	T1				60.0	40.0			
		T1			1.7	34.0	64.3			
	GT	T1			11.7	32.3	56.0			
		T2				10.0	90.0			
	NH	T2					80.0			20.0
		T2					76.0			24.0

and third conditioning experiments. In the second conditioning experiment, although clams in tanks held at constant temperature released more eggs, growth of larvae (Fig. 2) in this conditioning experiment was lower under both temperature regimes ( $207 \pm 7 \mu\text{m}$  at constant temperature and  $205 \pm 11 \mu\text{m}$  with gradual increase temperature after 28 days of culture). In the first conditioning experiment the percentage of larvae that survived metamorphosis was 32% larvae from tanks held at constant temperature and 40% larvae from tanks with gradual increase of temperature, a lower percentage of larval survivors was observed in tanks held at constant temperature in the second conditioning (9%) and 27% in larvae from tanks held at constant temperature, in the third conditioning experiment the percentages were 25% at constant temperature and 38% with the gradual increase in temperature.

#### Biochemical Analysis

Data showing the contents of glycogen, lipids, and proteins (mg) in the gonad-visceral mass obtained by the three conditioning experiments are shown in Table 4. The gonads of males, females, and indeterminate animals were analyzed separately. The major component of gonad-visceral mass was proteins, which ranged in concentration from 124.7–212.0 mg/gonad-visceral mass. Lipid content was minimum (12.3 mg/gonad-visceral mass) at the beginning of the second conditioning experiment when the clams were at an indeterminate stage, the lipid content was generally higher in females and it increased as they matured. Glycogen content was higher in the first conditioning experiment (83.5–128.5 mg/gonad-visceral mass) when the clams were in the resting stage and had stored energy

reserves for gametogenesis. Glycogen content decreased in the second conditioning experiment in males and females and to a greater extent in clams conditioned in tanks at constant temperature (14.0 and 16.1 mg/gonad-visceral mass). In the third conditioning experiment, the glycogen content was higher in females at the beginning of conditioning and decreased under both temperature regimes. No significant differences in glycogen content in clams in all regimes were observed.

Variations in the percentage of glycogen and lipids (main energy reserves for gametogenesis) of the gonad visceral mass for the three conditioning experiments performed in this study are shown in Table 5. In C1, the glycogen content decreased slightly (from 25% to 24%) under both temperature regimes, the decrease of glycogen content was higher under natural conditions (from 25% to 10%). Lipid content scarcely varied in CT and GT, there were no significant differences (ANOVA,  $P < 0.05$ ). Lipids increased from 6% to 14%, reaching values higher than clams under natural conditions (8%).

In the second conditioning experiment, C2, glycogen content decreased in the first sampling (T1) from 24% to 13% in GT, to 10% in CT, and to 6% in the natural conditions. In the second control (T2) glycogen content decreased under both temperature regimes (to 7% in GT and to 4% in CT), however, the glycogen content increased to 18% in clams held under natural conditions. In T1, lipids increased from 6% to 14% in GT tanks and from 6% to 12% in the CT tanks. In T2 the slight decrease in lipid content observed in both temperature regimes was caused by partial spawning.

In the third conditioning experiment, C3, glycogen content decreased in both temperature regimes whereas under natural conditions it increased in T2 to 18%. Lipid content increased in

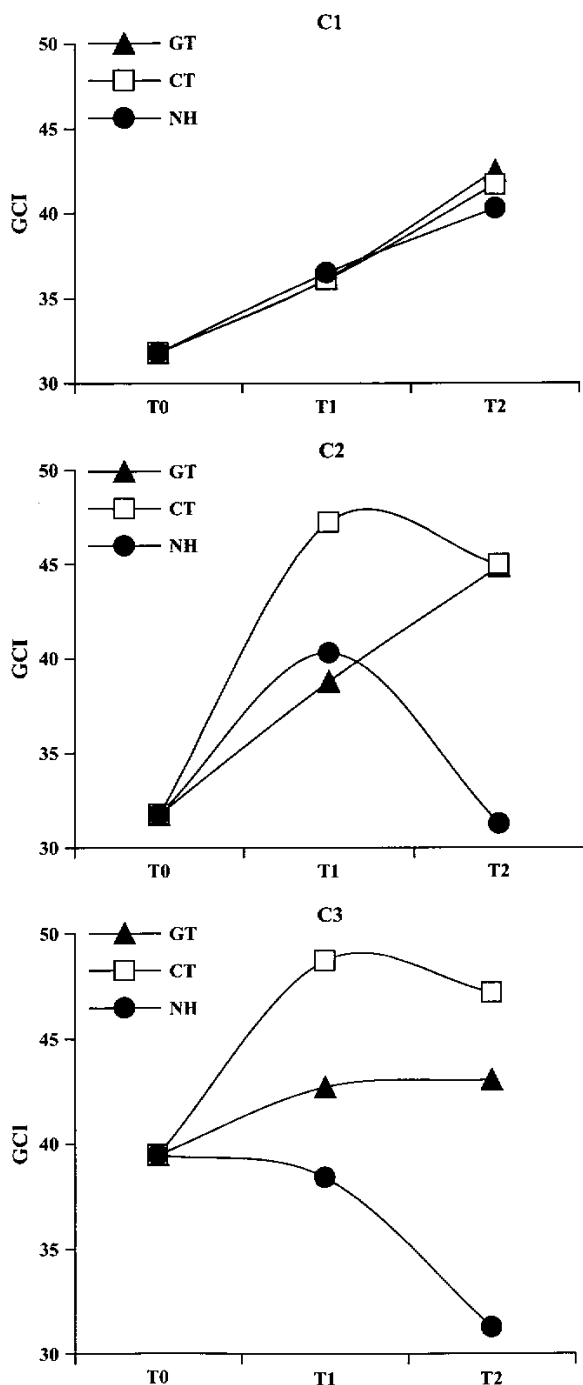


Figure 1. Changes in the gonadal condition index (GCI) during the three conditioning experiments and the natural habitat. NH, natural habitat; GT, gradual increase in temperature; CT, constant temperature.

both temperature regimes and decreased under natural conditions. ANOVA showed a highly significant influence of sex over the lipid content ( $P < 0.0001$ ) and glycogen content ( $P < 0.01$ ) whereas the temperature regime was not significant ( $P > 0.05$ ).

The percentage of lipids in the gonad-visceral mass seems to be a good indicator of the degree of gonadal maturity. The increase in lipids from T0 to T1 corresponded with an increase in the condition index and gonadal development as shown from histological analysis. Between T1 and T2 the percentage of lipids in the gonad remained constant or fell slightly, probably because of partial spawning.

#### DISCUSSION

Temperature is one of the main factors affecting the gametogenic cycle in bivalves (Mann 1979, Sastry 1979, Utting & Millican 1997). Temperature seems to define the starting point and the rate of gonadal development. It has long been recognized that by raising the temperature of sea water, bivalves can be brought into spawning condition (Sastry 1966, Hamida et al. 2004, Helm & Bourne 2004), however, the time taken to reach spawning condition depends on the extent of gonadal maturation when conditioning is started and is affected by food availability as well as the quality of the diet and ambient seawater during conditioning (Sastry 1966, Lubet 1981, Utting & Millican 1997, Delgado & Pérez Camacho 2003, Helm & Bourne 2004). Degree-days ( $D^\circ$ ) (Mann 1979) are a unit that combines temperature and time that is often used to measure the length of the conditioning period in bivalves (Utting & Millican 1997, Helm & Bourne 2004). If we were to assume the "biological zero" for gametogenesis in *Ruditapes decussatus* is  $10^\circ\text{C}$ , then clams conditioned in October spawned after  $1030 D^\circ$  when held at constant temperature and  $937.5 D^\circ$  when held under a gradual increase of temperature. Clams conditioned in February and April under a constant temperature spawned after  $410 D^\circ$  and  $470 D^\circ$  respectively, whereas a gradual increase of temperature shortened this to  $383 D^\circ$  and  $337.5 D^\circ$  respectively. In the three conditioning experiments fewer degree-days were required to spawn clams successfully in tanks when a gradual increase of temperature was used. Differences in degree-days depend on the initial condition of the broodstock and the phase of gametogenesis the adults are in when conditioning started. In Lagunas de Baldaio, gametogenesis of *R. decussatus* begins in December or January, after an inactive period in November and especially in December (Ojea et al. 2004); gonads become ripe from April onwards, and the main spawning activity occurs between June and August. Thus, at the start of the first conditioning experiment the clams were in the resting phase and a long time (14 wk) was required to obtain spawning, however, we obtained eggs in February, four months before natural conditions where the main spawning activity is observed beginning in June. Rodríguez Moscoso et al. (1993) reported that it is possible to spawn *R. decussatus* in March after 2–3 mo of conditioning. In the second and third conditioning experiments a shorter period of time was required (6 or 7 wk) because gametogenesis was more advanced when the experiment began, this agrees with work reported by Helm & Bourne (2004), *R. decussatus* with an adequate food supply require 4–8 wk ( $350$ – $650 D^\circ$ ) to reach spawning condition in late winter and early spring. Results of this study together with previous conditioning carried out in previous years show that the mortality rate is higher in broodstock conditioned directly at  $20^\circ\text{C}$ . The lowest mortality rate of adults was observed in the first conditioning 5% in GT tanks and 6% in CT tanks. In the second conditioning, clam mortality was 11% in tanks with GT

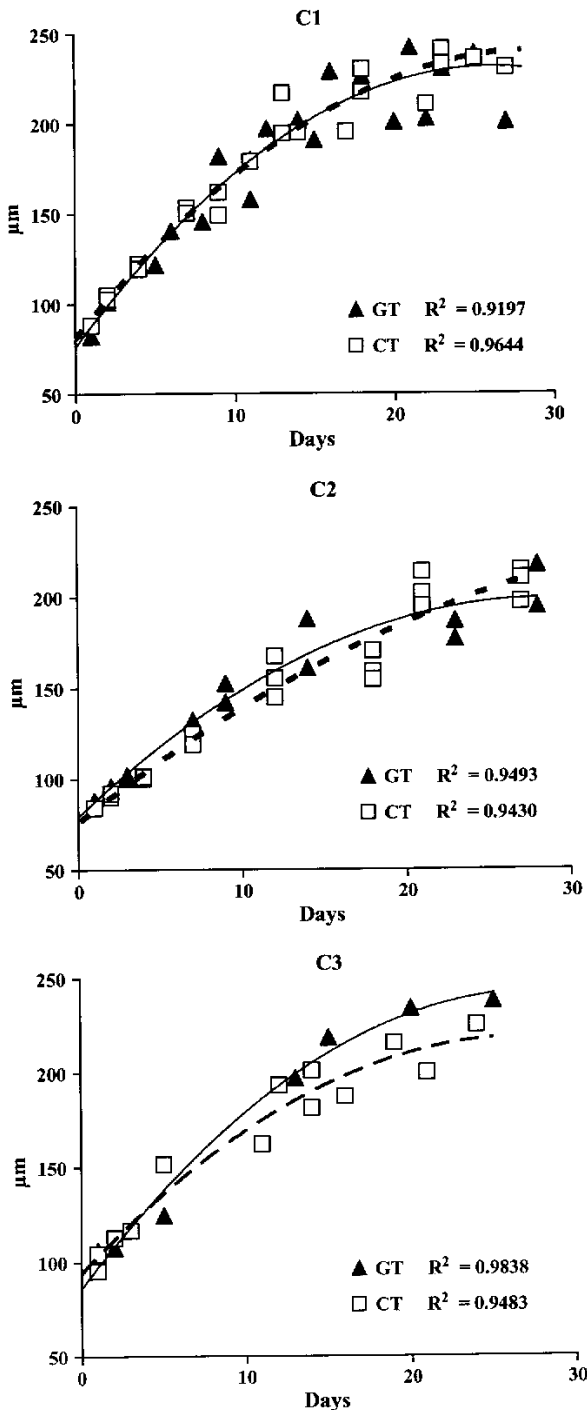


Figure 2. Growth of larvae collected at the end of each conditioning experiment (C1, C2, C3). Points are mean size for all tanks and the curve represents the calculated trendline. GT (continuous line) = gradual increase in temperature, CT (dash line) = constant temperature.

and 19% in tanks with CT. In the third conditioning the mortality rate was higher in CT tanks (29%) whereas in GT tanks mortality was 3%.

The most important difference between the two temperature regimes was the higher condition index of clams conditioned under the GT regime in C1 and C2, there were no differences in C3 probably because the clams in the third conditioning were collected when more than 50% of them were already ripe (3A). Between T1 and T2, with GT, there was a continuous development of gonads, together with an increase in condition index, whereas with CT maturity was reached more quickly but the maturation stage reached was similar at the end (T2) and the condition index remained constant. The latter may be because of a decrease in somatic tissue in parallel with the increase in gonad, which leads to underestimation of gonad growth (Laruelle et al. 1994).

In C2 and C3 partial spawnings took place between T1 and T2, shown by the presence of clams in stage 3D at both temperature regimes. Non-accumulation of eggs before spawning (Laruelle et al. 1994) and the existence of partial spawning is commonly observed in *R. decussatus* (Laruelle et al. 1994, Hamida et al. 2004, Delgado & Pérez Camacho 2005). Therefore, total number of eggs released per clam found here is a rough estimate because of *R. decussatus* releasing ripe oocytes regularly once a certain level of gonadal development has been reached (Delgado & Pérez Camacho 2003). In a previous paper Pérez Camacho et al. (1977) reported that only 35% of broodstock conditioned in the laboratory released their gametes indicating that under natural conditions the gonad ripens gradually, and spawning can be extended over a long period. Partial spawnings reduced the final number of eggs and increased the differences between specimens.

High temperatures throughout gametogenesis will not necessarily produce better gametes (Martínez et al. 2000), fecundity and egg quality are closely related to glycogen cycles and to *de novo* synthesis of lipids during spring vitellogenesis, which depends on stores of glycogen (Gabbott 1975, 1983). Interruption of these cycles, caused by artificial conditioning at high temperatures may force development of oocytes before sufficient glycogen has been accumulated for lipid synthesis. The percentage of lipids in the gonad-visceral-mass increased between T0 (7% to 8%) and T1 (15% to 16%) and this increase in lipid content between T0 and T1 was associated with an increase in condition index and a period of gonadal development, as shown by histological analysis. Between T1 and T2 the percentage of lipids in the gonad-visceral mass remained fairly steady or fell slightly, probably because of partial emission of gametes. Higher values of the condition index and lipid content of the gonad-visceral mass in the three conditioning experiments compared with the natural habitat suggest higher production of gametes with a higher biochemical quality.

Endogenous egg reserves are important for survival through embryogenesis until exogenous sources become available—but not for subsequent larval growth. Utting & Millican (1997) correlated growth rate of larvae with egg lipid levels. Larval growth rates observed were similar to those estimated by Beiras et al. (1994) and Pérez Camacho et al. (1977) (1.9–11.26  $\mu\text{m}$  per day and 5.96–8.09  $\mu\text{m}$  respectively), suggesting that the diet used in the conditioning experiments was of good quality.

Perhaps the most critical period in the production of juvenile clams (seed) occurs at metamorphosis (Manzi & Castagna 1989), because this involves major physical and physiological

TABLE 4.

Changes in the biochemical composition of *Ruditapes decussatus* during the three conditioning experiments (C1, C2, C3) at constant temperature (CT) and gradual increase in temperature (GT). T0: first sampling, T1: second sampling, T2: third sampling.

Conditioning	Sample	Sex	Glycogen (mg/gonad)				Proteins (mg/gonad)				Lipids (mg/gonad)			
			GT		CT		GT		CT		GT		CT	
			Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
C1	T0	Males	83.5	8.7	83.5	8.7	130.7	1.9	130.7	1.9	23.7	0.6	23.7	0.6
		Indeterminates	109.0	8.7	109.0	8.7	185.0	0.2	185.0	0.2	34.4	1.4	34.4	1.4
	T1	Males	99.2	6.9	93.4	6.9	140.1	2.0	138.4	9.8	54.2	4.3	46.2	6.2
		Females	128.5	15.3	100.0	8.9	178.4	7.7	144.0	5.7	77.1	10.0	50.0	5.7
	T2	Indeterminates	86.1	13.1	105.5	9.1	107.0	3.1	145.5	6.3	43.4	2.5	45.5	6.1
		Males	92.0	8.6	100.7	2.3	166.4	8.9	160.6	8.8	55.5	9.9	55.5	7.0
C2	T0	Females	100.2	4.1	93.3	4.7	148.8	17.2	150.0	12.3	58.1	1.8	62.3	9.8
		Indeterminates	40.5	4.3	40.5	4.3	75.0	3.2	75.0	3.2	12.3	0.8	12.3	0.8
	T1	Males	40.7	2.8	25.4	3.7	163.8	3.4	212.0	6.9	46.3	4.6	46.7	7.6
		Females	40.9	1.1	22.1	1.9	124.7	9.8	184.9	14.7	46.5	3.8	62.8	9.3
	T2	Males	25.5	3.0	14.0	0.2	191.5	14.9	204.9	11.4	40.1	5.3	38.7	3.8
		Females	29.8	2.1	16.1	0.4	182.9	7.3	190.5	16.2	62.8	5.2	62.6	5.4
C3	T0	Males	25.1	1.8	25.1	1.8	139.7	14.3	139.7	14.3	22.5	2.2	22.5	2.2
		Females	44.7	2.7	44.7	2.7	139.0	2.3	139.0	2.3	26.6	4.7	26.6	4.7
	T1	Males	19.8	1.7	17.6	2.1	153.7	5.7	179.7	1.7	32.8	4.0	32.6	3.2
		Females	26.1	1.2	21.4	1.9	134.9	3.6	163.0	7.3	43.8	3.8	57.6	5.5
	T2	Males	17.5	2.5	16.1	1.8	158.4	5.4	171.0	5.3	28.7	4.5	36.1	7.0
		Females	18.8	0.8	17.5	1.6	137.7	7.2	154.2	9.3	42.0	7.3	49.7	3.6

changes. Lee & Heffernan (1991) reported that survival from the time of hatching until initiation of feeding depends on levels of triglycerides in the animal. It seems that fecundity of bivalves is controlled to maintain a constant level of lipid reserves in the eggs (Utting & Millican 1997). This may explain why even under conditioning regimes in which the fecundity of broodstock is

increased, larval viability is not always improved. A high lipid index does not always produce high survival (Gallager & Mann 1986), both the quantity and the quality of the lipids must be considered, e.g., hatching success rate in *Pecten maximus* was positively related to lipid levels in eggs, but subsequent growth and survival of larvae were independent of egg lipid reserves

TABLE 5.

Changes in the percentage of glycogen and lipids of the gonad of *Ruditapes decussatus* during the 3 conditioning experiments (C1, C2, C3) at constant temperature (CT) and gradual increase in temperature (GT). T0: first sampling, T1: second sampling, T2: third sampling.

Conditioning	Sample	Sex	Glycogen (%)				Lipids (%)			
			GT		CT		GT		CT	
			Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
C1	T0	Males	26.46	2.75	26.46	2.75	6.10	0.16	6.10	0.16
		Indeterminates	25.38	2.02	25.38	2.02	6.48	0.27	6.48	0.27
	T1	Males	24.80	1.76	23.51	0.30	11.47	0.92	9.90	1.05
		Females	26.12	3.06	23.81	2.01	12.48	0.67	14.29	1.59
	T2	Indeterminates	29.25	4.48	26.07	2.22	11.54	0.59	9.15	1.19
		Males	22.65	1.96	23.97	0.52	13.79	2.65	10.40	1.31
C2	T0	Females	25.70	1.01	23.53	1.20	20.53	0.41	17.00	6.17
		Indeterminates	23.54	0.23	23.54	0.23	6.43	0.36	6.43	0.36
	T1	Males	11.44	0.80	5.96	0.17	10.40	3.76	9.26	1.51
		Females	14.32	0.36	5.90	0.50	17.83	4.60	13.87	0.62
	T2	Males	6.71	0.77	3.50	0.06	9.48	0.35	8.67	0.67
		Females	8.08	0.57	4.44	0.14	14.17	2.54	11.71	0.68
C3	T0	Males	9.20	0.68	9.20	0.68	7.40	0.21	7.40	0.21
		Females	15.42	0.93	15.42	0.93	8.19	0.59	8.19	0.59
	T1	Males	6.41	0.14	4.95	0.60	9.47	0.48	8.36	0.44
		Females	9.02	0.41	6.32	0.56	14.95	0.70	14.82	1.28
	T2	Males	5.57	0.78	4.23	0.53	8.15	0.44	9.61	1.52
		Females	5.76	0.26	5.61	0.52	13.31	0.99	11.95	0.68

(Devauchelle & Mingant 1991). We found that the percentage of larvae that survived metamorphosis was lower in larvae from CT tanks than in GT tanks. The percentage of larvae that survived metamorphosis ranged from 25% in C3 at CT to 40% in C1 at GT, apart from CT tanks in C2 (less than 10%). Survival rate of clam larvae in our work was higher than reported by Zine et al. (1998), that is, 9.5% when the larvae metamorphosed (10–40 days).

Broodstock conditioning for commercial production of bivalve seed may be considered as a stressful situation, but with an adequate food supply, low temperatures are probably more

appropriate for normal development of gametes and accumulation of energy reserves. In summary, results of the present study showed that *Ruditapes decussatus* can be conditioned successfully by a gradual increase in temperature, enhancing production of larvae and reducing overall hatchery production costs.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This research was carried out with the financial assistance of the Xunta de Galicia (PGIDT00MAR23501PR)

#### LITERATURE CITED

- Beiras, R., A. Pérez Camacho & M. Albetosa. 1994. Influence of temperature on the physiology of growth in *Ruditapes decussatus* (L.) larvae. *J. Shellfish Res.* 13:77–93.
- Delgado, M. & A. Pérez Camacho. 2003. A study of gonadal development in *Ruditapes decussatus* (L.) (Mollusca, Bivalvia), using image analysis techniques: Influence of food ration and energy balance. *J. Shellfish Res.* 22:435–441.
- Delgado, M. & A. Pérez Camacho. 2005. Histological study of the gonadal development of *Ruditapes decussatus* (L.) (Mollusca: Bivalvia) and its relationship with available food. *Sci. Mar.* 69:87–97.
- Devauchelle, N. & D. Mingant. 1991. Review of the reproductive physiology of the scallop, *Pecten maximus*, applicable to intensive aquaculture. *Aquat. Living Resour.* 4:41–51.
- Fraga, F. 1956. Determinación de glucógeno en moluscos con el reactivo de antrona. *Inv. Pesq.* 3:69–74.
- Gabbott, P. A. 1975. Storage cycles in marine bivalve molluscs: A hypothesis concerning the relationship between glycogen metabolism and gametogenesis. *Proc. 9th Europ. Mar. Biol. Symp.* 191–211.
- Gabbott, P. A. 1983. Developmental and seasonal metabolic activities in marine molluscs. In: P. W. Hochachka, editor. *The Mollusca*, vol. 2. Environmental Biochemistry and Physiology. New York: Academic Press. pp. 165–217.
- Gallager, S. M. & R. Mann. 1986. Growth and survival of larvae of *Mercenaria mercenaria* (L.) and *Crassostrea virginica* (Gmelin) relative to broodstock conditioning and lipid content of eggs. *Aquaculture* 56:105–121.
- Hamida, L., M. N. Medhiouband, J. C. Cochard, M. S. Romdhane & M. Le Pennec. 2004. Étude comparative du cycle de reproduction de la palourde *Ruditapes decussatus* en milieu naturel (sud Tunisie) et contrôlé (écloserie). *Cahiers de Biologie Marine (Cah. Biol. Mar.)* 45:291–303.
- Helm, M. M. & N. Bourne. 2004. Hatchery operation: Broodstock conditioning, spawning, and fertilization. In: A. Lovatelli, editor. *Hatchery culture of bivalves: A practical manual*, FAO Fisheries Technical Paper 471. Rome, Italy.
- Laruelle, F., J. Guillou & Y. M. Pualet. 1994. Reproductive pattern of the clams, *Ruditapes decussatus* and *R. philippinarum* on intertidal flats in Brittany. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 74:351–366.
- Lee, R. F. & P. B. Heffernan. 1991. Lipids and proteins in eggs of eastern oysters (*Crassostrea virginica* (Gmelin, 1971) and northern quahogs (*Mercenaria mercenaria* (Linnaeus, 1758)). *J. Shellfish Res.* 10:203–206.
- Loosanoff, V. L. & H. C. Davis. 1950. Conditioning of *Venerupis mercenaria* for spawning in winter and breeding its larvae in the laboratory. *Biol. Bull.* 98:60–65.
- Lowry, O., N. M. Rosenbrough, A. L. Farr & R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265–275.
- Lubet, P. 1981. Action de la température sur le cycle de reproduction des lamellibranchés. *Bull. Soc. Zool. Fr.* 106:283–292.
- Mann, R. 1979. The effect of temperature on growth, physiology, and gametogenesis in the Manila clam *Tapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 38:121–133.
- Manzi, J. J. & M. Castagna. 1989. Introduction. In: J. J. Manzi & M. Castagna, editors. *Clam Mariculture in North America*. Amsterdam: Elsevier. pp. 1–21.
- Marsh, J. B. & D. B. Weinstein. 1966. Simple charring method for determination of lipids. *J. Lipid Res.* 7:574–576.
- Martínez, G., C. Aguilera & L. Mettifofo. 2000. Interactive effects of diet and temperature on reproductive conditioning of *Argopecten purpuratus* broodstock. *Aquaculture* 183:149–159.
- Ojea, J., A. J. Pazos, D. Martínez, S. Novoa, J. L. Sánchez & M. Abad. 2004. Seasonal variation in weight and biochemical composition of the tissues of *Ruditapes decussatus* in relation to the gametogenic cycle. *Aquaculture* 238:451–468.
- Pérez Camacho, A., G. Román & M. Torre Cervigón. 1977. Experiencias en cultivos de larvas de tres especies de moluscos bivalvos: *Venerupis pullastra* (Montagu), *Venerupis decussata* (Linnaeus) y *Tapes edulis* (Linnaeus). *Boletín del Instituto Español de Oceanografía (Bol. Inst. Esp. Oceanogr.)*. Tomo III(235):7–62.
- Rodríguez Moscoso, E., R. Arnaiz, A. Coó, D. Martínez, A. Silva & J. A. Varela. 1993. Proceso de maduración y acondicionamiento de *Tapes decussatus* (Linné, 1787), fuera de época natural: I. Histoquímica, histología y composición bioquímica. In: A. Cerviño, A. Landín, A. de Coó, A. Guerra & M. Torre, editors. *Proc. IV Nat. Congress Aquaculture, Consellería de Pesca, Marisqueo e Acuicultura*, Xunta de Galicia, Spain. pp. 335–340.
- Sastry, A. N. 1966. Temperature effects in reproduction of the bay scallop *Aequipecten irradians* Lamarck. *Biol. Bull.* 130:118–134.
- Sastry, A. N. 1979. Pelecypoda (excluding Osteidae). In: A. C. Giese & J. S. Pearse, editors. *Reproduction of marine invertebrates*. Vol. 4. New York: Academic Press. pp. 113–292.
- Utting, S. D. & P. F. Millican. 1997. Techniques for the hatchery conditioning of bivalve broodstocks and the subsequent effect on eggs quality and larval viability. *Aquaculture* 155:45–54.
- Walne, P. R. 1966. Experiments in the large-scale culture of the larvae of *Ostrea edulis* L. *Fishery Investigations, Series II, Vol. XXV*. London: Ministry of Agriculture, Fisheries, and Food. 53 pp.
- Walne, P. R. 1976. Experiments on the culture in the sea of the butterflyfish *Venerupis decussata* L. *Aquaculture* 8:371–381.
- Wilson, J. H. & R. Seed. 1974. Reproduction in *Mytilus edulis* L. (Mollusca: Bivalvia) in Carlingford Lough, Northern Ireland. *Irish Fisheries Investigations B* 15:1–30.
- Zine, N. E., M. Menioui & J. Zaouali. 1998. Preliminary study of the embryology, larval and juvenile life of the clam *Ruditapes decussata* (L.) in controlled environment. *Mar. Life* 8:19–24.