TESIS DOCTORAL

Optimización del proceso de acondicionamiento de progenitores de ostra plana, *Ostrea edulis* (L., 1758) en criadero.

VERÓNICA MANEIRO VIÑAS

INSTITUTO DE ACUICULTURA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR
UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

SANTIAGO DE COMPOSTELA, 2014

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

TESIS DOCTORAL

Optimización del proceso de acondicionamiento de progenitores de ostra plana, *Ostrea edulis* (L., 1758) en criadero.

VERÓNICA MANEIRO VIÑAS

INSTITUTO DE ACUICULTURA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR
UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

SANTIAGO DE COMPOSTELA

2014

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

AUTORIZACIÓN DE LOS DIRECTORES

Dr. José Luis Sánchez López, profesor titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Santiago de Compostela.

Dr. Antonio Juan Pazos Castelos, profesor titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Santiago de Compostela.

Dra. **María de la Luz Pérez-Parallé Mera**, profesora titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Santiago de Compostela.

Como Directores de la Tesis de Doctorado titulada «Optimización del proceso de acondicionamiento de progenitores de ostra plana, *Ostrea edulis* (Linneo 1758) en criadero» presentada por Dña. Verónica Maneiro Viñas, alumna del Programa de Doctorado de Acuicultura, autorizan la presentación de la tesis indicada, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Artículo 34 del Reglamento de Estudios de Doctorado, y que como Directores de la misma no incurre en las causas de abstención establecidas en la ley 30/1992.

Y para que así conste, firmamos la presente en Santiago de Compostela, a 31 de Julio de 2014.

Fdo: José Luis Sánchez López

Fdo: Antonio Juan Pazos Castelos

Fdo: María de la Luz Pérez-Parallé Mera

Fdo: Verónica Maneiro Viñas

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Durante la elaboración de esta Tesis Doctoral, Verónica Maneiro Viñas disfrutó de un Contrato Laboral como Investigadora Colaboradora en el Proyecto de Investigación "*Bivalve conditioning and settlement-keys to competitive hatchery production (SETTLE)*" en el siguiente período: Enero 2009-Noviembre 2010.

Este trabajo de Tesis ha sido posible gracias a la financiación recibida de los siguientes proyectos:

"Optimización de la producción de semilla de ostra plana europea, *Ostrea edulis* L.". Proyecto del Programa Nacional del Ministerio de Educación y Ciencia. De 31/12/2005 al 31/12/2008. AGL2005-02665. Investigador principal: José Luís Sánchez López.

"Optimización de la producción de semilla de ostra plana, *Ostrea edulis* L. Mejora del proceso de acondicionamiento de progenitores". Proyecto de Programas Autonómicos de la Xunta de Galicia. De 05/08/2005 ó 04/08/2008. PGIDIT05RMA23501PR-1. Investigador principal: José Luís Sánchez López.

"Bivalve conditioning and settlement-keys to competitive hatchery production (*SETTLE*)". Proyecto de la Unión Europea. De 01/10/2008 ó 1/11/2010. 2008/PE018 (222043). Investigadores principales: María de la Luz Pérez-Parallé Mera y José Luís Sánchez López.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Agradecementos

Despois de moitos anos de traballo duro, esforzo e moita paciencia chega o final desta etapa de tese. Este traballo non vería a luz sen a colaboración de moitas persoas que me brindaron o seu apoio, a súa axuda e tódolos seus coñecementos. Por isto quero agradecerlles a todas elas o que fixeron por min para que este traballo saíse adiante do mellor xeito posible.

Quero agradecerllo en primeiro lugar aos meus directores de tese pola paciencia demostrada comigo, o seu apoio e ánimo para continuar e a súa dedicación para guiarme neste camiño durante tantos anos. A Luís porque foi o primeiro que creu en min, dándome a oportunidade de realizar o doutoramento con el e o seu grupo e polas súas ideas, orientación e apoio. A Antonio polas mil preguntas que lle realicei durante os experimentos e a redacción do traballo e todas recibiron unha resposta que me axudou a seguir e sobre todo pola súa paciencia redescubríndome o mundo da estatística. A Malú polas súas correccións, consellos, ánimos e por conseguir apurarme no traxecto final, sen ela tardaría moito máis en facela realidade.

Aos meus compañeiros de departamento pola amizade compartida, polo moito que aprendín de cada un deles, pola disposición que sempre tiveron a axudarme e a animarme nos momentos de baixón. Víctor e Montse, pola axuda técnica brindada nas primeiras etapas. Óscar, pola túa axuda e o teu humor. Crim, por ensinarme o teu traballo cas larviñas. Vane, por ser un *angelote*, con todas as letras, e incluso seguir axudándome dende lonxe, bótoche de menos! e Roi, polo apoio e por ensinarme a importancia da *biovida* e que saibas que es *amazing, man!*. E graciñas a todos polos momentos de congreso, comidas de departamento, ceas, experiencias, viaxes.....que ben o pasamos!

A Arturo Silva, por traer as ostras e a súa retranca, facendo máis livián o traballo e polo seu gran coñecemento do mundo da ostra plana.

E todos os meus amigos tamén merecen unha mención especial por escoitarme atentamente filosofar sobre a ostra e aturar durante todos este anos os meus cambios de humor e a suspensión de plans porque... teño que facer a tese! e sobre todo por facer que me esquecese da tese nos momentos malos e *resetearme* con charlas amenas, actividades divertidas, viaxes, festiñas,.... Mil perdóns a todos e moitas gracias pola vosa paciencia, ánimo e apoio. Quérovos!

E a toda a miña familia, por suposto, sen eles isto non sería posible. Aos meus pais, polo voso apoio incondicional, tanto emocional como económico cando me fixo falta (e non foron poucas veces) pero confiabades en min e por fin podedes ver os resultados. Fran e Fayna, un por darme puñaladas que me facían espabilar e outra por verme como a mellor investigadora do mundo, o que me daba un chisquiño de confianza para seguir adiante e sobre todo por traer ao mundo a Gara, a mellor *cousiña* do mundo, que nos sacou do pozo e nos fixo volver a vivir e a sonrir cando máis o necesitábamos. Quérovos moito!

E a todos os que me fun atopando ao longo destes anos e que dunha maneira ou outra me axudaron nesta gran etapa, xa fora no laboratorio, nos congresos, nos cursos, na vida... Graciñas a todos por deixar pegada en min!

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

a *Belis*

Ostra feliz não faz pérola

Rubem Alves

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

RESUMEN

El cultivo de ostra plana, *Ostrea edulis*, gozaba de gran esplendor en Galicia pero, debido a varios factores como la sobreexplotación de los bancos naturales, la sobrepesca y la incidencia de parásitos, que vinieron asociados a la semilla importada y que provocaron fuertes mortalidades, se produjo un bloqueo del sector. Para cubrir la alta demanda del mercado es imprescindible conseguir semilla de calidad y para eso es necesario realizar estudios de acondicionamiento de ejemplares autóctonos de esta especie.

El acondicionamiento de moluscos es el conjunto de procesos realizados sobre los reproductores para conseguir la madurez sexual fuera, tanto temporal como espacialmente, de su ambiente natural y así conseguir larvas para el cultivo fuera de la época de puesta. Para poder realizar el acondicionamiento de moluscos bivalvos es imprescindible conocer la influencia que los diferentes factores ambientales y nutricionales tienen sobre el desarrollo gonadal de los bivalvos. En este estudio se analizó la influencia del fotoperíodo, de la temperatura del agua, de la ración de alimento suministrada y del flujo del agua sobre el desarrollo gonadal de la ostra plana, *Ostrea edulis*, con el fin de optimizar su acondicionamiento en criadero.

La influencia de estos factores sobre el desarrollo gonadal de las ostras se evaluó de manera indirecta utilizando técnicas histológicas y estereológicas cuantitativas y también de forma directa a través del registro de los desoves obtenidos, fecha de los desoves y número de larvas obtenidas.

Los resultados obtenidos confirman que la temperatura del agua es un factor de primer orden en el acondicionamiento y el fotoperíodo es un factor regulador del desarrollo gametogénico de *Ostrea edulis*. Ambos factores actúan de manera independiente sobre el acondicionamiento; los mejores resultados se obtuvieron combinando gradiente de temperatura (14-18 ^{o}C) con gradiente de luz (8-16h/luz) tanto en otoño como en invierno. Una ración de alimento del 6% del peso seco del individuo en microgramos de microalgas era adecuada para el acondicionamiento óptimo de ostra plana, tanto en otoño como en invierno y aunque el flujo de agua no tenía una influencia destacable sobre éste, se observó un aumento de la mortalidad de los progenitores asociado con el aumento del flujo.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ABSTRACT

The culture of the flat oyster, *Ostrea edulis*, in Galicia reached a large development but due to several factors such as overexploitation of natural shoals, overfishing and the incidence of parasites, associated with imported seed that induced high mortalities, the culture of this species became almost impossible. To cover the market demands it is indispensable to get high quality seed through the conditioning of the native broodstock.

The conditioning of molluscs allows the broodstock to achieve sexual maturity outside both temporally and spatially of their natural environment. Thus, larvae for cultivation outside the spawning season can be obtained. For conditioning of bivalve molluscs is essential to know the influence that different environmental and nutritional factors have on gonadal development of bivalves. In order to optimise the conditioning in hatcheries, the influence of photoperiod, water temperature, food ration supplied and the flow of water on gonadal development of the flat oyster, *Ostrea edulis*, was analysed.

The influence of these factors on gonadal development of flat oysters was evaluated indirectly using histological and quantitative stereological techniques and also directly through the register of obtained spawning, spawning dates and number of larvae obtained.

The results confirm that the water temperature is a major factor in conditioning and that the photoperiod is a regulatory factor of gametogenic development of *Ostrea edulis*. Both factors operate independently on conditioning; the best results were obtained by combining a gradient of temperature (14-18 º C) and a gradient of light (8-16h/light) in autumn as well as in winter. The food ration of 6% (dry weight of the individual in micrograms of microalgae) was suitable for the optimal conditioning of the flat oyster, in autumn or winter, and although the water flow had not relevant influence on conditioning, an increase of mortality in the progenitors, associated with the increasing of the flow, was observed.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Índice

1. INTRODUCCIÓN **1**

1.1. Cultivo de moluscos en Galicia **8**

1.2. Acondicionamiento de moluscos bivalvos **13**

1.3. La Ostra plana **16**

1.3.1. Clasificación, Hábitat y Distribución **16**

1.3.2. Descripción anatómica **18**

1.3.3. Alimentación **23**

1.3.4. Reproducción **25**

1.3.5. Organismos competidores y patógenos de *Ostrea edulis* **31**

1.3.6. Valor nutritivo de *Ostrea edulis* **34**

1.4. Antecedentes históricos del cultivo de ostras **38**

1.5. Situación actual del cultivo de ostra (conclusiones y problemas) **42**

2. OBJETIVOS DEL ESTUDIO **45**

3. MATERIALES Y MÉTODOS **49**

3.1. Diseño experimental del acondicionamiento. **51**

3.2. Alimentación **64**

3.2.1. Cultivo de microalgas **64**

3.2.2. Cálculo de la ración de alimento **72**

3.2.3. Seguimiento de los cultivo microalgales **73**

3.3. Recogida del material biológico **76**

3.4. Protocolo de histología **78**

3.5. Estereología **88**

3.6. Extracción y análisis de ácidos grasos **90**

3.7. Estadística **93**

4. RESULTADOS **95**

4.1. Fases del ciclo gonadal de *Ostrea edulis* **97**

4.2. Análisis de ácidos grasos **101**

4.3. Efecto del fotoperíodo y la temperatura sobre el acondicionamiento de progenitores de *Ostrea edulis*.

- Experimento 1; Efecto combinado de la Temperatura y Fotoperíodo en otoño **104**

1. Medidas y Pesos **104**

2. Resultados histología **107**

3. Resultados estereología **110**

4. Resultados estadística..... **133**

- Experimento 2; Efecto del Fotoperíodo en otoño..... **134**

1. Medidas y Pesos..... **134**
2. Resultados histología..... **138**
3. Resultados estereología..... **141**
4. Desoves..... **160**
5. Resultados estadística..... **162**

- Experimento 3; Efecto del Fotoperíodo en otoño..... **163**

1. Medidas y Pesos..... **163**
2. Resultados histología..... **165**
3. Resultados estereología..... **167**
4. Desoves..... **177**
5. Resultados estadística..... **179**

- Experimento 4; Efecto del Fotoperíodo y Temperatura en invierno..... **180**

1. Medidas y Pesos..... **180**
2. Resultados histología..... **183**
3. Resultados estereología..... **185**
4. Desoves..... **199**
5. Resultados estadística..... **201**

- Experimento 5; Efecto de las condiciones óptimas de Temperatura y Fotoperíodo en invierno..... **202**

1. Medidas y Pesos..... **202**
2. Resultados histología..... **204**
3. Desoves..... **205**

4.4. Efecto de la ración de alimento sobre el acondicionamiento de progenitores de *Ostrea edulis*.

- Experimento 6; Efecto de la Ración de Alimento en otoño..... **207**

1. Medidas y Pesos..... **207**
2. Resultados histología..... **210**
3. Resultados estereología..... **213**
4. Desoves..... **226**
5. Resultados estadística..... **228**

- Experimento 7; Efecto de la Ración de Alimento en invierno..... **229**

1. Medidas y Pesos..... **229**
2. Resultados histología..... **231**
3. Resultados estereología..... **233**
4. Desoves..... **240**
5. Resultados Estadística..... **243**

4.5. Efecto combinado del flujo del agua y la ración de alimento sobre el acondicionamiento de progenitores de *Ostrea edulis*.

- Experimento 8; Efecto combinado del flujo del agua y la ración de alimento..... **244**
  - 1. Medidas y Pesos..... **244**
  - 2. Resultados histología..... **246**
  - 3. Resultados estereología..... **248**
  - 4. Desoves..... **262**
  - 5. Resultados Estadística..... **268**

5. DISCUSIÓN..... **269**

6. CONCLUSIONES..... **293**

7. BIBLIOGRAFÍA..... **297**

8. ANEXOS..... **309**

- **A. Abreviaturas**..... **311**
- **B. Datos biométricos**..... **315**
- **C. Recuento gonadal**..... **321**
- **D. Análisis Estadístico**..... **337**

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

1. INTRODUCCIÓN

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

1. INTRODUCCIÓN.

Según la definición dada por la FAO: "La Acuicultura es el cultivo de organismos acuáticos, en particular peces, moluscos, crustáceos y plantas acuáticas. La actividad de cultivo implica la intervención del hombre en el proceso de cría para aumentar la producción, en operaciones como la siembra, la alimentación, la protección frente a depredadores, etc. La actividad de cultivo también presupone que los individuos o asociaciones que la ejercen son propietarios de la población en cultivo. Para propósitos estadísticos, se admite que una determinada producción de organismos acuáticos constituye una contribución a la acuicultura cuando éstos son cosechados por individuos o asociaciones que han sido sus propietarios durante el período de cría. Se dice, por otra parte, que una cosecha es el resultado de la actividad pesquera cuando los organismos acuáticos, en su condición de bien común, pueden ser explotados por cualquiera, con o sin la respectiva licencia". En la Legislación Española la definición de acuicultura marina está desarrollada en la Ley Nº 23/1984 de Cultivos Marinos y dispone que "Se entiende por cultivos marinos la realización de las acciones y labores apropiadas para la reproducción o crecimiento de alguna o varias especies de la fauna y la flora marinas asociadas a ellas". La Comunidad Europea, en el Reglamento (CE) Nº 1421/2004 señala que debe entenderse como acuicultura "la cría o cultivo de organismos acuáticos con técnicas encaminadas a aumentar, por encima de las capacidades naturales del medio, la producción de los organismos en cuestión; estos serán, a lo largo de toda la fase de cría o de cultivo y hasta el momento de su recogida, propiedad de una persona física o jurídica."

La acuicultura en España ha seguido un crecimiento ascendente durante las últimas décadas, especialmente de las especies marinas, gracias a la gran inversión en medios realizada por el sector. Según el informe del Estado Mundial de la Pesca y la Acuicultura de 2012 de la FAO, la producción acuícola mundial alcanzó un máximo histórico en 2010 con una producción de 59,9 millones de toneladas, y con unos cálculos provisionales de 63,6 mill. de ton. para 2011, excluyendo las plantas y otros productos no destinados a la alimentación. China es la máxima responsable de este incremento. La acuicultura marina supone el 29,2% (18,3 mill. de ton.) de la producción acuícola mundial y de ésta el 75,5% (13,9 mill. de ton.) se corresponde con la producción de moluscos marinos.

Los moluscos son animales invertebrados de cuerpo blando y desde el punto de vista de la acuicultura la Clase Bivalvia es la más importante, de las siete clases existentes. Los bivalvos ocupan el lugar más destacado en el cultivo de moluscos ya que muestran un gran éxito en el cultivo. Los moluscos bivalvos representan en la acuicultura marina uno de los grupos más importantes desde el punto de vista productivo y económico, debido a que los costes de producción comparados con la inversión requerida para dicha producción no son tan elevados como para otros grupos. La gran producción española de moluscos bivalvos y las

mejoras en las técnicas de cultivo, permiten ver estos cultivos como la actividad más prometedora y rentable dentro de los cultivos marinos.

La producción de la acuicultura marina española alcanzó 253.840 ton. en 2010, lo que corresponde con el 10% de la producción total europea. Los moluscos son el principal grupo explotado, con un 82.4% del total, debido sobre todo a la gran producción de mejillones en Galicia, según datos del informe 'Indicadores de Acuicultura 2011', elaborado por la Fundación Observatorio Español de Acuicultura (OESA). España es el miembro de la Unión Europea con mayor producción acuícola pero sólo alcanza el 5º puesto respecto al valor económico.

Además, la acuicultura es un sector que genera 6.170 puestos de trabajo, 3.974 a tiempo completo sólo en Galicia (el 64% del total de la masa laboral acuícola española) pero estos datos han menguado desde 2007 (7.650 empleos) debido a la situación económica actual (Anuario de Acuicultura Galega 2011 de Pesca de Galicia).

Galicia es la primera región acuícola de Europa y una de las primeras a nivel mundial, gracias a la producción del mejillón. Hay un claro liderazgo productivo de Galicia respecto al territorio español ya que agrupa prácticamente la totalidad de la producción de mejillón (98%) y el rodaballo (88%), además de ser líder en el resto de los moluscos. Según los datos del Anuario de Acuicultura Galega 2011 de Pesca de Galicia se sabe que esta producción ha aumentado un 4,51% y el valor de sus productos en el mercado ha aumentado un 8,43% gracias al auge de la miticultura, que ha aumentado un 5% la producción y un 17% el valor generado. En 2011 la producción de bivalvos alcanzó los 226.401.927 Kg y de ellos 747.356 Kg corresponden a la ostra plana *Ostrea edulis* (Linneo 1758). En estos momentos Galicia cuenta con 3.587 bateas, 3.380 dedicadas al cultivo del mejillón y 149 al engorde de la ostra plana. La venta de la ostra plana en las lonjas gallegas alcanzó en 2012 los 603.025 Kg (2.859.565 €) (Anuario de Acuicultura Galega 2012).

El litoral español y de forma relevante, el litoral gallego presentan unas condiciones excepcionales para el desarrollo del cultivo de moluscos bivalvos. Galicia, con una línea de costa que alcanza entre el Río Eo (provincia de Lugo) y el Río Miño (provincia de Pontevedra) los 1.195 Km, cuenta con un total de 278 arenales y 70 millones de metros cuadrados de zona intermareal. A ello hay que añadirle las excelentes características geográficas y biotípicas de las rías, relativamente poco profundas, con escaso oleaje, y sometidas al fenómeno del "afloramiento" marino y al sistema de circulación estuárica y que además son ecosistemas de una gran producción biológica por sus especiales características (situación geográfica, orientación y dinámica). La causa de esta elevada productividad radica en la intensa renovación de nutrientes en sus aguas, que permite el desarrollo de una masa de fitoplancton hasta tres veces mayor que la de las aguas oceánicas situadas a igual latitud. Estos nutrientes (nitratos fundamentalmente) son aportados por aguas profundas y frías que llegan al interior de las rías por dos mecanismos distintos, los afloramientos y la circulación estuárica. Los afloramientos consisten en el ascenso de capas de agua profundas, las aguas que ascienden

vienen de una profundidad de al menos 200 m y cuando llegan cerca de la superficie y próximas a las costas invaden las rías entrando por el fondo, son aguas bastante frías y llegan llenas de los nutrientes necesarios para el crecimiento de los vegetales. Estos fenómenos se inician en primavera, tienen su máxima intensidad en verano y finalizan en otoño. Se producen por una serie de factores que actúan de forma conjunta, destacando el giro anticiclónico del Atlántico Norte, centrado en las Azores, que afecta a Galicia con los vientos del nordeste; estos vientos provocan el empuje de las aguas cercanas a la costa hacia mar adentro favoreciendo así, el ascenso de aguas profundas. En cuanto a la circulación estuárica, la circulación del agua en las rías se resume en que el agua dulce, procedente del río, ingresa por la parte posterior de las rías, se mezcla con el agua salada y sale por la boca de la ría, la mayor parte por la ribera norte, como una capa de agua superficial, ya que al carecer de sales tiene menor densidad. Para compensar esta salida de agua, entra agua del océano y lo hace desde el fondo, mezclándose verticalmente con la que va saliendo provocando un gradiente vertical de salinidad. De esta manera se consigue que la gran producción primaria de las rías se canalice hacia las especies de interés comercial.

En cuanto a la temperatura del agua en las rías, las temperaturas más altas se encuentran a finales de verano y están próximas a los 18 ^{o}C, pudiendo llegar hasta 20 ^{o}C en lugares abrigados, de poco fondo y cercanos a la costa. En invierno la temperatura mínima se mantiene entre los 10-12 ^{o}C. La salinidad en las rías fluctúa a lo largo de todo el año, debido a que en las épocas de lluvia (invierno y primavera) hay un mayor aporte de agua dulce que forma una capa superficial, debido a su menor densidad, que puede alcanzar 3 o 4 metros de espesor y registra valores de salinidad muy bajos, a veces es casi agua dulce. Por debajo de esta capa se encuentran aguas de salinidad de 35 a 35.5‰, muy similar a las aguas oceánicas. En verano, la influencia del agua dulce es casi nula por lo que la salinidad apenas sufre alteraciones. El oxígeno disuelto en el agua disminuye su concentración desde la superficie hacia el fondo; se pueden encontrar valores de saturación muy superiores al 100% en puntos concretos, coincidiendo con proliferaciones algales. En cambio, en las zonas de fondo fangoso que contienen mucha materia orgánica (parte interna de las rías o en las cercanías de polígonos de bateas), el contenido de O_2 en el agua cercana al fondo disminuye e incluso llega a agotarse, así que los fondos son anóxicos, marcando así el tipo de organismos que pueden vivir en esas zonas (Corral, 1992).

Por todo esto, estamos ante unas condiciones óptimas para el asentamiento de una amplia variedad de especies marinas y el crecimiento de marisco de alta calidad y no sorprende, por tanto, que se haya desarrollado en Galicia una potente actividad económica y social en torno al marisqueo que se pierde en la memoria de los tiempos. Se tiene constancia arqueológica de su existencia durante el Paleolítico y Mesolítico, así como en la Edad del Bronce, y continúa siendo una fuente principal de alimento y de materia prima para utensilios y ornamentos durante la cultura castrexa. De ello da fiel testimonio la multitud de

"concheiros" -depósitos prehistóricos de conchas y peces-, encontrados en la costa y en el interior del país (Polanco Torres y Corral, 2002).

Los moluscos se han visto sometidos durante siglos a una intensa explotación natural, lo que ha exigido la regulación de su extracción en los bancos y yacimientos naturales existentes por medio de licencias y concesiones para poder controlar la producción natural y facilitar la recuperación de los bancos naturales y la disponibilidad de semilla y juveniles, y conseguir así potenciar el desarrollo de la producción de moluscos a través de la acuicultura. El agotamiento de los bancos naturales por una extracción incontrolada y masiva de individuos, cada vez de menor talla, ha sido una de las causas, junto con los problemas patológicos, de la escasez en la producción de semilla, provocando en consecuencia un alza del precio que permite contemplar como una actividad rentable la instalación de plantas dedicadas a la producción de semillas de bivalvos.

La ostra plana *Ostrea edulis* es una especie autóctona de las costas de Europa, que se expande desde el Mar Negro hasta las costas de Noruega y a lo largo de toda la costa de Marruecos. La ostra plana es una especie ya conocida desde muy antiguo en las costas peninsulares; las primeras referencias aparecen como restos arqueológicos en los "concheiros" de los castros gallegos y en los restos de las villas romanas (Polanco Torres y Corral, 2002). Durante muchos años llegó a formar amplios bancos a lo largo de las costas atlánticas y mediterráneas europeas, alcanzando una gran importancia en las costas gallegas.

En el contexto de la acuicultura, no es necesario destacar la importancia social y económica que en su momento tuvo el cultivo de ostra plana; podrían señalarse aspectos de tradición, valor gastronómico, presencia autóctona, etc. Sin embargo, la explotación fuera de control hizo que desapareciesen muchos de los bancos naturales de ostra en Galicia, y a comienzos del siglo pasado la producción quedó fundamentalmente restringida a las rías de Vigo y Arousa. Este proceso culminó en los años 50 con el agotamiento de los bancos naturales de las rías de Vigo, Arousa y Noia, desapareciendo prácticamente con ellos la producción natural de esta especie en las aguas gallegas. Después de un período de esplendor, con cerca de 800 emplazamientos dedicados al cultivo de ostra, se pasó a partir de los años 70 a la importación de semilla para su engorde en batea, con todos los problemas que estas importaciones acarrean (fauna asociada, patógenos, etc.) y que provocaron elevadas mortalidades. Comenzó entonces en los años ochenta, el cultivo de semilla producida en criaderos industriales (*hatcheries*) que a pesar de su débil aceptación al principio, basada en la desconfianza de los ostricultores por la calidad de la semilla, en los años siguientes se mostró insuficiente para satisfacer la fuerte demanda. Esto, unido con la cada vez mayor rentabilidad de los cultivos de mejillón, hizo que las 800 concesiones para el cultivo de ostra se hayan reducido a 149 en la actualidad, que se dedican a la estabulación de adultos o semiadultos procedentes fundamentalmente de las distintas áreas de producción europea.

Aunque el sector ostrícola gallego tiene una gran potencialidad hay muchos factores que están bloqueando su desarrollo; entre estos podemos citar: el progresivo descenso de reclutamiento de semilla del medio natural, las importaciones de semilla y adultos que trajeron consigo numerosas enfermedades y parásitos (*Bonamia ostreae* y *Marteilia refringens*, principalmente) que provocaron grandes mortandades en los cultivos y la escasez y baja calidad de la semilla de producción en criadero que no es suficiente para cubrir la alta demanda del sector (Polanco Torres y Corral, 2002).

Por lo tanto, es imprescindible conseguir semilla de calidad y para eso es necesario realizar estudios de acondicionamiento de ejemplares autóctonos de esta especie ya que casi todos los estudios de los que se dispone son parciales y se refieren a poblaciones de *Ostrea edulis* de otras partes del mundo. Teniendo en cuenta que la ostra gallega posiblemente sea una raza fisiológicamente adaptada a reproducirse en aguas con temperaturas bajas (Korringa, 1941) se ve necesario hacer un amplio estudio del acondicionamiento de esta especie para dar con las condiciones óptimas para que el desarrollo gametogénico sea lo más breve posible y poder conseguir así larvas viables en el menor tiempo y en cualquier época del año. De esta manera, consiguiendo semilla de calidad y en la cantidad necesaria sería posible abastecer al mercado ostrícola e incluso repoblar los bancos naturales de nuestras rías.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.1 CULTIVO DE MOLUSCOS EN GALICIA.

Los moluscos son uno de los grupos más importantes en la acuicultura marina desde el punto de vista productivo y económico, debido a varios factores como son su elevado valor en el mercado y el conocimiento existente sobre su biología, necesidades nutricionales e instalaciones, que facilitan su producción.

Galicia dispone de grandes ventajas para el desarrollo de la acuicultura en general y del cultivo de moluscos en particular, pues posee unos recursos naturales únicos, como las condiciones medioambientales y la elevada productividad primaria de sus rías, que constituyen además lugares protegidos para la instalación de artefactos de cultivo. Además, en Galicia existe la infraestructura y tecnología suficiente para absorber una parte considerable de la demanda, una gran superficie explotable de fondos arenosos (hectáreas) y un mercado asegurado para la comercialización (Jara Jara, 1995).

De entre la gran cantidad de especies marinas que se producen, se extraen y se comercializan destacan bivalvos como el mejillón, varias especies de almeja, berberecho, la ostra plana y la vieira. Se trata de cultivos marinos que se desarrollan en el mar o en zonas en comunicación directa con éste (bahías, ensenadas, lagunas, rías, bocas de ríos), en agua salada o salobre. Estas especies se producen de forma natural en todas las rías gallegas, antiguamente más fructíferas. En estas zonas las cofradías u organizaciones de productores extraen estos moluscos mediante diferentes técnicas según la especie, respetando las épocas de veda y de desove naturales, para asegurar la continuidad de estos bancos naturales. Tras la extracción, los moluscos pasan a través de estaciones depuradoras y posteriormente son comercializados (Fernández, 1991b). Para poder llevar a cabo los cultivos de moluscos es necesaria la obtención de semilla y ésta se puede realizar a partir del método tradicional, es decir, captación de semilla en el medio natural por medio de colectores (piedras, conchas de mejillón u ostra, tejas árabes, placas o tubos plásticos), o comprarla en un criadero (*hatchery*) de moluscos.

Los cultivos se pueden clasificar en función del número de especies cultivadas en la explotación y así podemos diferenciar entre:

- Monocultivo: una sola especie cultivada en la explotación.
- Policultivo: cultivo simultáneo de varias especies, independientes o interdependientes.

Por otra parte, según las fases biológicas que se encuentran y producen en la explotación podemos hablar de:

- Cultivo total o integral: cuando el cultivo es controlado totalmente, durante el ciclo completo, siendo independiente de la población natural. Abarca desde la obtención inicial de gametos hasta el cultivo de individuos adultos maduros capaces de reproducirse de nuevo. Al mismo tiempo que se obtienen individuos de talla comercial para su venta también se logran nuevos reproductores para iniciar un nuevo ciclo.
- Cultivo parcial o semicultivo: Sólo atiende al animal durante un cierto período de su vida por lo que depende parcialmente de la población natural, como ejemplo, captura de larvas en el mar y engordarlas hasta su venta.

Los cultivos se pueden realizar por medio de distintas técnicas en función de las características bioecológicas de la especie a cultivar, la topografía y el clima de la zona, las condiciones económicas y la disponibilidad de los materiales adecuados. Los métodos de cultivo que se llevan a cabo a partir de semilla sembrada o fijada se diferencian según el método y la especie:

- Cultivos sobre fondo: utiliza los fondos marinos como soporte del cultivo. Este sistema se utiliza en el preengorde y engorde de especies excavadoras como la almeja o el berberecho. Si el sustrato es lo suficientemente duro (grava, piedra,…) también se puede utilizar para el cultivo de bivalvos epibiontes como la ostra o el mejillón. Los lugares más apropiados para este tipo de cultivos son los estuarios protegidos o bahías, con oscilaciones de las mareas bien marcadas para impedir que se depositen sedimentos y eliminar los excrementos y así poder facilitar el suministro de oxígeno, quedando gran superficie al descubierto durante la bajamar. El gran problema que tiene que afrontar este tipo de cultivo es la proliferación de depredadores.
    - Lechos de conchas o cascajos: El mantenimiento es fácil y barato, se puede utilizar semilla obtenida en otros sistemas pero se obtiene un bajo rendimiento y un crecimiento relativamente bajo causado por la sedimentación y el ataque de depredadores.
    - Lechos de roca: Son cómodos de usar y tienen un bajo coste y la selección se hace con gran facilidad.
- Cultivos sobreelevados: Se basan en la utilización de determinadas estructuras para elevar los cultivos y así evitar fondos poco propicios para una determinada especie e impedir, además, el acceso a los depredadores. Su instalación suele darse en playas fangosas de pendiente suave y con grandes oscilaciones de marea. Hay distintas clases en función del tipo de soporte que se utilice:

- Cultivo en postes o estacas: El soporte son postes o estacas que se clavan al fondo, en ellos se fijan o siembran moluscos epibiontes. En Francia se denominan "bouchots" y se utilizan para el cultivo de mejillones. A su vez también funcionan como colectores de semilla.
- Cultivo en bolsas plásticas o cestas: Sobre armazones de madera o metal se colocan bolsas de malla plástica ("pochons") o cestas que contienen los animales. Se utilizan sobre todo para el preengorde de ostra y almeja y el engorde de ostra.
- Cultivo en armazones de madera: Se trata de un armazón cuadriculado de madera colocado sobre soportes que lo separan del fondo. Se utiliza en Australia para el cultivo de ostras.

➢ Cultivos suspendidos o en suspensión: los moluscos se colocan colgados de cabos amarrados verticalmente a una estructura o soporte, mediante distintos procesos o utensilios: los mejillones se envuelven con una fina malla, las ostras se pegan con cemento rápido, las vieiras se cuelgan por el agujero practicado en la oreja de la concha y también se pueden utilizar cestas ostrícolas enganchadas a las cuerdas. Se utiliza para el cultivo de moluscos epibiontes y permite que permanezcan constantemente sumergidos.

En función del tipo de estructura de soporte al que se atan las cuerdas podemos distinguir:

- Viveros fijos: Es un armazón formado por listones o un emparrillado que sobresale de la superficie del mar y se levanta sobre una serie de estacas que están fijas al fondo. Del armazón cuelgan las cuerdas para el cultivo vertical de moluscos. Este sistema se utiliza en bahías y estuarios tranquilos, de poca pendiente y escasa profundidad, con corrientes débiles y escasos coeficientes de marea. Se usan, sobre todo, en el Mediterráneo, en el Atlántico no resultan útiles por la diferencia de los niveles de marea.
- Viveros flotantes: La estructura que soporta las cuerdas es un emparrillado o cabos horizontales que van armados sobre un sistema de flotación construido con diversos materiales: madera, poliespan, poliéster, hierro, etc.
    - Bateas o balsas: el emparrillado es similar al usado en los viveros fijos y va armado sobre un sistema de flotadores. Es originario de Japón pero en las rías gallegas se fue transformando hasta que en la actualidad el emparrillado es de vigas de eucalipto y los

flotadores son grandes bidones de hierro recubiertos de poliéster. Los lugares más apropiados para su colocación son aguas abrigadas, con un perfil de costa recortado, bastante profundidad y grandes oscilaciones de marea.



Figura 1. Batea de engorde de *Ostrea edulis,* utilizando cestas ostrícolas, en la Ría de Vigo.

- Palangres de cultivo o "long-line": consiste en una serie de boyas de plástico, poliéster, polietileno o barriles de madera, unidos por cabos longitudinales dispuestos horizontalmente respecto a la superficie del agua. A estos cabos se sujetan otros verticales que soportan los cultivos. Pueden ser de fondo o de superficie. Gracias a su elasticidad se pueden utilizar en lugares abiertos y expuestos a fuertes vientos, olas y corrientes.

- Parques de cultivo: Parcela en la zona marítimo-terrestre donde se realiza el cultivo horizontal de moluscos en régimen intensivo en la franja entre pleamar y bajamar. Se trata de un cultivo sobreelevado en parrillas, también llamadas mesas ostrícolas, unas estructuras de hierro de unos 0,5 m de altura sobre las que se sujetan los sacos o *poches* que contienen las ostras desde que se "siembran" hasta su recolección. Los sacos están sujetos con gomas y ganchos por un lado para evitar que el mar o el viento los tiren al suelo fangoso donde las ostras morirían en pocos días. La zona donde está instalado el cultivo es intermareal, es decir, que las parrillas quedan cubiertas por el agua o totalmente al descubierto dos veces cada día. Por lo tanto, las ostras viven sujetas al ritmo de las mareas y todos los días del año pasan varias horas

sin agua, lo que les obliga a desarrollar un potente músculo que las mantenga cerradas.

- Criaderos comerciales (*hatcheries*): Es una instalación en tierra en la que se actúa sobre los progenitores para obtener animales en su primera fase vital, post-larvas en los moluscos.

Algunos de estos métodos presentan problemas como depredadores, patologías o estacionalidad en los ciclos reproductivos. Estos problemas impiden que la cantidad de semilla sea suficiente para la demanda del mercado por lo que se debe producir en *hatcheries* o criaderos mediante técnicas adecuadas de acondicionamiento de reproductores y cultivo intensivo de larvas y post-larvas; así se pueden producir estos ejemplares de pequeño tamaño fuera de las épocas de producción natural y llevar a cabo un control de la calidad de las larvas (Fernández, 1991a).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.2 ACONDICIONAMIENTO DE MOLUSCOS BIVALVOS.

El acondicionamiento es el conjunto de procesos realizados sobre los reproductores para conseguir la madurez sexual fuera, tanto temporal como espacialmente, de su ambiente natural. Es fundamental para contar con larvas para el cultivo fuera de la época natural de puesta (Fernández, 1991a).

Los objetivos del acondicionamiento de reproductores de bivalvos son maximizar la fecundidad de los progenitores mientras se mantiene la calidad de los huevos y la viabilidad larvaria (Utting y Millican, 1997). Durante el acondicionamiento se manipula el ambiente físico y la nutrición de los reproductores para iniciar el desarrollo gonadal y la gametogénesis.

En el acondicionamiento los reproductores son sometidos a unas condiciones concretas, que varían según la especie, en instalaciones controladas, con el fin de alargar el período de madurez sexual o de forzar dicha madurez para poder disponer de larvas durante un período más largo y en cualquier época del año. Se trata de un procedimiento a través del cual los criaderos pueden ampliar su ciclo productivo sin tener que depender del período, relativamente corto, durante el cual los adultos de la especie de interés portan gametos maduros cuando se encuentran en el mar. Las técnicas se basan fundamentalmente en mantener los reproductores en agua de mar a la temperatura ideal de gametogénesis y en suministrarles una alimentación adecuada que cubra las necesidades energéticas del proceso de gametogénesis (Fernández, 1991a). Las condiciones de temperatura y alimentación variarán según la especie a acondicionar por lo que es muy importante conocer previamente la biología y el metabolismo del animal, así como sus patologías para evitar problemas de mortalidad y enfermedades durante el proceso.

Es preciso también realizar una cuidadosa selección de los reproductores, empleando ejemplares jóvenes (entre 2 y 3 años) de rápido crecimiento y libres de patologías; pueden proceder de la pesca en bancos naturales o de cultivo por lo que, cuando se sacan los adultos del mar y se llevan al criadero necesitan una limpieza cuidadosa con un cepillo metálico o un cuchillo para eliminar todos los epibiontes y los sedimentos adheridos (Helm y Bourne, 2004). Una vez limpios, es necesario medirlos (longitud) y determinar la clase de edad a la que pertenecen. A continuación se agrupan por tallas y se reparten equitativamente en los tanques de acondicionamiento.

El sistema de acondicionamiento consta de tanques de material plástico, polietileno o poliéster con fibra de vidrio, donde se colocan los reproductores; la capacidad de los tanques dependerá del número y la talla de los reproductores a acondicionar. Cuando se acondicionan bivalvos que no requieren sustrato, como las ostras, los reproductores se sitúan en bandejas separadas del fondo del tanque. Los tanques se conectan a un circuito abierto de agua de mar con un flujo de agua controlado, de esta manera la renovación de agua es constante evitando

así problemas de deficiencia de oxígeno. Es necesario controlar el caudal del agua para que todos los tanques tengan el mismo flujo, éste se establece entre 2 y 5 litros por individuo y por hora. Se pueden usar sistemas de recirculación de agua pero podría ser menos conveniente desde que se utiliza el fitoplancton como un componente valioso de la dieta de los reproductores. La circulación se asegura colocando la entrada de agua en el fondo y el desagüe en superficie en el extremo opuesto o al revés. Las tuberías del circuito deben de ser también plásticas para evitar la corrosión. Así mismo, se debe controlar la salinidad del agua ya que puede afectar al desarrollo de los ovocitos, la maduración de los óvulos y la consiguiente viabilidad larvaria (Muranaka y Lannan, 1984).

En estas condiciones los reproductores tienen controlada la temperatura para acelerar o retardar el desarrollo gonadal hacia el estado de madurez (Lannan *et al.*, 1980) y además se controla el intercambio de agua y la alimentación. El aumento de la temperatura del agua inicia la gametogénesis pero la fertilidad de los bivalvos y la calidad de los huevos producidos se mejora cuando se le añaden suplementos algales a los reproductores, esto está relacionado con la utilización de las reservas de glucógeno para la síntesis *de novo* de lípidos durante la vitelogénesis (Gabbot, 1983).

La principal fuente de alimento para los reproductores, durante el acondicionamiento, proviene normalmente de cultivos polialgales (*bloom* natural) complementados con cultivos monoespecíficos de algas unicelulares no tóxicas, con un tamaño entre 3 y 30 µm, de composición bioquímica adecuada, producidos en la propia instalación. Las especies más utilizadas son: *Isochrysis aff galbana (T-iso), Tetraselmis suecica, Skeletonema costatum, Phaeodactilum tricornutum, Chaetoceros calcitrans y Thalassiosira pseudonana*. Para la elaboración de una dieta es necesario conocer previamente los requerimientos nutritivos de la especie, es decir, la cantidad y calidad del alimento necesario para cada especie. Los requerimientos nutritivos esenciales son: proteínas, las cuales utiliza para su mantenimiento y crecimiento y pueden utilizarse como reserva energética para actividades metabólicas en individuos que están en proceso de maduración sexual; hidratos de carbono, que son el combustible metabólico más importante ya que el glucógeno es la principal fuente de reserva en adultos y es utilizado fundamentalmente para la gametogénesis y su degradación da lugar a azúcares sencillos que el animal va a utilizar para fines energéticos y biosintéticos; y los lípidos, que son muy importantes en los procesos de producción de energía y como fuente de ácidos grasos esenciales y además se encargan del transporte de las vitaminas liposolubles. Los lípidos neutros o triglicéridos se emplean como reserva metabólica y los lípidos polares o fosfolípidos tienen función estructural.

Las mejores dietas son las que tienen un alto contenido en PUFAs, ác. eicosapentanoico 20:5 (n-3) y ác. docosahexaenoico 22:6 (n-3) ya que la mayoría de los bivalvos adultos son incapaces de sintentizarlos a partir de precursores de cadena corta. Para

asegurarse de que se suministra una dieta óptima en calidad, los suplementos algales deberían contener siempre un mínimo de 2 ó 3 especies de microalgas.

Una vez establecida la ración de alimento (entendida como el número de células de fitoplancton por animal y día) que se va a suministrar al cultivo, se calcula el volumen de cultivo de algas que hay que dar diariamente para cubrir las necesidades alimenticias de todos los animales acondicionados. El cálculo de este volumen se hace mediante el recuento del número de células del cultivo algal. Una vez conocido el volumen de fitoplancton necesario, se extrae del cultivo y se deposita en un tanque limpio al que se le conecta una bomba dosificadora (con el flujo regulado para que los animales dispongan de alimento durante todo el día) que pasará el alimento al sistema de circulación del agua que va a los tanques de los reproductores.

En el caso de las ostras, por ser larvíparas, es necesario instalar en los desagües de los tanques un sistema de filtros con el tamaño de malla adecuado, que permita la recogida de las larvas una vez sean expulsadas de la cavidad paleal. Conviene recoger las larvas tan pronto como sea posible después de la expulsión para evitar la contaminación de las mismas con materia fecal de los adultos presente en el agua. Una vez recolectada la puesta se hace un recuento y se las distribuye en tanques de cultivo (Helm y Bourne, 2004).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.3 LA OSTRA PLANA (*Ostrea edulis* Linneo, 1758).

1.3.1 CLASIFICACIÓN, HÁBITAT Y DISTRIBUCIÓN.

CLASIFICACIÓN:

La ostra plana u ostra europea (*Ostrea edulis* Linneo, 1758) es un molusco bivalvo perteneciente a:

Clase Bivalvia, Linneo 1758.

Orden Pterioidea, Newell, 1965.

Familia Ostreidae, Rafinesqui, 1815.

Género Ostrea, Linneo, 1758.



Figura 2. Aspecto morfológico de *O.edulis.*

DISTRIBUCIÓN:



Es una especie autóctona de las costas de Europa; se distribuye desde Sebastopol, en el Mar Negro, hasta los 65º de latitud norte sobre las costas de Noruega y su límite meridional es el cabo Agadir, en Marruecos. Según Ranson (1951), *O. edulis* hizo su aparición al mismo tiempo y en todos los lugares por mutación de la especie miocenapliocena, *Ostrea lamellosa* que poblaba los mares en la época Cuaternaria; se puede considerar que era una especie muy común (Polanco Torres y Corral, 2002).

Podemos encontrar *O. edulis* a lo largo de la costa oeste de Europa, desde Noruega a Marruecos en el Atlántico Noreste y en la cuenca

del Mediterráneo y Mar Negro. También se encuentran poblaciones naturales en la costa este de Norte América desde Maine a Rhode Island, como resultado de introducciones internacionales que se hicieron en los años 40 y 50. Es una especie introducida y cultivada en Norteamérica, Australia y Japón (Laing *et al*., 2005).

HÁBITAT:

O. edulis suele localizarse cerca de la costa, en la zona infralitoral, en fondos que están siempre sumergidos, hasta una profundidad de 30 o 40 metros. También se encuentran ostras en la zona intermareal donde las condiciones ambientales son favorables y estables, pero son casos aislados. La ostra plana vive generalmente en ensenadas de aguas claras, bahías y estuarios. Es importante que las corrientes marinas sean débiles para permitir la fijación de la larva. A la hora de establecer los cultivos es necesario considerar diversos factores ambientales que pueden determinar el éxito o fracaso del cultivo.

Salinidad. Se considera idóneo para esta especie un nivel de salinidad entre 25 a 30‰. Es muy importante que la salinidad no baje de un 15 ‰ para que las microalgas que sirven de alimento a esta especie puedan desarrollarse.

Sedimentos marinos. Es importante que el nivel de sedimentos sea mínimo. Las áreas con aguas profundas y fondos rocosos son las idóneas.

Polución. Obviamente la contaminación del agua debe ser mínima. Especialmente dañino es el efecto de los efluentes de refinerías, industrias pesadas, el cloro o el cobre. Los herbicidas y pesticidas agrícolas son muy perjudiciales para las larvas.

Presencia de animales. La existencia de animales que puedan competir por el sustrato como ascidias, balanos, crepídulas o pomatoceros es un factor obviamente negativo para el establecimiento de ostras. También las zonas con poblaciones abundantes de parásitos como el gasterópodo *Odostomia*, el anélido *Polydora*, el copépodo *Mytilicola* o el cangrejo *Pinnotheres* son negativas para el éxito del cultivo.

Ostrea edulis ha demostrado gran adaptabilidad a diferentes ambientes con un amplio rango de condiciones (Loosanoff, 1952; Korringa, 1976a). Existen varias razas fisiológicas, adaptadas a diferentes condiciones ambientales y la diferenciación genética ha sido demostrada a lo largo de las costas europeas por Korringa en 1947 (Ruíz Blanco, 1992). Por ejemplo, en España encontramos una de las razas de más baja temperatura (la temperatura requerida para el desove son 12-13^{o}C) mientras que en los fiordos de Noruega la temperatura necesaria para el desove es 25^{o}C y en las costas de Francia la gametogénesis sólo se inicia con 10^{o}C y el desove sólo se produce con 14-16^{o}C (Polanco Torres y Corral, 2002; FAO, 2004).

1.3.2 DESCRIPCIÓN ANATÓMICA.

La ostra plana es un molusco bivalvo, de 5 a 10 cm. de longitud. La concha es pesada y quebradiza. Tiene forma circular o de pera, con la superficie áspera y escamosa. La concha es irregular y tiene un pico ganchudo que está ornamentado con una delicada foliación. Las dos valvas poseen formas diferentes, subcircular o circular inequivalva. La valva izquierda o inferior es bastante cóncava y es por la que el animal se fija al sustrato, puede ser verde pálido o castaño con marcas rosas, verdes o púrpuras y está esculpida por crestas concéntricas que parten del umbo y se hacen más patentes en los márgenes y con nervios o estrías bastante profundas; la valva derecha o superior es plana y tiene los bordes más ásperos y actúa como tapa sentándose dentro de la izquierda, es gris-marrón con líneas concéntricas o hendiduras y, a veces, con estrías radiales o nervios. Las superficies interiores de las valvas son suaves, no se aprecian impresiones musculares ni seno paleal, y normalmente son nacaradas, blancas o gris-azuladas, a menudo con zonas más oscuras. Las valvas se mantiene juntas gracias a un ligamento elástico en la parte más estrecha, el ligamento es marrón oscuro, está unido a una cavidad triangular y se extiende marginalmente cubriendo el área central que es bastante extensa (Ruíz Blanco, 1992).

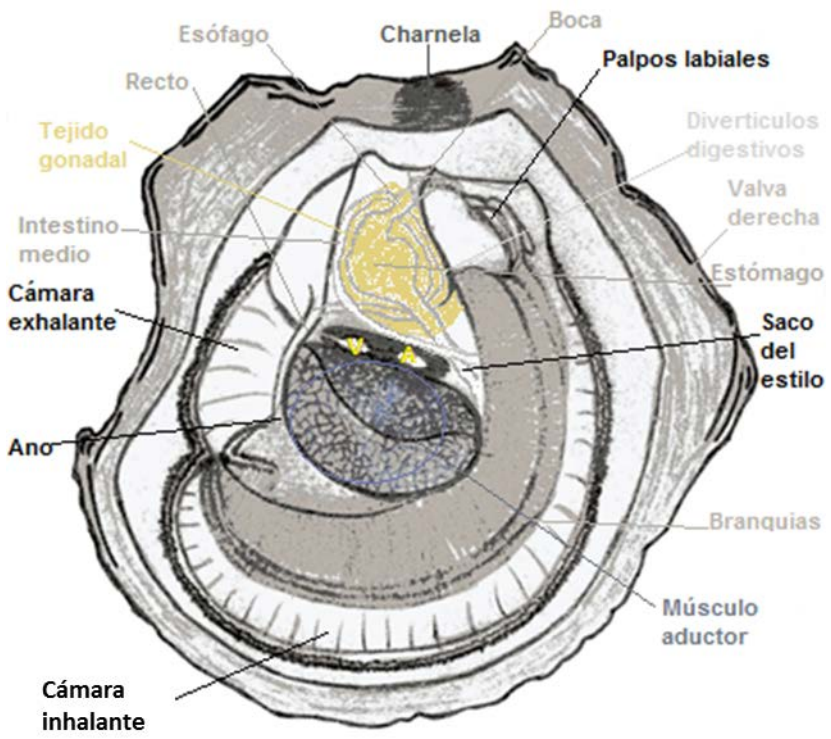


Figura 3. Anatomía de *Ostrea edulis*. Basada en dibujo de Yonge (1926).

La charnela, desprovista de dientes en la fase adulta, junto con el ligamento se encarga de unir las dos valvas en la zona dorsal; el ligamento es córneo elástico de color marrón oscuro y se encuentra incrustado en una depresión situada en el extremo anterior de las valvas. La

glándula del biso en las ostras se ha atrofiado y el pie es un órgano rudimentario. La masa corporal del animal está localizada entre el músculo aductor y la charnela y es de color cremoso a pardo-amarillento y está cubierta por un repliegue del manto que la separa de la cara interna de la concha.

El músculo aductor anterior ha desaparecido, así que el posterior se ha transformado en un gran músculo central que sirve para cerrar las valvas contra la tensión del ligamento. Este músculo está formado por dos tipos de tejido muscular, la porción anterior está formada por fibras estriadas y provocan el cierre rápido de las valvas, y la porción más pequeña está formada por fibras musculares lisas que permite un cierre de valvas lento y sostenido. La impresión muscular se encuentra situada en el centro de la valva y no presenta pigmentación.

Generalmente la concha en su parte externa es de color blanco sucio, amarillento o color arena, con bandas concéntricas café claro o azulinas-violáceas en la valva derecha pero la coloración de la concha depende en gran parte del sustrato y del medio. La concha está constituida principalmente por carbonato cálcico en forma de calcita (95-98%) embebido en una matriz orgánica, conquiolina, de naturaleza proteica y glúcidos (Walne, 1980).

La estructura interna de la concha se distribuye en tres capas:

- Periostraco, la capa más externa, de naturaleza orgánica, es delgado y de color marrón oscuro. Formado por conquiolina, una sustancia orgánica parecida a la quitina.
- Mesostraco u ostraco, es la capa intermedia y está formado por conquiolina más carbonato cálcico, que se presenta como cristales con una estructura a base de largos prismas perpendiculares a la superficie o bien se organizan en una mezcla de estructuras prismáticas y laminares.
- Hipostraco, la capa interna, formada por hojas de láminas de calcita embebidas entre membranas muy delgadas de matriz orgánica; la calcita cristaliza en forma de aragonito por lo que se forma el pseudonácar. Determina el crecimiento en espesor de la concha ya que aumenta en toda su superficie.

Las diferentes partes del epitelio del manto van a segregar las distintas partes de la concha. El epitelio del manto es una capa celular de la superficie de la piel con función secretora de material tanto orgánico como inorgánico en diferentes proporciones. El surco marginal (en el borde externo) forma el periostraco; el borde externo del manto origina la capa prismática y la capa más interna la forma la superficie restante del manto.

La concha contiene el cuerpo del animal, que puede variar de color desde el amarillento cremoso hasta el gris pálido. Las partes blandas están recubiertas por el manto en forma de doble repliegue cutáneo, que lo envuelven y lo separan de la capa nacarada de la concha. El manto además de segregar la concha también posee función sensorial y puede iniciar el cierre de las valvas en respuesta a condiciones desfavorables en su entorno y además puede regular la entrada y salida del agua en la cavidad corporal.

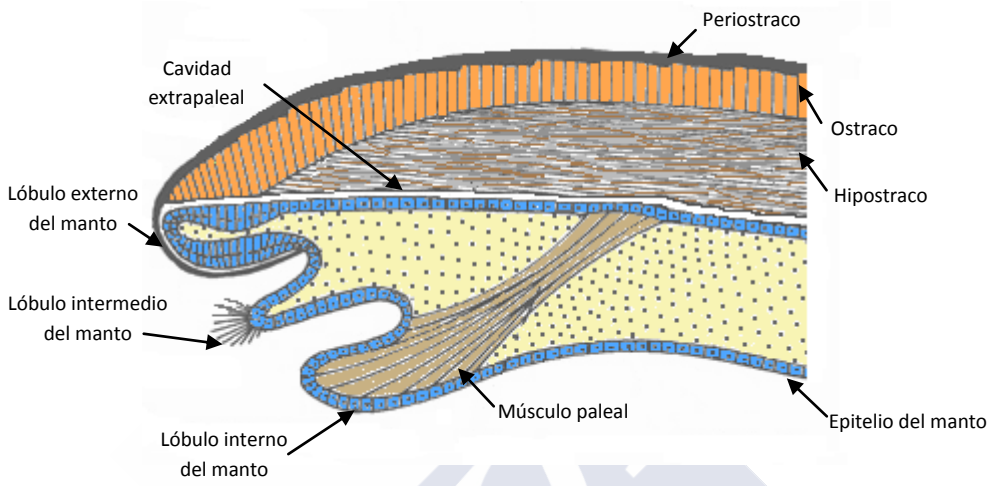


Figura 4. Partes del manto y la concha.
http://www.asturnatura.com/moluscos/bivalvos.html

El manto es una capa fina de músculo conjuntivo que contiene músculos, vasos sanguíneos y nervios recubierto de epitelio unicelular, y que cuelga a ambos lados del cuerpo, por lo que en la región ventral forma una cámara que está siempre llena de agua, es la *cavidad del manto*. Los bordes del manto están libres, pero en la zona del extremo ventral se unen para formar un conducto, que hará las funciones de cloaca. En la región cefálica los bordes del manto también están soldados formando así el capuchón cefálico que recubre la boca y los palpos labiales. En la región ventral, en cambio, los bordes están libres siguiendo el contorno de la concha. El espacio libre entre los dos lóbulos del manto forma la cavidad paleal y son las branquias las que dividen esta cavidad en dos, la cámara inhalante o parte ventral y la cámara exhalante o parte dorsal.

Los bordes del manto, casi siempre pigmentados, son libres, foliosos y plegados y finalizan en un cordón muscular provisto de tentáculos sensitivos. Tienen dos pliegues que forman tres bordes, son los bordes externo, intermedio e interno. El borde externo es el que se encarga de la formación de la concha, el borde medio tiene un papel sensorial ya que posee numerosos tentáculos y el borde interno, que es el más desarrollado, es musculoso y también presenta tentáculos y es el encargado de regular la entrada del agua en la cavidad paleal ya que forma una especie de velo que limita el paso del agua (Helm y Bourne, 2004).

Debajo del manto se encuentran las branquias típicas de los moluscos, utilizadas para la respiración, se llaman *ctenidios***,** y constan de un eje longitudinal, que posee los nervios, los músculos y los vasos sanguíneos y un gran número de expansiones filiformes laterales, en posición alterna a la de los filamentos del lado opuesto. Posee una varilla esquelética quitinosa para impedir que los filamentos se colapsen. Están constituidas por cuatro láminas branquiales plegadas y ciliadas, que se extienden, soldadas de dos en dos a la masa visceral, desde la boca hasta cerca del punto de fusión de los bordes del manto. Las láminas branquiales están formadas por pequeños filamentos ciliados (filibranquias), con articulaciones interlamelares en forma de V interconectados, que se reúnen por grupos y dejan entre sí poros por los que penetra el agua durante la filtración y se abren a unos espacios libres, las *lagunas acuíferas*. En estas branquias se pueden diferenciar dos tipos de filamentos: los frontales, que se encargan de llevar las partículas capturadas en la superficie en dirección descendente hasta el surco alimenticio, y las laterales, que producen la corriente de agua que atraviesa la branquia y que cumple la función respiratoria.

Las branquias se localizan en la cavidad paleal, a ambos lados de la masa visceral, y mantienen su posición mediante una membrana dorsal y otra ventral, de tal modo que las branquias dividen la cavidad paleal en dos cámaras, una superior y otra inferior. El agua penetra en la cámara inferior o inhalante por el extremo posterior del animal, entre los márgenes del manto, asciende, y fluye entre los filamentos de las branquias a los espacios interlamelares donde se realiza el intercambio gaseoso atravesando los ctenidios, alcanza la cámara dorsal o exhalante y sale al exterior por una abertura situada en la parte posterior. La circulación del agua en la cavidad paleal se lleva a cabo por el batido de un gran número de cilios que se encuentran recubriendo los filamentos del ctenidio. Los vasos sanguíneos discurren a lo largo del eje del ctenidio. El vaso aferente, que proviene del corazón, aporta la sangre desoxigenada y el vaso eferente se lleva la sangre oxigenada de nuevo al corazón. La sangre circula entre los filamentos por difusión, formando una corriente contraria a la del agua, lo que maximiza el intercambio de gases.

Las partículas destinadas a la ingestión son transportadas y seleccionadas, las más pesadas se desvían y pasan a formar parte de las pseudoheces, y las más adecuadas para la alimentación entran en la cavidad bucal por medio de los palpos, situados en el extremo anterior.

En el extremo anterior, hay dos pares de lenguas, llamados *palpos labiales*, que rodean la boca y facilitan la introducción de alimento.



Figura 5. Palpos y branquias en *O. edulis*.

El aparato circulatorio es muy simple, su función es distribuir por todo el cuerpo el oxígeno y el material alimenticio procedente de la digestión, y recoger el anhídrido carbónico y los productos de desecho. Es un sistema abierto formado por un corazón tricameral, formado por dos aurículas laterales y un ventrículo, situado en la región dorsal, muy cerca del músculo aductor, envuelto por un saco transparente, el pericardio. Las aurículas están unidas y las aberturas branquiales son relativamente largas. Las aortas, una anterior y otra posterior salen del ventrículo y expulsan sangre, que se distribuye por todo el cuerpo por lar arterias y arteriolas. El sistema arterial termina en espacios libres en el tejido conjuntivo, son los senos lagunares (lagunas); de estos senos parten las venas antes de llegar al seno ventral, del que va al órgano excretor "órgano de Bojanus" o riñón, donde se purifica y pasa a las branquias por medio de los vasos branquiales aferentes, que llevan la sangre a las branquias, donde se oxigena, y posteriormente vuelven al corazón. El sistema venoso consta de una serie vaga de senos de pared fina a través de la cuales vuelve la sangre al corazón.

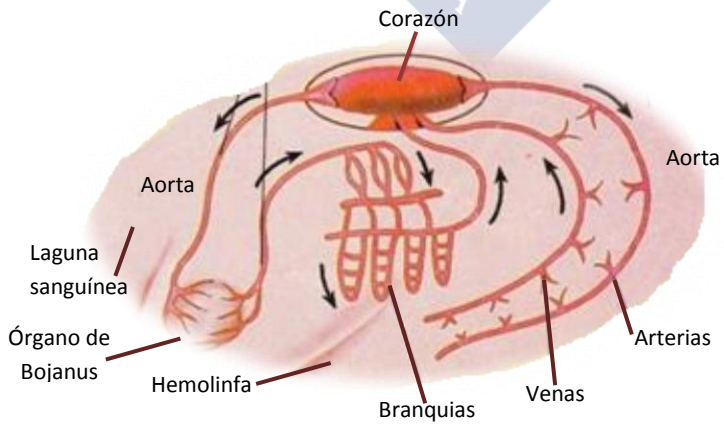


Figura 6. Sistema circulatorio abierto de las ostras.
http://circulasv.blogspot.com.es/2012_09_01_archive.html

El aparato excretor está formado por las glándulas pericárdicas y dos riñones, en forma de U, situados por debajo del corazón. La parte glandular de cada uno de los túbulos que forman los riñones se abre a la cavidad pericárdica, allí vierten las sustancias de desecho las glándulas pericárdicas, mientras que, por el otro lado, desembocan en la cavidad paleal a través de los dos poros urinarios.

El sistema nervioso es un sistema de tipo ganglionar, no existe un verdadero centro nervioso, por lo que la respuesta a determinados estímulos se produce a nivel local o ganglionar. Está constituido por tres pares de ganglios principales: los cerebro-pleurales, viscerales y pediales. Los ganglios cerebro-pleurales se enlazan entre ellos por una comisura cerebroide o central de los centros cerebro-pleurales, que están unidos a cada lado por un conectivo cerebro-paleo-visceral a los ganglios pedales y viscerales. Hay otros ganglios por el cuerpo pero menos importantes.

Los órganos sensoriales están representados por estatocistos, que son ojos sencillos repartidos por todo el borde del manto. También hay osfradios que son los órganos del sentido químico y se encuentran por toda la parte posterior del cuerpo, cerca de los ganglios viscerales, y los olfativos se sitúan a ambos lados del ano (Grasse, 1960).

1.3.3 ALIMENTACIÓN.

La ostra es un animal filtrador, con la capacidad de ingerir partículas en suspensión en el medio, son animales micrófagos que se alimentan de fitoplacton y diversas partículas orgánicas en suspensión. No obstante, el alimento más apropiado es el basado en microalgas. Estas generalmente son de los géneros *Isochrysis*, *Monochrysis*, *Tetraselmis* y *Skeletonema*.

La ostra, en la región anterior posee un orificio bucal, rodeado por dos pares de palpos labiales ciliados, que por medio de un corto esófago se une con el estómago. El estómago está totalmente encerrado en una masa de divertículos gástricos. Ya dentro del estómago se encuentra una abertura que presenta un gran saco, que contiene el *estilo cristalino*, apoyado sobre el fondo del saco estomacal, al que los cilios que recubren las paredes del saco hacen girar continuamente, y que se trata de un bastoncillo quitinoso y casi transparente de hasta 8 cm de longitud, que tiene un extremo redondeado y el otro afilado, el extremo redondeado incide en la placa gástrica del estómago. El estilo cristalino está compuesto de capas de mucoproteínas y tiene un doble papel en la digestión, por un lado es un órgano de trituración del alimento y por otro se le han detectado actividades amilasa y laminarinasa, que actúan extracelularmente en el pH ácido del saco del estilo y del estómago, ya que libera enzimas capaces de transformar el almidón en azúcares más fáciles de digerir. Del estómago salen por un lado los conductos que desembocan en la glándula digestiva o hepatopáncreas y por otro el

intestino, que es muy curvo y que presenta un complejo sistema de pliegues en la superficie interna, para finalizar en el recto y luego el ano que desemboca entre dos pares de palpos labiales del borde dorsal del músculo abductor en la cámara exhalante.

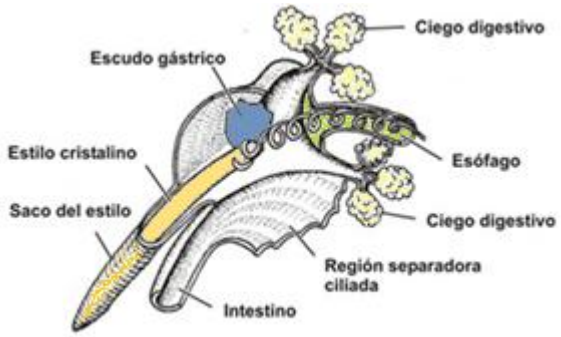


Figura 7. Estructura detallada del sistema digestivo.
http://www.asturnatura.com/moluscos/bivalvos.html

La ostra plana posee dos vías de asimilación del alimento:

1. Absorción directa de las sustancias disueltas en el agua.
2. Ingestión de partículas en suspensión.

Las partículas minerales y orgánicas se filtran y son retenidas en la superficie de las branquias recubiertas de mucus y los cilios branquiales las conducen hacia los palpos labiales. Después se ingieren y en el estómago se digieren con la ayuda del estilete cristalino. Al mismo tiempo se realiza una digestión intracelular en los divertículos digestivos, con la cual los residuos pasan al intestino y son evacuados por el ano, formando las heces. En ocasiones, las branquias y los palpos labiales pueden rechazar partículas recubiertas de mucus, ya sea por ser demasiado gruesas o por ser demasiado abundantes, y caen sobre el manto y son expulsadas en forma de pseudoheces a la cámara inhalante, que expulsan de la cavidad paleal con un vigoroso batido de valvas mientras que los deshechos y verdaderas heces son expulsadas a la cámara exhalante.

Una ostra puede filtrar cerca de 250 litros de agua al día. La velocidad de bombeo parece que no depende de la temperatura, sino más bien de la concentración de ciertas sustancias en el agua.

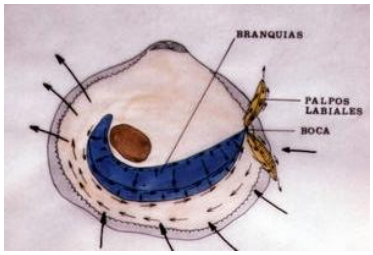


Fig. 8. Circulación del agua y los alimentos

1.3.4 REPRODUCCIÓN.

La reproducción de *Ostrea edulis* es sexual, sigue un ciclo reproductor estacional. Es una especie hermafrodita rítmica consecutiva protándrica, alcanzan la primera madurez sexual como macho, con una sexualidad consecutiva rítmica, es decir, los reproductores producen gametos masculinos o femeninos, los gametos no maduran simultáneamente. Según Marteil (1976), la ostra plana será macho en el otoño que sigue a su captación del medio como juvenil, los espermatozoides desaparecen y se empiezan a desarrollar las ovogonias en la siguiente estación reproductiva, en la que la ostra será hembra, después volverá a una nueva fase macho y tras ella, una segunda fase hembra, y así sucesivamente, esta alternancia continúa durante toda la vida. La reproducción en las costas gallegas se extiende desde el principio de la primavera hasta noviembre e incluso diciembre, al principio y al fin de la estación reproductora la temperatura no es mayor de 12-14°C.

Los ostreidos tienen unos órganos reproductores estructuralmente muy simples que no difieren entre sexos, así que el sexo actual sólo se puede diferenciar durante la época reproductora en las gónadas maduras (Orton, 1920). Se trata de un aparato reproductor muy simple formado por las gónadas y los conductos evacuadores. La gónada que, cuando está completamente desarrollada aparece como un órgano tubular ramificado y fusionado por el lado dorsal, formando una estructura continua que envuelve la glándula digestiva y demás órganos. En los individuos sexualmente maduros, la gónada se distingue fácilmente por su color cremoso y por contraste con el color más oscuro de la glándula digestiva y ocupa una parte importante de la masa corporal; sin embargo, durante el período de reposo sexual es una estructura difusa que apenas se distingue. Antes de que comience el desarrollo de los productos sexuales, la gónada consiste en una serie de túbulos cuya pared externa está revestida de epitelio ciliado, mientras que la pared opuesta está revestida de una capa doble o triple de ovogonias y espermatogonias (Cole, 1942).

Las gónadas son pares y se unen en su línea media de forma acinosa y ramificada, por lo que al madurar ocupan una gran parte de la masa visceral. Los acinos están repletos de canales finos y cortos que se unen para formar canales más importantes hasta llegar a un único conducto evacuador o gonoducto. El gonoducto carece de estructuras musculares por lo que la expulsión de los gametos maduros se realiza por el movimiento de los cilios de las células que los tapizan. Los productos sexuales se descargan a través del poro genital, situado en la cámara suprabranquial.

La ausencia de diferencias aparentes entre sexos, aparte de la presencia de huevos o esperma, muestra el alto grado de capacidad para cambiar de sexo que tiene el organismo. Las primeras fases de producción de óvulos o esperma pueden ocurrir simultáneamente con la fase final del estado precedente. El estado de macho puede alcanzar la madurez casi inmediatamente después del desove como hembra, en unos pocos días (Maneiro, 2008).

El desarrollo gonadal de *Ostrea edulis* comienza después de una fase indiferenciada a la que sigue otra de espermatogénesis. Las espermatogonias se dividen y forman mórulas de espermatocitos, los cuales por posteriores divisiones dan lugar a unas bolas de espermatozoides maduros (mórulas). Al mismo tiempo, se pueden reconocer ovogonias en las primeras fases de su desarrollo (etapa de "macho inmaduro"). Posteriormente los conductos se llenan de esperma maduro mientras que en la parte más interna de los folículos continúa una proliferación activa de espermatogonias (Cole, 1942).

La fase siguiente es de transición de macho a primera fase de hembra. Las mórulas de esperma están en el lumen de los conductos y los folículos y las paredes de estos están recubiertos por hemocitos (Helm y Bourne, 2004).

La primera fase de hembra ocurre a la vez que la maduración como macho. Los ovocitos siguen creciendo y los folículos siguen expandiéndose hasta llegar a fase de hembra totalmente desarrollada. Los folículos están llenos de ovocitos maduros ya listos para el desove. El proceso continúa con la proliferación de las mórulas de esperma maduro. Igual que en el primer desarrollo, al madurar las bolas espermáticas ya están las ovogonias madurando en las paredes del folículo.

Los folículos de una gónada completamente desarrollada están constituídos casi por completo por células germinales en diferentes estadíos de formación y células vesiculares entre los folículos. Al final del desarrollo sexual la gónada adulta se ve como una masa blanquecina de contorno indefinido, incluida entre los divertículos digestivos por la parte inferior y la superficie del epitelio por encima, recubriendo. Los productos genitales maduros son drenados por un canal que termina en una cloaca común con los riñones, que desemboca al exterior por un orificio genitourinario situado encima de las branquias (Galtsoff, 1964).

El tamaño de las células vesiculares es mayor que en otras especies de ostreidos. También los ovocitos son mucho mayores (100-130 µm) ya que contienen mayores cantidades de sustancia vitelina (Polanco Torres y Corral, 2002).

La puesta y el subsiguiente desarrollo de las fases larvarias tienen características poco frecuentes. Los ovocitos y el esperma van a parar, a través de los poros genitales, a la cavidad exhalante. Cuando la ostra desova como macho, la corriente exhalante dispersa el esperma en el mar. Cuando lo hace como hembra, los huevos no pasan a la corriente exhalante sino a las lagunas acuíferas de las láminas branquiales; desde ellas son impelidas, a través de los ostiolos, en contra de la corriente a la cavidad inhalante del manto. *O. edulis* es un bivalvo larvíparo, es decir, no expulsa los huevos al mar como lo hacen la mayoría de los bivalvos sino que los huevos permanecen en la cámara inhalante las primeras fases del desarrollo larvario, razón por la que contienen mayores cantidades de sustancia vitelina. Durante este tiempo los ovocitos son fecundados por el esperma que entra con la corriente alimenticia y se transforman en larvas, con la protoconcha completamente desarrollada antes de ser

expulsadas al mar donde completarán su desarrollo. El tiempo de incubación de las larvas de la ostra europea es de una o dos semanas en las que las larvas completan su desarrollo dentro de la cavidad del manto (Helm y Bourne, 2004). Durante su incubación, las larvas yacen libremente en la superficie de las branquias. Las larvas viven una gran parte de su vida en la cavidad paleal; inicialmente son blancas pero gradualmente, según avanza el desarrollo larvario, el color se va oscureciendo. Parece que la prolongada retención de las larvas sólo tiene un papel protector ya que, cuando se extraen los huevos fecundados de la cavidad del manto, estas son capaces de desarrollarse normalmente en recipientes con agua de mar.

Una hembra de ostra puede poner desde 500.000 a 1.000.000 huevos. Después de 8 a 10 días tras la fecundación pasan al estadío de larvas que abandonarán la cámara inhalante cuando alcancen la etapa de larva veliger y serán expulsadas al agua circulante.

Hay que tener en cuenta que, en las especies en las que la incubación es interna, en la cavidad paleal materna, las larvas son retenidas hasta poco antes del término de su vida como tales, esto favorece la supervivencia larvaria y disminuye la mortalidad natural. Esto permite un gran ahorro metabólico materno al producir un número menor de huevos, pero también tiene una parte negativa ya que limita su extensión.

El ciclo sexual de *O. edulis* se muestra en la Figura 9, se trata de un desarrollo indirecto, por medio de fases larvarias de vida pelágica con una duración de tres o cuatro semanas en condiciones normales, que se nutren esencialmente de nanoplancton vegetal. Después de la fecundación y la posterior segmentación del huevo a partir del propio vitelo y tras la gastrulación aparecen las larvas. El desarrollo larvario de la ostra se subdivide en varias fases. La primera, se desarrolla dentro de la hembra mientras la segunda ya tiene lugar en el medio marino, es la fase planctónica, y la tercera fase es la de fijación, pasando de la vida planctónica a la vida sésil, bentónica.

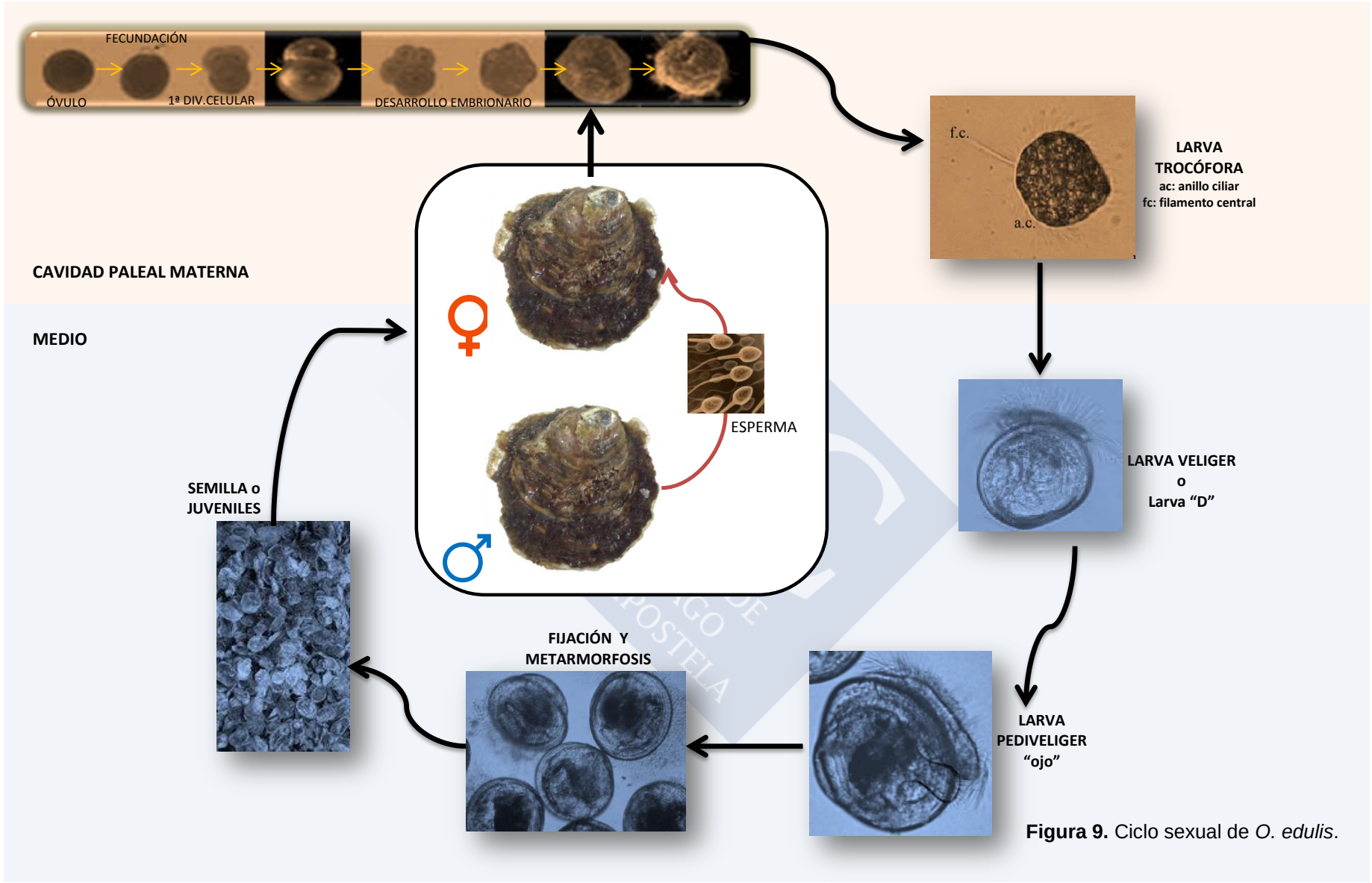
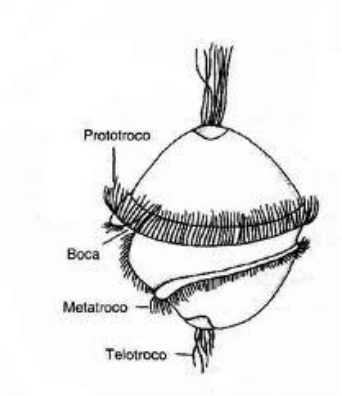


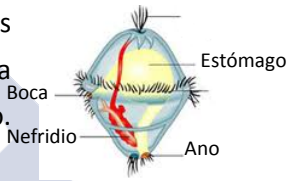
Figura 9. Ciclo sexual de *O. edulis*.

Las fases del desarrollo larvario son las siguientes:

1. LARVA TROCÓFORA: Un día después de la fecundación ya está formada. Es de forma ovalada, de un tamaño entre 60-80 µm y de vida libre pero sigue alimentándose principalmente del vitelo ya que el aparato digestivo no está aún bien diferenciado, la boca se abre cerca del centro de la larva correspondiendo con el blastoporo embrionario; le sigue una faringe corta que da al estómago con forma de saco, le sigue un pequeño intestino y el ano. Posee una simetría bilateral y forma de peonza. En el extremo superior posee un penacho de cilios que facilita la natación y también dos bandas de cilios en la zona media, un anillo de cilios situados por encima de la boca llamada Prototroca y otro anillo por debajo de la boca, la Metatroca; la vibración de estos cilios contribuye al movimiento de la larva. Durante esta etapa larvaria aparece la glándula de la concha.



LARVA POSTTROCOFORA: Se forma dos días después de la fecundación y no se alimenta. Comienza a diferenciarse el tubo digestivo y se desarrolla el velo. La glándula de la concha forma una concha univalva.



Polanco y Corral (2002)

2. LARVA VELIGER: Dura desde los dos a los veinte días después de la fecundación (Ruíz Blanco, 1992). El tamaño de la larva en esta fase varía de 160 a 200 µm. Tiene vida planctónica. Comienza a alimentarse del exterior. El aparato digestivo se puede diferenciar ya en esófago, estómago (ya con el saco del estilete) e intestino en forma de U. Presenta dos valvas simétricas con el borde dorsal curvado, dándole una forma similar a la letra "D", de ahí que esta fase también se conozca como "forma D". En la parte anterior posee un velo lleno de cilios que saca al abrir la concha, de ahí la gran movilidad que las caracteriza y también le sirve para la captura del alimento. Empieza a ser visible el ojo larvario lo que marca la proximidad de la siguiente etapa que se ve favorecida por el aumento de la densidad corporal, provocada por el consumo de lípidos durante esta fase, lo que provoca que la larva descienda hasta el fondo para buscar un substrato apropiado o intentar la fijación.



3. LARVA PEDIVELIGER: Comienza desde el día 20 al 29 postfecundación. Aparato digestivo completamente diferenciado. El velo comienza la regresión. El pie se desarrolla y comienza a ser funcional. Se aprecia claramente una mancha, conocida con el nombre de ojo, que indica la proximidad del fin de la metamorfosis y la fijación al sustrato.

4. PLANTÍGRADO: Aparece unos 30 días después de la fecundación. Tiene vida bentónica. La larva se va al fondo y reptando sobre el pie, busca el sustrato adecuado para su fijación. El pie contráctil alcanza el desarrollo completo, incluyendo una glándula que produce un líquido viscoso que al contacto con el agua forma unos hilos córneos muy resistentes, el biso, que aparece en esta etapa. Empieza a desarrollarse los filamentos branquiales y la actividad de la cavidad paleal. Ya se pueden diferenciar los palpos labiales.

5. FIJACIÓN: Al final de la vida pelágica se fija a un substrato sólido por el pie y empieza a reptar para explorar la superficie, libera el contenido de la glándula del biso, tumba su valva izquierda, en concreto el borde anterior, sobre el cemento que se endurece y la mantiene sujeta. Una vez ya fijada finaliza la metamorfosis segregando una concha que se extiende y se sujeta al sustrato.

La duración de la vida larvaria depende en gran parte de la temperatura. La supervivencia larvaria, en ambiente natural, ronda el 10%.

Ostrea edulis hace un gran esfuerzo reproductor ya que produce entre 500.000 y un millón de huevos por desove; los huevos que son fecundados permanecen en el interior de la ostra, liberándose las larvas planctónicas en un período entre 8-10 días. Las larvas de más de 160 µm permanecen en estado pelágico de 8 a 10 días antes de fijarse.

La ostra europea puede alcanzar un gran tamaño (más de 20 cm) y llegar a vivir muchos años, más de 20 (Helm y Bourne, 2004).

Los ciclos gonadales de los invertebrados marinos están muy influenciados por factores exógenos y endógenos, la temperatura se considera el principal factor ambiental que regula los procesos de gametogénesis y desove (Mann, 1979). Sin embargo, hay otros parámetros ambientales importantes que hay que tener en cuenta, tales como: la disponibilidad de alimento, el fotoperíodo y la salinidad.

1.3.5 ORGANISMOS COMPETIDORES Y PATÓGENOS DE *OSTREA EDULIS*.

Los animales **competidores** de la ostra plana son animales marinos que compiten por el hábitat y el nicho ecológico y como consecuencia reducen la disponibilidad del alimento y en ocasiones pueden ser la causa desencadenante de diferentes enfermedades. En las rías gallegas, los mayores competidores de la ostra cultivada en batea son las ascidias y la propia semilla del mejillón. Otros posibles competidores, aunque en menor grado son, las esponjas perforantes, generalmente pertenecientes al género *Cliona,* que forman una especie de canales o protuberancias en el interior de las valvas, volviéndolas más frágiles, y la *Anomia sp*., que es un bivalvo muy similar a la ostra que tiene las valvas muy delgadas y viven fijadas a la concha de ésta. La semilla de ostra también se ve muy afectada por el crecimiento masivo de briozoos y balanos.

La ostra plana está sometida a la depredación por algunas especies que disponen de medios para penetrar en la concha. Entre ellos destacan los turbelarios que atacan a la semilla y a los individuos jóvenes; los pulpos, que se alimentan triturando el bivalvo; gasterópodos, principalmente del género *Murex* que son capaces de abrir las ostras y devorarlas; crustáceos como la nécora, centolla, buey, etc. que atacan principalmente a las ostras jóvenes; equinodermos como *Ascidia rubens* que son de las más voraces; los peces que destruyen las larvas de los moluscos en general y aves, aunque tienen preferencia por los berberechos y los mejillones.

Los organismos **patógenos** de las ostras se encuentran en distintos grupos zoológicos e infectan a distintas partes del animal. Se desconoce el modo de transmisión de la mayoría de los parásitos y es imposible determinar si se transfiere de un animal a otro por contagio o si el agente patógeno está presente en el medio. Por esto, la única manera de evitar las enfermedades es prevenir las infecciones controlando la densidad del cultivo y retirar las ostras del agua en el momento que se manifiesta la enfermedad.

Algunos agentes que afectan a la concha son:

- *Ostracobable implexa*, se trata de un hongo que se desarrolla en la concha y provoca manchas blancas en la superficie interna de las valvas, llegando a deformar la concha por lo que impide el cierre de las valvas y debilita el músculo.
- *Cliona celata,* es una esponja perforadora que excava galerías en la concha, se aprecia por la presencia en el interior de las valvas de puntos y decoloraciones. Si las perforaciones son muy intensas las lesiones pueden llegar hasta el manto. Provoca la disminución del peso y debilita al animal, haciéndolo más débil a otras enfermedades.

- *Polydora haplura* y *Polydora ciliata* son dos poliquetos que excavan galerías en la concha, la ostra reacciona segregando capas de conquiolina lo que le provoca una pérdida de peso porque parte de la energía necesaria para el crecimiento la consumen en la fabricación de la conquiolina por lo que acaban muriendo.

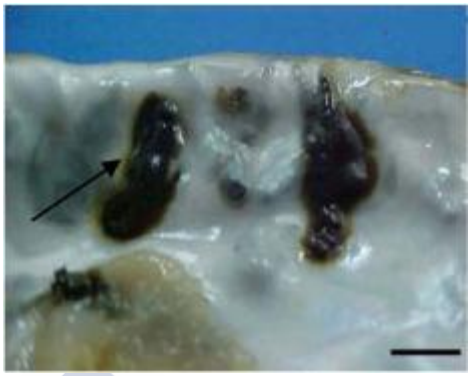


Figura 10. Galerias provocadas por *Polydora sp*. en la concha. Barra= 2 cm. Sabry y Magalhães (2005)

Patógenos que afectan a la glándula digestiva:

- *Marteilia refringens*, es un protozoo que parasita la glándula digestiva, decolorando el epitelio de la glándula digestiva. El manto se decolora y se vuelve transparente y la masa visceral queda arrugada y viscosa. Inhibe el crecimiento porque disminuyen las reservas de glucógeno y provoca mortalidades masivas. La enfermedad se conoce como marteiliasis.

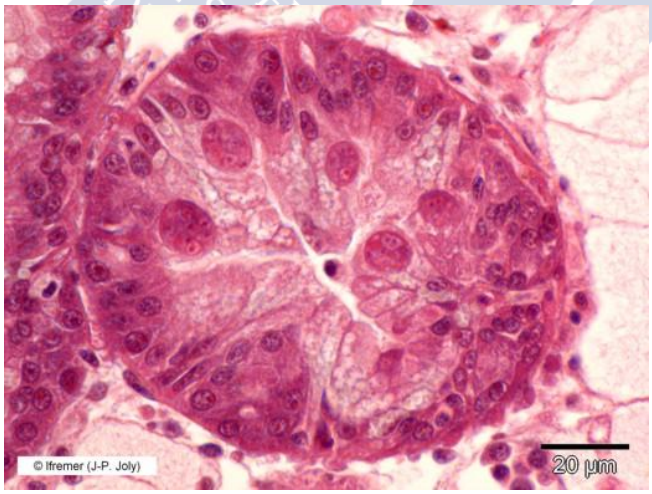


Figura 11. Cinco plasmodios de *Marteilia refringens* en el epitelio del tubo digestivo de *Ostrea edulis.* Tinción: H&E. http://www.eurl-mollusc.eu/Main-activities/Tutorials/Marteilia-refringens

- *Mytilicola intestinalis,* es un copépodo que invade la glándula digestiva y provoca la inhibición de la actividad filtradora del animal. Infecta más a los mejillones.

Patógenos que afectan a la hemolinfa:

- *Bonamia ostreae*, se trata de un protozoo parásito intracelular que invade la hemolinfa e infecta los hemocitos y se manifiesta con intensas inflamaciones. Su infección se conoce como bonamiasis y se manifiesta con la aparición de úlceras en las branquias y la carne del animal adquiere un color amarillento aunque la mayoría de las ostras infectadas no muestran síntomas macroscópicos obvios. Se hace sistémica y normalmente letal cuando las ostras tienen 2-3 años de edad. Las ostras se mueren a los 2-4 meses después de manifestarse la infección. La fase de su ciclo de vida que se desarrolla dentro de las ostras se caracteriza por células uninucleadas de pequeño tamaño (se les denomina microcélulas) que viven y se multiplican dentro de los hemocitos del hospedador, lo que conduce a la ruptura de la células hospedadora, y las células del parásito liberadas son fagocitadas por nuevos hemocitos, repitiéndose el ciclo (Figueras y Novoa, 2012). Se detectó por primera vez en la costa atlántica francesa y se propagó rápidamente a las distintas zonas de Europa, entre ellas, las rías gallegas, en las que fue la causante de las altas mortalidades que sufrieron los centros productores de Galicia en los años 80.

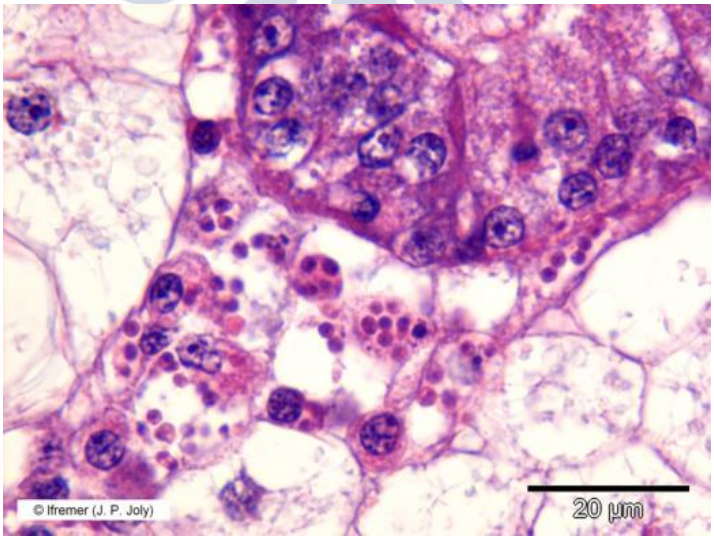


Figura 12. Células de *Bonamia ostreae* dentro de los hemocitos y libres en el tejido conectivo rodeando la glándula digestiva de *Ostrea edulis.* Tinción: H&E. http://www.eurl-mollusc.eu/Main-activities/Tutorials/Bonamia-sp

Hay otros agentes patógenos que afectan a las branquias como el *Trichodina sp.,* que es un ciliado que parasita las branquias produciendo lesiones en el tejido epitelial, en un número elevado puede provocar la muerte ya que afecta a la actividad filtradora del animal. Otros agentes patógenos también pueden afectar a la gónada, es el caso de *Bucephalus haimeanus*, un trematodo que parasita y puede llegar a degradar la gónada, provocando pérdida de peso y una importante disminución de su capacidad reproductora. *Steinhausia ovicola* es un protozoo que parasita los ovocitos y acaba destruyéndolos, los ovocitos son viables hasta cierto punto por lo que pueden transmitir la enfermedad a la nueva generación.

1.3.6 VALOR NUTRITIVO DE *OSTREA EDULIS*.

Ostrea edulis es un producto cuya composición química es de gran calidad alimenticia por su riqueza en sales minerales (1-2%) entre los que hay que destacar el calcio, hierro, potasio, fósforo, magnesio y yodo. Además también contiene glúcidos (4%), lípidos (1-2%), proteínas (10%) y vitaminas C, B1, B2, B3, B12, A, D y E.

En cuanto al aporte nutricional, *Ostrea edulis* es un alimento que destaca por su alto contenido en zinc, vitamina B12, yodo, selenio, colesterol, calcio, agua e hierro. Además de otros nutrientes presentes en menor grado y, que ordenados por su relevancia, son: vitamina B, vitamina B2, vitamina B6, fósforo, magnesio, proteínas, sodio, vitamina D, vitamina B3, vitamina E, potasio, hidratos de carbono, retinol, calorías, vitamina A, vitamina B9, ácidos grasos poliinsaturados, ácidos grasos saturados y ácidos grasos monoinsaturados.

Su alto contenido en zinc, resulta muy beneficioso en el proceso de formación de los huesos, así como en el desarrollo de los órganos reproductivos, favoreciendo el funcionamiento de la glándula prostática. También facilita a nuestro organismo la asimilación y el almacenamiento de la insulina. El zinc, además es un poderoso antioxidante natural, que favorece la absorción de vitamina A y la síntesis de proteínas como el colágeno y colabora en el crecimiento óptimo durante el embarazo, niñez y adolescencia, además de ayudar al mantenimiento de los sentidos de la vista, el gusto y el olfato. También está presente en otros tejidos de nuestro organismo como músculos, testículos, cabellos, uñas y revestimientos oculares.

La alta concentración de vitamina B12 en la ostra es beneficiosa para las funciones del sistema nervioso, corazón y cerebro. La vitamina B12 -o cobalamina- favorece el mantenimiento de la envoltura de mielina de las células nerviosas y participa en la síntesis de neurotransmisores. Además, es necesaria para la conversión de ácidos grasos en energía, y ayuda al mantenimiento de las reservas energéticas de los músculos a la vez que colabora para el buen funcionamiento del sistema inmunitario. La presencia de esta vitamina en nuestro organismo está íntimamente relacionada a la de la vitamina B9, que es necesaria para el metabolismo del ácido fólico. Al igual que éste, la cobalamina interviene en la formación de glóbulos rojos y la síntesis de ADN, ARN y proteínas.

Gracias a la presencia de yodo entre sus nutrientes, la ostra favorece el funcionamiento de los tejidos nerviosos y musculares, así como el sistema circulatorio. Además, el yodo, colabora en el metabolismo de otros nutrientes, y juega un papel esencial en el adecuado desarrollo de la glándula tiroidea.

Por su contenido en selenio, la ostra refuerza la protección contra enfermedades cardiovasculares a la vez que estimula el sistema inmunológico. El carácter antioxidante del selenio, retarda el proceso de envejecimiento celular, a la vez que le confieren propiedades preventivas contra el cáncer. La acción de este nutriente guarda relación con la actividad de la vitamina E.

El consumo de las ostras va a aportar colesterol a nuestro organismo, que es requerido tanto por los tejidos corporales (hígado, médula espinal, páncreas y cerebro) como por el plasma sanguíneo, siendo esencial para la formación de la membrana plasmática que regula la entrada y salida de sustancias a través de las células.

Los altos niveles de calcio presentes en la ostra contribuyen al fortalecimiento de huesos, dientes y encías, y favorece la adecuada coagulación de la sangre, previniendo enfermedades cardiovasculares, ya que el calcio ayuda a disminuir los niveles de colesterol en sangre. También ayuda a regular la frecuencia cardíaca y la transmisión de impulsos nerviosos, contribuyendo así a la reducción de la tensión arterial en personas con hipertensión. El calcio además, mantiene la permeabilidad de las membranas celulares, e interviene en el proceso de la actividad neuromuscular.

La ostra, por su alto contenido en agua, cerca de un 85%, favorece además la hidratación de nuestro organismo.

Al ser un alimento rico en hierro (necesario para la síntesis de hemoglobina), la ostra colabora en la renovación de las células sanguíneas, posibilitando el transporte de oxígeno desde los pulmones hacia los diferentes órganos, como los músculos, el hígado, el corazón o el cerebro, siendo el hierro indispensable en determinadas funciones de este último, como la capacidad de aprendizaje. El hierro también incrementa la resistencia ante enfermedades ya que refuerza las defensas frente a los microorganismos, previene los estados de fatiga o anemia, y hace posible el funcionamiento del sistema nervioso central, el control de la temperatura corporal o la glándula tiroides, siendo además saludable para la piel, el cabello y las uñas. Este alimento resulta muy beneficioso para el organismo en situaciones de carencia de hierro, ya sean como consecuencia de hábitos alimenticios inadecuados, durante la menstruación o el embarazo, o tras accidentes u operaciones quirúrgicas donde se ha perdido sangre.

A continuación se muestra una tabla con el resumen de los principales nutrientes de las ostras así como la proporción media de cada uno, en relación a 100 g de alimento:

En 100 g……. 81 kcal

Carbohidratos: 5,0 g
Proteínas: 9,5 g
Grasas: 2,3 g
Colesterol: 50,0 mg
Agua: 82,06 g

Minerales:

Sodio: 106,00 mg	**Zinc**: 16,62 mg
Potasio: 168,00 mg	**Calcio**: 8,00 mg
Fósforo: 162,00 mg	**Hierro**: 5,11 mg
Magnesio: 22,00 mg	**Cobre**: 1,58 mg
Manganeso: 0,64 mg	**Selenio**: 77,00 mcg

Vitaminas:

Vitamina **A** (Retinol): 81,00 µg	Vitamina **E**: 0,85 mg
Vitamina **C**: 8,00 mg	Vitamina **B1**: 0,07 mg
Vitamina **B2**: 0,23 mg	Vitamina **B3**: 2,01 mg
Vitamina **B5**: 0,50 mg	Vitamina **B6**: 0,05 mg
Vitamina **B12**: 16,00 µg	Ácido fólico (**B9**): 10,00 µg

Proteínas (contenido aminoacídico):

Triptófano: 0,11 g	Arginina: 0,69 g	Fenilalanina: 0,34 g
Treonina: 0,41 g	Cistina: 0,12 g	Valina: 0,41 g
Isoleucina: 0,41 g	Serina: 0,42 g	Tirosina: 0,30 g
Leucina: 0,67 g	Alanina: 0,57 g	Histidina: 0,18 g
Lisina: 0,71 g	Glicina: 0,59 g	Ácido aspártico: 0,91 g
Metionina: 0,21 g	Ácido glutámico: 1,28 g	Prolina: 0,39 g

Grasas:

Ác. grasos saturados: 0,51 g

14:0 - 0,08 g (3.6%)

16:0 - 0,36 g (16.5%)

18:0 - 0,07 g (4.3%)

Ác. grasos monoinsaturados: 0,36 g

Ác. grasos omega-9: 0,24 g

Ác. oleico 18:1 (n-9) - 0.19 g

Ác. erúcico - 22:1 (n-9) - 0.05 g

16:1 indiferenciado - 0.11 g

Ác. grasos poliinsaturados: 0.89 g

18:2 indif. - 0,03 g

18:3 indif. - 0,03 g

Ác. grasos omega-3: 0,83 g

Ác. docosahexaenoico (DHA) 22:6 (n-3) - 0,25 g

Ác. estearidónico (SDA), 18:4 (n-3) - 0,08 g

Ác. docosapentaenoico (DPA), 20:5 (n-3) - 0,44 g

Ác. Eicosatetraenoico (ETA), 20:4 (n-3) - 0,04 g

Ác. Eicosapentanoico (EPA) 20:5 (n-3) - 0,02 g

UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.4 ANTECEDENTES HISTÓRICOS DEL CULTIVO DE OSTRAS.

Se considera que la forma más antigua de la acuicultura fue llevada a cabo sobre los moluscos, concretamente la acuicultura marina se inició precisamente con el cultivo de las ostras. El cultivo de las ostras u ostricultura como actividad se viene ejerciendo desde muy antiguo, situándolo hace unos 4.000 años, época en la que japoneses, griegos y romanos las cultivaban con un gran éxito. En China, en el 460 a.C. se desarrollaba esta actividad empleando bloques de piedras entrelazadas con conchas de ostras (Ranson, 1951).

En Europa, el cultivo de ostras data de hace al menos 2000 años y se practicaba en ensenadas y bahías. Ya en los tiempos del Imperio Romano en España, los romanos le dieron una gran importancia, ya que una de las vías romanas cruzaba por Arcade, donde crearon piscinas de agua marina para su desarrollo y siguieron una complicada logística para conseguir transportarlas vivas a campañas remotas, como la de Britania y así poder aportar fuerzas a Quinto Lolio Urbico en la extenuante tarea de alzar el Muro de Antonino, en cuya turba se pueden encontrar restos de conchas de ostra. Los romanos popularizaron el consumo de ostras y llegaron a convertirlas en el plato indispensable en todo banquete de alcurnia. Por otra parte, Plinio el Viejo en su *Historia Natural* dejó constancia de que en el año 160 a.C. un patricio romano nacido en Nápoles, Sergius Orata inició la ostricultura ya que organizó los primeros parques ostrícolas en la bahía de Nápoles, en las cercanías del Lago Lucrino, diseñando curiosos sistemas de captación. Más tarde este cultivo fue continuado en el Lago Fusan, el cual contiene agua salobre y ocupa el antiguo cráter de un volcán extinguido. En diferentes áreas del lago se colocaban montones de piedras con ostras adheridas para formar una especie de banco artificial. Alrededor de cada uno de ellos se colocaban círculos de pilares de madera unidas entre sí por cables, de los que colgaban cuerdas con ramas que tenían la misión de recoger las larvas y así se fijaba la semilla. En estos colectores, las ostras crecían hasta determinado tamaño y, llegado el momento, se colocaban en una especie de cestas que se mantenían sumergidas en otras áreas del lago, donde engordaban hasta adquirir el tamaño adecuado para ser enviadas al mercado. También Aristóteles mencionaba los cultivos de estas especies en la Grecia clásica (Polanco Torres y Corral, 2002).

Posteriormente su consumo siguió aumentando y llegó a su máximo en el siglo XVIII, que es considerado como la gran época de las ostras. A mediados del siglo XVIII hay un movimiento de recuperación de los bancos naturales ostrícolas; se inicia en 1753 en las costas de Pomerania (Alemania), reintentándolo en 1830 y posteriormente en 1843 pero resultó todo un fracaso ya que las dificultades del litoral y la temperatura del agua no permitían el desarrollo de esta industria.

La repoblación de los bancos ostrícolas franceses se inició en 1859, en la bahía de la Seyne y en Toulon y en 1860 en el área de Thau, lográndose grandes éxitos. Sin embargo las

acciones llevadas a cabo en la costa mediterránea no fueron tan positivas como las realizadas en las costas atlánticas, achacándose los resultados menos favorables a que se habían utilizado para la repoblación ostras inglesas que estaban habituadas a aguas vivas y más frías y que no pudieron llevar a cabo la reproducción bajo temperaturas más cálidas.

Al mismo tiempo, en 1863 en Inglaterra (áreas de Southend y Herne-Bay), se comienzaron ensayos de cultivos de ostras, siguiendo el ejemplo de la producción francesa. En el SO de Francia, en 1865, se comienza a desarrollar la técnica de las tejas encaladas, que son tejas recubiertas con una mezcla de cal y arena fina, que se convirtieron en el principal método de recolección de semilla en Francia y Países Bajos, y también las cajas de madera para la cría de los juveniles. A partir de 1895 solamente se cultivaban ostras (en fase de engorde) a partir de semilla procedente de parques naturales o semilla importada de Francia y/o Holanda. En el s. XX se procedió a la siembra de conchas de berberechos (1904) y mejillones (1939) en aguas submareales para la recolección de la semilla de ostra. Esta práctica es muy común en los Países Bajos ya que es más rentable y menos trabajosa. Luego la semilla se cría en bandejas o se restablecen en parcelas submareales (FAO, 2004).

En Holanda, los ensayos de cultivo ostrícolas comienzan en 1870, las iniciativas privadas pretendían recuperar los bancos naturales que se encontraban ya muy empobrecidos, naciendo así las zonas de producción de Zelandia. En Italia, en el Golfo de Tarento, se reactivan los cultivos ostrícolas tradicionales a partir de 1890. En esta época, en Austria se hacían ensayos en el Adriático mediante las técnicas de captación de larvas en el estuario de Grado.

En 1920 tuvo lugar una mortalidad masiva que afectó a las poblaciones de ostra europea. La población se recuperó más tarde pero en muchas áreas tradicionales de crianza fue reemplazada por *Crassostrea angulata*. Después, a principios de los 70 y 80 se propagaron dos enfermedades provocadas por *M. refringens* y *B. ostreae*, reduciendo drásticamente la producción de *O. edulis* en casi todas las áreas europeas tradicionales de crianza. Desde este momento, la producción de ostra plana ha permanecido baja pese a las nuevas prácticas de manejo y a la realización de programas intensivos de repoblación (FAO, 2004).

En Galicia, hay que destacar la gran importancia social y económica que tuvo en su momento la ostra plana. Según referencias históricas, la ostra plana gallega además de ser apreciada como manjar para los emperadores romanos, se exportaban a todo el mundo. Pero la explotación masiva del recurso centrada en la extracción, hizo que muchos de los bancos naturales de ostra gallegos desaparecieran prácticamente en su totalidad. En 1788 Cornide ya advertía de la extinción de los bancos naturales de bivalvos en las rías gallegas, e informaba concretamente sobre la desaparición de ostreras naturales en la ría de O Burgo (A Coruña) y de la ría de Ferrol. En años posteriores se continuó con la misma pauta, agotando así la mayoría de los bancos naturales, pese a los intentos del naturalista Paz Graells, que en 1870 consideraba que la principal causa del declive de los bancos de ostra naturales era el incumplimiento del reglamento vigente (vedas, tamaños mínimos y períodos de descanso para

la producción de semilla) y para educar a la población en este ámbito puso en marcha los Parques-Escuela de Ostricultura, donde se enseñaban los métodos seguidos por los ostricultores franceses (limpieza de los lechos, colocación de colectores, siembra de semilla,…). Para Paz Graells en 1860 e incluso para investigadores del CSIC en los años 1950, Arcachon en particular y la ostricultura francesa en general fueron el modelo a seguir, este modelo se basa en un método de cultivo consistente en captar las larvas liberadas a la corriente por las ostras adultas por medio de *tejas colectoras* colocadas en las playas. Una vez que las crías alcanzaban cierto tamaño, se sacaban de las tejas y se trasladaban a cajas de madera que, a la vez que permitían el paso del agua y por tanto también de los nutrientes, resguardaban al molusco de los depredadores. En los años 30, B. Andreu entre otros, intentó recuperar el cultivo. A principios de siglo la producción quedó restringida prácticamente a las Rías de Vigo y Arousa. Este proceso culmina en los años 50, con el agotamiento cuasi total de los, en otra hora tan ricos, bancos naturales de las Rías de Vigo, Arousa y Noia, desapareciendo con ellos la producción natural de esta especie en aguas gallegas e imposibilitando así la obtención de semilla por captación natural. Se presenta, entonces, la necesidad de importar de forma masiva ostra de procedencia francesa para su engorde en batea. La instalación de la primera batea para el cultivo de ostra en Galicia tuvo lugar en 1963. Galicia que por tradición era exportadora de ostra, que se utilizaba para la repoblación de los bancos franceses, se convierte en los años 60 en importador de semilla y semiadultos de *Ostrea edulis*, para engordar en batea en nuestras aguas. Entre 1970 y 1974 se concedieron 820 puntos de fondeo para batea de ostra (Rodriguez, 1990).

En la actualidad el cultivo de ostras en Galicia se realiza principalmente en bateas y parques de cultivo. En los parques de cultivo se requieren de unas profundidades de 1 a 10 m, con fondos duros de arena o gravilla, limpios de fango donde existan corrientes y unas mareas de fuerza media. También es conveniente la presencia en el fondo de objetos duros, como conchas o piedras, para que se fijen las larvas. Este tipo de cultivo se puede realizar directamente sobre el fondo o empleando mesas ostrícolas, que mantienen alejados del cultivo a otros organismos. En las bateas se lleva a cabo el preengorde y engorde de las ostras, esto se puede conseguir de dos maneras diferentes, por medio del cultivo en cuerda o en cestas.

El cultivo de batea en cuerda es el más extendido en Galicia, con este sistema una batea de 500 m^2 puede llegar a albergar unas 3.000 cuerdas que pueden soportar 450.000 ostras. Se obtiene una producción más baja que con el cultivo en cestas pero, a cambio, tiene las ventajas de que resulta más económico y menos trabajoso y además, las ostras engordadas con este sistema son de mejor calidad, ya que a igual longitud tienen más peso, son más gruesas y tienen mayor cantidad de carne que las ostras cultivadas en cestas. El cultivo empieza con el encordado, sujetando los juveniles de ostra a las cuerdas mediante cemento. El tamaño de las ostras es de aproximadamente 5 cm para que la concha sea lo suficientemente

gruesa y resista el cemento. En cada punto de la cuerda se colocan tres ostras, con las caras planas hacia el exterior y el borde ventral hacia arriba, evitando que el cemento cubra las charnelas. Cuando el cemento ya está seco se llevan las cuerdas a la batea y se cuelgan de los pontones con una separación de 30 cm. El único mantenimiento que necesitan es la limpieza de las cuerdas ya que son invadidas por algas, semilla de mejillón, ascidias, etc. que puede impedir que el agua pase entre las ostras llegando a dificultar su alimentación y respiración. En 10 meses, dependiendo de la zona, una ostra de tamaño de 4-5 cm y 10 g de peso pasan a 7-10 cm y 50-60 g. La mortalidad media de este cultivo es de 40-50%, dependiendo de la calidad de la ostra, la zona de cultivo y el grado de infestación por patógenos (*B. ostreae* y *M. refringens*).

El cultivo de ostras en cestas se basa en la colocación de las ostras en el interior de cestas apilables que se cuelgan del emparrillado de la batea, formando grupos de 10-20 cestas mediante una cuerda que las atraviesa por un orificio central. El interior de las cestas está dividido en cuatro partes por medio de separadores en forma de cruz (cuarterones), de esta manera las ostras se mantienen distribuidas homogéneamente por la superficie. Este cultivo se realiza en dos fases: el preengorde, que va desde 5 mm hasta los 5 cm, y el engorde, desde los 5 cm hasta la talla comercial. En función del tamaño de las ostras la densidad en el interior de la cesta varía. El mantenimiento de este cultivo resulta más laborioso que el cultivo en cuerdas, ya que hay que clasificar las ostras, distribuirlas en cuarterones y cestas según el tamaño, hacer desdobles a medida que crecen y limpiar las cuerdas y las cestas. La duración media del preengorde es de 8 meses y tiene una supervivencia en torno al 80-90% y el engorde se consigue en 10-12 meses y con una supervivencia del 40-50%.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.5 SITUACIÓN ACTUAL DEL CULTIVO DE OSTRA.

A pesar de la gran potencialidad admitida por todos los sectores implicados, la capacidad de producción podría ser de varios miles de toneladas anuales, pero en la actualidad hay toda una serie de factores que están bloqueando el desarrollo del sector ostrícola español, fundamentalmente gallego. Podríamos citar entre otros:

- La práctica desaparición de los bancos naturales de las rías gallegas que en otra época fueron muy productivos. Estos bancos se vieron mermados por la sobreexplotación de forma continuada.

- Bacterias y parásitos como *Marteilia refringens* y *Bonamia ostreae* que llegaron asociados a las masivas importaciones de semilla y semiadultos de las áreas ostrícolas europeas provocando enfermedades y grandes mortalidades en los bancos naturales y cultivos, acarreando grandes pérdidas económicas en el sector.

- Al progresivo descenso de reclutamiento de semilla del medio natural se une la escasa producción de semilla en criadero y la baja calidad de ésta, por lo que no llega a cubrir la alta demanda del mercado.

Esta demanda de semilla sólo se puede satisfacer mediante el control de la reproducción en criadero, acondicionando los reproductores. Con el acondicionamiento se puede conseguir la madurez sexual fuera de su ambiente natural, tanto temporal como espacialmente. Este proceso es fundamental para poder contar con larvas para el cultivo fuera de la época natural de puesta y por lo tanto, conseguir así un mayor número de larvas que pueden ser usadas para su posterior engorde en batea e incluso para la repoblación de los bancos naturales de las rías.

En el acondicionamiento, los reproductores son sometidos a unas condiciones determinadas, que varían según la especie, en instalaciones controladas, con el fin de alargar el período de madurez sexual o forzar esa madurez para disponer de larvas de en cualquier época del año. Las técnicas utilizadas se basan fundamentalmente en mantener a los reproductores en agua de mar a la temperatura ideal para la gametogénesis y en suministrarles la alimentación necesaria para cubrir las necesidades energéticas del desarrollo gametogénico.

El ciclo reproductivo de los moluscos bivalvos es estacional, lo que provoca ciclos de almacenamiento de reservas que hace que el estado inicial de los reproductores sea muy diferente a lo largo de las estaciones. A su vez, este ciclo está determinado por la compleja interacción de factores internos y factores externos (temperatura, fotoperíodo, disponibilidad de alimento, salinidad…). La falta de datos acerca de los factores internos implicados provoca

que la estimulación del desarrollo gametogénico se realice exclusivamente a través del control de las condiciones externas del cultivo, principalmente variando la temperatura y el fotoperíodo.

La influencia del fotoperíodo sobre el desarrollo gonadal ya ha sido demostrada en otros bivalvos como *Pecten maximus* (Paulet y Boucher, 1991), *Chlamys varia* (Louro *et al*., 2005), *Ruditapes decussatus* (Martínez *et al*., 2005); pero por el momento no existen evidencias claras de su influencia sobre el desarrollo gametogénico de *O. edulis,* aunque como la ostra presenta receptores lumínicos no debe descartarse la influencia del fotoperíodo sobre estos animales. Experimentos preliminares (Maneiro, 2008) apoyan esta hipótesis.

Además en el cultivo de la ostra plana hay otras condiciones que no están completamente optimizadas como son los flujos de agua y temperaturas óptimas para su desarrollo, las dietas más adecuadas y los niveles de alimentación para cada etapa del cultivo y la influencia del fotoperíodo sobre el ciclo gametogénico. También es necesario realizar los experimentos en distintas épocas del año, ya que los individuos parten de condiciones gonadales distintas, tanto en su estadío de maduración como de reservas disponibles.

Por todos estos motivos, creemos conveniente la realización de más experimentos de acondicionamiento de *Ostrea edulis* en distintas épocas del año para evaluar el estado inicial de los reproductores e intentar encontrar el fotoperíodo, la dieta y el flujo de agua más óptimo para estos individuos y así conseguir el acondicionamiento ideal para un correcto y rápido desarrollo gonadal que permita obtener larvas con la calidad óptima y en cantidad a lo largo de todo el año.

En la actualidad, aunque ha habido importantes avances en la producción de semilla en criadero hay algunos cuellos de botella que están bloqueando este proceso:

En el acondicionamiento:

- Alta mortalidad de reproductores.
- Cantidad y calidad de las larvas a lo largo del año.

En el cultivo larvario:

- Crecimiento larvario.
- Infecciones bacterianas.
- Mortalidad alta durante la metamorfosis.
- Métodos de fijación.

La situación actual en los criaderos muestra una gran variabilidad en los resultados y no es fácil hacer previsiones, en parte porque no se sabe si las condiciones utilizadas son las adecuadas o si, al contrario, se está sometiendo a estos organismos a un alto grado de estrés que podría estar afectando a la calidad y viabilidad de las puestas.

Ante esto, las empresas implicadas en el sector mantienen un esfuerzo por mejorar y optimizar la producción de semilla de ostra plana que permita recuperar y rentabilizar su cultivo en Galicia. El desarrollo de técnicas y métodos para la obtención de semilla autóctona, de calidad; la selección de variedades resistentes a los principales patógenos y especialmente adaptadas al medio; la elaboración de técnicas que permitan un crecimiento rápido del individuo, etc., todo esto unido a un estricto control de las importaciones de ostras foráneas, puede cambiar el signo de la evolución y restaurar la producción ostrícola de Galicia.

2. OBJETIVOS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

2. OBJETIVOS DEL ESTUDIO.

Para poder realizar el acondicionamiento de moluscos bivalvos es imprescindible conocer la influencia que los diferentes factores ambientales y nutricionales tienen sobre el desarrollo gonadal de los bivalvos. En este estudio se analiza la influencia del fotoperíodo, de la temperatura del agua, de la ración de alimento suministrada y del flujo del agua sobre el desarrollo gonadal de la ostra plana, *Ostrea edulis*, con el fin de optimizar su acondicionamiento en criadero. Para ello se abordaron los siguientes objetivos parciales:

1. Confirmar si la temperatura del agua influye en el desarrollo gonadal de la ostra plana *Ostrea edulis*, lo mismo que sucede en otros bivalvos.

2. Determinar si el período de iluminación diario (fotoperíodo) también tiene influencia en el desarrollo gonadal de la ostra plana *Ostrea edulis* acondicionada en criadero.

3. Definir la ración de alimento óptima para el correcto desarrollo gonadal de la ostra plana en criadero.

4. Estudiar si el flujo de agua influye en el desarrollo gonadal de *Ostrea edulis*.

El manejo adecuado de estos factores para el acondicionamiento de progenitores de *O. edulis* tendrá repercusiones positivas, de aplicación práctica en el cultivo industrial de la ostra plana, ya que permitirá a los criaderos obtener larvas de buena calidad y viables en cualquier época del año y en el menor tiempo posible.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

3. MATERIALES Y MÉTODOS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

3. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1 DISEÑO EXPERIMENTAL DEL ACONDICIONAMIENTO.

Se acondicionaron adultos de ostra plana procedentes de la recolección en la costa de Galicia, concretamente en Punta Cabalo (Boa, Ría de Noia) y Cambados (Ría de Arousa). Una vez que los ejemplares llegaron a la "hatchery", se separaron 10 - 12 individuos al azar para, en el laboratorio, poder comprobar en que estadío del desarrollo gonadal se encontraban. Los restantes fueron acondicionados siguiendo unas condiciones determinadas para cada experimento.

Previamente al acondicionamiento, los individuos se mantuvieron en recipientes (cubetas) siguiendo las condiciones ambientales, es decir, la temperatura del agua era la misma que se encontraba en el mar en ese momento, las horas de luz eran las naturales de esa época y se alimentaban "ad libitum" con *bloom* natural, para que se sobrepusieran de los posibles daños causados por el estrés en el momento de la pesca y el transporte. Estas condiciones se mantenían durante al menos una semana. Al principio es bueno proporcionar abundante alimento con el objetivo de aumentar los niveles de reservas alimenticias en los adultos, que más adelante se van a movilizar durante el desarrollo de los gametos. Esto es más importante para las hembras que para los machos, ya que la maduración de los óvulos requiere mucha energía (Helm y Bourne, 2004).

El acondicionamiento fue realizado por triplicado y con 30 ostras en cada cubeta o tina de 30 l. Se utilizó un circuito abierto de agua de mar filtrada a 10 μm, y con un flujo de 1 l/ostra/hora para cada cubeta del experimento o, lo que es lo mismo, 30 l/hora, porque en cada cubeta se colocaban 30 individuos.



Figura 13. Cubetas para el acondicionamiento de las ostras. Se puede observar el flujo de agua entrante.

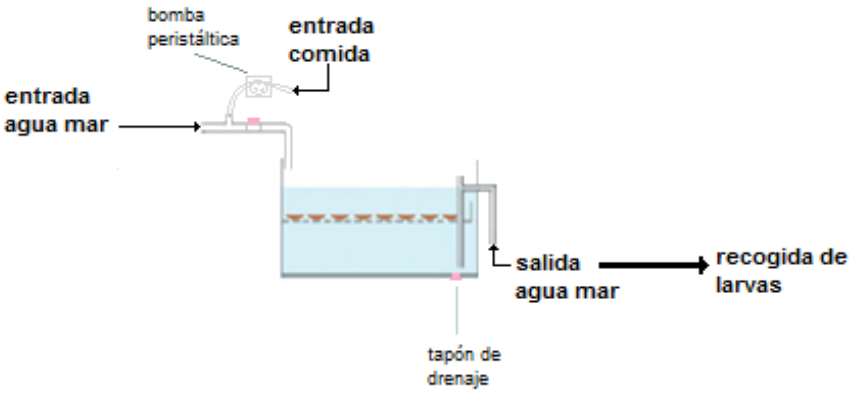


Figura 14. Esquema de la cubeta de 30 l utilizada para acondicionamiento de reproductores.

Durante el experimento, el agua de mar empleada se sometió a un tratamiento de filtración, mediante un filtro de anillas de 100 µm, separado por un filtro de arena de otro filtro de anillas, esta vez de 20 µm, a los que siguen dos filtros de cartucho de 10 µm y 5 µm, colocados en serie. El agua se calienta mediante un intercambiador, que recibe agua dulce a 80 ^{o}C de una caldera gracias a una bomba recirculante; el agua de mar pasa a través de las placas del intercambiador que están en contacto con las placas de agua dulce caliente y así consigue elevar la temperatura del agua de mar hasta la temperatura necesaria para el acondicionamiento. El agua se mantenía en un circuito abierto. Cada cubeta de ostras, 30 por cubeta, recibía agua y alimento con una velocidad de renovación de 1 l/ hora/ostra.

Alimentación: En los experimentos en los que se estudia el efecto del fotoperíodo y la temperatura del agua se suministró a los animales una ración de alimento del 6 % (el 6 % del peso seco del individuo en gramos de microalgas). En los experimentos específicos para el estudio de la ración de alimento se utilizaron raciones de alimento del 3, 6 y 9 %.

Temperatura del agua: Para el estudio de la temperatura del agua en el acondicionamiento de la ostra plana se utilizaron dos tratamientos diferentes: en un caso se utilizó 15 ^{o}C, una temperatura próxima a la temperatura del agua de mar y en el segundo caso se empleó un gradiente de temperatura desde los 14 ^{o}C hasta los 18 ^{o}C (aumentando ≈ 1 ^{o}C por semana). En los demás experimentos se utilizó siempre un gradiente desde la temperatura ambiental hasta los 18 ^{o}C.

Fotoperíodo: Para el estudio del efecto del fotoperíodo en el acondicionamiento se iluminaron los tanques artificialmente con dos lámparas de 2000 lux. Se utilizaron diferentes tratamientos que van desde las 8 h/luz/día (condición natural de invierno) hasta las 16

h/luz/día (condición natural de primavera/verano). En los experimentos para el estudio de la ración de alimento y flujo de agua se empleó un gradiente de luz de 8 hasta las 16 h.



Figura 15. Instalaciones donde se llevó a cabo el acondicionamiento.

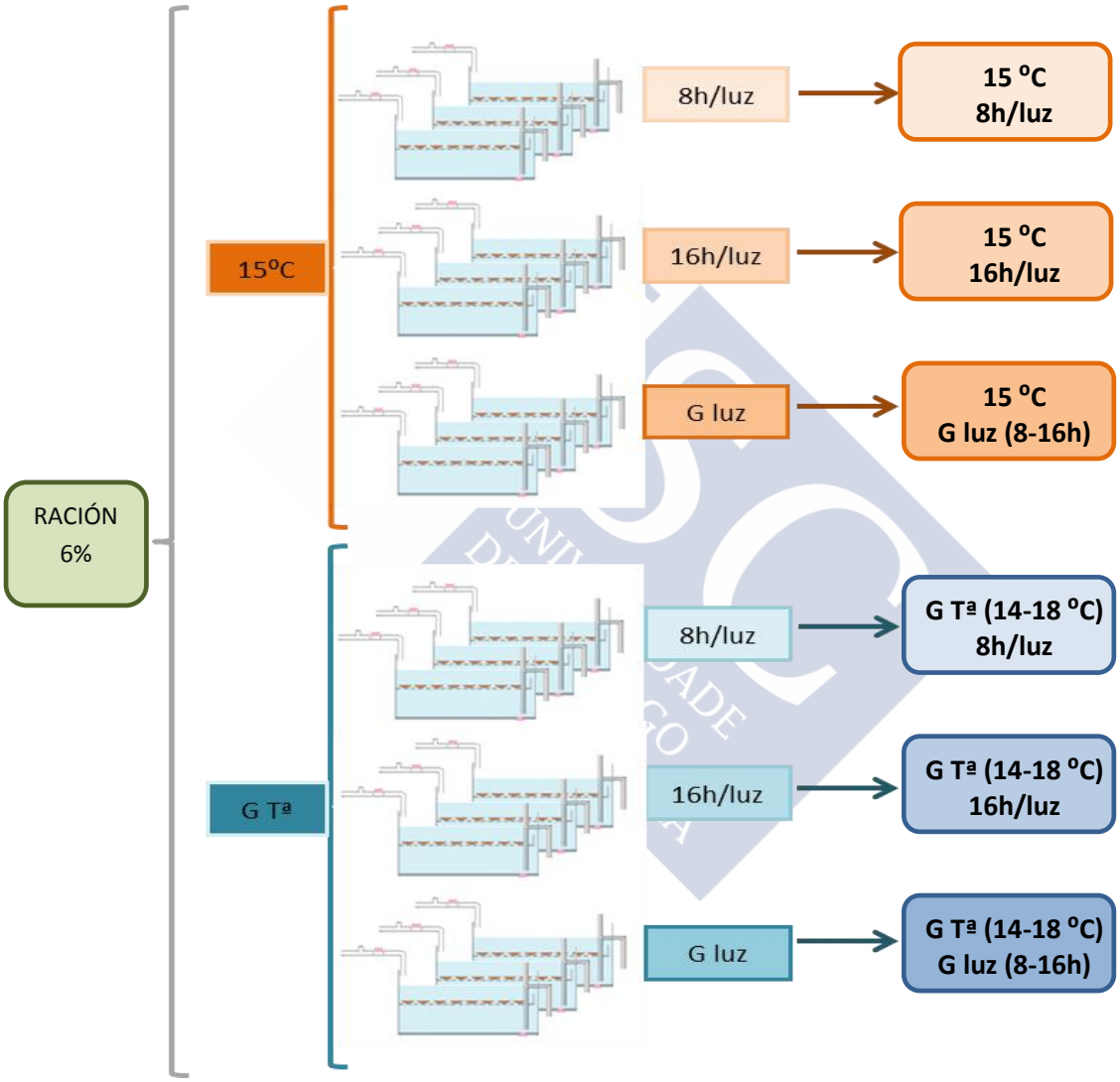
Se realizaron diferentes experimentos de acondicionamiento en los que se varió la temperatura del agua, el fotoperíodo, la dieta suministrada y el flujo de agua. Cada acondicionamiento se realizó por triplicado, utilizándose tres cubetas que contenían 30 individuos cada una. Las condiciones experimentales fueron las siguientes:

EFECTO DEL FOTOPERÍODO Y LA TEMPERATURA SOBRE EL ACONDICIONAMIENTO DE PROGENITORES DE *OSTREA EDULIS*

Se mantuvieron las condiciones estándar de acondicionamiento en cuanto a la dieta y ración de alimento suministrada a los individuos (6 %) y el flujo del agua (1l/h), los elementos variables eran el fotoperíodo y la temperatura.

El gradiente de luz consistía en el aumento progresivo de la iluminación que incide sobre los individuos desde 8 h de luz/día hasta 16 h, en 30 días; para ello se iluminaron artificialmente con dos lámparas de 2000 lux cuando anochecía hasta completar las 16 h de luz/día. El gradiente de temperatura consistía en el incremento de 1 ^{o}C de la temperatura del agua por semana desde los 14 ^{o}C iniciales hasta los 18 ^{o}C finales.

EXPERIMENTO 1; EFECTO COMBINADO DE LA TEMPERATURA Y FOTOPERÍODO EN OTOÑO: Las condiciones experimentales fueron las siguientes: se utilizaron dos regímenes de temperatura (temperatura constante de 15 ºC y gradiente de temperatura (de 14 ºC a 18 ºC en 30 días) que se combinaron con tres tratamientos diferentes de fotoperíodo (8 h/luz día, 16 h/luz día y gradiente de 8 a 16 h/luz día). Por lo tanto se realizaron 6 acondicionamientos distintos por triplicado, tal y como se muestra en el siguiente esquema.

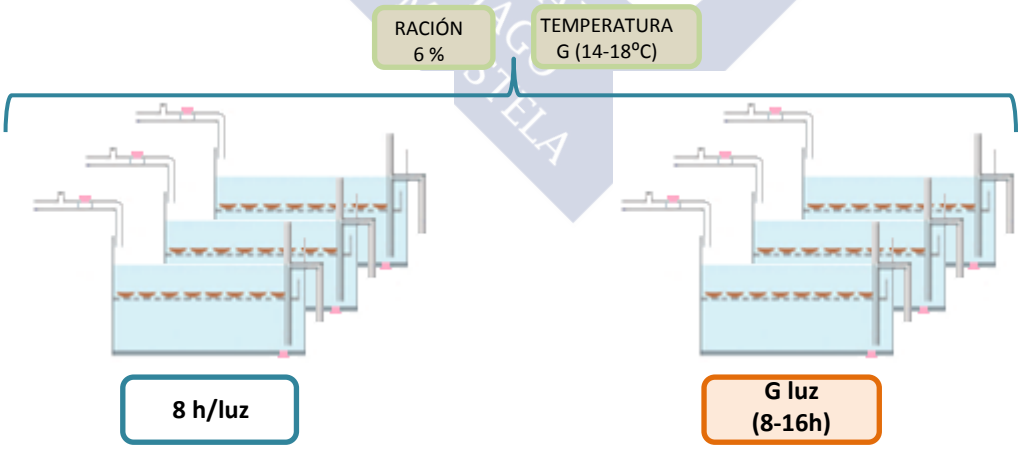


En este experimento se partió de una población de 560 individuos adultos de ostra plana, con una talla media de 7,14 cm de largo y 6,8 cm de ancho y un peso medio de 82,5 g. La primera muestra de 20 individuos se recogió el día 18 de octubre de 2005 y se utilizó para determinar el estado inicial de desarrollo gonadal de la población. El resto de los individuos (540) se distribuyeron en las cubetas plásticas utilizadas para los distintos acondicionamientos.

Se realizaron tres muestreos, a los 30, 60 y 90 días y en cada uno de ellos se extrajeron 10 ostras por tipo de acondicionamiento. Los individuos de cada muestreo fueron medidos con un calibre y pesados en una balanza Mettler® PM300 (precisión hasta la centésima de gramo). Primero se determinó el peso total de todos los individuos, tras lo cual las ostras fueron abiertas y se separó la concha de la vianda, pesando ambas partes por separado.

Peso húmedo carne = 163,9 g
Peso húmedo concha = 740,4 g
Peso total = 1650 g
Peso medio individuo = 82,5 g

EXPERIMENTO 2; EFECTO DEL FOTOPERÍODO EN OTOÑO: Se realizaron dos tipos de acondicionamiento en función de las horas de luz recibidas por el cultivo para comprobar la influencia de las horas de luz sobre el desarrollo gonadal. Así mismo se utilizó una ración de alimento del 6 % y un gradiente de temperatura de 14 a 18 ºC tal y como se ha explicado anteriormente. Uno de ellos se mantiene con un fotoperíodo constante a lo largo de todo el experimento, 8 h/luz, es decir, durante la duración de todo el experimento el cultivo recibe 8 horas diarias de iluminación. El otro va sufriendo un gradiente a lo largo de la evolución del experimento, G (8-16h/luz), al comienzo recibe 8 horas de iluminación pero se va incrementando 2 horas de luz a la semana hasta que llega a las 16 horas de iluminación y así se mantiene hasta el término.

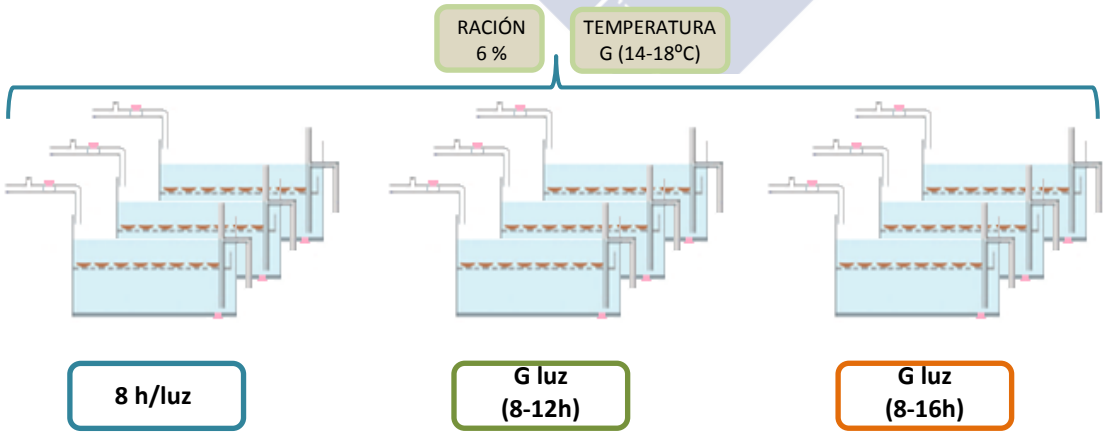


El experimento se llevó a cabo partiendo de una población de 192 individuos adultos de ostra plana, con una talla media de 9,3 cm de largo y 8,41 cm de ancho y un peso medio de 149,86 g. La primera muestra de 12 individuos se recogió el día 10 de octubre de 2007 y se utilizó para determinar el estado inicial de desarrollo gonadal de la población en ese momento.

Los individuos restantes, 180, se distribuyeron en las cubetas plásticas utilizadas para los distintos acondicionamientos, 90 ostras distribuidas en tres cubetas acondicionadas con 8 h de luz y otras 90 ostras en tres cubetas sometidas a un gradiente de horas de luz. Se realizaron 5 muestreos, a los 29, 34, 43, 49 y 69 días y en cada uno se recogieron 10 ostras de cada acondicionamiento. Los individuos extraídos en cada muestreo se midieron con un calibre y se pesaron con la balanza Mettler® PM300. Primero se determinó el peso total de todos los individuos, tras lo cual se abrieron las ostras y se separó la concha de la vianda, pesando cada parte por separado. El inicio del acondicionamiento y muestreo inicial tuvieron lugar el 10 de octubre de 2007.

Peso húmedo carne = 196,49 g
Peso húmedo concha = 1547,18 g
Peso total = 1798,30 g
Peso medio individuo = 149,86 g

EXPERIMENTO 3; EFECTO DEL FOTOPERÍODO EN OTOÑO: Las condiciones fueron similares al experimento 2 pero en este caso se realizaron tres acondicionamientos distintos ya que además de los dos anteriores, 8h/luz y G (8-16h/luz), se realizó un tercer acondicionamiento con un gradiente de fotoperíodo intermedio, G (8-12h/luz), es decir, partiendo de las 8 horas iniciales se le va aumentando 1 hora semanal de luz al cultivo hasta que alcance las 12 horas diarias. Las condiciones de temperatura y ración de alimento son las mismas del experimento 2.



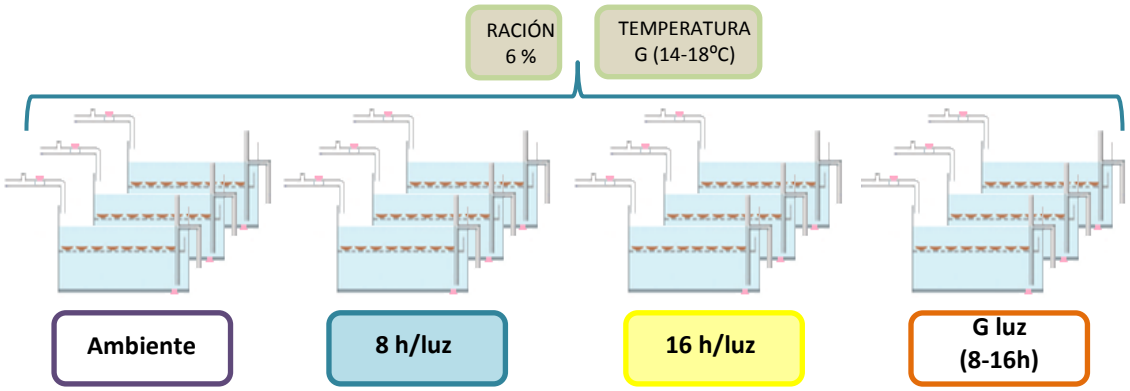
El experimento se llevó a cabo partiendo de una población de 282 individuos adultos de ostra plana, con una talla media de 7,48 cm de largo y 7,96 cm de ancho y un peso medio

de 92,73 g. La primera muestra de 12 individuos se recogió el día 19 de octubre de 2009 y se utilizó para determinar el estado inicial de desarrollo gonadal de la población en ese momento. Los individuos restantes, 270, se distribuyeron en cubetas plásticas utilizadas para los distintos acondicionamientos, 90 ostras distribuidas en tres cubetas para cada régimen. Se realizaron 2 muestreos, a los 34 y 62 días y en cada uno se recogieron 6 ostras de cada acondicionamiento. Los individuos extraídos en cada muestreo se midieron con un calibre y se pesaron con la balanza Mettler® PM300. Primero se determinó el peso total de todos los individuos, tras lo cual se abrieron las ostras y se separó la concha de la vianda, pesando cada parte por separado. Inicio del acondicionamiento y muestreo inicial: 19 de octubre de 2009.

Peso húmedo carne = 181,11 g
Peso húmedo concha = 797,47 g
Peso total = 1112,8 g
Peso medio individuo = 92,73 g

- **EXPERIMENTO 4; EFECTO DEL FOTOPERÍODO Y LA TEMPERATURA EN INVIERNO:** Los progenitores fueron acondicionados siguiendo 4 regímenes distintos. En el primero de ellos se reflejaron las condiciones medioambientales en el período del experimento y en los 3 siguientes se utilizaron tres condiciones de fotoperíodo diferentes utilizando en todos los casos un gradiente de temperatura de 14 a 18 ºC y una ración de alimento de 6 %.

1. Condiciones medioambientales: El cultivo fue mantenido durante todo el experimento siguiendo el fotoperíodo natural de la estación, próximo a las 11 horas de luz solar al inicio del experimento, y la temperatura del agua de mar era la misma que la de la ría en ese momento, el agua osciló desde 15 a 17 ºC durante todo el experimento. Es decir, temperatura ambiente y luz natural.
2. 8 horas de luz: Se mantuvo el cultivo con 8 horas constantes de luz durante todo el experimento, imitando de esta manera el fotoperíodo natural de otoño-invierno.
3. 16 horas de luz: 16 horas de luz al día incidiendo sobre las ostras a lo largo de todo el experimento, imitando el fotoperíodo natural durante la primavera.
4. Gradiente (de 8 a 16 h/luz): Gradiente de luz que comienza con 8 horas y va progresando a lo largo del mes hasta alcanzar las 16 horas de luz diarias.



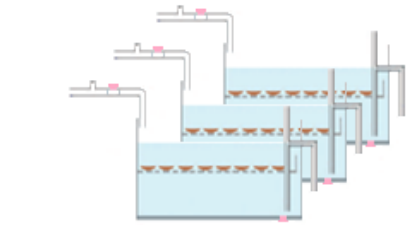
El experimento se llevó a cabo partiendo de una población de 370 individuos adultos de ostra plana, con una talla media de 8,05 cm de largo y 8,46 cm de ancho y un peso medio de 106,66 g. La primera muestra de 10 individuos se recogió el día 2 de marzo de 2009 y se utilizó para determinar el estado inicial de desarrollo gonadal de la población en ese momento. Los individuos restantes, 360, se distribuyeron en cubetas plásticas utilizadas para los distintos acondicionamientos, 30 ostras en cada cubeta y por triplicado para cada régimen. Se realizaron 2 muestreos, a los 30 y 63 días y en cada uno se recogieron 6 ostras de cada acondicionamiento. Los individuos extraídos en cada muestreo se midieron con un calibre y se pesaron con la balanza Mettler® PM300. Primero se determinó el peso total de todos los individuos, tras lo cual se abrieron las ostras y se separó la concha de la vianda, pesando cada parte por separado. Inicio del acondicionamiento y muestreo inicial: 2 de marzo de 2009.

Peso húmedo carne = 138,9 g
Peso húmedo concha = 797,51 g
Peso total = 1066,62 g
Peso medio individuo = 106,66 g

EXPERIMENTO 5; EFECTO DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE TEMPERATURA, FOTOPERÍODO Y RACIÓN DE ALIMENTO EN INVIERNO: Se acondicionaron los progenitores siguiendo las condiciones más idóneas, en función de los resultados obtenidos previamente. El fotoperíodo elegido fue el de gradiente de 8 a 16 h/luz día. El acondicionamiento se realizó en 3 bandejas con 30 ostras cada una siguiendo las condiciones más idóneas, es decir:

- 6 % de ración de alimento.
- Gradiente de temperatura del agua que va aumentando de 14 a 18 ºC en un mes aproximadamente.

- Gradiente de fotoperíodo, las horas de luz que inciden sobre el cultivo van aumentando de 8 a 16 en el período de un mes.



El experimento se llevó a cabo partiendo de una población de 100 individuos adultos de ostra plana, con una talla media de 7,13 cm de largo y 7,25 cm de ancho y un peso medio de 70,98 g. La primera muestra de 10 individuos se recogió el día 20 de enero de 2010 y se utilizó para determinar el estado inicial de desarrollo gonadal de la población en ese momento. Los individuos del muestreo inicial se midieron con un calibre y se pesaron con la balanza Mettler® PM300. Primero se determinó el peso total de todos los individuos, tras lo cual se abrieron las ostras y se separó la concha de la vianda, pesando cada parte por separado. Los 90 individuos restantes se distribuyeron en 3 cubetas plásticas. Inicio del acondicionamiento y muestreo inicial: 20 de enero de 2010. Aproximadamente al mes, el 24 de febrero, se tenía previsto realizar el primer muestreo, lo que no fue posible puesto los progenitores ya habían desovado en su mayoría.

Peso húmedo carne = 97,22 g
Peso húmedo concha = 513,14 g
Peso total = 709,82 g
Peso medio individuo = 70,98 g

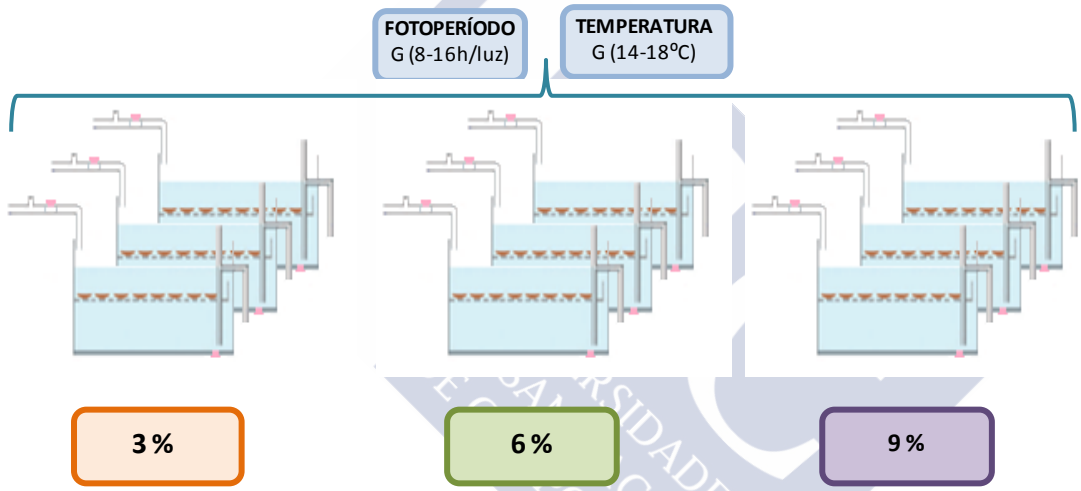
EFECTO DE LA RACIÓN DE ALIMENTO SOBRE EL ACONDICIONAMIENTO DE PROGENITORES DE *OSTREA EDULIS*

En los experimentos anteriores fue suministrada a los individuos acondicionados una ración de alimento del 6 % del peso seco de los individuos, suficiente para sostener el desarrollo gonadal sin la producción excesiva de pseudoheces.

La dieta suministrada a los reproductores acondicionados para este estudio se basa principalmente en el aporte de mezcla de monocultivos algales de las especies citadas posteriormente.

La cantidad de alimento suministrado a las ostras se controló regulando el flujo de la mezcla de algas mediante un circuito dosificador conectado al circuito del agua de mar.

EXPERIMENTO 6; EFECTO DE LA RACIÓN DE ALIMENTO EN OTOÑO: Se realizaron tres tipos de acondicionamiento que se diferenciaban en la cantidad de alimento suministrado. En un caso se administró el 3 % del peso seco de cada individuo, en gramos de microalgas al día, en el segundo caso el 6 % y el último recibía una ración de alimento del 9 %. Las condiciones de fotoperíodo y temperatura del agua son iguales para todos, se sometieron a un gradiente de temperatura, G (14-18 ºC) y a un gradiente de iluminación, G (8-16 h/luz). Los 3 tipos de acondicionamientos, por triplicado, se realizaron tal y como se muestra en el siguiente esquema.



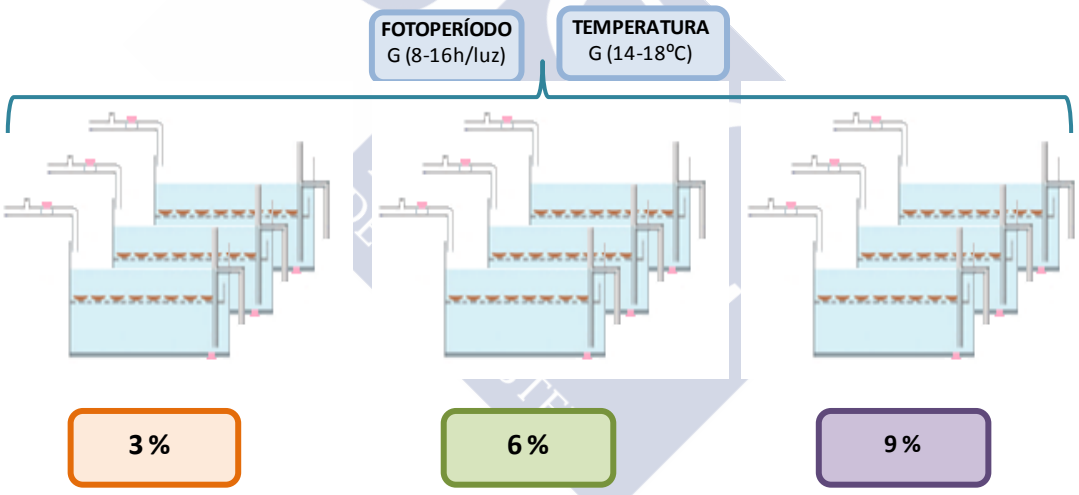
Para la realización de este experimento se partió de una población de 280 individuos adultos de ostra plana. Se inició el acondicionamiento y se analizaron las primeras muestras para conocer el estado gonadal de cada uno de los individuos el 30 de octubre de 2006, se analizaron 10 individuos, con una talla media de 9,09 cm de largo y 9,35 cm de ancho y un peso medio de 122,75 g. Los individuos restantes, 270, se distribuyeron en las cubetas plásticas utilizadas para los distintos acondicionamientos, 90 ostras divididas en 3 cubetas para el acondicionamiento del 3 %, otras 90 para el de 6 % y 90 más para el del 9 %. La temperatura del agua se ajustó a 14 ºC al inicio del experimento y fue aumentada 1 ºC a la semana hasta alcanzar los 18 ºC. Las condiciones de luz se ajustaron mediante un gradiente de 8 a 16 h/luz al día durante el mismo periodo.

Se realizaron 3 muestreos más, a los 14, 30 y 74 días y en cada uno se recogieron 6 individuos de cada acondicionamiento. Los individuos recogidos en cada muestreo se midieron con un calibre y se pesaron con la balanza Mettler® PM300. Primero se determinó el peso

total de todos los individuos, tras lo cual se abrieron las ostras y se separó la concha de la vianda, pesando cada parte por separado. Inicio del acondicionamiento y muestreo inicial: 30 de octubre de 2006.

Peso húmedo carne = 160,65 g
Peso húmedo concha = 1053,51 g
Peso total = 1227,46 g
Peso medio individuo = 122,75 g

EXPERIMENTO 7; EFECTO DE LA RACIÓN DE ALIMENTO EN INVIERNO: Al igual que en el experimento de otoño se utilizaron tres condiciones de acondicionamiento diferenciadas en la ración de alimento suministrado, 3 %, 6 % y 9 % del peso seco de microalgas por individuo al día. Las condiciones de luz y temperatura son las mismas que constan en el experimento 6.



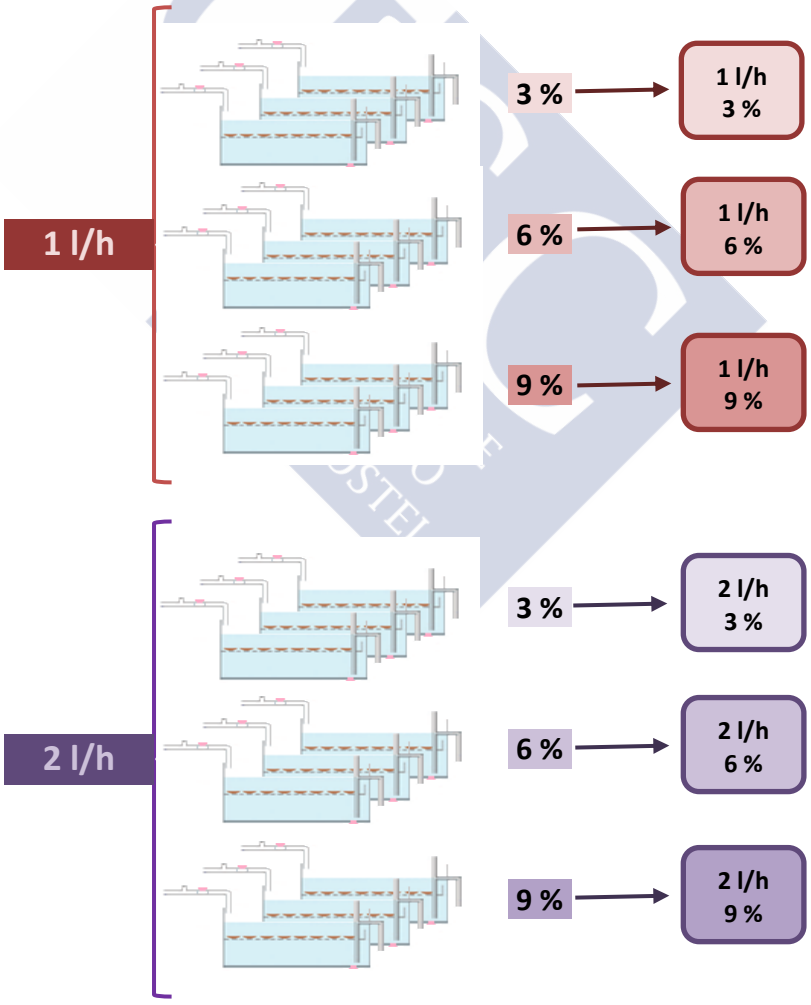
Los acondicionamientos van a seguir las pautas del anterior experimento. Se hizo un muestreo inicial el 25 de enero de 2007 para comprobar el estado inicial de 10 individuos y se acondicionaron los restantes, 270 individuos, siguiendo los tres regímenes de alimentación. A los 18 días, se recogieron 6 individuos de cada uno de los tres acondicionamientos y se midieron con un calibre y se pesaron con la balanza Mettler® PM300. Primero se determinó el peso total de todos los individuos, luego se abrieron las ostras y se separó la concha y la vianda, y se pesó cada parte por separado. Inicio del acondicionamiento y muestreo inicial: 25 de enero de 2007.

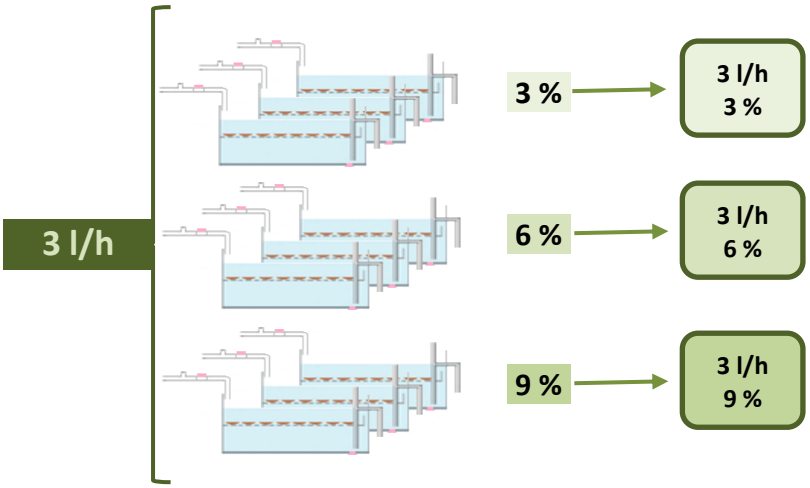
Peso húmedo carne = 165,99 g

Peso húmedo concha = 1291,00 g
Peso total = 1476,20 g
Peso medio individuo = 147,62 g

EFECTO COMBINADO DEL FLUJO DEL AGUA Y LA RACIÓN DE ALIMENTO SOBRE EL ACONDICIONAMIENTO DE PROGENITORES DE *OSTREA EDULIS*.

EXPERIMENTO 8; EFECTO DEL FLUJO DE AGUA Y LA RACIÓN DE ALIMENTO: Se realizaron nueve acondicionamientos distintos en función del flujo de agua suministrado a cada cultivo combinado con tres raciones de alimento diferente. Los tres flujos de agua utilizados son: 1 l/h, 2 l/h y 3 l/h por cada individuo acondicionado. Cada uno de estos flujos se combinó con las tres raciones diferentes de alimento, 3 %, 6 % y 9 %.





Para realizar este experimento se partió de una población de 820 individuos adultos de ostra plana, con una talla media de 9,29 cm de largo y 9,20 cm de ancho y un peso medio de 145,55 g. La primera muestra de 10 individuos se recogió el día 3 de mayo de 2006 y se utilizó para determinar el estado inicial de desarrollo gonadal de la población en ese momento. Los individuos restantes, 810, se distribuyeron en cubetas plásticas utilizadas para los distintos acondicionamientos, 90 ostras distribuidas en tres cubetas para cada acondicionamiento. Se realizó un muestreo más, a los 26 días, en el que se recogieron 6 individuos en cada uno de los acondicionamientos. Los individuos recogidos en cada muestreo se midieron con un calibre y se pesaron con la balanza Mettler® PM300. Primero se determinó el peso total de todos los individuos, tras lo cual se abrieron las ostras y se separó la concha de la vianda, pesando cada parte por separado. Inicio del acondicionamiento y muestreo inicial: 3 de mayo de 2006.

Peso húmedo carne = 219,68 g
Peso húmedo concha = 1182,6 g
Peso total = 1455,46 g
Peso medio individuo = 145,55 g

3.2 ALIMENTACIÓN.

3.2.1 CULTIVO DE MICROALGAS.

Se conoce como microalgas a una gran cantidad de especies que constituyen el fitoplancton que abarca desde organismos autótrofos hasta microflagelados y microciliados auxótrofos. Estas especies aportan un alto contenido nutricional y ofrecen grandes facilidades de manejo en sistemas de cultivo.

Las microalgas marinas unicelulares se cultivan para suministrar como alimento en las diferentes etapas del cultivo de moluscos en criadero. La razón de su utilización es su elevado contenido proteico que incluye aminoácidos esenciales, además de lípidos ricos en ácidos grasos insaturados, hidratos de carbono, vitaminas y otras moléculas como esteroles, carotenoides y enzimas. Normalmente se cultivan en agua de mar tratada y enriquecida con nutrientes adicionales como nitratos, fosfatos, oligoelementos esenciales, vitaminas y dióxido de carbono como fuente de carbono.

La técnica de cultivo de microalgas consiste en inocular a un volumen variable de agua de mar previamente enriquecida con nutrientes, un número relativamente pequeño de células (entre 50 y 150 cél/µl de cultivo). En condiciones de aireación, temperatura y luz adecuada, el cultivo se desarrolla rápidamente y en pocos días llega a la concentración de células que tenía el inóculo inicial (Helm y Bourne, 2004).

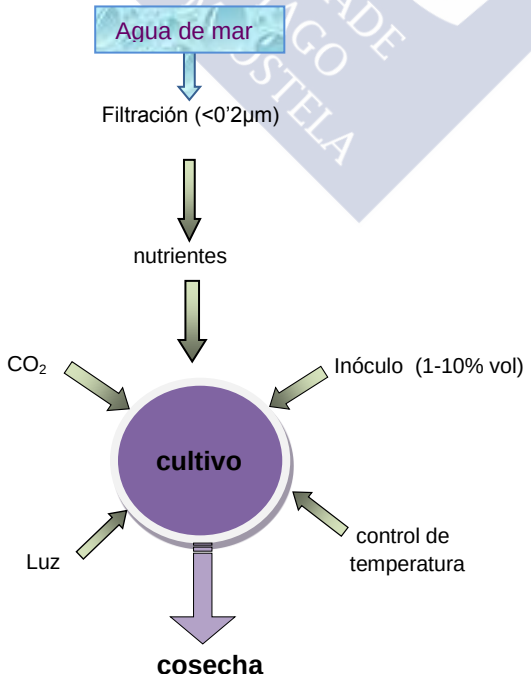


Figura 16. Diagrama esquemático del proceso de cultivo de microalgas con los diferentes aportes necesarios.

Figura 1. Diagrama esquemático del proceso de cultivo de microalgas con los diferentes aportes necesarios.

La necesidad de cultivar microalgas surge porque la concentración de fitoplancton natural en el agua de mar utilizada en los criaderos es insuficiente para garantizar un crecimiento óptimo de los moluscos cultivados. De ahí que el éxito de los criaderos dependa en gran medida del cultivo de microalgas y supone alrededor del 40 % de los costes totales de producción.

El cultivo de microalgas se realizó en las instalaciones de la Cofradía de Pescadores San Bartolomé de Noia en O Freixo, bajo la supervisión del doctor Arturo Silva.

Las instalaciones están divididas en tres zonas con diferentes sistemas de producción de fitoplancton. Una zona en la que el cultivo se realiza en pequeños volúmenes en una c*ámara de cultivo* que está aislada térmicamente a temperatura de 18 $\pm$ 1 ^{o}C e iluminada durante las 24 h con luz artificial. El segundo sistema de producción se realiza en una sala a modo de invernadero con luz natural y luz artificial, el agua del sistema se somete a tratamiento físico (filtración y esterilización). El tercer sistema se lleva a cabo en piscinas o estanques exteriores bajo condiciones naturales, el agua de mar sólo sufre un filtrado grosero, este sistema es el más utilizado para el cultivo de fitoplancton natural, los *blooms naturales*.

El cultivo del fitoplancton se ve afectado por parámetros físico-químicos, como son la luz, la temperatura, el pH, la concentración de nutrientes, la disponibilidad de CO_2, y también la salinidad y la calidad del agua.

Luz: Para no elevar la temperatura del agua se utilizaron tubos fluorescentes de 40-60 W de potencia colocados de manera que el aprovechamiento de la energía lumínica fuese máximo. Se iluminan los cultivos durante las 24 h del día para un mayor rendimiento siendo la intensidad de luz óptima de 1600 - 1900 lux.

Temperatura: El cultivo de microalgas se mantuvo entre los 18 - 20 ^{o}C para evitar que las variaciones de temperatura provoquen desequilibrios en la composición bioquímica de las células. Para esto se utilizó una cámara isotérmica en las primeras fases y en las siguientes se utilizaron invernaderos para mantener la temperatura en un rango estable sin que alcance valores extremos.

pH: Fue mantenido en los valores idóneos, entre 7 y 8, empleando un medio de cultivo con una composición adecuada y capacidad tamponadora y, al mismo tiempo controlando la cantidad de CO_2 disuelto, suministrando aire enriquecido con gas carbónico.

Salinidad: El efecto que ejerce sobre los cultivos está íntimamente relacionado con las concentraciones de nutrientes. Para las especies cultivadas los valores óptimos se encuentran en 27-35‰. Es un parámetro muy difícil de controlar y se evitan problemas

teniendo las instalaciones en zonas donde los niveles no bajen de 32‰.

Calidad del agua: La calidad óptima del agua es primordial y se ha conseguido al seleccionar la ubicación de la toma de agua en un lugar adecuado y, además, fue controlada mediante procesos de filtración, haciendo circular el agua a través de una batería de filtros de cartucho de distinto tamaño de poro. En algunas fases, en las que se necesita mayor calidad de cultivo, el agua fue esterilizada antes de su uso para eliminar bacterias y otros microorganismos que pudieran resultar nocivos para el cultivo.

El objetivo del cultivo era conseguir altas densidades de células, para lo que el agua de mar fue enriquecida con los nutrientes requeridos por el metabolismo celular como son los macronutrientes: nitrógeno, fósforo y también silicato sódico en disolución en agua destilada para los cultivos de diatomeas, ya que es necesario para el desarrollo de la pared celular de estos organismos, y micronutrientes y vitaminas. Se ha utilizado como medio de cultivo el Algal-1, que es un preparado nutritivo industrial y produce grandes rendimientos en cultivos a pequeña escala y bajo condiciones controladas.

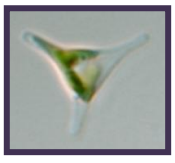
La principal fuente de alimento para los reproductores, durante el acondicionamiento, provenía de mezcla de cultivos monoespecíficos.

Las especies que se utilizaron como alimento en las distintas etapas de producción del cultivo integral fueron seleccionadas por la disponibilidad de obtención de cepas y su capacidad para crecer en cultivos masivos, por su rápido desarrollo y su valor nutritivo y digestibilidad.

Las especies de microalgas seleccionadas para la alimentación de los progenitores de *Ostrea edulis* durante el acondicionamiento fueron las siguientes:

Bacillariophyta: Diatomeas. Las microalgas de esta clase aportan minerales y ácidos grasos ω-3 al cultivo. Estos ácidos grasos son considerados por algunos autores como indispensables para la supervivencia de cultivos larvarios y el acondicionamiento de progenitores. Clase *Bacillariophyceae* y *Coscinodiscophyceae:*

- *Phaeodactylum tricornutum*----------



- *Skeletonema costatum*
- *Chaetoceros calcitrans* ----------



Haptophyta: Clase *Coccolithophyceae* y clase *Chrysophyceae,* se utilizan como fuente de vitaminas del grupo B, hidratos de carbono y una pequeña porción de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga.

- *Isochrysis galbana*
- *Isochrysis aff galbana (T-iso)* ----------



- *Monochrysis lutheri* (Clase *Chrysophyceae*)----



Chlorophyta: Clase *Prasinophyceae*, aportan fundamentalmente proteínas, hidratos de carbono y vitaminas A, C y E.

- *Tetraselmis suecica* --------





Cada grupo posee unas cualidades nutritivas propias. Todas estas microalgas poseen una pared celular fina por lo que son fácilmente digeribles y su mezcla representa una dieta rica y muy próxima a la que tendrían los reproductores en el ambiente natural.

Tabla 1. Composición de contenidos nutritivos en porcentajes de materia seca total de algas fitoplanctónicas (Polanco *et al*., 2000).

	Lípidos	Glúcidos	Proteínas	Cenizas
Clase *Bacillariophyceae*	5	14	33	32
Clase *Chrysophyceae*	8	24	53	21
Clase *Prasinophyceae*	5	23	55	15

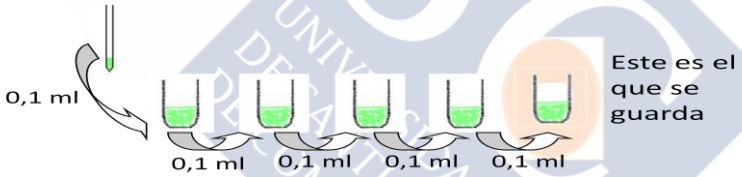
Todas estas especies se emplean como alimento en todas las fases de producción dentro de los criaderos pero su modo de cultivo variará en función de la calidad que se necesite en cada paso del proceso.

En condiciones intensivas, el cultivo se llevó a cabo en una cámara a temperatura y luz constante, se utilizaron envases de pequeño tamaño, transparentes y que se pueden esterilizar en autoclave: tubos de mantenimiento de cepas de 20 ml, cepas de renovación de 250 ml y botellones de vidrio de 2000 ml y 5000 ml. Todos los envases fueron esterilizados y se

rellenaron con agua de mar que previamente había sido filtrada a 0,2 µm y esterilizada en el autoclave (agua de mar estéril). A esta agua se le añadieron los nutrientes adecuados para cada especie en la proporción óptima y también se inocularon con una pequeña cantidad de una determinada especie. A partir de estos inóculos se desarrollaron los cultivos de microalgas a distintos volúmenes, botellones de Pirex® de 2 y 5 l y las bolsas de polietileno de 400 l. Los volúmenes superiores a medio litro fueron agitados con aire a presión al que se le añadió un 1% en volumen de anhídrido carbónico para favorecer la fotosíntesis y mantener el equilibrio de gases y el pH.

Cada especie de microalgas se cultivó por separado y en volúmenes reducidos, lo que se conoce como *monocultivos intensivos*, siguiendo las siguientes etapas:

1. Inóculos de reserva: se realizaron en tubos de ensayo de 30 ml en agua de mar estéril y enriquecida con nutrientes y como previsión de contaminaciones accidentales de los cultivos cada mes se replicaron y se renovaron los tubos, cogiendo 0,1 ml del último e inoculándolo en un tubo nuevo, se hacen series de 5 tubos como mínimo y se guarda el último. De esta forma se garantiza la pureza de las cepas monoalgales. Los inóculos se mantuvieron en una habitación cerrada, en estantes iluminados con luz fluorescente, a temperatura constante y sin aireación.



2. Cepas: se mantuvieron en matraces Erlenmeyer de 250 ml en las mismas condiciones que los inóculos. Forman el inóculo de partida adecuado para los botellones. Las cepas se renovaron cada dos semanas, inoculando a la nueva cepa 1 o 2 ml de una cepa de preparación anterior, comprobando previamente en el microscopio el buen estado de las células y la ausencia de contaminantes.

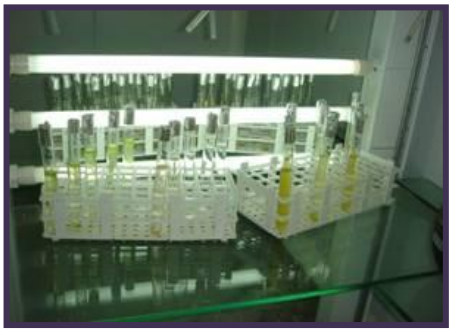


Figura 17. Tubos de ensayo con los inóculos de reserva de los cultivos monoalgales.



Figura 18. Erlenmeyers con las cepas monoalgales.

3. Botellones de 2 y 5 litros: se empezó por los botellones de 2 l a los que se le añadió el inóculo de la especie de microalga del Erlenmeyer, el medio Algal-1 y una varilla de vidrio para la agitación. Se hizo un control de la producción mediante el recuento de la concentración de microalgas en los cultivos en una cámara de Neubaüer, cogiendo una muestra diaria de cada botellón. Cuando el cultivo alcanzó la densidad óptima deseada se realizó una extracción parcial que sirvió para inocular el botellón de 5 l. El botellón de 5 l se preparó también con inóculos monoespecíficos en agua de mar filtrada (0,2 µm) y esterilizada por autoclave, con aporte adecuado de nutrientes y se cosecharon una vez transcurridos de 12 a 15 días, dependiendo de la especie, ya que la velocidad de crecimiento varía de una especie a otra.

A los cultivos en botellones se le añadió Algal-1 en una proporción de 5 ml/l; se trata de un preparado nutritivo que contiene macroelementos (N y P), oligoelementos (Fe, Zn, Mn, Mo, Cu,…) y vitaminas como la B1 y B12. También se añadió silicato sódico en disolución (disolución de 30 mg/l y se le añadió 1 mg por cada litro) en agua destilada a los botellones en los que se cultivan diatomeas ya que es necesario para el desarrollo de la pared celular de estos organismos.

Los botellones una vez inoculados se mantuvieron en una cámara isoterma a $18 \pm 1\ ^{o}C$ y con iluminación continua para que alcanzasen el estado estacionario en el menor tiempo posible, considerado el momento óptimo de extracción; esto se consiguió a los 12 - 15 días en función de la especie. Los cultivos fueron mantenidos en agitación continua mediante el aporte de aireación forzada y con adición de CO_2 para la regulación del pH, sin superar el 1 % en volumen de aire aportado.



Fig. 19. Botellones de vidrio de 2 y 5 l.



Fig. 20. Detalle de los botellones de 5 l.

4. Cultivo en bolsas de 400 l. Los cultivos a escala intermedia se prepararon a partir de inóculos procedentes de los botellones de 5 l. Fueron cultivados a temperatura ambiente, con agua de mar filtrada a 0,2 µm y esterilizada con ultravioleta u ozono. Se le añadió la proporción adecuada de nutrientes agrícolas solubles, empleándose como nutrientes una solución de abono NPK con oligoelementos para pulverización foliar (Nutrileaf). Estos

cultivos estaban sometidos a iluminación continua con luz artificial durante las noches y luz natural por el día. Se realizó un recuento de la concentración de microalgas para saber cuándo alcanzaban la densidad óptima y así poder ser usadas como alimento en el acondicionamiento. Estos cultivos fueron utilizados para la alimentación de progenitores y postlarvas.

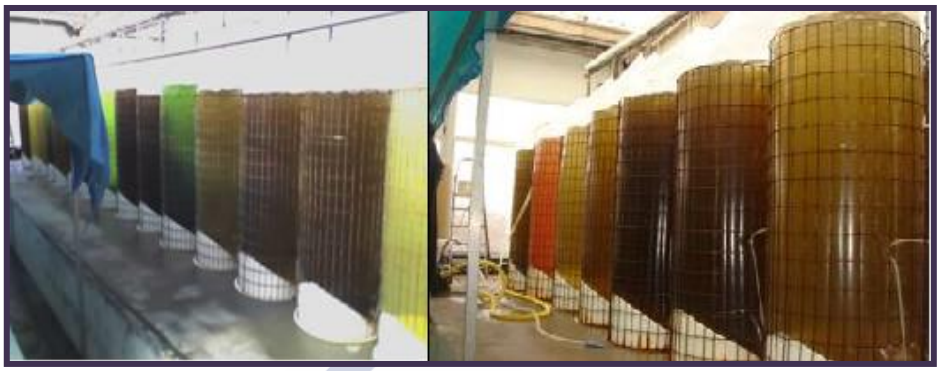


Figura 21. Distintos sistemas de cultivo microalgal a escala intermedia en bolsas de polietileno iluminadas con luz natural.

Los cultivos extensivos se realizaron en invernaderos pues así se consigue ahorrar en iluminación y se mantiene una temperatura en torno a los 18 – 20 ^{o}C la mayor parte del año. Se utilizaron diferentes sistemas de cultivo:

1. Cultivos en tanques de 2000 l. Se llevaron a cabo en invernaderos con temperatura ambiente y luz natural. El agua de mar se filtró a 1 µm, sin esterilización previa y se le añadieron los nutrientes agrícolas solubles. Estos cultivos se utilizaron para las etapas de preengorde y alimentación de progenitores.

2. Cultivos en piscinas de elevado volumen. Agua de mar cruda, es decir, filtrada a 100 µm y sin esterilizar, complementada con nutrientes para favorecer el crecimiento de las especies del fitoplancton natural de nuestras rías, provocando los *blooms naturales* que están constituidos principalmente por diatomeas. Se mantuvieron con aireación de fondo como agitación. Es el alimento que se le suministró a la semilla de talla superior a 700 - 900 µm. Se utilizaron también para el preacondicionamiento de los progenitores.



Figura 22. Piscinas externas a las instalaciones donde se lleva a cabo principalmente el cultivo de *bloom natural*.

La dieta de los reproductores acondicionados para este estudio se basó principalmente en el aporte de flagelados y diatomeas (80 - 90 % diatomeas) procedentes de los cultivos monoalgales, a una densidad de 6 % (w/w) del peso seco de los individuos en peso seco de microalgas (*Tetraselmis*, *Isochrysis* y *T-Iso*, *Monochrysis*, *Skeletonema sp., Phaedactylum* y *Chaetoceros sp.*).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.2.2 CÁLCULO DE LA RACIÓN DE ALIMENTO.

Para el cálculo de la ración de alimento que hay que proporcionar a cada cubeta fue necesario calcular el peso seco unitario de cada ostra, para lo que se secó la carne de 10 ostras en una estufa de aire forzado a 80 ^{o}C hasta peso constante. El peso seco unitario así calculado fue 2,87 g y por lo tanto la ración por individuo, el 6% de este valor, sería de 0,1722 g/día.

Para calcular cuál es el porcentaje en peso seco de microalgas, en relación al peso seco de la carne de la ostra, se partió de una muestra de microalgas de un volumen determinado (200 ml) que fue sometida a filtración forzada para que las microalgas quedaran retenidas en el filtro. El filtro seco se pesa previamente en una balanza Mettler® con una aproximación a la décima de miligramo. Acabada la operación el filtro se introdujo en la estufa de desecación a 80 ^{o}C durante 24 h, pesándose a continuación para determinar por diferencia de peso, el peso seco de las microalgas. Este proceso se realizó por duplicado y se calculó el valor medio.

Tabla 2. Relación del peso húmedo y seco del filtro con las microalgas.

	PESO INICIAL FILTRO	PESO FILTRO + MICROALGAS	PESO SECO MICROALGAS	PESO MEDIO
FILTRO 1	0,07823 g	0,0909 g	0,0126 g	0,01225 g
FILTRO 2	0,0794 g	0,0913 g	0,0119 g	

El valor de 0,01225 g corresponde a 200 ml de agua, así que en 1 litro tendríamos 0,06126 g en peso seco de microalgas. Como en cada cubeta hay 30 unidades hubo que suministrar 5,16 g de microalgas al día a cada cubeta, lo que representa 85 l/día de cultivos microalgales en cada cubeta de acondicionamiento.

3.2.3 SEGUIMIENTO DE LOS CULTIVOS MICROALGALES.

El estudio de crecimiento de los cultivos intensivos de microalgas en botellones de 2 y 5 litros mostró que no todas las especies alcanzaron la misma densidad, siendo el tamaño en gran medida el determinante de la tasa de crecimiento de cada especie. El tiempo de detención es el número de días que transcurren entre la inoculación y la máxima densidad. El crecimiento de las microalgas es ascendente hasta que alcanzan un límite de densidad a partir del cual no se dividen más por falta de nutrientes (período de detención).

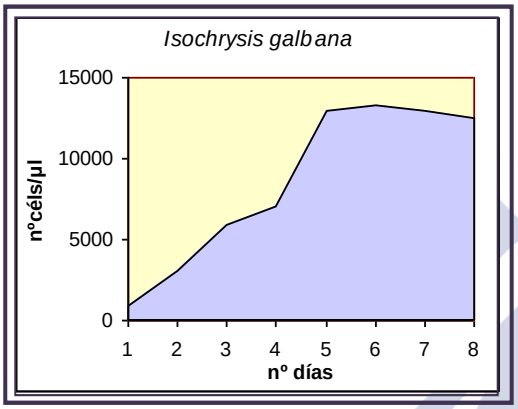


Figura 23. Crecimiento celular de *I. galbana* cultivada en botellón de 2 l.

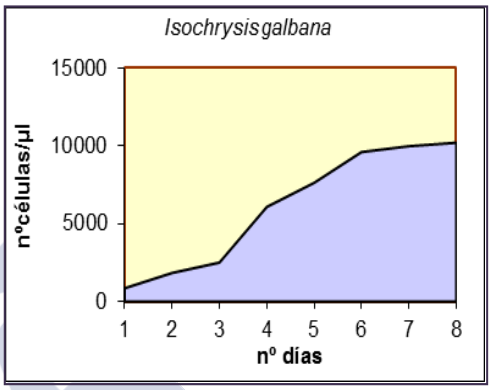


Figura 24. Crecimiento celular de *I. galbana* cultivada en botellón de 5 l.

Isochrysis galbana (**Figuras 23 y 24**) que es un flagelado del grupo Haptophyceae, alcanza su valor máximo de densidad celular alrededor de los 7 - 8 días.

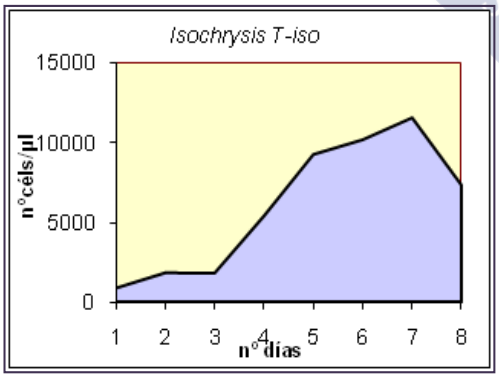


Figura 25. Crecimiento celular de *I. T-iso galbana* cultivada en botellón de 2 l.

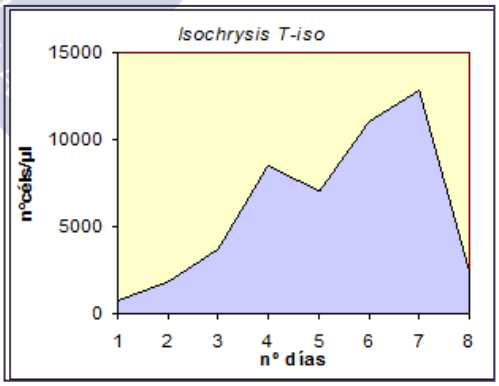


Figura 26. Crecimiento celular de *I .T-iso galbana* cultivada en botellón de *5* l.

Isochrysis T-iso (**Figuras 25 y 26**) también pertenece al grupo Haptophyceae y tarda entre 6 - 7 días en llegar a su máximo, alcanzando concentraciones de 12000 y 13000 células por microlitro.

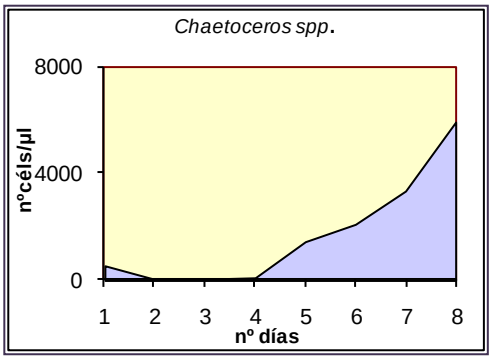


Figura 27. Crecimiento celular de *Chaetoceros spp.* cultivada en botellón de 2 l.

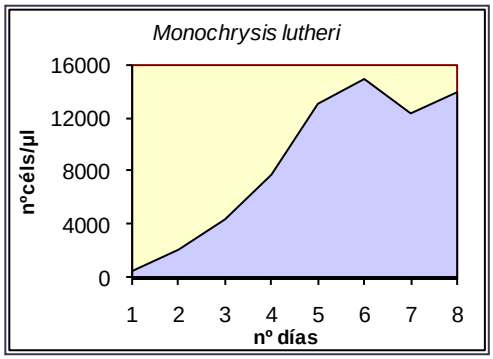


Figura 28. Crecimiento celular de *Monochrysis lutheri* cultivada en botellón de 2 l.

Chaetoceros spp. (**Figura 27**) es una diatomea (Bacillariophyta de la Clase Coscinodiscophyceae) con pared celular silícea, llamada frústulo. Aunque los primeros días de cultivo tuvo un crecimiento casi nulo al cuarto día comenzó a desarrollarse normalmente y fueron necesarios más días de cultivo para que alcanzase la máxima densidad. *Monochrysis lutheri* (**Figura 28**) pertenece a la clase Crysophyceae y resultó ser la microalga de crecimiento más rápido, alcanzando su mayor densidad celular a los 6 días.

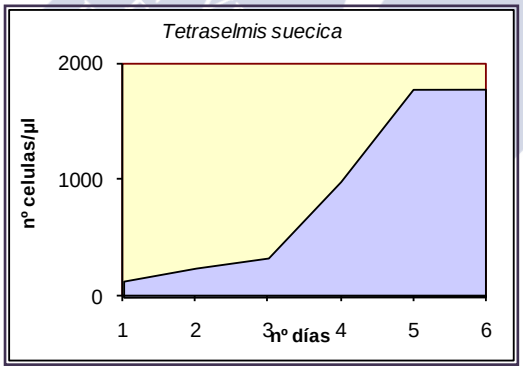


Figura 29. Crecimiento celular de *Tetraselmis suecica* cultivada en botellón de 2 l.

Tetraselmis suecica (**Figura 29**) pertenece a la clase Prasinophyceae y alcanzó una densidad celular mucho menor, porque esta especie es de mayor tamaño que el resto.

En la **Tabla 3** se presentan los valores de tiempo de detención y recuentos máximos alcanzados para las cinco especies de microalgas cultivadas en botellones.

Tabla 3. Evolución de los cultivos microalgales en botellones de 2 y 5 l para las especies de microalgas utilizadas, tiempo de retención en días, número de células por µl y por ml.

Botellones	Especie	Tiempo de detención	Nº células/µl	Nº células/ml
2 litros	*Chaetoceros spp.*	8 - 9 días	6000	6×10^6
	Isochrysis galbana	6 - 7 días	13000	13×10^6
	Isochrysis T-iso	6 - 7 días	12000	12×10^6
	Monochrysis lutheri	6 días	15000	15×10^6
	Tetraselmis suecica	5 - 6 días	1750	$1{,}75 \times 10^6$
5 litros	*Isochrysis galbana*	8 días	10000	10×10^6
	Isochrysis T-iso	6 - 7 días	13000	13×10^6

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.3 RECOGIDA DEL MATERIAL BIOLÓGICO.

Se recogieron del medio natural, a través de la pesca, 200 o 800 ejemplares (dependiendo del experimento) de reproductores de *Ostrea edulis* de una talla similar y se trasladaron a la planta para proceder al estudio del proceso de acondicionamiento. Los ejemplares fueron separados en distintas bandejas o cubetas para someterlos a las distintas condiciones de luz, temperatura, dieta, flujo en función de las condiciones de cada experimento. Antes del acondicionamiento de las ostras se realizó un muestreo inicial, 10 - 12 individuos fueron llevados al laboratorio donde se analizaron para determinar el estado inicial de desarrollo gonadal y a través de los sucesivos muestreos fue posible observar cómo evolucionaba el desarrollo en cada acondicionamiento con el paso del tiempo.

Las muestras fueron procesadas inmediatamente después de la llegada de las ostras al laboratorio ya que el tejido gonadal es especialmente sensible a la degradación (Pazos, 1993).

Previamente se procedió a determinar la longitud y la anchura de cada individuo con un calibre y luego, con una balanza el peso húmedo total.



A continuación, se abría la concha, con el máximo cuidado para no dañar ningún órgano interno y con las valvas entreabiertas se pasaba un cuchillo para cortar el músculo aductor y así separar las valvas por completo. Con cuidado, se separó la concha de la carne y se pesaron por separado para calcular el peso húmedo de la concha y el peso húmedo de la carne.

A continuación y encima de una tabla de cortar y con un bisturí se procedió a la separación de las branquias, el manto, los palpos y el músculo, quedándonos únicamente con el tejido gonadal que rodea la masa visceral.

Con la ayuda del bisturí, las pinzas y unas tijeras de disección se separó el tejido gonadal, que está recubriendo los órganos digestivos, del resto del animal y se cortaron porciones de gónada, lo más finas posibles para evitar la contaminación con tejido digestivo. Se intentó extraer el mayor número de porciones, debido al posible desarrollo asincrónico de la gónada, y así poder obtener una imagen más real o global del estado general de desarrollo gonadal del individuo. Las porciones obtenidas se utilizaron para la realización del estudio histológico y así observar el estado de los tejidos y el grado de desarrollo en el que se encuentra el individuo. Todas las porciones fueron marcadas para identificar el individuo al que pertenecen. Todos los cortes que procedían del mismo individuo fueron guardados en el mismo casete y numerados antes de introducirlos en el líquido fijador.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.4 PROTOCOLO DE HISTOLOGÍA

Fijación:

El proceso de fijación preserva los tejidos ya que detiene la autolisis pero también permite que los tejidos se mantengan sin cambios después de los tratamientos. Los tejidos se endurecen ligeramente pero no se rompen y así permiten que las estructuras tisulares no se encojan y permanezcan en un estado muy cercano a *in vivo.*

Después de hacer varias pruebas con el fijador Davidson y aunque se obtuvieron buenos resultados finalmente se eligió el líquido de Bouin ya que se lograba una coloración más brillante de los tejidos, un mayor contraste entre las distintas estructuras presentes en la gónada y se adaptaba perfectamente al ritmo de trabajo.

La fijación se realizó por inmersión en el fijador Bouin, preparado con agua de mar artificial para evitar roturas celulares debidas a un choque osmótico. El agua de mar debe tener una salinidad del 29‰; si excedía esta salinidad se diluía hasta que alcanzaba este valor con un poco de agua destilada. Las piezas se introdujeron dentro del líquido fijador lo antes posible para evitar la degradación del tejido, ya sea por autolisis o por la acción bacteriana. Es recomendable que el grosor de las piezas que se van a fijar no exceda de los 5 ó 6 mm.

El Bouin está formado por ácido pícrico, formaldehido y ácido acético glacial. Es muy útil para tejidos blandos, y preserva bien el núcleo y el glucógeno. Antes de la inclusión en parafina conviene eliminar el ácido pícrico mediante lavados en etanol de 70° porque puede provocar una mala inclusión o afectar a la tinción.

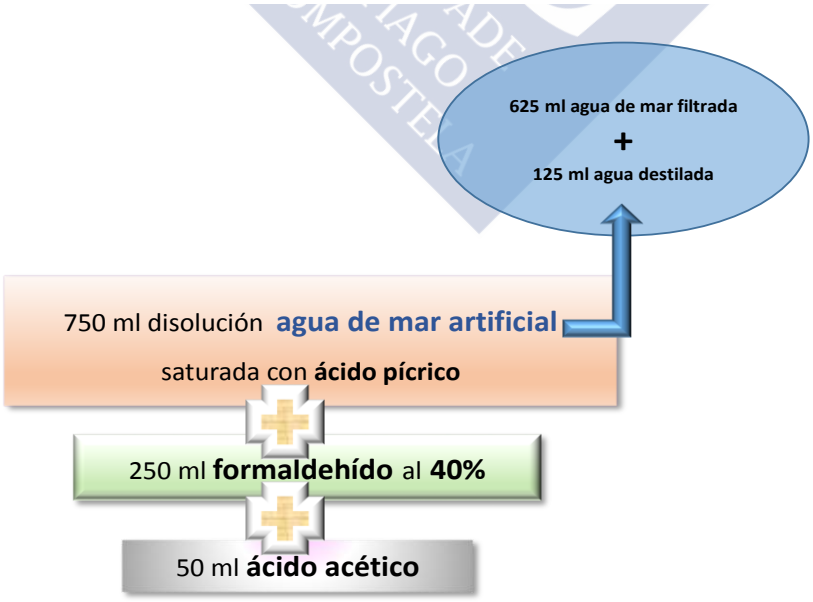
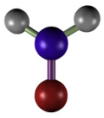
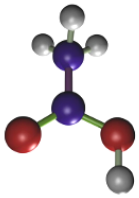


Figura 30. Esquema de la preparación del líquido fijador de Bouin.

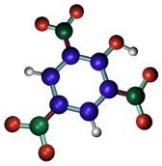
Formaldehido: Actúa mediante la formación de puentes entre las moléculas tisulares. Es un fijador ampliamente usado por la buena preservación del tejido, actúa como conservante, produce poca retracción tisular, es un buen fijador de complejos lipídicos y previene el endurecimiento de los baños de alcoholes posteriores.



Ácido acético: Su proceso de fijación se basa en cambiar el estado coloidal de las proteínas. Se suele usar en combinación con otros fijadores que causen contracción tisular. Es el fijador ideal para ácidos nucleicos y nucleoproteínas. Como inconvenientes cabe destacar la destrucción de las mitocondrias y mala fijación de membranas y citoplasma.



Ácido pícrico: produce la fijación porque las sales del tipo picrato coagulan con las proteínas de los tejidos. Preserva bien la estructura celular, no produce retracciones y deja los tejidos suaves cuando el tiempo de fijación es óptimo, penetra bien, preserva bien el glucógeno y los lípidos.



Los casetes que contienen las muestras, un casete para cada individuo, fueron introducidos en los frascos que contienen el fijador Bouin durante 18 horas. Una vez transcurrido este tiempo se cambiaron a otros frascos que contienen etanol de 70º; previamente al cambio se secan los casetes con papel de filtro para eliminar la mayor cantidad de Bouin antes de introducirlos en alcohol. Una vez que se llega a este paso se puede detener el proceso durante días o incluso semanas. Este baño de etanol fue utilizado para extraer el exceso de Bouin, se deja durante uno o dos días para que se elimine al máximo el color amarillo y los restos del fijador. Se realizaron varios baños de etanol de 70º si se veía muy sucio. Justo antes de comenzar la deshidratación se repitió un baño con etanol de 70º limpio.

Deshidratación:

Es un paso necesario para eliminar por completo toda el agua que se pueda extraer de los tejidos fijados, así como los restos de fijador que pudieran quedar en el tejido.

Para la deshidratación se utilizaron alcoholes etílicos, se realizaron baños sucesivos de etanol de riqueza creciente y de acuerdo con los siguientes tiempos:

3 baños en etanol de 70º ---------- 1 hora cada uno.
1 baño en etanol de 96º ---------- 1 hora.
3 baños en etanol de 100º --------- 1 hora cada uno.

Se utilizó etanol absoluto PRS de Panreac y a partir de éste se realizaron las diluciones con agua destilada para la preparación del etanol de 96º y 70º.

Es conveniente agitar los baños previamente y cada cierto tiempo para que el agua no quede depositada en el fondo.

El siguiente paso es el **Aclarado**. Ya que el alcohol no es miscible con la parafina hay que realizar un paso intermedio para sustituir el alcohol o agua que pueda quedar entre los tejidos por un líquido que sí sea soluble en parafina. Primero se utilizó el xileno que es un buen agente aclarante ya que es muy compatible con la parafina; más tarde se cambió a isoparafina H, que es un sustituto del xileno, no aromático, prácticamente inodoro y mucho menos tóxico que el xileno, así que además de ser un gran aclarante es menos problemático.

2 baños con xileno o isoparafina H ---------- 20 minutos cada uno.

El xileno utilizado fue xileno para análisis, de Riedel-deHaën. Posteriormente se pasó al uso de isoparafina H de Panreac.

Inclusión en parafina

La inclusión es el proceso de rodear un tejido con una sustancia firme, tal como la parafina, para poder realizar posteriormente secciones muy delgadas. La parafina es una mezcla de hidrocarburos sólidos derivados del petróleo. Es un buen medio de inclusión pues es fácilmente absorbida por el tejido, aportándole consistencia y además es un excelente conservante. Hay varios tipos distintos que se diferencian en el punto de fusión. La parafina utilizada en este trabajo fue Parafin Microscopy Histosec® en pastillas de Merck, que tiene un punto de fusión de entre 56 y 58 ºC.

La inclusión se realizó en una estufa Memmert a 61 ºC. Los casetes procedentes de un mismo acondicionamiento se introdujeron en un frasco de polipropileno con tapa de rosca y se añadió parafina hasta cubrirlos por completo. Se realizaron tres baños de parafina; los dos primeros son para que los tejidos liberen todo el xileno o isoparafina H que contienen, para lo cual es necesario un mínimo de 2 horas en cada baño antes de pasar al baño definitivo con parafina limpia, que es la que va a quedar embebida en los tejidos para darle consistencia ante la cuchilla. Este último baño tiene que ser de 4 horas como mínimo y siempre que fue posible se dejó toda la noche.

Montaje de los bloques

Las porciones de tejido gonadal extraídas de los individuos se montaron en bloques de parafina para facilitar su corte en el microtomo. Para la realización de este proceso se ha utilizado un dispensador de parafina eléctrico de P-Selecta modelo 4000490 (Figura 31).

Se utilizaron moldes de inclusión metálicos, la base se rellenó con parafina y se introdujo la porción de gónada cuidando que su orientación fuese la correcta, es decir, que la parte externa del tejido gonádico quedase hacia el exterior del bloque y hacia el interior la zona en contacto con el digestivo, además, las secciones de tejido deben ser incluidas perfectamente planas para asegurarse de que se obtenga una sección completa y debe haber un margen adecuado (aproximadamente 2 mm) de medio de inclusión rodeando el tejido para que el apoyo a la hora del corte sea máximo.

Se rellenó el molde con parafina evitando que la muestra quede a flote ya que esto complicaría el posterior corte al micrótomo. Después se colocó la rejilla o casete, que lleva la identificación individual de cada muestra, y se cubrió ligeramente con parafina para que quede bien sujeta al resto del bloque. Una vez que se enfriaron a temperatura ambiente durante unos minutos, las rejillas se introdujeron en una bandeja de agua con hielo para que la parafina solidifique y se puedan extraer sin problema del molde metálico (Figura 32). Se limpiaron los excesos de parafina que quedaban por los laterales. Una vez preparados, los bloques fueron conservados en la nevera a 4 ^{o}C hasta su posterior corte.



Figura 31. Dispensador de parafina eléctrico utilizado para el montaje de los bloques.



Figura 32. Detalle de los bloques ya montados en una bandeja con agua e hielo.

Cortes al microtomo

Los cortes se realizaron a partir de los bloques hechos previamente; el objetivo de la realización de los cortes es el de obtener una muestra de los tejidos lo suficientemente fina que permita su estudio microscópico después de la tinción y el montaje. Es aconsejable mantener en todo momento los bloques fríos para evitar problemas a la hora del corte.

Los cortes se hicieron en un micrótomo Shandon Finesse 77510250GB y con cuchillas S35 stainlesssteel de Feather. Las secciones se cortaron a 5 µm.

Una vez realizados los cortes se pasaron por un baño de agua o de flotación con agua destilada a 38 - 40 ^{o}C; el uso de agua destilada en el baño de agua ayuda a eliminar las burbujas de aire. El baño estaba unos cuantos grados por debajo del punto de fusión de la parafina. Las secciones se dejaron en el baño de agua hasta que se estiraron. Se separaron individualmente y se recogieron directamente con el portaobjetos previamente marcado, colocando dos o tres cortes por porta. Se dejaron escurrir en la placa caliente que rodea el baño de agua y posteriormente se colocaron en la estufa a 58 - 61 ^{o}C para que se secasen completamente y con el fin de eliminar la mayor cantidad posible de parafina antes de iniciar el proceso de tinción.

Proceso de tinción

Tiene como fin colorear las estructuras del corte para una mejor observación al microscopio. La especificidad de la tinción estructural que se va a obtener depende del colorante usado, su calidad y sus tiempos, que son exclusivos para cada tejido.

La elección de estos colorantes y de los tiempos de tinción se hace con el objetivo de lograr un buen contraste de color en las preparaciones; se hicieron pruebas intentando distintos tiempos pero los resultados no fueron tan buenos.

Para conseguir una buena tinción de los cortes histológicos se debe seguir una serie de pasos que aparecen detallados a continuación y aparecen resumidos en la **Tabla 5**.

Primero es necesario realizar un desparafinado de las muestras. El **desparafinado** tiene como función eliminar la máxima cantidad posible de parafina que siga embebida en los tejidos. Para conseguirlo se realizaron dos baños, el primero de 10 min y el segundo de 5 min en xilol o isoparafina H.

A continuación, se realizaron tres baños en alcoholes de graduación decreciente y se acabó con agua destilada para conseguir la **rehidratación** de los tejidos. La rehidratación es un paso importante y necesario antes de la tinción para que el colorante pueda penetrar en los tejidos.

Para la tinción se eligió la utilización de un colorante revelador de proteínas ácido-básicas, la tinción hematoxilina-eosina, siguiendo las especificaciones de la **Tabla 5**.

La hematoxilina utilizada fue la Solución de Papanicolaou 1a, solución de hematoxilina según Harris, de Merck. La Hematoxilina de Harris es un método regresivo, ya que la descalcificación a menudo disminuye las propiedades basofílicas de los núcleos; este método tiñe todas las estructuras tisulares (núcleos, citoplasma, tejidos conectivos…) y continúa con una decoloración controlada y un viraje al color azul hasta llegar a una tinción nuclear que sea óptima. La intensificación del color azul se logra lavando los portaobjetos bajo el grifo de agua corriente.

Y la eosina se preparó al 0,5% (p/v), a partir de Eosina amarillenta de Analema y con ácido acético glacial al 0,1%.

Seguidamente y para que los colorantes queden bien fijados a los tejidos se llevaron a cabo baños en alcohol de graduación creciente para deshidratar los tejidos y se acabó con dos baños en xileno o isoparafina H.

Montaje de los portaobjetos

Se prepararon los cubreobjetos que iban a solapar el tejido en los portaobjetos para protegerlo. El montaje se realizó con pegamento “DPX Mountant for histology” de Fluka.

Los cubreobjetos se colocaron sobre papel absorbente y en una superficie lisa y se les echó unas gotas de pegamento. Se colocó el portaobjetos sobre el cubreobjetos y se presionó con cuidado para eliminar las burbujas de aire.

Una vez montados se dejaron a temperatura ambiente de 12 a 24 horas. Luego se eliminaron los excesos de pegamento con la ayuda de una cuchilla y/o isoparafina H y se almacenaron para su posterior análisis al microscopio.

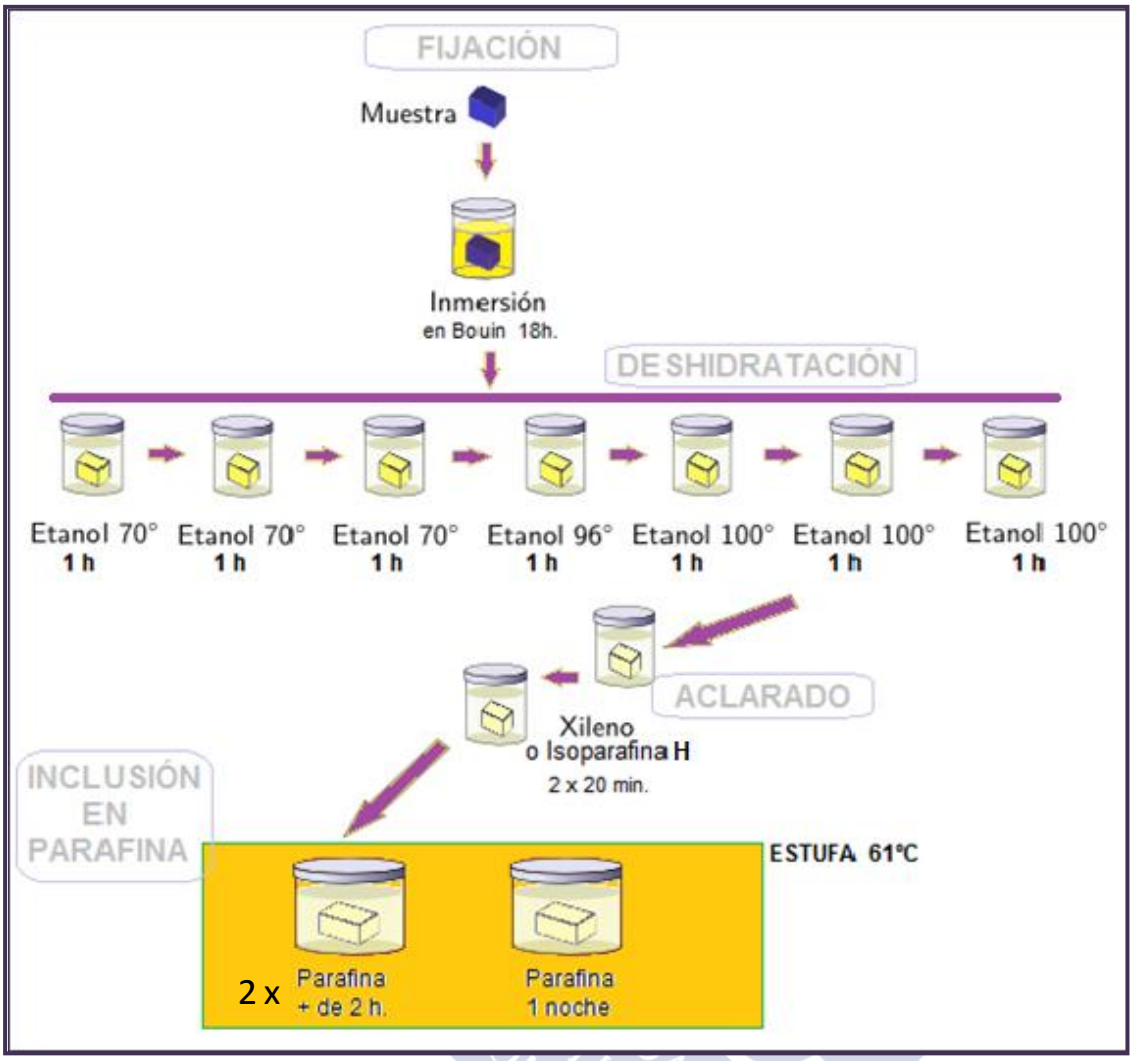


Figura 33. Esquema general del protocolo de histología seguido.

Tabla 4. Protocolo convencional de histología.

MÉTODO CONVENCIONAL DE HISTOLOGÍA

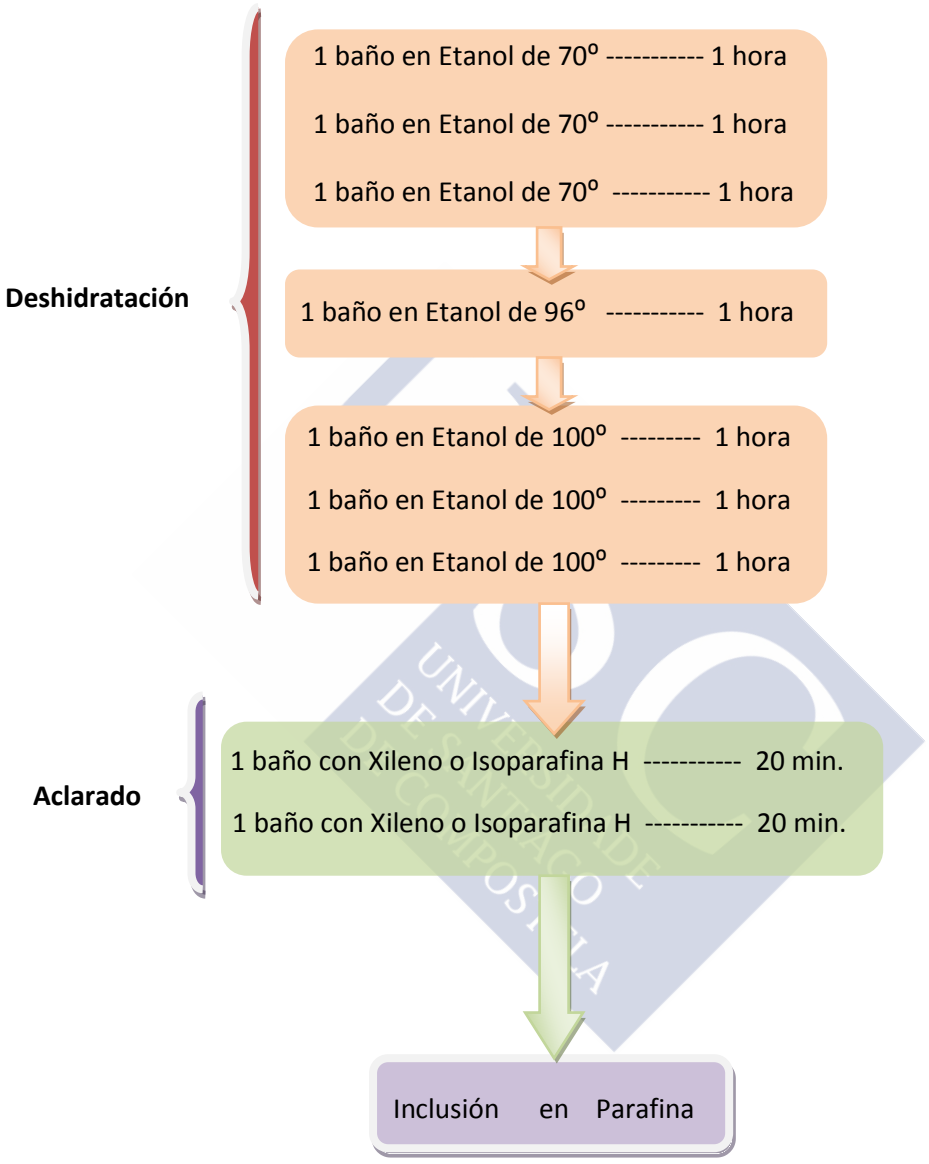
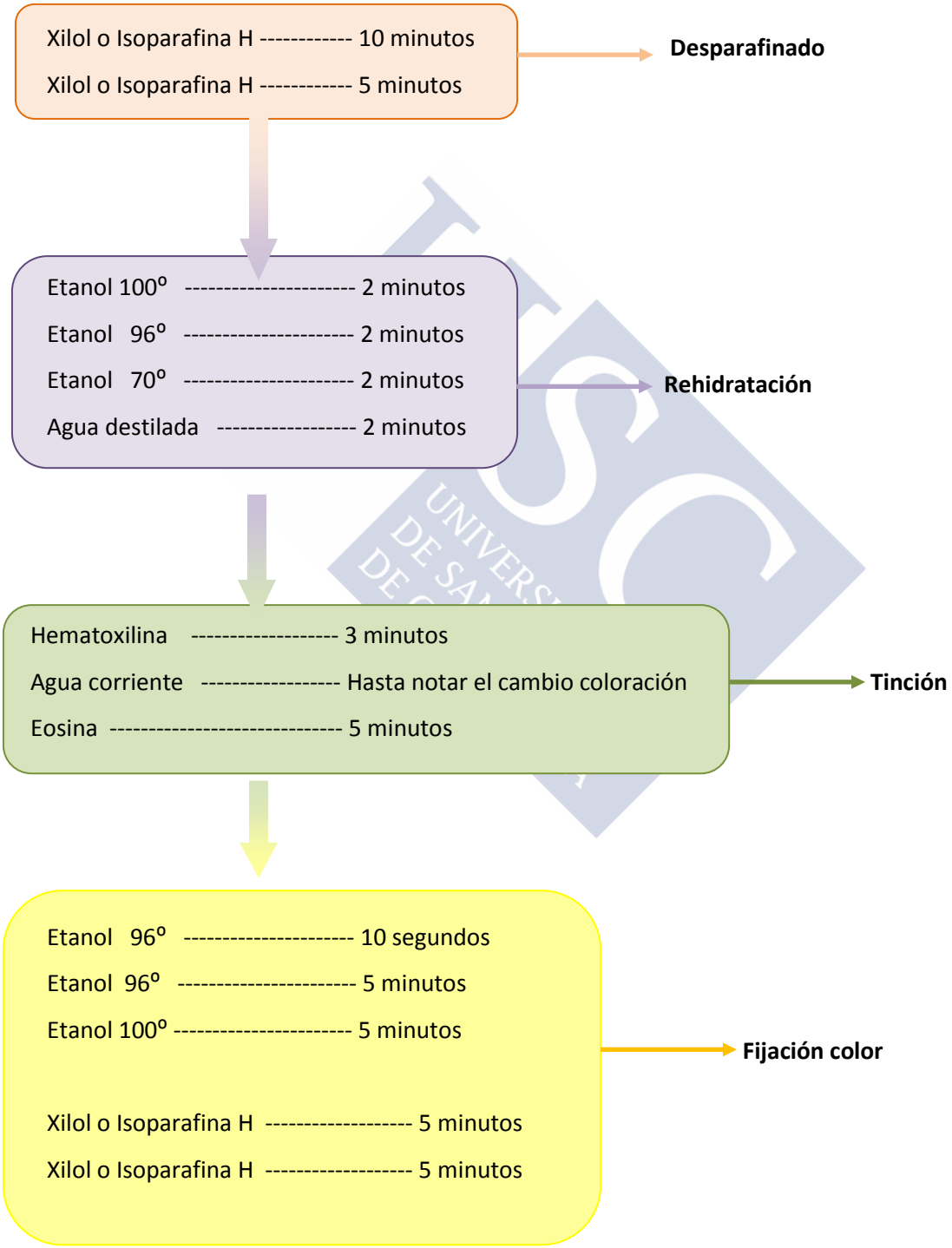


Tabla 5. Protocolo de tinción.

PROTOCOLO DE TINCIÓN



Una vez finalizado completamente el proceso de tinción y montaje, se analizaron todas las preparaciones al microscopio óptico y se observó el grado de desarrollo gonadal en cada porción.

Se realizaron fotografías al azar de distintas zonas de la gónada, entre 6 y 10 fotografías de cada portaobjetos, siempre que era posible, con un aumento de 10X. Las imágenes obtenidas fueron almacenadas en el ordenador y renombradas con un número y una clave para identificar el animal al que correspondían y así poder posteriormente realizar el análisis estereológico.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.5 ESTEREOLOGÍA

La palabra estereología fue acuñada en la carta de la constitución de la "Sociedad Internacional para la Estereología" en 1961 y tiene como significado la interpretación tridimensional de imágenes bidimensionales como secciones o proyecciones (Elías et al., 1971).

En este estudio se utilizó la estereología para medir la fracción de volumen de la gónada ocupada por células sexuales mediante el programa de análisis de imagen *SigmaScan Pro 5* y así evaluar el grado de madurez sexual de los cortes histológicos. Para conseguir las imágenes fue utilizado el microscopio Nikon Phase Contrast Attachment "Ph" for Optiphot-2 y la cámara fotográfica con la que se tomaron todas las fotografías fue una Nikon Coolpix 8400.

La determinación de la fracción de volumen está basada en el principio de Delesse (1847) donde plantea que la densidad de volumen de varios componentes de una roca (u otro compuesto sólido) puede ser estimada realizando las mediciones del área relativa de sus perfiles mediante secciones al azar. Los perfiles de una estructura son las secciones o cortes que vemos en la preparación. Este principio se expresa matemáticamente de la siguiente manera:

$$\mathbf{Aa = Vv}$$

Donde Aa significa que la fracción o proporción de área de los perfiles en una sección o corte es una estimación de la proporción de la estructura en el volumen total.

Basándonos en el principio de Delesse, en que la proporción de áreas es la misma que la de los volúmenes, el método para estimar la densidad de área consiste básicamente en aplicar una retícula de puntos equidistantes entre sí, sobre la imagen o ventana muestreada, de esta manera se efectúa un recuento de puntos que "caen" o se encuentran en los perfiles del componente o *fase* j (Álvarez Fariña, 2006).

Por tanto, se puede establecer la siguiente equivalencia:

$$\mathbf{Pj/Pt = Aa = Vv}$$

Donde;

Pj es el nº de puntos que pertenecen a la fase j (células germinales).

Pt es el nº de puntos totales pertenecientes al espacio de referencia (gónada).

Para poder realizar este cálculo se utilizó una retícula de 18 x 14 puntos (ver Figura 34) superpuesta a cada fotografía. Se marcaron los puntos de la retícula que coincidían con gametos, al finalizar, el programa tiene una herramienta que cuenta el número de puntos marcados. Con distintos colores se marcaron los gametos femeninos (diferenciando los maduros de los inmaduros), los gametos masculinos, las células vesiculares de reserva y las zonas que no corresponden con tejido gonadal (tejido muscular, hepatopáncreas, etc.). Para cada una de las fotos se procesaron estos valores en una hoja de cálculo Excel; en la hoja de cálculo se obtuvo el valor medio de porcentaje de gónada ocupada en cada individuo, pudiendo separar los porcentajes parciales correspondientes a la parte femenina y masculina de la gónada de un individuo (Pazos, 1993).

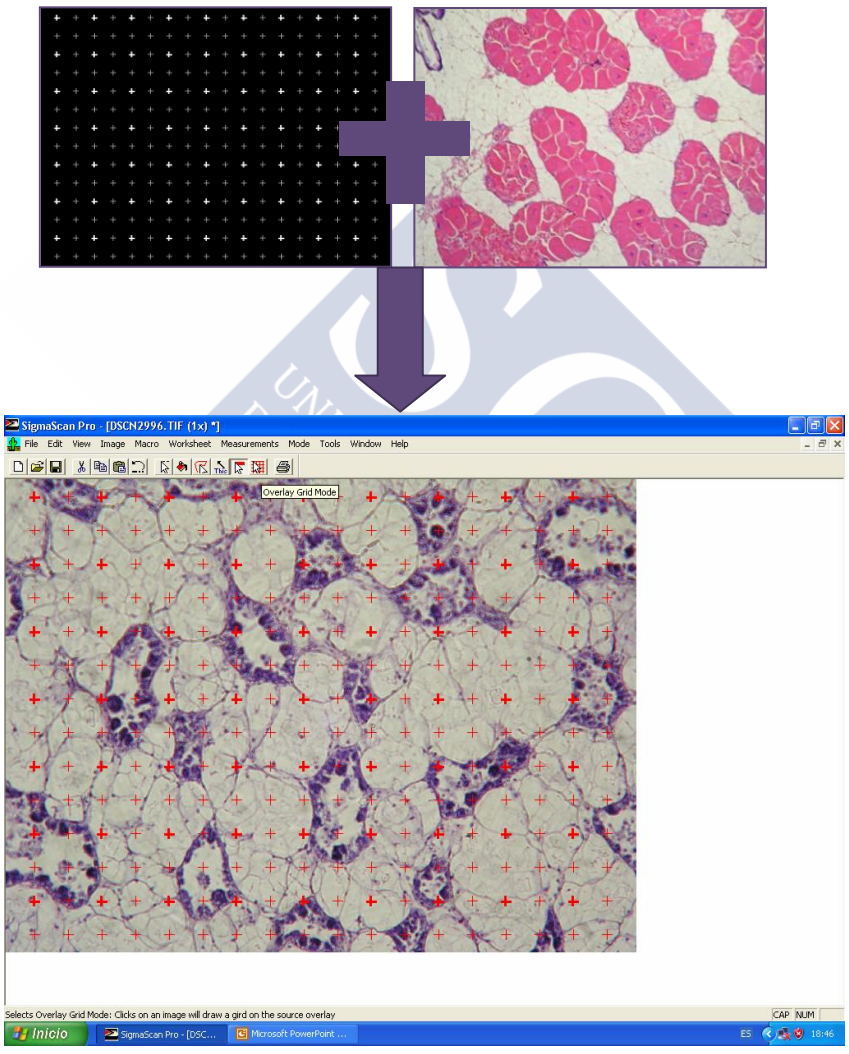


Figura 34. Retícula utilizada para el recuento de células sexuales sobre cada fotografía de tejido gonadal

Una vez obtenidos los resultados de porcentajes de ocupación en la gónada se realizaron los gráficos de ocupación.

3.6 EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS DE ÁCIDOS GRASOS.

Es necesario comprobar que la dieta suministrada a las ostras es la óptima y adecuada en lo que se refiere a la composición de ácidos grasos. Para conseguirlo se analizaron los ácidos grasos de:

- Una mezcla de microalgas, correspondiente a la ración diaria de alimento. Se analizaron 10 muestras (20 litros) de esta mezcla, elegidas al azar y en diferentes momentos de su cultivo para observar si la concentración de ácidos grasos se mantenía.
- Cultivos monoalgales. Se analizaron todas las microalgas individualmente para conocer la composición de ácidos grasos que contenía cada especie.

El proceso de extracción y análisis de ácidos grasos constaba de 5 fases:

1. **Liofilización de las muestras:** Las muestras de los monocultivos microalgales congeladas a -20 ^{o}C fueron cortadas y liofilizadas durante, aproximadamente, 24 horas. Posteriormente fueron pulverizadas, usando para ello un mortero. Una vez pulverizadas se guardaron en el congelador a -20 ^{o}C.

2. **Extracción de lípidos totales:** Para la extracción de lípidos totales (LT) se siguió el método de Folch *et al*. (1957) con las modificaciones de Beninger y Lucas (1984), utilizando como mezcla extractora cloroformo-metanol 2:1 (V/V). El proceso consta de 11 pasos que se detallan a continuación:

   1. El tejido liofilizado (0,3 g) fue homogeneizado con 15 ml de cloroformo:metanol 2:1 durante 1 min. El proceso se realizó en un tubo Corex utilizando un homogeneizador Omni 2000 con Macro Generador mod. 10010L.
   2. Se centrifugó a 3.000 *g*. durante 10 min.
   3. El sobrenadante se filtró a una ampolla de decantación a través de un filtro Whatman Nº1 humedecido previamente con 5 ml de la mezcla extractora.
   4. Con el precipitado obtenido se repitió el proceso de extracción 2 veces.
   5. Una vez recogidos los sobrenadantes de las 3 extracciones en la ampolla de decantación se añadieron 0,25 volúmenes de una solución de NaCl al 0,6% (p/v) en agua destilada. La relación cloroformo:metanol:agua es de 8:4:3 como recomiendan Folch *et al*. (1957).

      La finalidad del lavado con agua es la eliminación de contaminantes no lipídicos y con la adición de sal se disminuye la pequeña pérdida de lípidos en el lavado.
   6. Se agitó y dejó reposar toda la noche.

7. Se obtuvieron dos fases, la superior que contenía metanol y agua y la inferior clorofórmica que es la que contenía los lípidos. Se filtró la fase clorofórmica a través de un filtro de papel Whatman Nº1, exento de grasa y humedecido con 5 ml de cloroformo, a un balón de rotavapor, y se lavó dos veces el filtro con 5 ml de cloroformo.
8. Se evaporó el cloroformo a 40 ^{o}C en el rotavapor.
9. El residuo seco se disolvió en 20 ml de cloroformo y se filtró a otro balón a través de papel Whatman Nº1 humedecido con 5 ml de cloroformo. Se hicieron dos lavados del primer balón y dos del papel de filtro con 5 ml de cloroformo.
   Esta purificación se realizó para eliminar la materia no soluble en cloroformo.
10. Se evaporó de nuevo a 40 ^{o}C en el rotavapor.
11. El residuo seco, que contenía los lípidos, fue resuspendido en 10 ml de cloroformo y recogido en un tubo Pirex® con tapón de rosca.

Los lípidos totales fueron conservados a – 20 ^{o}C hasta su cuantificación.

3. Cuantificación de los lípidos totales (LT): Se realizó gravimétricamente (Bligh y Dyer, 1959; Barner y Blackstock, 1973). Los tubos con 10 ml de LT congelados a -20 ^{o}C fueron retirados del congelador, se dejaban 1 - 2 horas a temperatura ambiente, después se repartía 300 µl de muestra en cápsulas de aluminio, previamente pesadas. Posteriormente las cápsulas con las muestras (siempre por triplicado), se introdujeron en la estufa a 60 ^{o}C durante 15 min para, seguidamente, dejarlas enfriar en el desecador durante 15 - 20 min aproximadamente y a continuación se pesaban en la balanza de precisión. El peso de los LT fue calculado en miligramos. Finalmente, se calculó la cantidad total de LT (mg) que había en los 10 ml de muestra de partida.

4. Transesterificación de los ácidos grasos. Para la realización de este paso se utilizó el método de Kates (1972) que emplea sulfúrico al 2 % (p/v) en metanol. Los reactivos necesarios para este paso eran:

- Solución saturada de Cloruro Sódico.
- Sulfúrico metanólico (Solución p/v de ác. sulfúrico en metanol)

Y se siguieron los pasos enumerados a continuación:

1. Se pipeteó en un tubo Pirex® con tapón de rosca 4 ml de los lípidos disueltos en cloroformo.
2. Se evaporó el cloroformo en corriente de nitrógeno.

3. Se añadieron 3 ml de sulfúrico metanólico (solución al 2% p/v de ác. sulfúrico en metanol).
4. Se agitaron para que se mezclen bien.
5. Se calentaron en un baño a 60 ºC durante 1 h y 30 min.
6. Se dejaron enfriar y se añadieron 3 ml de agua saturada con NaCl y 3 ml de hexano.
7. Se agitaron durante 1 min.
8. Se centrifugaron a 1500 *g* durante 10 min.
9. La fase superior que contenía los ésteres metílicos de los ácidos grasos se pasó a los tubos y se concentraron evaporando el hexano en corriente de nitrógeno.
10. Se añadieron 100 µl de hexano a cada tubo.
11. Se recuperó la muestra con una pipeta y se trasvasó a un vial con inserto.
12. Se aplicó un poco de atmósfera de nitrógeno, se sellaron los viales y se almacenaron a -20 ºC.

5. Cromatografía de gases (cromatogramas): Se utilizó un cromatógrafo Hewlett-Packard modelo 5890 Serie II, equipado con un inyector automático (HP 7673), un detector de ionización de llama y una columna capilar flexible Supercowax-10 (Supelco) de 30 m x 0,25 mm i.d. (diámetro interno) y 0,25 µm de espesor. Como gas portador se empleó el helio a un flujo de 56 cm/seg. Se trabajó con SPLIT 50:1 y el gradiente de temperatura empleado es el que se detalla en la Figura 35. La temperatura del inyector fue de 250 ºC y la del detector de 260 ºC.

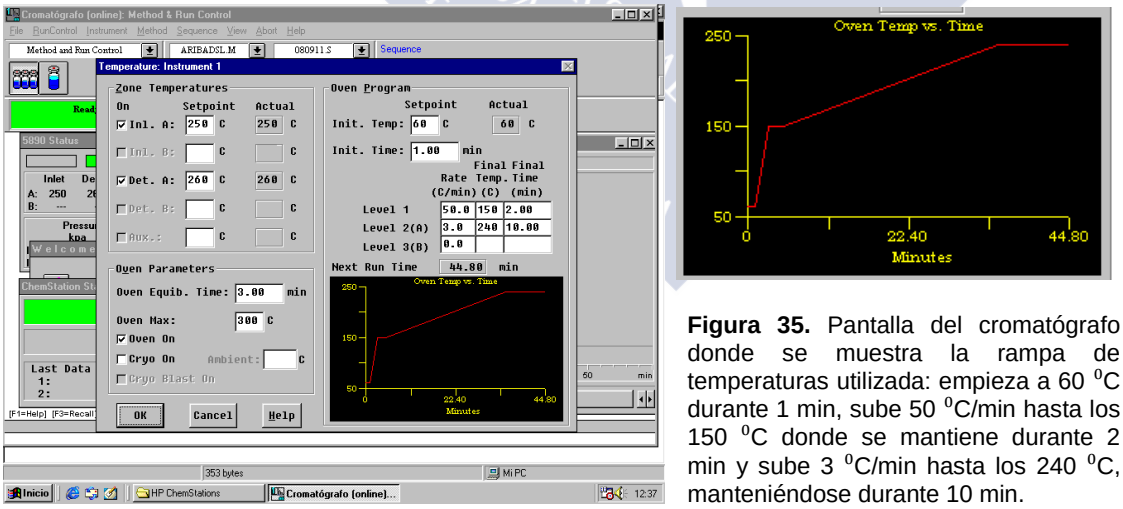


Figura 35. Pantalla del cromatógrafo donde se muestra la rampa de temperaturas utilizada: empieza a 60 ºC durante 1 min, sube 50 ºC/min hasta los 150 ºC donde se mantiene durante 2 min y sube 3 ºC/min hasta los 240 ºC, manteniéndose durante 10 min.

La identificación de los picos se realizó por comparación de los tiempos de retención de los patrones Supelco 37 y aceite de hígado de bacalao de Sigma.

3.7 ESTADÍSTICA

Para el análisis de los datos obtenidos mediante la estereología se realizó un Análisis Normal de Varianza (ANOVA) multifactorial, es decir, de varios factores (muestreo, temperatura, fotoperíodo, y dieta), dependiendo del experimento. La variable dependiente es el porcentaje de ocupación gonadal en los distintos acondicionamientos dentro de cada muestreo (% ocup). Para realizar este análisis se utiliza el paquete estadístico IBM SPSS 19.0. El nivel de significación que se usa para todas las pruebas es del 5 % ($p < 0,05$).

Para poder utilizar el Análisis Normal de Varianza **tienen que cumplirse los supuestos teóricos del ANOVA**:

- **Normalidad de las variables**, es decir, la distribución de la variable dependiente (% ocupación) debe ser normal para cada nivel de cada factor o tratamiento.

Esto se comprueba a través de los estadísticos descriptivos de **asimetría** y **curtosis**. Los valores tipificados (estandarizados) de dichos estadísticos deben estar en el rango -2/+2. Si se salen de este rango la distribución no es normal. También se comprueba con los **test de Kolmogorov-Smirnov** y de **Shapiro-Wilk**, este último es más apropiado para tamaños de muestra pequeños.

- **Homogeneidad de las varianzas**, se comprueba con el test de Levene.

En varios de los casos (en varios de los niveles de los distintos factores) los datos de % de ocupación no cumplen estos dos supuestos teóricos por eso se hace una transformación de los datos. Se usa **la transformación arcoseno (Arcs_Ocup)**, es decir, el arc. seno de la raíz cuadrada de la ocupación en tanto por uno:

$$\text{Arc. seno} \sqrt{\frac{\%\ \text{ocupación}}{100}}$$

Con esta transformación los datos cumplen los supuestos teóricos en la mayor parte de los casos, aunque no en todos.

ANOVA

Se realiza para cada uno de los muestreos utilizando como factores fotoperíodo, temperatura, ración de alimento o flujo de agua. Dependiendo de cada experimento.

Se hizo un diseño con los efectos principales y todas las interacciones posibles de los factores. En algunos casos si no se encontraban efectos significativos de las interacciones se sacaban del modelo y se repetía el análisis con sólo los efectos principales.

Se realizó también el ANOVA utilizando como factores muestreo, fotoperíodo, temperatura, dieta y flujo de agua para todos los muestreos juntos, pero también para los muestreos realizados previamente al inicio de los desoves.

Como test *a posteriori* o Post Hoc se utilizó el HSD (Honestly Significantly Different) de Tukey. Se realizaron comparaciones múltiples *a posteriori* con el objetivo de encontrar diferencias significativas entre los distintos acondicionamientos realizados en un experimento.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4. RESULTADOS

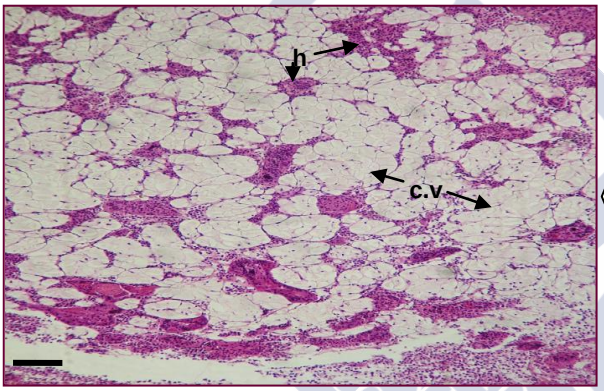
USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

4. RESULTADOS.

4.1 FASES DEL CICLO GONADAL DE *Ostrea edulis*.

En 1942, H. A. Cole en el trabajo "Primary Sex-Phases in *Ostrea edulis*" hace una descripción de las distintas fases del desarrollo gametogénico de *Ostrea edulis*: fase de reposo, fase indiferenciada, fase de macho inmaduro (en la que comienza la división de las espermatogonias para formar mórulas de espermatocitos), fase de macho maduro (en la que ya encontramos mórulas de espermatocitos maduros), fase de transición de macho a hembra, fase de hembra inmadura (ovogonias) y fase de hembra madura (ovocitos maduros).

En este trabajo de investigación hemos podido observar y describir mediante técnicas histológicas las fases del desarrollo gametogénico apuntadas anteriormente por Cole. A continuación, se muestran los resultados obtenidos.



FASE DE REPOSO

h: hemocitos

c. v: células vesiculares

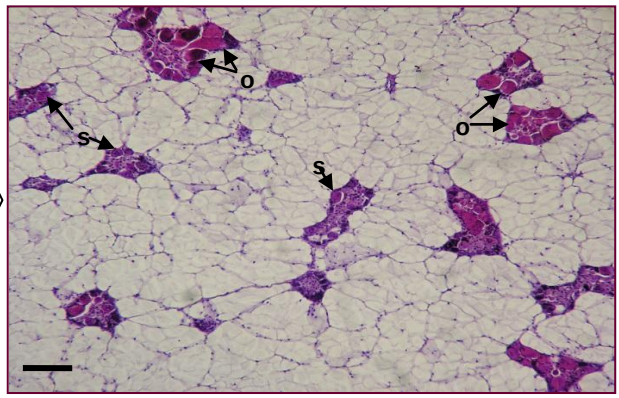
I) La **fase de reposo** constituye un periodo de recuperación y se caracteriza básicamente por la ausencia total de células sexuales y folículos, quedando solamente restos mínimos de tejido gonadal indiferenciado por lo que no es posible determinar el sexo. En los inicios de esta fase es posible observar restos de folículos muy destruidos e invadidos por hemocitos. El tejido conectivo ocupa todo el espacio desplazando casi totalmente a la gónada, pero se pueden observar algunos islotes con óvulos o espermatozoides que no han sido liberados y aún no han sido reabsorbidos totalmente.

FASE

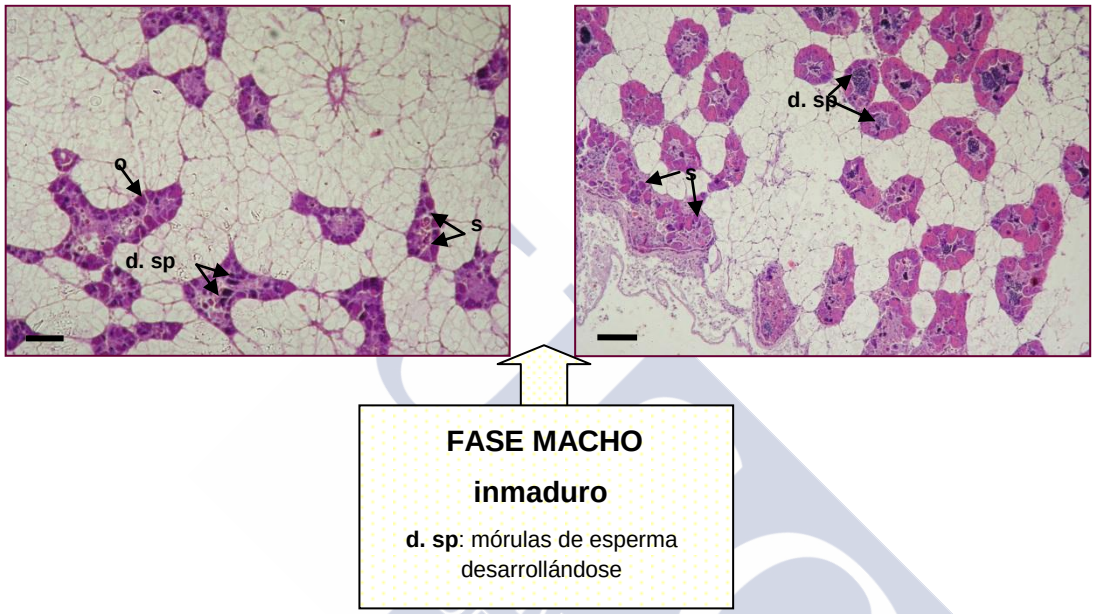
INDIFERENCIADA

o: oogonia

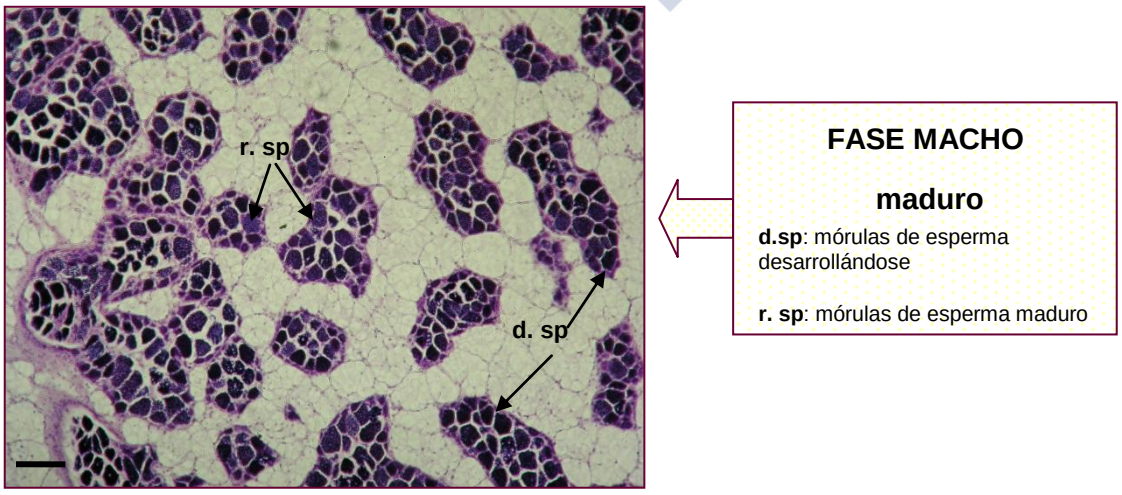
s: espermatogonia



II) La **fase indiferenciada** ocurre antes de que comience la gametogénesis. Durante esta fase, la gónada consiste en una serie de conductos tubulares que están en el tejido conectivo entre la epidermis y los divertículos digestivos, y cuya pared externa (que es la mitad más próxima a la superficie corporal) está revestida de epitelio ciliado, pero la pared opuesta, la más próxima a los divertículos digestivos, está revestida de una capa doble o triple de ovogonias y espermatogonias, fácilmente distinguibles.



III) A continuación comienza la espermatogénesis, las espermatogonias se dividen y forman mórulas de espermatocitos, que madurarán formando las mórulas de espermátidas y originarán los espermatozoides maduros, esta fase del desarrollo es conocida como **fase de macho joven** o **inmaduro** y en este estado también pueden comenzar a desarrollarse algunas ovogonias.



IV) A continuación, viene la **fase de macho maduro** o funcional donde ya se pueden ver los conductos llenos de mórulas de esperma, casi maduras o maduras. En la parte más profunda de los folículos hay una proliferación activa de espermatogonias y también numerosos ovocitos revistiendo las paredes de los folículos así que, se puede decir que el desarrollo de la primera fase femenina tiene lugar al mismo tiempo que el desarrollo y maduración de las mórulas de esperma.

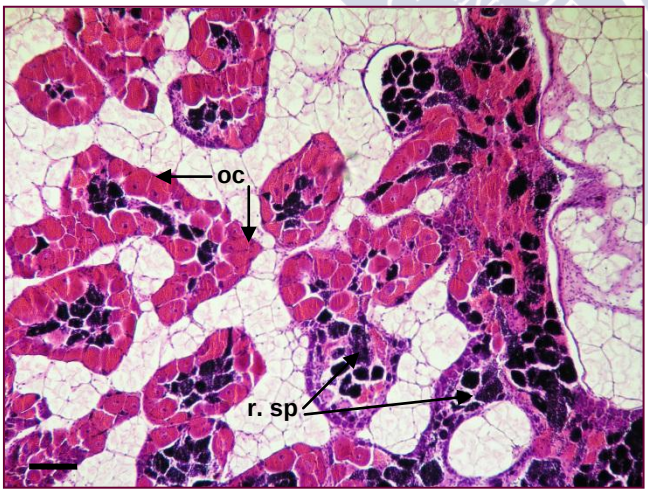
MACHO

DESOVANDO

r. sp: mórulas de esperma maduro



Una vez maduro el animal desova como macho, entendiéndolo como la liberación de esperma maduro al medio.



FASE de TRANSICIÓN

De ♂ **a** ♀

oc: ovocito

V) El desarrollo de la primera fase femenina tiene lugar al mismo tiempo que el desarrollo y maduración de las mórulas de esperma. Existe una fase de transición denominada **fase de transición** de macho a hembra, en la que los conductos y los folículos están ocupados por mórulas de esperma maduro y otras en los últimos estadíos de desarrollo, pero la parte más profunda del folículo está revestida de ovocitos en desarrollo.

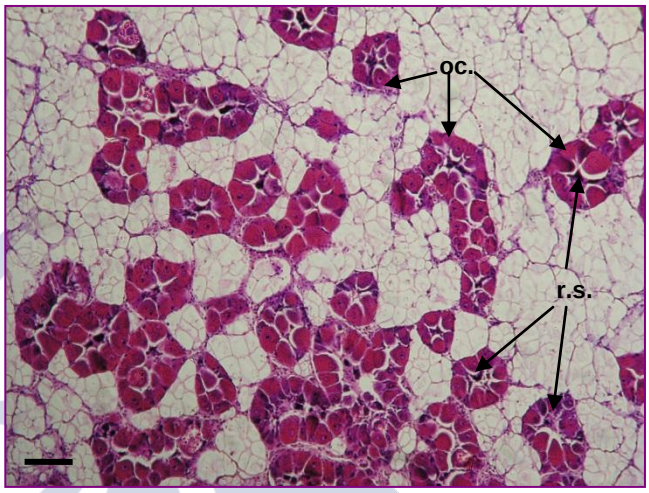
VI y VII) Con el crecimiento y expansión de los ovocitos y los folículos se pasa de la fase de transición a una **fase de hembra** totalmente desarrollada, en la que se puede observar los folículos completamente llenos de ovocitos ya maduros, listos para ser liberados. Entre los ovocitos y en las paredes foliculares pueden aparecer espermatocitos residuales y también pueden encontrarse grupos de espermatogonias y ovogonias que van a formar la base de las siguientes fase macho y hembra.

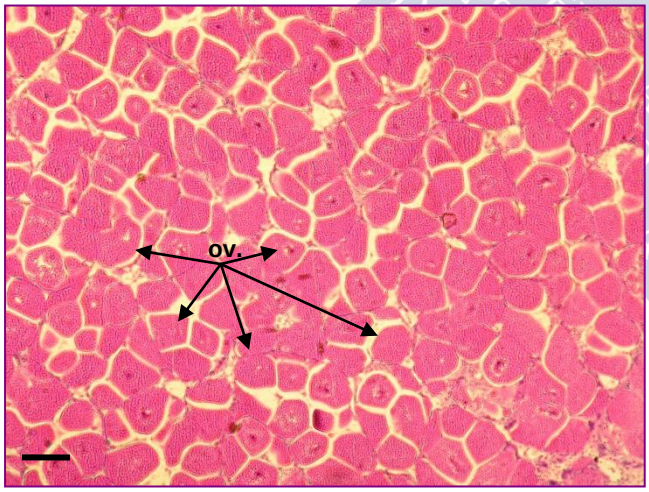
FASE HEMBRA

INMADURA

oc: ovocito

r.s: espermatocitos residuales





FASE HEMBRA

MADURA

ov.: ovocitos maduros

4.2 ÁNALISIS DE ÁCIDOS GRASOS.

Para conseguir el mejor crecimiento y desarrollo gonadal de *O. edulis* se utilizan dietas algales ricas en ácidos grasos poliinsaturados y con altos niveles de carbohidratos. Los trabajos de Chu y Webb (1984) revelaron la importancia de los ácidos grasos esenciales y las relaciones entre los ácidos grasos n-3 y n-6, ya que promueven un mayor crecimiento.

En el presente trabajo puede decirse en términos generales que, los cultivos monoalgales presentaban niveles ricos en PUFAs esenciales, caracterizándose cada grupo por la composición lipídica que se presenta a continuación:

Diatomeas: ricas en 20:5 (n-3) y altos niveles de 20:4 (n-6).

- *Phaeodactylum tricornatum:* 14:0, 16:0, 16:1 y 20:5 (n-3).
- *Skeletonema costatum:* alto contenido (5-20%) de 20:5 (n-3) y algo menos de 22:6 (n-3).
- *Chaetoceros calcitrans:* alto porcentaje de 16:3 y 20:5 (n-3) y un poco de 22:6 (n-3) (≈1%).

Clase *Coccolithophyceae:*

- *Isochrysis galbana:* gran proporción de 18:3 (n-3) y 18:4 (n-3), también de 14:0, 16:0, 18:1 y 22:6 (n-3).
- *Isochrysis aff galbana (T-iso)*: alto contenido (5-20%) en 22:6 (n-3).

Clase *Chrysophyceae:*

- *Monochrysis lutheri:* destaca el alto contenido de 16:1 (n-7) y 20:5 (n-3) y en menor proporción 18:2 (n-6) y 22:6 (n-3).

Clase *Prasinophyceae*:

- *Tetraselmis suecica:* 5-20% de 20:5 (n-3) y 20:4 (n-6) y alto porcentaje de 16:0, 18:1, 18:3 (n-3), 18:4 (n-3).

En el siguiente cuadro se muestra la composición mayoritaria de ácidos grasos de las microalgas, que han sido utilizadas como aportes extra en la dieta de los reproductores.

	Phaeodactylum tricornutum	*Isochrysis galbana*	I. galbana (T-Iso)	*Tetraselmis suecica*	*Skeletonema costatum*	*Chaetoceros calcitrans*	*Pavlova lutheri*
Tipos de ácidos grasos en orden decreciente de concentración	20:5 (n3)	22:6 (n3)	16:1	18:1 (n9)	16:1 (n7)	16:1 (n7)	16:0
	16:1	18:1 (n9)	14:0	18:3 (n3)	16:0	20:5 (n3)	18:3 (n6)
	16:0	18:4 (n3)	18:1	16:0	20:5 (n3)	14:0	16:1 (n7)
	14:0	16:0	16:0	20:5 (n3)	14:0	16:3 (n4)	18:0
	18:4 (n3)	14:0	22:6 (n3)	18:4 (n3)	16:3 (n4)	16:2 (n6)	22:6 (n3)
	20:4 (n6)	18:2 (n6)	18:2 (n6)	18:2 (n6)	16:4 (n1)	16:0	18:1 (n7)
	18:1 (n9)	18:3 (n3)	20:5 (n3)	16:1	16:2 (n4)	16:2 (n4)	20:5 (n3)
	18:2 (n6)	16:1	15:0	20:4(n-6)	18:4 (n3)	22:6 (n3)	18:1 (n9)
	22:5 (n6)	20:5 (n3)	20:4 (n6)	20:1 (n9)	18:1 (n9)	18:0	18:2 (n6)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

EFECTO DEL FOTOPERÍODO Y LA TEMPERATURA SOBRE EL ACONDICIONAMIENTO DE PROGENITORES DE *OSTREA EDULIS*

- **EXPERIMENTO 1; EFECTO COMBINADO DE LA TEMPERATURA Y EL FOTOPERÍODO EN OTOÑO.**
- **EXPERIMENTO 2; EFECTO DEL FOTOPERÍODO EN OTOÑO.**
- **EXPERIMENTO 3; EFECTO DEL FOTOPERÍODO EN OTOÑO.**
- **EXPERIMENTO 4; EFECTO COMBINADO DE LA TEMPERATURA Y EL FOTOPERÍODO EN INVIERNO.**
- **EXPERIMENTO 5; EFECTO DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE TEMPERATURA, FOTOPERÍODO Y RACIÓN DE ALIMENTO EN INVIERNO.**

EFECTO DE LA RACIÓN DE ALIMENTO SOBRE EL ACONDICIONAMIENTO DE PROGENITORES DE *OSTREA EDULIS*

- **EXPERIMENTO 6; EFECTO DE LA RACIÓN DE ALIMENTO EN OTOÑO.**
- **EXPERIMENTO 7; EFECTO DE LA RACIÓN DE ALIMENTO EN INVIERNO.**

EFECTO COMBINADO DEL FLUJO DEL AGUA Y LA RACIÓN DE ALIMENTO SOBRE EL ACONDICIONAMIENTO DE PROGENITORES DE *OSTREA EDULIS*

- **EXPERIMENTO 8; EFECTO COMBINADO DEL FLUJO DEL AGUA Y LA RACIÓN DE ALIMENTO.**

4.3 EFECTO DEL FOTOPERÍODO Y TEMPERATURA SOBRE EL ACONDICIONAMIENTO DE PROGENITORES DE *OSTREA EDULIS*

EXPERIMENTO 1; EFECTO COMBINADO DE LA TEMPERATURA Y EL FOTOPERÍODO EN OTOÑO:

Los progenitores fueron sometidos a las condiciones experimentales siguientes: dos temperaturas del agua (15ºC y gradiente de temperatura) y tres fotoperíodos (8h/luz, 16h/luz y gradiente de luz). Consiguiendo, de este modo, seis condiciones de acondicionamiento diferentes (Ver apartado 3.1.1 Experimento 1 de Materiales y Métodos).

1. MEDIDAS Y PESOS (BIOMETRÍA):

Muestreo inicial: 18 de Octubre

Para la determinación del estado gonadal de los progenitores en otoño se realizó un muestreo inicial. En este muestreo inicial se escogieron 20 individuos de un total de 560 individuos recogidos en Cambados (Ría de Arousa).

Se midió la longitud y el ancho de cada ejemplar utilizando un calibre, determinándose que la longitud media era de 7,142 cm y la anchura media era de 6,8 cm.

A continuación, se determinó el peso húmedo, en una balanza Mettler® PM300. En la tabla 7 se presentan los pesos frescos de la concha y la vianda, junto con el peso total y el peso medio por individuo.

Tabla 7. Peso húmedo de la vianda, de la concha, peso total y peso medio de los progenitores en el muestreo inicial. **Phv** (peso húmedo de la vianda), **Pmv** (peso medio de la vianda), **Phc** (peso húmedo de la concha), **Pt** (peso total de los individuos seleccionados para este muestreo) y **Pmi** (peso medio de cada individuo).

	nº ind.	**Phv** (Peso húmedo vianda)	**Pmv** (Peso medio vianda)	**Phc** (Peso húmedo concha)	**Pt** (Peso total)	**Pmi** (Peso medio individuo)
Muestreo inicial	20	163,90 g	8,195 g	1486,1 g	1650 g	82,5 g

Muestreo 1: 30 días - 1 mes

El primer muestreo fue realizado un mes después de empezar el acondicionamiento de los progenitores. Los distintos parámetros biométricos se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Peso húmedo de la vianda, de la concha, peso total y peso medio de los progenitores en el muestreo 1, un mes después del inicio del acondicionamiento.

	nº ind.	Phv	Pmv	Phc	Pt	Pmi
15 ºC 8h/luz	6	48,25 g	8,04 g	225,27 g	336,22 g	56,04 g
15 ºC 16h/luz	6	49,19 g	8,2 g	240,6 g	295,48 g	49,25 g
15 ºC G luz (8-16h)	6	39,69 g	6,62 g	232,31 g	232,31 g	47,68 g
GTª 8h/luz	6	47,44 g	7,9 g	253,87 g	310,02 g	51,67 g
GTª 16h/luz	6	39,25 g	6,56 g	225,03 g	267,82 g	44,64 g
GTª G luz (8-16h)	6	48,39 g	8,07 g	234,82 g	287,73 g	47,955 g

El peso medio por individuo es bastante menor que el peso medio por individuo obtenido inicialmente, siendo el Pmi del muestreo inicial de 82,5 g y oscilando en el muestreo 1 entre 56,02 g (15ºC 8h/luz) y 44,64 g (GTª 16h/luz), reflejando los pesos medios individuales más altos de este muestreo los individuos acondicionados con 8h de luz. Los pesos más bajos corresponden con los individuos sometidos a más horas de luz y a la temperatura más elevada.

Muestreo 2: 60 días - 2 meses

A los dos meses de comenzar el acondicionamiento se realizó el segundo muestreo, recogiéndose seis individuos de cada acondicionamiento y determinándose los parámetros biométricos citados anteriormente.

Tabla 9. Peso húmedo de la vianda, de la concha, peso total y peso medio de los progenitores en el muestreo 2, dos meses después del inicio del acondicionamiento.

	nº ind.	Phv	Pmv	Phc	Pt	Pmi
15 ºC 8h/luz	6	42,92 g	7,15 g	224,82 g	275,94 g	45,99 g
15 ºC 16h/luz	6	50,36 g	8,39 g	230,38 g	279,28 g	46,55 g
15 ºC G luz (8-16h)	6	46,83 g	7,81 g	237,62 g	310,01 g	51,67 g
GTª 8h/luz	6	44,06 g	7,34 g	213,37 g	263,26 g	43,88 g
GTª 16h/luz	6	54,78 g	9,13 g	234,35 g	299,17 g	49,86 g
GTª G luz (8-16h)	6	54,05 g	9,01 g	255,90 g	333,91 g	55,65 g

Se puede observar un aumento grande en el Pmv en los acondicionamientos sometidos a un gradiente de temperatura y a un gradiente de luz (que aumenta de 8,07 g a 9,01 g en el muestreo 2) y sometidos a gradiente de temperatura y fotoperíodo de 16h (que aumenta de 6,56 g a 9,13 g en el muestreo 2). El peso medio por individuo máximo fue encontrado en los progenitores sometidos a gradiente de luz y los más bajos con los individuos acondicionados con 8h de luz. Curiosamente, los Pmi que más aumentan eran los que se encontraban más bajos en el anterior muestreo.

Muestreo 3: 90 días - 3 meses

En el tercer muestreo, aproximadamente a los tres meses no se recogieron los datos biométricos, únicamente se estudió el desarrollo gonadal mediante estudios histológicos.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2. RESULTADOS DE HISTOLOGÍA.

Las preparaciones y el análisis histológico se realizaron de acuerdo con los protocolos descritos en el apartado 3.4 de Materiales y Métodos. A continuación, en la figura 35 se muestran imágenes representativas del desarrollo gametogénico de las ostras acondicionadas con los diferentes regímenes de temperatura y fotoperíodo. En el muestreo inicial, el estudio histológico se realizó sobre 12 individuos.

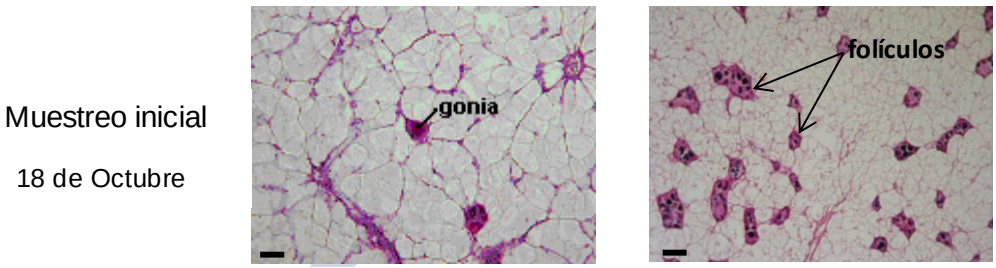


Figura 35. Fotografías de las secciones histológicas más representativas del desarrollo gonadal de los individuos analizados en el muestreo inicial. ▬Barra: 10 µm.

Este experimento comenzó en otoño, a mediados del mes de Octubre, período en el que la ostra plana se encuentra en un estado de reposo o inicio de la gametogénesis en el medio como se observa en las imágenes correspondientes al muestreo inicial, en las que se aprecian los folículos gonadales vacíos en su mayoría y algunas células primordiales o gonias.

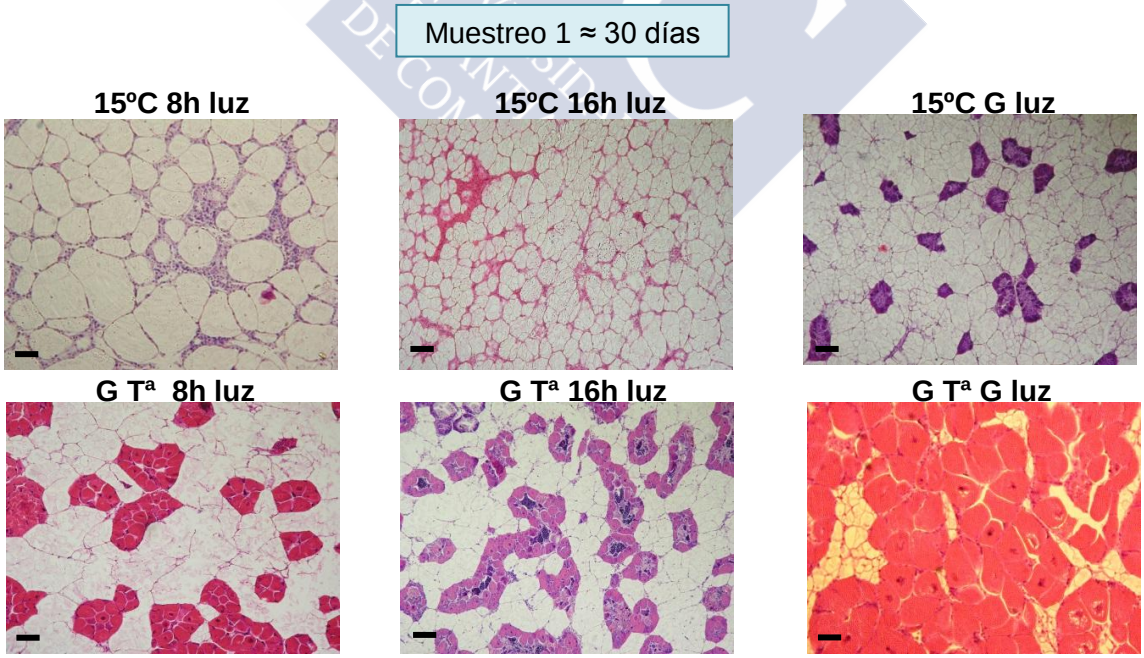


Figura 36. Fotografías de las secciones histológicas más representativas del desarrollo gonadal de los individuos analizados a los 30 días del inicio del acondicionamiento. ▬ Barra: 10 µm.

En las preparaciones procedentes del muestreo 1, a los 30 días aproximadamente, se aprecia ya desarrollo gonadal, aunque difiere bastante entre los distintos regímenes de

acondicionamiento. En los regímenes sometidos a gradiente de temperatura (G Tª) se observa mayor número de ovocitos vitelogénicos y espermátidas, que es más acusado en los que van acompañados de más horas de luz, observándose ovocitos de mayor tamaño y espermátidas en fases más avanzadas.

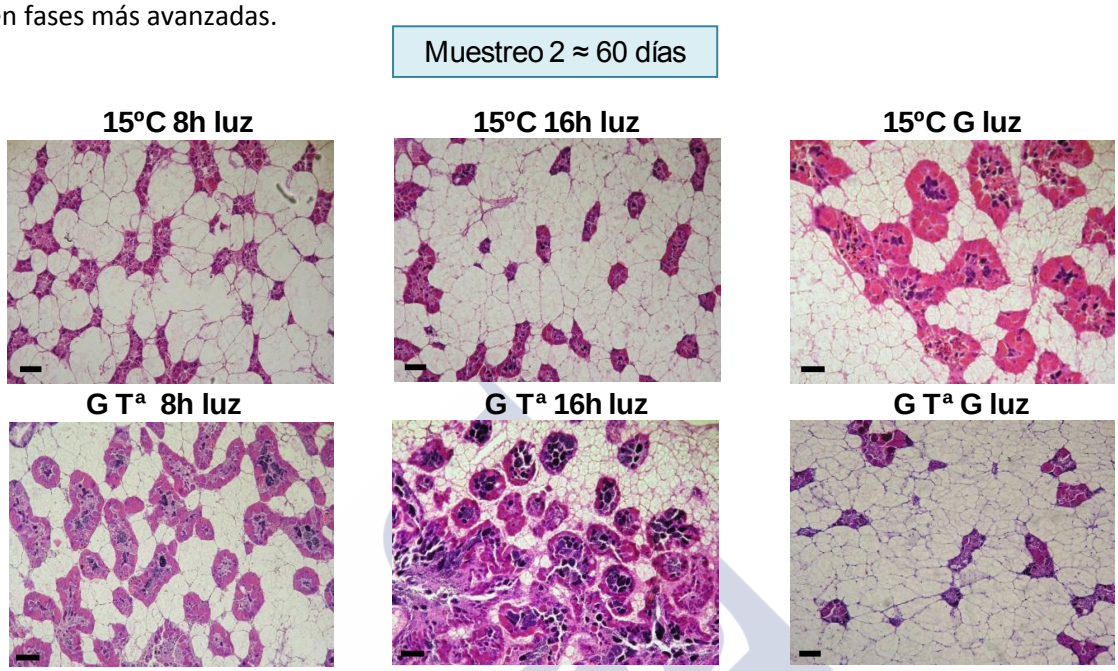


Figura 37. Fotografías de las secciones histológicas más representativas del desarrollo gonadal de los individuos analizados a los 60 días del inicio del acondicionamiento. ▬ Barra: 10 µm.

Las preparaciones del muestreo 2, a los 60 días, reflejan mejor las diferencias entre las dos temperaturas utilizadas, ya que en los regímenes de temperatura más baja se inicia el desarrollo gonadal mientras que los de temperatura más alta ya se encuentran en estadíos próximos al desove, encontrándose el tejido gonadal repleto de ovocitos maduros o espermatozoos ya maduros próximos al desove y ya desovados en algunos casos de GTª G luz.

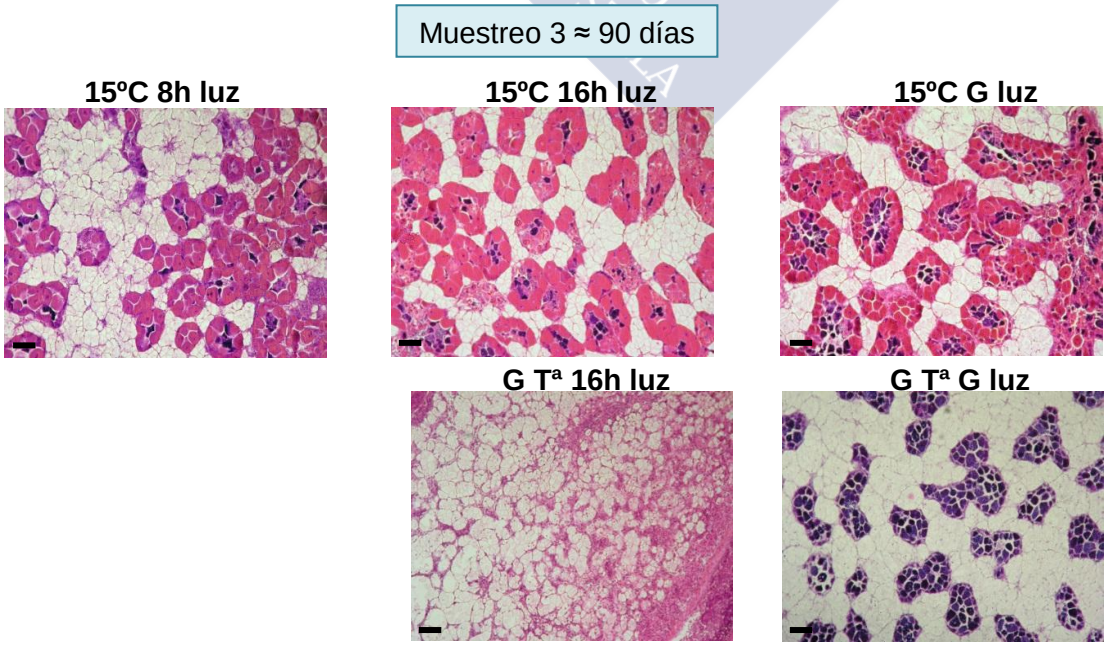


Figura 38. Fotografías de las secciones histológicas más representativas del desarrollo gonadal de los individuos analizados a los 90 días del inicio del acondicionamiento. ▬ Barra: 10 µm.

En el siguiente muestreo, a los tres meses aproximadamente, se puede observar que los individuos sometidos a temperatura de 15ºC están en una fase madura mientras que los de gradiente de temperatura ya habían desovado. A esta temperatura se aprecia una gónada desorganizada en los individuos sometidos a 8h de luz mientras que en el resto la gónada está ya reorganizada para la siguiente maduración.

De la observación de las preparaciones histológicas se puede inferir que las ostras acondicionadas a 15 ºC necesitan aproximadamente tres meses de acondicionamiento para iniciar el desove, de hecho, se detectaron desoves masivos aproximadamente a los cuatro meses pero algunos individuos acondicionados con 15ºC G luz ya habían liberado esperma anteriormente. En cambio, las ostras acondicionadas con gradiente de temperatura desovan en un plazo próximo a dos meses, dependiendo de las horas de luz que recibían.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3. RESULTADOS DE ESTEREOLOGÍA: PORCENTAJE DE OCUPACIÓN GONADAL DURANTE EL ACONDICIONAMIENTO.

Mediante métodos de estereología (ver apartado 3.5 de Materiales y Métodos) se analizaron las preparaciones histológicas, preparadas previamente. Para ello se utilizaron un mínimo de seis fotografías correspondientes a cada corte histológico. Por medio del programa Sigma ScanPro se identificaron los distintos tipos celulares del tejido gonadal y se anotó su número: espermátidas y espermatocitos, ovogonias y ovocitos, células vesiculares y otros (hemocitos, tejido muscular, restos de hepatopáncreas, etc.).

El número de células reproductoras masculinas (espermátidas y espermatocitos) se denominó porcentaje de gónada masculina (% Gónada Masculina o % GM), mientras que al conjunto de células reproductoras femeninas (ovogonias y ovocitos) se le designó como porcentaje de gónada femenina (% Gónada Femenina o % GF).

Los datos obtenidos, se presentan en las figuras de la 39 a la 81.

Muestreo inicial: 18 de Octubre

Al inicio del experimento, en otoño, cuando en la naturaleza *Ostrea edulis* ya ha desovado y se encuentra en reposo gonadal, se recogieron 12 individuos y tras su análisis se pudo observar (figura 39), que todos los individuos se encontraban vacíos, en reposo gonadal o con los últimos restos de células femeninas de la puesta, salvo un individuo que todavía no había desovado totalmente con un porcentaje de gónada femenina (ovocitos maduros) del 50,2%.

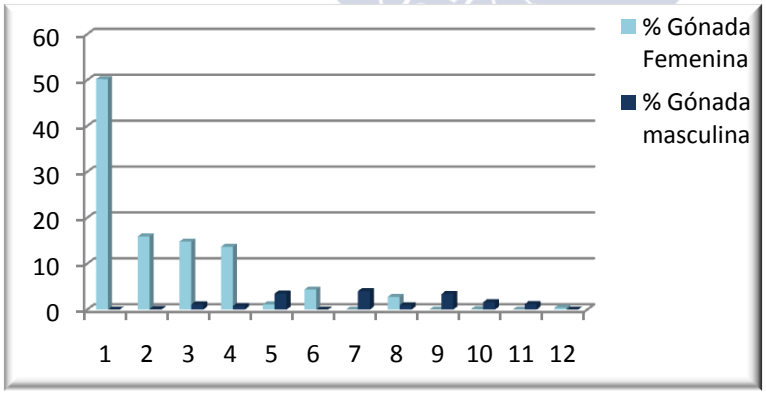


Fig. 39. Porcentajes de ocupación gonadal femenina y masculina en el muestreo inicial (n=12).

El porcentaje medio de ocupación por células femeninas y masculinas era el siguiente: **% GF** = 8,58 (d.e = 14,52) y **% GM** = 1,39 (d.e = 1,46). En general se observaron sólo células

sexuales femeninas, en su mayoría ovocitos maduros que aún no habían sido evacuados o se encontraban en lisis. Apenas se aprecia rastro de espermátidas o espermatocitos.

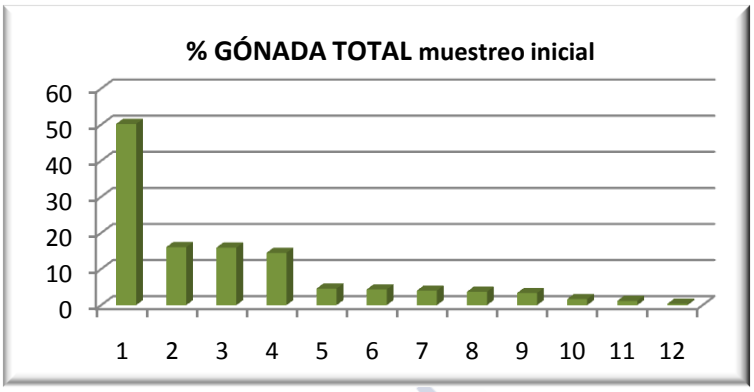


Fig. 40. Porcentajes de ocupación gonadal total en los individuos del muestreo inicial (n=12).

De los 12 individuos analizados estereológicamente (figura 40) sólo uno de ellos tenía un porcentaje de ocupación gonadal mayor al 50%. Tres de ellos presentaban una ocupación próxima al 15% (16,07% - 15,94% - 14,48%); esta ocupación era debida a la presencia de ovocitos maduros que no han sido expulsados tras el desove. Los ocho individuos restantes tenían una ocupación gonadal por debajo del 5%, la mayoría se encontraba en fase de reposo o al principio de la fase indiferenciada pero se podían encontrar aún algunos folículos con gametos maduros que no han sido expulsados a la cavidad paleal. El porcentaje de ocupación gonadal total por células sexuales era: **% GT** = 9,97 (d.e = 13,9).

Muestreo 1: 30 días - 1 mes

15ºC 8h/luz

A los 30 días del inicio del acondicionamiento se analizó el porcentaje de ocupación gonadal. La gónada femenina apenas estaba presente en seis individuos, con un porcentaje por debajo del 5%. La ocupación masculina tampoco era muy elevada, el máximo era 9,33% (figura 41). Así que el porcentaje medio de ocupación gonadal por células femeninas y masculinas era:

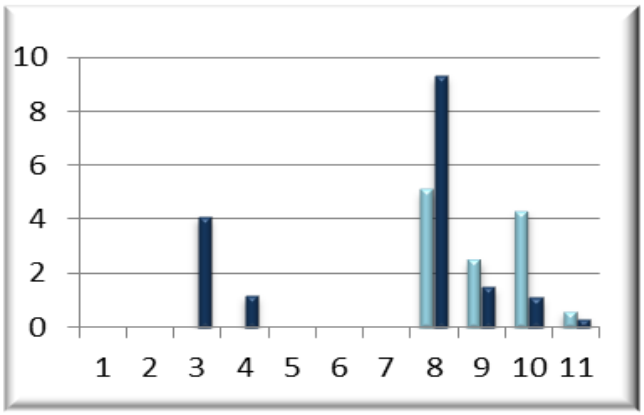


Fig. 41. Porcentajes de ocupación gonadal femenina y masculina de los individuos acondicionados con 15ºC 8h/luz durante 30 días (n=11).

% GF = 1,14 (d.e = 1,92%).

% GM = 1,6 (d.e = 2,84).

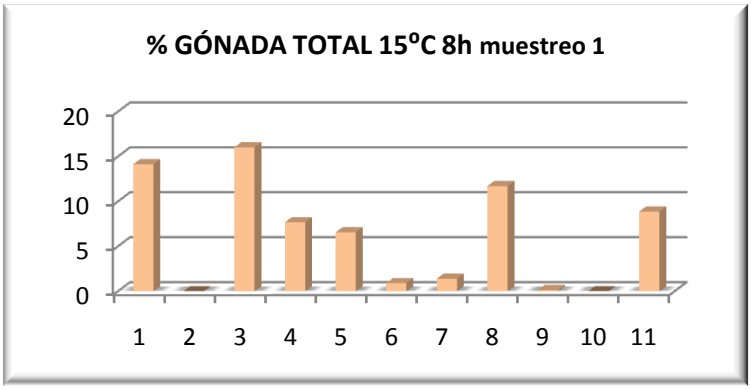


Fig. 42. Porcentajes de ocupación gonadal total de los individuos acondicionados con 15ºC 8h/luz durante 30 días (n=11).

% GT = 2,74 (d.e = 4,36)

Se encontraron cinco individuos con la gónada prácticamente vacía, sólo formada por células vesiculares, en fase inactiva o de reposo. Otros cinco individuos tenían una ocupación gonadal inferior al 5% (4,10% - 4,03% - 2,38% - 1,19% - 0,93%) y solo uno de los individuos tenía una gónada con una ocupación superior al 14% (14,42%) en el que se podía observar espermátidas y ovogonias de los primeros estadíos.

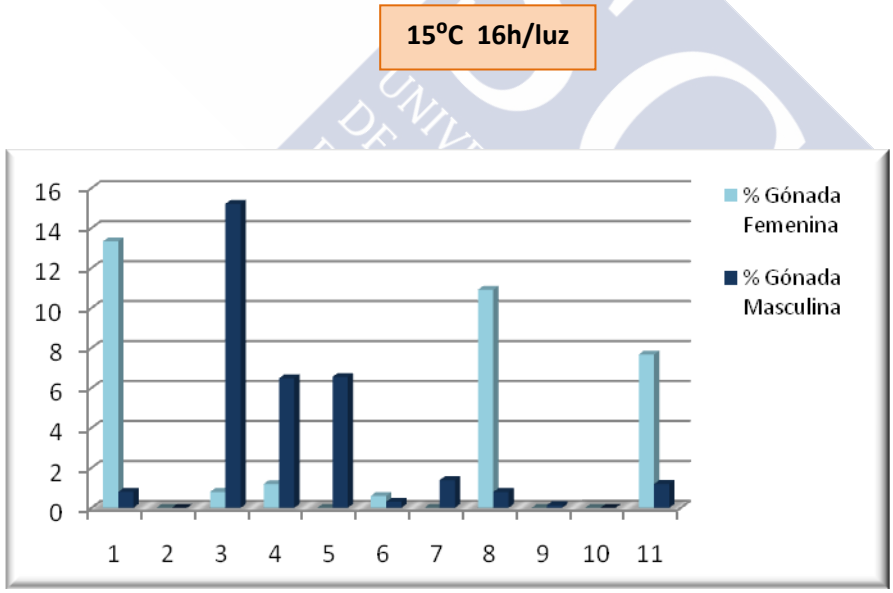


Fig. 43. Porcentajes de ocupación gonadal femenina y masculina de los individuos acondicionados con 15ºC 16h/luz durante 30 días (n=11).

Entre los individuos sometidos a un acondicionamiento con 15ºC 16h/luz, cinco no presentaban desarrollo gonadal femenino y dos no presentaban desarrollo gonadal masculino. Los porcentajes más altos de gónada femenina eran: 13,33% - 10,91% - 7,67%. Los porcentajes de gónada masculina más elevados eran: 15,21% - 6,55% - 6,48%.

% GF = 3,14 (d.e = 5,0)

% GM = 2,99 (d.e = 4,72)

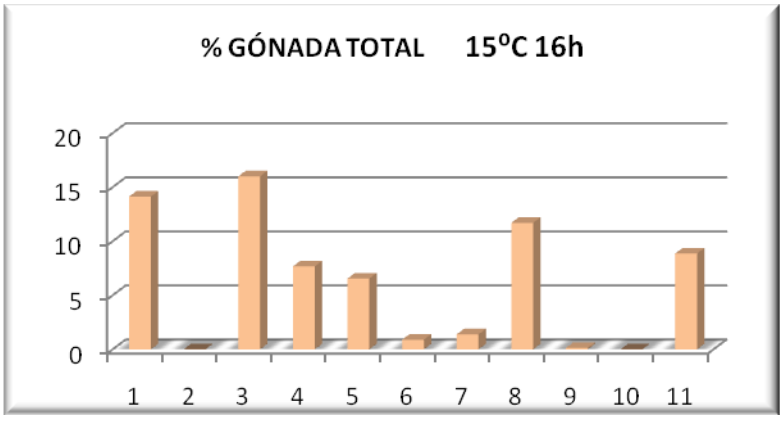


Fig. 44. Porcentajes de ocupación gonadal total de los individuos acondicionados con 15ºC 16h/luz durante 30 días. (n=11).

En la figura 44, se muestran los porcentajes de ocupación de los 11 individuos del acondicionamiento de 15ºC 16h/luz, y se pudo observar que sólo tres individuos superaban el 10% de ocupación gonadal (16,01% - 14,13% - 11,71%) y otros tres que superaban el 5% (8,86% - 7,67% - 6,55%). Los cinco restantes se quedaron por debajo del 2% de ocupación, con la gónada casi llena de células vesiculares. **% GT** = 6,12 (d.e = 6,03).

15ºC G luz

Bajo las condiciones de acondicionamiento de 15ºC y gradiente de luz (8-16h) se pudo ver que sólo tres de los individuos poseían representación femenina: 12,98% - 2,78% - 2,51% (Figura 45). Respecto a la gónada masculina había tres individuos que tenían un porcentaje mayor al 5%: 9,12% - 7,28% - 6,88%. Las ocupaciones gonadales medias eran:

% GF = 1,66 (d.e = 3,9)

% GM = 2,66 (d.e = 3,36).

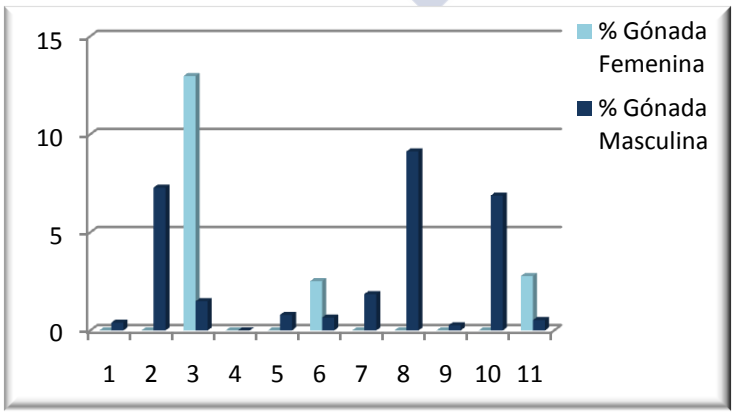


Fig. 45. Porcentajes de ocupación gonadal femenina y masculina de los individuos acondicionados con 15ºC G luz durante 30 días (n=11).

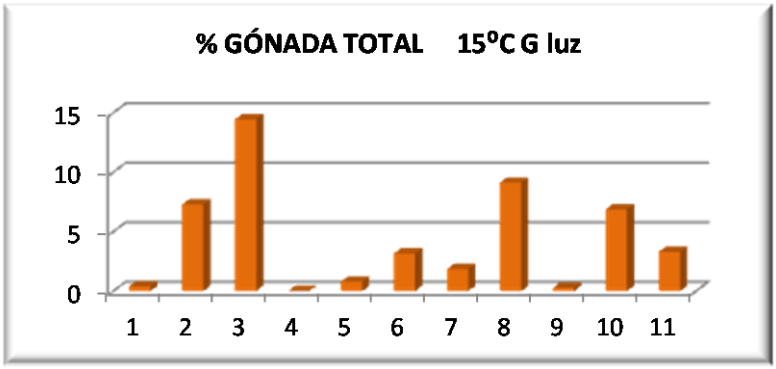
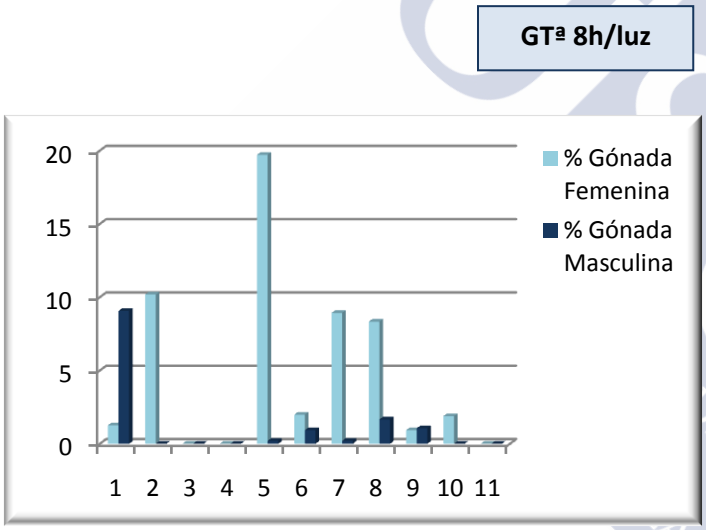


Fig. 46. Porcentajes de ocupación gonadal total de los individuos acondicionados con 15ºC G luz durante 30 días (n=11).

Sólo cuatro individuos que superaron el 5% de la ocupación gonadal: 14,46% - 9,13% - 7,28% - 6,88%. En tres de ellos la ocupación era por completo gónada masculina y el otro casi por completo gónada femenina. El porcentaje medio de ocupación era muy bajo, mostrando que estaba en las primeras fases del ciclo gonadal. **% GT** = 4,32 (d.e = 4,61).



% GF = 4,84 (d.e = 6,28)

% GM = 1,19 (d.e = 2,67)

Fig. 47. Porcentajes de ocupación gonadal femenina y masculina de los individuos acondicionados con G Tª 8h/luz durante 30 días (n=11).

Bajo las condiciones de gradiente de temperatura (14-18ºC) y 8 horas de luz se observó un mayor desarrollo de la gónada femenina (Figura 47), donde se encontraba un individuo con un porcentaje de ocupación próximo al 20% (19,71%) y otros tres próximos al 10% de ocupación (10,18% - 8,93% - 8,33%). Los restantes individuos tenían una ocupación femenina inferior al 2%, teniendo en cuenta que había tres individuos con el 0%; siendo la media de ocupación femenina próxima al 5%. En cuanto a la gónada masculina, excepto un individuo que tenía una ocupación del 9% los restantes presentaban unas ocupaciones inferiores al 2%, teniendo en cuenta que se encontraban cinco individuos con el 0% de ocupación por células masculinas.

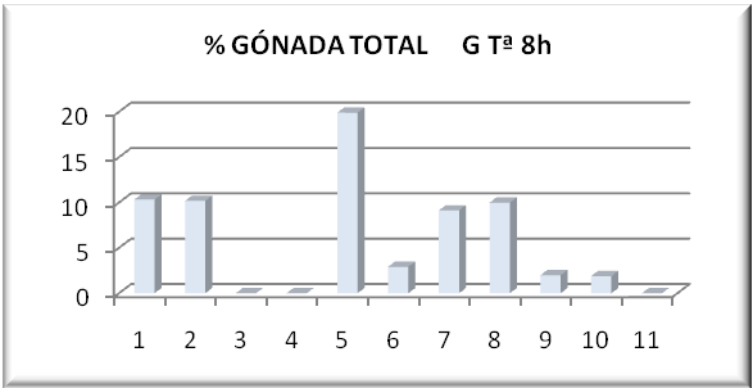


Fig. 48. Porcentajes de ocupación gonadal total de los individuos acondicionados con G Tª y 8h/luz durante 30 días (n=11).

El porcentaje de gónada total (Figura 48) muestra a un individuo con una ocupación próxima al 20% y a cuatro próximos al 10%, tres de ellos gracias a la aportación femenina. Hay tres individuos con el 0% de ocupación gonadal, en los que prácticamente se veían células vesiculares con algunos hemocitos. **% GT** = 6,03 (d.e = 6,37).

GTª 16h/luz

En la figura 49, que corresponde con la ocupación gonadal de los individuos acondicionados con GTª 16h/luz, destaca la ocupación de la gónada femenina, que estaba presente en seis de los individuos (25,4% - 13,49% - 7,41% - 4,1% - 2,47% - 1,21%). **% GF** = 6,01 (d.e = 8,52).

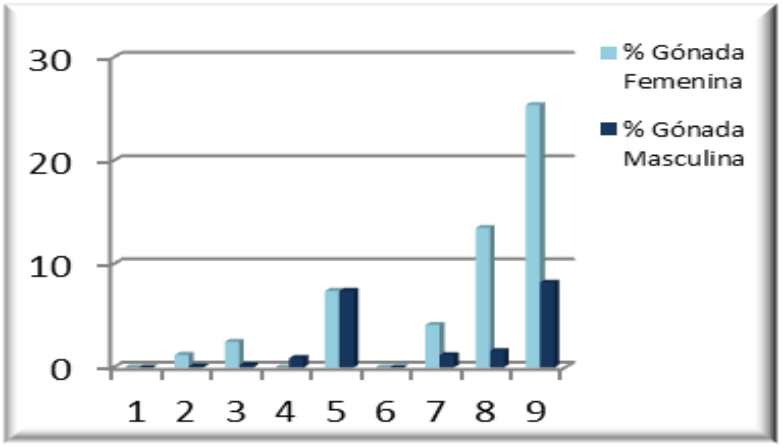


Fig. 49. Porcentajes de ocupación gonadal femenina y masculina de los individuos acondicionados con G Tª 16h/luz durante 30 días (n=9).

La gónada masculina estaba presente en siete de los individuos pero sólo en dos de ellos era destacable (8,2% - 7,4%). En cinco de ellos era menor al 1%. Uno de los individuos presentaba exactamente el mismo porcentaje de gónada femenina y masculina (7,4%). **% GM** = 2,18 (d.e = 3,24).

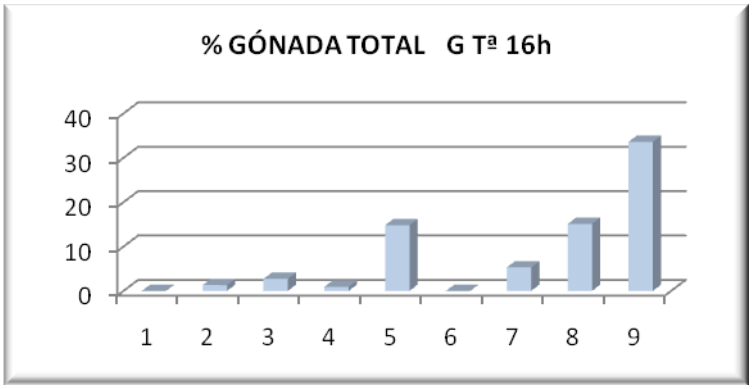


Fig. 50. Porcentajes de ocupación gonadal total de los individuos acondicionados con G Tª 16h/luz durante 30 días (n=9).

% GT = 8,19 (d.e = 11,23)

El porcentaje de ocupación media era el más alto hasta el momento (8,19%) pero la desviación estándar también (11,23). Uno de los individuos alcanzaba el porcentaje de ocupación gonadal del 33,6% y hay otros dos próximos al 15% (15,08% - 14,81%).

G Tª G luz

Al examinar los individuos acondicionado con GTº G luz se encontraron cuatro individuos que tenían el porcentaje de ocupación de gónada femenina por encima del 10%: 17,86% - 14,42% - 14,29% - 10,85% y cuatro más, próximos al 5%: 7,94% - 7,8% - 4,76% - 4,5%. Sólo se vieron tres individuos con menos del 2% de ocupación de la gónada por células femeninas (Figura 51). **% GF** = 7,71 (d.e = 6,04). Aunque todos los individuos presentaban algún porcentaje de gónada masculina, en la mayoría la ocupación era inferior al 5%, salvo en tres individuos que tienen una ocupación de 25,66% - 14,02% y 6,22%. **% GM** = 5,37 (d.e = 7,79).

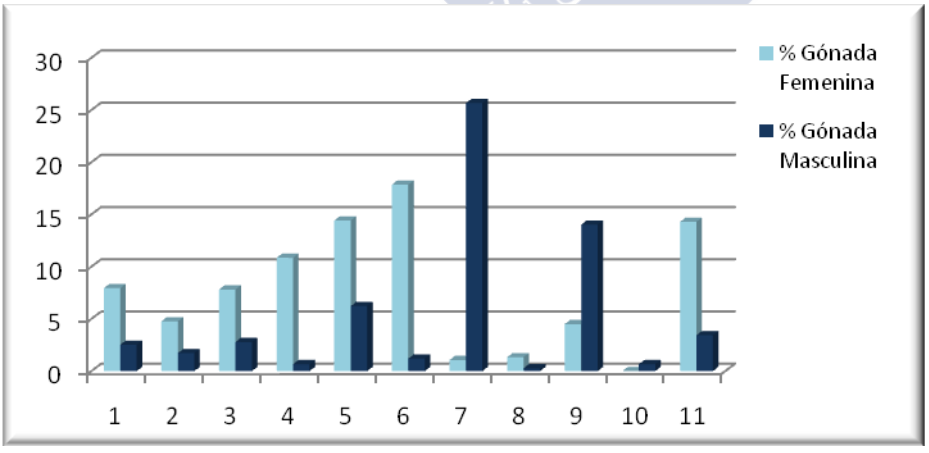


Fig. 51. Porcentajes de ocupación gonadal femenina y masculina de los individuos acondicionados con G Tª G luz durante 30 días (n=11).

Cabe destacar la existencia de siete individuos con mayor presencia de gónada femenina que de gónada masculina.

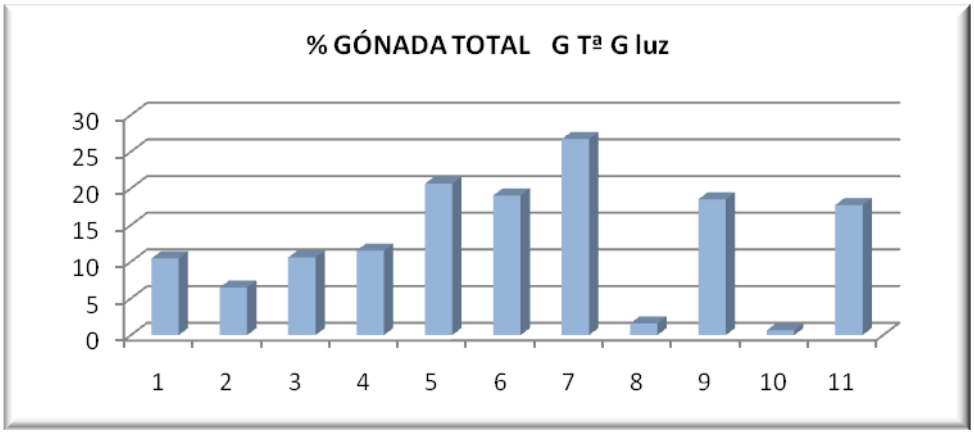


Fig. 52. Porcentajes de ocupación gonadal total de los individuos acondicionados con G Tª G luz durante 30 días (n=11).

La mayoría de los individuos estaban por encima del 10% de ocupación. En estas condiciones de acondicionamiento se encontraron las ocupaciones más altas de todo el muestreo realizado a los 30 días y también la mayor homogeneidad de ocupación entre todos los individuos e incluso dentro del propio tejido gonadal de cada individuo.

% GT = 13,08 (d.e = 8,22)

En las figuras 53-56 se muestran los resultados comparativos obtenidos al cabo de 30 días de acondicionamiento bajo las seis situaciones experimentales ensayadas.

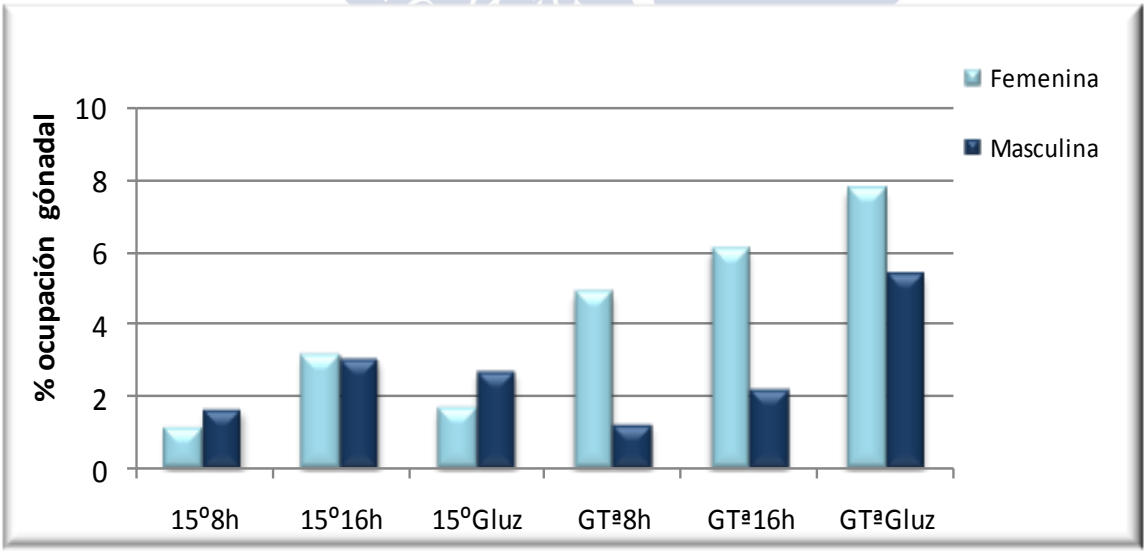


Fig. 53. Porcentajes de ocupación gonadal media femenina y masculina para los diferentes acondicionamientos después de 30 días.

Después de 30 días, la gónada estaba mayoritariamente ocupada por ovogonias y ovocitos, en consonancia con las observaciones reflejadas en el apartado inicial de Resultados

sobre las fases del ciclo gonadal de *Ostrea edulis*. Esto era más evidente en los individuos sometidos a acondicionamientos con gradiente de temperatura (Figura 53).

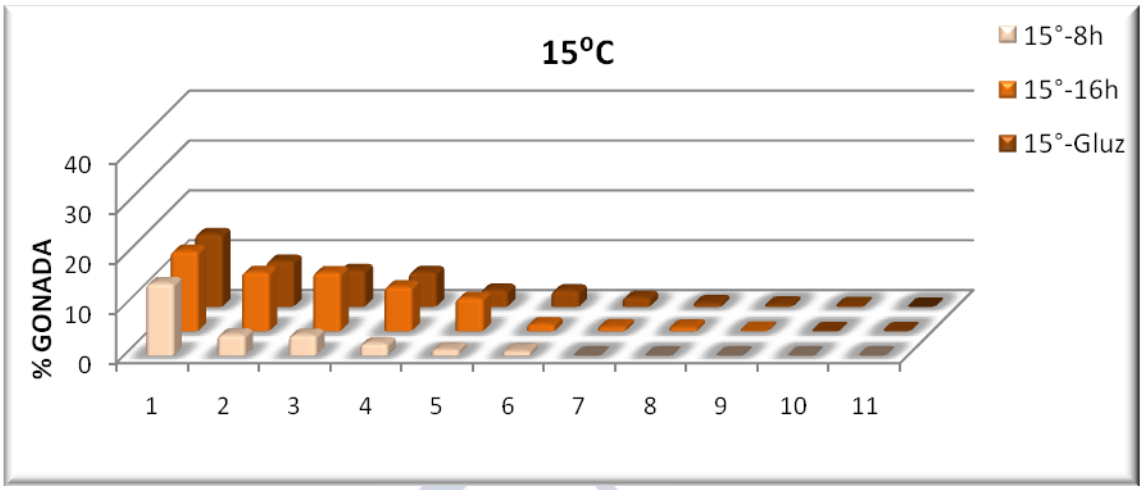


Fig. 54. Porcentaje de ocupación gonadal de cada uno de los individuos analizados a los 30 días de acondicionamiento y sometidos a una temperatura del agua de 15ºC y tres fotoperíodos diferentes.

La figura 54 muestra los porcentajes de ocupación gonadal de todos los individuos acondicionados con 15 ºC y se puede observar que los individuos acondicionados con más horas de luz (16h y gradiente de luz) mostraban porcentajes más altos, llegando en algún caso hasta el 16%. Mientras que con 8h de luz, diez de los individuos analizados no llegaban al 5% de ocupación.

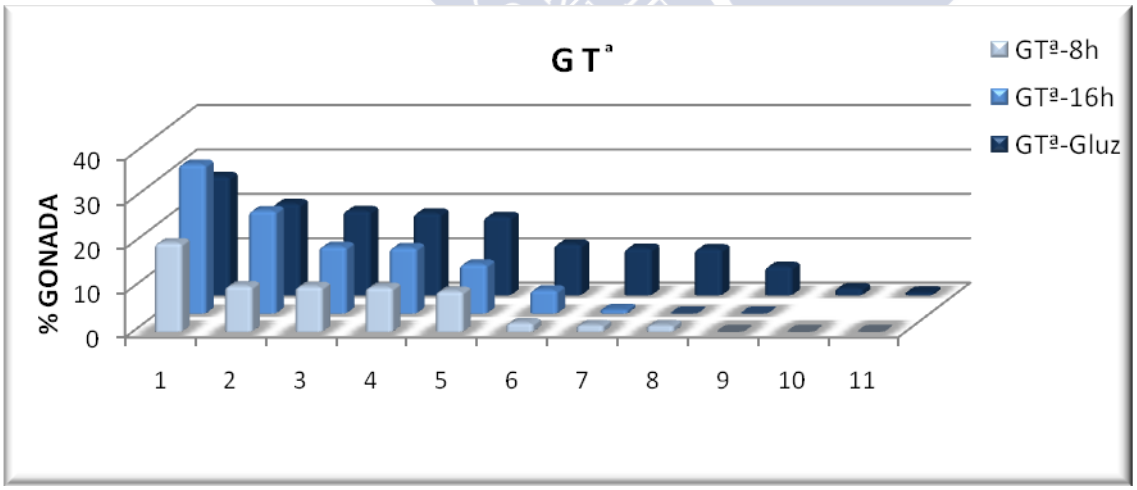


Fig. 55. Porcentaje de ocupación gonadal de cada uno de los individuos analizados a los 30 días de acondicionamiento y sometidos a un gradiente de temperatura del agua y tres fotoperíodos. diferentes.

Los individuos acondicionados con gradiente de temperatura (14-18 ºC) mostraban, como en el caso anterior, una enorme variabilidad individual. Con relación al efecto de la luz podía observarse una tendencia similar a lo observado en el acondicionamiento a 15 ºC. Los

individuos acondicionados con fotoperíodos de 16h y gradiente de luz mostraban un desarrollo gonadal claramente superior que los individuos acondicionados con 8h de luz (Figura 55). Los sometidos a G luz presentaban unas ocupaciones más homogéneas entre los individuos.

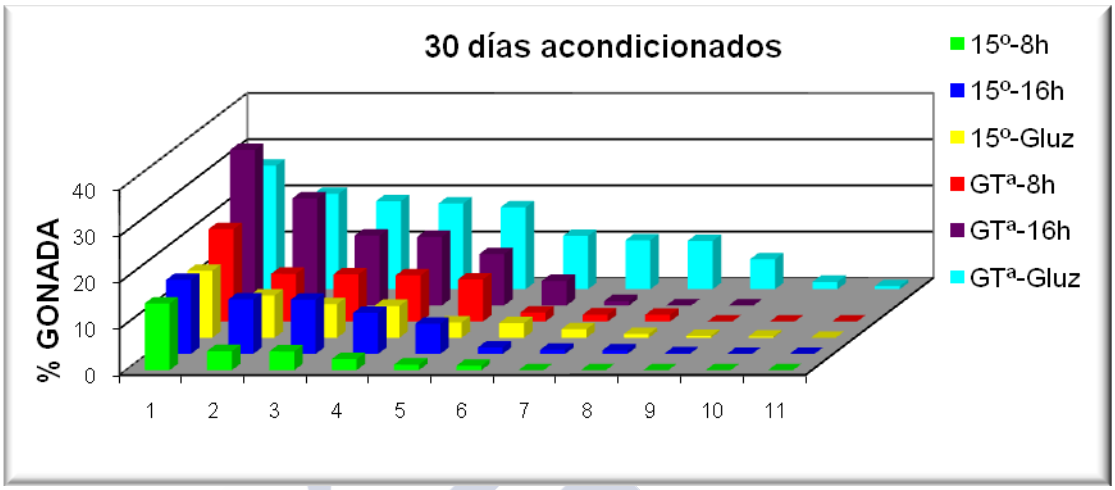


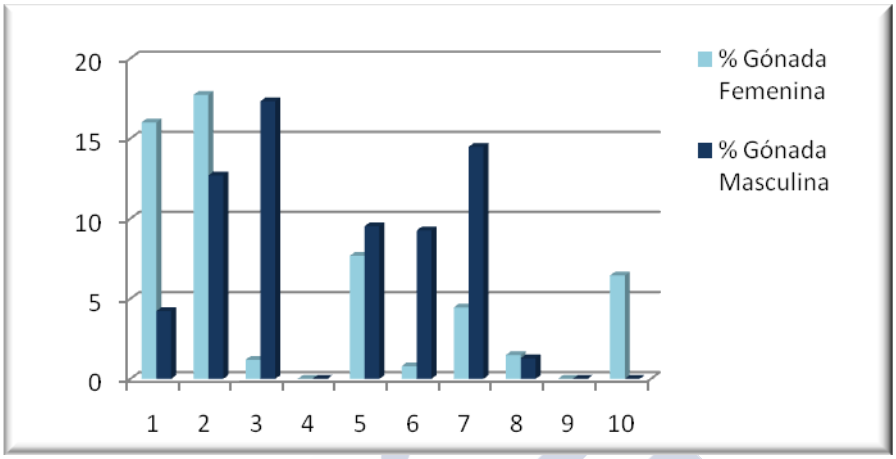
Fig. 56. Porcentaje gonadal medio de ocupación de cada uno de los individuos analizados a los 30 días y sometidos a las seis condiciones de acondicionamiento diferentes.

Como era de esperar los resultados reflejan el efecto positivo del incremento de la temperatura sobre el desarrollo gonadal.

La figura 56 muestra un resumen de los resultados obtenidos en el porcentaje de ocupación gonadal de cada uno de los progenitores sometidos a las distintas condiciones de temperatura y fotoperíodo a los 30 días del inicio del acondicionamiento y refleja la mayor homogeneidad en el desarrollo de los individuos sometidos a gradiente de temperatura, con mayor número de individuos con altos porcentajes de ocupación gonadal.

Muestreo 2: 60 días - 2 meses

15ºC 8h/luz



% GF = 5,58
(d.e = 6,53)

% GM = 6,88
(d.e = 6,62)

Fig. 57. Porcentajes de ocupación gonadal femenina y masculina de los individuos acondicionados con 15ºC 8h durante 60 días (n=10).

En la figura 57 se puede observar que existía un número mayor de individuos con un alto porcentaje de ocupación por gónada masculina que femenina. En cuanto a los porcentajes de gónada femenina, los más altos eran: 17,72% - 16,00% - 7,67% - 6,45% - 4,46%. Los porcentajes de ocupación masculina eran: 17,33% - 14,49% - 12,7% - 9,52% - 9,26% - 4,23%.

Al igual que en el primer muestreo, después de 60 días de acondicionamiento se sigue observando una gran variabilidad individual en el desarrollo gonadal.

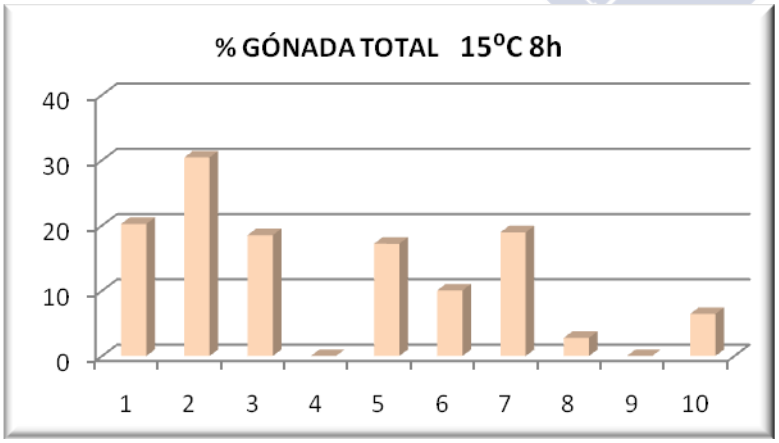


Fig. 58. Porcentajes de ocupación gonadal total de los individuos acondicionados con 15ºC 8h durante 60 días (n=10).

% GT = 12,46
(d.e = 10,17)

Se encontraron dos individuos que tenían la gónada completamente vacía, sin presencia de células sexuales. Además, seis de los individuos tenían un porcentaje de ocupación por encima del 10%: 30,42% - 20,24% - 18,95% - 18,52% - 17,20% y 10,05%.

15ºC 16h/luz

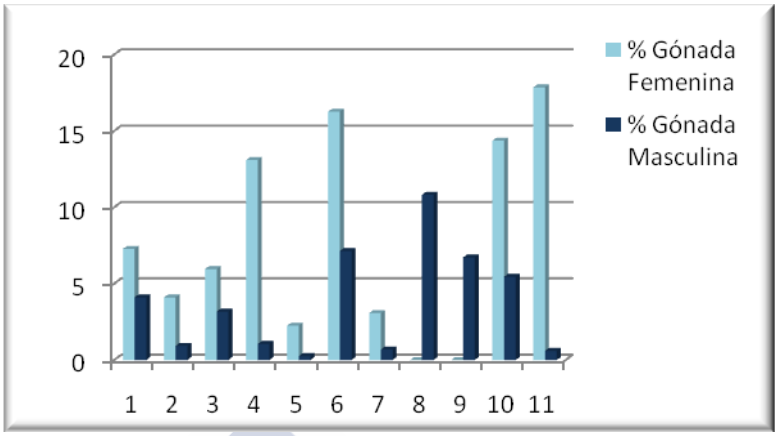


Fig. 59. Porcentajes de ocupación gonadal femenina y masculina de los individuos acondicionados con 15ºC 16h durante 60 días (n=11).

Excepto dos de los individuos analizados, que no poseían células femeninas, los restantes presentaban un porcentaje de ocupación femenina más elevado que el porcentaje de ocupación masculina. Los porcentajes parciales de gónada femenina más elevados de este acondicionamiento son: 17,86% - 16,26% - 14,36% - 13,09% y 7,28%. Siendo el porcentaje medio, % **GF** = 6,99 (d.e = 6,6). Mientras que el porcentaje de gónada masculina era de 3,55 (d.e = 3,47). Sólo se encontraron cuatro individuos que tenían un porcentaje de ocupación por encima del 5%: 10,82% - 7,14% - 6,71% y 5,45%.

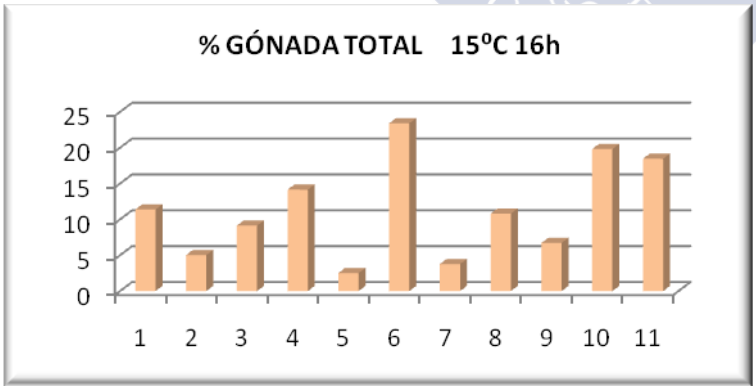


Fig. 60. Porcentajes de ocupación gonadal total de los individuos acondicionados con 15ºC y 16h luz durante 60 días (n=11).

% GT = 10,53 (d.e = 6,91)

En la figura 60, se muestran los porcentajes de ocupación gonadal de los individuos acondicionados con 15ºC/16h luz; seis de los individuos sobrepasaban el 10% de ocupación gonadal: 23,40% - 19,81% - 18,46% - 14,15% - 11,38% y 10,82%. Las ocupaciones son debidas principalmente a la presencia de ovocitos inmaduros y esperma, aunque se encontraron algunos folículos con ovocitos ya maduros.

15ºC G luz

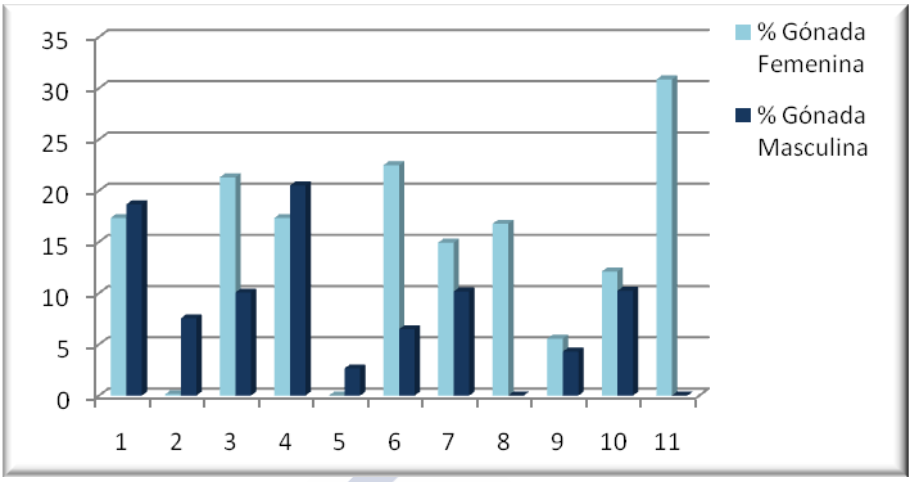


Fig. 61. Porcentajes de ocupación gonadal femenina y masculina de los individuos acondicionados con 15ºC G luz durante 60 días (n=11).

Entre los individuos acondicionado con 15 ºC G luz hay dos individuos que no poseen representación de gónada femenina, en los restantes los porcentajes son: 17,33% - 21,3% - 17,33% - 22,49% - 14,92% - 16,77% - 5,55% - 12,10% y 30,85%. Siendo más altos, en su mayoría, que en el caso de la parte masculina de la gónada.

En casi todos los individuos, excepto dos, había un porcentaje de células sexuales masculinas: 18,65% - 7,54% - 10,05% - 20,5% - 2,65% - 6,48% - 10,16% - 4,29% - 10,22%.

% GF = 14,43 (d.e = 9,49) **% GM** = 8,23 (d.e=6,75).

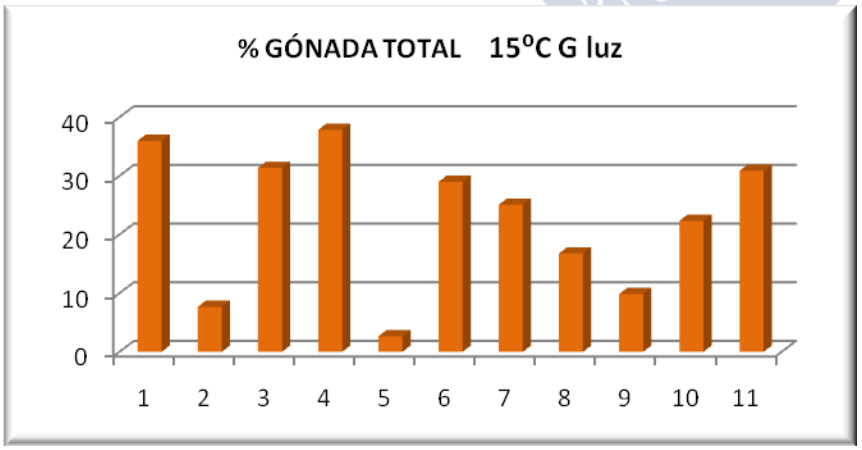


Fig. 62. Porcentajes de ocupación gonadal total de los individuos acondicionados con 15ºC G luz durante 60 días (n=11).

% GT = 22,66 (d.e = 11,92)

Cuando se representaban los datos referidos a la ocupación gonadal total, cinco de los individuos poseían una ocupación gonadal próxima al 30%: 35,48% - 31,35% - 37,83% - 28,97% 25,08% - 22,32% y 30,85%, siendo unos datos bastante homogéneos. Los otros dos individuos tenían una ocupación de 7,67% - 2,65% - 16,77% y 9,84%.

G Tª 8h/luz

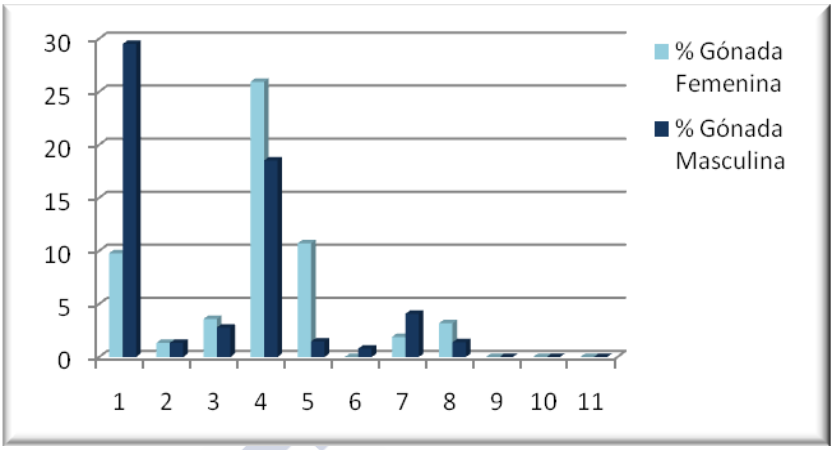


Fig. 63. Porcentajes de ocupación gonadal femenina y masculina de los individuos acondicionados con G Tª 8h/luz durante 60 días (n=11).

Dos de los individuos acondicionados durante 60 días con GTª 8h/luz poseían un porcentaje de gónada femenina que rondaba el 10%: 9,79% y 10,72%. Cuatro estaban por debajo del 4%, tres completamente vacíos y uno de ellos tenía un porcentaje de gónada femenina de 25,93%. En cuanto a la gónada masculina, los porcentajes de ocupación eran: 29,5% - 18,52% y los individuos restantes tenían un porcentaje de ocupación por debajo del 5%. Los porcentajes medios de ocupación gonadal femenina y masculina eran:

% GF = 5,13 (d.e =7,89) **% GM** = 5,44 (d.e = 9,58).

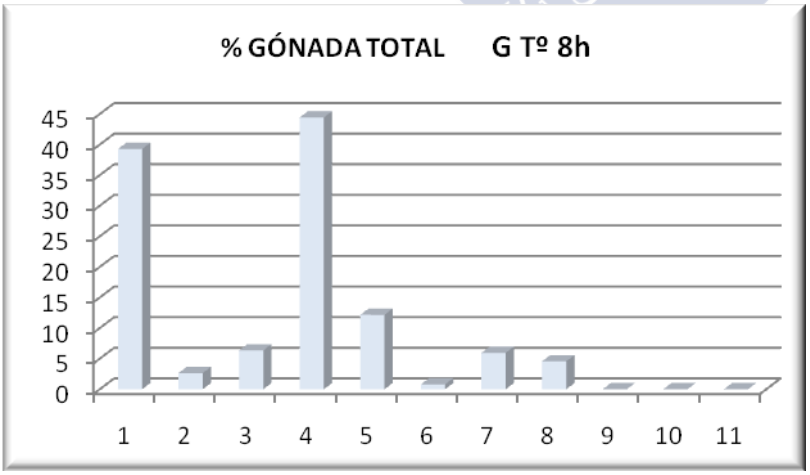


Fig. 64. Porcentajes de ocupación gonadal total de los individuos acondicionados con G Tª 8h/luz durante 60 días (n=11).

% GT = 10,56
(d.e = 15,95)

Dos de los individuos tenían unos porcentajes de ocupación muy elevados: 39,28% y 44,44%; debido fundamentalmente a la presencia de esperma y ovocitos inmaduros. Otros poseían unos porcentajes de 12,17% - 6,35% - 5,95% y 4,56% y los restantes estaban por debajo del 3%.

GTª 16h/luz

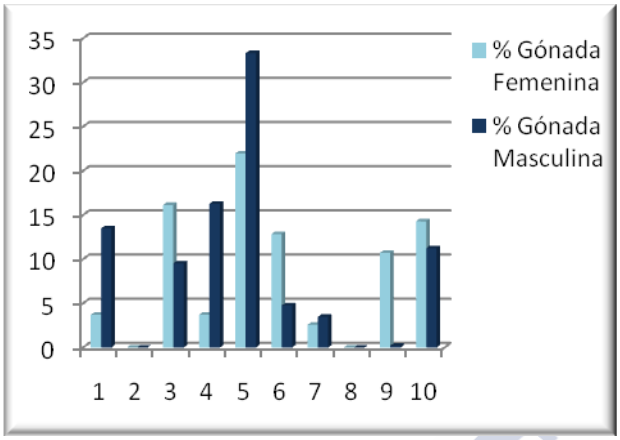


Fig. 65. Porcentajes de ocupación gonadal femenina y masculina de los individuos acondicionados con G Tª 16h/luz durante 60 días (n=10).

% GF = 8,59 (d.e = 7,62)

% GM = 9,23 (d.e = 10,32)

En la figura 65 se pueden observar que cinco de los individuos poseían un porcentaje de gónada femenina que superaba el 10%: 16,14% - 21,96% - 12,83% - 10,72% y 14,29%. Tres de los individuos estaban próximos al 3% y dos estaban completamente vacíos.

Con respecto a la ocupación masculina de la gónada, también cuatro de los individuos superan el 10% de ocupación, uno con creces, 33,33% y los otros 13,49% - 16,27% y 11,24%. Los otros tienen una ocupación del 9,53% - 4,76% y 3,47%. Los otros tres no presentaban ni rastro de células masculinas.

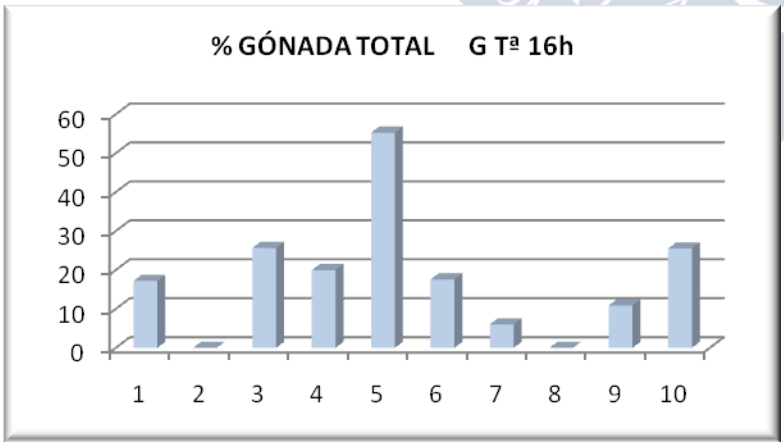


Fig. 66. Porcentajes de ocupación gonadal total de los individuos acondicionados con G Tª 16h/luz durante 60 días (n=10).

% GT = 17,82
(d.e = 16,16)

Cuando se comprobaron los resultados del porcentaje de ocupación gonadal total (Figura 66) cinco de los individuos presentaban unos porcentajes de ocupación rondando el 20% (17,20% - 25,67% - 19,97% - 17,59% y 25,53%), pero uno de ellos ya mostraba una ocupación mucho más elevada (55,29%) y se encontraba próximo al desove como macho. Sin embargo, dos poseían unos porcentajes mucho más bajos (6,05% y 10,91%) y otros dos tenían la gónada completamente vacía.

GTª Gluz

Sólo se pudieron analizar estereológicamente ocho individuos ya que hubo problemas en el proceso de tinción y no se podían diferenciar las estructuras con total nitidez.

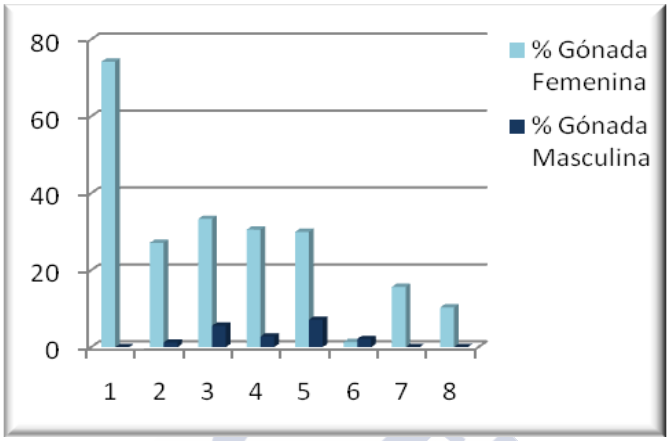


Fig. 67. Porcentajes de ocupación gonadal femenina y masculina de los individuos acondicionados con G Tª G luz durante 60 días (n=8).

Como se muestra en la figura, la mayoría de individuos poseían un porcentaje de gónada femenina muy superior al de gónada masculina. Presentaban un alto porcentaje de gónada femenina, cinco de ellos por encima del 20%, llegando uno a alcanzar el 74,21% de ocupación. La ocupación por gónada masculina era muy baja, siendo la mayor de 7,14%. Así, los porcentajes medios de ocupación gonadal encontrados eran:

% GF = 27,81 (d.e = 21,88) **% GM** = 2,35 (d.e = 2,71)

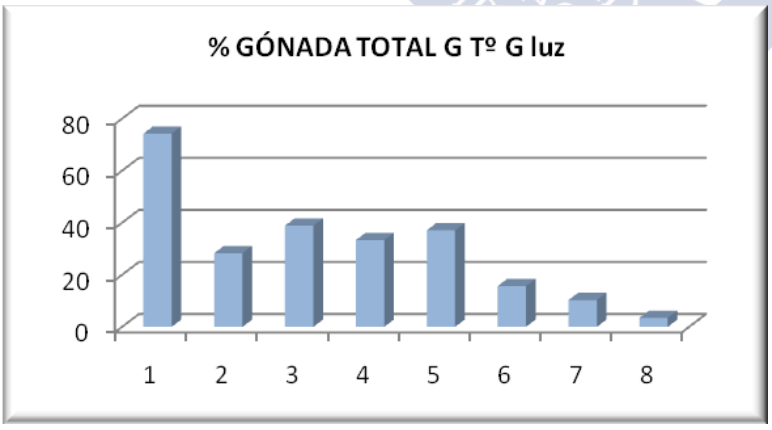


Fig. 68. Porcentajes de ocupación gonadal total de los individuos acondicionados con G Tª G luz durante 60 días (n=8).

% GT = 30,16
(d.e = 22,03)

Los porcentajes de ocupación gonadal total eran los más altos encontrados en el experimento hasta el momento, el menor porcentaje era del 3,44% pero había tres individuos que superaban el 30% (38,89% - 33,34% y 37,11%) y uno de los individuos presentaba prácticamente toda la gónada ocupada con células reproductoras femeninas maduras, con un porcentaje de 74,21%. El porcentaje de ocupación medio de los individuos analizados alcanzaba un 30,16%.

En las figuras 69-72 se muestran los resultados comparativos obtenidos al cabo de 60 días de acondicionamiento bajo las seis situaciones experimentales ensayadas.

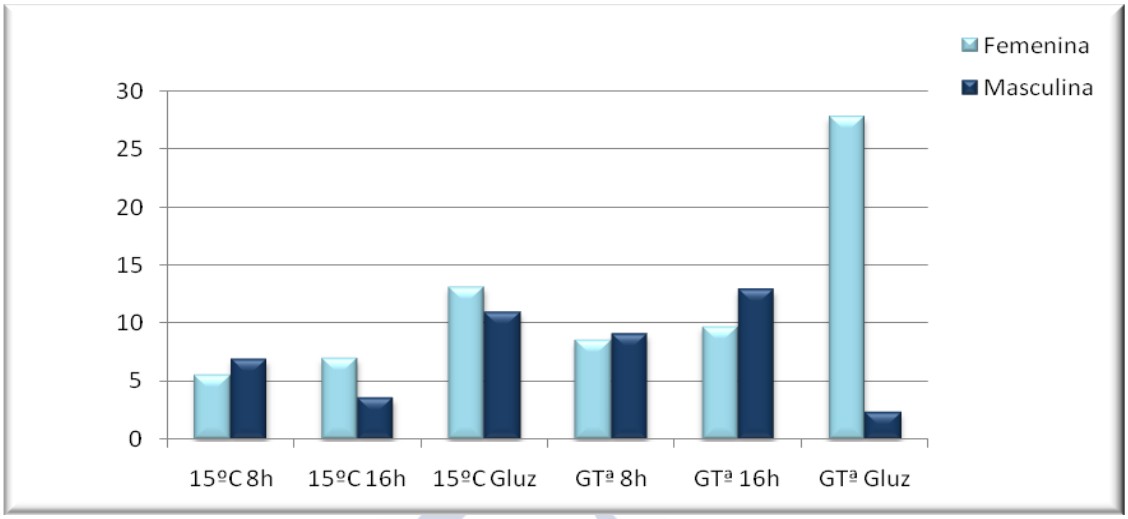


Fig. 69. Porcentajes de ocupación gonadal media femenina y masculina para los diferentes acondicionamientos después de 60 días.

Después de 60 días, la gónada estaba mayoritariamente ocupada por ovogonias y ovocitos, pero en algunos acondicionamientos se observaron gran cantidad de espermátidas madurando (Figura 69).

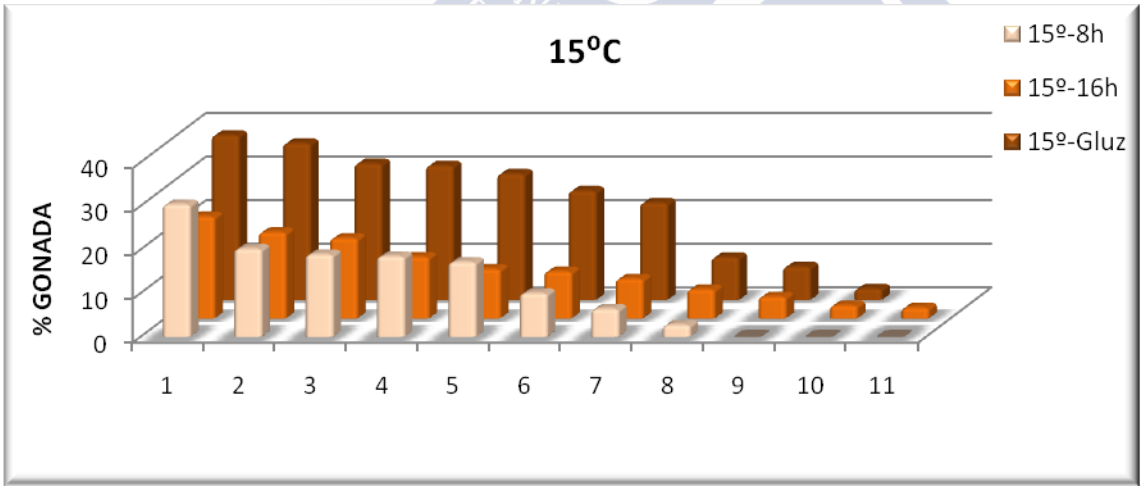


Fig. 70. Porcentaje gonadal de cada uno de los individuos analizados a los 60 días de acondicionamiento y sometidos a una temperatura del agua de 15ºC y tres fotoperíodos diferentes.

La figura 70 muestra los porcentajes de ocupación gonadal después de dos meses de acondicionamiento y se puede observar que los individuos tenían la gónada mucho más desarrollada que en el muestreo anterior (1 mes) y los más avanzados en el desarrollo eran los que habían sido acondicionados siguiendo un gradiente de luz. Cuatro de estos individuos mostraban ocupaciones gonadales por encima del 30% (37,83% - 35,98% - 31,35% y 30,85) y tres más por encima del 20% (28,97% - 25,08% y 22,32%). En el caso de los progenitores acondicionados con 8h de luz, los porcentajes de ocupación eran del 30,42% - 20,24% - 18,95%

y 18,52% y para los individuos acondicionados con 16 horas de luz de 23,41% - 19,82% - 18,45 - 14,15% y 11,38%.

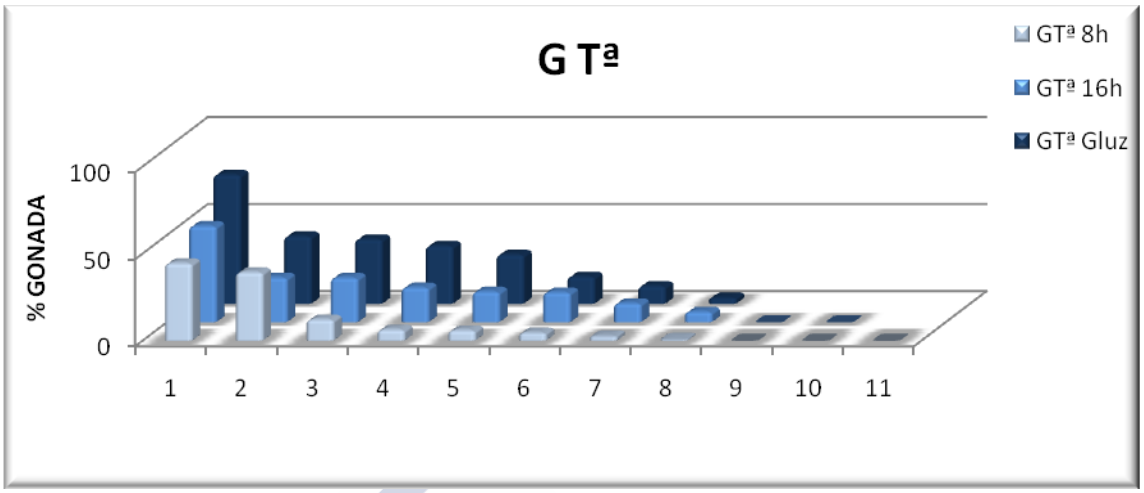


Fig. 71. Porcentaje gonadal de cada uno de los individuos analizados a los 60 días de acondicionamiento y sometidos a un gradiente de temperatura del agua y tres fotoperíodos diferentes.

Como se ve en la figura 71, los desarrollos gonadales también están más avanzados pero hay mucha asincronía debido a que mientras muchos de los individuos se encuentran con la gónada madura y a punto de desovar, hay otros que presentan ocupaciones muy bajas o la gónada completamente vacía, probablemente porque ya habían desovado o realizado sueltas de esperma maduro al medio.

Se debe destacar que en estos individuos acondicionados con gradiente de temperatura, el grado de ocupación es prácticamente el doble que el obtenido en el caso de los individuos acondicionados con la temperatura constante de 15ºC. La figura 72 muestra un resumen de los resultados obtenidos en el porcentaje de ocupación gonadal de cada uno de los progenitores sometidos a las distintas condiciones de temperatura y fotoperíodo a los 60 días del inicio del acondicionamiento.

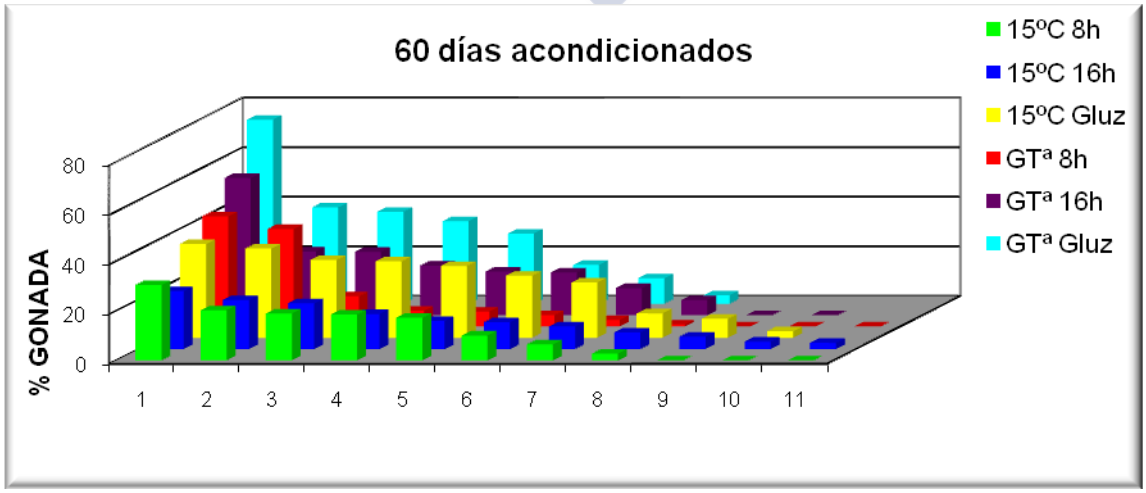


Fig. 72. Porcentaje gonadal medio de ocupación de cada uno de los individuos analizados a los 60 días y sometidos a las seis condiciones de acondicionamiento diferentes.

Muestreo 3: 90 días - 3 meses

En este tercer muestreo se contempla únicamente los acondicionamientos realizados a temperatura constante de 15ºC, puesto que las ostras acondicionadas con gradiente de temperatura ya habían desovado en su mayor parte al cabo de dos meses, antes de recoger las muestras para realizar este muestreo.

15ºC 8h/luz

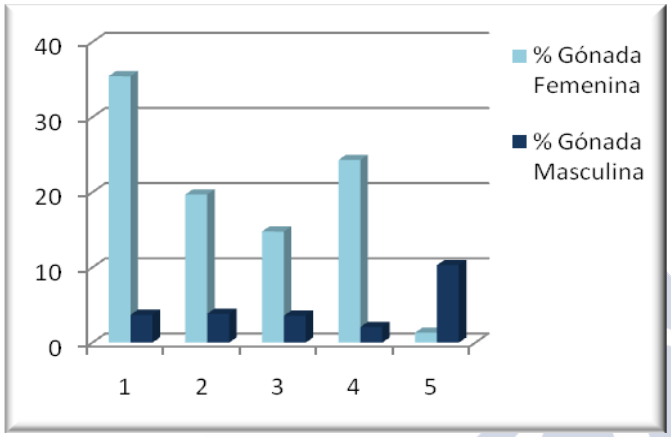


Fig. 73. Porcentajes de ocupación gonadal femenina y masculina de los individuos acondicionados con 15ºC 8h/luz durante 90 días (n=5).

Los porcentajes de gónada femenina encontrados eran mucho más elevados que los de gónada masculina, salvo en uno de los individuos. Los porcentajes femeninos eran 35,45% - 19,71% - 14,78% y 24,31%; mientras que la ocupación masculina sólo alcanza el 10,38% en uno de los individuos y los restantes tenían ocupaciones muy bajas, entre el 2 y 4%. Los porcentajes de ocupación gonadal media eran: **% GF** = 19,11 (d.e = 12,54) **% GM** = 4,70 (d.e = 3,22)

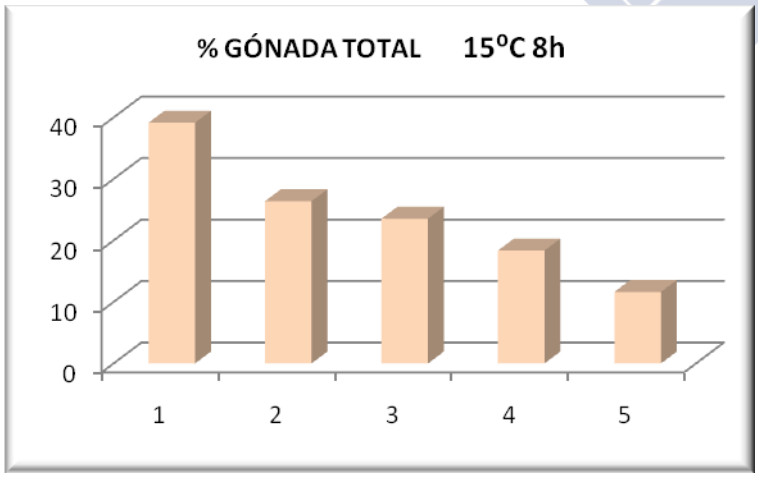


Fig. 74. Porcentajes de ocupación gonadal total de los individuos acondicionados con 15ºC 8h/luz durante 90 días (n=5).

% GT = 23,82 (d.e = 10,25)

Los porcentajes de ocupación total de los individuos acondicionados con 15ºC 8h/luz y analizados a los 90 días (Figura 74) eran todos superiores al 10% (39,15% - 26,39% - 23,55% - 18,36% y 11,64%).

15ºC 16h/luz

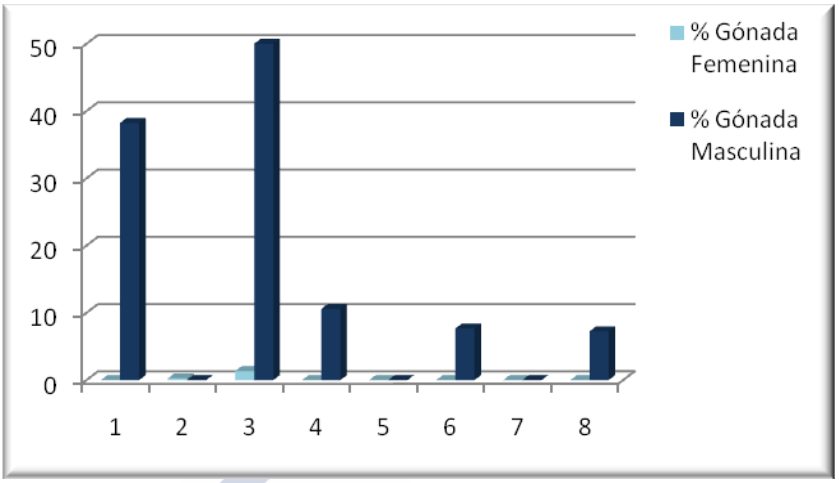


Fig. 75. Porcentajes de ocupación gonadal femenina y masculina de los individuos acondicionados con 15ºC 16h/luz durante 90 días (n=8).

Como se puede observar en la figura 75, apenas había representación de células sexuales femeninas (0,26% y 1,32%) en dos de los individuos acondicionados con 15ºC 16h/luz después de 3 meses. El tejido gonadal de cinco de los individuos analizados estaba formado básicamente por espermatocitos y esperma maduro (50,0% - 38,23% - 10,58% - 7,67% y 7,24%). Así, los porcentajes medios de ocupación gonadal femenina y masculina eran:

% GF = 0,20 (d.e = 0,46) **% GM** = 14,21 (d.e = 19,15)

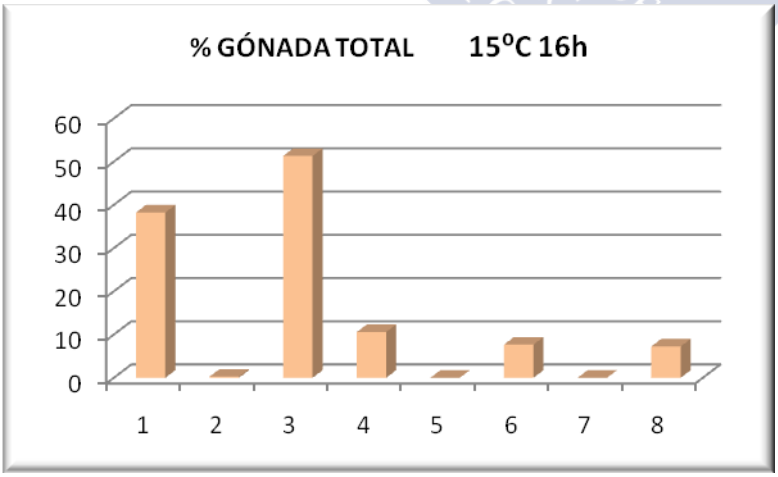


Fig. 76. Porcentajes de ocupación gonadal total de los individuos acondicionados con 15ºC 16h/luz durante 90 días (n=8).

% GT = 14,41
(d.e = 19,48)

Los porcentajes de ocupación totales de los ocho individuos analizados (Figura 76) se debían básicamente a la parte sexual masculina y eran los siguientes: 38,23% - 0,26% - 51,32% - 10,58% - 7,67% y 7,24%. Dos de los individuos se encontraban completamente vacíos.

15ºC G luz

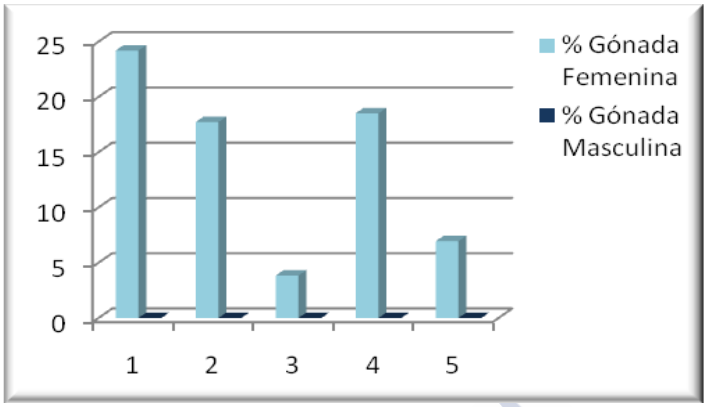


Fig. 77. Porcentajes de ocupación gonadal femenina y masculina de los individuos acondicionados con 15ºC G luz durante 90 días (n=5).

En los individuos acondicionados con G luz sucede lo contrario que en el anterior acondicionamiento (15ºC 16h/luz). En la figura 77 se ve que no hay ni rastro de células sexuales masculinas. El tejido gonadal de los cinco individuos analizados estaba formado únicamente por ovogonias y ovocitos (24,21% - 17,72% - 3,84% - 18,52% y 6,95%). Así, el porcentaje de ocupación femenina era: **% GF** = 14,25 (d.e = 8,53), mientras el masculino era 0,0%.

El 100% de la ocupación gonadal era debida al porcentaje de ocupación de gónada femenina. **% GT** = 14,25 (d.e = 8,53)= **% GF**

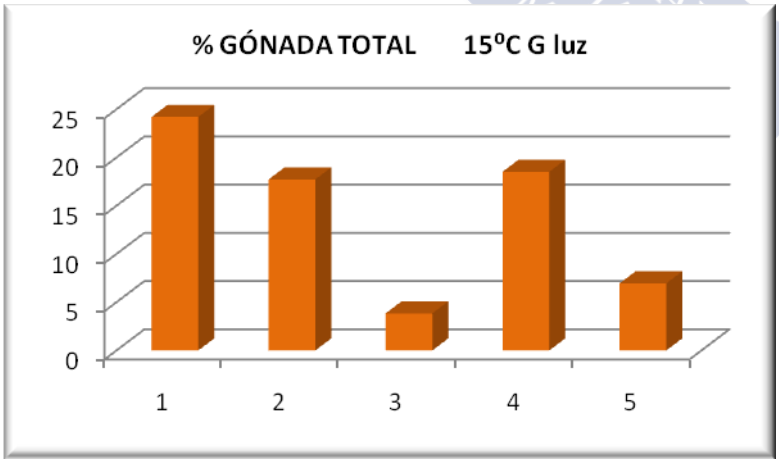


Fig. 78. Porcentajes de ocupación gonadal total de los individuos acondicionados con 15ºC G luz durante 90 días (n=5).

En las figuras 79 y 80 se muestran los resultados comparativos obtenidos al cabo de 90 días de acondicionamiento bajo las tres situaciones experimentales analizadas.

Después de 90 días, la gónada estaba mayoritariamente ocupada por ovogonias y ovocitos, en general, aunque se observó que los individuos acondicionados con 16h/luz sólo

tenían espermátidas madurando y en cambio, los individuos acondicionados bajo gradiente de luz, únicamente poseían ovocitos y ovogonias en su tejido gonadal (Figura 79).

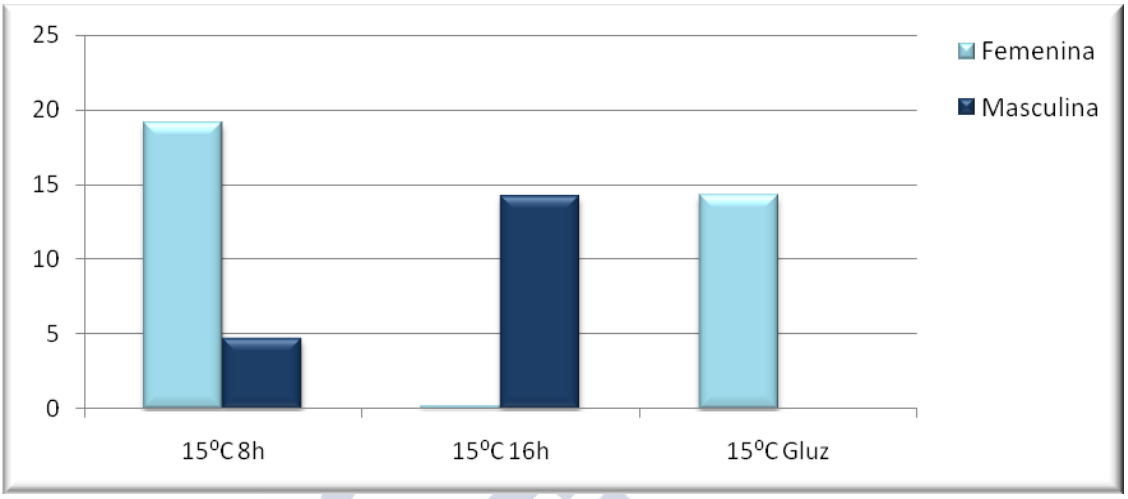


Fig. 79. Porcentajes de ocupación gonadal media femenina y masculina para los diferentes acondicionamientos después de 90 días.

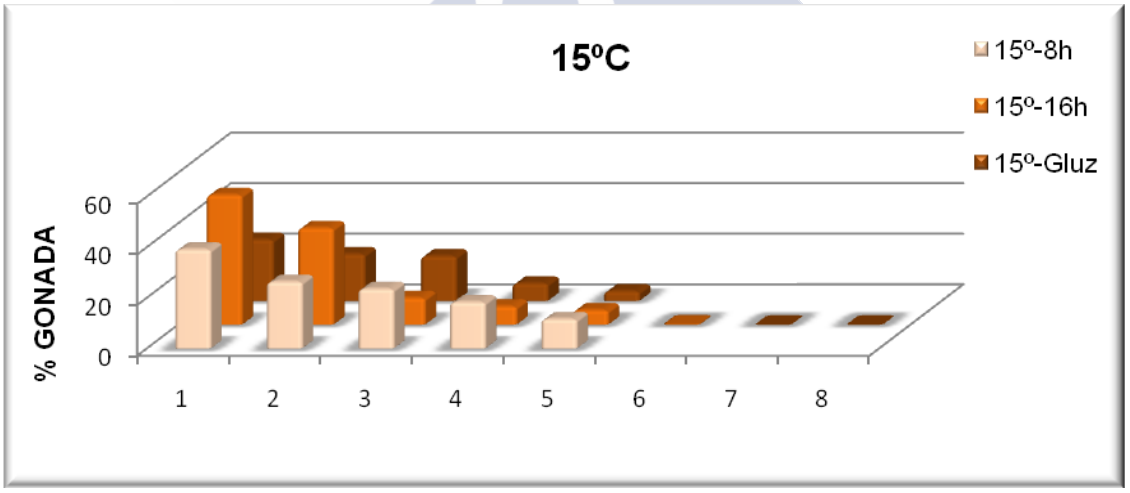


Fig. 80. Porcentaje gonadal de cada uno de los individuos analizados a los 90 días de acondicionamiento y sometidos a una temperatura del agua de 15ºC y tres fotoperíodos diferentes.

En la figura 80 se muestra que los porcentajes de ocupación más elevados individualmente correspondían con los individuos acondicionados con 16h/luz (50,0% y 38,23%), aunque también presentaban una desviación estándar mucho mayor; los individuos acondicionados con 8h/luz tenía unos porcentajes algo más homogéneos y lo mismo ocurría con los individuos acondicionados con un gradiente de luz, estos últimos con signos de desoves parciales.

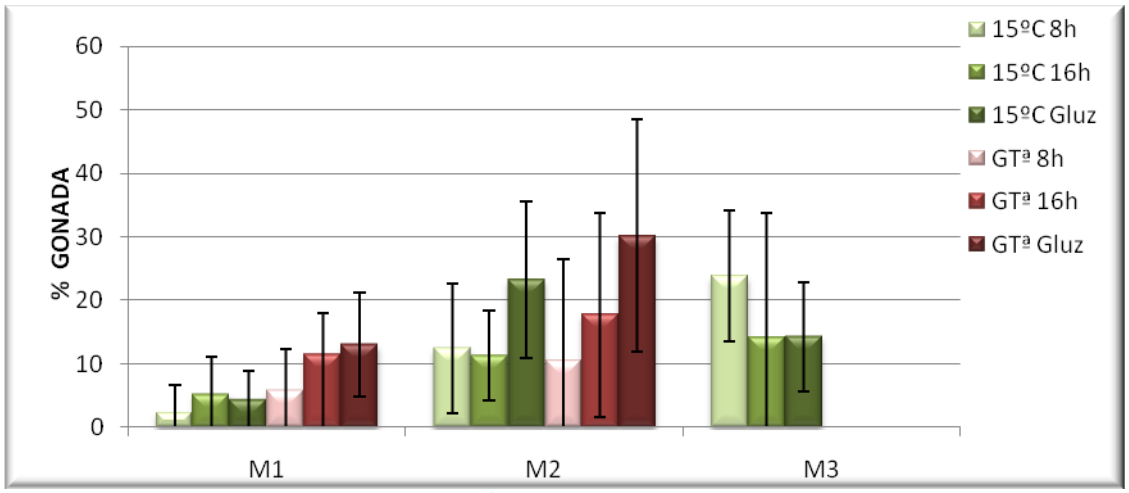


Fig. 81. Porcentajes de ocupación media de los individuos sometidos a los diferentes acondicionamientos a los largo de todo el experimento. M1: muestreo 1 (30 días), M2: muestreo 2 (60 días) y M3: muestreo 3 (90 días)

En la figura 81 se puede observar la evolución del desarrollo gonadal medio de los individuos sometidos a cada uno de los acondicionamientos y analizados a lo largo de los distintos muestreos. En el muestreo 1, los individuos con mayor porcentaje de ocupación eran los acondicionados con gradiente de temperatura. En el muestreo 2, los individuos acondicionados con gradiente de luz tenían unos porcentajes de ocupación gonadal más altos. En el muestreo 3, tal y como se ha comentado anteriormente, no se analizaron los individuos acondicionados con gradiente de temperatura puesto que ya se habían producido desoves masivos a los dos meses de acondicionamiento.

Se carece de datos de producción de larvas en este experimento, ya que los desoves se produjeron mucho antes de lo esperado.

4. RESULTADOS ESTADÍSTICA.

Se realizó el ANOVA de los resultados estereológicos para cada uno de los muestreos utilizando como factores muestreo, fotoperíodo y temperatura. Se hizo un diseño con los efectos principales y todas las interacciones posibles de los factores. Sin embargo, no se encontraron efectos significativos de las interacciones. El muestreo y el fotoperíodo si que mostraban diferencias significativas.

Al realizar los PostHoc (Tukey HSD) se encontraron diferencias significativas (p=0,03) entre los regímenes de fotoperíodo de 8h y GF.

Tabla 10.- Resultados del ANOVA realizado en el Experimento 1, utilizando la variable dependiente Arcs_Ocup y los factores Muestreo, Temperatura y Fotoperíodo.

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
CorrectedModel	2.062[a]	14	.147	4.086	.000
Intercept	12.270	1	12.270	340.386	.000
Muestreo	1.155	2	.577	16.020	.000
Temperatura	.108	1	.108	2.993	.086
Fotoperiodo	.269	2	.135	3.735	.027
Muestreo * Temperatura	.042	1	.042	1.152	.285
Muestreo * Fotoperiodo	.289	4	.072	2.005	.098
Temperatura * Fotoperiodo	.069	2	.034	.954	.388
Muestreo * Temperatura * Fotoperiodo	.048	2	.024	.661	.518
Error	4.578	127	.036		
Total	19.672	142			
Corrected Total	6.640	141			

a. R Squared = .311 (Adjusted R Squared = .235)

Tabla 11.- Resultados del test de Tukey realizado en el Experimento 1, utilizando la variable dependiente Arcs_Ocup para el factor Fotoperíodo.

Arcs_Ocup
Tukey HSD

(I) Fotoperiodo	(J) Fotoperiodo	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% ConfidenceInterval	
					LowerBound	UpperBound
8h	16h	-.040941	.0387631	.543	-.132868	.050985
	GF	-.130225*	.0393770	.003	-.223608	-.036842
16h	8h	.040941	.0387631	.543	-.050985	.132868
	GF	-.089283	.0389775	.061	-.181719	.003152
GF	8h	.130225*	.0393770	.003	.036842	.223608
	16h	.089283	.0389775	.061	-.003152	.181719

Based on observed means.
The error term is Mean Square(Error) = .036.
*. The mean difference is significant at the .05 level.

EXPERIMENTO 2; EFECTO DEL FOTOPERÍODO EN OTOÑO.

Los progenitores fueron sometidos a las siguientes condiciones experimentales: la temperatura del agua era un gradiente desde 14 a 18ºC y dos fotoperíodos (8h/luz y gradiente de luz desde 8 a 16h/luz). Se conseguían de este modo dos condiciones de acondicionamiento diferentes (Ver apartado 3.1.1 Experimento 2 de Materiales y Métodos).

1. MEDIDAS Y PESOS (BIOMETRÍA):

Muestreo inicial: 10 de Octubre

Para determinar el estado gonadal de los progenitores en otoño se realizó un muestreo inicial. En este muestreo se recogieron 12 individuos del total de 192 individuos procedentes de Cambados (Ría de Arousa).

Se midió la longitud y el ancho de cada ejemplar utilizando un calibre, determinándose que la longitud media era de 9,3 cm y la anchura media era de 8,41 cm.

A continuación, se determinó el peso húmedo, en una balanza Mettler® PM300. En la tabla 12 se presentan los pesos frescos de la concha y la vianda, junto con el peso total y el peso medio por individuo.

Tabla 12. Peso húmedo de la vianda, de la concha, peso total y peso medio de los progenitores en el muestreo inicial. **Phv** (peso húmedo de la vianda), **Pmv** (peso medio de la vianda), **Phc** (peso húmedo de la concha), **Pt** (peso total de los individuos seleccionados para este muestreo) y **Pmi** (peso medio de cada individuo).

	nº ind.	**Phv** (Peso húmedo vianda)	**Pmv** (Peso medio vianda)	**Phc** (Peso húmedo concha)	**Pt** (Peso total)	**Pmi** (Peso medio individuo)
Muestreo inicial	12	196,49 g	16,37 g	1547,18 g	1798,30 g	149,86 g

Muestreo 1: 29 días

El primer muestreo fue realizado un mes después de empezar el acondicionamiento de los progenitores. Los distintos parámetros biométricos se muestran en la Tabla 13.

Tabla 13. Peso húmedo de la vianda, de la concha, peso total y peso medio de los progenitores en el muestreo 1, 29 días después del inicio del acondicionamiento.

	nº ind.	Phv	Pmv	Phc	Pt	Pmi
8h/luz	10	143,08 g	14,31 g	1139,15 g	1309,33 g	130,93 g
G (8-16h/luz)	10	143,88 g	14,39 g	1126,34 g	1286,19 g	128,62 g

El peso medio por individuo era menor que el peso medio obtenido inicialmente, siendo 149,86 g el Pmi del muestreo inicial y oscilando en el muestreo 1 entre 130,93 g (8h/luz) y 128,62 g (G luz).

Muestreo 2: 34 días

A los 34 días de comenzar el acondicionamiento se realizó el segundo muestreo, recogiéndose 9 y 13 individuos de cada uno de los acondicionamientos y determinándose los parámetros biométricos citados anteriormente.

Tabla 14. Peso húmedo de la vianda, de la concha, peso total y peso medio de los progenitores en el muestreo 2, 34 días después del inicio del acondicionamiento.

	nº ind.	Phv	Pmv	Phc	Pt	Pmi
8h/luz	9	108,83 g	12,09 g	846,41 g	972,25 g	108,03 g
G (8-16h/luz)	13	163,6 g	12,58 g	1404,83 g	1584,38 g	121,88 g

Se podía observar que el peso medio de los individuos era menor que en los dos muestreos anteriores pero había una gran diferencia entre los individuos acondicionados con 8h/luz (108,03 g) y los acondicionados con un gradiente de luz (121,88 g). En cuanto al peso medio de la vianda, no difiere tanto entre los dos acondicionamientos.

Muestreo 3: 43 días

A los 43 días de iniciar el acondicionamiento de los individuos se realizó el muestreo 3, en el que se recogieron 10 individuos de cada acondicionamiento. Los distintos parámetros biométricos se muestran en la Tabla 15.

Tabla 15. Peso húmedo de la vianda, de la concha, peso total y peso medio de los progenitores en el muestreo 3, 43 días después del inicio del acondicionamiento.

	nº ind.	Phv	Pmv	Phc	Pt	Pmi
8h/luz	10	127,89 g	12,79 g	1174,82 g	1324,69 g	132,47 g
G (8-16h/luz)	10	150,86 g	15,09 g	1216,85 g	1384,85 g	138,48 g

El peso medio de los individuos acondicionados era mucho más elevado que en el muestreo anterior y seguía siendo superior en los individuos acondicionados con un gradiente de luz (138,48 g) que en los sometidos a 8h/luz (132,47 g). El peso medio de la vianda aumenta en ambos acondicionamientos pero el aumento es más acusado en los individuos acondicionados con gradiente de luz.

Muestreo 4: 49 días

El cuarto muestreo se realizó a los 49 días de comenzar el acondicionamiento de los progenitores, recogiéndose 10 individuos de cada acondicionamiento (uno de los individuos tuvo que ser descartado ya que no se encontraba en buenas condiciones). Se determinaron los parámetros biométricos citados anteriormente.

Tabla 16. Peso húmedo de la vianda, de la concha, peso total y peso medio de los progenitores en el muestreo 4, 49 días después del inicio del acondicionamiento.

	nº ind.	Phv	Pmv	Phc	Pt	Pmi
8h/luz	10	136,53 g	13,65 g	1155,49 g	1317,53 g	131,75 g
G (8-16h/luz)	9	155,44 g	17,27 g	1175,57 g	1353,83 g	135,38 g

El peso medio de la vianda ha aumentado en ambas tipos de acondicionamiento desde el muestreo anterior, observándose diferencias claras entre las dos condiciones de fotoperíodo utilizadas. Este aumento no se veía reflejado en el peso medio de los individuos ya que había disminuido en los dos acondicionamientos.

Muestreo 5: 69 días

El muestreo 5 se realizó a los 69 días del inicio del acondicionamiento, recogiéndose 10 individuos de cada uno de los acondicionamientos y determinándose los parámetros biométricos citados anteriormente y que se muestran en la Tabla 17.

Tabla 17. Peso húmedo de la vianda, de la concha, peso total y peso medio de los progenitores en el muestreo 5, 69 días después del inicio del acondicionamiento.

	nº ind.	Phv	Pmv	Phc	Pt	Pmi
8h/luz	10	122,27 g	12,23 g	1138,11 g	1285,22 g	128,52 g
G (8-16h/luz)	10	192,72 g	19,27 g	1583,79 g	1801,69 g	180,17 g

Los pesos de los individuos acondicionados con gradiente de luz eran mucho más elevados que los de 8h/luz, tanto el peso medio de la vianda como el peso medio del individuo.

Así mismo, se pudo observar la existencia de larvas en la cavidad paleal de uno de los individuos.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2. RESULTADOS HISTOLOGÍA.

Las preparaciones y el análisis histológico se realizaron de acuerdo con los protocolos descritos en el apartado 3.4 de Materiales y Métodos. A continuación, en las figuras 82-84 se muestran algunas imágenes representativas del desarrollo gametogénico de las ostras acondicionadas con los dos regímenes de fotoperíodo.

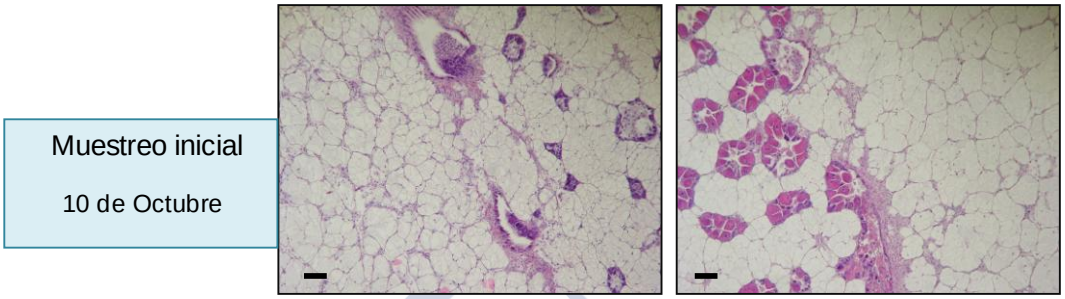


Figura 82. Fotografías de las secciones histológicas más representativas del desarrollo gonadal de los individuos analizados en el muestreo inicial. — Barra: 10 µm.

Este experimento se inició en otoño, a principios del mes de Octubre, período en el que la ostra plana se encuentra en un estado de reposo o inicio de la gametogénesis como se observa en las imágenes correspondientes al muestreo inicial, en las que se aprecian los folículos gonadales vacíos en su mayoría y algunas células primordiales o gonias y algunos signos de reabsorción.

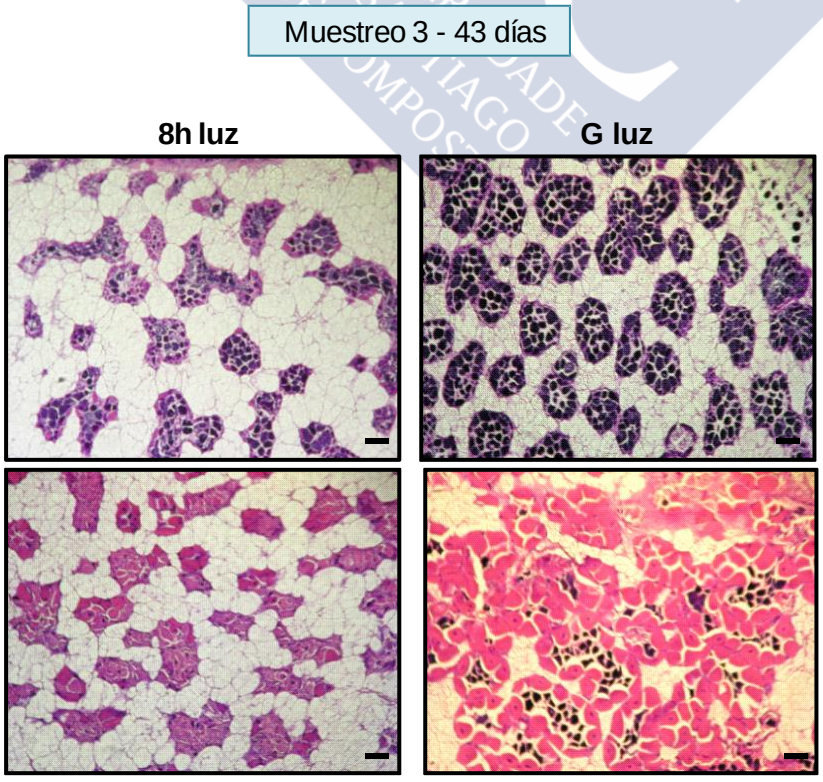


Figura 83. Fotografías de las secciones histológicas más representativas del desarrollo gonadal de los individuos analizados a los 43 días del inicio del acondicionamiento. — Barra: 10 µm.

En las preparaciones procedentes del muestreo 3, a los 43 días del inicio del acondicionamiento (Figura 83), se aprecia ya desarrollo gonadal, aunque difiere bastante entre los dos regímenes de acondicionamiento. Los individuos sometidos a gradiente de luz (G luz) se encuentran en estadíos más avanzados en el desarrollo gonadal, los folículos son de mayor tamaño y presentan gran número de bolas de esperma maduro en su interior. Los individuos acondicionados con 8h de luz se están desarrollando pero siguen un ritmo más lento y aunque se puede observar en las fotografías esperma maduro, también se encuentran espermátidas en sus primeras etapas de desarrollo e incluso tejido gonadal formado sólo por células vesiculares y hemocitos.

La mayoría de los individuos acondicionados con gradiente de luz durante 69 días (Figura 84) presentaban ya los gametos completamente maduros e incluso en los ductos, preparados para la evacuación. En los individuos sometidos a un fotoperíodo de 8h de luz se veían algunos gametos muy maduros aunque en su mayor parte presentaban un desarrollo menos avanzado.

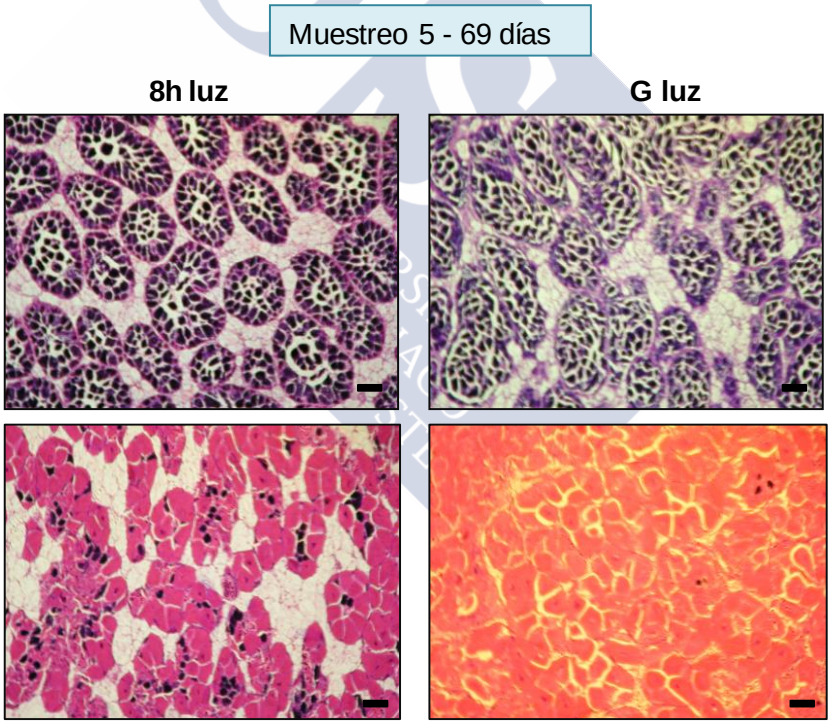


Figura 84. Fotografías de las secciones histológicas más representativas del desarrollo gonadal de los individuos analizados a los 69 días del inicio del acondicionamiento. — Barra: 10 µm.

Después de dos meses de acondicionamiento se observó un bajo número de individuos con desarrollo gonadal femenino, más evidente en el caso de las ostras sometidas a un fotoperíodo de 8h de luz. En la mayoría de individuos está bien desarrollada la gónada masculina pero sólo algunos presentaban desarrollada la gónada femenina (resultado que podrá observarse claramente en el apartado 3 de Resultados). En cualquier caso, el desarrollo

gametogénico sigue las pautas ya explicadas, los individuos acondicionados con 8h/luz llevan un claro retardo en el desarrollo si se compara con los individuos acondicionados durante el mismo período pero acondicionados con gradiente de luz, simulando las horas de luz que recibirían en el medio durante el verano.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3. RESULTADOS DE ESTEREOLOGÍA. RECUENTO DEL PORCENTAJE DE OCUPACIÓN GONADAL A LO LARGO DEL ACONDICIONAMIENTO.

Mediante los métodos estereológicos (ver apartado 3.5 de Materiales y métodos) se analizaron las preparaciones histológicas. Para ello se utilizaron un mínimo de 6 fotografías correspondientes a cada corte histológico. Por medio del programa Sigma ScanPro se identificaron los distintos tipos celulares del tejido gonadal y se anotó su número: espermátidas y espermatocitos, ovogonias y ovocitos, células vesiculares y otros (hemocitos, tejido muscular, restos de hepatopáncreas, etc.).

El número de células reproductoras masculinas (espermátidas y espermatocitos) se denominó porcentaje de gónada masculina (% Gónada Masculina o % GM), mientras que al conjunto de células reproductoras femeninas (ovogonias y ovocitos) se le designó como porcentaje de gónada femenina (% Gónada Femenina o % GF).

Los datos obtenidos, se presentan en las figuras de la 85 a la 121.

Muestreo inicial: 10 de Octubre

Al inicio de este experimento, en otoño, se recogieron 12 individuos y tras su análisis se pudo observar (Figura 85) que la ocupación gonadal era muy baja en todos los individuos. De los doce individuos analizados sólo tres superaban el 5% de ocupación femenina (17,66% - 8,07% y 5,49%) y siete tenían un porcentaje inferior al 1%. El porcentaje de gónada femenina media era: **% GF** = 3,26 (d.e = 5,28).

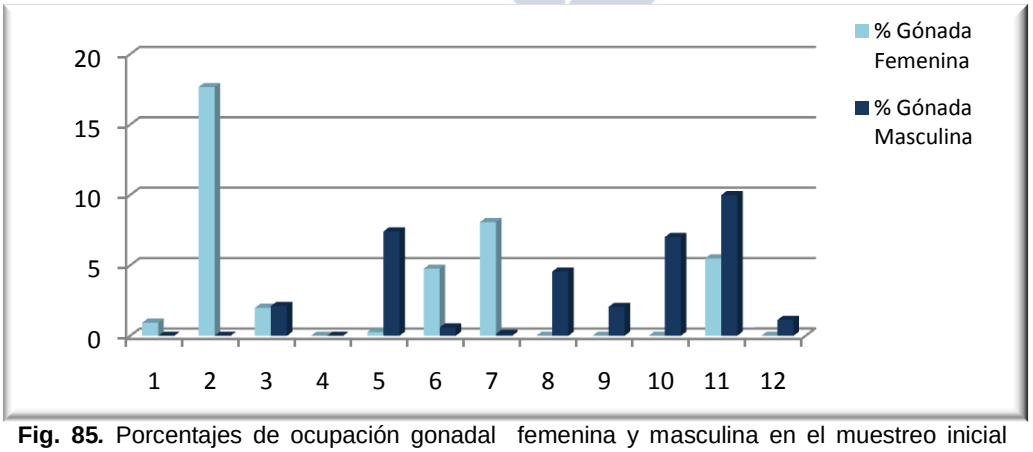


Fig. 85. Porcentajes de ocupación gonadal femenina y masculina en el muestreo inicial (n=12).

En cuanto al porcentaje de gónada masculina, sólo tres de los individuos superaban el 5% de ocupación (7,41% - 7,01% y 9,99%). % **GM** = 2,92 (d.e = 3,48).

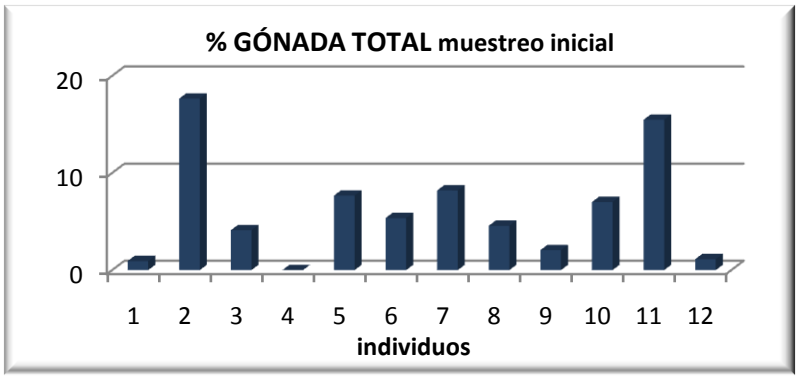


Fig. 86. Porcentajes de ocupación gonadal total en individuos del muestreo inicial (n=12).

Los porcentajes totales de ocupación en los individuos muestreados al inicio del acondicionamiento eran bajos, excepto dos de ellos que se encontraban por encima del 15% (17,66% y 15,48%) y cuatro por encima del 5% (7,67% - 5,36% - 8,20% y 7,01%); uno de los individuos presentaba la gónada completamente vacía, 0% de ocupación. **% GT** = 6,18 (d.e = 5,57). La mayoría de individuos analizados en el muestreo inicial se encontraban prácticamente vacíos y con signos de reabsorción; la ocupación hallada se debe a que se encontraron algunos folículos llenos de ovocitos y esperma maduro que aún no había sido evacuado, incluso en los conductos. Esto indica que los individuos analizados de partida se encontraban en reposo gonadal tras una puesta anterior, por lo que presentaban signos de reabsorción de los productos sexuales que no habían sido expulsados.

Muestreo 1: 29 días

8h/luz

A los 29 días desde el inicio del acondicionamiento se analizó el porcentaje de ocupación gonadal de diez individuos acondicionados con 8h/luz (Figura 87). La gónada femenina apenas estaba presente en tres de los individuos, con porcentajes muy bajos (5,16% - 6,88% y 2,25%). En los siete restantes no había representación alguna de gónada femenina. % **GF** = 1,43 (d.e = 2,55).

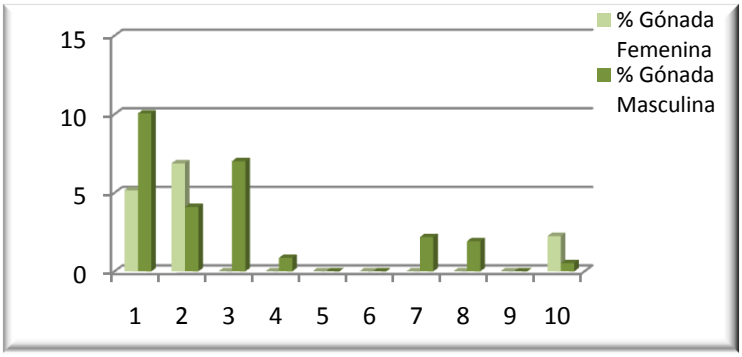


Fig. 87. Porcentajes de ocupación gonadal femenina y masculina de los individuos acondicionados con 8h/luz durante 29 días (n=10).

La presencia de células reproductoras masculinas tampoco era muy elevada, sólo dos de los individuos tenían un porcentaje de ocupación masculina superior al 5% (10,05% y 7,01%) y seis se encontraban por debajo del 2%. El porcentaje medio de ocupación masculino era muy bajo. % **GM** = 2,67 (d.e = 3,42).

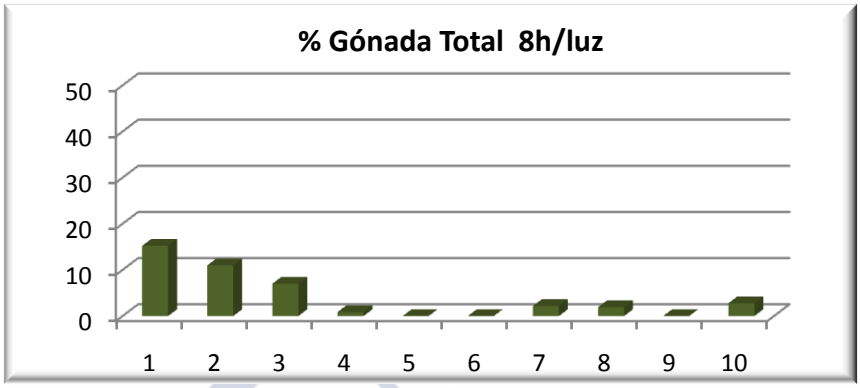


Fig. 88. Porcentajes de ocupación gonadal total de los individuos acondicionados con 8h/luz durante 29 días (n=10).

Se puede observar en la figura 88 que el porcentaje de ocupación total (femenina y masculina) de la gónada era muy bajo. Se encontraron tres individuos con la gónada completamente vacía, formada únicamente por células vesiculares. Otros cuatro individuos tenían una ocupación gonadal inferior al 3% (0,86% - 2,18% - 1,92% y 2,78%) y los otros tres superaban el 5% de ocupación gonadal (15,21% - 10,98% y 7,01%). % **GT** = 4,09 (d.e = 5,27).

G (8-16h/luz)

Entre los individuos sometidos a un acondicionamiento con gradiente de luz durante 29 días, seis de ellos no presentaban desarrollo gonadal femenino y los otros cuatro tenían una ocupación gonadal de: 14,68% - 24,01% - 43,06% y 4,03%. Respecto a la gónada masculina había dos individuos con un porcentaje de ocupación de 0%, cinco de ellos tenían un porcentaje menor de 7% (5,36% - 6,61% -2,31% - 0,93% y 1,59%) y tres de los individuos poseían unos porcentajes más elevados, superiores al 30% (Figura 89). Las ocupaciones gonadales medias eran: % **GF** = 8,58 (d.e = 14,63). % **GM** = 11,93 (d.e = 15,56).

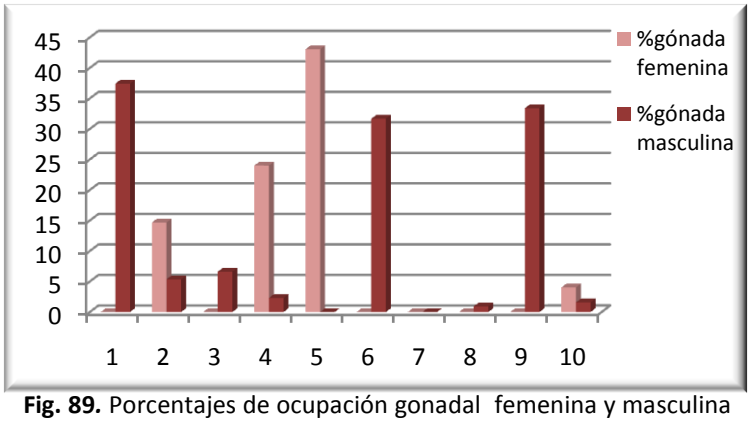


Fig. 89. Porcentajes de ocupación gonadal femenina y masculina de los individuos acondicionados con gradiente de luz durante 29 días (n=10).

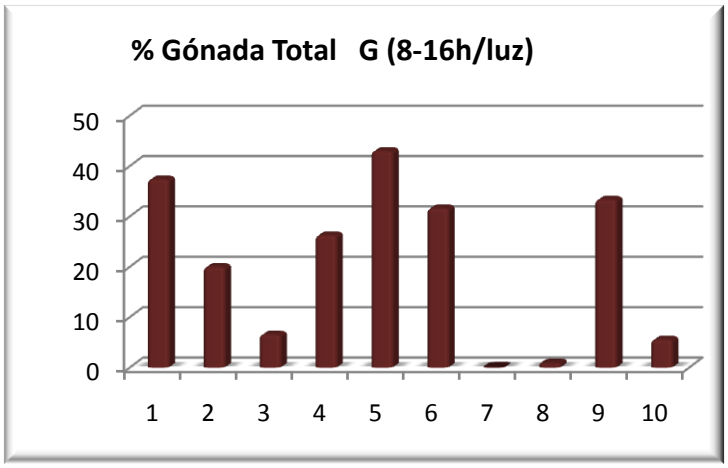


Fig. 90. Porcentajes de ocupación gonadal total de los individuos acondicionados con G luz durante 29 días (n=10).

% GT = 20,51 (d.e = 16,12)

En la figura 90, se muestran los porcentajes de ocupación de los diez individuos que fueron sometidos a gradiente de luz, y se pudo observar que seis de los individuos superaban el 20% de ocupación (37,43% - 20,04% - 26,32% - 43,06% - 31,68% y 33,40%), dos por encima del 5% y los dos restantes apenas presentaban gónada. La ocupación gonadal de estos (20,51%) era muy superior a la de los individuos acondicionados con 8h/luz (4,09%).

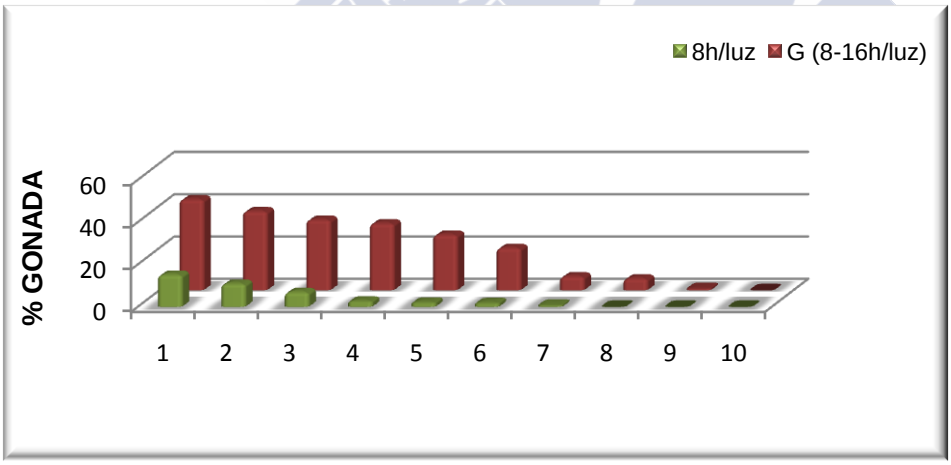


Fig. 91. Porcentaje gonadal de cada uno de los individuos analizados a los 29 días de acondicionamiento y sometidos a dos fotoperíodos diferentes (8h/luz y G luz).

Como se observa en la figura 91, los individuos acondicionados con gradiente de luz tenían unos porcentajes de ocupación gonadal mucho más elevados que los individuos acondicionados con 8h/luz, su desarrollo gonadal estaba mucho más avanzado, señalando un claro efecto acelerador de la temperatura del agua sobre el desarrollo gonadal de *Ostrea edulis*. Así mismo se debe destacar la gran variabilidad individual observada.

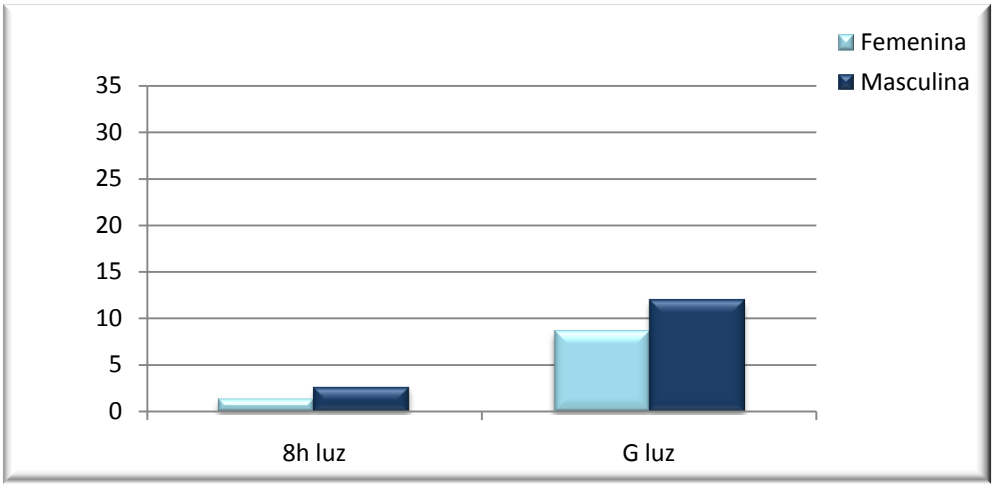


Fig. 92. Porcentajes de ocupación gonadal media femenina y masculina para los dos acondicionamientos después de 29 días.

En la figura 92 se muestran los porcentajes de ocupación gonadal media femenina y masculina obtenidos para cada uno de los acondicionamientos en los individuos analizados en el primer muestreo. La ocupación por gónada masculina era superior a la femenina en ambos acondicionamientos.

Muestreo 2: 34 días

8h/luz

Después de 34 días de acondicionamiento los individuos sometidos a un regimen de 8h/luz al día (regimen de luz en invierno) no presentaban apenas ocupación por gónada femenina. Sólo tres de los individuos presentaban signos de células femeninas y con porcentajes de ocupación muy bajos (2,85% - 6,55% y 2,38%), mientras los otros seis tenían una ocupación femenina del 0%. En cambio, la gónada masculina estaba presente en todos los individuos, superando tres de ellos el 10% de ocupación (11,31% - 17,06% y 15,54%).

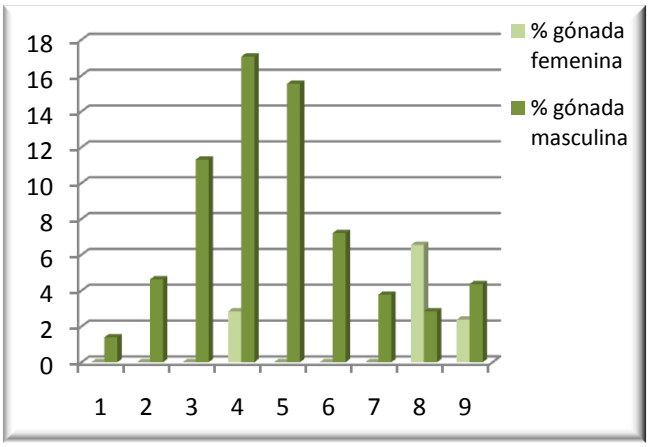


Fig. 93. Porcentajes de ocupación gonadal femenina y masculina de los individuos acondicionados con 8h/luz durante 34 días (n=9).

% **GF** = 1,31 (d.e = 2,27).

% **GM** = 7,57 (d.e = 5,72).

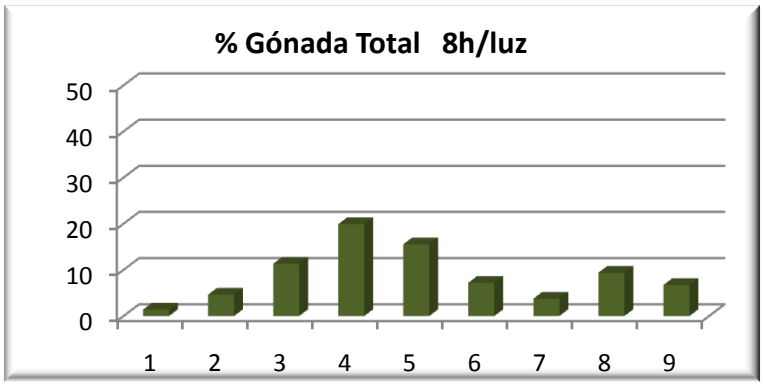


Fig. 94. Porcentajes de ocupación gonadal total de los individuos acondicionados con 8h/luz durante 34 días (n=9).

% GT = 8,88 (d.e = 5,91)

En la figura 94 se puede ver que el porcentaje de ocupación gonadal media de los individuos acondicionados con 8h/luz durante 34 días duplicaba la ocupación obtenida en los individuos analizados en el anterior muestreo (Figura 88). Prácticamente, toda la ocupación era debida a la presencia de gónada masculina, tres de los individuos superaban el 10% de ocupación (11,31% - 19,91% y 15,54%) y otros cuatro estaban próximos al 5% (4,63% - 7,21% - 9,39% y 6,74%).

G (8-16h/luz)

En la figura 95 destaca el alto porcentaje de ocupación de gónada masculina en muchos de los individuos y que estaba presente en todos salvo en dos. Seis de los individuos presentaban porcentajes mayores al 20%: 20,57% - 27,51% - 26,99% - 40,41% - 33,67% y 26,19%. El porcentaje medio de ocupación: % **GM** = 14,59 (d.e = 14,92). El porcentaje de ocupación de gónada femenina era menor: % **GF** = 6,32 (d.e = 7,07). Destacando seis individuos con una ocupación de 0% y cuatro individuos con una ocupación superior al 10%: 17,06% - 12,83% - 13,93% y 18,19%.

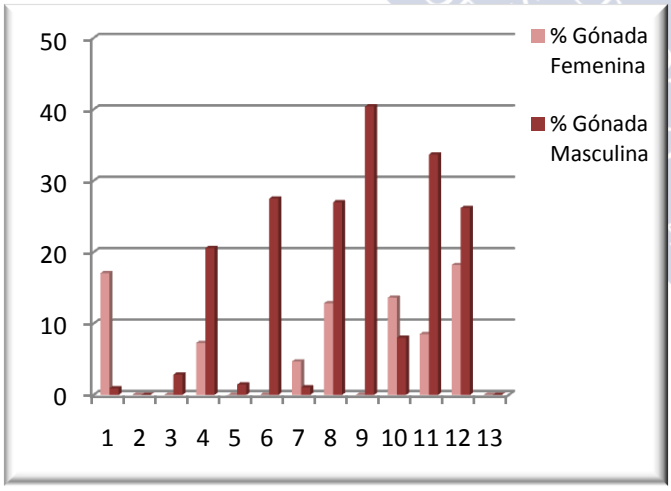


Fig. 95. Porcentajes de ocupación gonadal femenina y masculina de los individuos acondicionados con G luz durante 34 días (n=13).

En cuanto al porcentaje de ocupación total, cuatro de los individuos presentaban una ocupación gonadal que superaba el 30% (39,82% - 40,41% - 42,20% y 44,38%) y otros tres rebasaban el 20% (27,84% - 27,51% y 21,63%) (Figura 96). El porcentaje de ocupación media

seguía siendo más elevado que el de los individuos acondicionados durante el mismo tiempo con 8h/luz. % **GT** = 20,91 (d.e = 17,44).

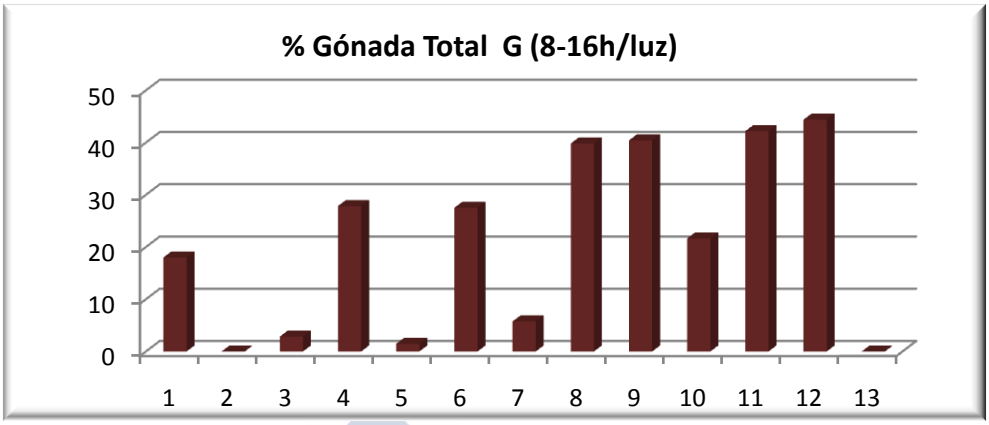


Fig. 96. Porcentajes de ocupación gonadal total de los individuos acondicionados con G luz durante 34 días (n=13).

En la figura 97, los resultados individuales comparativos muestran que los individuos acondicionados con gradiente de luz seguían teniendo, después de 34 días acondicionados, unos porcentajes de ocupación gonadal mucho más elevados que los individuos acondicionados con 8h/luz. La ocupación gonadal es casi tres veces superior en los individuos acondicionados con G luz.

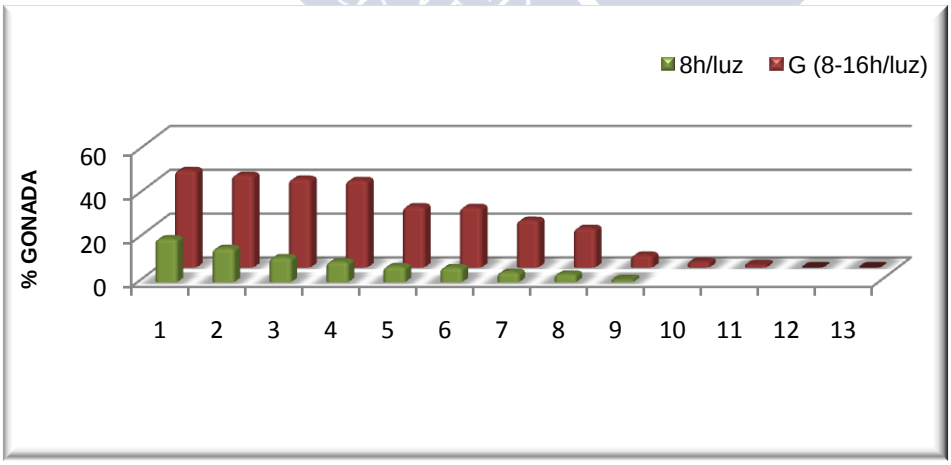


Fig. 97. Porcentaje gonadal de cada uno de los individuos analizados a los 34 días de acondicionamiento y sometidos a dos fotoperíodos diferentes (8h/luz y G luz).

En la figura 98 se muestran los porcentajes medios de ocupación gonadal femenina y masculina de los individuos analizados en el muestreo 2, a los 34 días del inicio del acondicionamiento. La ocupación por gónada masculina es superior a la masculina en ambos acondicionamientos.

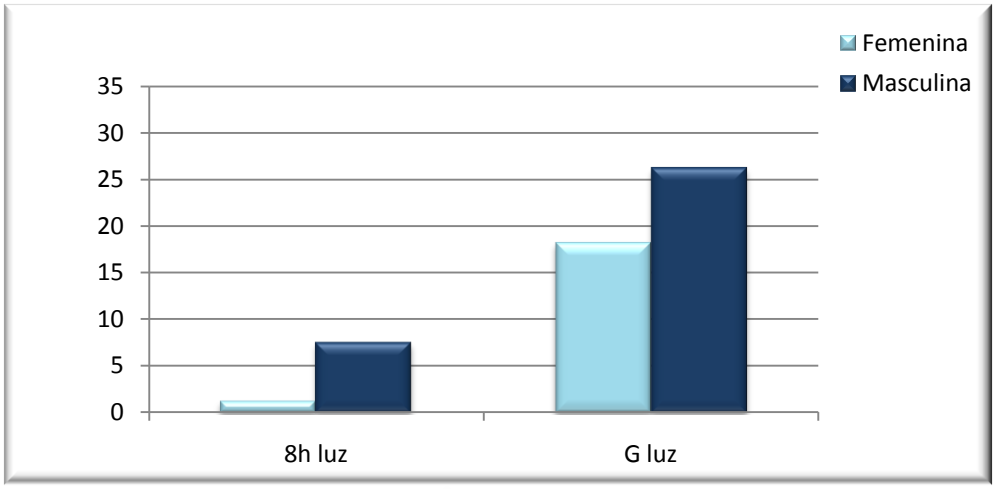


Fig. 98. Porcentajes de ocupación gonadal media femenina y masculina para los dos acondicionamientos después de 34 días.

Muestreo 3: 43 días

8h/luz

En la figura 99 se puede observar que de los individuos analizados casi todos presentaban una mayor parte de gónada masculina que femenina. Sólo tres de ellos superaban el 10% de ocupación femenina (11,58% - 15,15% y 25,07%). % **GF** = 6,19 (d.e = 8,53). En cuanto a los porcentajes de gónada masculina, cinco de ellos sobrepasaban el 10% (16,34% - 23,35% - 17,93% - 32,34% y 30,16%). % **GM** = 13,23 (d.e = 12,53). También se encontró un individuo completamente vacío, uno que sólo tenía representación femenina (hembra pura) y dos que únicamente presentaban gónada masculina (machos puros) y bastante llena, con ocupaciones superiores al 20%.

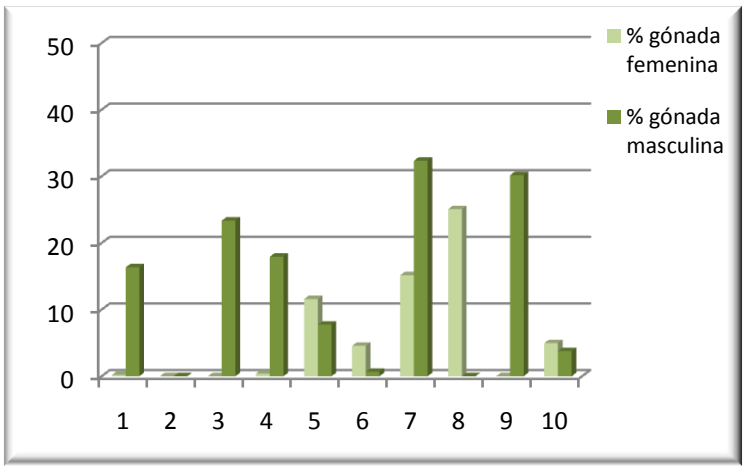


Fig. 99. Porcentajes de ocupación gonadal femenina y masculina de los individuos acondicionados con 8h/luz durante 43 días (n=10).

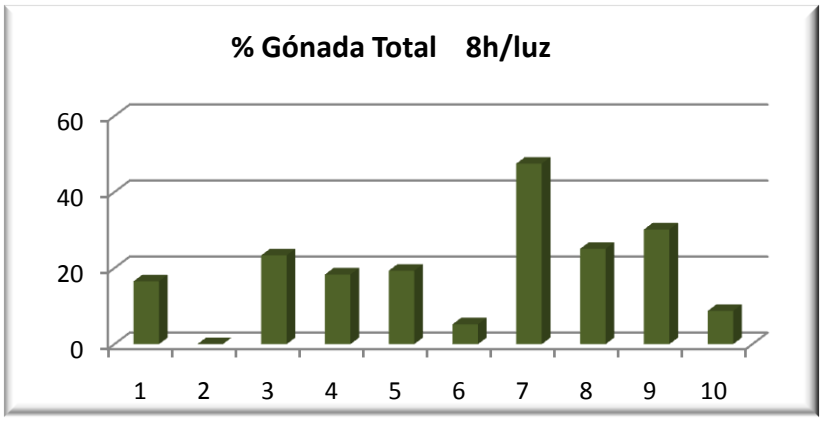


Fig. 100. Porcentajes de ocupación gonadal total de los individuos acondicionados con 8h/luz durante 43 días (n=10).

Cuando se representaron los datos referidos a la ocupación gonadal total (Figura 100), cuatro de los individuos superaban el 20% de ocupación: 23,35% - 47,49% - 25,07% y 30,16%. Otros tres tenían una ocupación superior al 15%: 16,53% - 18,32% y 19,31%. El porcentaje medio de ocupación total aumentaba mucho con respecto a los individuos acondicionados con 8h/luz y analizados en el muestreo anterior, siendo superior al doble. % **GT** = 19,42 (d.e = 13,55)

G (8-16h/luz)

Al analizar los datos de ocupación de los individuos acondicionados con gradiente de luz (Figura 101) se observa, al igual que en los acondicionados con 8h/luz, que la representación masculina era mucho mayor que la femenina, tanto en número de individuos como en porcentaje de ocupación. Cinco de los individuos no presentaban representación femenina alguna y sólo tres superaban el 5% de ocupación por células femeninas (16,14% - 5,89% y 8,27%). El porcentaje medio era de % **GF** = 3,56 (d.e = 5,36).

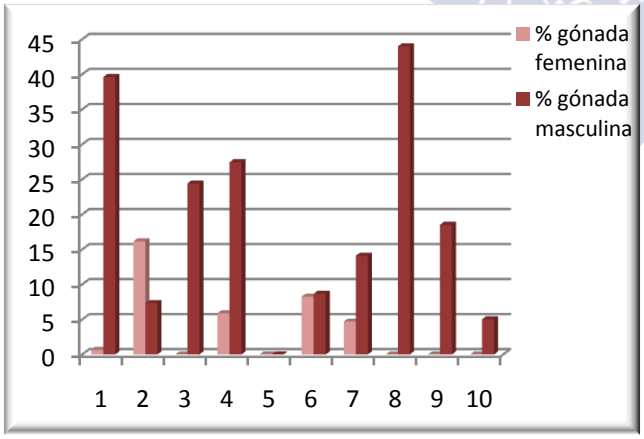


Fig. 101. Porcentajes de ocupación gonadal femenina y masculina de los individuos acondicionados con G luz durante 43 días (n=10).

En cuanto a la gónada masculina, excepto uno de los individuos, todos tenían una ocupación masculina superior al 5%. Dos de ellos presentaban una ocupación próxima al 40%: 39,62% y 43,98% y había otros cuatro individuos con una ocupación superior al 10%: 24,41% -

27,45% - 14,09% y 18,52%. Así que, el porcentaje medio de ocupación por gónada masculina era muy superior al de gónada femenina. % **GM** = 18,91 (d.e = 14,81).

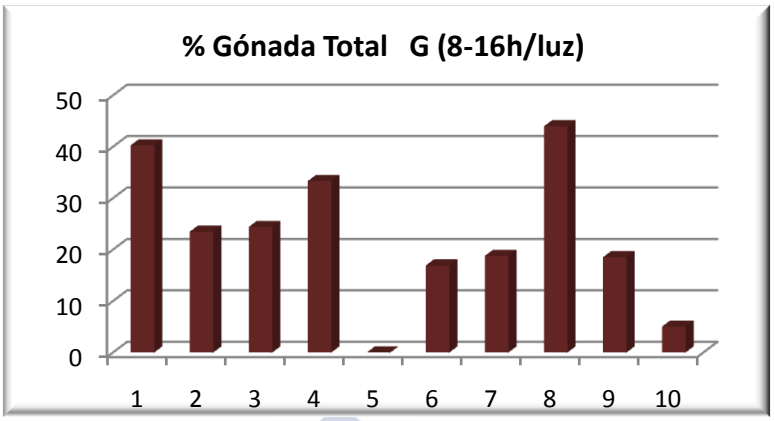


Fig. 102. Porcentajes de ocupación gonadal total de los individuos acondicionados con G luz durante 43 días (n=10).

La mitad de los individuos analizados presentaban un porcentaje medio de ocupación superior al 20%, dos de ellos llegaban a doblar este porcentaje y sólo se encontraron dos individuos que tuvieran una ocupación inferior al 15%, uno de ellos se encontraba completamente vacío, probablemente ya había desovado. El porcentaje medio de ocupación total, % **GT** = 22,47 (d.e = 14,03), era el más elevado hasta el momento en el experimento.

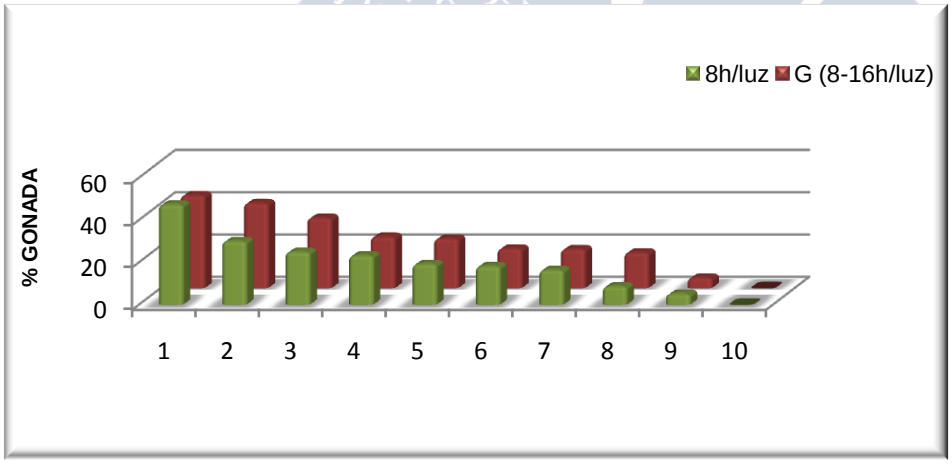


Fig. 103. Porcentaje gonadal de cada uno de los individuos analizados a los 43 días de acondicionamiento y sometidos a dos fotoperíodos diferentes (8h/luz y G luz).

La figura 103 muestra los porcentajes de ocupación gonadal de los individuos analizados y se puede observar que la mayoría de los individuos acondicionados con gradiente de luz continúan teniendo unos porcentajes de ocupación gonadal más elevados que los individuos acondicionados con 8h/luz. Aunque los porcentajes de ocupación gonadal se iban igualando entre los dos acondicionamientos, eran más parejos, quizás esto se debiese a la liberación de esperma ya maduro al medio de los individuos acondicionados con G luz.

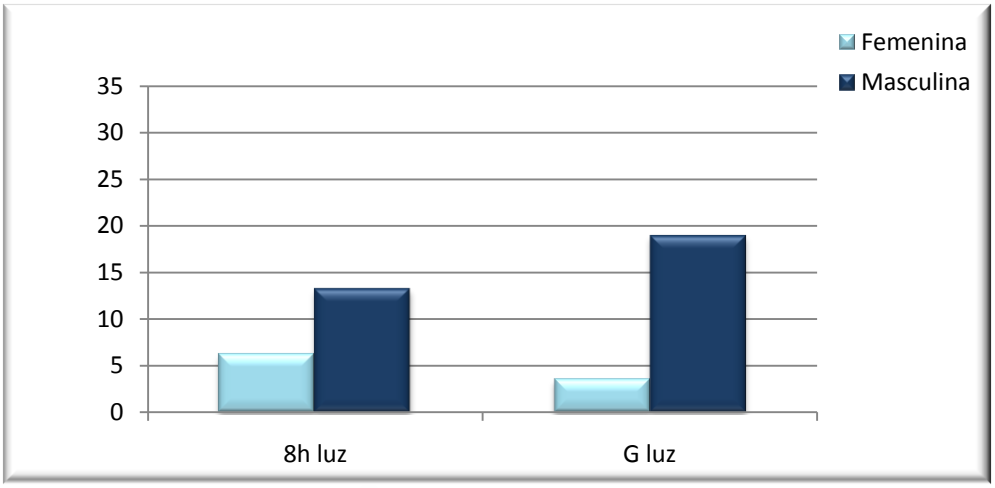


Fig. 104. Porcentajes de ocupación gonadal media femenina y masculina para los dos acondicionamientos después de 43 días.

Los porcentajes de ocupación media de los individuos analizados muestran (Figura 104) que los porcentajes de ocupación por gónada masculina eran superiores a los femeninos en los dos acondicionamientos, siendo el doble para los individuos acondicionados con 8h/luz y casi el cuádruple en los individuos acondicionados con el gradiente de luz.

Muestreo 4: 49 días

8h/luz

En la figura 105 se muestra que cuatro de los individuos no tenían representación alguna de gónada femenina y otros dos apenas (1,98% y 0,73%), mientras que se encontraron tres individuos con un porcentaje de ocupación muchos más elevado: 19,18% - 32,61% y 24,94%. El porcentaje medio de ocupación femenina era % **GF** = 8,61 (d.e = 12,29). La gónada masculina estaba presente en todos los individuos, salvo en uno, y todos los porcentajes de ocupación eran superiores al 5%, destacando dos individuos con 52,12% y 39,29% de ocupación. % **GM** = 17,49 (d.e = 26,10).

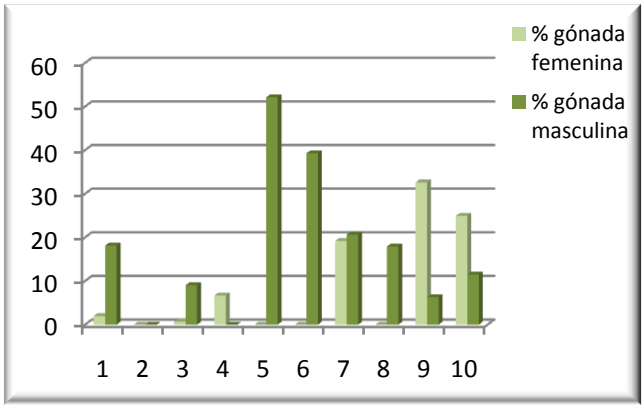


Fig. 105. Porcentajes de ocupación gonadal femenina y masculina de los individuos acondicionados con 8h/luz durante 49 días (n=10).

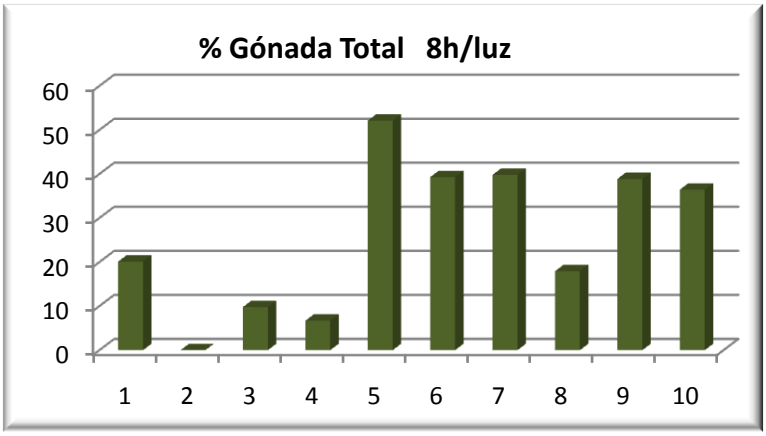


Fig. 106. Porcentajes de ocupación gonadal total de los individuos acondicionados con 8h/luz durante 49 días (n=10).

Cuando se comprobaron los resultados del porcentaje de ocupación gonadal total (Figura 106) se observó que cuatro de los individuos se encontraban próximos al 40%: 39,29% - 39,81% - 38,89% y 36,44%; uno presentaba una ocupación aún más elevada (52,12%), otros dos estaban próximos al 20% y había dos con menor ocupación (9,79% y 6,68%) y uno completamente vacío. % **GT** = 26,10 (d.e = 17,44). Este porcentaje representa la mayor ocupación encontrada en los individuos acondicionados con 8h/luz analizados hasta ese momento en este experimento.

G (8-16h/luz)

De los 9 individuos analizados (Figura 107), sólo cuatro de los individuos presentaban gónada femenina, y de ellos dos tenían una ocupación próxima al 9% y dos destacaban claramente con 37,90% y 25,53% de ocupación por gónada femenina. % **GF** = 9,08 (d.e = 13,75). En cuanto a los porcentajes de gónada masculina, eran mucho más elevados, salvo dos individuos que apenas tenían representación masculina. Dos de los individuos presentaban una ocupación superior al 20%: 24,47% y 20,90%; cuatro estaban próximos al 40%: 40,01% - 43,25% - 38,29% y 37,76% y destacaba la ocupación de 51,85% de uno de los individuos. % **GM** = 28,58 (d.e = 18,50).

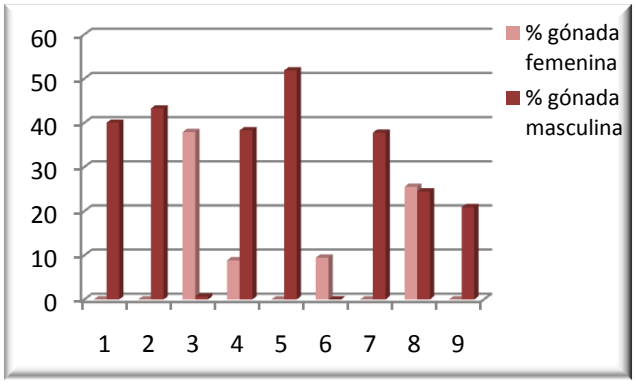


Fig. 107. Porcentajes de ocupación gonadal femenina y masculina de los individuos acondicionados con G luz durante 49 días (n=9).

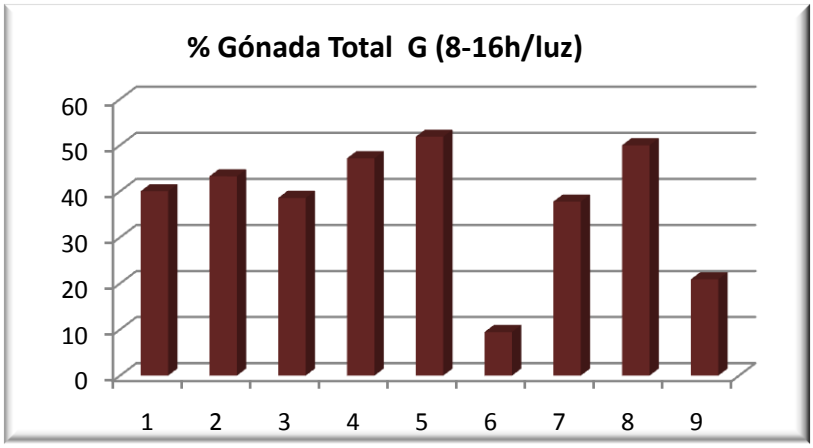


Fig. 108. Porcentajes de ocupación gonadal total de los individuos acondicionados con G luz durante 49 días (n=9).

Los porcentajes de ocupación totales de los nueve individuos analizados (Figura 108) se debían, en gran parte, a la parte sexual masculina, salvo en dos casos. Los porcentajes eran muy elevados en casi todos los individuos, cinco superaban el 40% de ocupación: 40,01% - 43,25% - 47,15% - 51,85% y 50%. El % **GT** = 37,66 (d.e = 13,95), superando en casi un 12% al porcentaje de ocupación total de los individuos analizados en el anterior muestreo.

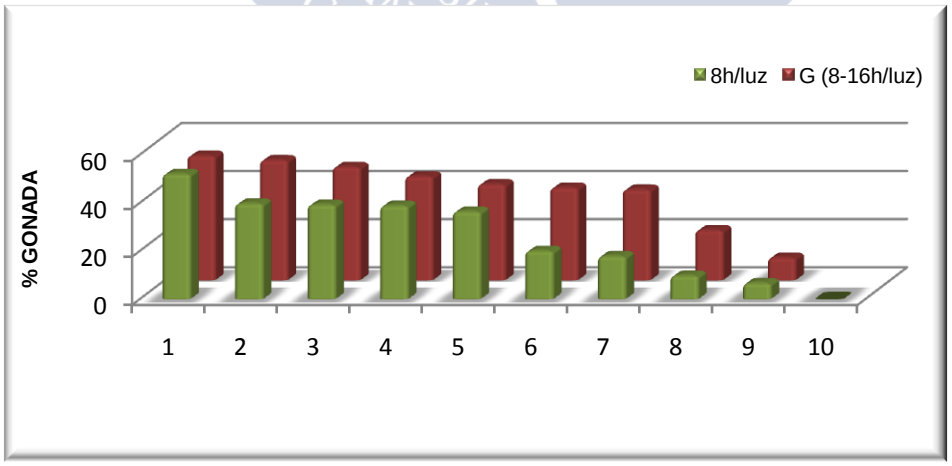


Fig. 109. Porcentaje gonadal de cada uno de los individuos analizados a los 49 días de acondicionamiento y sometidos a dos fotoperíodos diferentes (8h/luz y G luz).

Los porcentajes de ocupación de los dos acondicionamientos se encuentran más parejos en el muestreo realizado a los 49 días del inicio del acondicionamiento pero sin embargo se puede observar (Figura 109) que siguen siendo un poco más elevados y homogéneos los porcentajes de los individuos acondicionados con un gradiente de luz frente a los acondicionados con 8h/luz.

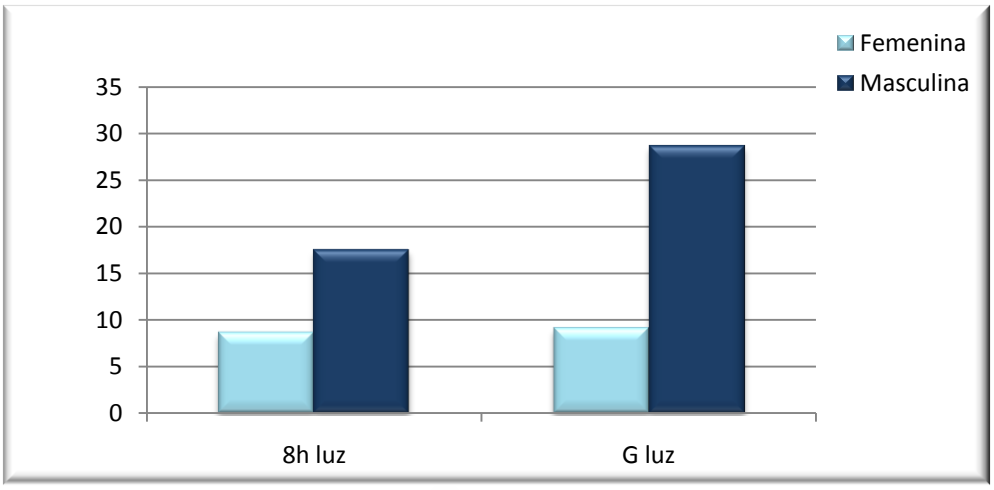


Fig. 110. Porcentajes de ocupación gonadal media femenina y masculina para los dos acondicionamientos después de 49 días.

Al igual que en los anteriores muestreos, el porcentaje medio de ocupación gonadal masculino de los individuos analizados en los dos acondicionamientos es superior que el femenino, haciéndose más evidente en los individuos sometidos a un gradiente de luz.

Muestreo 5: 69 días

8h/luz

Con la condición de fotoperíodo de 8h/luz, transcurridos 69 días desde el comienzo del acondicionamiento (Figura 111) se pudo ver que sólo dos de los individuos analizados presentaban un porcentaje de ocupación por gónada femenina destacable, con 17,53% y 8,47% y cinco de ellos no tenían representación femenina. % **GF** = 2,80 (d.e = 5,80). En cambio, todos los individuos presentaban un alto porcentaje de gónada masculina, siendo el valor menor de 4,63% y encontrándose cuatro individuos que superaban el 30 % de ocupación: 49,27% - 39,09% - 34,99% y 33,60%. % **GM** = 26,53 (d.e = 10,87).

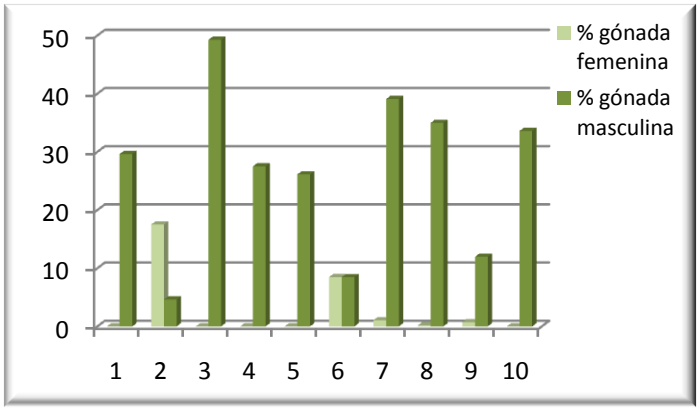


Fig. 111. Porcentajes de ocupación gonadal femenina y masculina de los individuos acondicionados con 8h/luz durante 69 días (n=10).

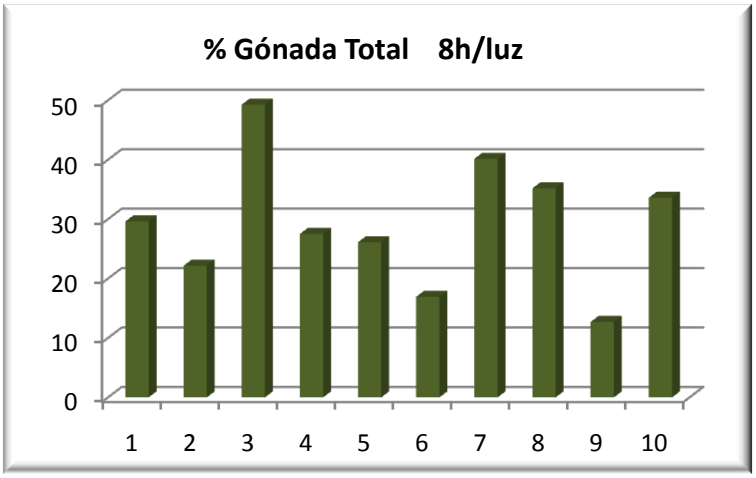


Fig. 112. Porcentajes de ocupación gonadal total de los individuos acondicionados con 8h/luz durante 69 días (n=10).

En la figura 112, se muestran los porcentajes medios de ocupación total de los diez individuos analizados, y se puede observar que sólo dos de los individuos presentaban unos porcentajes de ocupación menores que el 20% (16,93% y 12,70%). Mientras que cuatro individuos mostraban mayor ocupación gonadal, superior al 30%: 49,27% - 40,15% - 35,19% y 33,60%. También se puede constatar que el porcentaje medio de los individuos acondicionados con 8h/luz seguía aumentando en cada muestreo. Uno de los individuos presentaba larvas en la cavidad paleal en el momento de realizar el muestreo.

Así, el porcentaje medio de ocupación gonadal total era: % **GT** = 29,32 (d.e = 10,87)

G (8-16h/luz)

Entre los individuos sometidos a un acondicionamiento con gradiente de luz durante 69 días (Figura 113), cuatro de ellos no tenían presencia de gónada femenina, otros dos presentaban una ocupación próxima al 10% y sólo dos tenían una alta ocupación (36,37% y 30,16%). En cuanto a la representación masculina, uno de los individuos no presentaba rastro de células masculinas y los nueve restantes poseían unos porcentajes de ocupación altos, entre 12,90% y 48,61%. Los porcentajes medios de ocupación femenina y masculina eran los siguientes: % **GF** = 8,93 (d.e = 13,43) y % **GM** = 28,09 (d.e = 14,90).

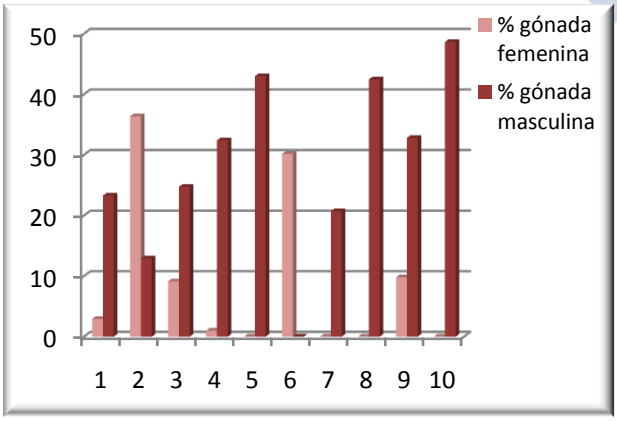


Fig. 113. Porcentajes de ocupación gonadal femenina y masculina de los individuos acondicionados con G luz durante 69 días (n=10).

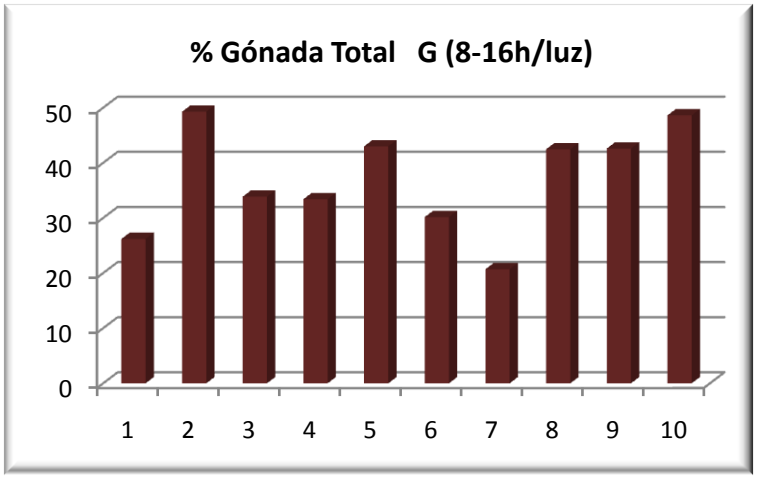


Fig. 114. Porcentajes de ocupación gonadal total de los individuos acondicionados con G luz durante 69 días (n=10).

Todos los individuos poseían un porcentaje de ocupación gonadal superior al 20%, llegando hasta el 49,27 de ocupación. De este modo el porcentaje medio de ocupación era: % **GT** = 37,02 (d.e = 9,63). Este porcentaje estaba unas décimas por debajo del porcentaje del muestreo anterior pero se puede observar que la desviación era mucho menor, los porcentajes eran claramente más homogéneos (Figura 114). Esto se explicaría con desoves parciales o liberación de esperma ya maduro al medio.

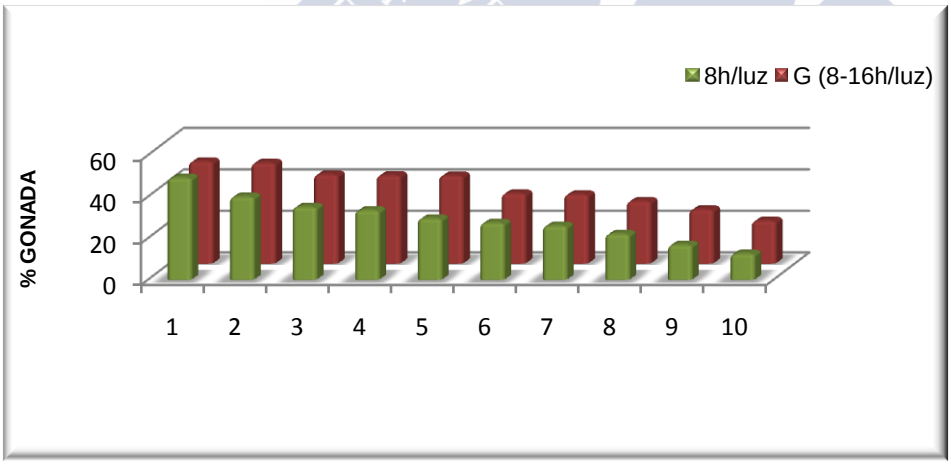


Fig. 115. Porcentaje gonadal de cada uno de los individuos analizados a los 69 días de acondicionamiento y sometidos a dos fotoperíodos diferentes (8h/luz y G luz).

La ocupación gonadal de todos los individuos analizados se había incrementado con respecto a muestreos anteriores aunque seguía siendo algo superior en los individuos acondicionados con gradiente de luz (Figura 115).

En la figura 116 se muestran los porcentajes medios de ocupación gonadal y se puede ver que la ocupación masculina era muy superior a la femenina en los dos acondicionamientos, como sucedía a lo largo de todo el experimento.

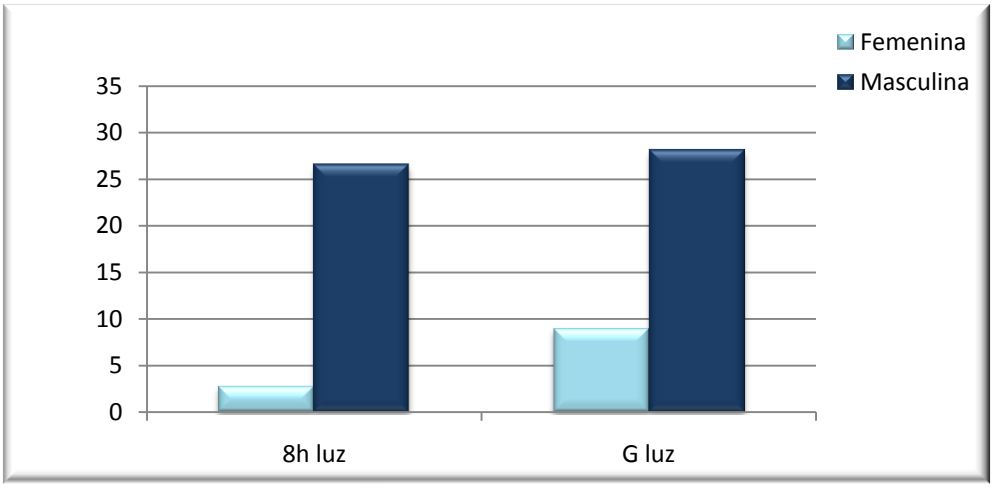


Fig. 116. Porcentajes de ocupación gonadal media femenina y masculina para los dos acondicionamientos después de 69 días.

En las figuras 117-121 se muestra el desarrollo gonadal a lo largo de este experimento, muestreo tras muestreo. Los individuos acondicionados con 8h/luz presentan una evolución positiva, los porcentajes de ocupación gonadal iban aumentando con cada muestreo realizado (Figura 117). El muestreo inicial muestra mayor ocupación que el muestreo 1 debido principalmente a la presencia de productos sexuales maduros que aún no habían sido expulsados o reabsorbidos.

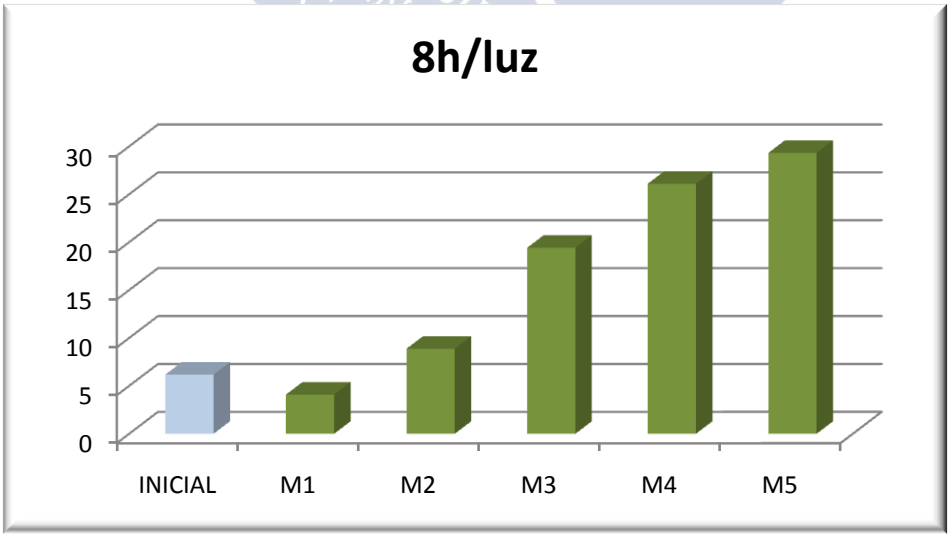


Fig. 117. Porcentaje gonadal medio de los individuos de cada uno de los muestreos acondicionados con 8h/luz (M=muestreo).

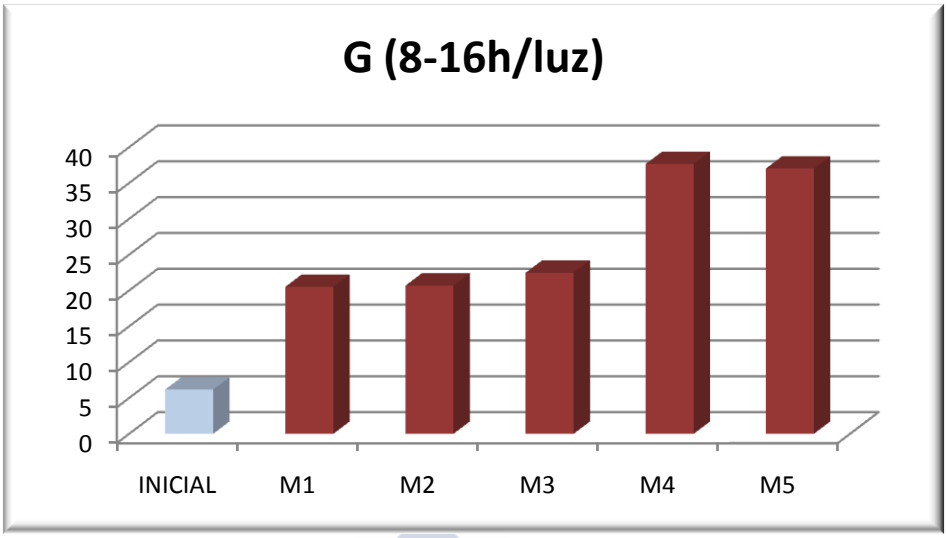


Fig. 118. Porcentaje gonadal medio de los individuos de cada uno de los muestreos acondicionados con gradiente de luz. (M=muestreo).

En la figura 118 se muestra el desarrollo de los individuos acondicionados con gradiente de luz y como después de 29 días de acondicionamiento (M1) el porcentaje de ocupación gonadal se llega a triplicar y sigue aumentando en los últimos muestreos, llegando a encontrar desoves parciales, entendiéndose como la expulsión de esperma maduro al medio, entre el muestreo 4 y el 5.

En la siguiente gráfica (Figura 119) se representan comparativamente los porcentajes de ocupación medios de cada uno de los muestreos para los dos acondicionamientos. En todos los muestreos los individuos acondicionados con gradiente de luz tenían un porcentaje de ocupación superior a los individuos acondicionados con 8h/luz. Se encontraron desoves parciales en los individuos acondicionados con G luz entre los muestreos 4 y 5.

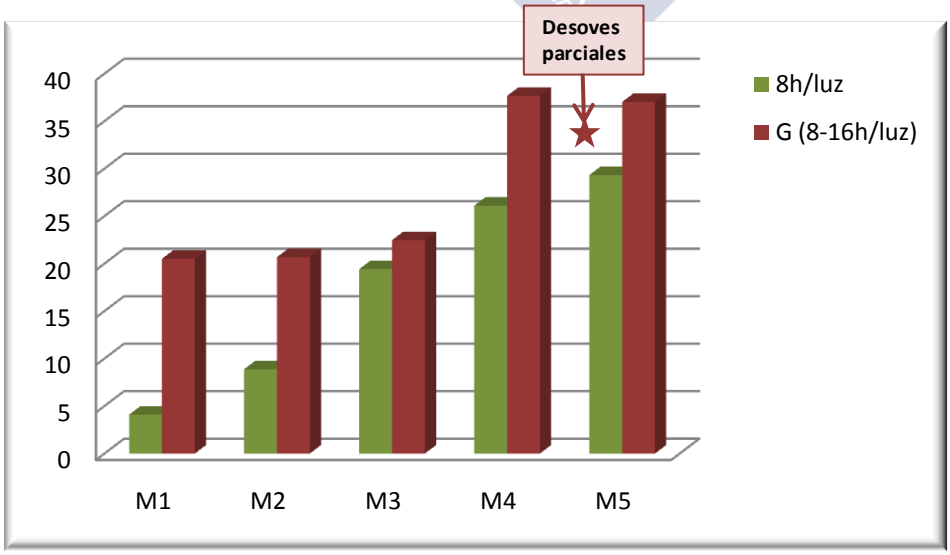


Fig. 119. Porcentaje gonadal medio de los individuos acondicionados con los dos fotoperíodos diferentes en cada uno de los muestreos realizados (M=muestreo).

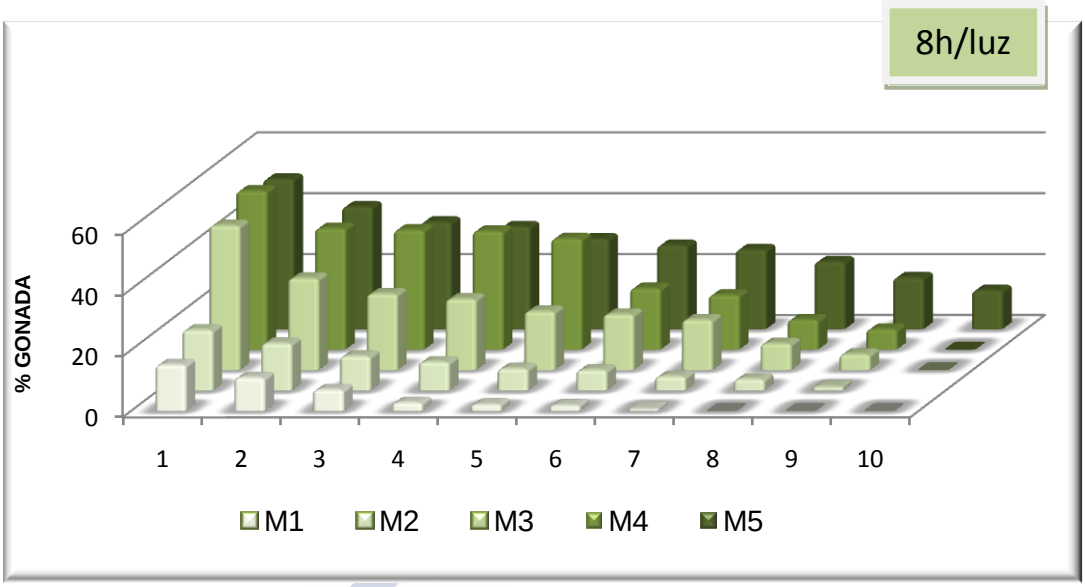


Fig. 120. Porcentaje gonadal de cada uno de los individuos analizados a lo largo del experimento de acondicionamiento y sometidos a un fotoperíodo de 8h/luz. (M=muestreo).

Las figuras 120 y 121 representan la evolución del desarrollo gametogénico individual de las ostras sometidas a los dos regímenes de luz (8h y gradiente de luz) a través de los cinco muestreos anteriormente descritos.

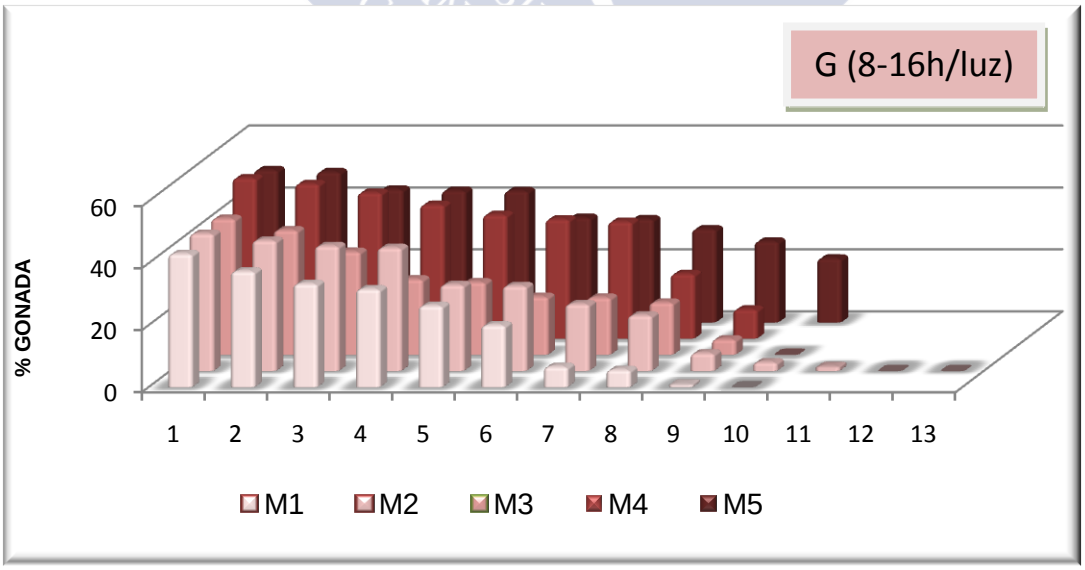


Fig. 121. Porcentaje gonadal de cada uno de los individuos analizados a lo largo del experimento de acondicionamiento y sometidos a un fotoperíodo de gradiente (8-16h/luz). (M=muestreo).

4. DESOVES:

Después de 74 días de acondicionamiento, se encontraron desoves masivos procedentes de las ostras acondicionadas con un fotoperíodo de gradiente de luz (8-16h), aunque previamente se habían encontrado algunos desoves parciales en estos mismos tanques, aproximadamente a los dos meses de iniciarse el acondicionamiento. (Figura 122)

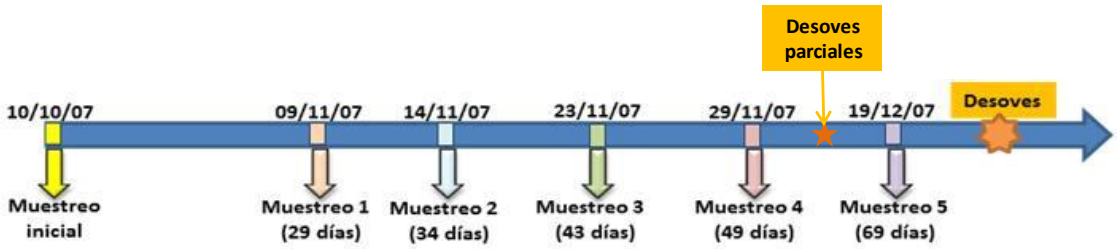


Fig. 122. Esquema con las fechas de los muestreos realizados y los desoves obtenidos.

En la tabla 16 y en la figura 118 se muestran los desoves obtenidos bajo los diferentes regímenes de luz y el número de larvas liberadas en cada caso. Debemos destacar que los progenitores acondicionados con el gradiente de luz (8-16h) producían desoves con anterioridad en el tiempo (un mes antes) a los individuos acondicionados con un fotoperíodo de 8h/luz. Además, la producción larvaria total era significativamente más elevada en las ostras sometidas al gradiente de luz (6 millones y medio de larvas frente a sólo 2 millones). Se obtuvieron cuatro millones y medio más de larvas con los individuos acondicionados con G luz y en menos tiempo.

Tabla 18. Fecha de desoves y número de larvas liberadas.

8h/luz		G (8-16h/luz)	
		Entre 29/11 y 19/12	desoves parciales número de larvas no registrado
		24/12/07	1.000.000 larvas
		12/01/08	2.500.000
24/01/08	2.000.000 larvas	24/01/08	3.000.000
TOTAL: 2.000.000 larvas		TOTAL: 6.500.000 larvas	

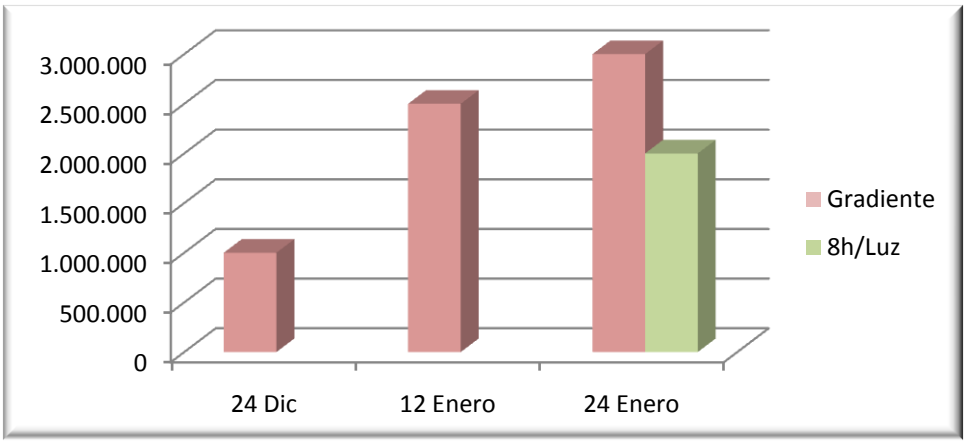


Fig. 123. Fechas de los desoves y número de larvas liberadas en los distintos tipos de acondicionamientos.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5. RESULTADOS ESTADÍSTICOS:

Como los datos estereológicos no cumplían los supuestos teóricos del Anova (ver Anexo 8.4. Análisis estadístico) se realizó un test no paramétrico, el test de Mann-Whitney, que mostraba la existencia de diferencias significativas entre los dos fotoperíodos ensayados.

Tabla 19.- Resultados del Test de Mann-Whitney realizado en el Experimento 2, utilizando la variable dependiente Ocup y los factores muestreo y fotoperíodo.

Mann-Whitney Test

	Ocupacion
Mann-Whitney U	845.000
Wilcoxon W	2070.000
Z	-2.916
Asymp. Sig. (2-tailed)	.004

UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

EXPERIMENTO 3; EFECTO DEL FOTOPERÍODO EN OTOÑO.

1. MEDIDAS Y PESOS (BIOMETRÍA):

Las condiciones experimentales a las que fueron sometidos los progenitores en este experimento eran las siguientes: la temperatura del agua seguía un gradiente de 14 a 18ºC, es decir, gradiente de temperatura y se probaron tres condiciones de fotoperíodo distintas, **8h/luz** y dos regímenes con gradiente de luz **Gradiente 1 (G1: de 8 a 12h/luz)** y **Gradiente 2 (G2: de 8 a 16h/luz)**. Realizando así, tres tipos de acondicionamiento diferentes (Ver más detallado en el apartado 3.1 Experimento 3 de Materiales y Métodos).

Muestreo inicial: 19 de Octubre

Para determinar el estado gonadal de los progenitores en otoño se realizó un muestreo inicial. En este muestreo inicial se recogieron 12 individuos del total de 282 individuos procedentes de Punta Cabalo (Boa) en la Ría de Muros e Noia.

Se midió la longitud y el ancho de cada ejemplar utilizando un calibre, determinándose que la longitud media era de 7,48 cm y la anchura media era de 7,96 cm.

A continuación, se determinó el peso húmedo, en una balanza Mettler® PM300. En la tabla se presentan los pesos frescos de la concha y la vianda, junto con el peso total y el peso medio por individuo.

Tabla 20. Peso húmedo de la vianda, de la concha, peso total y peso medio de los progenitores en el muestreo inicial. **Phv** (peso húmedo de la vianda), **Pmv** (peso medio de la vianda), **Phc** (peso húmedo de la concha), **Pt** (peso total de los individuos seleccionados para este muestreo) y **Pmi** (peso medio de cada individuo).

	nº ind.	**Phv** (Peso húmedo vianda)	**Pmv** (Peso medio vianda)	**Phc** (Peso húmedo concha)	**Pt** (Peso total)	**Pmi** (Peso medio individuo)
Muestreo inicial	12	181,11 g	15,09 g	797,47 g	1112,80 g	92,73 g

Muestreo 1: 35 días

El primer muestreo fue realizado a los 35 días después de comenzar el acondicionamiento de los progenitores. Los distintos parámetros biométricos se muestran en la Tabla 18.

Tabla 21. Peso húmedo de la vianda, de la concha, peso total y peso medio de los progenitores en el muestreo 1, 35 días después del inicio del acondicionamiento.

	nº ind.	Phv	Pmv	Phc	Pt	Pmi
8h/luz	6	65,16 g	10,86 g	434,26 g	561,22 g	93,54 g
G1 (8-12h/luz)	6	53,38 g	8,90 g	279,44 g	381,56 g	63,59 g
G2 (8-16h/luz)	6	84,74 g	14,12 g	403,04 g	567,42 g	94,57 g

El peso medio de los individuos acondicionados con el gradiente 1 (63,59 g) era mucho menor que el peso medio obtenido inicialmente (92,73 g). En los otros dos acondicionamientos el Pmi permanece prácticamente igual, apenas se incrementaba unos gramos (0,81 g los acondicionados con 8h/luz y 1,84 g los individuos acondicionados con el gradiente 2).

Muestreo 2: 63 días

El segundo muestreo se realizó a los 63 días de comenzar el acondicionamiento, recogiéndose 6 individuos de cada uno de los tipos de acondicionamiento y determinándose los parámetros biométricos citados anteriormente.

Tabla 22. Peso húmedo de la vianda, de la concha, peso total y peso medio de los progenitores en el muestreo 1, 63 días después del inicio del acondicionamiento.

	nº ind.	Phv	Pmv	Phc	Pt	Pmi
8h/luz	6	84,60 g	14,10 g	489,84 g	676,00 g	112,67 g
G1 (8-12h/luz)	6	81,64 g	13,61 g	513,54 g	788,08 g	131,35 g
G2 (8-16h/luz)	6	61,70 g	10,28 g	376,20 g	519,76 g	86,63 g

Se puede observar que el peso medio de los individuos era mayor que en los dos muestreos anteriores para los individuos acondicionados con 8h/luz y gradiente 1 pero los individuos acondicionados con el gradiente 2 tenían un peso medio más bajo, incluso, que el peso medio de los individuos analizados en el muestreo inicial. Se encontró una diferencia de más de 20 g.

Cuando se llevó a cabo la apertura de las valvas fue posible observar la presencia de larvas en la cavidad paleal de algunos individuos recogidos para realizar este muestreo.

2. RESULTADOS DE HISTOLOGÍA.

Las preparaciones y el análisis histológico se realizaron de acuerdo con los protocolos descritos en el apartado 3.4 de Materiales y Métodos. A continuación, en las figuras 124-126 se muestran algunas imágenes representativas del desarrollo gametogénico de las ostras acondicionadas con las tres condiciones de fotoperíodo.

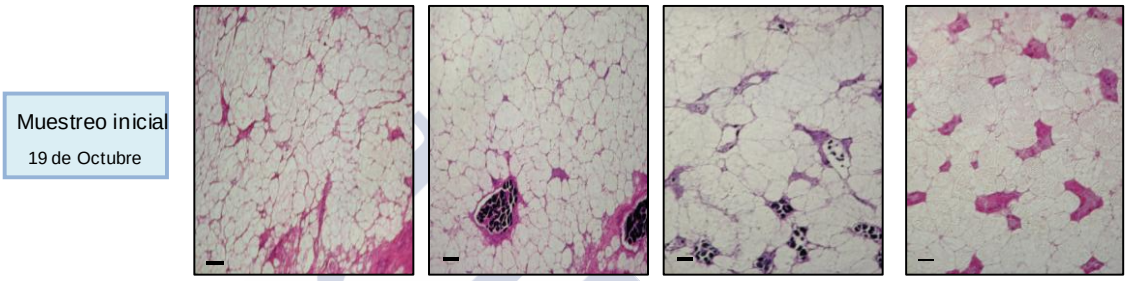


Figura 124. Fotografías de las secciones histológicas más representativas del desarrollo gonadal de los individuos analizados en el muestreo inicial. Barra: 10 µm

Al inicio del acondicionamiento, a mediados de octubre, se podía observar que la mayoría de individuos se encontraban reorganizando su tejido gonadal después de la última puesta, de ahí la presencia de gran cantidad de hemocitos. También se podían observar folículos que aún no habían evacuado sus gametos aunque estaban maduros y en algunos individuos se encontraron folículos de pequeño tamaño, que presentaban en sus paredes ovogonias o espermátidas en sus primeras fases.

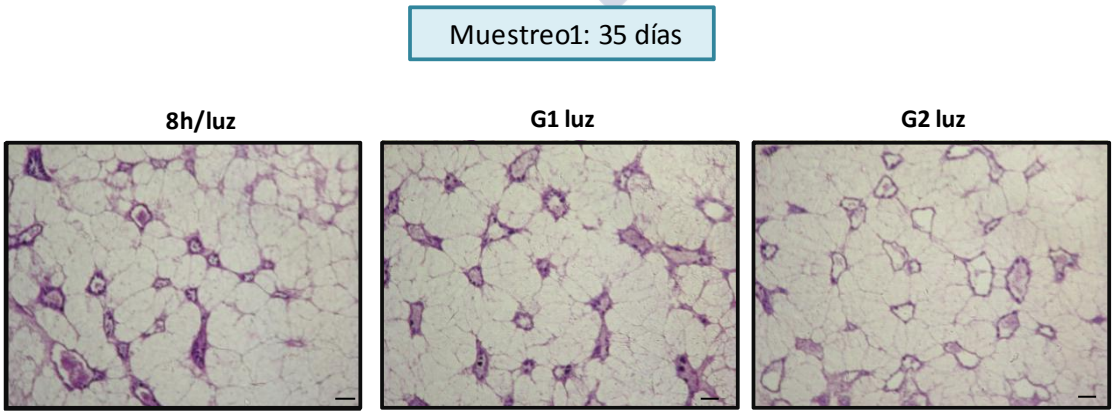


Figura 125. Fotografías de las secciones histológicas más representativas del desarrollo gonadal de los individuos analizados a los 35 días del inicio del acondicionamiento. Barra: 10 µm.

A los 35 días del inicio del acondicionamiento se podía observar que el tejido gonadal de los individuos acondicionados con 8h/luz presentaba, en su mayoría, restos de desoves anteriores, aún no se había reorganizado el tejido gonadal después de su anterior desarrollo. Por lo contrario, los individuos acondicionados con los gradiente de luz ya presentaban la gónada organizada y ya se podían observar pequeños folículos con las ovogonias y espermátidas en sus paredes.



Figura 126. Fotografías de las secciones histológicas más representativas del desarrollo gonadal de los individuos analizados transcurridos 63 días del inicio del acondicionamiento. ⎯ Barra: 10 µm.

Los individuos analizados a los 63 días del inicio del acondicionamiento mostraban que mientras los individuos acondicionados con 8h/luz comenzaban a tener folículos con células en sus paredes y en el interior, los individuos acondicionados con gradiente de luz ya se encontraban en un estado bastante maduro, teniendo los individuos acondicionados con el gradiente (8-16h), G2, un porcentaje de ocupación mayor y en estadíos más avanzados.

Cuando se observaron todas preparaciones correspondientes a este experimento en el microscopio daba la impresión de que los individuos acondicionados con G1 y G2 habían realizado desoves parciales entre el muestreo inicial y el M1 y los que se acondicionaron con 8h/luz lo hicieron entre el M1 y el M2.

3. RESULTADOS DE ESTEREOLOGÍA. RECUENTO DEL PORCENTAJE DE OCUPACIÓN GONADAL A LO LARGO DEL ACONDICIONAMIENTO.

Mediante los métodos estereológicos (ver apartado 3.5 de Materiales y Métodos) se analizaron las preparaciones histológicas. Para ello se utilizaron un mínimo de 6 fotografías correspondientes a cada corte histológico. Por medio del programa Sigma ScanPro se identificaron los distintos tipos celulares del tejido gonadal y se anotó su número: espermátidas y espermatocitos, ovogonias y ovocitos, células vesiculares y otros (hemocitos, tejido muscular, restos de hepatopáncreas, etc.).

El número de células reproductoras masculinas (espermátidas y espermatocitos) se denominó porcentaje de gónada masculina (% Gónada Masculina o % GM), mientras que al conjunto de células reproductoras femeninas (ovogonias y ovocitos) se le designó como porcentaje de gónada femenina (% Gónada Femenina o % GF).

Los datos obtenidos, se presentan en las figuras de la 127 a la 148.

Muestreo inicial: 19 de Octubre

Al iniciar este experimento se recogieron 12 individuos y tras su análisis se observó (Figura 127) que de los individuos analizados sólo dos de los individuos superaban el 5% de ocupación femenina (6,68% y 11,44%) y siete tenían un porcentaje inferior al 2%. El porcentaje de gónada femenina media era: **% GF** = 2,57 (d.e = 3,50). En cuanto al porcentaje de gónada masculina, sólo dos de los individuos superaban el 5% de ocupación (5,09% y 7,74%). Así, el **% GM** = 2,23 (d.e = 2,53).

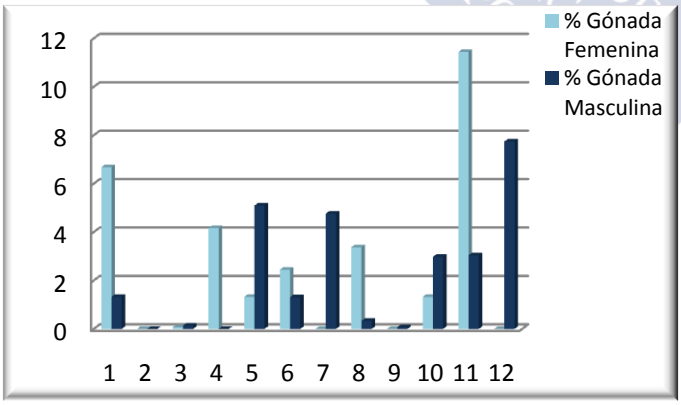


Fig. 127. Porcentajes de ocupación gonadal femenina y masculina en el muestreo inicial (n=12).

La mayoría de los individuos se encontraban prácticamente vacíos con un gran cúmulo de hemocitos que se encargan de la reabsorción de los restos celulares no evacuados y en algunos se podían observar algunos folículos con células maduras pero que aún no habían

desovado. Había un par de individuos que presentaban ovogonias, en las primeras etapas de desarrollo, pegadas a la pared folicular.

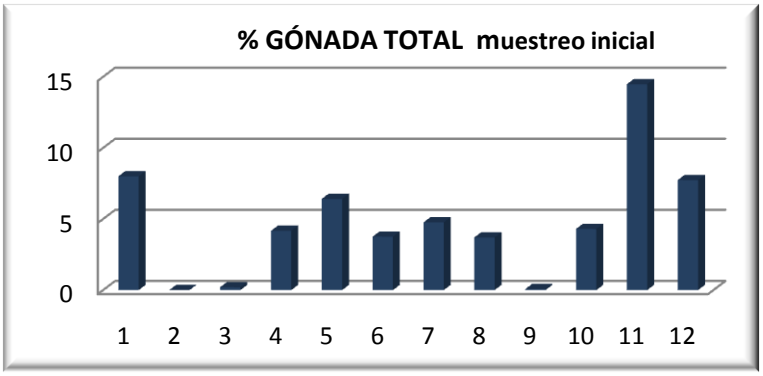


Fig. 128. Porcentajes de ocupación gonadal total en individuos del muestreo inicial (n=12).

Los porcentajes totales de ocupación en los individuos muestreados al inicio del acondicionamiento eran muy bajos, excepto uno de ellos que se encontraba por encima del 10% (14,48%) y tres por encima del 5% (8,00% - 6,42% y 7,74%); tres de los individuos presentaban una ocupación próxima al 0% (0,00% - 0,20% y 0,07%). **% GT** = 4,80 (d.e = 4,10).

Muestreo 1: 35 días

8h/luz

A los 35 días desde el inicio del acondicionamiento se analizó el porcentaje de ocupación gonadal de los individuos acondicionados con 8h/luz. En la figura 129 se ve que la gónada femenina apenas está presente en dos de los individuos, con un porcentaje por debajo del 5% (4,63% y 0,20%). La ocupación masculina es más alta, el máximo es 20,77% y dos individuos más superan el 10% de ocupación (13,69% y 10,98%). Así que el porcentaje medio de ocupación gonadal por células femeninas y masculinas era:

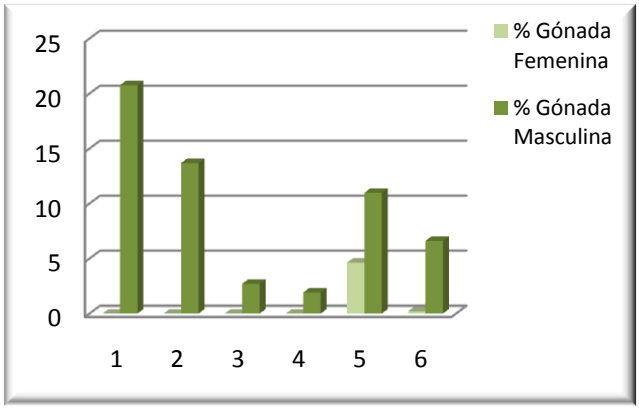


Fig. 129. Porcentajes de ocupación gonadal femenina y masculina de los individuos acondicionados con 8h/luz durante 35 días (n=6).

% GF = 0,80 (d.e = 1,87).

% GM = 9,45 (d.e = 7,19).

Prácticamente toda la ocupación gonadal total de estos individuos (Figura 130) era debida a la ocupación masculina de la gónada. Sólo tres de los individuos superaban el 10% de ocupación (20,77% - 13,69% y 15,61%).

% GT = 10,25 (d.e = 7,60)

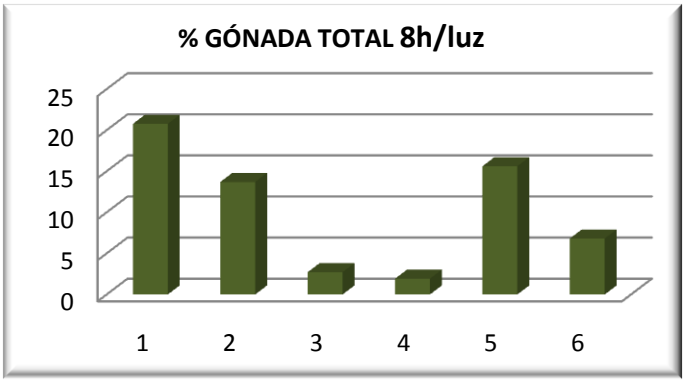


Fig. 130. Porcentajes de ocupación gonadal total de los individuos acondicionados con 8h/luz durante 35 días (n=6).

G1 (8-12h/luz)

Bajo las condiciones de acondicionamiento de G1 se pudo ver que ninguno de los individuos analizados tenía representación femenina (Figura 131). Además, dos de los individuos tenían el tejido gonadal completamente vacío, formado únicamente por células vesiculares. Respecto a la gónada masculina hay un individuo que destaca con un porcentaje de ocupación gonadal del 12,96% y los otros tres se encontraban entre el 2,25% y 3,51% de ocupación gonadal. Las ocupaciones gonadales medias eran: **% GF** = 0,0 (d.e = 0,0) y **% GM** = 3,51 (d.e = 4,84).

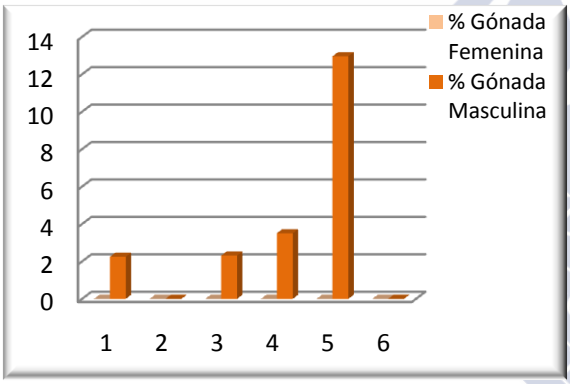


Fig. 131. Porcentajes de ocupación gonadal femenina y masculina de los individuos acondicionados con G1 durante 35 días (n=6).

La ocupación gonadal total era completamente debida a los porcentajes de ocupación masculina, no había rastro de ocupación femenina, por lo que, el porcentaje de gónada total es igual al porcentaje de gónada masculina. **% GT** = **% GM** = 3,51 (d.e = 4,84).

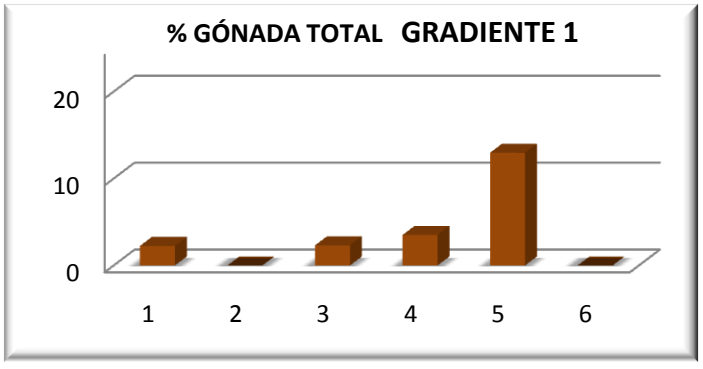


Fig. 132. Porcentajes de ocupación gonadal total de los individuos acondicionados con G1 durante 35 días (n=6).

G2 (8-16h/luz)

De los seis individuos analizados (Figura 133), uno de ellos tenía el tejido gonadal completamente vacío, con un porcentaje de 0% de ocupación tanto femenina como masculina y sólo uno de los individuos presentaba gónada femenina y con un porcentaje muy bajo, 0,93%. **% GF** = 0,15 (d.e = 0,38). En cuanto a los porcentajes de gónada masculina, no eran muy elevados, siendo el máximo de ocupación encontrado de 6,42%. **% GM** = 2,72 (d.e = 2,65).

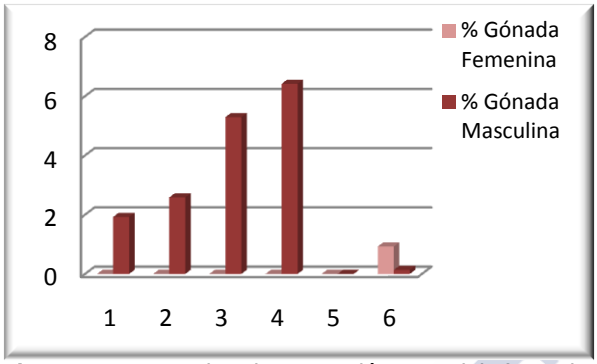


Fig. 133. Porcentajes de ocupación gonadal femenina y masculina de los individuos acondicionados con G2 durante 35 días (n=6).

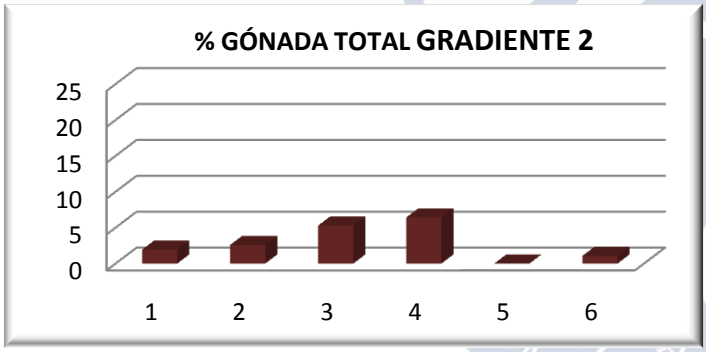


Fig. 134. Porcentajes de ocupación gonadal total de los individuos acondicionados con G2 durante 35 días (n=6).

% GT = 2,88 (d.e = 2,49).

La figura 134 es prácticamente igual a la correspondiente a individuos acondicionados con el gradiente 1 (G1) (Figura 133), ya que salvo uno de los individuos que tenía sólo un 0,93% de ocupación femenina, en los restantes la ocupación gonadal total era debida a la ocupación masculina del tejido gonadal.

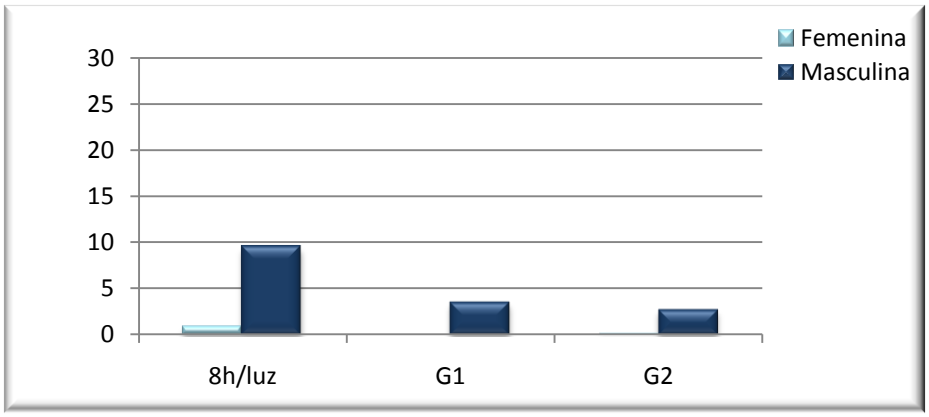


Fig. 135. Porcentajes de ocupación gonadal media femenina y masculina para los diferentes acondicionamientos después de 35 días.

En la figura 135 se muestran los porcentajes medios de ocupación gonadal tanto masculino como femenino. Es de destacar el bajo nivel de desarrollo gametogénico al cabo de un mes de acondicionamiento bajo los tres diferentes regímenes de fotoperíodo y la superioridad de gónada masculina.

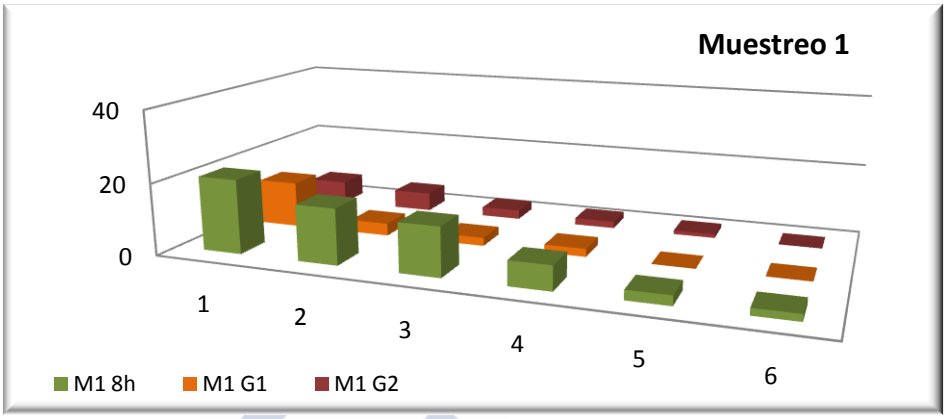


Fig. 136. Porcentaje de ocupación gonadal medio de cada uno de los individuos analizados a los 35 días y sometidos a las tres condiciones diferentes de acondicionamiento (M1=muestreo 1).

En la figura 136 se muestra la comparación de los porcentajes de ocupación gonadal de cada uno de los individuos analizados siguiendo las tres condiciones experimentales y destaca que las ocupaciones más altas se deban a los individuos sometidos a 8h/luz. Una vez que se miran con detenimiento las fotos correspondientes a estos individuos se puede decir que los altos porcentajes se deben, al desarrollo tardío de estos individuos.

Muestreo 2: 63 días

El segundo muestreo se llevó a cabo 63 días después del inicio del acondicionamiento de los progenitores.

8h/luz

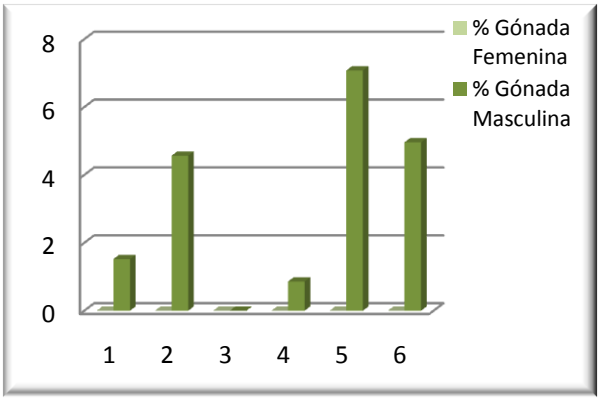


Fig. 137. Porcentajes de ocupación gonadal femenina y masculina de los individuos acondicionados con 8h/luz durante 63 días (n=6).

En la figura 137 se observa que ninguno de los 6 individuos analizados presentaba ocupación gonadal femenina. **% GF** = 0,0 (d.e = 0,0). La ocupación gonadal era toda masculina y no era muy alta, el máximo de ocupación de los organismos acondicionados con 8h/luz durante 62 días era de 7,08%. Además, uno de los individuos se encontraba completamente vacío, 0% de ocupación. Así, **% GT** = **% GM** = 3,16 (d.e = 2,78).

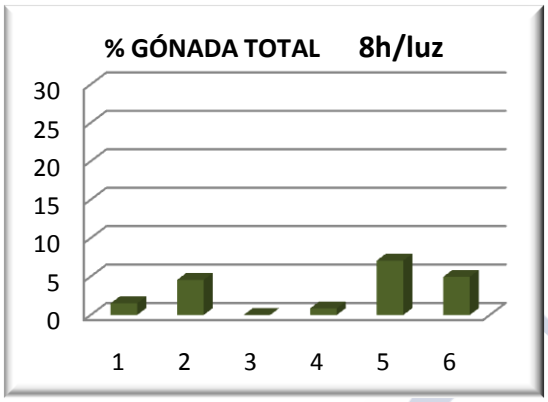


Fig. 138. Porcentajes de ocupación gonadal total de los individuos acondicionados con 8h/luz durante 63 días (n=6).

Al observar la figura 138, se ve que la ocupación total de los individuos acondicionados con 8h/luz se debe en su totalidad a la ocupación por gónada masculina ya que no hay presencia de gónada femenina en ninguno de los individuos analizados.

G1 (8-12h/luz)

De los individuos acondicionados con el G1 sólo uno de ellos presentaba un porcentaje de gónada femenino (13,30%). Además, uno de los individuos se encontraba completamente vacío. **% GF** = 2,22% (d.e = 5,43). Los porcentajes de gónada masculina eran más altos, tres de ellos superaban el 5% de ocupación (7,54% - 13,76% y 10,19%) y los otros dos estaban con 4,37% de ocupación gonadal. **% GM** = 6,70% (d.e = 4,87).

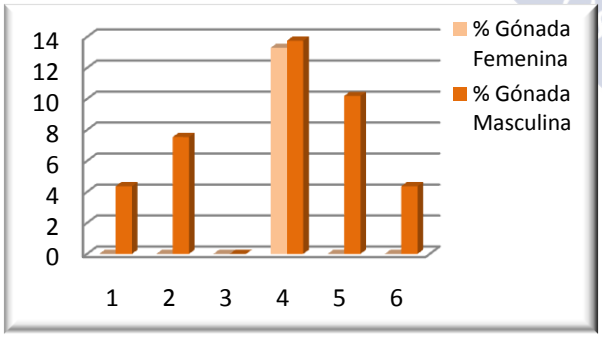


Fig. 139. Porcentajes de ocupación gonadal femenina y masculina de los individuos acondicionados con G1 durante 63 días (n=6).

Cuando se analizaba el porcentaje gonadal total (Figura 140) se observaba que, salvo uno de los individuos que presentaba gónada femenina y masculina, alcanzando un 27,05% de ocupación gonadal total, en el resto de los individuos el porcentaje de ocupación gonadal era el mismo que el porcentaje de gónada masculina. El porcentaje medio de ocupación gonadal total era un poco más alto. **% GT** = 8,92 (d.e = 9,52).

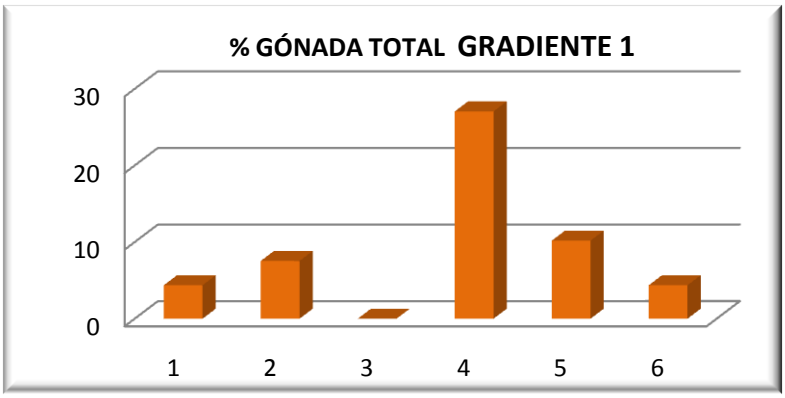


Fig. 140. Porcentajes de ocupación gonadal total de los individuos acondicionados con G1 durante 63 días (n=6).

G2 (8-16h/luz)

En la figura 141 se muestran los seis individuos analizados y dos de ellos poseían un porcentaje de gónada femenina que superaba el 15%: 16,54% y 16,14%. Tres de los individuos no presentaban signos femeninos y otro casi nada (0,33%). **% GF** = 5,50 (d.e = 8,40). Con respecto a la ocupación masculina de la gónada, uno de los individuos destacaba con una ocupación de 21,56%, mientras otros dos superaban el 5% (9,13% y 5,82%). **% GM** = 7,31% (d.e = 7,53).

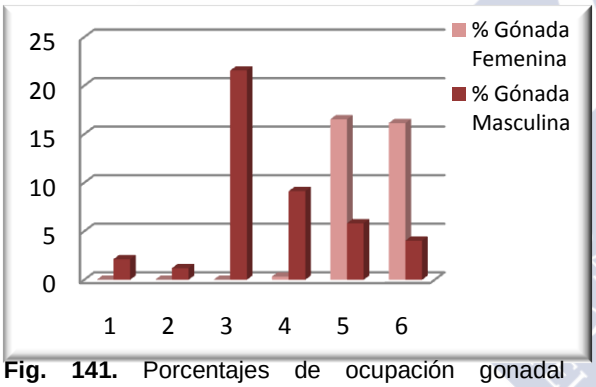


Fig. 141. Porcentajes de ocupación gonadal femenina y masculina de los individuos acondicionados con G2 durante 63 días (n=6).

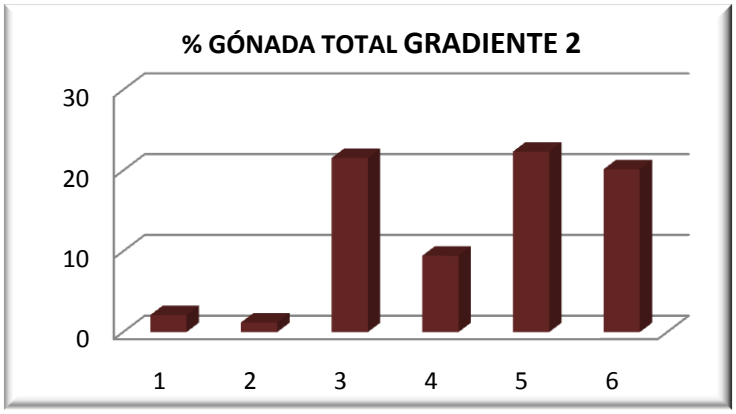


Fig. 142. Porcentajes de ocupación gonadal total de los individuos acondicionados con G2 durante 63 días (n=6).

Cuando se comprobaron los resultados del porcentaje de ocupación gonadal total (Figura 142), tres de los individuos presentaban un porcentaje de ocupación próximo al 20% (21,56% - 22,36% y 20,17%), mientras los otros presentaban unos porcentajes más bajos (9,46% - 2,12% y 1,19%). **% GT** = 12,81% (d.e = 9,82). El porcentaje medio de ocupación gonadal era el más alto observado hasta el momento en este experimento.

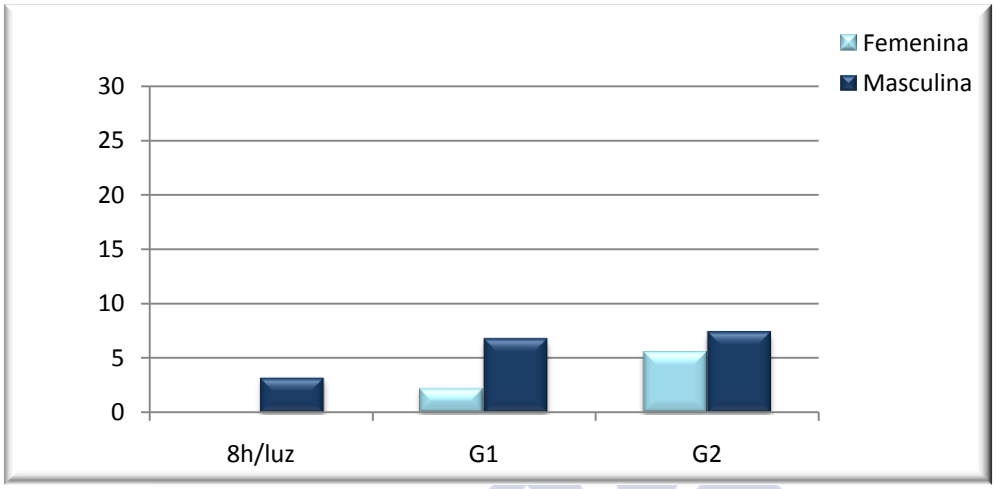


Fig. 143. Porcentajes de ocupación gonadal media femenina y masculina para los diferentes acondicionamientos después de 63 días.

Los individuos analizados a los 63 días del inicio del acondicionamiento mostraban un porcentaje de ocupación por gónada masculina superior a la ocupación femenina (Figura 143). En los individuos acondicionados con 8h/luz no había presencia de gónada femenina y en los individuos acondicionados con los dos gradientes de luz, el porcentaje de gónada masculina era superior al de la femenina, más acusado en los individuos sometidos a las condiciones de gradiente 1.

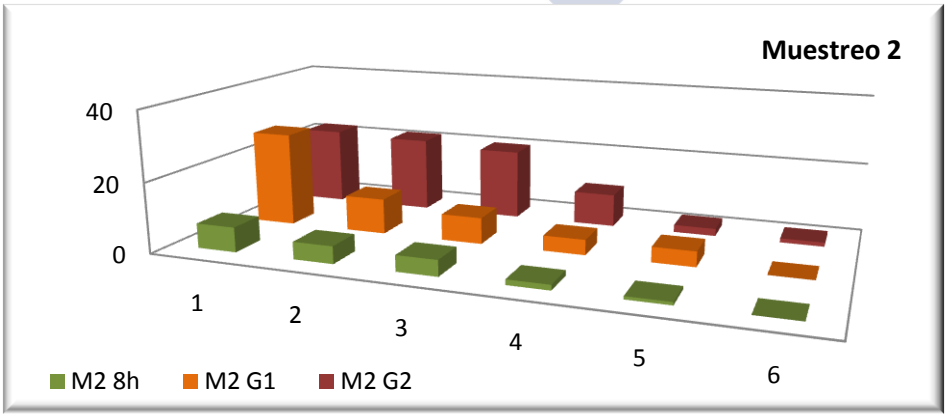


Fig. 144. Porcentaje gonadal medio de ocupación de cada uno de los individuos analizados a los 63 días y sometidos a las tres condiciones de acondicionamiento diferentes (M2=muestreo 2).

En la figura 144 se puede observar que los porcentajes de ocupación gonadal total eran muy diferentes en función del fotoperíodo al que han sido sometidos. El porcentaje más alto correspondía a un individuo acondicionado con el gradiente 1 pero la mayor homogeneidad de ocupación y mayor número de individuos con altas ocupaciones se puede observar que están presentes en los individuos acondicionados con gradiente 2.

En las figuras 145-147 se muestra la evolución del porcentaje de ocupación gonadal de cada individuo a lo largo de todo el experimento y para cada régimen de acondicionamiento.

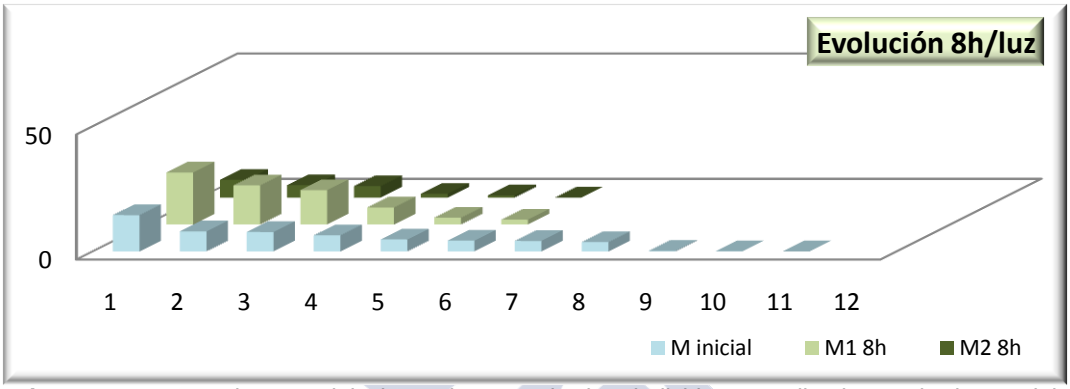


Fig. 145. Porcentaje gonadal de cada uno de los individuos analizados a lo largo del acondicionamiento y sometidos a un fotoperíodo de 8h/luz. (M inicial=muestreo inicial; M1=muestreo 1; M2=muestreo 2).

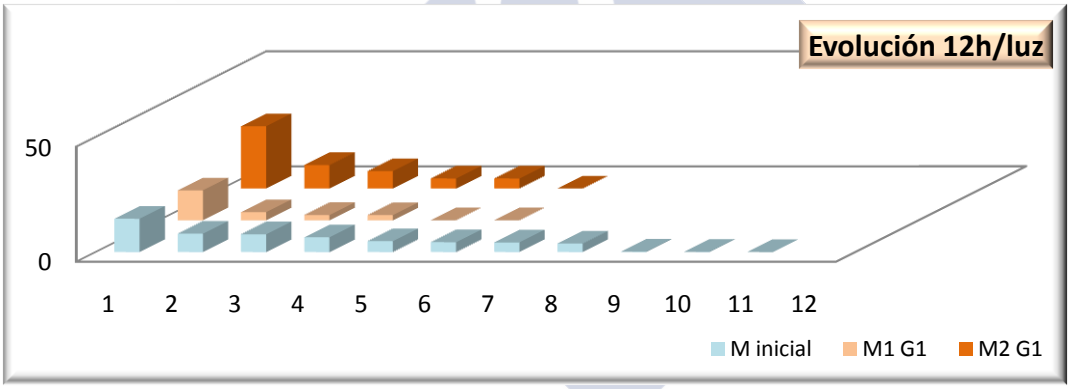


Fig. 146. Porcentaje gonadal de cada uno de los individuos analizados a lo largo del acondicionamiento y sometidos a un gradiente de luz de 8 a 12h/luz.((M inicial=muestreo inicial; M1=muestreo 1; M2=muestreo 2)

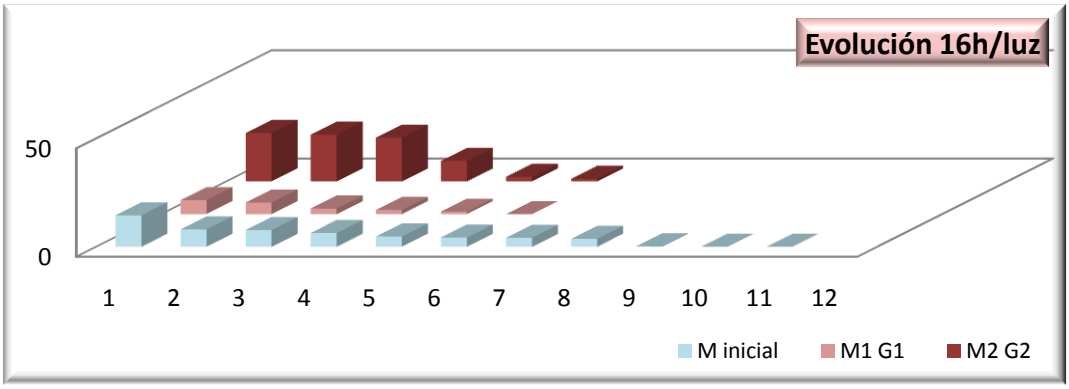


Fig. 147. Porcentaje gonadal de cada uno de los individuos analizados a lo largo del acondicionamiento y sometidos a un gradiente de luz de 8 a 16h/luz.((M inicial=muestreo inicial; M1=muestreo 1; M2=muestreo 2)

En los individuos acondicionados con 8h/luz se mostraban unos porcentajes de ocupación más elevados en el muestreo 1, como ya se dijo, debido al retraso gonadal que llevan respecto a los otros dos acondicionamientos. Los individuos acondicionados con los gradientes de luz en el muestreo 1 apenas presentaban ocupación gonadal y presentaban los porcentajes de ocupación más elevados en el muestreo 2, ya que se encontraban en su mayoría con células maduras y cercanos al desove o ya desovando, sin embargo, los individuos acondicionados con el gradiente 2 (8-16h/luz) presentaban unas ocupaciones mayores y más homogéneas entre ellos.

La figura 148 muestra los resultados globales obtenidos en el experimento 3, donde los progenitores eran sometidos a un gradiente de temperatura y tres diferentes fotoperíodos. La gráfica representa el porcentaje de ocupación gonadal por individuo a través de los diferentes muestreos.

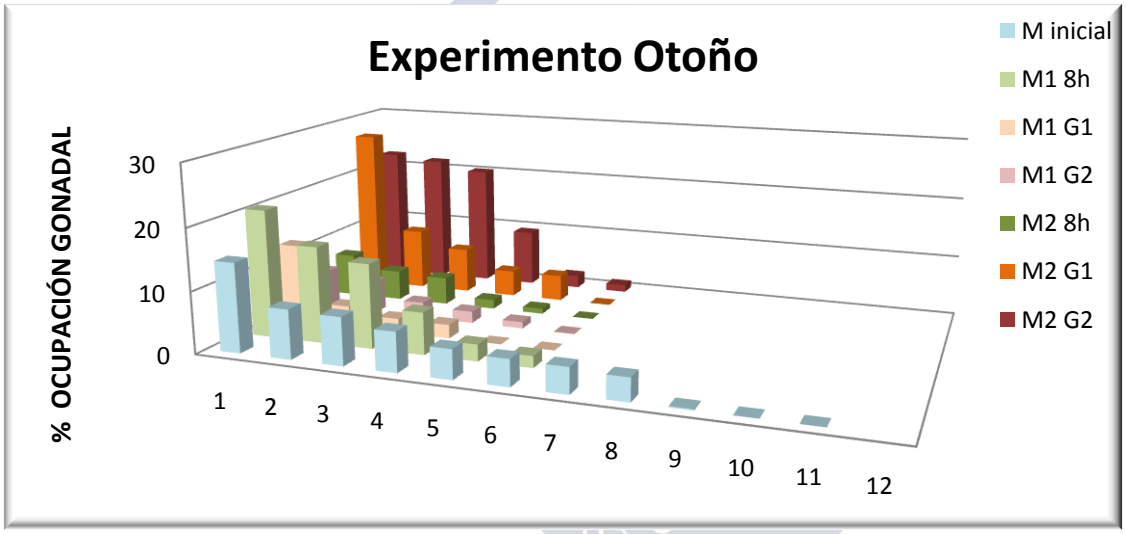


Fig. 148. Porcentaje gonadal medio de ocupación de cada uno de los individuos analizados a lo largo del experimento y sometidos a las tres condiciones diferentes de fotoperíodo.

4. <u>DESOVES</u>:

Aproximadamente a los dos meses y medio después del inicio del acondicionamiento (Figura 149), se encontraron desoves procedentes de las ostras acondicionadas con un fotoperíodo de gradiente de luz G2 (8-16h). Las ostras acondicionadas con un gradiente de luz G1 (8-12h) y las ostras acondicionadas con 8h/luz tardaron tres semanas más en iniciar los desoves.

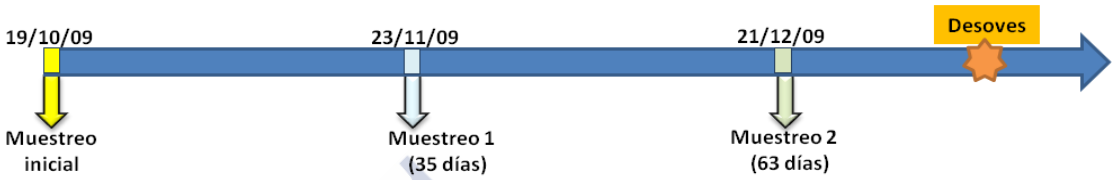


Fig. 149. Esquema con las fechas de los muestreos realizados y los desoves obtenidos.

Como se puede observar en la tabla 23 y en la figura 150, la luz tuvo un claro efecto sobre la producción larvaria. Los progenitores acondicionados los fotoperíodos más largos muestran un aumento evidente del número de desoves y de larvas liberadas. Los mejores resultados se obtuvieron con el gradiente de luz (8-16 h), seguido de los progenitores acondicionados con el gradiente (8-12 h).

Tabla 23. Fecha de desoves y número de larvas liberadas.

8h/luz	Gradiente 1	Gradiente 2
		04/01/10 450.000 larvas
	25/01/10 950.000 larvas	07/01/10 1.125.000 larvas
28/01/10 1.150.000 larvas	02/02/10 850.000 larvas	14/01/10 980.000 larvas
01/02/10 1.000.000 larvas	04/02/10 850.000 larvas	22/01/10 1.200.000 larvas
12/02/10 750.000 larvas	16/02/10 1.950.000 larvas	29/01/10 2.200.000 larvas
		30/01/10 1.500.000 larvas
		31/01/10 850.000 larvas
		01/02/10 1.125.000 larvas
		04/02/10 1.000.000 larvas
		08/02/10 2.300.000 larvas
		18/02/10 1.000.000 larvas
TOTAL: 2.900.000 larvas	TOTAL: 4.600.000 larvas	TOTAL: 12.840.000 larvas

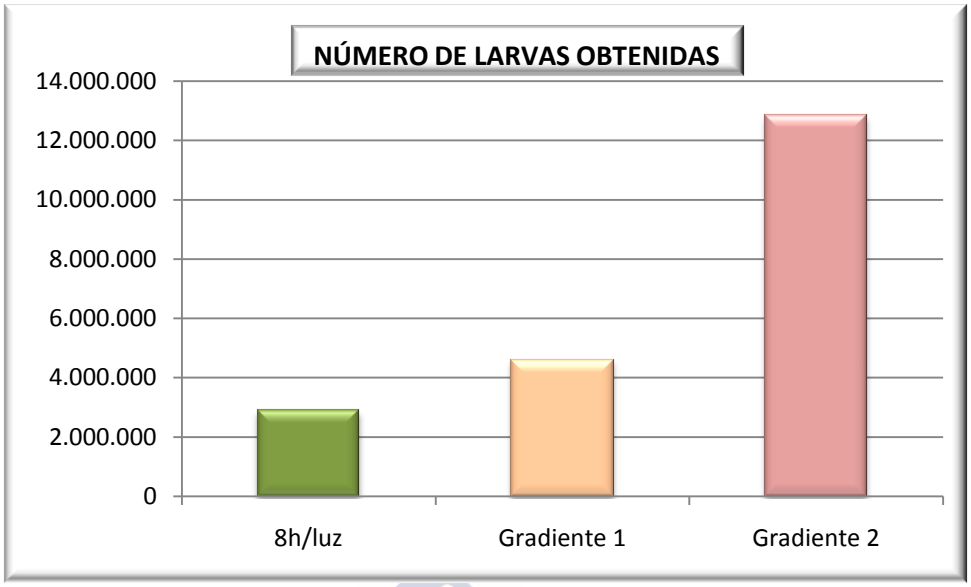


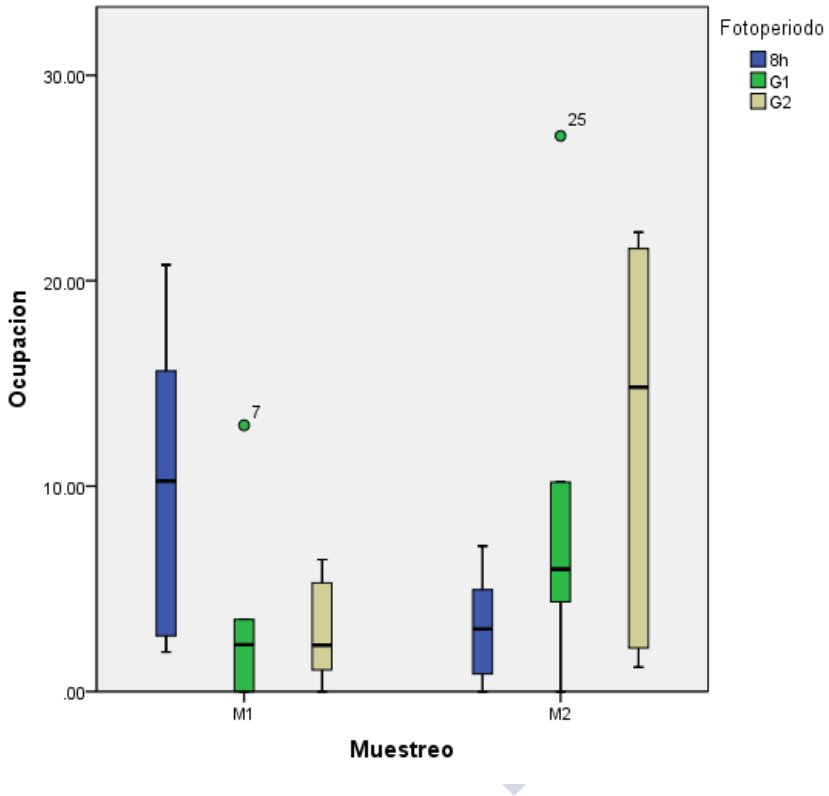
Fig. 150. Número de larvas liberadas en los distintos tipos de acondicionamientos.

UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5. RESULTADOS DE ESTADÍSTICA.

La ocupación gonadal no seguía una distribución normal, por lo que se realizó la transformación Arcs y la Arcs_Ocup seguía una distribución normal siguiendo los supuestos teóricos del Anova. No se encontraron diferencias significativas entre los tres fotoperíodos.

La ausencia de estas diferencias se debe en gran parte a la dispersión presente y, como ya se ha comentado en los resultados de estereología, a un retraso en el desarrollo gonadal de los individuos acondicionados con 8h, como se puede observar en la siguiente gráfica, y a las emisiones parciales de gametos de los individuos acondicionados con G al inicio del acondicionamiento.



EXPERIMENTO 4; EFECTO COMBINADO DEL FOTOPERÍODO Y LA TEMPERATURA EN INVIERNO.

1. MEDIDAS Y PESOS (BIOMETRÍA):

Los progenitores fueron acondicionados siguiendo 4 regímenes de fotoperíodo y temperatura distintos. En el primero de ellos se reflejaron las condiciones medioambientales durante el período del experimento y en los tres restantes se utilizó un gradiente de temperatura de 14 a 18 ºC y tres condiciones de fotoperíodo diferentes: 8h/luz, 16h/luz y un gradiente de luz (8-16h). Ver apartado 3.1.1 Experimento 2 de Materiales y Métodos.

Muestreo inicial: 2 de Marzo

Para determinar el estado gonadal de los progenitores en invierno se realizó un muestreo inicial. En este muestreo se recogieron 10 individuos del total de 370 individuos recolectados en Punta Cabalo (Boa-Noia) en la Ría de Muros y Noia.

Se midió la longitud y el ancho de cada ejemplar utilizando un calibre, determinándose que la longitud media era de 8,05 cm y la anchura media era de 8,46 cm.

A continuación, se determinó el peso húmedo, en una balanza Mettler® PM300. En la tabla 24 se presentan los pesos frescos de la concha y la vianda, junto con el peso total y el peso medio por individuo.

Tabla 24. Peso húmedo de la vianda, de la concha, peso total y peso medio de los progenitores en el muestreo inicial. **Phv** (peso húmedo de la vianda), **Pmv** (peso medio de la vianda), **Phc** (peso húmedo de la concha), **Pt** (peso total de los individuos seleccionados para este muestreo) y **Pmi** (peso medio de cada individuo).

	nº ind.	**Phv** (Peso húmedo vianda)	**Pmv** (Peso medio vianda)	**Phc** (Peso húmedo concha)	**Pt** (Peso total)	**Pmi** (Peso medio individuo)
Muestreo inicial	10	138,9 g	13,89 g	797,51 g	1066,62 g	106,66 g

Muestreo 1: 30 días

El primer muestreo fue realizado un mes después de empezar el acondicionamiento de los progenitores. Los distintos parámetros biométricos se muestran en la Tabla 25.

Tabla 25. Peso húmedo de la vianda, de la concha, peso total y peso medio de los progenitores en el muestreo 1, 30 días después del inicio del acondicionamiento.

	nº ind.	Phv	Pmv	Phc	Pt	Pmi
Ambiente	6	94,29 g	15,715 g	488,25 g	657,17 g	109,53 g
8 h/luz	6	113,65 g	18,94 g	723,21 g	946,75 g	157,79 g
16 h/luz	6	101,73 g	16,955 g	590,77 g	776,64 g	129,44 g
G luz	6	81,30 g	13,55 g	589,81 g	755,81 g	125,97 g

El peso medio de todos los individuos analizados, en los cuatro acondicionamientos experimentales, era mayor, ya que el peso medio de los individuos sometidos a las condiciones ambientales había aumentado 3 g, los acondicionados con 16h/luz y gradiente de luz aumentaron en torno a los 20 g y en los individuos sometidos a 8h/luz el aumento de peso era mayor de 50 g. Los pesos medios de la vianda también eran mayores en todos los casos pero no siguen un paralelismo con los pesos medios, el mayor incremento en el peso medio de la vianda correspondía con los individuos acondicionados con 8h/luz y el menor con los individuos acondicionados con gradiente de luz.

Muestreo 2: 63 días

El segundo muestreo se realizó a los 63 días de comenzar el acondicionamiento, recogiéndose 6 individuos de cada uno de los acondicionamientos y determinándose los parámetros biométricos citados anteriormente.

Tabla 26. Peso húmedo de la vianda, de la concha, peso total y peso medio de los progenitores en el muestreo 2, 63 días después del inicio del acondicionamiento.

	nº ind.	Phv	Pmv	Phc	Pt	Pmi
Ambiente	6	77,08 g	12,85 g	476,38 g	649,81 g	108,30 g
8 h/luz	6	85,82 g	14,30 g	588,57 g	770,32 g	128,39 g
16 h/luz	6	92,60 g	15,43 g	540,91 g	712,00 g	118,67 g
G luz	6	89,44 g	14,91 g	593,15 g	779,61 g	129,94 g

Se puede observar que el peso medio de los individuos era menor que en el muestreo anterior para todos los acondicionamientos excepto para los acondicionados con gradiente de luz, que tenía un aumento de 4 g. Lo mismo ocurría con los pesos medios de la vianda, eran inferiores en todos los acondicionamientos excepto en los acondicionados con gradiente de luz.

Durante el muestreo se encontraron larvas en la cavidad paleal de uno de los individuos acondicionados con 16h/luz; observadas al microscopio se determinó que tenían una semana aproximadamente.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2. RESULTADOS HISTOLOGÍA.

Las preparaciones y el análisis histológico se realizaron de acuerdo con los protocolos descritos en el apartado 3.4 de Materiales y Métodos. A continuación, en las figuras 151-153 se muestran imágenes representativas del desarrollo gametogénico de las ostras acondicionadas con los diferentes regímenes de temperatura y fotoperíodo. En el muestreo inicial, el estudio histológico se realizó sobre 10 individuos.

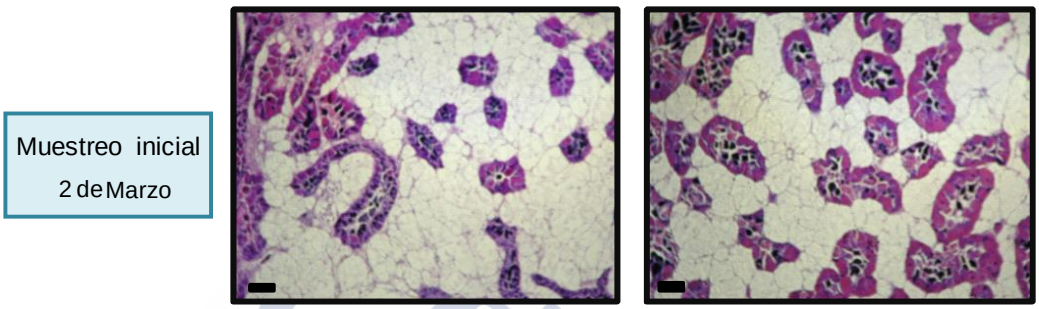


Figura 151. Fotografías de las secciones histológicas más representativas del desarrollo gonadal de los individuos analizados en el muestreo inicial. ▬ Barra: 10 µm.

El acondicionamiento de los individuos de este experimento se inició en invierno y al analizar histológicamente todos los individuos se pudo observar la presencia de folículos en la gónada. Los folículos se encontraban en distintas etapas de maduración, algunos maduros y otros presentaban restos de desoves anteriores.

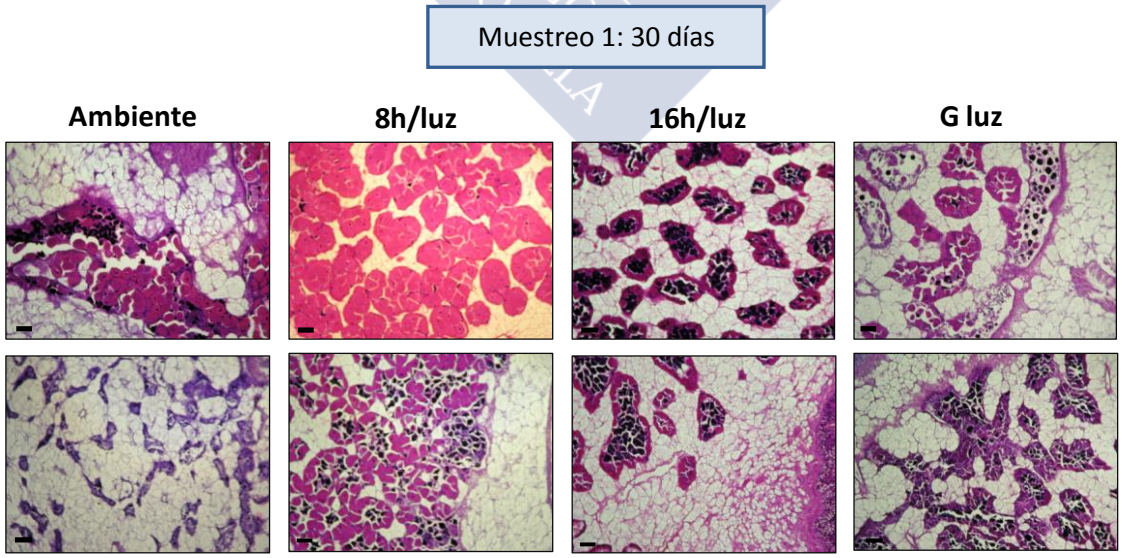


Figura 152. Fotografías de las secciones histológicas más representativas del desarrollo gonadal de los individuos analizados a los 30 días del inicio del acondicionamiento. ▬ Barra: 10 µm.

En la figura 152 se puede observar el estado en el que se encontraba la gónada tras 30 días de acondicionamiento con las distintas condiciones. Los individuos acondicionados con las condiciones ambientales se encontraban en su mayoría con los folículos muy maduros e incluso desovando y con zonas con signos de reabsorción pero también se encontraron individuos que poseían folículos de pequeño tamaño con las paredes revestidas con espermátidas poco maduras. La mayoría de los individuos acondicionados con 8h/luz se encontraban desovando (por lo que se encontraron también zonas de la gónada completamente vacías y con signos de reabsorción) pero en algunos de ellos los folículos ya tenían la siguiente fase en las paredes bastante madura y en el centro restos del desove anterior. Lo mismo pasa con los individuos acondicionados con 16h/luz pero los signos de reabsorción son más evidentes. En los individuos acondicionados con gradiente de luz se podían observar ovocitos maduros y mórulas de esperma desovando y reabsorbiendo las no eliminadas al medio y en algunas, gónada en reposo con restos de la puesta anterior.

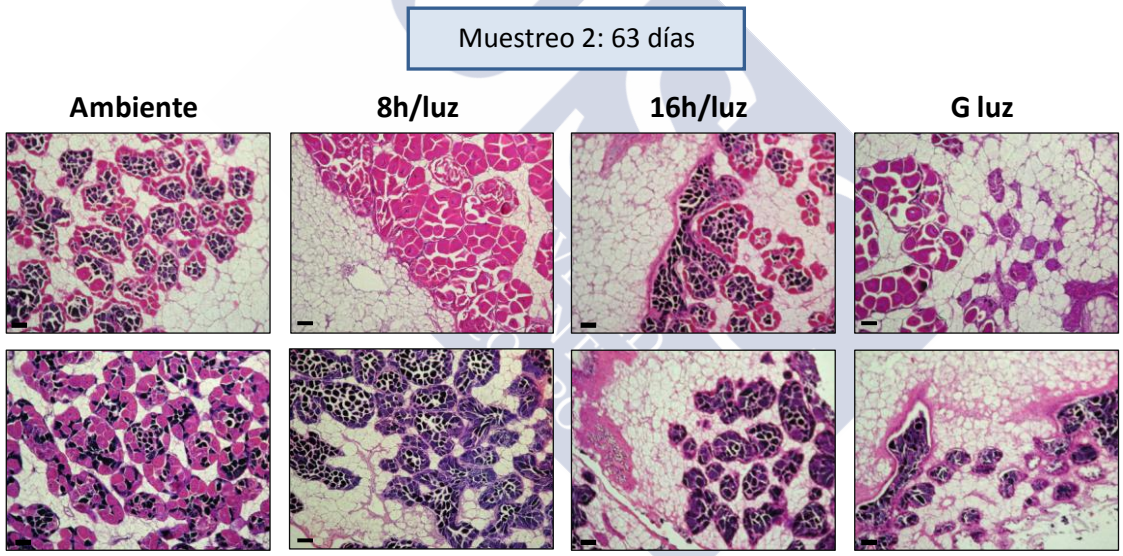


Figura 153. Fotografías de las secciones histológicas más representativas del desarrollo gonadal de los individuos analizados a los 63 días del inicio del acondicionamiento. ▬ Barra: 10 µm.

A los 63 días del inicio del acondicionamiento todos los individuos analizados presentaban la gónada con gran número de células reproductoras y maduras. Se puede observar que los individuos acondicionados con las condiciones ambientales y 8h/luz tenían los folículos llenos de células maduras. Mientras que los individuos acondicionados con 16h/luz y gradiente de luz ya habían realizado desoves parciales ya que presentan signos de reabsorción y gran cantidad de hemocitos en algunas zonas, sin embargo también se podían apreciar ovogonias y mórulas de esperma muy maduras tanto en los folículos como en los conductos, hecho más evidente en los individuos acondicionados con gradiente de luz.

3. RESULTADOS DE ESTEREOLOGÍA. RECUENTO DEL PORCENTAJE DE OCUPACIÓN GONADAL A LO LARGO DEL ACONDICIONAMIENTO.

Mediante los métodos estereológicos (ver apartado 3.5 de Materiales y Métodos) se analizaron las preparaciones histológicas. Para ello se utilizaron un mínimo de 6 fotografías correspondientes a cada corte histológico. Por medio del programa Sigma ScanPro se identificaron los distintos tipos celulares del tejido gonadal y se anotó su número: espermátidas y espermatocitos, ovogonias y ovocitos, células vesiculares y otros (hemocitos, tejido muscular, restos de hepatopáncreas, etc.).

El número de células reproductoras masculinas (espermátidas y espermatocitos) se denominó porcentaje de gónada masculina (% Gónada Masculina o % GM), mientras que al conjunto de células reproductoras femeninas (ovogonias y ovocitos) se le designó como porcentaje de gónada femenina (% Gónada Femenina o % GF).

Los datos obtenidos, se presentan en las figuras de la 154 a la 180.

Muestreo inicial: 2 de Marzo

En el muestreo inicial se analizaron 10 individuos. Todos los individuos analizados presentaban folículos en la gónada. En este experimento se partía de individuos que ya tenían la gónada reestructurada y ya habían iniciado el proceso de maduración gonadal, en mayor o menor grado.

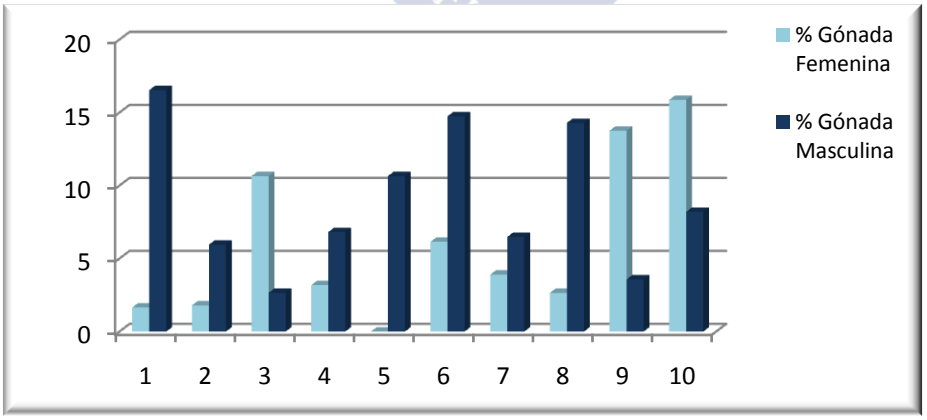


Fig. 154. Porcentajes de ocupación gonadal femenina y masculina en el muestreo inicial (n=10).

De los diez individuos, sólo tres poseían una ocupación gonadal femenina superior al 10%: 10,65% - 13,76% y 15,87% y había uno que no presentaba signos femeninos: **% GF** = 5,95 (d.e = 5,53). En cuanto a la gónada masculina, todos los individuos tenían representación,

cuatro de ellos superan el 10% de ocupación: 16,54% - 10,65% - 14,75% y 14,29%, mientras otros cuatro superaban el 5%. **% GM** = 8,989 (d.e = 4,85).

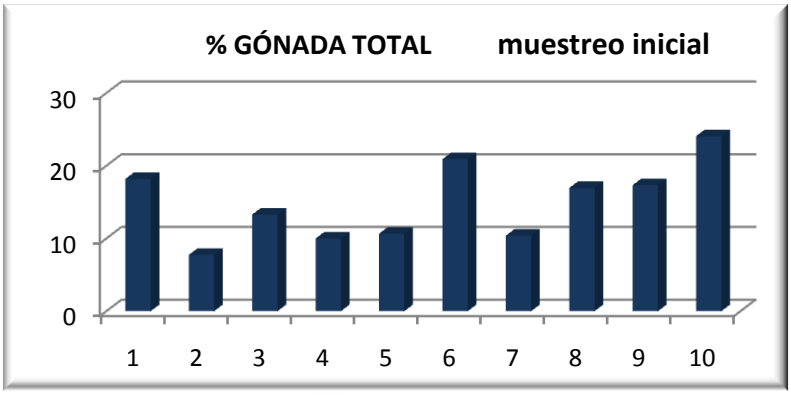


Fig. 155. Porcentajes de ocupación gonadal total en individuos del muestreo inicial (n=10).

Los porcentajes totales de ocupación gonadal de los diez individuos analizados al inicio del acondicionamiento eran más elevados que los encontrados en los muestreos iniciales realizados en otoño. Dos de ellos superaban el 20% de ocupación: 20,90% y 24,07%. Cinco superaban el 10%: 13,29% - 10,65% -10,38% - 16,94% y 17,33%. Las ocupaciones gonadales más bajas eran 7,74% y 9,99%. Así, el porcentaje medio de ocupación gonadal es: **% GT** = 14,95 (d.e = 5,35). Comparados estos resultados con los porcentajes de ocupación obtenidos en otoño se observa ahora que se parte de un tejido gonadal más desarrollado y una mayor homogeneidad en torno a la ocupación gonadal.

Muestreo 1: 30 días

A los 30 días del inicio del acondicionamiento se realizó el primer muestreo para analizar el estado gonadal de los individuos sometidos a las distintas condiciones de acondicionamiento, para ello se recogieron 6 individuos de cada uno de ellos.

Ambiente

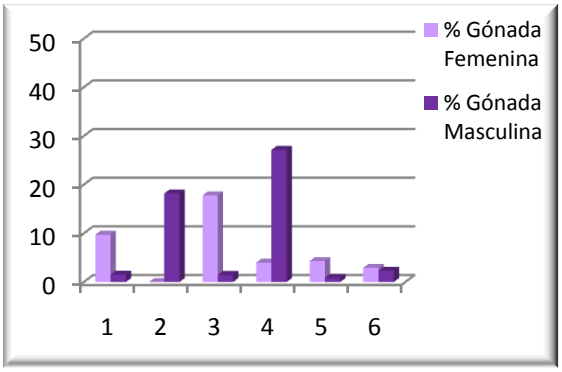


Fig. 156. Porcentajes de ocupación gonadal femenina y masculina de los individuos acondicionados con condiciones ambientales durante 30 días (n=6).

En la figura 156 se presentan los porcentajes de ocupación gonadal femenina y masculina. Los porcentajes más elevados de ocupación gonadal femenina eran 9,72% y 17,79% y de ocupación gonadal masculina eran 18,19% y 27,12%. Los restantes individuos tenían ocupaciones que no superaban el 4,30%. La media de ocupación gonadal femenina: **% GF** = 6,45 (d.e = 6,39) y la masculina: **% GM** = 5,58 (d.e = 11,27).

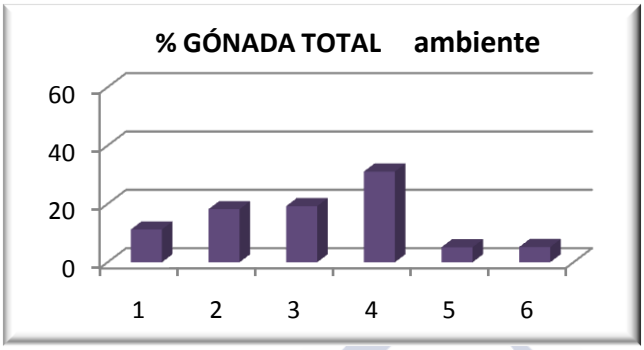


Fig. 157. Porcentajes de ocupación gonadal total de los individuos acondicionados con condiciones ambientales durante 30 días (n=6).

Los porcentajes de ocupación total se muestran en la figura 157. Un individuo superaba el porcentaje del 30% (31,09%), dos se encontraban próximos al 20% (18,18% y 19,25%), uno por encima del 10% (11,24%) y los otros dos al 5%. El porcentaje de ocupación total media de este acondicionamiento era: **% GT** = 15,03 (d.e = 9,94).

8h/luz

En todos los individuos analizados, salvo en uno, el porcentaje de gónada femenina superaba el porcentaje de gónada masculina. Dos individuos poseían una ocupación femenina muy elevada (46,23% y 30,95%), tres estaban próximos al 20% y otro al 10% de ocupación femenina. El porcentaje medio de ocupación femenina era: **% GF** = 24,41 (d.e = 12,75). En cuanto a la ocupación masculina del tejido gonadal era elevada en tres individuos, con unos porcentajes de 10,25% - 34,79% y 11,18%; los otros dos estaban próximos al 4%. **% GM** = 11,77 (d.e = 11,70).

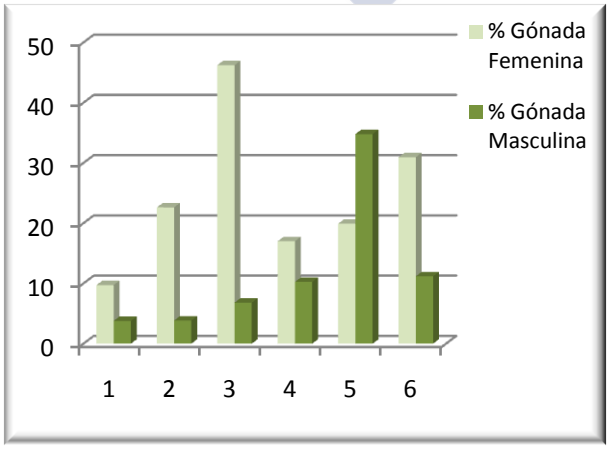


Fig. 158. Porcentajes de ocupación gonadal femenina y masculina de los individuos acondicionados con 8h/luz durante 30 días (n=6).

En la figura 159 se representan los datos de ocupación gonadal total obtenidos. Dos de los individuos presentaban más de la mitad del tejido gonadal ocupado por células sexuales (53,04% - 54,70%), tres superaban el 20% de ocupación (26,46% - 27,25% y 42,13%) y el otro tenía un porcentaje de ocupación gonadal total de 13,49%. El porcentaje medio era: **% GT** = 36,18 (d.e = 16,44).

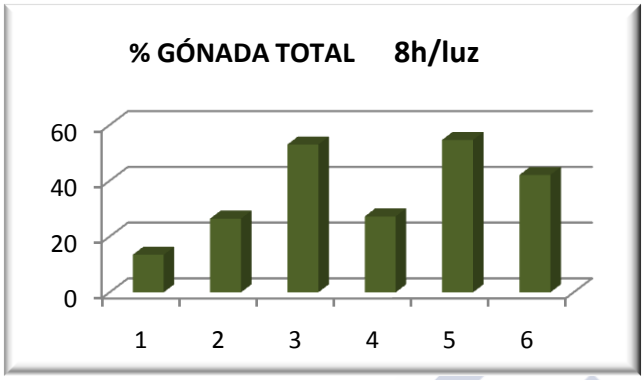


Fig. 159. Porcentajes de ocupación gonadal total de los individuos acondicionados con 8h/luz durante 30 días (n=6).

16h/luz

Como se puede observar en la figura 160, y al igual que los individuos acondicionados con 8 horas de luz, los porcentajes de gónada femenina eran superiores a los de gónada masculina excepto en un caso. Dos de los individuos tenían un porcentaje de gónada femenina superior al 20% (23,28% y 21,10%) y tres superaban el 10% (11,18% - 16,80% y 14,68%). Así, la ocupación femenina media era: **% GF** = 15,30 (d.e = 6,75). Los porcentajes de gónada masculina eran inferiores al 5% en cuatro de los individuos, los otros dos tenían una ocupación gonadal masculina de 17,79% y 24,08%. La ocupación masculina media era: **% GM** = 7,85 (d.e = 10,44)

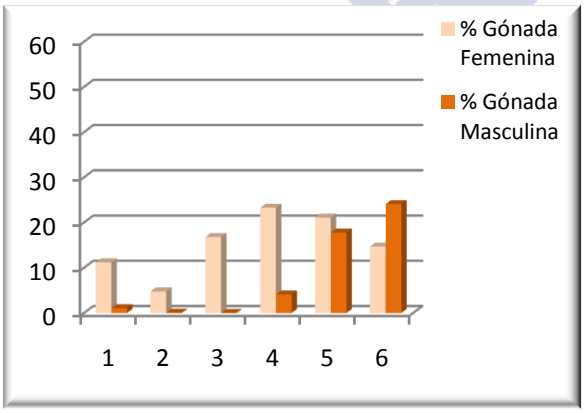


Fig. 160. Porcentajes de ocupación gonadal femenina y masculina de los individuos acondicionados con 16h/luz durante 30 días (n=6).

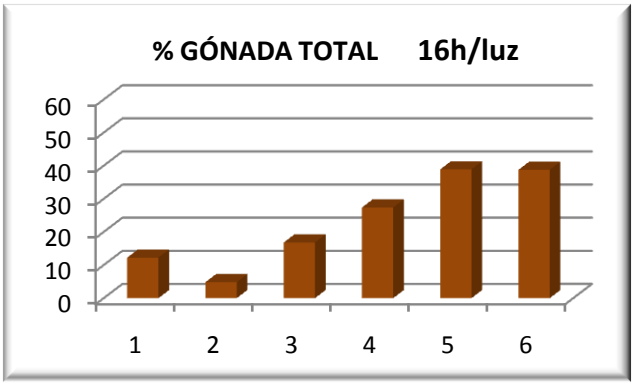


Fig. 161. Porcentajes de ocupación gonadal total de los individuos acondicionados con 16h/luz durante 30 días (n=6).

Los porcentajes de ocupación total de los seis individuos analizados (Figura 161) eran bastante dispares. El porcentaje de ocupación más bajo era de 4,83%; le seguían 12,24% - 16,80% y 27,38% y dos de ellos eran más elevados (38,89% y 38,76%). El porcentaje medio de ocupación total de este acondicionamiento era: **% GT** = 23,15 (d.e = 14,17).

G luz

De los individuos acondicionados con gradiente de luz, tres de ellos no poseían gónada femenina y la ocupación de los tres restantes no era muy elevada: 7,94% - 6,61% y 10,58%. Por lo tanto, el porcentaje medio de ocupación femenina era: **% GF** = 4,19 (d.e = 4,76). En cuanto a los porcentajes de gónada masculina, dos superaban el 40% de ocupación (44,64% y 40,41%), otros dos alcanzaban el 24,67% y 15,34% y los otros dos eran más bajos (5,89% y 0,93%). El porcentaje medio de ocupación masculina era: **% GM** = 21,98 (d.e = 17,92).

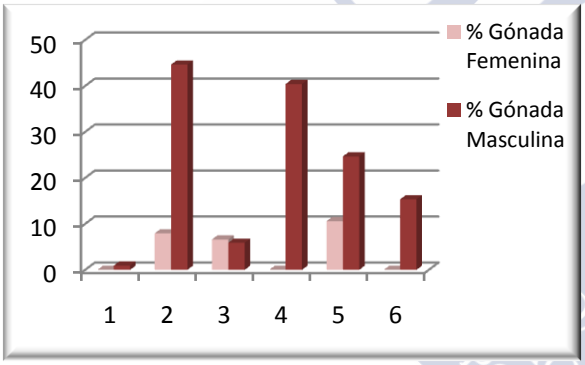


Fig. 162. Porcentajes de ocupación gonadal femenina y masculina de los individuos acondicionados con G luz durante 30 días (n=6).

En la figura 163, se muestran los porcentajes medios de ocupación total de los seis individuos analizados y se puede observar que uno de los individuos tenía la gónada prácticamente vacía (0,93%), dos estaban próximos al 15% (12,50% y 15,34%) y los tres porcentajes más altos eran: 52,58% - 40,41% y 35,25%. El porcentaje de ocupación total medio era: **% GT** = 26,17 (d.e = 19,62).

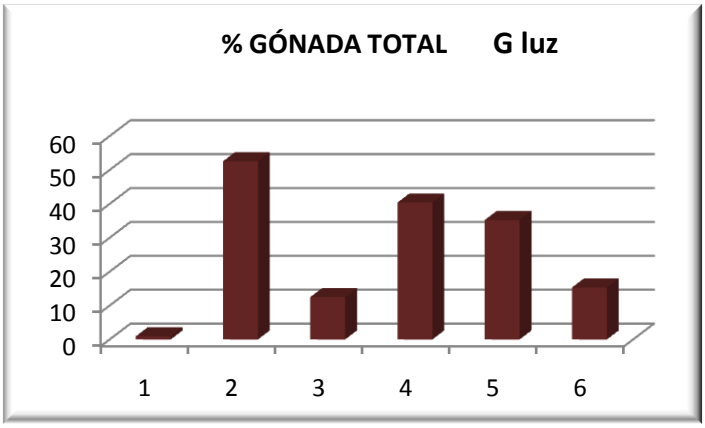


Fig. 163. Porcentajes de ocupación gonadal total de los individuos acondicionados con G luz durante 30 días (n=6).

En la figura 164 se muestran los porcentajes medios de ocupación gonadal tanto masculina como femenina, para las cuatro condiciones de acondicionamiento utilizadas y después de un mes del inicio de experimento.

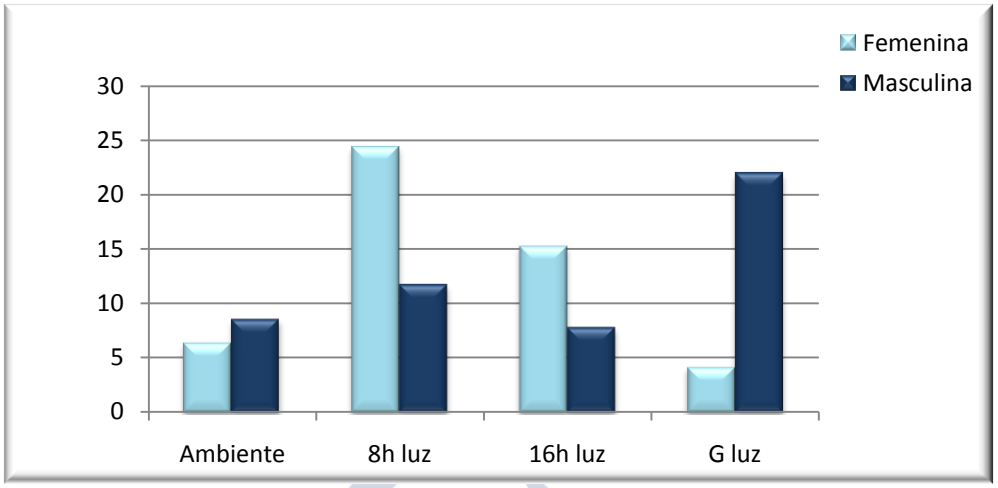


Fig. 164. Porcentajes medios de ocupación gonadal femenina y masculina para los diferentes acondicionamientos después de 30 días.

Después de 30 días, la ocupación gonadal por células femeninas y masculinas difiere en los distintos acondicionamientos. Los individuos acondicionados con condiciones ambientales poseían unos porcentajes de ocupación femenina y masculina muy similares; en los individuos acondicionados con 8 y 16h/luz la presencia de gónada femenina es superior a la gónada masculina y los individuos acondicionados con gradiente de luz mostraban el triple de ocupación masculina que femenina.

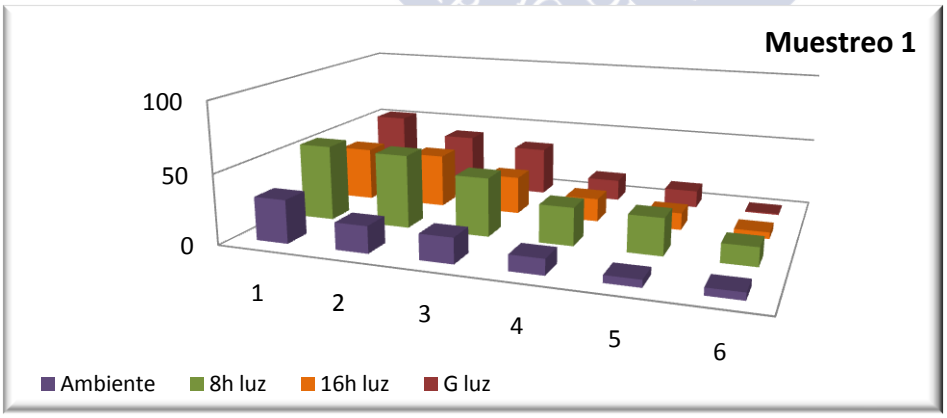


Fig. 165. Porcentaje gonadal medio de ocupación de cada uno de los individuos analizados a los 30 días y sometidos a los cuatro regímenes de acondicionamiento diferentes.

En la figura 165 se muestra la comparación de los porcentajes de ocupación gonadal de cada uno de los individuos analizados siguiendo las condiciones experimentales y destaca que las ocupaciones más altas se deban a los individuos sometidos a 8h/luz y las más bajas se correspondan con los individuos acondicionados con las condiciones ambientales.

Muestreo 2: 63 días

Ambiente

A los 63 días desde el inicio del acondicionamiento se analizó el porcentaje de ocupación gonadal de seis individuos sometidos a las condiciones ambientales (Figura 166). La gónada femenina estaba presente en todos los individuos, en dos el porcentaje era bajo (2,51% y 4,30%) y en los otros estaba cercana o superaba el 20% (19,71% - 23,81% - 35,52% y 29,76%). Salvo el porcentaje de los individuos 2 y 4, la ocupación femenina se debía totalmente a ovocitos maduros. La ocupación femenina media era: **% GF** = 19,27 (d.e = 13,49). En cuanto a la gónada masculina, en un individuo apenas estaba presente, el individuo 4 tenía una ocupación muy elevada (57,74%) estaba formado por folículos repletos de esperma maduro con zonas en las que el esperma se encuentra ya en los ductos. Los individuos 2 (29,43%) y 6 (22,82%) presentaban el mismo patrón un poco menos desarrollado y con zonas del tejido gonadal completamente vacío formado únicamente por células vesiculares. Los dos restantes tenían una ocupación masculina de 14,15% y 8,00%. **% GM** = 22,06 (d.e = 20,33).

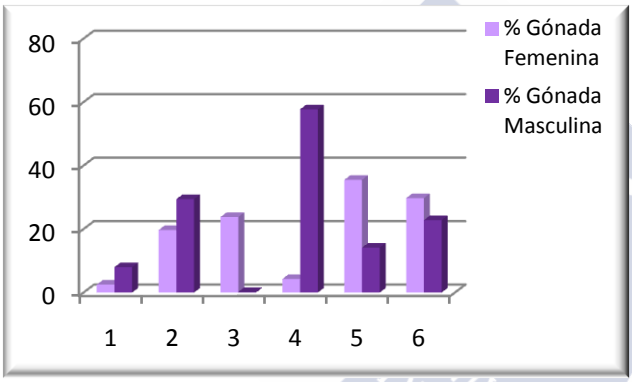


Fig. 166. Porcentajes de ocupación gonadal femenina y masculina de los individuos acondicionados con condiciones ambientales durante 63 días (n=6).

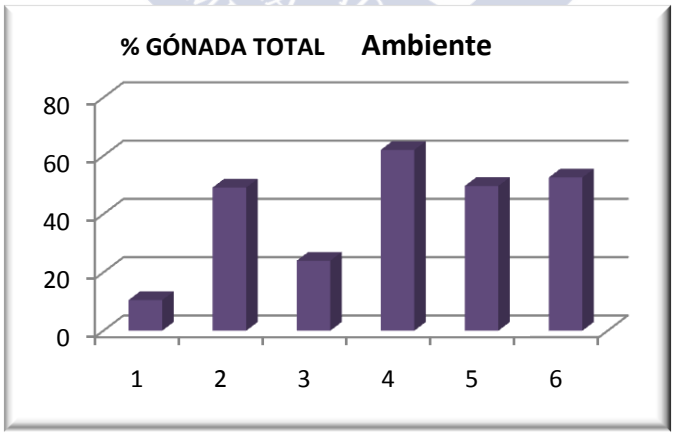


Fig. 167. Porcentajes de ocupación gonadal total de los individuos acondicionados con condiciones ambientales durante 63 días (n=6).

En la figura 167 se muestran los porcentajes de ocupación total de los seis individuos. Cuatro de ellos superaban el 40% de ocupación (49,14% - 62,04% - 49,67% y 52,58%) y los dos restantes alcanzaban el 24,01% y 10,51%. **% GT** = 41,33 (d.e = 19,68).

8h/luz

De los individuos acondicionados con 8h/luz, dos de ellos no presentaban gónada femenina, otros dos presentaban algunos ovocitos maduros, restos de un desove anterior (1,59% y 1,52%) y los dos restantes: el individuo 1 era una hembra pura y madura con signos de reabsorción (34,56%) y el individuo 3 era una hembra madura desovando y con restos de una puesta anterior como macho (44,45%). La ocupación femenina media: **% GF** = 13,70 (d.e = 20,27).

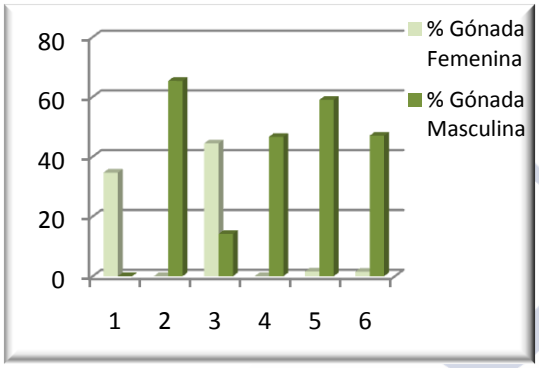


Fig. 168. Porcentajes de ocupación gonadal femenina y masculina de los individuos acondicionados con 8h/luz durante 63 días (n=6).

Los individuos 2 y 4 (65,35% y 46,63%) eran machos puros, el tejido gonadal estaba ocupado sólo por gónada masculina. En los individuos 5 y 6 (58,99% y 47,02%) el tejido gonadal estaba formado por folículos repletos de esperma y signos de desove pero con restos de ovocitos. La ocupación masculina media: **% GM** = 38,69 (d.e = 25,90).

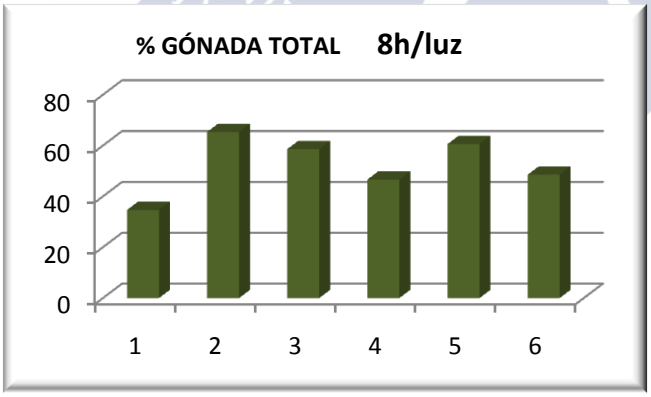


Fig. 169. Porcentajes de ocupación gonadal total de los individuos acondicionados con 8h/luz durante 63 días (n=6).

Todo los individuos poseían una alta ocupación gonadal, tres superaban el 50% (65,35% - 58,60% y 60,58%), dos se encontraban por encima del 40% (46,63% y 48,54%) y otro presentaba el 34,66% de ocupación. Todos se encontraban con el tejido gonadal maduro e incluso desovando o muy próximo al desove. Así, **% GT** = 52,39 (d.e = 11,28). Este dato representa la máxima ocupación gonadal encontrada en este experimento hasta el momento.

16h/luz

En la figura 170 se observa que existía un número mayor de individuos con un alto porcentaje de ocupación por gónada masculina que femenina. La ocupación femenina solo era relevante en dos de los individuos con una ocupación de 15,81% y 18,325%. **% GF** = 5,94 (d.e = 8,66). Todos los individuos presentan gónada masculina, cuatro tenían una ocupación por encima del 25% (25,46% - 59,26% - 29,43% y 38,89%), encontrándose dos machos puros. Los otros dos porcentajes eran más bajos (15,54% y 4,17%). **% GM** = 28,79 (d.e = 17,93).

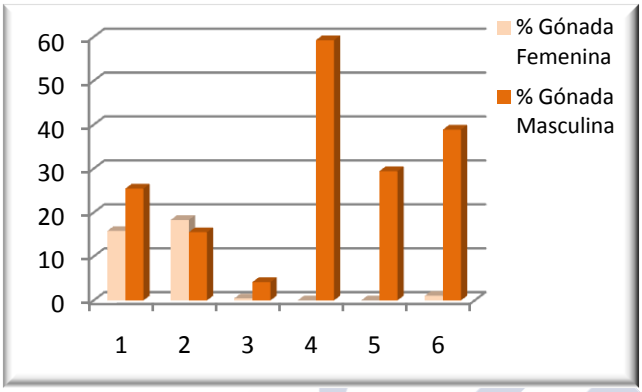


Fig. 170. Porcentajes de ocupación gonadal femenina y masculina de los individuos acondicionados con 16h/luz durante 63 días (n=6).

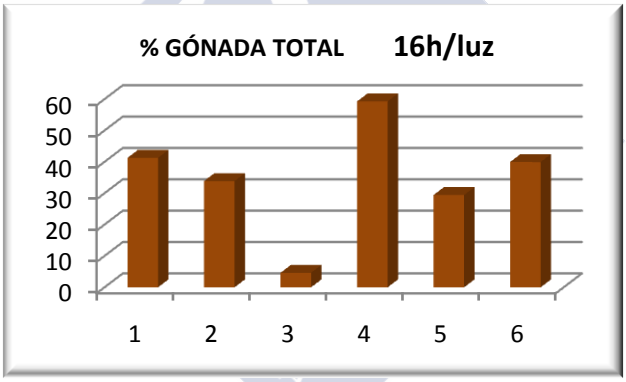


Fig. 171. Porcentajes de ocupación gonadal total de los individuos acondicionados con 16h/luz durante 63 días (n=6).

Cuando se representaron los resultados del porcentaje de ocupación gonadal total (Figura 171) se vio que cinco de los individuos estaban próximos o superaban el 30% (41,27% - 33,86% - 59,26% - 29,43% y 39,95%) y el otro tenía la gónada prácticamente vacía, con gran número de hemocitos y pequeños folículos comenzando una nueva fase. Excepto el individuo 3, todos los demás se encontraban con el tejido gonadal maduro y con restos de desoves anteriores. **% GT** = 34,73 (d.e = 17,93).

G luz

Entre los individuos analizados en este muestreo se encontraban un macho puro y una hembra pura, los cuatro individuos restantes presentaban tanto ocupación gonadal femenina como masculina (Figura 172).

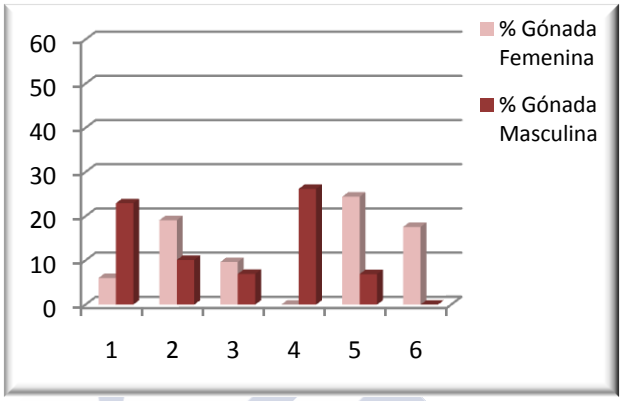


Fig. 172. Porcentajes de ocupación gonadal femenina y masculina de los individuos acondicionados con G luz durante 63 días (n=6).

La ocupación femenina era alta en tres individuos (19,12% - 24,43% y 17,59%) y menor en otros dos (6,02% y 9,66%). La ocupación femenina media era: **% GF** = 12,80 (d.e = 9,14). En cuanto a la ocupación masculina, dos individuos superaban el 20% (22,95% y 26,19%) y los restantes tenían una ocupación de: 10,12% - 6,95% y 6,91%. **% GM** = 12,19 (d.e = 10,20).

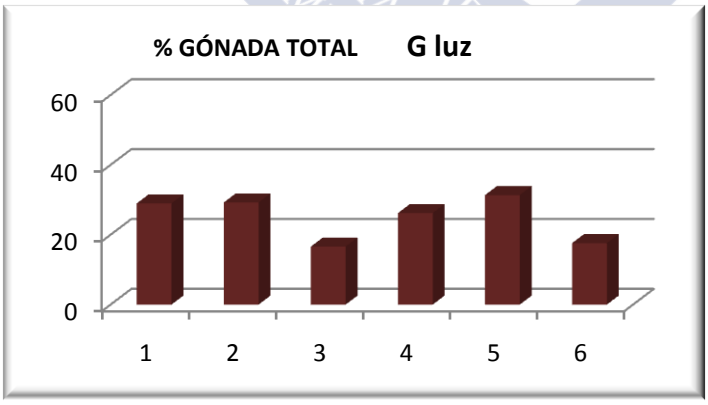


Fig. 173. Porcentajes de ocupación gonadal total de los individuos acondicionados con G luz durante 63 días (n=6).

Los porcentajes gonadales totales de cuatro de los individuos superaban el 20% (28,97% - 29,24% - 26,19% y 31,35%) y otros dos se encontraban bastante cerca (16,60% y 17,59%), la ocupación era bastante homogénea. **% GT** = 24,99 (d.e = 6,34). Todos los individuos presentaban células maduras y signos de postdesove.

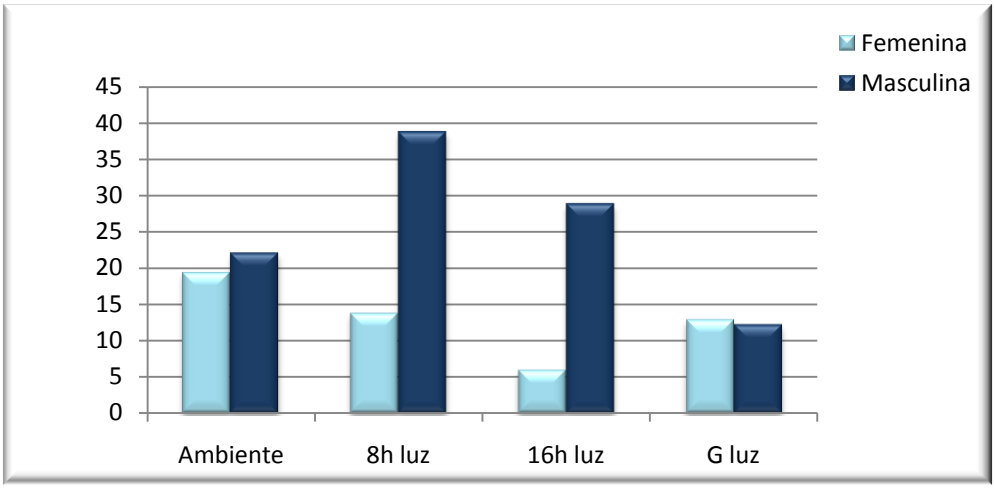


Fig. 174. Porcentajes medios de ocupación gonadal femenina y masculina para los diferentes acondicionamientos después de 63 días.

Al comparar los porcentajes medios de ocupación femenina y masculina de todos los individuos analizados en cada acondicionamiento en el muestreo 2 (Figura 174), se puede observar que la ocupación por gónada masculina era superior a la ocupación femenina en tres regímenes de acondicionamiento (Ambiente, 8h/luz y 16h/luz) pero siendo especialmente destacable en los individuos acondicionados con 8h/luz y 16h/luz. Los individuos acondicionados con gradiente de luz poseían unas ocupaciones gonadales masculina y femenina muy similares.

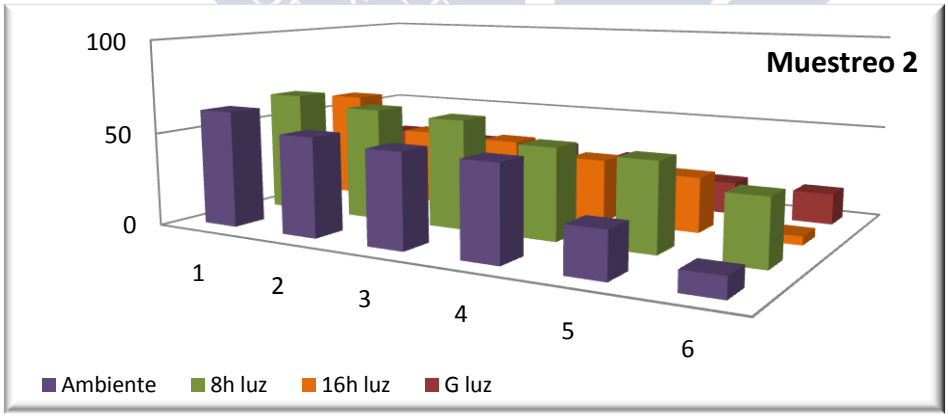


Fig. 175. Porcentaje gonadal medio de ocupación de cada uno de los individuos analizados a los 63 días y sometidos a las cuatro condiciones de acondicionamiento diferentes.

La figura 175 muestra los porcentajes de ocupación gonadal después de 63 días de acondicionamiento y se puede observar que los individuos acondicionados con 8h/luz presentaban las ocupaciones más altas (65,35% - 60,58% - 58,60%) y a continuación los acondicionados bajo condiciones ambientales (62,04% - 52,58% - 49,67%). Las ocupaciones más bajas correspondían a los individuos acondicionados con gradiente de luz (31,35% - 29,24% - 28,97%).

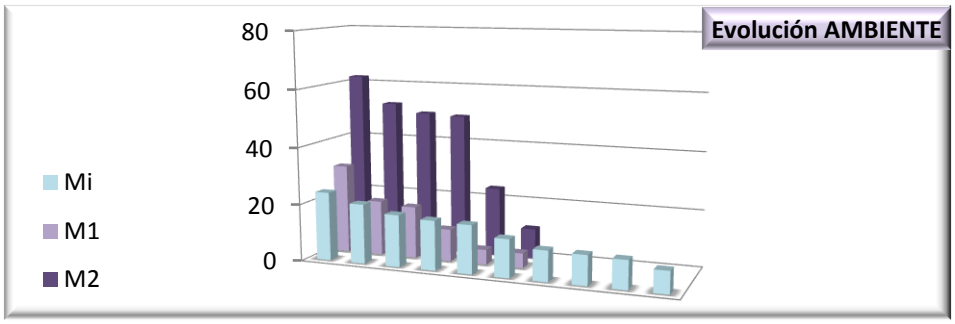


Fig. 176. Porcentaje gonadal de cada uno de los individuos analizados a lo largo del acondicionamiento y sometidos a las condiciones ambientales. Mi: muestreo inicial; M1: muestreo 1 (30 días); M2: muestreo 2 (63 días).

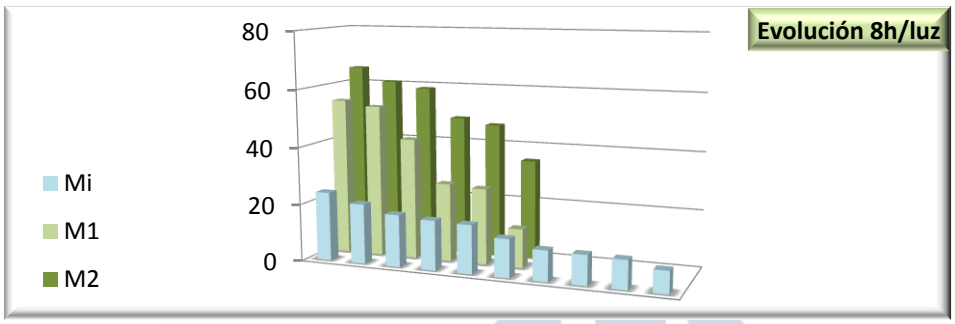


Fig. 177. Porcentaje gonadal de cada uno de los individuos analizados a lo largo del acondicionamiento y sometidos a 8h de luz. Mi: muestreo inicial; M1: muestreo 1 (30 días); M2: muestreo 2 (63 días).

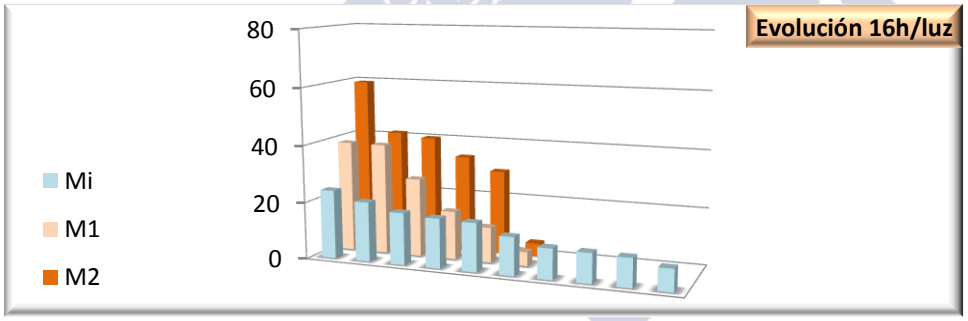


Fig. 178. Porcentaje gonadal de cada uno de los individuos analizados a lo largo del acondicionamiento y sometidos a 16h de luz. Mi: muestreo inicial; M1: muestreo 1 (30 días); M2: muestreo 2 (63 días).

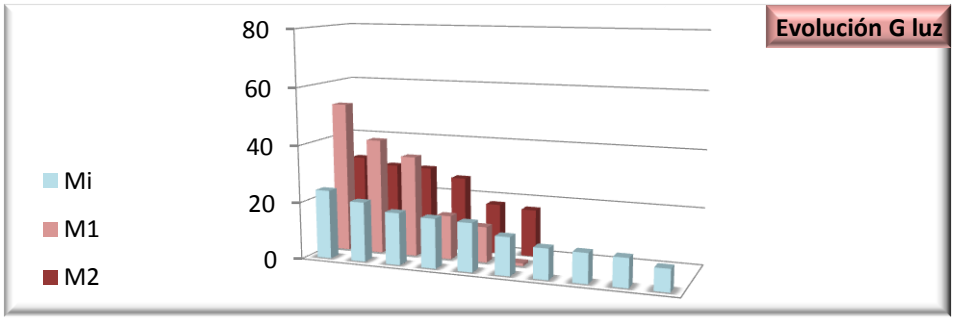


Fig. 179. Porcentaje gonadal de cada uno de los individuos analizados a lo largo del acondicionamiento y sometidos a un gradiente de luz. Mi: muestreo inicial; M1: muestreo 1 (30 días); M2: muestreo 2 (63 días).

En las figuras 176-179 se representan los porcentajes de ocupación gonadal alcanzados por cada uno de los individuos analizados, en los dos muestreos realizados en cada uno de los acondicionamientos, mostrando así la evolución en el desarrollo gonadal en función del acondicionamiento al que eran sometidos. También se muestran los porcentajes de los individuos analizados en el muestreo inicial para que sirvan de referencia del estado gonadal en el que se encontraban al inicio del experimento.

Los individuos que habían sido sometidos a las condiciones ambientales (Figura 176) durante los primeros 30 días de acondicionamiento apenas presentaban cambios en el desarrollo, en el muestreo inicial los individuos analizados tenían unas ocupaciones comprendidas entre 24,07% y 7,74% y a los 30 días las ocupaciones variaban de 31,09% a 5,16%. A los 63 días, en el muestreo 2, los porcentajes de ocupación habían aumentado, cuatro individuos superaban el 40%, llegando un individuo al 62,04%.

En la figura 177 se representan los resultados de ocupación de los individuos acondicionados con 8h de luz que mostraban un gran aumento de la ocupación gonadal en los primeros 30 días de acondicionamiento pasando de porcentajes de 24,07%-7,74% (% GT = 14,95) del muestreo inicial a 54,70%-13,50% (% GT = 36,18); a los 63 días los porcentajes de ocupación de todos los individuos estaban entre 65,35% y 34,66% (% GT = 52,39).

Los individuos acondicionados con 16h de luz (Figura 178) también experimentaban un incremento de ocupación en cada muestreo pero menos notable que el de los de 8h. En el muestreo 1, los porcentajes de ocupación estaban entre 38,89% y 4,83% (% GT = 23,15) y en el muestreo 2 se encontraron porcentajes de ocupación más elevados, casi todos por encima del 30% (% GT = 34,73).

La figura 179 refleja los datos obtenidos con los individuos acondicionados con gradiente de luz y como en estos aumentaban la ocupación gonadal muy rápido, llegando incluso en un individuo al 52,58% y después de 63 días de acondicionamiento sus ocupaciones gonadales habían disminuido (31,35%-16,60%) pero los porcentajes de ocupación de todos los individuos eran bastante homogéneos (d.e = 6,34). En todos los muestreos se encontraron individuos con rastros de haber realizado un desove anteriormente.

La figura 180 muestra los resultados globales obtenidos en el experimento 4, indicando la ocupación gonadal de los progenitores sometidos a cuatro regímenes de acondicionamiento. La gráfica representa el porcentaje de ocupación gonadal por individuo a través de los diferentes muestreos.

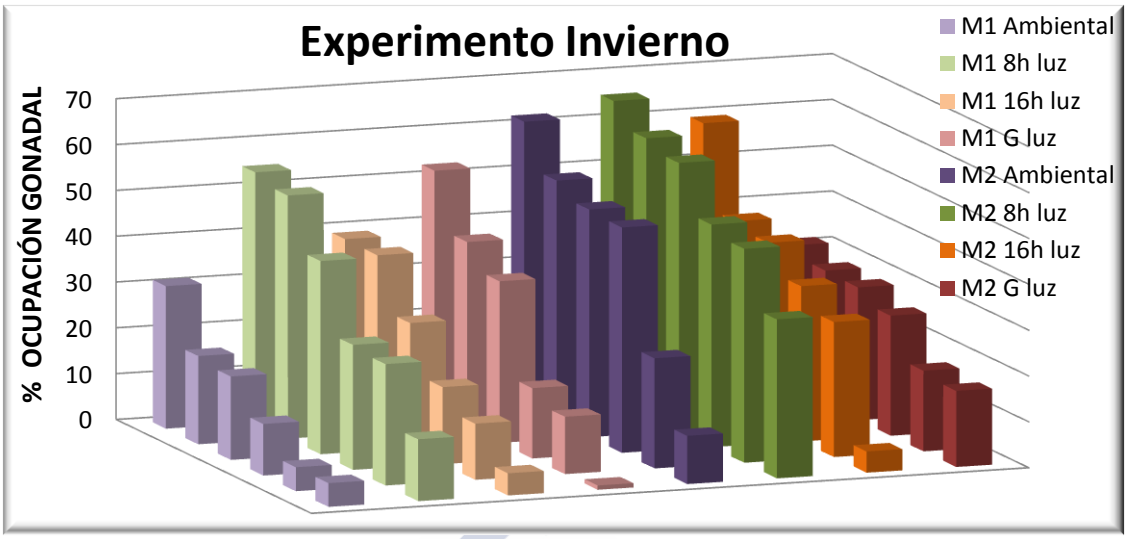


Fig. 1**80.** Porcentaje gonadal medio de ocupación de cada uno de los individuos analizados a lo largo del experimento y sometidos a los cuatro regímenes de acondicionamiento.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4. DESOVES:

Después de 28 días de acondicionamiento, antes de la realización del muestreo 1, se encontraron desoves masivos en los tanques acondicionados con 16h de luz y un día más tarde en los de gradiente de luz.



Fig. 181. Esquema con las fechas de los muestreos realizados y los desoves obtenidos.

Como se puede observar en la tabla 27 y en la figura 182, la luz tuvo un claro efecto sobre la producción larvaria. Los progenitores acondicionados con gradiente de luz mostraban un aumento evidente del número de desoves y de larvas liberadas. Los mejores resultados se obtuvieron claramente con los progenitores acondicionados con el gradiente de luz (8-16 h).

Tabla 27. Fecha de desoves y número de larvas liberadas.

AMBIENTE	8h luz	16h luz	G luz
Ostra con larvas en el muestreo 2	Ostra con larvas en el muestreo 2	Ostra con larvas en el muestreo 2	2 ostras con larvas en el muestreo 2
		30/03/09 1.600.000	
		01/04/09 2.200.000	31/03/09 2.200.000
01/04/09 1.500.000		05/04/09 1.100.000	01/04/09 1.000.000
02/04/09 1.500.000		10/04/09 2.500.000	02/04/09 1.500.000
11/04/09 1.500.000		04/05/09 muestreo	05/04/09 1.200.000
14/04/09 1.200.000	06/04/09 1.500.000		06/04/09 5.000.000
04/05/09 muestreo	07/04/09 1.500.000		07/04/09 1.500.000
	13/04/09 2.700.000		13/04/09 816.000
	14/04/09 1.000.000		14/04/09 2.500.000
	15/04/09 1.000.000		15/04/09 1.480.000
TOTAL 5.700.000 larvas	**TOTAL** 7.700.000 larvas	**TOTAL** 6.400.000 larvas	**TOTAL** 17.196.000 larvas

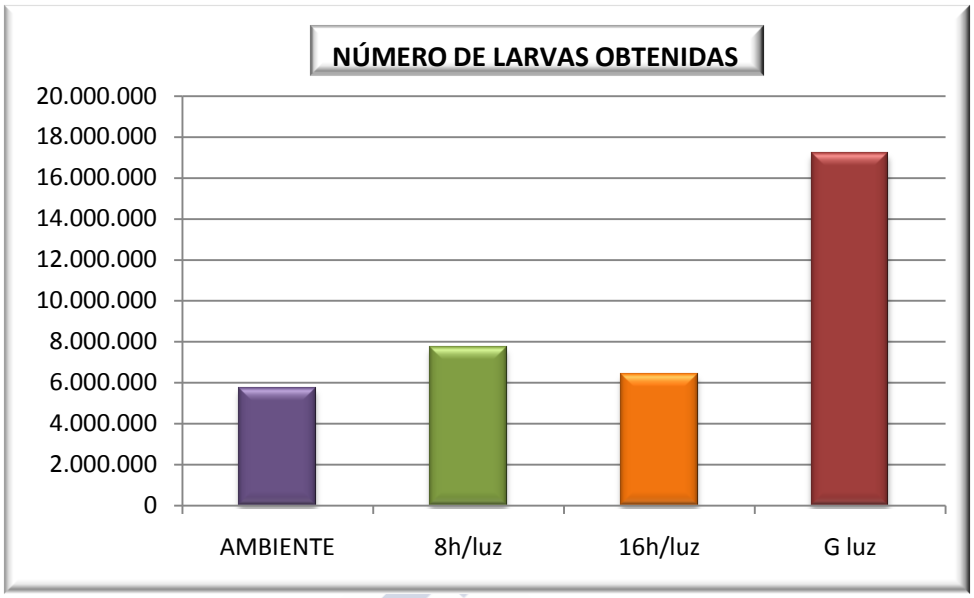


Fig. 182. Número de larvas liberadas en los distintos tipos de acondicionamientos.

5. RESULTADOS ESTADÍSTICA.

El ANOVA de los datos estereológicos realizado mostró diferencias significativas para muestreo y fotoperíodo pero no para la interacción de ambos factores.

Las pruebas PoscHoc desvelaron que las diferencias significativas (p=0,25) se producían entre los fotoperíodos de 8h y GF.

Tabla 28.- Resultados del ANOVA realizado en el Experimento 4, utilizando la variable dependiente Ocup y los factores Muestreo y Fotoperíodo.

Tests of Between-Subjects Effects

Source	Dependent Variable	F	Sig.
Corrected Model	Ocupacion	3.659	.004
Intercept	Ocupacion	211.397	.000
Muestreo	Ocupacion	9.179	.004
Fotoperiodo	Ocupacion	3.774	.018
Muestreo * Fotoperiodo	Ocupacion	1.705	.181
Error	Ocupacion		
Total	Ocupacion		
Corrected Total	Ocupacion		

a. R Squared = .390 (Adjusted R Squared = .284)

Tabla 29.- Resultados del Test de Tukey realizado en el Experimento 4, utilizando la variable dependiente Ocup para el factor Fotoperíodo.

Tukey HSD

Dependent Variable	(I) Fotoperiodo	(J) Fotoperiodo	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
Ocupacion	AMBIENTE	8h	-16.1108	6.32553	.067
		16h	-.7667	6.32553	.999
		GF	2.5958	6.32553	.976
	8h	AMBIENTE	16.1108	6.32553	.067
		16h	15.3442	6.32553	.087
		GF	18.7067*	6.32553	.025
	16h	AMBIENTE	.7667	6.32553	.999
		8h	-15.3442	6.32553	.087
		GF	3.3625	6.32553	.951
	GF	AMBIENTE	-2.5958	6.32553	.976
		8h	-18.7067*	6.32553	.025
		16h	-3.3625	6.32553	.951

EXPERIMENTO 5; EFECTO DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE TEMPERATURA Y FOTOPERÍODO EN INVIERNO.

El objetivo de este experimento fue confirmar los resultados obtenidos en los experimentos anteriores utilizando las condiciones óptimas de fotoperíodo y temperatura para el desarrollo gonadal. Los progenitores en un número de 90 se distribuyeron en 3 bandejas (30 ostras en cada una) y fueron sometidos a un gradiente de luz (8-16h/luz) combinado con un gradiente de temperatura (14-18ºC). Ver apartado 3.1.1 Experimento 5 de Materiales y Métodos.

Este experimento se desarrolló en el criadero de cultivo de moluscos de la Cofradía de San Bartolomé de Noia. Los resultados del experimento se evaluaron de forma directa a través de la determinación del número y fechas de los desoves obtenidos, así como del número de larvas viables liberadas. A continuación, se incluyen así mismo los datos de biometría e histología correspondientes al muestreo inicial.

1. MEDIDAS Y PESOS (BIOMETRÍA):

Muestreo inicial: 20 de Enero

Para determinar el estado gonadal de los progenitores en invierno, al inicio del acondicionamiento, se realizó un muestreo inicial. En este muestreo inicial se recogieron 10 ostras de un total de 100 individuos progenitores recolectados en Punta Cabalo (Boa-Noia) en la Ría de Muros y Noia.

Inicialmente se procedió a medir la longitud y la anchura de cada ejemplar de ostra utilizando un calibre, determinándose que la longitud media era de 7,13 cm y la anchura media era de 7,25 cm.

A continuación, se determinó el peso húmedo de cada individuo utilizando una balanza Mettler® PM300. En la tabla 30 se presentan el peso fresco de la concha, el peso fresco de la vianda, junto con el peso total y el peso medio por individuo determinados en el muestreo inicial

Tabla 30. Peso húmedo de la vianda, de la concha, peso total y peso medio de los progenitores en el muestreo inicial. **Phv** (peso húmedo de la vianda), **Pmv** (peso medio de la vianda), **Phc** (peso húmedo de la concha), **Pt** (peso total de los individuos seleccionados para este muestreo) y **Pmi** (peso medio de cada individuo).

	nº ind.	**Phv** (Peso húmedo vianda)	**Pmv** (Peso medio vianda)	**Phc** (Peso húmedo concha)	**Pt** (Peso total)	**Pmi** (Peso medio individuo)
Muestreo inicial	10	97,22 g	9,72 g	513,14 g	709,82 g	70,98 g

Los 90 individuos restantes se distribuyeron en 3 cubetas plásticas. Aproximadamente pasado un mes desde el inicio del acondicionamiento, el 24 de febrero, se tenía previsto realizar el primer muestreo, lo que no fue posible puesto los progenitores ya habían desovado en su mayoría.

2. RESULTADOS HISTOLOGÍA.

Las preparaciones y el análisis histológico se realizaron de acuerdo con los protocolos descritos en el apartado 3.4 de Materiales y Métodos. A continuación, en la figura 183 se muestran unas imágenes representativas del desarrollo gametogénico de las ostras analizadas en el muestreo inicial, a mediados del mes de Enero. El estudio histológico fue realizado sobre un número de 10 individuos.

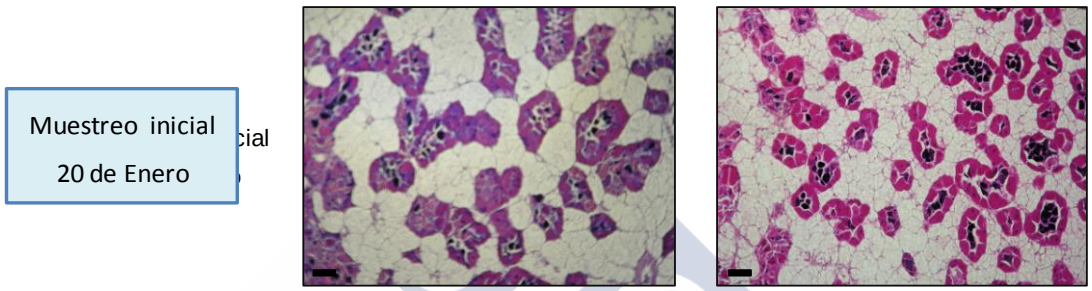


Figura 183. Fotografías de las secciones histológicas más representativas del desarrollo gonadal de los individuos analizados en el muestreo inicial. ▬ Barra: 10 µm.

En las imágenes correspondientes al muestreo inicial se muestra el estado gonadal de los progenitores en invierno. Se aprecian folículos gonadales en distintas etapas de maduración, con ovogonias en las paredes y esperma maduro en el centro en su mayoría, algunos presentaban restos de desoves anteriores.

3. DESOVES.

Aproximadamente pasado un mes desde el inicio del acondicionamiento (Figura 184), se produjeron los primeros desoves procedentes de las ostras acondicionadas con las condiciones óptimas de fotoperíodo y temperatura: gradiente de luz G (8-16h) y gradiente de temperatura (14-18ºC).

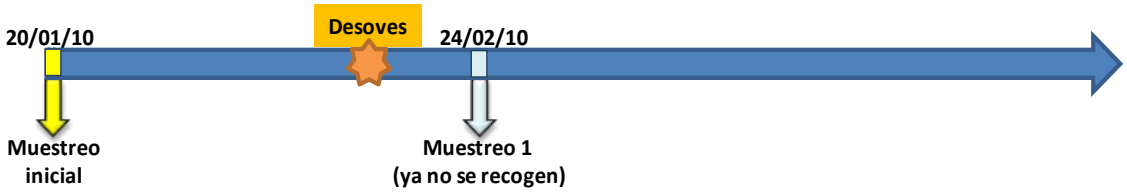


Fig. 184. Esquema que muestra las fechas de los muestreos a realizar y la obtención de los desoves.

En la tabla 31 y en la figura 185 se muestran las fechas de los desoves y el número de larvas liberadas en cada desove, así como el número de larvas totales.

Tabla 31. Fecha de desoves y número de larvas liberadas.

Gradiente de luz y temperatura	
22/02/10	475.000 larvas
04/03/10	2.300.000
07/03	350.000
08/03	2.500.000
09/03	3.500.000
11/03	880.000
14/04	850.000
15/04	900.000
17/04	750.000
19/04	550.000
20/04	1.000.000
21/04	1.200.000
26/04	900.000
27/04	1.000.000
28/04	650.000

TOTAL 16.605.000 larvas

Como se puede observar, los desoves continuaron por un período aproximado de 2 meses con una producción larvaria de más de 16 millones y medio de larvas. Estos resultados confirman los anteriormente obtenidos con los progenitores acondicionados con las mismas condiciones de fotoperíodo y temperatura.

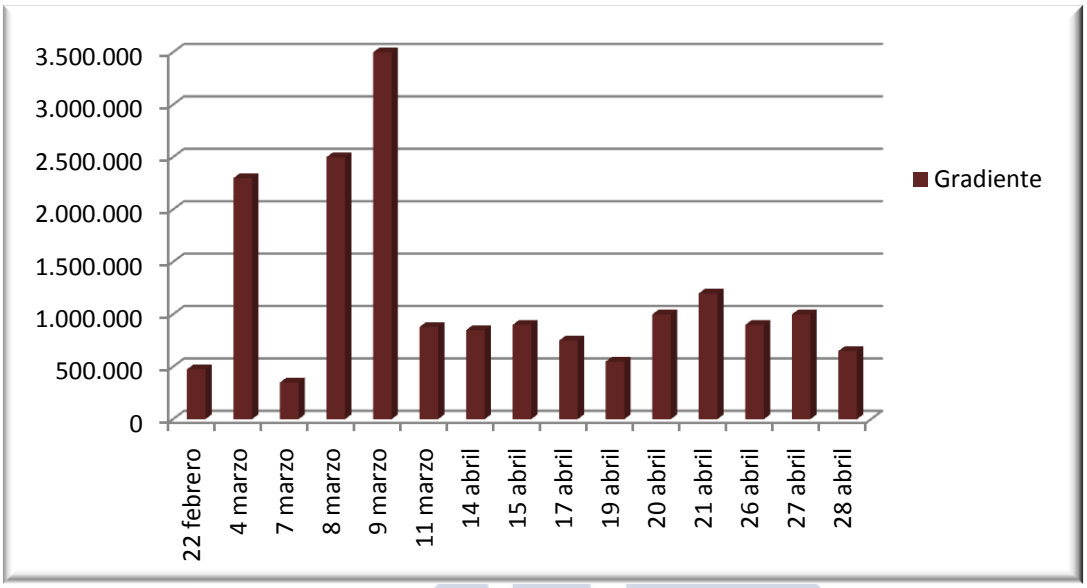


Fig. 185. Fechas de los desoves y cantidad de larvas recuperadas desde el inicio del acondicionamiento.

UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.3 EFECTO DE LA RACIÓN DE ALIMENTO SOBRE EL ACONDICIONAMIENTO DE PROGENITORES DE *OSTREA EDULIS*

EXPERIMENTO 6; EFECTO DE LA RACIÓN DE ALIMENTO EN OTOÑO:

Todos los progenitores fueron sometidos a las mejores condiciones de temperatura y luz, en función de los resultados obtenidos en los anteriores experimentos, es decir, se acondicionaron con un gradiente de temperatura, G (14-18 ^{o}C) y con un gradiente de iluminación, G (8-16 h/luz) pero se diferencian en la ración de alimento que reciben: 3%, 6% y 9%. (Ver apartado 3.1.1 Experimento 6 de Materiales y Métodos).

1. MEDIDAS Y PESOS (BIOMETRÍA):

Muestreo inicial: 30 de Octubre

Para la determinación del estado gonadal de los progenitores en otoño se realizó un muestreo inicial. En este muestreo inicial se escogieron 10 individuos de un total de 280 individuos recogidos en Cambados (Ría de Arousa).

Se midió la longitud y la anchura de cada ejemplar utilizando un calibre, determinándose que la longitud media era de 9,09 cm y la anchura media era de 9,35 cm.

A continuación, se determinó el peso húmedo, en una balanza Mettler® PM300. En la tabla 32 se presentan los pesos frescos de la concha y la vianda, junto con el peso total y el peso medio por individuo.

Tabla 32. Peso húmedo de la vianda, de la concha, peso total y peso medio de los progenitores en el muestreo inicial. **Phv** (peso húmedo de la vianda), **Pmv** (peso medio de la vianda), **Phc** (peso húmedo de la concha), **Pt** (peso total de los individuos seleccionados para este muestreo) y **Pmi** (peso medio de cada individuo).

	nº ind.	**Phv** (Peso húmedo vianda)	**Pmv** (Peso medio vianda)	**Phc** (Peso húmedo concha)	**Pt** (Peso total)	**Pmi** (Peso medio individuo)
Muestreo inicial	10	160,65 g	16,07 g	1053,51 g	1227,46 g	122,75 g

Muestreo 1: 14 días

El primer muestreo fue realizado catorce días después de empezar el acondicionamiento de los progenitores. Los distintos parámetros biométricos se muestran en la Tabla 33.

Tabla 33. Peso húmedo de la vianda, de la concha, peso total y peso medio de los progenitores en el muestreo 1, catorce días después del inicio del acondicionamiento.

	nº ind.	Phv	Pmv	Phc	Pt	Pmi
3%	6	88,20 g	14,70 g	718,24 g	766,80 g	127,80 g
6%	6	90,49 g	15,08 g	721,23 g	837,13 g	139,52 g
9%	6	124,21 g	20,70 g	761,47 g	899,97 g	149,99 g

El peso medio de los individuos analizados a los 14 días era bastante superior que el peso medio por individuo obtenido inicialmente, siendo el Pmi del muestreo inicial de 122,75 g y aumentó en 16 g (6%) y 26 g (9%). El peso medio de la vianda, en cambio, había disminuido en los individuos alimentados con el 3% y 6% y había aumentado casi 5 g en los individuos alimentados con el 9%.

Muestreo 2: 30 días

Al mes de comenzar el acondicionamiento se realizó el segundo muestreo, recogiéndose seis individuos de cada acondicionamiento y determinándose los parámetros biométricos citados anteriormente.

Tabla 34. Peso húmedo de la vianda, de la concha, peso total y peso medio de los progenitores en el muestreo 2, treinta días después del inicio del acondicionamiento.

	nº ind.	Phv	Pmv	Phc	Pt	Pmi
3%	6	108,06 g	18,01 g	780,15 g	871,86 g	145,31 g
6%	6	125,80 g	20,97 g	795,80 g	925,79 g	154,30 g
9%	6	118,15 g	19,69 g	907,64 g	1034,78 g	172,46 g

Se puede observar un aumento grande en el Pmi en los tres acondicionamientos pero más marcado en los individuos acondicionados con el 9% de alimentación. Los Pmv, en cambio, son muy similares en todos los individuos.

Muestreo 3: 74 días

En el tercer muestreo, aproximadamente a los dos meses y medio se recogieron los datos biométricos de seis individuos de cada acondicionamiento.

Tabla 35. Peso húmedo de la vianda, de la concha, peso total y peso medio de los progenitores en el muestreo 2, dos meses y medio después del inicio del acondicionamiento.

	nº ind.	Phv	Pmv	Phc	Pt	Pmi
3%	6	91,92 g	15,32 g	701,63 g	811,26 g	135,21 g
6%	6	103,76 g	17,29 g	721,18 g	840,60 g	140,10 g
9%	5	73,85 g	14,77 g	639,90 g	713,75 g	142,75 g

Se observó una disminución en los pesos medios de los tres acondicionamientos, de casi 30 g en los individuos acondicionados con una ración del 9%. También disminuye mucho el Pmv en los tres acondicionamientos pero era aún más acusado para los del 9%.

2. RESULTADOS DE HISTOLOGÍA.

Las preparaciones y el análisis histológico se realizaron de acuerdo con los protocolos descritos en el apartado 3.4 de Materiales y Métodos. A continuación, en las figuras 186-189 se muestran imágenes representativas del desarrollo gametogénico de las ostras acondicionadas con los diferentes regímenes de alimentación.

Muestreo inicial
30 de Octubre

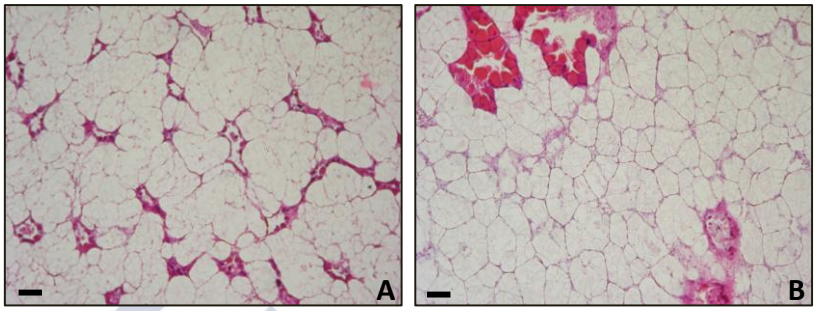


Figura 186. Fotografías de las secciones histológicas más representativas del desarrollo gonadal de los individuos analizados en el muestreo inicial. ▬ Barra: 10 µm.

En el muestreo inicial, el estudio histológico se realizó sobre 10 individuos. Este experimento comenzó en otoño, a finales de Octubre, y como se puede observar en la Figura 186 A en la mayoría de los individuos, la gónada ya se estaba reestructurando y comenzando a formar pequeños folículos que poseían ovogonias en sus paredes, junto con zonas con restos de desoves que estaban siendo reabsorbidos. Uno de los individuos se encontraba con la gónada madura y desovando, Figura 186 B, los folículos estaban formados por ovocitos maduros, con zonas de reabsorción y gran cantidad de hemocitos, junto con grandes zonas en las que únicamente se encontraban células vesiculares.

A los catorce días del inicio del acondicionamiento se analizaron 6 individuos de cada una de las condiciones propuestas: 3%, 6% y 9% y los resultados histológicos se pueden observar en la Figura 187. En cuanto a los del 6%, tres de los individuos se encontraban con ovocitos maduros en la gónada y el resto presentaban folículos pequeños con espermátidas inmaduras y alguna ovogonia en sus paredes. También se encontraron restos de desoves anteriores. Los individuos acondicionados con la ración de alimento del 9% presentaban una gónada menos ocupada en general, las ocupaciones más elevadas eran debidas a restos de desoves anteriores, un individuo como hembra y otro como macho. El resto de individuos tenían el tejido gonadal formado por folículos con espermátidas y ovogonias inmaduras en las paredes.

Lamentablemente, debido a problemas técnicos con el procesamiento de las muestras en la planta de cultivos, no se han podido presentar los resultados de histología de los individuos acondicionados con una ración del 3% de alimento.

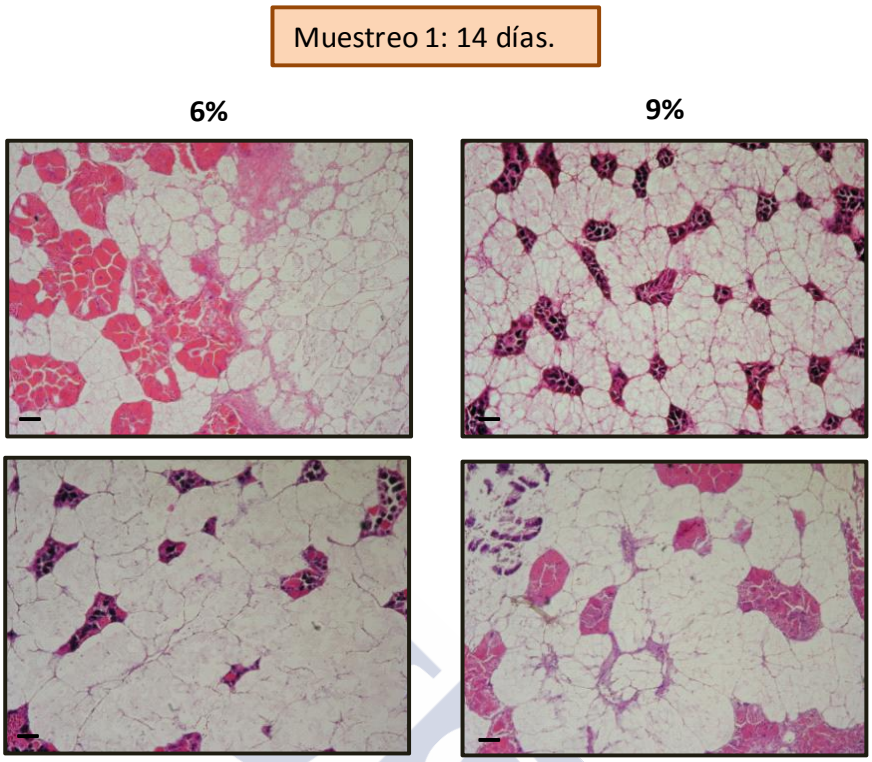


Figura 187. Fotografías de las secciones histológicas más representativas del desarrollo gonadal de los individuos analizados a los 14 días del inicio del acondicionamiento. ⎯ Barra: 10 µm.

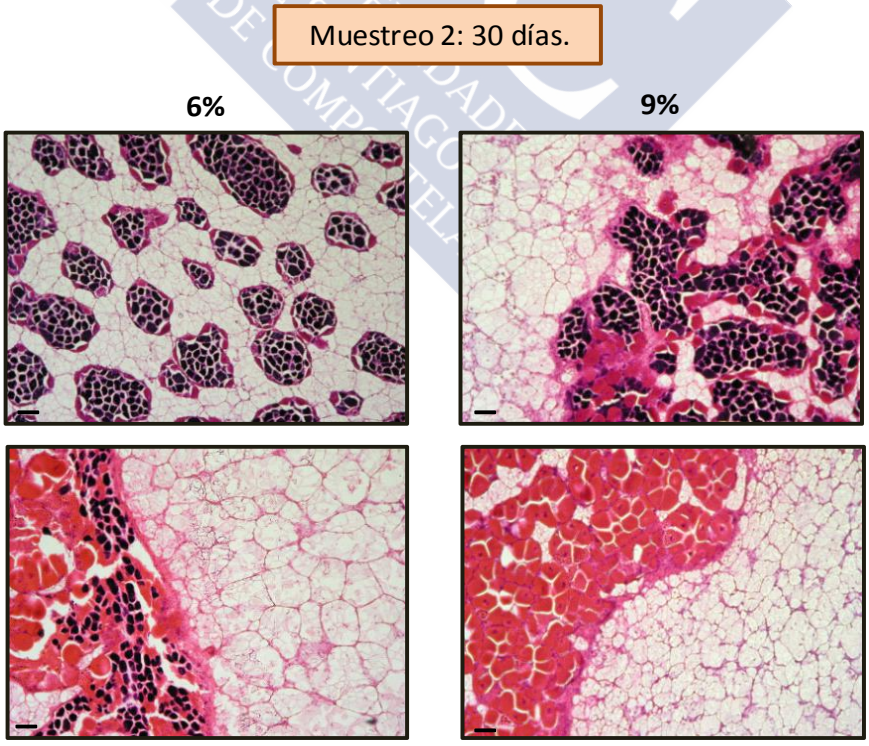


Figura 188. Fotografías de las secciones histológicas más representativas del desarrollo gonadal de los individuos analizados a los 30 días del inicio del acondicionamiento. ⎯ Barra: 10 µm.

En el muestreo 2 (Figura 188) después de 30 días de acondicionamiento, las diferencias son más evidentes. Mientras que los individuos acondicionados con una ración del 6% presentan algunas gónadas maduras, todos los individuos acondicionados con el 9% presentan gónadas con folículos maduros e incluso desovando, con esperma maduro u ovocitos maduros en los conductos o con restos de desoves parciales realizados anteriormente.

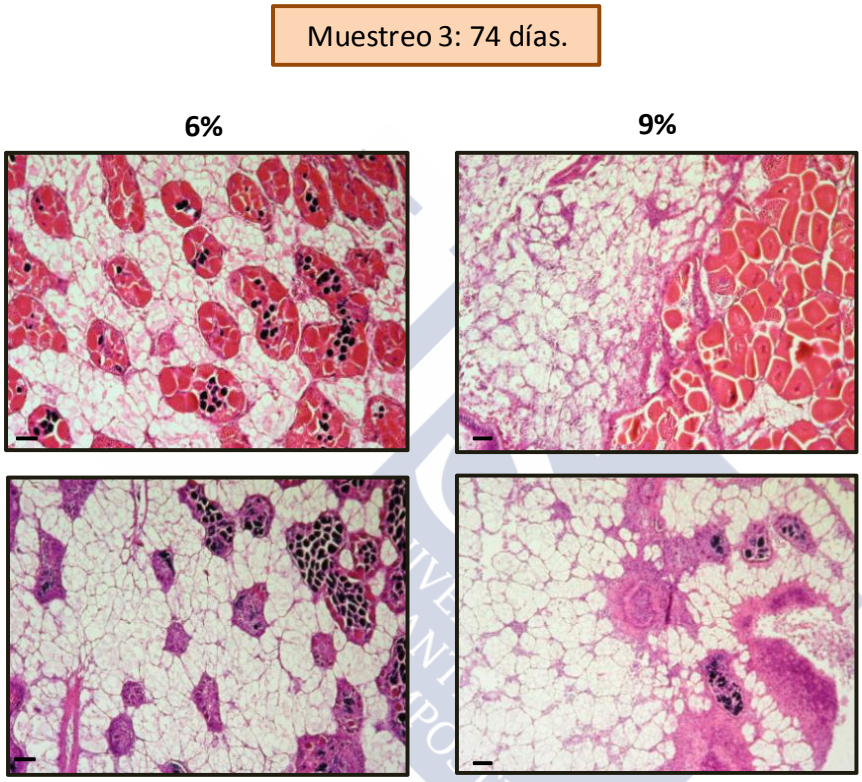


Figura 189. Fotografías de las secciones histológicas más representativas del desarrollo gonadal de los individuos analizados a los 74 días del inicio del acondicionamiento. ▬ Barra: 10 µm.

En el siguiente muestreo, a los dos meses y medio, se puede observar que los individuos acondicionados con una ración del 6% se encontraban en una fase madura y con restos de desoves anteriores y mientras que los del 9% presentaban una gónada muy desorganizada después de la puesta, con células muy maduras pero también con muchos signos de reabsorción y gran cantidad de hemocitos. Los primeros desoves ya se habían recogido aproximadamente un mes antes y se siguieron recogiendo datos de desoves a los largo de todo el mes.

3. RESULTADOS DE ESTEREOLOGÍA: PORCENTAJE DE OCUPACIÓN GONADAL DURANTE EL ACONDICIONAMIENTO.

Las preparaciones histológicas, preparadas previamente, se analizaron mediante métodos de estereología (ver apartado 3.5 de Materiales y Métodos). Para ello se utilizaron un mínimo de seis fotografías correspondientes a cada corte histológico. Por medio del programa Sigma ScanPro se identificaron los distintos tipos celulares del tejido gonadal y se anotó su número: espermátidas y espermatocitos, ovogonias y ovocitos, células vesiculares y otros (hemocitos, tejido muscular, restos de hepatopáncreas, etc.).

El número de células reproductoras masculinas (espermátidas y espermatocitos) se denominó porcentaje de gónada masculina (% Gónada Masculina o % GM), mientras que al conjunto de células reproductoras femeninas (ovogonias y ovocitos) se le designó como porcentaje de gónada femenina (% Gónada Femenina o % GF).

Los datos obtenidos, se presentan en las figuras de la 190 a la 214.

Muestreo inicial: 30 de Octubre

Al inicio del experimento, en otoño, se recogieron 10 individuos y tras su análisis se pudo observar (Figura 190), que de los diez individuos analizados sólo tres superaban el 5% de ocupación femenina (18,72% - 7,87% y 8,07%), debida principalmente a la presencia de ovocitos maduros, y cinco de ellos presentaban una ocupación de gónada femenina inferior al 1%. El porcentaje medio de gónada femenina era, por lo tanto, **% GF** = 4,12 (d.e = 5,98).

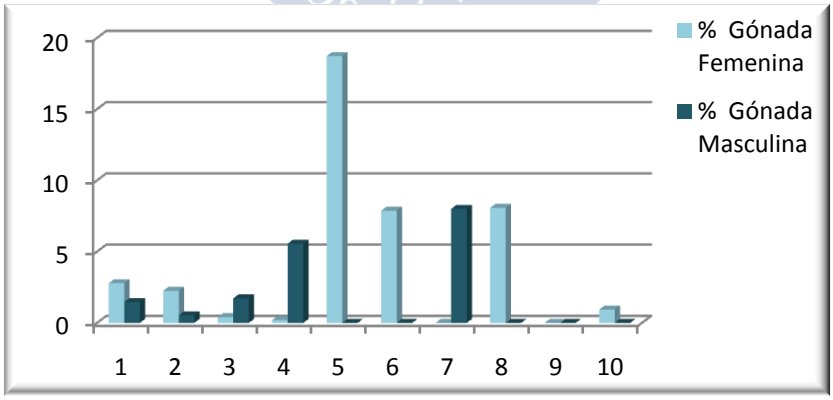


Fig. 190. Porcentajes de ocupación gonadal femenina y masculina en el muestreo inicial (n=10).

En cuanto al porcentaje de gónada masculina, sólo dos de los individuos analizados superaron el 5% de ocupación masculina (5,56% y 8,00%), cinco de ellos no tenían representación alguna de gónada masculina y los tres restantes poseían una ocupación inferior al 2%. **% GM** = 1,73 (d.e = 2,80).

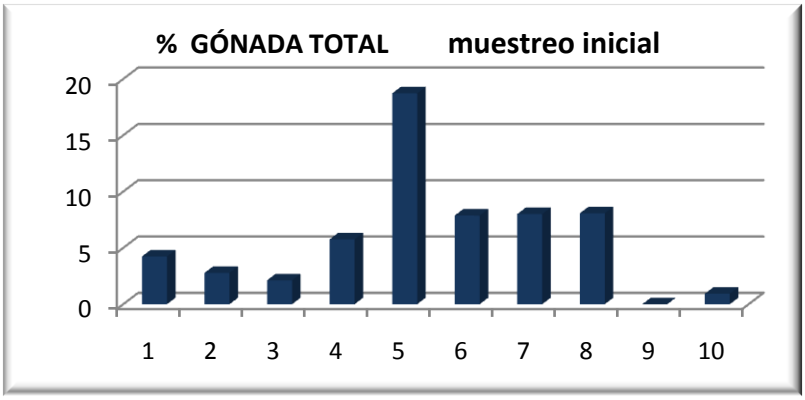


Fig. 191. Porcentajes de ocupación gonadal total en individuos del muestreo inicial (n=10).

Los porcentajes totales de ocupación (Figura 191) en los individuos muestreados al inicio del acondicionamiento eran bajos, sólo uno superaba el 15% (18,72%) y sólo cuatro se encontraban por encima del 5% (5,76% -7,87% - 8,00% y 8,07%). **% GT** = 5,85 (d.e = 5,41).

Muestreo 1: 14 días

6%

A los 14 días desde el inicio del acondicionamiento, se analizaron los porcentajes de ocupación gonadal de seis individuos acondicionados con la ración de alimento del 6% (Figura 192). La gónada femenina estaba presente en cinco de los individuos y destacaban tres porcentajes de ocupación alta (16,07% - 19,05% y 24,34%), encontrándose tres hembras bastante maduras con ovocitos maduros y signos de desove. **% GF** = 10,46 (d.e = 10,61). La presencia de ocupación masculina no era destacable salvo en un individuo (10,85%), cuatro se encontraban por debajo del 2% y uno con 3,97% de ocupación masculina. **% GM** = 2,84 (d.e = 4,17).

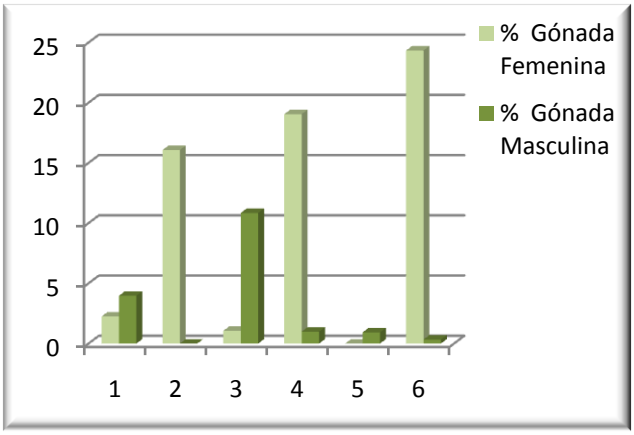


Fig. 192. Porcentajes de ocupación gonadal femenina y masculina de los individuos acondicionados con el 6% durante 14 días (n=6).

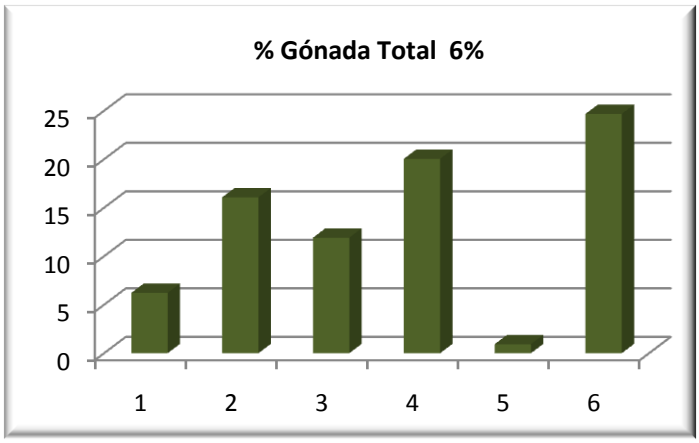


Fig. 193. Porcentajes de ocupación gonadal total de los individuos acondicionados con el 6% durante 14 días (n=6).

Se puede observar en la figura 193 que el porcentaje total de ocupación de la gónada difiere mucho entre los individuos, tres de ellos superaban el 15% de ocupación (16,07% - 20,04% y 24,67%), otro alcanzaba el 11,91% de ocupación, otro se encontraba con el 6,22% y un individuo estaba vacío con pocos restos de desove masculino (0,93%). Así, la ocupación total media era: **% GT** = 13,30 (d.e = 8,80).

9%

Entre los individuos acondicionados con una ración de alimento del 9% durante 14 días, cuatro apenas presentaban desarrollo gonadal femenino (tenían una ocupación femenina inferior al 1%), y dos mostraban una ocupación bien diferente, 1,92% y 14,09%. La media de ocupación femenina era, **% GF** = 2,94 (d.e = 5,50). La ocupación masculina sólo se podía observar en cuatro de los individuos analizados con ocupaciones que variaban entre 4,10% y 11,71%. **% GM** = 5,20 (d.e = 4,72).

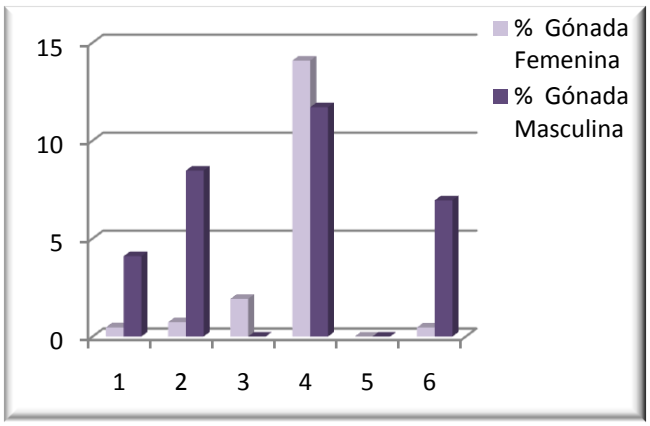


Fig. 194. Porcentajes de ocupación gonadal femenina y masculina de los individuos acondicionados con el 9% durante 14 días (n=6).

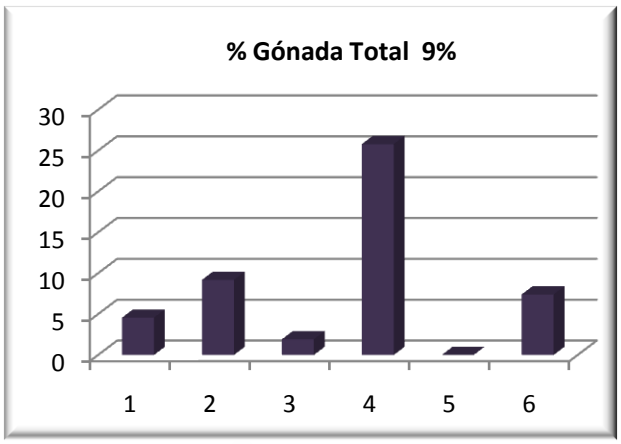


Fig. 195. Porcentajes de ocupación gonadal total de los individuos acondicionados con el 9% durante 14 días (n=6).

Al observar las ocupaciones totales medias de cada individuo analizado (Figura 195), destacaba el porcentaje de ocupación del 25,80% de uno de los individuos, otro se encontraba completamente vacío y otro con muy poca ocupación (1,92%) y los tres restantes presentaban una ocupación de 4,57% - 9,19% y 7,41%. Así: **% GT** = 8,15 (d.e = 9,29).

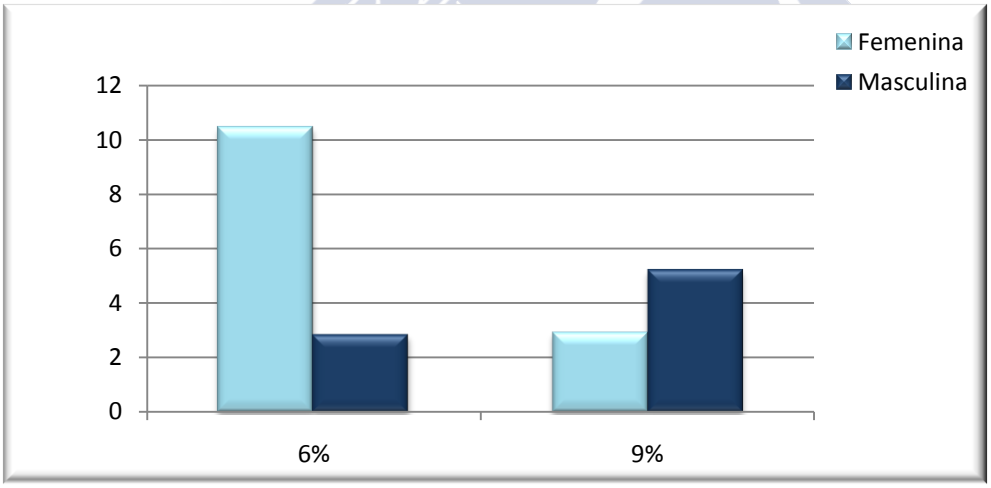


Fig. 196. Porcentajes medios de ocupación gonadal femenina y masculina para los dos tipos de acondicionamiento después de 14 días.

Los individuos analizados a los 14 días del inicio del acondicionamiento mostraban, por regla general, unas ocupaciones gonadales bajas pero se podía observar (Figura 196) que los individuos acondicionados con una ración del 6% de alimento presentaban una ocupación femenina cuatro veces superior a la ocupación masculina y en los individuos acondicionados con una ración del 9% la ocupación masculina era superior a la femenina.

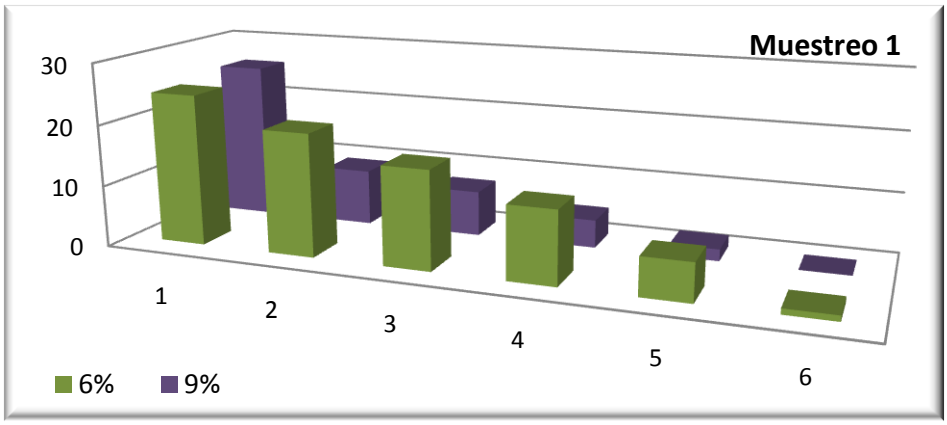


Fig. 197. Porcentaje gonadal medio de ocupación de cada uno de los individuos analizados a los 14 días y sometidos a dos condiciones de alimentación diferentes.

En la figura 197 se pueden observar los porcentajes de ocupación gonadal de cada individuo sometido a acondicionamiento con unas raciones de alimento de 6% y 9% y aunque el porcentaje más elevado perteneciese a los individuos acondicionados con una ración del 9% (25,80%), se podría decir que, en general, los porcentajes más elevados corresponden con los individuos acondicionados con el 6% (24,67% - 20,04% - 16,07% - 11,91% - 6,21% - 0,92%) si se comparan con los de 9% (9,19% - 7,41% - 4,57% - 1,93% y 0%). Siendo la media de ocupación más elevada en el 6% frente al 9% (13,30% y 8,15%, respectivamente) y la desviación estándar también era menor: 8,80 en el 6% frente a 9,29 en el 9%.

Muestreo 2: 30 días

6%

En la figura 198 se muestran los seis individuos analizados a los 30 días de comenzar el acondicionamiento y que estaban sometidos a una ración de alimento del 6%. El porcentaje de ocupación femenina era muy bajo, sólo se encontraban dos individuos con unos porcentajes relevantes: 15,08% y 8,99%. En cambio, la gónada masculina estaba presente en todos los individuos y en cuatro presentaba unos valores elevados: 21,30% - 21,63% - 25,13% y 41,21%. Así:

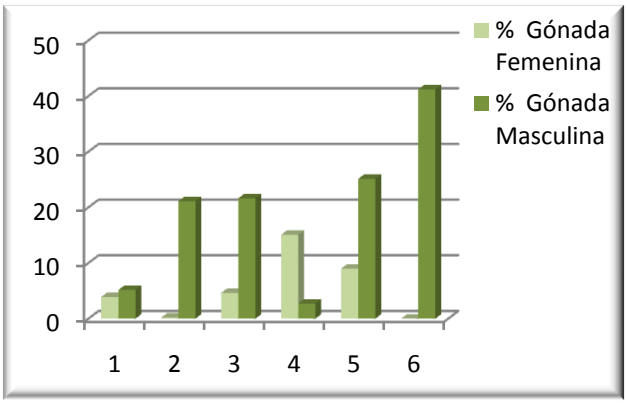


Fig. 198. Porcentajes de ocupación gonadal femenina y masculina de los individuos acondicionados con el 6% durante 30 días (n=6).

% GF = 5,47 (d.e = 5,76).

% GM = 19,49 (d.e = 14,12).

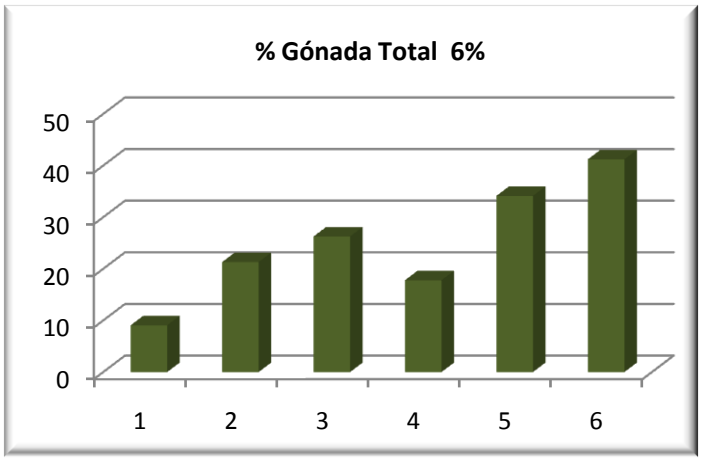


Fig. 199. Porcentajes de ocupación gonadal total de los individuos acondicionados con el 6% durante 30 días (n=6).

Cuando se comprobaron los resultados del porcentaje de ocupación gonadal total (Figura 199) cuatro de los individuos presentaban un porcentaje de ocupación superior al 20% (21,30% - 26,26% - 34,13% y 41,21%) y otro estaba muy cercano (17,79%), el individuo con menor ocupación gonadal presentaba un 9,06%. Así, que se encontró una ocupación gonadal total media bastante elevada, **% GT** = 24,96 (d.e = 11,55).

9%

Al analizar los individuos acondicionados con el 9% de ración de alimento (Figura 200) se encontraron unos porcentajes de ocupación gonadal más elevados que los de los individuos del 6%. La ocupación femenina era alta en cuatro individuos: 26,26% - 41,14% - 35,39% y 14,35%; en otro era mucho más baja (3,64%) y en el otro no estaba presente la gónada femenina. **% GF** = 20,13 (d.e = 16,87). Con respecto a la ocupación por gónada masculina, cinco de los individuos presentaban unos porcentajes bastante altos, destacando sobre todo dos de ellos (15,54% - 8,73% - 11,91% - 33,80% y 37,30%), estos altos porcentajes se debían a mórulas de esperma maduro que estaban desovando o muy próximos al desove. **% GM** = 38,17 (d.e = 10,26).

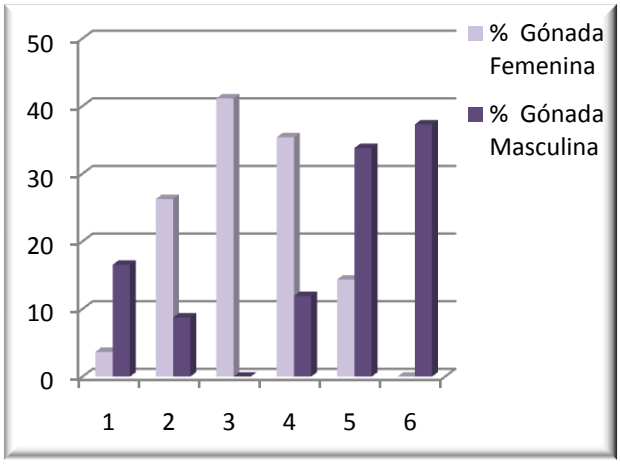


Fig. 200. Porcentajes de ocupación gonadal femenina y masculina de los individuos acondicionados con el 9% durante 30 días (n=6).

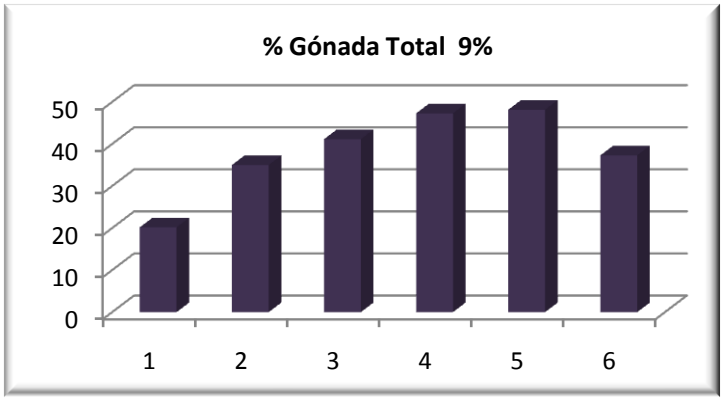


Fig. 201. Porcentajes de ocupación gonadal total de los individuos acondicionados con el 9% durante 30 días (n=6).

Los porcentajes de ocupación total de los individuos acondicionados con el 9% y analizados a los 30 días (Figura 201) eran todos superiores al 20% (20,17% - 34,99% - 41,14% - 47,29% - 48,15% y 37,30%). Son los porcentajes más altos encontrados hasta el momento en este experimento. El porcentaje de ocupación total era también más elevado alcanzando el valor de 38,17%. **% GT** = 38,17 (d.e = 10,26).

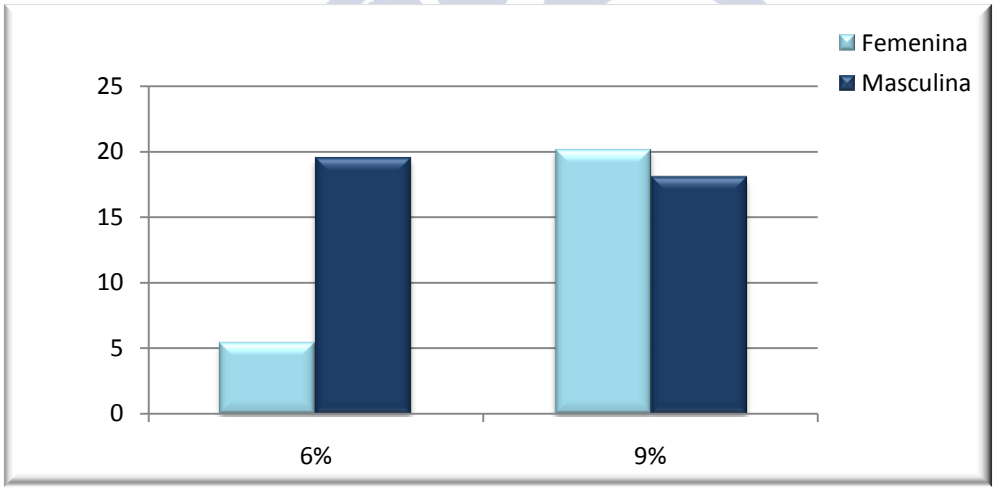


Fig. 202. Porcentajes medios de ocupación gonadal femenina y masculina para los dos tipos de acondicionamiento después de 30 días.

Después de 30 días de acondicionamiento, los porcentajes de ocupación femenina y masculina habían aumentado en ambos tipo de acondicionamiento. Los individuos acondicionados con el 6% de ración de alimento poseían un porcentaje de ocupación masculina casi cuatro veces superior a la ocupación por gónada femenina. Mientras, los individuos acondicionados con el 9% de ración de alimento poseían unos porcentajes de ocupación masculina y femenina muy similares.

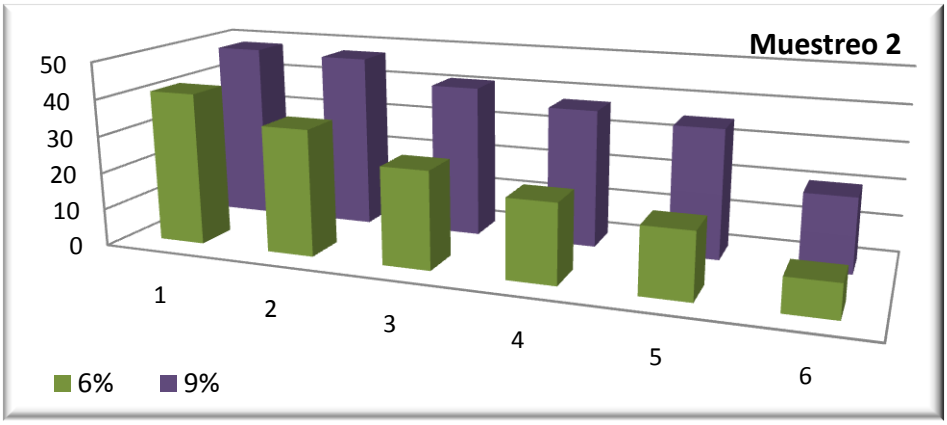


Fig. 203. Porcentaje gonadal medio de ocupación de cada uno de los individuos analizados a los 30 días y sometidos a dos condiciones de alimentación diferentes.

La figura 203 muestra los porcentajes de ocupación gonadal después de 30 días de acondicionamiento y se puede observar que todos los individuos tenían la gónada mucho más desarrollada que en el muestreo anterior y que los individuos acondicionados con el 9% de ración de alimento presentaban una mayor ocupación gonadal.

Muestreo 3: 74 días

6%

Como se muestra en la figura 204, los individuos acondicionados con una ración del 6% de alimento durante 74 días mostraban unos porcentajes altos tanto de gónada masculina como femenina, excepto uno que presentaba la gónada vacía, sólo formada por células vesiculares. En tres de los individuos destaca la alta ocupación femenina (20,37% - 18,39% y 11,11%), los otros dos mostraban una ocupación femenina del 7,41% y 4,10%. **% GF** = 10,23 (d.e = 8,00). En cuanto a la ocupación masculina, era superior al 5% en todos los individuos (13,10% - 15,54% - 15,21% - 11,24% y 5,62%). **% GM** = 10,12 (d.e = 6,13).

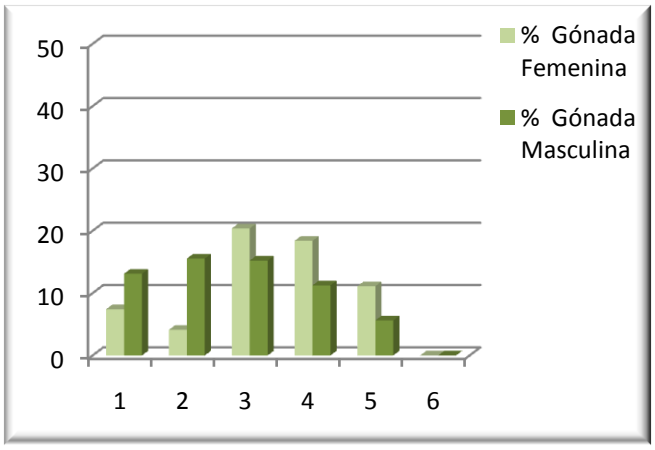


Fig. 204. Porcentajes de ocupación gonadal femenina y masculina de los individuos acondicionados con el 6% durante 74 días (n=6).

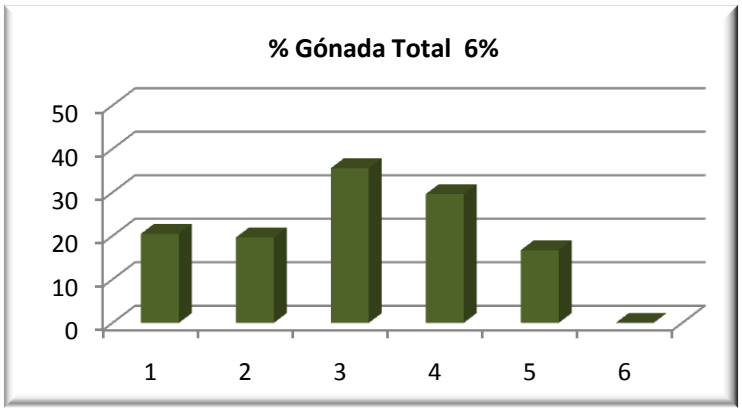


Fig. 205. Porcentajes de ocupación gonadal total de los individuos acondicionados con el 6% durante 74 días (n=6).

Cuando se representaron los datos referidos a la ocupación gonadal total, salvo el individuo que presentaba la gónada vacía, todos los individuos presentaban unas ocupaciones gonadales superiores al 15% (20,50% - 19,65% - 35,59% - 29,63% y 16,73%) y todos mostraban signos de estar desovando o de desoves parciales anteriores. **% GT** = 20,35 (d.e = 12,21).

9%

En la figura 206 se puede observar que existía un mayor número de individuos con alto porcentaje de ocupación por gónada femenina que masculina. Los porcentajes de ocupación femenina superaban el 15% (21,36% - 25,20% - 17,26% y 40,81%), salvo un individuo que no presentaba ocupación femenina. **% GF** = 20,93 (d.e = 14,71). La ocupación masculina era muy baja, sólo uno superaba el 5% (5,09%), dos individuos rondaban el 2% (2,85% y 2,18%) y los dos restantes no presentaban ocupación masculina alguna. **% GM** = 2,02 (d.e = 2,14).

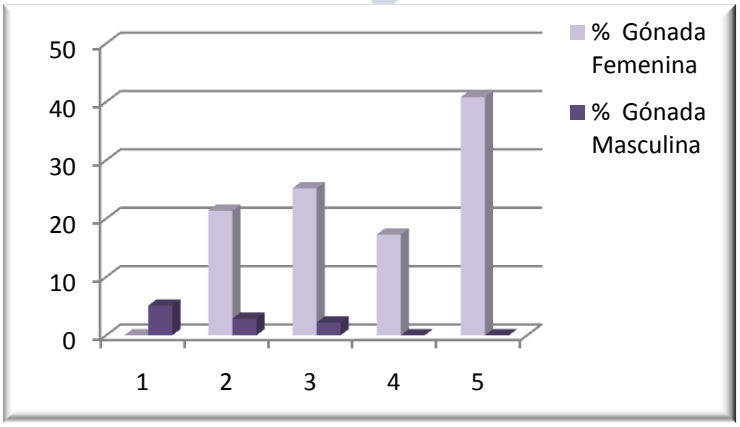


Fig. 206. Porcentajes de ocupación gonadal femenina y masculina de los individuos acondicionados con el 9% durante 74 días (n=6).

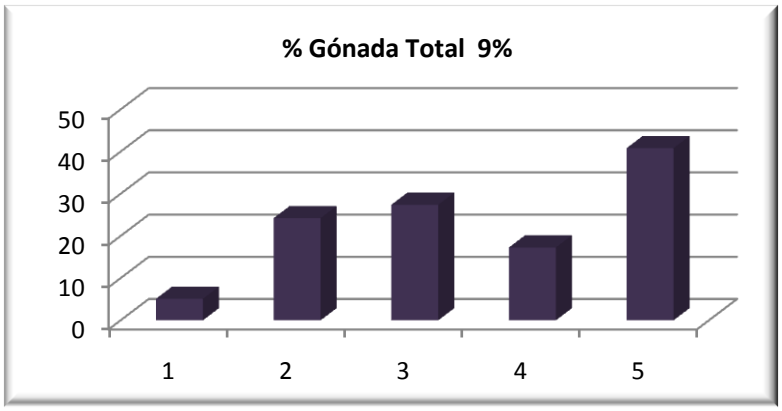


Fig. 207. Porcentajes de ocupación gonadal total de los individuos acondicionados con el 9% durante 74 días (n=6).

Los porcentajes de ocupación total de los cinco individuos analizados (Figura 207) se debían sobre todo a la ocupación gonadal femenina. Los porcentajes obtenidos fueron: 5,09% - 24,21% - 27,38% 17,26% y 40,81%. Siendo el porcentaje medio de ocupación gonadal total para este acondicionamiento: **% GT** = 22,95 (d.e = 13,15).

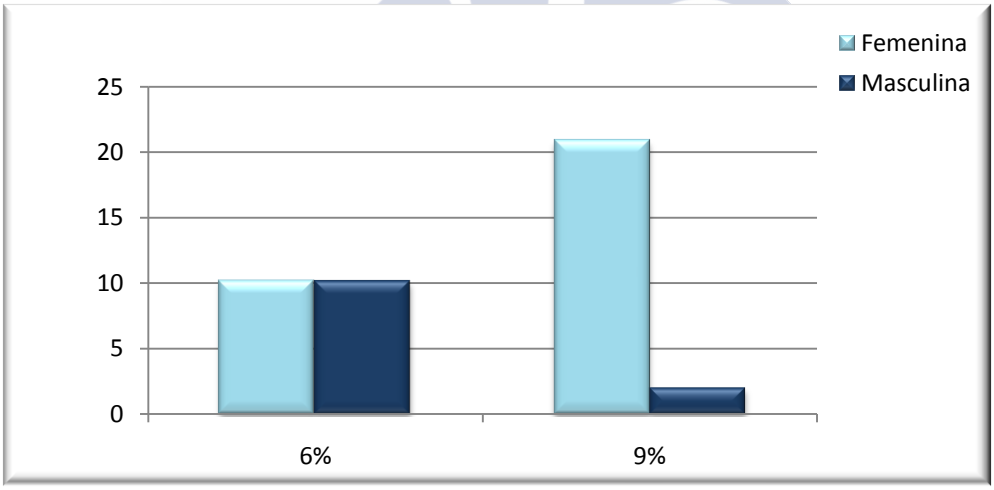


Fig. 208. Porcentajes medios de ocupación gonadal femenina y masculina para los dos tipos de acondicionamientos después de 74 días.

Después de 74 días de acondicionamiento (Figura 208), la gónada estaba formada mayoritariamente por ovogonias y ovocitos. En los individuos acondicionados con el 6% de ración de alimento los porcentajes de ocupación masculina y femenina son casi iguales (10,23% GF y 10,12% GM). En cambio, en los individuos acondicionados con el 9% se ve claramente que la ocupación femenina era muy superior a la masculina (20,93% GF y 2,02% GM).

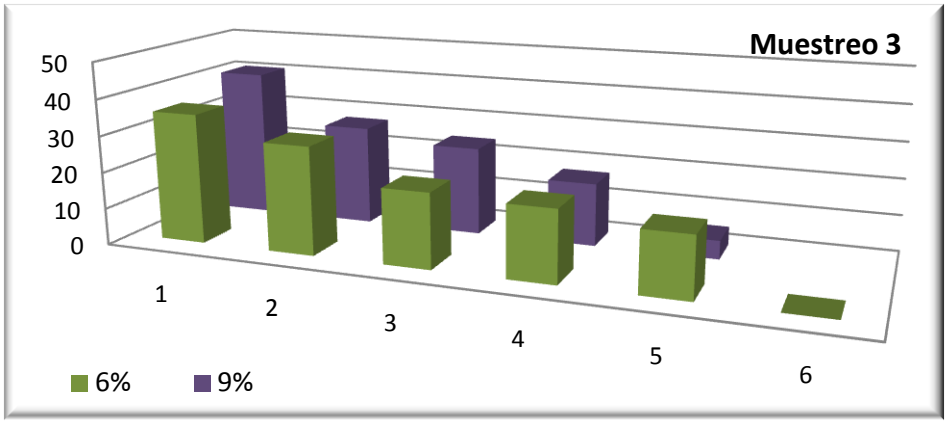


Fig. 209. Porcentaje gonadal medio de ocupación de cada uno de los individuos analizados a los 74 días y sometidos a las dos condiciones de alimentación diferentes.

A los 74 días desde el inicio del acondicionamiento, los porcentajes de ocupación gonadal de los individuos de ambos tipos de acondicionamiento (Figura 209) eran bastante similares. Las ocupaciones gonadales con la ración de alimento del 6% eran: 35,59% - 29,63% - 20,50% - 19,65% y 16,73% y las obtenidas con la ración de alimento del 9% eran: 40,81% - 27,38% - 24,21% - 17,26% y 5,09%. Incluso las medias (20,35 y 22,95) y las desviaciones (12,21 y 13,15) eran muy similares.

En las figuras 210 y 211 se puede observar la evolución de los individuos acondicionados con las diferentes raciones de alimento a lo largo del acondicionamiento.

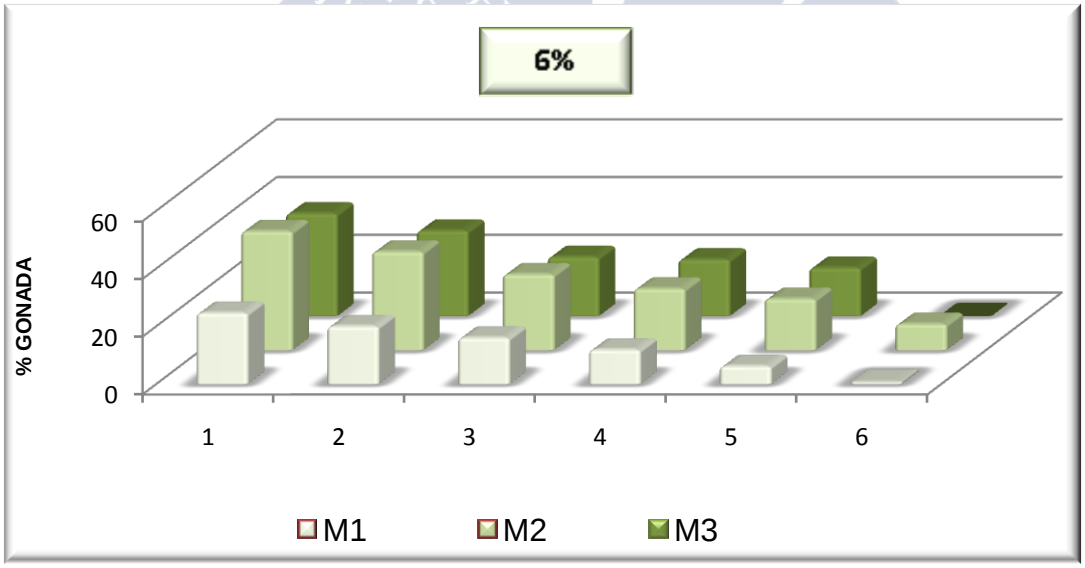


Fig. 210. Porcentaje gonadal de cada uno de los individuos analizados a lo largo del acondicionamiento y acondicionados con una ración de alimento del 6%. (M1=muestreo 1; M2=muestreo 2; M3=muestreo 3)

Los individuos acondicionados con una ración de alimento del 6% (Figura 210) mostraban un aumento en el porcentaje de ocupación gonadal en el muestreo 2 con respeto al muestreo 1, con sólo 15 días de diferencia entre ellos y variando en el muestreo 1 de 24,67% a

0,93% y en el muestreo 2 de 41,21% a 9,06%. Los porcentajes de ocupación en el muestreo 3 mostraban un descenso en la ocupación gonadal pero con porcentajes más homogéneos entre los individuos analizados (35,59% a 16,73%), salvo uno de ellos que se encuentra completamente vacío.

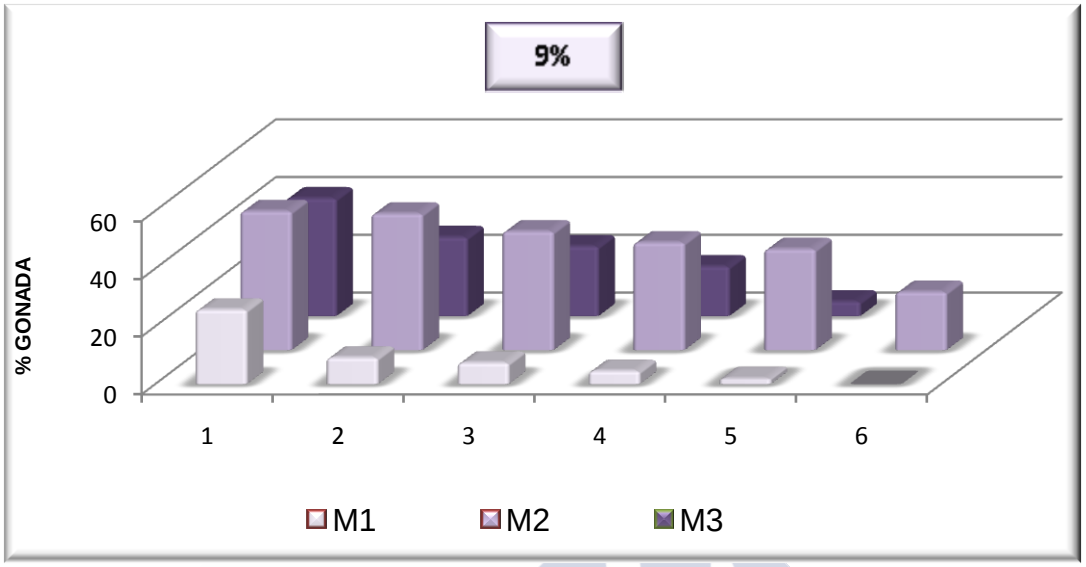


Fig. 211. Porcentaje gonadal de cada uno de los individuos analizados a lo largo del acondicionamiento y acondicionados con una ración de alimento del 9%. (M1=muestreo 1; M2=muestreo 2; M3=muestreo 3)

En cuanto a los individuos acondicionados con una ración de alimento del 9% (Figura 211) se observa que partían de porcentajes de ocupación menores en el muestreo 1 (9,19% a 0%, salvo un individuo que destacaba con el 25,8%) y presentaban un gran aumento en la ocupación gonadal tras 16 días de acondicionamiento (entre 48,15% y 20,17%). A los 74 días de acondicionamiento también presentaban un descenso en la ocupación gonadal (40,81% - 5,09%).

En las figuras 212 y 213 se comparan los porcentajes medios de ocupación gonadal de los individuos analizados en cada uno de los muestreos en los distintos acondicionamientos. Los individuos acondicionados con una ración de alimento del 6% mostraban una progresión hasta llegar al muestreo 3, donde disminuía ligeramente la ocupación gonadal (5,85% Mi - 13,30% M1 - 24,96% M2 y 20,35% M3). Los individuos acondicionados con una ración del 9% presentaban una progresión similar pero el desarrollo gonadal era más lento en un principio y en el muestreo 2 mostraba un gran aumento y como en el caso anterior, en el muestreo 3 volvía disminuir la ocupación gonadal (5,85% Mi - 8,15% M1 - 38,15% M2 y 22,95% M3).

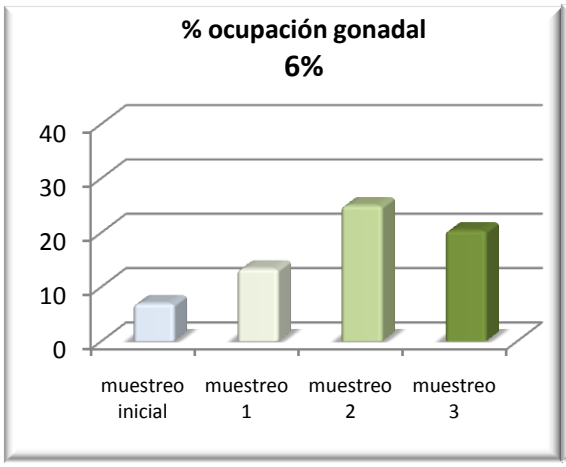


Fig. 212. Porcentaje medio de ocupación gonadal de los individuos analizados en cada muestreo y acondicionados con una ración del 6% de alimento.

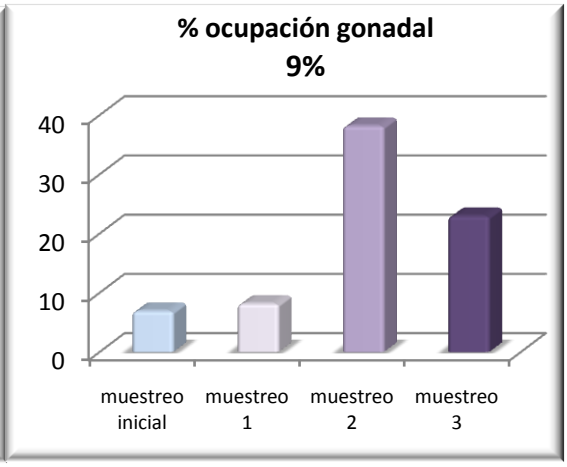


Fig. 213. Porcentaje medio de ocupación gonadal de los individuos analizados en cada muestreo y acondicionados con una ración del 9% de alimento.

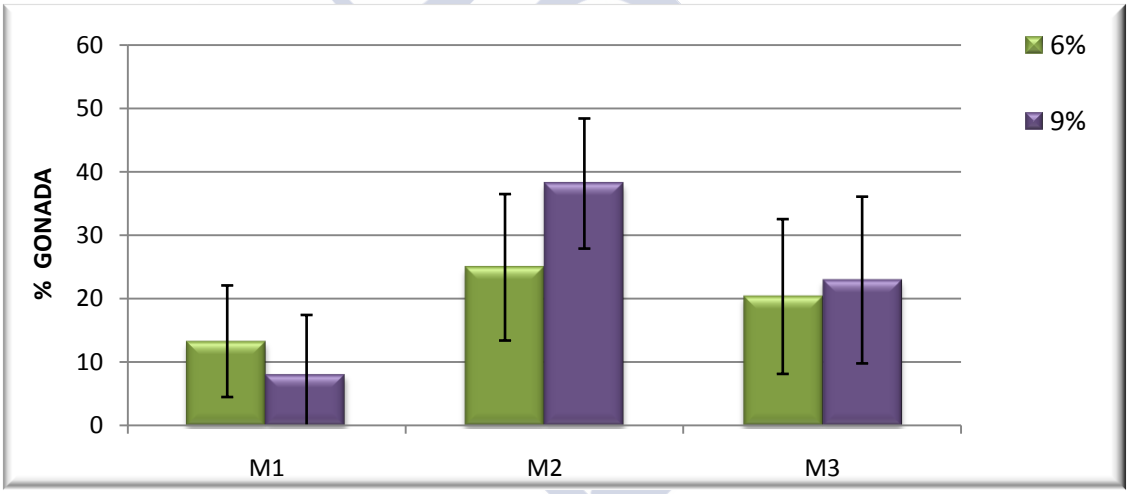


Fig. 214. Porcentajes medios de ocupación de los individuos sometidos a los diferentes acondicionamientos a lo largo de todo el experimento. Se pueden ver las desviaciones estándar. (M inicial=muestreo inicial; M1=muestreo 1; M2=muestreo 2)

En la figura 214 se muestran los porcentajes medios de ocupación gonadal, al igual que en las anteriores, pero en esta figura se ven enfrentados y con sus desviaciones estándar, siendo estos valores para los individuos acondicionados con una ración del 6%: 8,8 M1 - 11,55 M2 - 12,21 M3 y para los individuos con una ración del 9%: 9,29 M1 - 10,26 M2 - 13,15 M3.

4. DESOVES.

Una vez acondicionados los individuos y analizados los porcentajes de ocupación gonadal de cada uno de los individuos acondicionados, se encontraron desoves masivos a mediados del mes de diciembre, tras 48 y 50 días de acondicionamiento con una alimentación del 6% y 9%, respectivamente. Previamente se habían encontrado pequeños desoves parciales en los tanques. A los 74 días desde el inicio del acondicionamiento se realizó otro muestreo para comprobar el estado del tejido gonadal de los individuos acondicionados, tras los desoves masivos recogidos. Los individuos acondicionados con una ración de alimento del 3% tardaron 1 mes más en desovar.

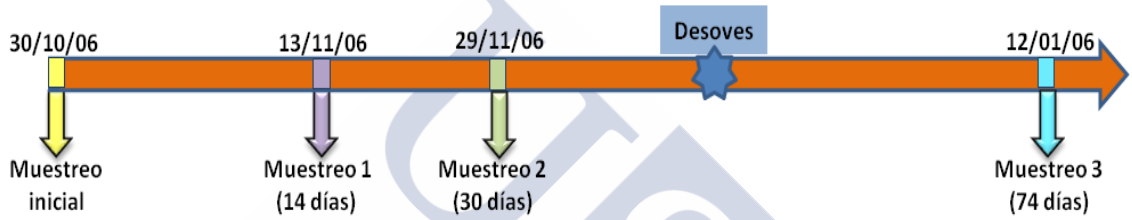


Fig. 215. Esquema que muestra las fechas de los muestreos realizados y la obtención de los desoves.

Tabla 36. Fecha de desoves y número de larvas liberadas.

3%		6%		9%	
		17/12/06	500.000 larvas		
		22/12/06	3.500.000	19/12/06	500.000 larvas
		25/12/06	2.500.000	23/12/06	5.000.000
		06/01/07	3.000.000	04/01/07	3.700.000
		08/01/07	1.500.000	08/01/07	9.200.000
12/01/07	3.600.000	09/01/07	4.000.000		
TOTAL:	3.600.000 larvas	TOTAL:	15.000.000 larvas	TOTAL:	18.000.000 larvas

Los resultados muestran una diferencia clara en el número de desoves y el número de larvas producidas en el caso de los progenitores acondicionados con las dietas con una ración de alimento más alta (Tabla 36). No existían diferencias significativas entre el número de larvas obtenidas con las raciones de alimento del 6% y 9% (Figura 216). Sin embargo, cuando se analizan los resultados de mortalidad de los progenitores se encontró que ésta era muy superior en las ostras acondicionadas con el 9% probablemente relacionada con el aumento de la producción de pseudoheces observada en dicho acondicionamiento y que va asociada con el aumento de la población bacteriana (Figura 217).

Los progenitores fueron mantenidos en las cubetas durante un mes más durante el que no se observaron más desoves.

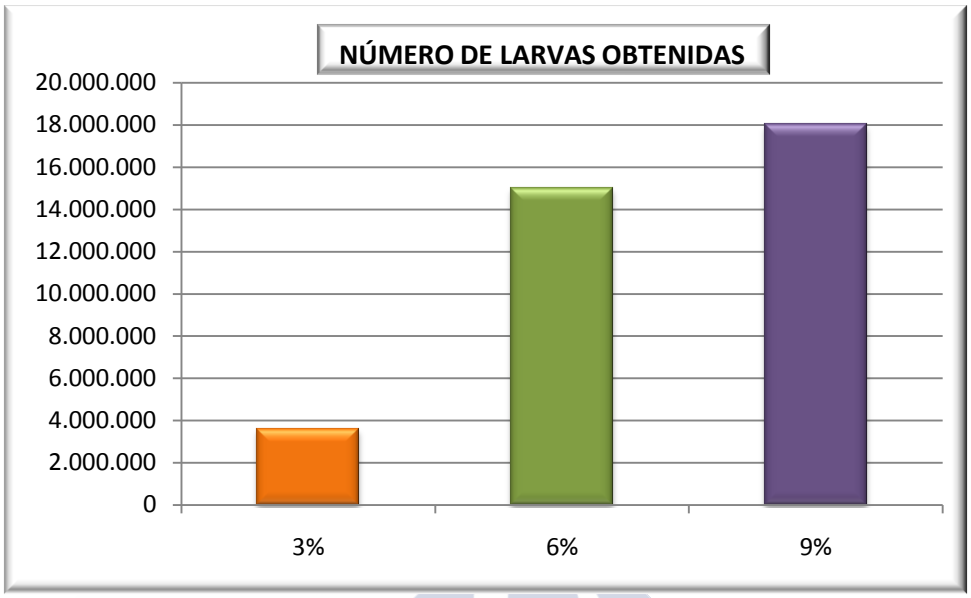


Fig. 216. Número de larvas liberadas en los distintos tipos de acondicionamientos.

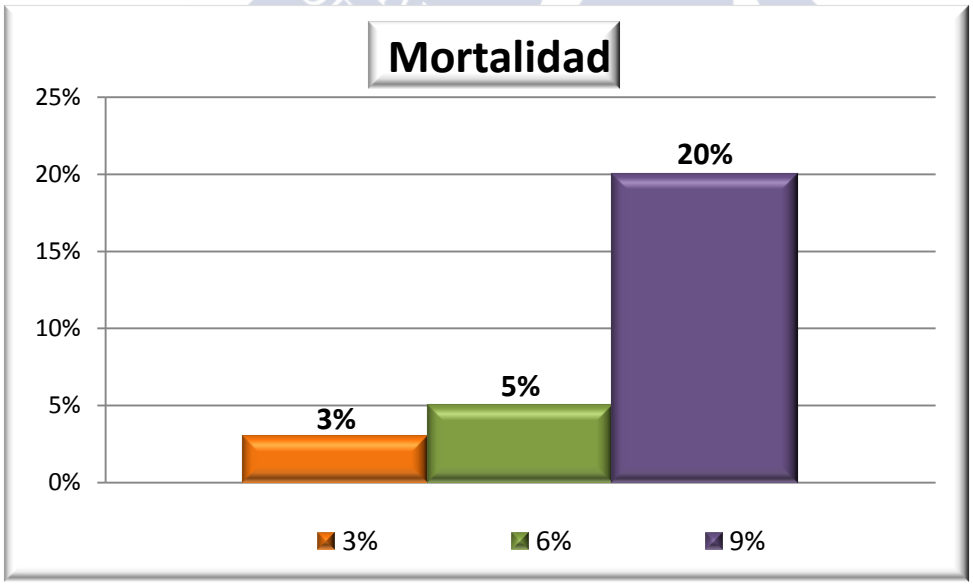
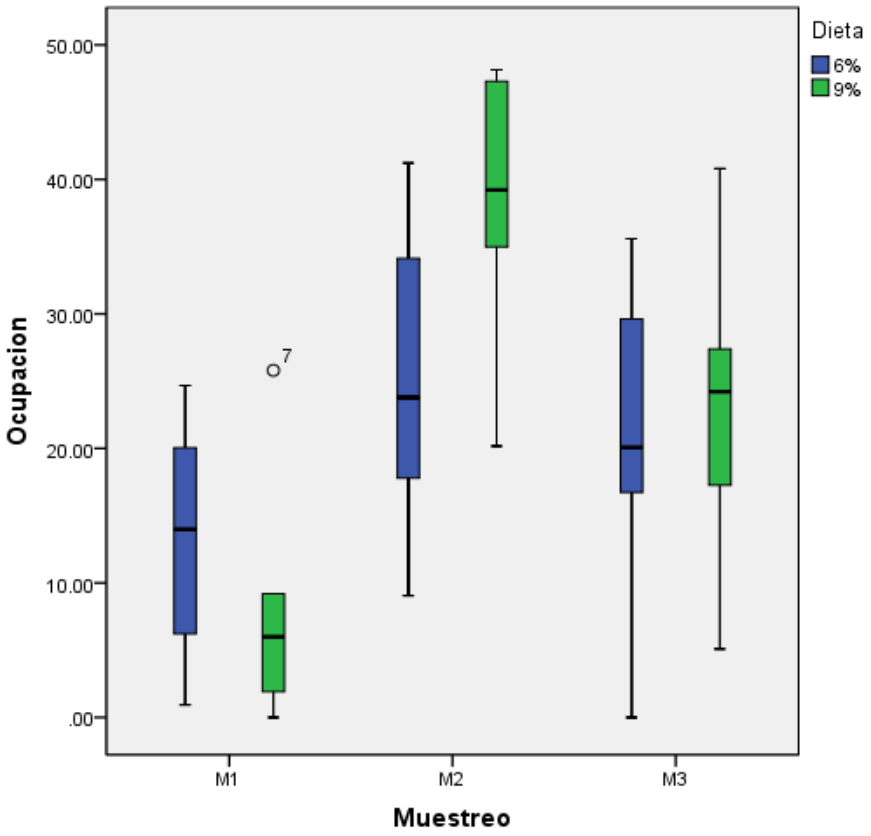


Fig. 217. Porcentajes de mortalidad de progenitores observada en cada uno de los tres acondicionamientos realizados.

5. RESULTADOS ESTADÍSTICA.

El ANOVA de los datos estereológicos no mostró diferencias significativas entre las dietas del 6% y 9%, hay que recordar que no hay datos estereológicos de la dieta del 3%. Se encontraron diferencias significativas entre los muestreos. La interacción de ambos factores, muestreo y dieta no fue significativa.

En la tabla personalizada se pueden observar diferencias significativas entre los muestreos M1 y M2 para los individuos acondicionados con una dieta del 9% (ver Anexo Estadística).



EXPERIMENTO 7; EFECTO DE LA RACIÓN DE ALIMENTO EN INVIERNO:

Al igual que en el experimento sobre el efecto de la ración de alimento en otoño, todos los progenitores fueron sometidos a un gradiente de temperatura, G (14-18 ºC) y a un gradiente de iluminación, G (8-16 h/luz) pero se diferencian en la ración de alimento suministrado: 3%, 6% y 9% del peso seco de microalgas por individuo al día (Ver apartado 3.1.1 Experimento 7 de Materiales y Métodos).

1. MEDIDAS Y PESOS (BIOMETRÍA):

Muestreo inicial: 25 de Enero

Se realizó un muestreo inicial para determinar el estado gonadal de los progenitores en otoño. En este muestreo inicial se analizaron 10 individuos de un total de 280 individuos recogidos en Cambados (Ría de Arousa).

Se determinó el peso húmedo, en una balanza Mettler® PM300. En la tabla 37 se presentan los pesos frescos de la concha y la vianda, junto con el peso total y el peso medio por individuo.

Tabla 37. Peso húmedo de la vianda, de la concha, peso total y peso medio de los progenitores en el muestreo inicial. **Phv** (peso húmedo de la vianda), **Pmv** (peso medio de la vianda), **Phc** (peso húmedo de la concha), **Pt** (peso total de los individuos seleccionados para este muestreo) y **Pmi** (peso medio de cada individuo).

	nº ind.	**Phv** (Peso húmedo vianda)	**Pmv** (Peso medio vianda)	**Phc** (Peso húmedo concha)	**Pt** (Peso total)	**Pmi** (Peso medio individuo)
Muestreo inicial	10	165,99 g	16,60 g	1291,00 g	1476,20 g	147,62 g

Muestreo 1: 18 días

El primer muestreo fue realizado dieciocho días después de empezar el acondicionamiento de los progenitores, para ello se analizaron un total de 6 individuos.

Los distintos parámetros biométricos se muestran en la Tabla 38.

Tabla 38. Peso húmedo de la vianda, de la concha, peso total y peso medio de los progenitores en el muestreo 1, dieciocho días después del inicio del acondicionamiento.

	nº ind.	Phv	Pmv	Phc	Pt	Pmi
3%	6	95,22 g	15,87 g	749,93 g	853,29 g	142,22 g
6%	6	86,80 g	14,46 g	758,65 g	854,20 g	142,36 g
9%	6	94,03 g	15,67 g	732,09 g	837,60 g	139,60 g

Los pesos medios por individuo habían disminuido en las diferentes condiciones de acondicionamiento, los individuos acondicionados con una ración de alimento del 9% presentan los pesos más bajos. El peso medio de la vianda era en todos los individuos inferior al observado en el muestreo inicial, aunque con valores muy similares bajo las diferentes condiciones.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2. RESULTADOS DE HISTOLOGÍA.

Las preparaciones y el análisis histológico se realizaron de acuerdo con los protocolos descritos en el apartado 3.4 de Materiales y Métodos. A continuación, en las figuras 218 y 219 se muestran imágenes representativas del desarrollo gametogénico de las ostras acondicionadas con los diferentes regímenes de alimentación.

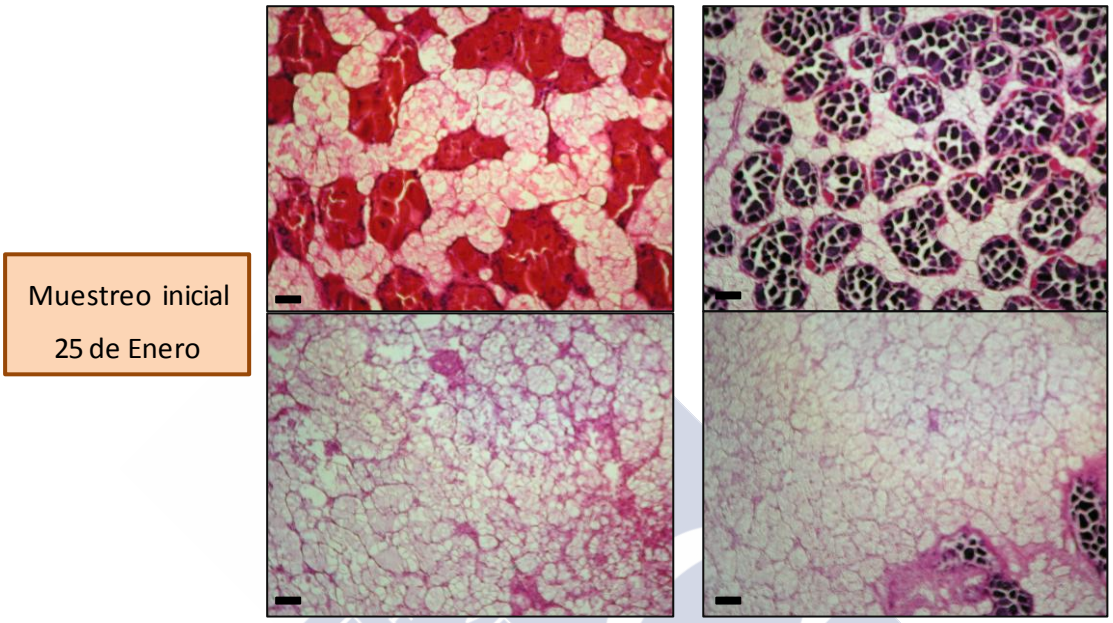


Figura 218. Fotografías de las secciones histológicas más representativas del desarrollo gonadal de los individuos analizados en el muestreo inicial. ▬ Barra: 10 µm.

En el muestreo inicial, el estudio histológico se realizó sobre 10 individuos. Este experimento comenzó a finales de enero, en invierno, y en la mayoría de los individuos, como se puede observar en la Figura 218, el tejido gonadal se encontraba con la gónada madura en algunas zonas, con los ovocitos o esperma maduro y con signos de desoves y reabsorción mientras que otras zonas del tejido gonadal se encontraban ya completamente reestructuradas o en período de recuperación con gran cantidad de hemocitos.

A los dieciocho días del inicio del acondicionamiento se analizaron 6 individuos de cada una de las condiciones propuestas: 3%, 6% y 9% y los resultados histológicos se pueden observar en la figura 219. En todos los acondicionamientos se observa mucha asincronía en el desarrollo gonadal, incluso dentro de un mismo corte se encuentran zonas completamente vacías y otras ocupadas por folículos llenos de células maduras. También se pueden ver signos de desove, reabsorción y reordenación de la gónada. Todo esto hace pensar que ha habido desoves previos a la realización del muestreo.

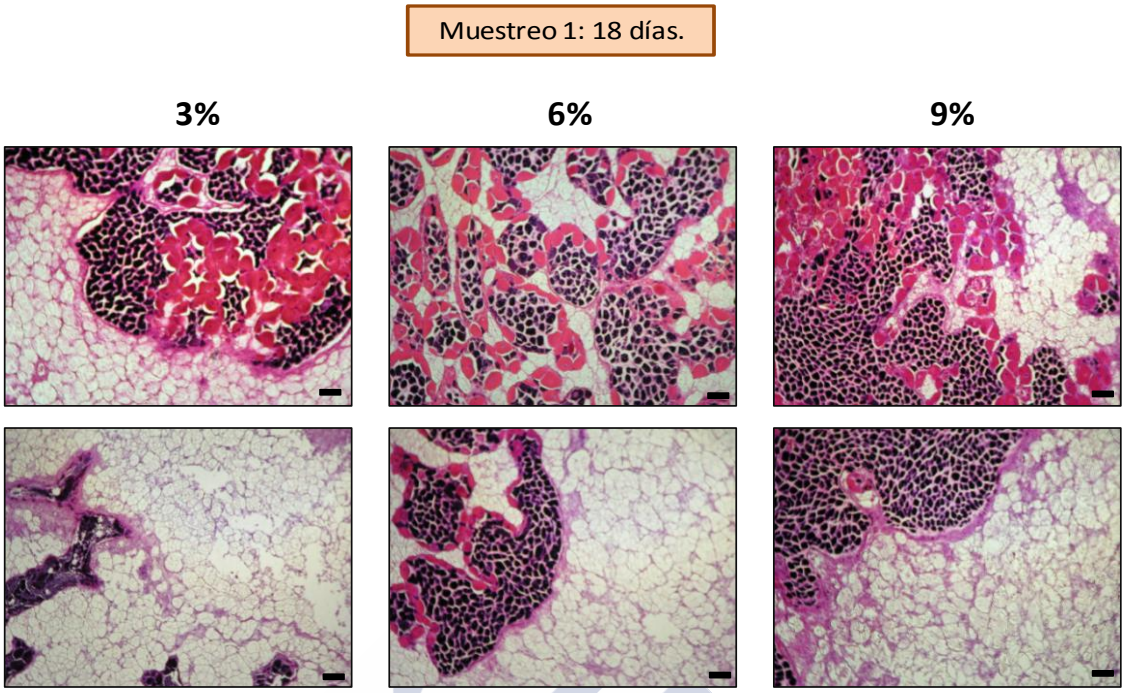


Figura 219. Fotografías de las secciones histológicas más representativas del desarrollo gonadal de los individuos analizados a los 18 días del inicio del acondicionamiento. ▬ Barra: 10 µm.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3. RESULTADOS DE ESTEREOLOGÍA: PORCENTAJE DE OCUPACIÓN GONADAL DURANTE EL ACONDICIONAMIENTO.

Las preparaciones histológicas, se analizaron mediante métodos de estereología (ver apartado 3.5 de Materiales y Métodos). Para ello se utilizaron un mínimo de seis fotografías correspondientes a cada corte histológico. Por medio del programa Sigma ScanPro se identificaron los distintos tipos celulares del tejido gonadal y se anotó su número: espermátidas y espermatocitos, ovogonias y ovocitos, células vesiculares y otros (hemocitos, tejido muscular, restos de hepatopáncreas, etc.).

El número de células reproductoras masculinas (espermátidas y espermatocitos) se denominó porcentaje de gónada masculina (% Gónada Masculina o % GM), mientras que al conjunto de células reproductoras femeninas (ovogonias y ovocitos) se le designó como porcentaje de gónada femenina (% Gónada Femenina o % GF).

Los datos obtenidos, se presentan en las figuras de la 220 a la 230.

Muestreo inicial: 25 de Enero

Se recogieron 10 individuos al inicio del experimento en invierno, para analizar estereológicamente y comprobar su estado de desarrollo gonadal, mientras los otros fueron acondicionados siguiendo las condiciones antes descritas.

Se pudo observar (Figura 220), que entre los diez individuos analizados se encontraban algunos porcentajes de ocupación gonadal bastante altos. Cuatro de ellos superaban el 10% de ocupación femenina (12,37% - 14,29% - 18,52% y 11,77%), tres se encontraban rondando el 5% (4,30% - 5,23% y 5,23%) y otros tres individuos no poseían representación femenina. El porcentaje medio de gónada femenina era, por lo tanto, **% GF** = 7,17 (d.e = 6,65).

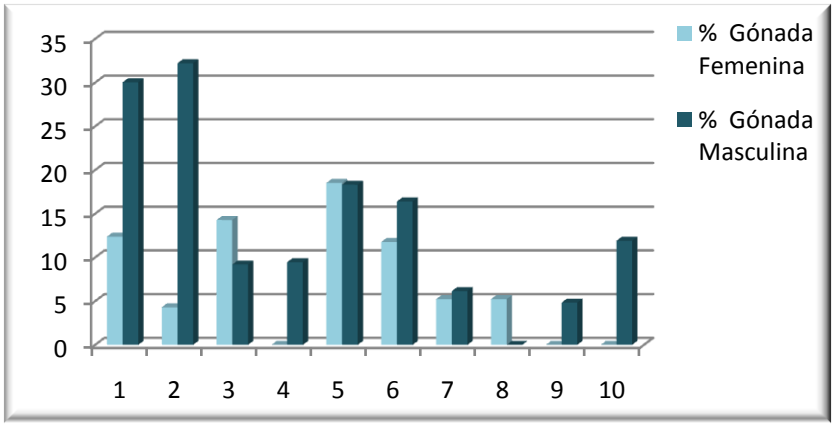


Fig. 220. Porcentajes de ocupación gonadal femenina y masculina en el muestreo inicial (n=10).

Los porcentajes de ocupación masculina de los individuos analizados son más elevados, dos de ellos superaban el 30% (30,03% y 32,21%), dos superaban el 15% (18,32% y 16,40%), tres se encontraban rondando el 10% de ocupación masculina (9,19% - 9,46% y 11,90%) y otros dos rondando el 5% (6,15% y 4,83%) y sólo uno de ellos no presentaba ocupación masculina. **% GM** = 13,85 (d.e = 10,55).

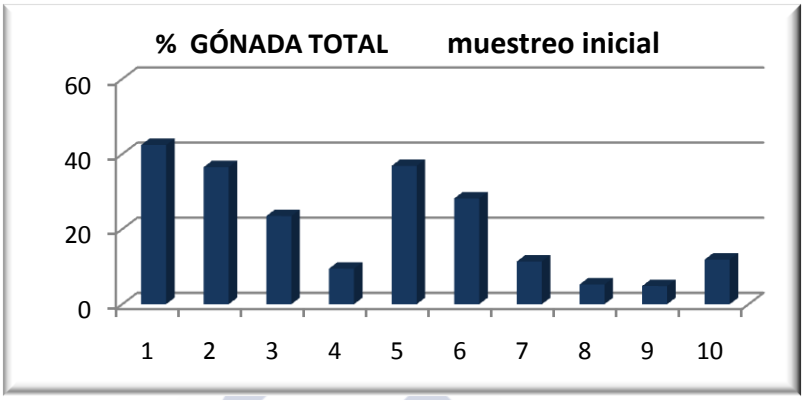


Fig. 221. Porcentajes de ocupación gonadal total en individuos del muestreo inicial (n=10).

Al calcular los porcentajes medios de ocupación gonadal total de los individuos muestreados al inicio del acondicionamiento (Figura 221) se observó que cinco de los individuos poseían una ocupación elevada, cinco de ellos superaban el 20% (42,40% - 36,51% - 23,48% - 36,84% y 28,17%) y otros dos superaban el 10% (11,38% y 11,90%). Los porcentajes más bajos correspondían con individuos que ya habían desovado, se veían claros signos de reabsorción y desove, y zonas de gónada completamente vacía, su ocupación rondaba el 5% (9,46% - 5,23% y 4,83%). El porcentaje medio de ocupación gonadal de los individuos analizados era: **% GT** = 21,02 (d.e = 14,24).

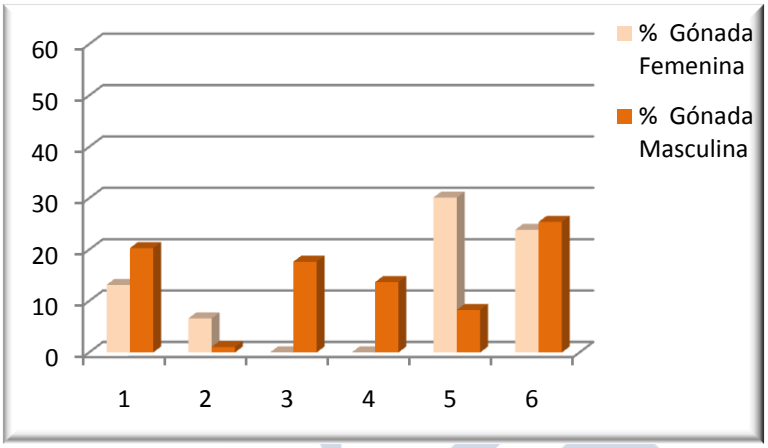
Muestreo 1: 18 días

A los dieciocho días desde el inicio del experimento, se analizaron seis individuos de cada uno de los acondicionamientos para ver la evolución que seguía el desarrollo del tejido gonadal de los individuos acondicionados.

3%

En la siguiente figura (Figura 222) se muestran los porcentajes de ocupación obtenidos al analizar seis de los individuos acondicionados con una ración de alimento del 3%. Dos de los individuos no presentaban ocupación femenina, se trataba de dos machos puros, mientras los

cuatro restantes presentaban ovocitos maduros en distintas proporciones (13,16% - 6,61% - 30,16% y 23,87%). En cuanto a la gónada masculina, representada en todos los individuos, alcanzaba valores bastante altos en cuatro de los individuos (20,31% - 17,66% - 13,69% y 25,40%), en los otros dos individuos, con los porcentajes más bajos, la parte masculina que se encontraba en el tejido gonadal se trataba de esperma residual de puestas anteriores.



% GF = 12,30 (d.e = 12,56).

% GM = 14,40 (d.e = 8,75).

Fig. 222. Porcentajes de ocupación gonadal femenina y masculina de los individuos acondicionados con el 3% durante 18 días (n=6).

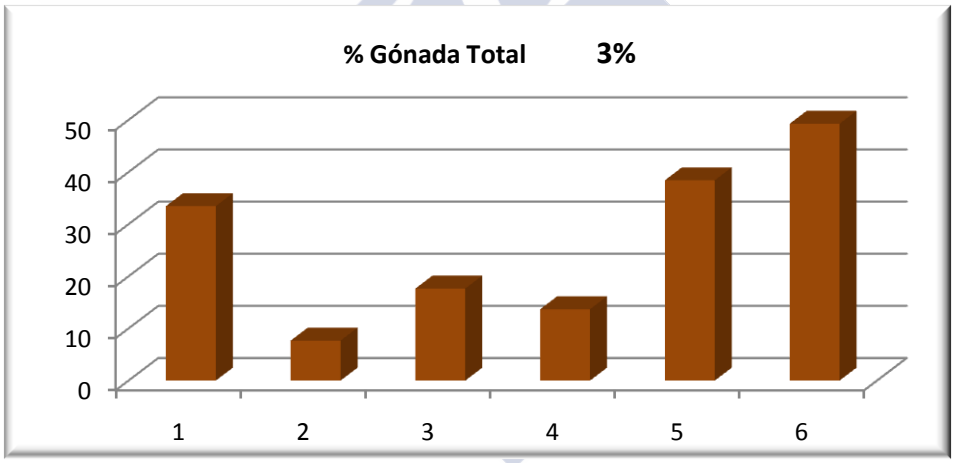


Fig. 223. Porcentajes de ocupación gonadal total de los individuos acondicionados con el 3% durante 18 días (n=6).

En la figura 223, se representa la ocupación gonadal total de los individuos analizados y muestra que tres de los individuos superaban el 30% (33,47% - 38,43% y 49,27%), dos superaban el 10% (17,66% y 13,69%) y el otro tenía una ocupación de 7,67%. **% GT** = 26,70 (d.e = 16,16).

Todos los individuos mostraban síntomas de haber desovado ya poco tiempo antes o que se trataba de desoves parciales que dejan células maduras en los conductos, folículos fusionados, ovocitos maduros reabsorbiéndose, gran cantidad de hemocitos y zonas del tejido completamente reestructuradas ya y formadas sólo por células vesiculares.

6%

Al analizar los porcentajes de ocupación gonadal de seis de los individuos acondicionados con una ración de alimento del 6% (Figura 224) se observaba que la gónada femenina estaba presente en cinco de los individuos pero con porcentajes muy bajos (menores del 10%) en tres de ellos y destacaban dos con ocupaciones elevadas (18,78% y 28,44%). Así, **% GF** = 10,36 (d.e = 10,99); la ocupación masculina estaba presente en todos los individuos y con altos porcentajes en cuatro de ellos (21,83% - 24,41% - 46,96% y 33,80%) y todos ellos eran individuos con esperma maduro y en pleno desove ya que las mórulas se encontraban ya en los ductos. **% GM** = 22,99 (d.e = 16,32). El individuo 6, con síntomas de haber desovado, presentaba la gónada formada por células vesiculares y en determinadas zonas tenía folículos de pequeño tamaño con espermatogonias en las paredes y ovocitos maduros residuales embebidos o con signos de reabsorción.

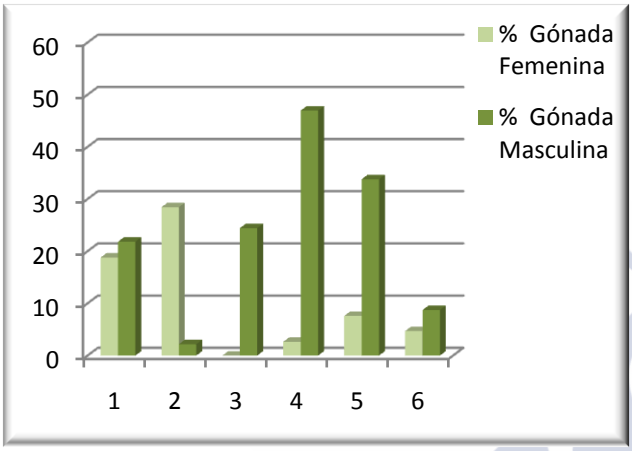


Fig. 224. Porcentajes de ocupación gonadal femenina y masculina de los individuos acondicionados con el 6% durante 18 días (n=6).

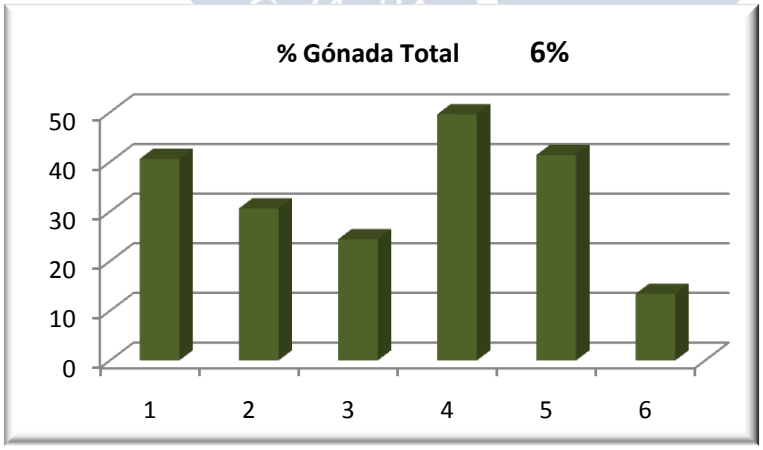


Fig. 225. Porcentajes de ocupación gonadal total de los individuos acondicionados con el 6% durante 18 días (n=6).

Las ocupaciones totales medias de los individuos analizados (Figura 225) mostraban sus altos porcentajes de ocupación; tres de los individuos superaban el 40% (40,61% - 49,61% y 41,41%), dos superaban el 20% (30,62% y 24,41%) y el individuo con la gónada menos ocupada tenía una ocupación de 13,43%. El porcentaje de ocupación total media era: **% GT** = 33,35 (d.e = 13,16).

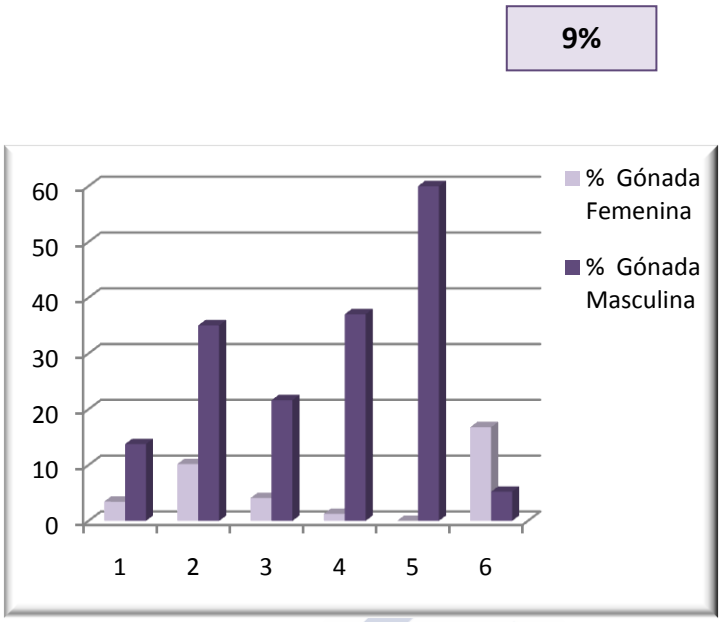


Fig. 226. Porcentajes de ocupación gonadal femenina y masculina de los individuos acondicionados con el 9% durante 18 días (n=6).

Entre los individuos acondicionados con una ración de alimento del 9% de alimentación durante 18 días (Figura 226), la ocupación por gónada masculina era mucho mayor que por gónada femenina en todos los individuos salvo en uno, que tenía una ocupación femenina del 16,80%, otro de los individuos presentaba el 10,19% de ocupación femenina, los restantes no llegaban al 5%. **% GF** = 5,97 (d.e = 6,37). La ocupación masculina se encontraba en todos los individuos y con porcentajes muy elevados en algunos; el más elevado (62,24%) se trataba de un macho puro, con folículos muy grandes y repletos de mórulas de esperma maduro, había otros dos individuos que superaban el 30% (35,05% y 37,04%) y los otros tres: 13,76% - 21,63% y 5,23%. **% GM** = 29,16 (d.e = 20,29).

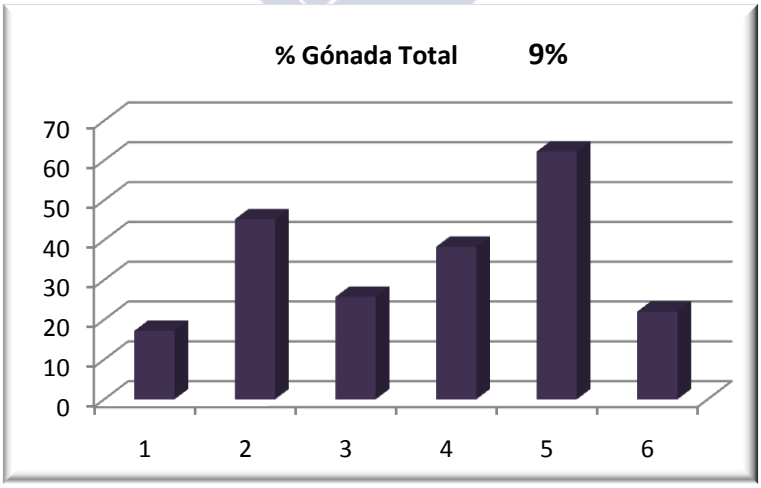


Fig. 227. Porcentajes de ocupación gonadal total de los individuos acondicionados con el 9% durante 18 días (n=6).

Se puede observar en la figura 227 que el porcentaje total de ocupación de la gónada difiere mucho entre los individuos analizados en este acondicionamiento. Uno de ellos destaca con una ocupación de 62,24%; dos superaban el 30% (45,24% y 38,30%) y otro se acercaba con un 25,73%; y dos individuos con las ocupaciones más bajas (17,20% y 22,03%). **% GT** = 35,12 (d.e = 16,90). Los individuos mostraban un tejido gonadal con células reproductoras muy maduras, desovando o a punto de desovar; en algunos casos se encontraban zonas del tejido completamente recuperado y otras zonas con los folículos fusionados o rotos y llenos de mórulas de esperma maduro u ovocitos maduros.

Después de 18 días de acondicionamiento, la ocupación por gónada masculina era superior a la ocupación por gónada femenina en los tres acondicionamientos ensayados (Figura 228). Es interesante señalar que esta diferencia era mínima en los individuos acondicionados con una ración de alimento del 3% (12,30% GF y 14,40% GM) pero esta diferencia se incrementaba en los del 6% (10,36% GF y 22,99% GM) y se hacía mucho mayor en los individuos acondicionados con el 9% (5,97% GF y 29,16% GM).

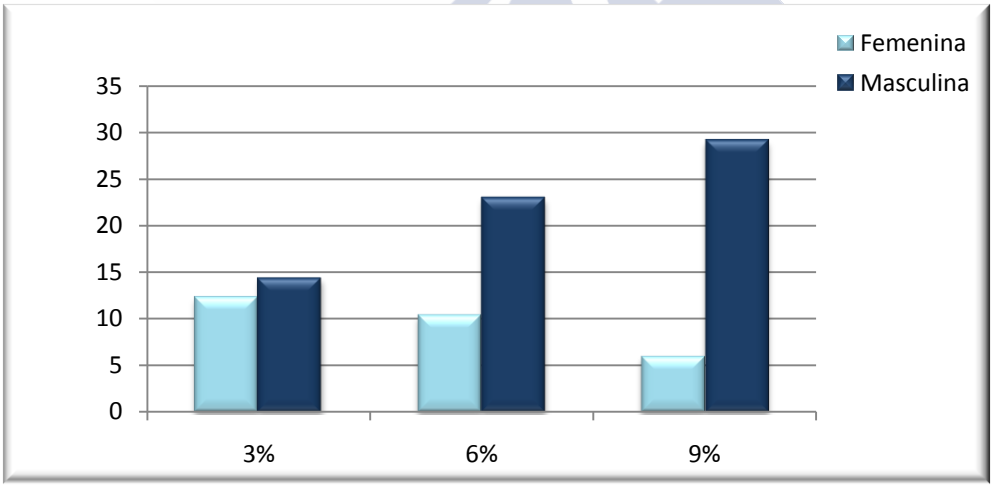


Fig. 228. Porcentajes medios de ocupación gonadal femenina y masculina para los dos acondicionamientos después de 18 días.

En la figura 229 se observan los porcentajes de ocupación gonadal de cada individuo analizado para las tres condiciones de ensayo (3%, 6% y 9%) y el porcentaje más elevado pertenecía a uno de los individuos acondicionados con el 9% de alimentación (62,24% - 45,24% - 38,30% - 25,73% - 22,03% y 17,12%) pero las ocupaciones más altas y homogéneas (menor desviación estándar) correspondían con los individuos acondicionados con el 6% (49,61% - 41,41% - 40,61% - 30,62% - 24,41% y 13,43%).

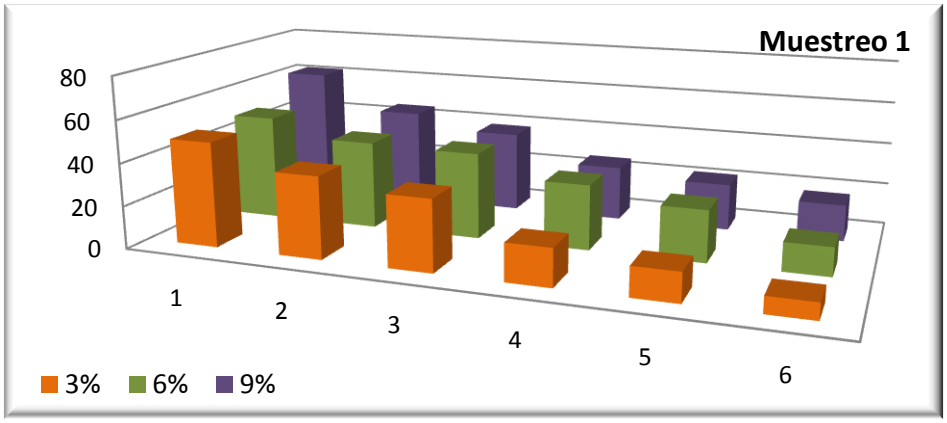


Fig. 229. Porcentaje gonadal medio de ocupación de cada uno de los individuos analizados a los 14 días y sometidos a las dos condiciones de alimentación diferentes.

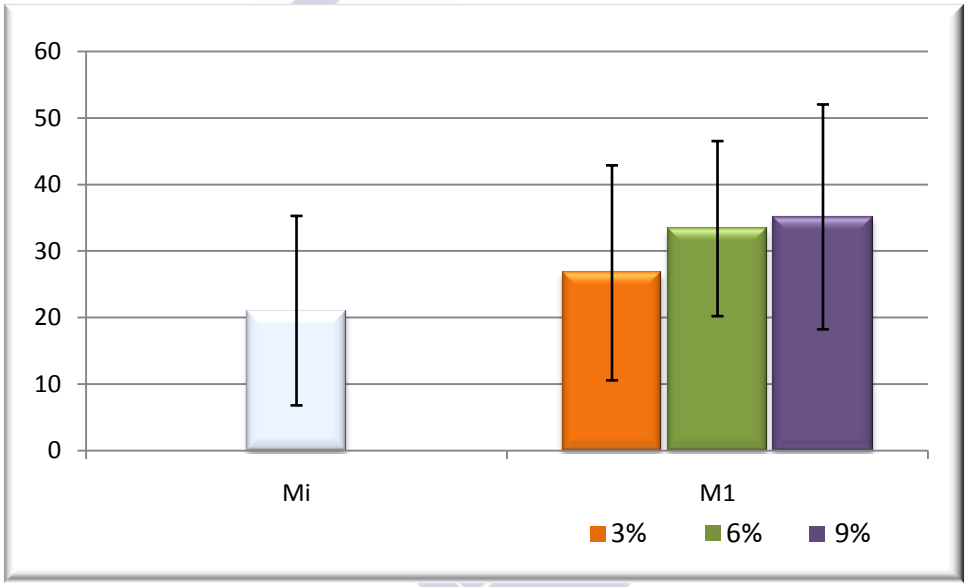


Fig. 230 Porcentajes de ocupación media de los individuos sometidos a los diferentes acondicionamientos a lo largo de todo el experimento. (M: inicial: muestreo inicial; M1: muestreo 1)

La evolución del desarrollo gonadal de los individuos acondicionados durante dieciocho días y siguiendo tres condiciones distintas de dieta se puede observar en la figura 230. El mayor porcentaje de ocupación correspondía con los individuos acondicionados con el 9% (35,12% frente al 33,35% de los individuos acondicionados con el 6%) y la menor ocupación gonadal se correspondía con los individuos acondicionados con el 3% de ración de alimento (26,70%). Se debe destacar que las desviaciones eran muy altas para todos los individuos analizados (16,16 para 3%; 13,16 para 6%; 16,90 para 9%).

4. DESOVES.

Una vez acondicionados los individuos y analizados los porcentajes de ocupación gonadal de cada uno de los individuos acondicionados, se encontraron evidencias de desoves parciales antes del primer muestreo. En los tanques acondicionados con una alimentación del 6% y 9%, se encontraron desoves aproximadamente al mes del inicio del acondicionamiento. Los individuos acondicionados con una ración de alimento del 3% tardaron tres semanas más en desovar.

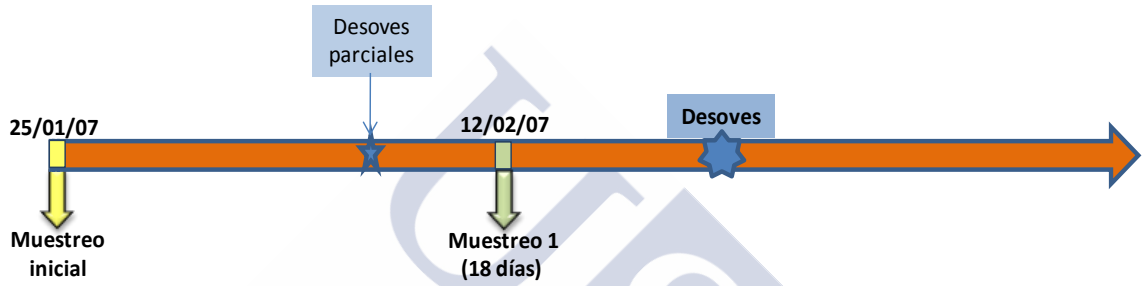


Fig. 231. Esquema que muestra las fechas de los muestreos realizados y la obtención de los desoves.

Los resultados mostraban diferencias en el número de desoves y el número de larvas producidas para el caso de los progenitores acondicionados con una ración de alimento del 6% comparado con los individuos acondicionados con raciones de alimento del 3% y 9% (Tabla 39 y Figura 232).

Tabla 39. Fecha de desoves y número de larvas liberadas.

3%	6%	9%
		19/02/07 4.700.000 larvas
	26/02/07 700.000 larvas	28/02/07 1.500.000
13/03/07 3.800.000 larvas	16/03/07 2.500.000	19/03/07 4.200.000
20/03/07 400.000	17/03/07 2.400.000	
31/03/07 4.800.000	20/03/07 1.700.000	
	26/03/07 600.000	
	05/04/07 3.000.000	
	10/04/07 1.200.000	
TOTAL 9.000.000 larvas	TOTAL 12.100.000 larvas	TOTAL 10.400.000 larvas

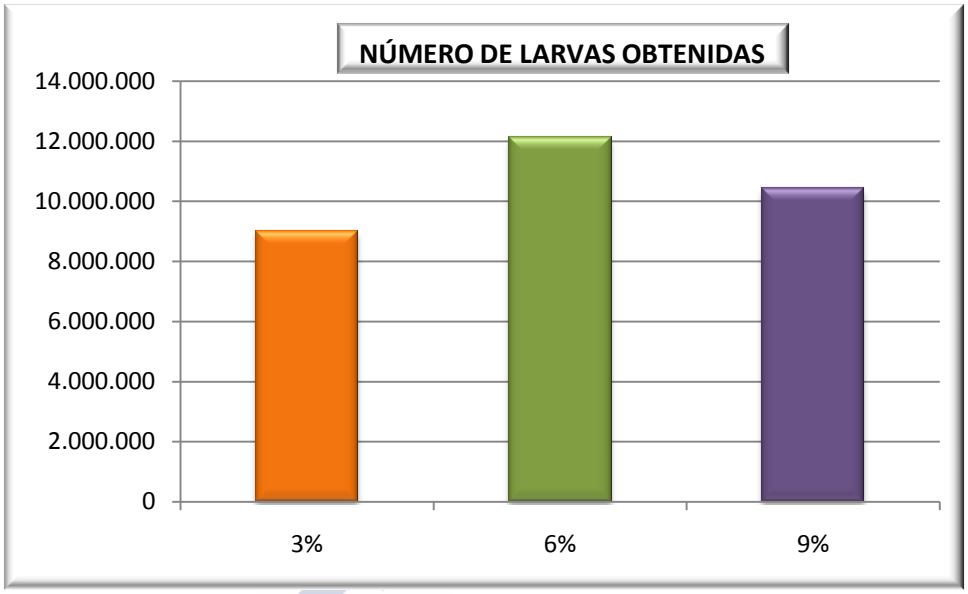


Fig. 232. Número de larvas liberadas en los distintos tipos de acondicionamiento.

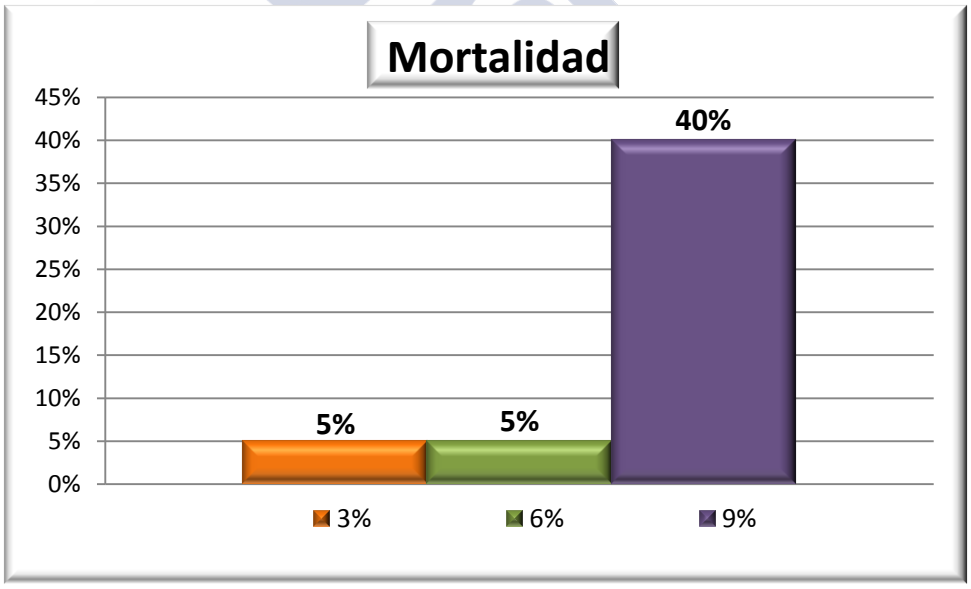


Fig. 233. Porcentajes de mortalidad producida en cada uno de los acondicionamientos realizados.

En la figura 233 se muestran los porcentajes de mortalidad obtenidos a lo largo del experimento para los individuos acondicionados con las tres condiciones de ensayo. Los progenitores acondicionados con una ración de alimento del 3% y del 6% mostraban una mortalidad del 5%, en cambio, la mortalidad de los individuos acondicionados con una ración de alimento del 9% alcanzaba el 40%, esta mortalidad probablemente está relacionada con el aumento de la producción de pseudoheces observada en dicho acondicionamiento y que va asociada con el aumento de la población bacteriana.

En resumen,

Si comparamos los resultados obtenidos en los experimentos sobre el efecto de la ración de alimento en otoño y en invierno, se puede observar que la situación inicial de desarrollo gonadal era claramente diferente; en otoño, al inicio del experimento, la gónada en la mayoría de los individuos presentaba poca ocupación ya que se estaba reestructurando y comenzando a formar pequeños folículos, encontrándose zonas con restos de desoves que estaban siendo reabsorbidos y grandes zonas en las que únicamente se encontraban células vesiculares (ver Figura 186), el porcentaje de ocupación gonadal era del 5,85%; mientras que en invierno, el tejido gonadal se encontraba con folículos maduros en algunas zonas, con los ovocitos o esperma maduro y con signos de desoves y reabsorción y en otras zonas el tejido gonadal estaba completamente reestructurado (ver Figura 218), siendo el porcentaje de ocupación gonadal del 21,02%. En cuanto a la producción de larvas y la mortalidad de los progenitores:

OTOÑO Se obtuvieron 3.600.000 larvas con la ración del 3%, 15 millones con la de 6% y 18 millones con la del 9% (ver Figura 216). La mortalidad de los reproductores era más baja en los individuos del 3% (3%), los del 6% presentan una mortalidad del 5% y aumentaba en los individuos acondicionados con la ración del 9% hasta un porcentaje del 20%.

INVIERNO Se obtuvieron 9 millones de larvas en los individuos acondicionados con la ración del 3%, 12.100.00 larvas con la de 6% y 10.400.000 larvas con la del 9% (ver Figura 232). La mortalidad de los reproductores era la misma (5% de mortalidad) en los individuos acondicionados con el 3% y el 6% pero sufría un gran aumento en los individuos acondicionados con la ración del 9%, hasta un 40% de mortalidad (ver Figura 233).

5. RESULTADOS ESTADÍSTICA.

Los datos seguían una distribución normal pero no cumplían el criterio de homogeneidad de las varianzas, tampoco los datos transformados.

No se encontraron diferencias significativas entre los datos estereológicos de las tres dietas ensayadas (3%, 6% y 9%).

4.4 EFECTO COMBINADO DEL FLUJO DEL AGUA Y LA RACIÓN DE ALIMENTO SOBRE EL ACONDICIONAMIENTO DE PROGENITORES DE *OSTREA EDULIS*

EXPERIMENTO 8; EFECTO COMBINADO DEL FLUJO DEL AGUA Y LA RACIÓN DE ALIMENTO.

Los progenitores fueron sometidos a nueve acondicionamientos distintos en función del flujo de agua suministrado a cada cultivo (1 l/h, 2 l/h y 3 l/h) combinado con tres raciones de alimento diferente (3 %, 6 % y 9 %). Consiguiendo, de este modo, nueve situaciones de acondicionamiento diferentes (Ver apartado 3.1.1 Experimento 8 de Materiales y Métodos).

1. MEDIDAS Y PESOS (BIOMETRÍA):

Muestreo inicial: 03 de Mayo

Para la determinación del estado gonadal de los progenitores en primavera se realizó un muestreo inicial. En este muestreo se seleccionaron 10 individuos de un total de 820 progenitores recogidos en Cambados (Ría de Arousa).

Se midió la longitud y el ancho de cada ejemplar utilizando un calibre, determinándose que la longitud media era de 9,29 cm y la anchura media era de 9,20 cm.

A continuación, se determinó el peso húmedo, en una balanza Mettler® PM300. En la tabla 40 se presentan los pesos frescos de la concha y la vianda, junto con el peso total y el peso medio por individuo.

Tabla 40. Peso húmedo de la vianda, de la concha, peso total y peso medio de los progenitores en el muestreo inicial. **Phv** (peso húmedo de la vianda), **Pmv** (peso medio de la vianda), **Phc** (peso húmedo de la concha), **Pt** (peso total de los individuos seleccionados para este muestreo) y **Pmi** (peso medio de cada individuo).

	nº ind.	**Phv** (Peso húmedo vianda)	**Pmv** (Peso medio vianda)	**Phc** (Peso húmedo concha)	**Pt** (Peso total)	**Pmi** (Peso medio individuo)
Muestreo inicial	10	219,68 g	21,97 g	1182,60 g	1455,46 g	145,55 g

Muestreo 1: 26 días

El primer muestreo fue realizado aproximadamente un mes después de empezar el acondicionamiento de los progenitores. Los distintos parámetros biométricos se muestran en la Tabla 41.

Tabla 41. Peso húmedo de la vianda, de la concha, peso total y peso medio de los progenitores en el muestreo 1, un mes después del inicio del acondicionamiento.

	nº ind.	Phv	Pmv	Phc	Pt	Pmi
1 l/h 3%	6	106,36 g	17,73 g	613,42 g	769,27 g	128,21 g
1 l/h 6%	6	121,41 g	20,24 g	686,44 g	864,27 g	144,05 g
1 l/h 9%	6	88,03 g	14,67 g	560,68 g	681,62 g	113,55 g
2 l/h 3%	6	126,36 g	21,06 g	642,97 g	813,91 g	135,65 g
2 l/h 6%	6	115,18 g	19,20 g	581,43 g	726,74 g	121,12 g
2 l/h 9%	6	110,94 g	18,49 g	654,16 g	802,31 g	133,72 g
3 l/h 3%	6	112,94 g	18,82 g	586,02 g	746,16 g	124,36 g
3 l/h 6%	6	115,75 g	19,29 g	538,96 g	690,62 g	115,10 g
3 l/h 9%	6	104,21 g	17,37 g	601,47 g	754,06 g	125,68 g

El peso medio por individuo era menor que el peso medio por individuo obtenido inicialmente. El peso medio de la vianda también era menor en todos los individuos analizados en el muestreo 1 frente al obtenido para los individuos analizados en el muestreo inicial.

2. RESULTADOS DE HISTOLOGÍA.

Las preparaciones y el análisis histológico se realizaron de acuerdo con los protocolos descritos en el apartado 3.4 de Materiales y Métodos. A continuación, en las figuras 234 y 235 se muestran imágenes representativas del desarrollo gametogénico de las ostras acondicionadas con los diferentes regímenes de flujo de agua y dieta. En el muestreo inicial, el estudio histológico se realizó sobre 10 individuos.

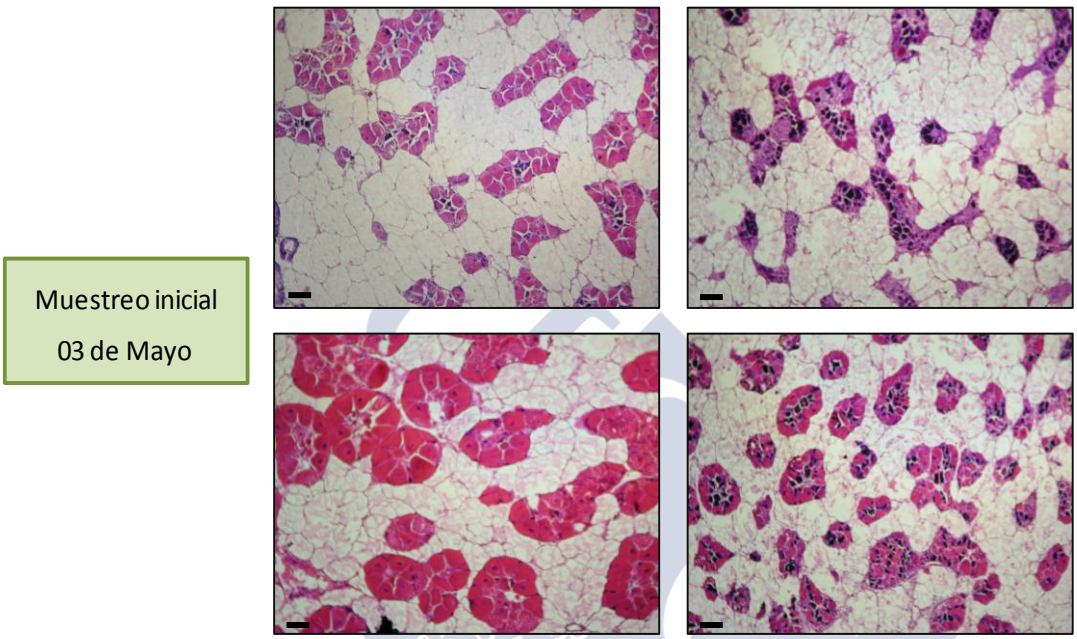


Figura 234. Fotografías de las secciones histológicas más representativas del desarrollo gonadal de los individuos analizados en el muestreo inicial. ▬ Barra: 10 µm.

Este experimento comenzó en primavera, a principios del mes de Mayo, y en las fotografías correspondientes al análisis estereológico (Figura 234) se podía observar que la gónada ya poseía folículos maduros, próximos al desove o con reabsorción en algunos individuos y en otros se observaban zonas del tejido gonadal prácticamente vacío formado por células vesiculares y zonas con folículos más o menos maduros, con ovogonias en las paredes y esperma más maduro en la zona central.

En las preparaciones procedentes del muestreo 1, a los 26 días del inicio del acondicionamiento (Figura 235), se aprecia un desarrollo gonadal avanzado, más marcado en los acondicionamientos con las dietas más altas (6% y 9%) aunque existía una gran variabilidad individual y entre los distintos regímenes de acondicionamiento.

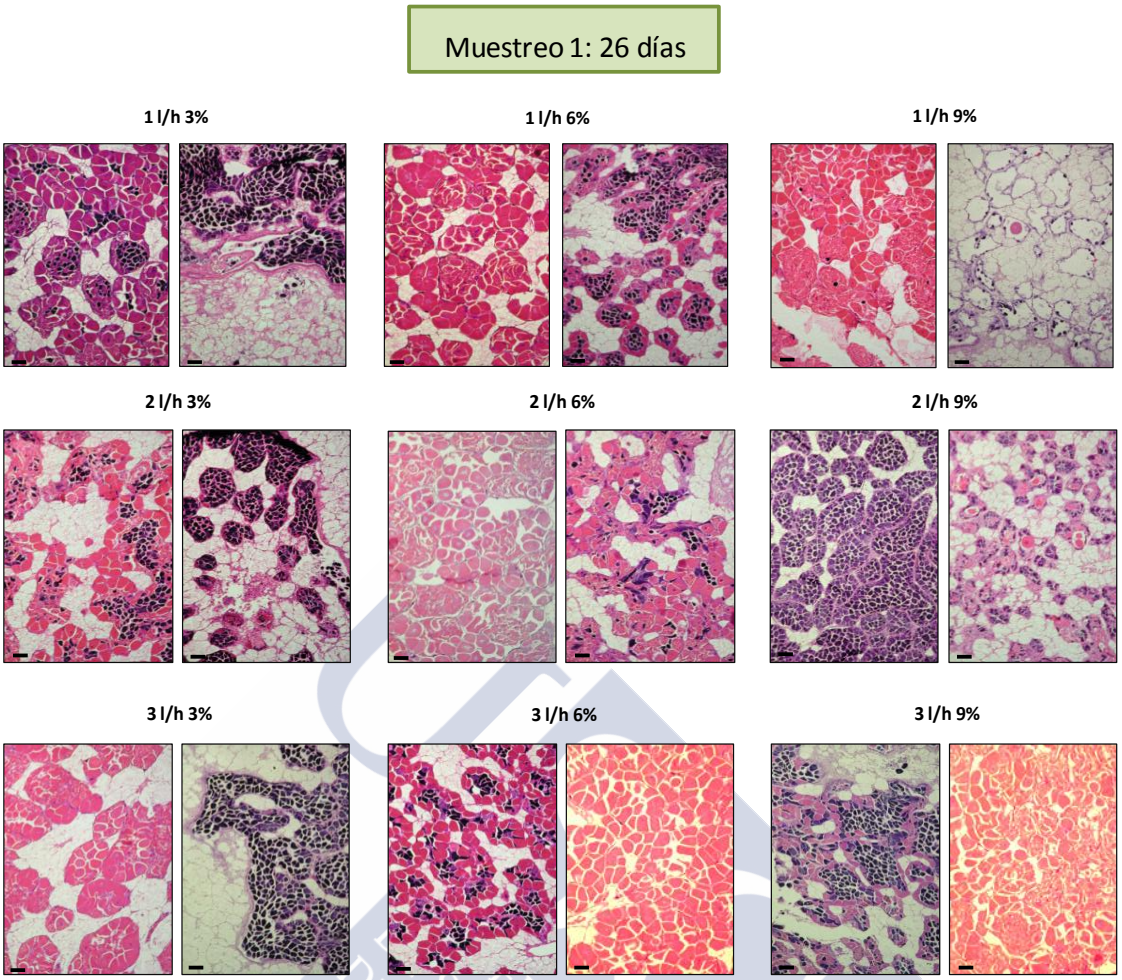


Figura 235. Fotografías de las secciones histológicas más representativas del desarrollo gonadal de los individuos analizados a los 26 días del inicio del acondicionamiento. ▬ Barra: 10 µm.

3. RESULTADOS DE ESTEREOLOGÍA: PORCENTAJE DE OCUPACIÓN GONADAL DURANTE EL ACONDICIONAMIENTO.

Las preparaciones histológicas, se analizaron mediante métodos de estereología (ver apartado 3.5 de Materiales y Métodos). Para ello se utilizaron un mínimo de seis fotografías correspondientes a cada corte histológico. Por medio del programa Sigma ScanPro se identificaron los distintos tipos celulares del tejido gonadal y se anotó su número: espermátidas y espermatocitos, ovogonias y ovocitos, células vesiculares y otros (hemocitos, tejido muscular, restos de hepatopáncreas, etc.).

El número de células reproductoras masculinas (espermátidas y espermatocitos) se denominó porcentaje de gónada masculina (% Gónada Masculina o % GM), mientras que al conjunto de células reproductoras femeninas (ovogonias y ovocitos) se le designó como porcentaje de gónada femenina (% Gónada Femenina o % GF).

Los datos obtenidos, se presentan en las figuras de la 236 a la 261.

Muestreo inicial: 03 de Mayo.

Se recogieron 10 individuos al inicio del experimento en primavera, para analizar estereológicamente y comprobar su estado de desarrollo gonadal, mientras los otros fueron acondicionados siguiendo las condiciones antes descritas.

Se pudo observar (Figura 236), que entre los diez individuos analizados se encontraban algunos porcentajes de ocupación gonadal bastante altos. Estos altos porcentajes son el producto de una gónada madura, ovocitos muy maduros y con signos de reabsorción. Seis de ellos superaban el 15% de ocupación femenina (25,60% - 15,81% - 25,60% - 16,80% - 24,54% y 17,06%), dos se encontraban rondando el 10% (11,91% y 9,19%) y otros dos individuos apenas poseían representación femenina (0,33% y 0,00%). El porcentaje medio de gónada femenina era, por lo tanto, **% GF** = 14,68 (d.e = 9,46).

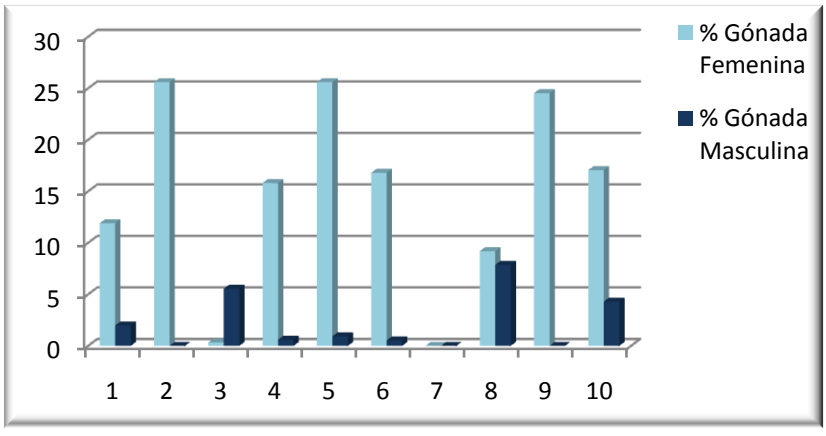


Fig. 236. Porcentajes de ocupación gonadal femenina y masculina en el muestreo inicial (n=10).

Los porcentajes de ocupación masculina encontrados eran mucho menores, sólo tres de los individuos superaban el 5% de ocupación por gónada masculina (5,56% y 7,87%), otros dos tenían unas ocupaciones del 1,99% y 4,30%, mientras que los seis restantes no alcanzaban el 1%. El porcentaje medio de gónada masculina era, por lo tanto, **% GM** = 2,18 (d.e = 2,78).

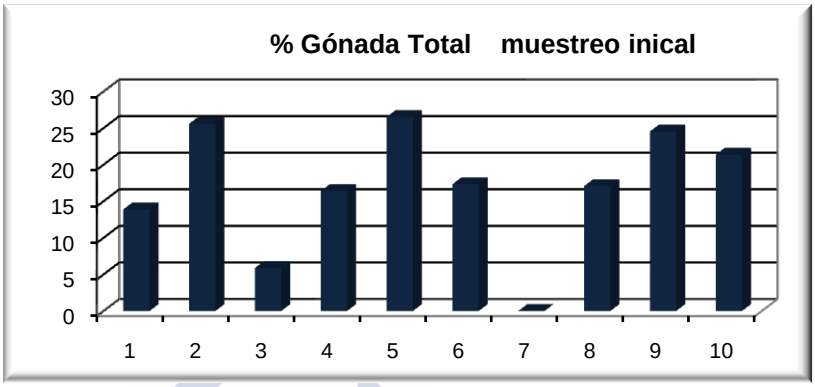


Fig. 237. Porcentajes de ocupación gonadal total en individuos del muestreo inicial (n=10).

De los 10 individuos analizados estereológicamente (figura 237) cuatro de ellos tenían un porcentaje de ocupación gonadal mayor del 20% (25,60% - 26,52% - 24,54% y 21,36%) y cuatro presentaban una ocupación próxima al 15% (13,89% - 16,40% - 17,33% y 17,06%). Esta ocupación era debida a la presencia de ovocitos maduros a punto de ser desovados o que no habían sido expulsados tras el desove. Los dos individuos restantes tenían una ocupación gonadal de 5,89% (pequeños folículos con espermatogonias en las paredes) y de 0,0% (sólo células vesiculares y hemocitos). El porcentaje de ocupación gonadal total por células sexuales era: **% GT** = 16,86 (d.e = 8,58).

Muestreo 1: 26 días.

Tras 26 días de acondicionamiento, se analizaron estereológicamente seis individuos de cada uno de los acondicionamientos ensayados para calcular el porcentaje de ocupación gonadal.

1 l/h 3%

En la figura 238, se muestran los porcentajes de ocupación femenina y masculina de los 6 individuos acondicionados con un flujo de 1l/h y una ración de dieta del 3%, y se podían observar que dos individuos superaban el 30% de ocupación gonadal femenina (31,42% y 38,96%) y otros dos superaban el 10% (18,59% y 10,05%), los dos restantes apenas

presentaban gónada femenina (0,59% y 0,00%). El porcentaje medio de gónada femenina era, **% GF** = 16,60 (d.e = 16,11). En cuanto a la gónada masculina, tres de los individuos apenas poseían representación masculina (de 0,0 a 1,52%) pero otros tres presentaban unas ocupaciones más altas: 8,34% - 20,90% y 50,07% (tratándose de individuos que se encuentran desovando como macho). El porcentaje medio de gónada masculina era, por lo tanto, **% GM** = 13,59 (d.e = 19,53).

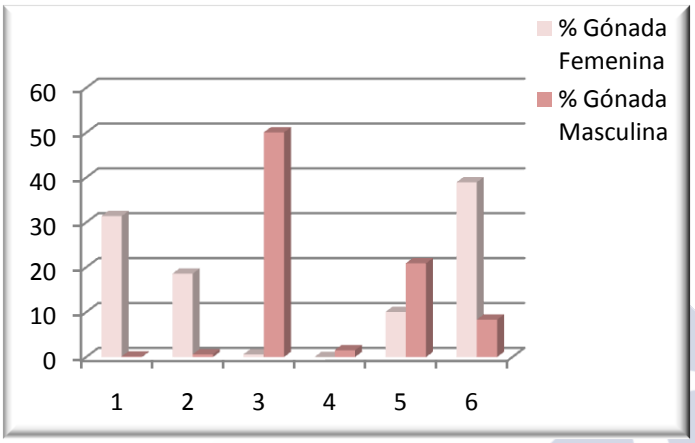


Fig. 238. Porcentajes de ocupación gonadal femenina y masculina de los individuos acondicionados con un flujo de 1l/h y una ración del 3% de alimento durante 26 días (n=6).

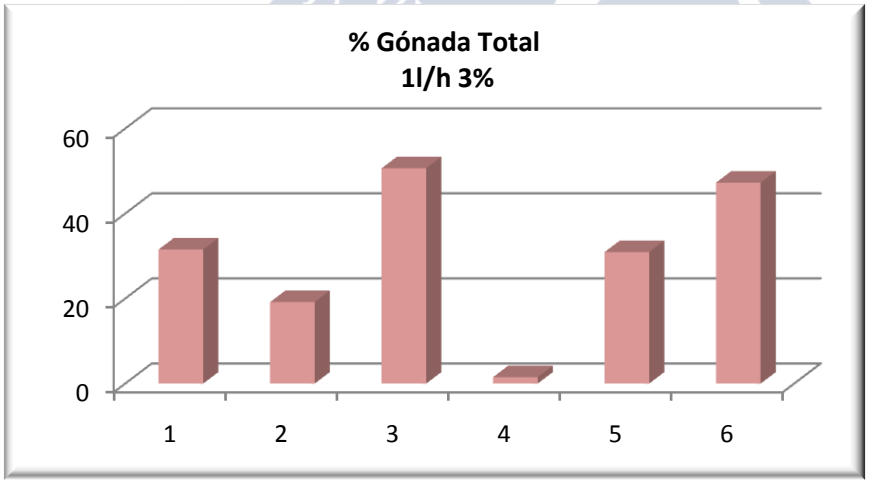


Fig. 239. Porcentajes de ocupación gonadal total de los individuos acondicionados con un flujo de 1l/h y una ración del 3% de alimento durante 26 días (n=6).

El porcentaje de gónada total (Figura 239) mostraba cuatro individuos con una ocupación muy alta, superior al 30% (31,55% - 50,66% - 30,95% y 47,29%) y los otros dos individuos presentaban ocupaciones más bajas: 19,18% (ovocitos muy maduros con mucha reabsorción) y 1,52% (células vesiculares reestructuradas y restos de desove masculino). **% GT** = 30,19 (d.e = 18,20).

1 l/h 6%

Bajo las condiciones de acondicionamiento de 1l/h de flujo del agua y una dieta del 6% (Figura 240) se pudo ver, que excepto uno, todos los individuos tenían representación femenina pero sólo eran ocupaciones elevadas en dos de ellos: 18,59% y 38,69%. Respecto a la gónada masculina, presentaba unas ocupaciones más altas en todos los individuos, salvo en uno que no estaba presente. Las ocupaciones masculinas eran: 17,73% - 28,27% - 27,45% - 19,97% - 30,69%. Todos los individuos presentaban mórulas de esperma muy maduro y comenzando el desove, excepto el individuo nº5 que se trataba de una hembra pura con los ovocitos muy maduros. Las ocupaciones gonadales medias eran: **% GF** = 11,83 (d.e = 14,69) y **% GM** = 20,68 (d.e = 11,32).

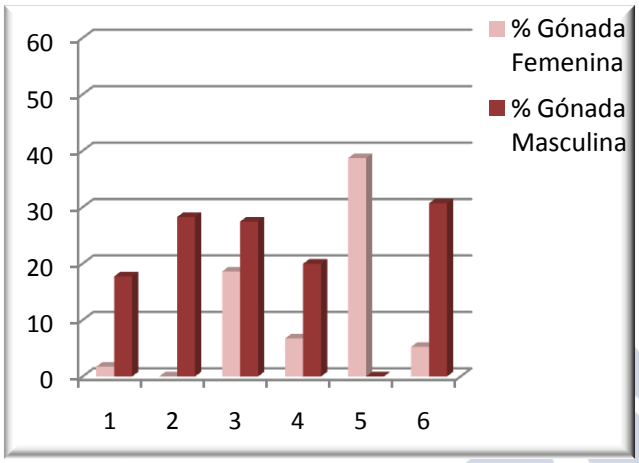


Fig. 240. Porcentajes de ocupación gonadal femenina y masculina de los individuos acondicionados con un flujo de 1l/h y una ración del 6% de alimento durante 26 días (n=6).

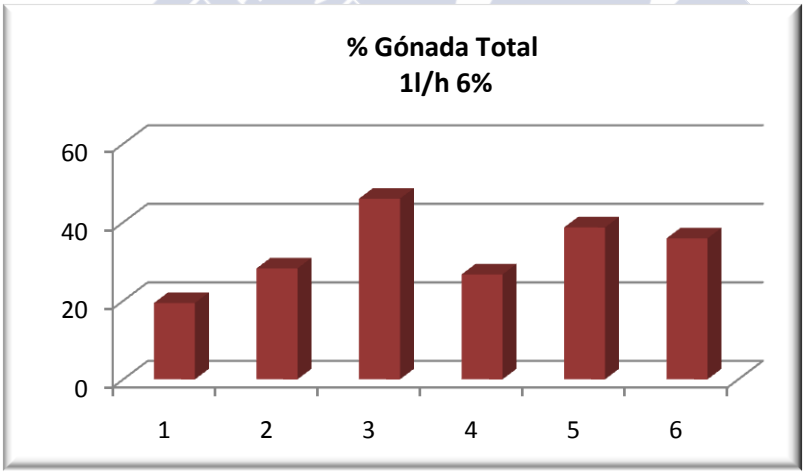


Fig. 241. Porcentajes de ocupación gonadal total de los individuos acondicionados con un flujo de 1l/h y una ración del 6% de alimento durante 26 días (n=6).

Las ocupaciones totales medias de los individuos analizados (Figura 241) mostraban altos porcentajes de ocupación; uno de los individuos superaba el 40% (46,03%), dos superaban el 35% (38,69% y 35,91%), otros dos superaban el 25% (28,27% y 26,72%) y el individuo con la gónada menos ocupada tenía una ocupación de 19,45%. El porcentaje de ocupación total media era: **% GT** = 32,51 (d.e = 9,54).

1 l/h 9%

Bajo las condiciones de 1l/h de flujo y un 9% de dieta se observó un menor desarrollo en la gónada de los individuos (Figura 242), con claros signos de desoves anteriores. Se encontraron dos individuos con un porcentaje de ocupación femenina altos: 16,60% y 40,87%. Los restantes individuos tenían una ocupación femenina inferior al 1%; siendo la ocupación femenina media **% GF** = 9,67 (d.e = 16,65). En cuanto a la gónada masculina, cuatro de los individuos tenían unas ocupaciones destacables: 15,41% - 7,61% - 8,93% y 4,76%. El porcentaje medio de gónada masculina era, **% GM** = 6,18 (d.e = 5,80).

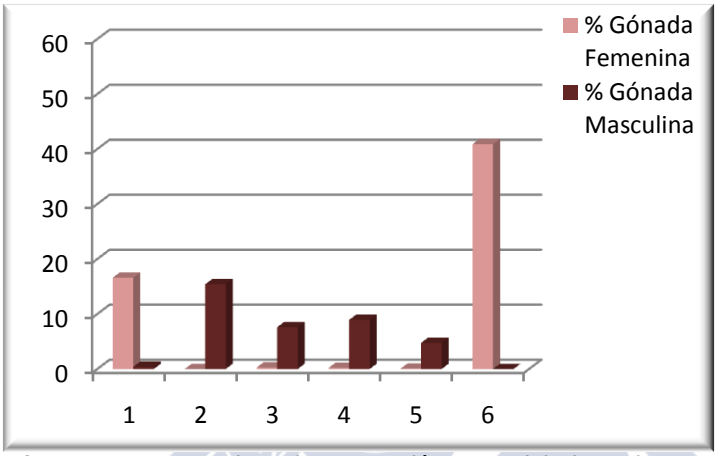


Fig. 242. Porcentajes de ocupación gonadal femenina y masculina de los individuos acondicionados con un flujo de 1l/h y una ración del 9% de alimento durante 26 días (n=6).

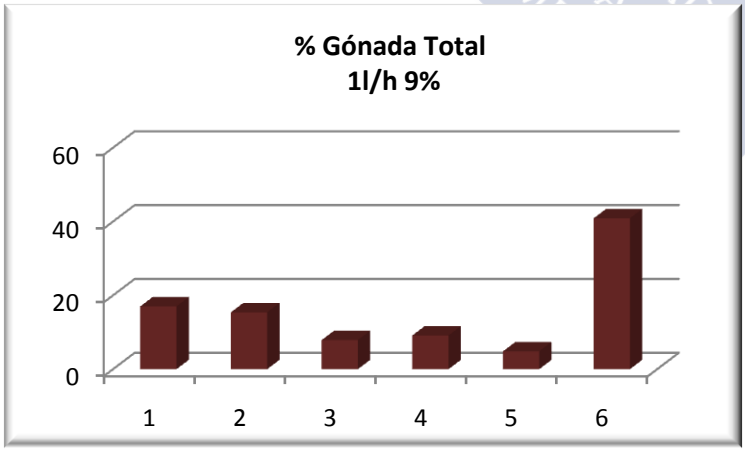


Fig. 243. Porcentajes de ocupación gonadal total de los individuos acondicionados con un flujo de 1l/h y una ración del 9% de alimento durante 26 días (n=6).

En la figura 243, se representa la ocupación gonadal total de los individuos analizados. Uno de los individuos superaba el 40% (40,87%) y otros dos que superaban el 15% (17,00% y 15,41%), los tres restantes eran del orden del 7,87%, 9,13% y 4,83% de ocupación. Todos los individuos, salvo el 6, mostraban síntomas de haber desovado ya o de haber desovado parcialmente. Así, el **% GT** = 15,85 (d.e = 13,10).

2 l/h 3%

En la figura 244 se muestran los seis individuos analizados y que habían sido acondicionados durante 26 días con un flujo de 2l/h y con una ración de alimento del 3%. Dos de ellos poseían un porcentaje de gónada femenina que superaba el 15% (25,46% y 15,74%), otros dos se encontraban con unos porcentajes de ocupación próximos al 5% (4,83% y 6,55%), y los otros dos no llegaban al 1%. **% GF** = 8,93 (d.e = 9,85). Con respecto a la ocupación masculina de la gónada, destacaba un individuo con el 23,68% de ocupación masculina, tres individuos poseían unos porcentajes de ocupación masculina próximos al 15% (14,49% - 16,20% y 17,00%). **% GM** = 12,20% (d.e = 9,29).

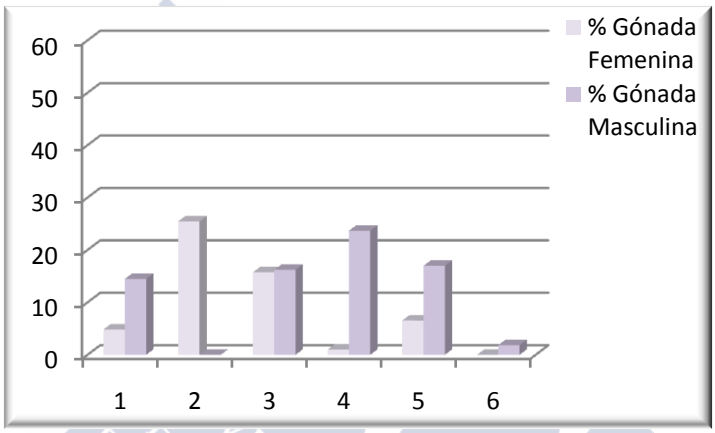


Fig. 244. Porcentajes de ocupación gonadal femenina y masculina de los individuos acondicionados con un flujo de 2l/h y una ración del 3% de alimento durante 26 días (n=6).

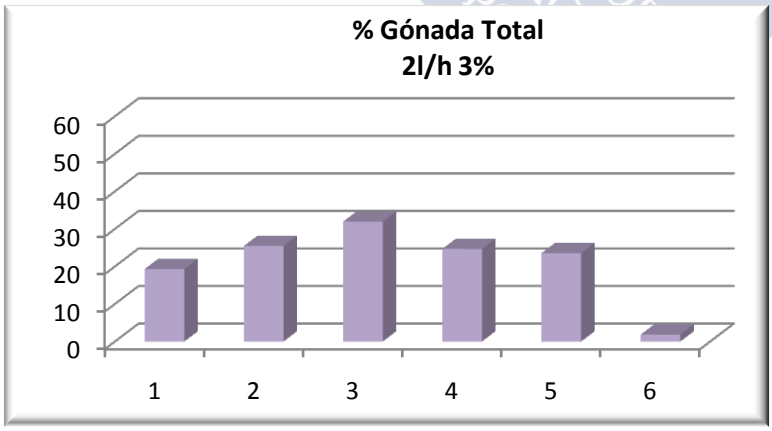


Fig. 245. Porcentajes de ocupación gonadal total de los individuos acondicionados con un flujo de 2l/h y una ración del 3% de alimento durante 26 días (n=6).

En la figura 245, se muestran los porcentajes de ocupación gonadal total de los individuos analizados; destaca la ocupación de 31,95% de uno de los individuos, cuatro de los individuos tenían unos porcentajes de ocupación gonadal próximos al 20%: 19,32% - 25,46% - 24,67% - 23,55%. El último, presentaba una ocupación de 1,85% y se debía a restos de esperma que no había sido evacuado en un desove anterior. **% GT** = 21,13 (d.e = 10,29).

2 l/h 6%

En la figura 246 destaca la ocupación del tejido gonadal por gónada femenina, que estaba presente en todos los individuos y con porcentajes de ocupación elevados. Dos de los individuos superaban el 30% de ocupación femenina (36,44% y 41,73%), otros tres estaban próximos al 20% (19,78% - 19,44% y 19,18%). El individuo 5, que también presentaba ocupación masculina, tiene una ocupación femenina de casi el 10%. **% GF** = 24,40 (d.e = 12,09). La gónada masculina estaba presente sólo en dos de los individuos pero sólo era destacable (11,97%) en uno de ellos. **% GM** = 2,09 (d.e = 4,84).

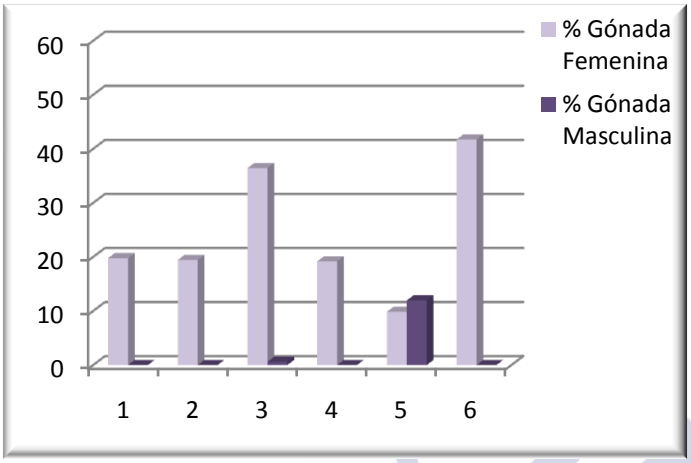


Fig. 246. Porcentajes de ocupación gonadal femenina y masculina de los individuos acondicionados con un flujo de 2l/h y una ración del 6% de alimento durante 26 días (n=6).

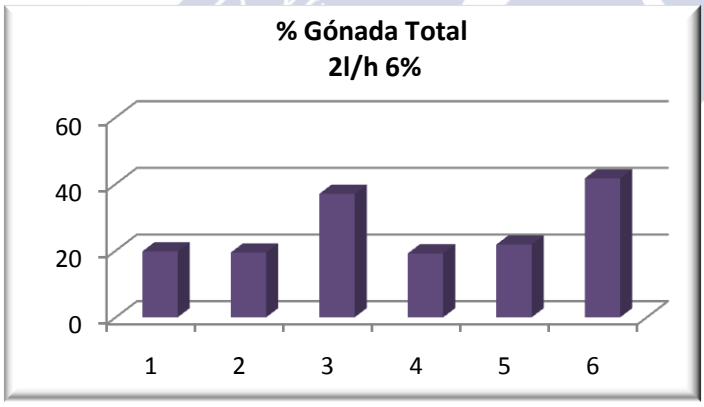


Fig. 247. Porcentajes de ocupación gonadal total de los individuos acondicionados con un flujo de 2l/h y una ración del 6% de alimento durante 26 días (n=6).

Los porcentajes totales de ocupación de los seis individuos analizados (Figura 247) se debían sobre todo a la parte sexual femenina y eran los siguientes: 19,78% - 19,44% - 37,04% - 19,18% - 21,83% y 41,73%. Todos los individuos eran hembras, con ovocitos maduros próximos al desove o con signos de reabsorción excepto el número 5, que ya estaba desovando como macho y los folículos estaban llenos de ovocitos ya maduros. **% GT** = 26,50 (d.e = 10,13).

2 l/h 9%

En la figura 248 se observa que la gónada femenina estaba presente en todos los individuos, con unos porcentajes dispares, tres por debajo del 5% (0,79% - 3,37% y 1,19%) y tres con porcentajes más elevados: 10,25% - 19,05% y 46,83% (hembra pura con ovocitos maduros). El porcentaje medio de gónada femenina era, **% GF** = 13,58 (d.e = 17,71). La ocupación masculina era más alta ya que todos los individuos se encontraban en fase de macho maduro, excepto el número 6 que es una hembra pura madura. Los porcentajes de ocupación masculina eran: 27,52% - 60,52% - 12,30% - 35,52% y 26,46%. Así, que el porcentaje medio de ocupación gonadal masculina era, **% GM** = 27,05 (d.e = 20,70).

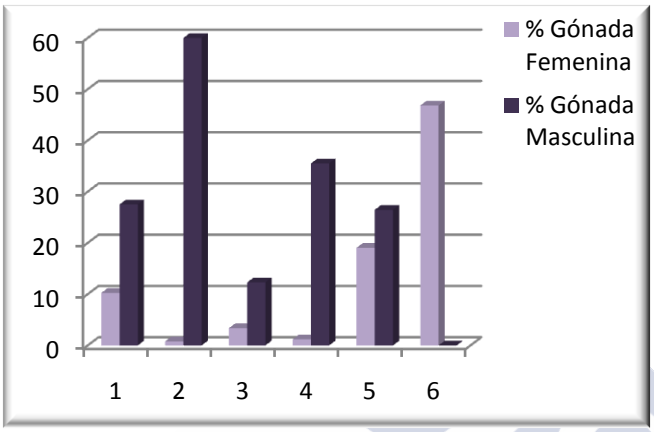


Fig. 248. Porcentajes de ocupación gonadal femenina y masculina de los individuos acondicionados con un flujo de 2l/h y una ración del 9% de alimento durante 26 días (n=6).

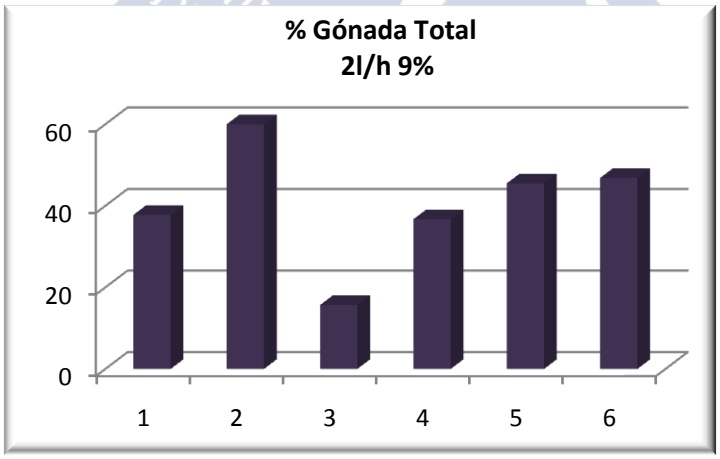


Fig. 249. Porcentajes de ocupación gonadal total de los individuos acondicionados con un flujo de 2l/h y una ración del 9% de alimento durante 26 días (n=6).

Las ocupaciones totales medias de los individuos analizados (Figura 249) mostraban unos altos porcentajes de ocupación; tres de los individuos superaban el 40% (61,31% - 45,50% y 46,83%), dos superaban el 30% (37,77% y 36,71%) y el individuo con la gónada menos ocupada tenía una ocupación de 15,67%. El porcentaje de ocupación total media era: **% GT** = 40,63 (d.e = 15,07).

3 l/h 3%

Se analizó el porcentaje de ocupación gonadal de seis individuos sometidos a 3l/h de flujo de agua y con una ración del 3% (Figura 250). La gónada femenina estaba presente sólo en tres de los individuos de forma destacable (17,00% - 22,03% y 18,85%), en los otros tres el porcentaje era bajo (0,46% - 1,06% y 3,97%). La ocupación femenina media era: **% GF** = 10,56 (d.e = 9,77). En cuanto a la gónada masculina, en un individuo no estaba presente (se trataba de una hembra pura), tres presentaban ocupaciones próximas al 10% (8,67% - 15,94% y 15,08%) y dos de ellos presentaban unos porcentajes de ocupación masculina que superaban el 40% (42,20% y 41,40%). **% GM** = 20,55 (d.e = 17,42).

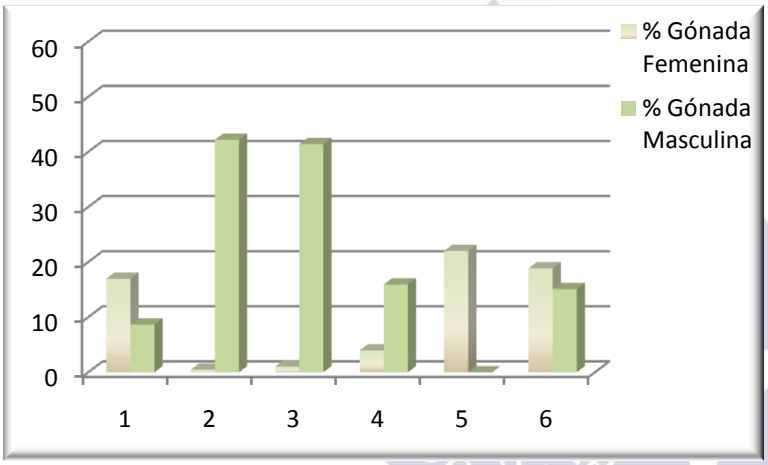


Fig. 250. Porcentajes de ocupación gonadal femenina y masculina de los individuos acondicionados con un flujo de 3l/h y una ración del 3% de alimento durante 26 días (n=6).

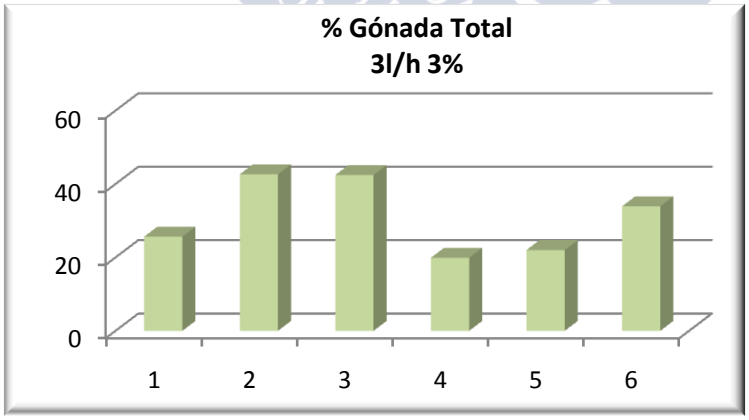


Fig. 251. Porcentajes de ocupación gonadal total de los individuos acondicionados con un flujo de 3l/h y una ración del 3% de alimento durante 26 días (n=6).

Los porcentajes de ocupación gonadal total eran elevados, casi todos superaban el 20%: 25,66% - 42,66% - 42,46% - 19,91% - 22,03% y 33,93%. Así, el porcentaje de ocupación total media era: **% GT** = 31,11 (d.e = 10,08).

3 l/h 6%

Entre los individuos analizados en este muestreo se encontraban dos hembras puras, los cuatro individuos restantes presentaban tanto ocupación gonadal femenina como masculina (Figura 252). La ocupación femenina superaba el 30% en tres individuos (40,61% - 34,86% y 31,15%) y en los otros tres rondaba el 10% (14,09% - 8,60% y 17,79%). La ocupación femenina media era: **% GF** = 24,52 (d.e = 12,78). En cuanto a la ocupación masculina, uno de los individuos destacaba por su ocupación (35,98%) y los otros tres tenían unas ocupaciones de: 10,12% - 7,81% y 18,39%. Así, **% GM** = 12,05 (d.e = 13,60).

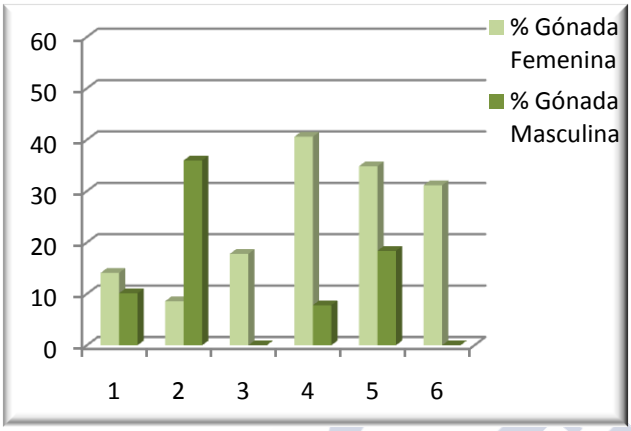


Fig. 252. Porcentajes de ocupación gonadal femenina y masculina de los individuos acondicionados con un flujo de 3l/h y una ración del 6% de alimento durante 26 días (n=6).

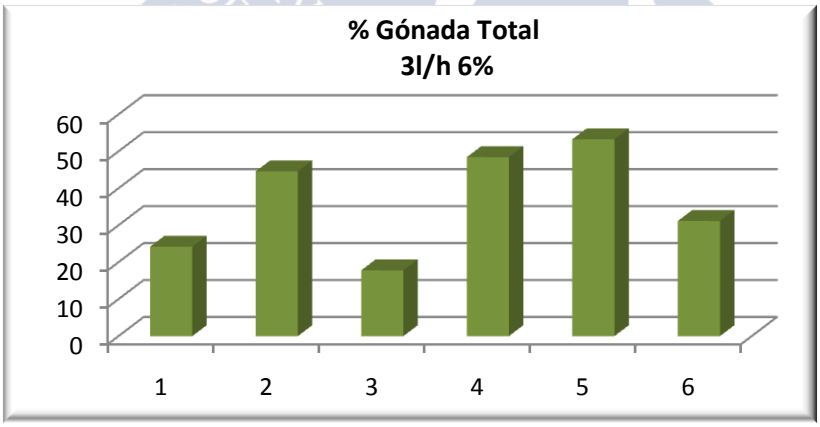


Fig. 253. Porcentajes de ocupación gonadal total de los individuos acondicionados con un flujo de 3l/h y una ración del 6% de alimento durante 26 días (n=6).

En la figura 253, se representa la ocupación gonadal total de los seis individuos analizados y se observa que tres de ellos superaban el 40% (44,58% - 48,41% y 53,24%) y los otros eran inferiores pero superaban el 17% (24,21% - 17,79% y 31,15%). El porcentaje medio de ocupación gonadal para este acondicionamiento era, **% GT** = 36,56 (d.e = 14,26).

3 l/h 9%

Entre los individuos analizados, se encontró una hembra pura madura y además cuatro presentaban un buen desarrollo gonadal femenino (15,81% - 16,07% - 18,98% y 24,80%) y otros dos presentaban una ocupación más baja (5,89% y 3,37%). La media de ocupación femenina era, **% GF** = 14,15 (d.e = 8,10). La ocupación masculina sólo era destacable en cuatro individuos (31,48% - 12,44% - 27,25% y 44,71%), los otros dos tenían unas ocupaciones inferiores al 1%. **% GM** = 19,48 (d.e = 17,95).

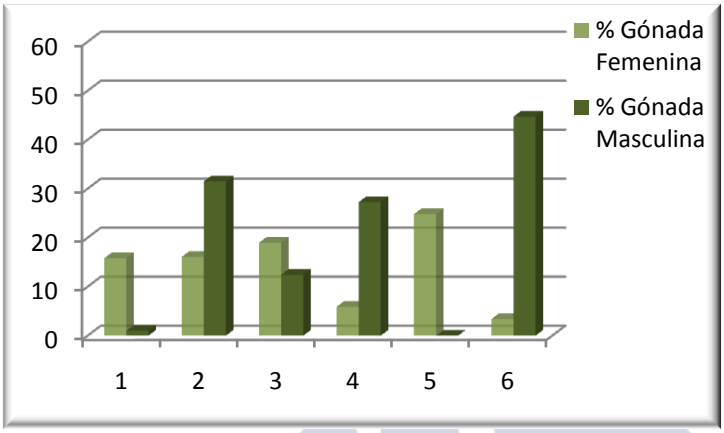


Fig. 254. Porcentajes de ocupación gonadal femenina y masculina de los individuos acondicionados con un flujo de 3l/h y una ración del 9% de alimento durante 26 días (n=6).

Al observar las ocupaciones totales medias de cada individuo analizado (Figura 255), destacaba el porcentaje de ocupación de dos individuos que superaban el 40% (47,55% y 48,08%), otros tres que superaban el 20% (31,42% - 33,14% y 24,80%), y el menos desarrollado presentaba una ocupación total del 16,80%. Así: **% GT** = 33,63 (d.e = 12,40).

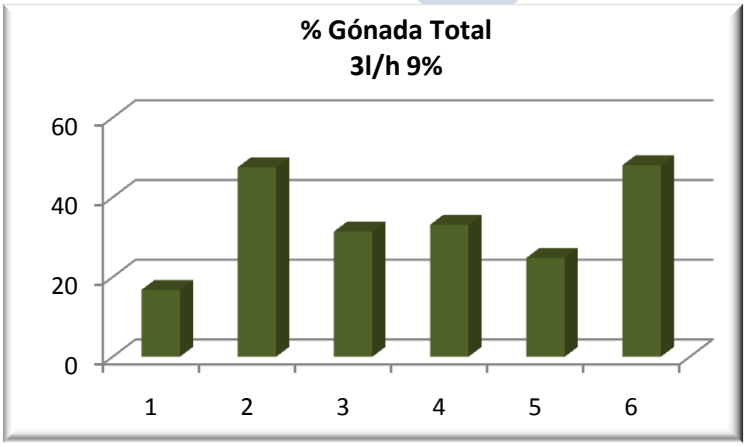


Fig. 255. Porcentajes de ocupación gonadal total de los individuos acondicionados con un flujo de 3l/h y una ración del 9% de alimento durante 26 días (n=6).

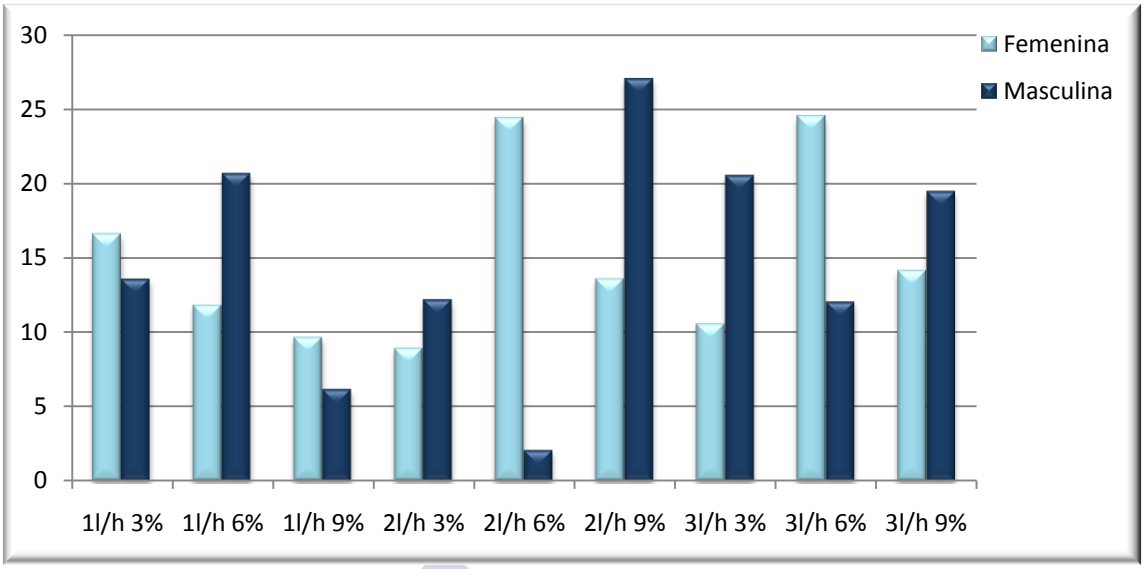


Fig. 256. Porcentajes medios de ocupación gonadal femenina y masculina para los diferentes acondicionamientos después de 26 días.

En las figuras 256 y 257 se muestran los porcentajes medios de ocupación gonadal femenina y masculina de los individuos analizados en cada uno de los acondicionamientos realizados pasados 26 días. Como se puede observar había una gran variabilidad en cuanto al sexo que se estaba desarrollando en la gónada. En todos los acondicionamientos había ocupación por gónada femenina y masculina pero no seguía una pauta fija. Lo más destacable era la proporción hembra/macho en los individuos acondicionados con un flujo de 2l/h y una dieta del 6%, todos los individuos analizados eran hembras con ovogonias ya maduras y la parte masculina se debía a restos de mórulas espermáticas de un desove anterior que aún no habían sido eliminadas.

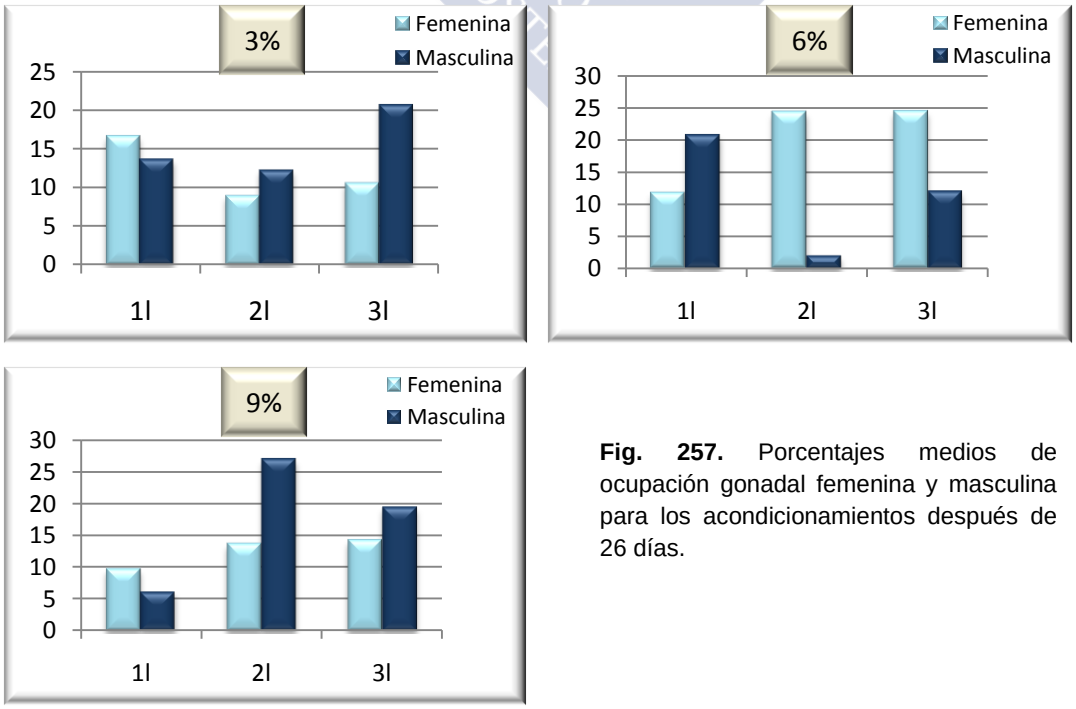


Fig. 257. Porcentajes medios de ocupación gonadal femenina y masculina para los acondicionamientos después de 26 días.

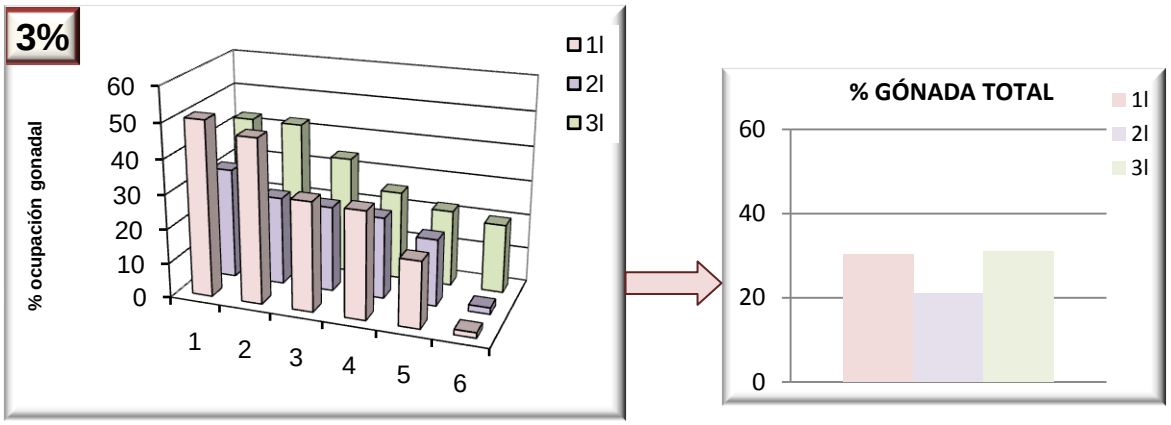


Fig. 258. Porcentaje medio de ocupación gonadal de cada uno de los individuos acondicionados con una dieta del 3% y sometidos a las tres condiciones de flujo de agua, analizados a los 26 días.

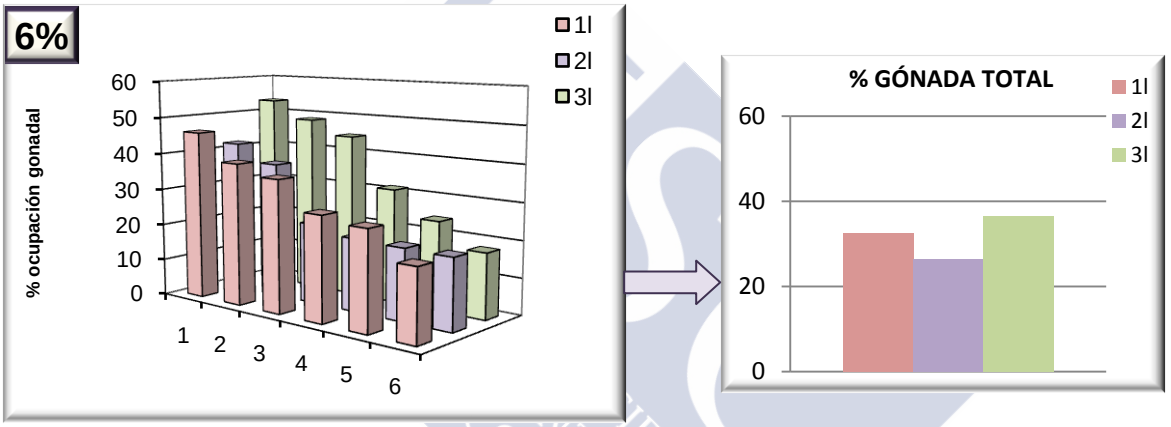


Fig. 259. Porcentaje medio de ocupación gonadal de cada uno de los individuos acondicionados con una dieta del 6% y sometidos a las tres condiciones de flujo de agua, analizados a los 26 días.

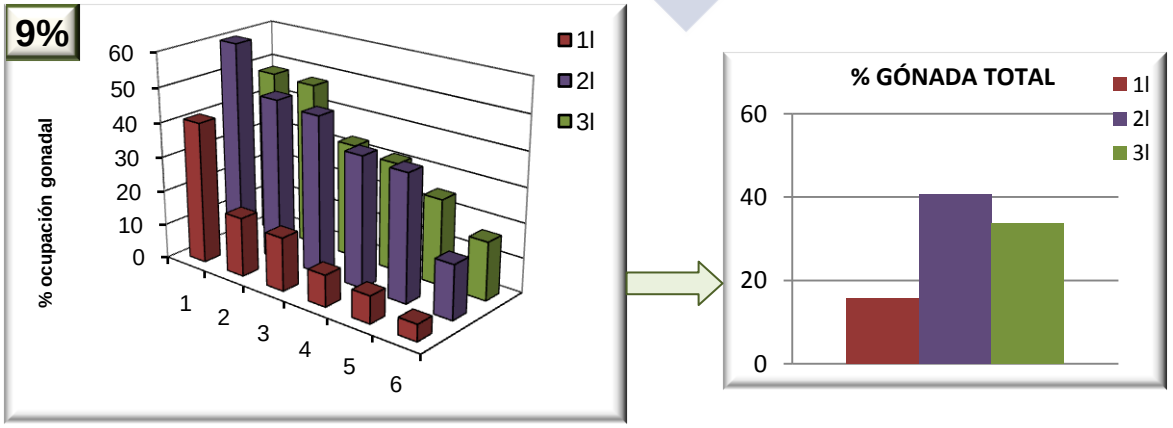


Fig. 260. Porcentaje medio de ocupación gonadal de cada uno de los individuos acondicionados con una dieta del 9% y sometidos a las tres condiciones de flujo de agua, analizados a los 26 días.

En la figura 258 se muestran los porcentajes medios de ocupación gonadal de todos los individuos acondicionados con una ración de alimento del 3% y tres flujos de agua distintos. Mientras los individuos acondicionados con 1l/h y 3l/h tenían una media de desarrollo gonadal muy similar (30,19% y 31,11%), los individuos que recibían un flujo de agua de 2l/h presentaban un porcentaje medio de ocupación gonadal inferior (21,13%) y el porcentaje de ocupación individual de todos individuos analizados en este acondicionamiento era menor que en las otras dos condiciones.

En la siguiente gráfica (figura 259) se pueden observar los porcentajes medios de ocupación gonadal de los individuos analizados y que habían sido acondicionados con una ración de alimento del 6% y tres flujos de agua diferentes. En todos los casos, el porcentaje medio de ocupación gonadal había aumentado pero seguía el mismo patrón que los acondicionados con el 3% de alimentación, es decir, los individuos acondicionados con 1l/h (32,51%) y 3l/h (36,56%) de flujo de agua mostraban una ocupación superior a los acondicionados con 2l/h (26,50%).

Los porcentajes medios de ocupación gonadal de los individuos acondicionados con una dieta del 9% se muestran en la figura 260. Se puede observar que la ocupación gonadal media de los individuos analizados que habían sido sometidos a un flujo de 1l/h era muy inferior a las otras dos condiciones ensayadas (15,85%). Las otras dos condiciones mostraban unas ocupaciones gonadales mucho mayores, 40,63% para los acondicionados con 2l/h y 33,63% para los acondicionados con 3l/h, doblando la ocupación obtenida para 1l/h.

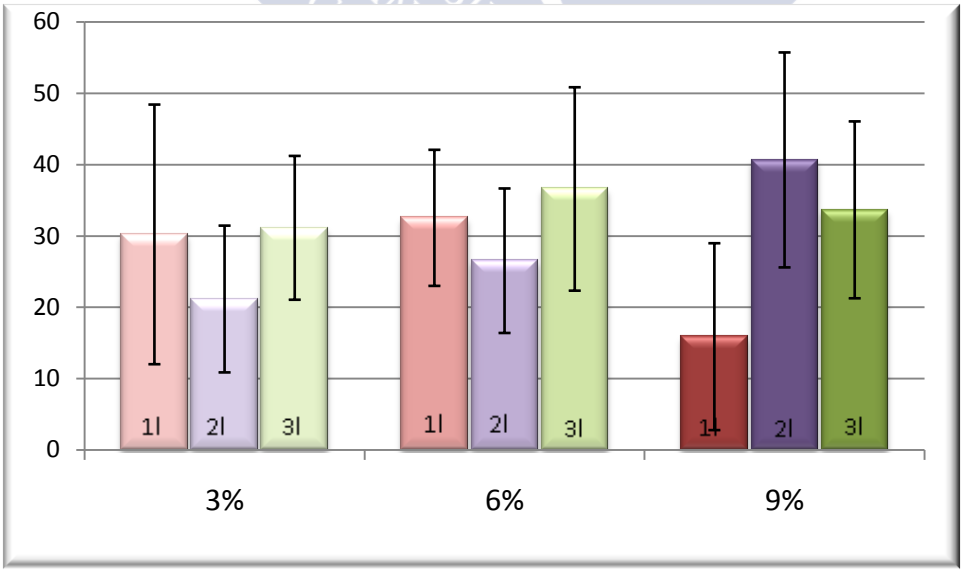


Fig. 261 Porcentajes de ocupación media y desviaciones estándar de los individuos sometidos a los diferentes acondicionamientos a lo largo de todo el experimento.

En la figura 261 se comparan los porcentajes medios de ocupación gonadal obtenidos en el primer muestreo para cada uno de los nuevo tipos de acondicionamiento estudiados, así como sus desviaciones estándar.

4. DESOVES.

Una vez acondicionados los individuos y analizados los porcentajes de ocupación gonadal de cada uno de los individuos acondicionados, se encontraron desoves a principios del mes de Junio, tras un mes de acondicionamiento (Fig. 262).

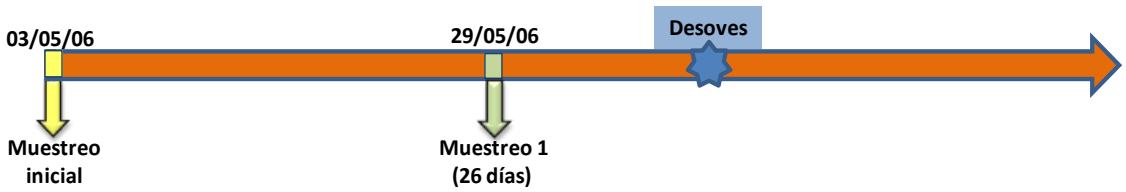


Fig. 262. Esquema que muestra las fechas de los muestreos realizados y la obtención de los desoves.

En las tablas 42, 43 y 44 se representan las fechas de los desoves y el número de larvas obtenidas en los individuos acondicionados con una ración de alimento del 3%, 6% o 9% y los tres flujos de agua ensayados.

Tabla 42. Fecha de los desoves y número de larvas liberadas por los individuos acondicionados siguiendo una dieta del 3% y con los tres flujos de agua ensayados.

3%

1l/h	2l/h	3l/h
05/06/06 1.500.000 larvas		
13/06/06 300.000	09/06/06 450.000 larvas	09/06/06 1.500.000 larvas
14/06/06 1.200.000	13/06/06 1.200.000	14/06/06 3.000.000
23/06/06 400.000	14/06/06 4.500.000	16/06/06 750.000
	22/06/06 1.300.000	
	25/06/06 450.000	
TOTAL 3.400.000 larvas	**TOTAL** 7.900.000 larvas	**TOTAL** 5.250.000 larvas

Como se observa en la tabla 42 y en la figura 263, de los individuos acondicionados con una ración de alimento del 3%, los individuos que recibían un flujo de agua de 1l/h fueron los primeros en iniciar los desoves, cuatro días antes del inicio de los desoves en los individuos acondicionados con los otros flujos de agua. Sin embargo, el número de larvas obtenidas con estas condiciones de acondicionamiento era mucho menor que el obtenido en los otros dos

casos, el mayor número de larvas obtenidas correspondía a los individuos acondicionados con 2l/h de flujo de agua.

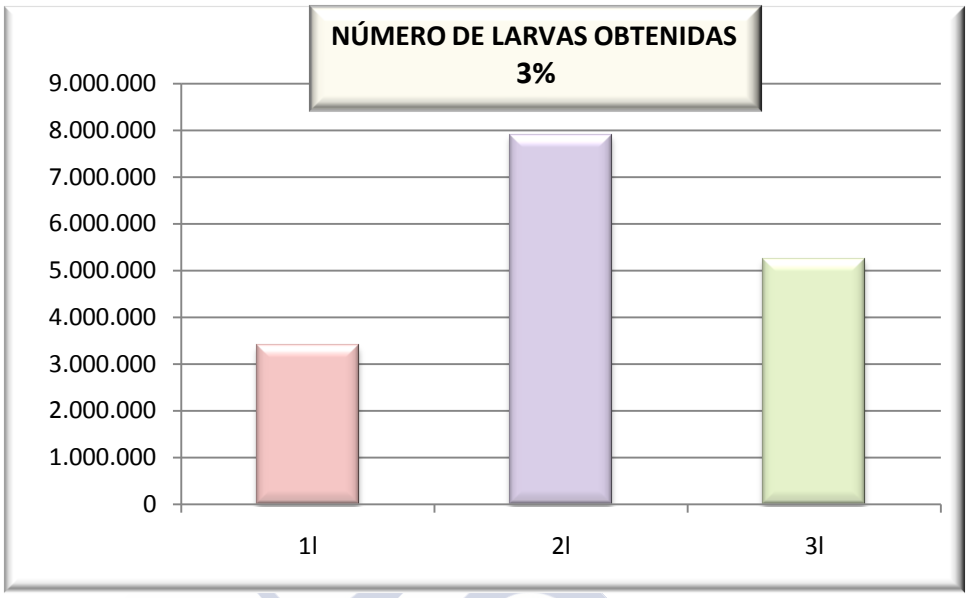


Fig. 263. Número de larvas liberadas en los distintos tipos de acondicionamientos.

MORTALIDAD:

1l/h	2l/h	3l/h
10%	20%	50%

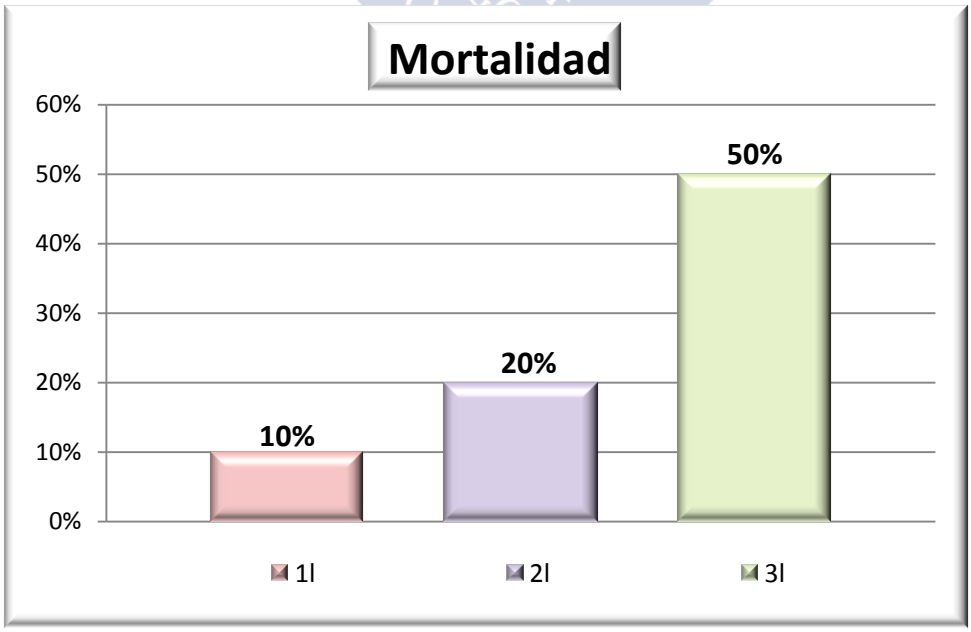


Fig. 264. Porcentajes de mortalidad de progenitores producida en cada uno de los acondicionamientos realizados con una ración de alimento del 3%.

Cuando se analizaba la mortalidad obtenida en los progenitores acondicionados con una ración de alimento del 3% y los tres flujos de agua ensayados (Fig. 264) se observaba una mortalidad del 10% de los progenitores en los individuos acondicionados con un flujo de 1l/h, el doble de mortalidad (20%) en los progenitores acondicionados con 2l/h y un 50% en los progenitores acondicionados con el flujo de 3l/h.

Tabla 43. Fecha de los desoves y número de larvas liberadas por los individuos acondicionados siguiendo una dieta del 6% y con los tres flujos de agua ensayados.

6%		
1l/h	**2l/h**	**3l/h**
05/06/06 850.000 larvas		05/06/06 500.000 larvas
23/06/06 1.500.000	09/06/06 500.000 larvas	12/06/06 350.000
25/06/06 2.500.000	12/06/06 900.000	13/06/06 1.500.000
	14/06/06 3.000.000	27/06/06 2.000.000
	21/06/06 600.000	
	23/06/06 700.000	
TOTAL 4.850.000 larvas	**TOTAL** 5.700.000 larvas	**TOTAL** 4.350.000 larvas

En la tabla 43 se representan las fechas de los desoves y el número de larvas obtenidas en los individuos acondicionados con una ración de alimento del 6% y los tres flujos de agua ensayados. Los primeros desoves fueron obtenidos al mes aproximadamente del inicio del acondicionamiento.

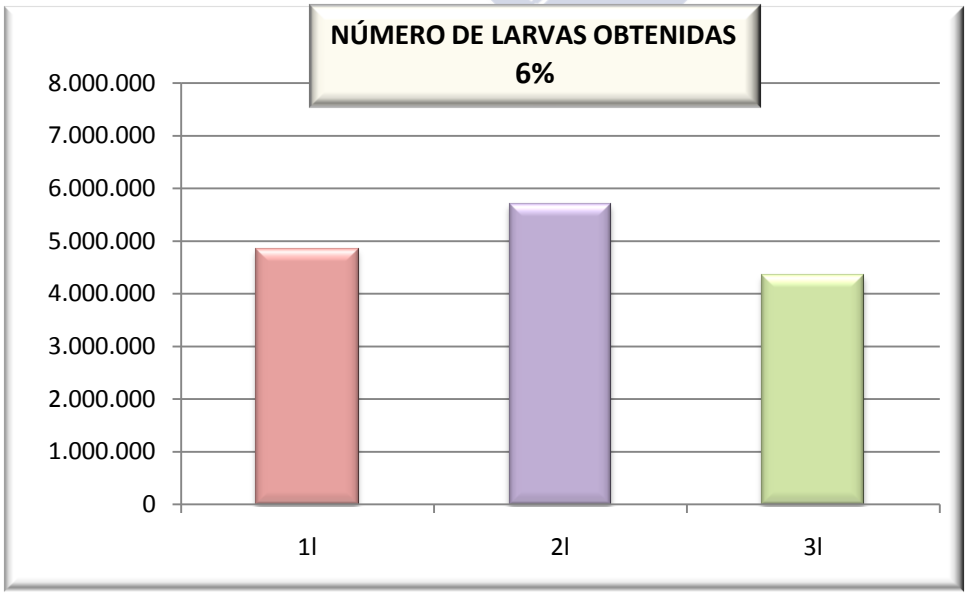
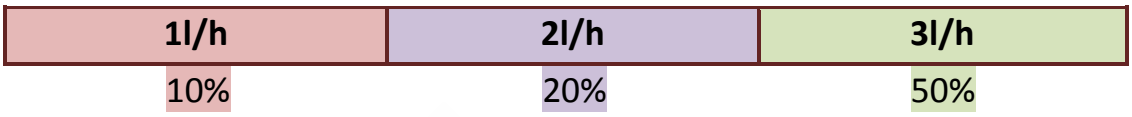


Fig. 265. Número de larvas liberadas en los distintos tipos de acondicionamientos.

En cuanto al número de larvas liberadas (figura 264) se encontraron menores divergencias que en los acondicionados con una ración de alimento del 3%. El mayor número de larvas liberadas correspondía al tanque de los individuos acondicionados con un flujo de 2l/h, seguido por los individuos acondicionados con 1l/h (casi un millón de larvas menos) y los acondicionados con 3l/h (unas 1.500.000 larvas menos).

MORTALIDAD:



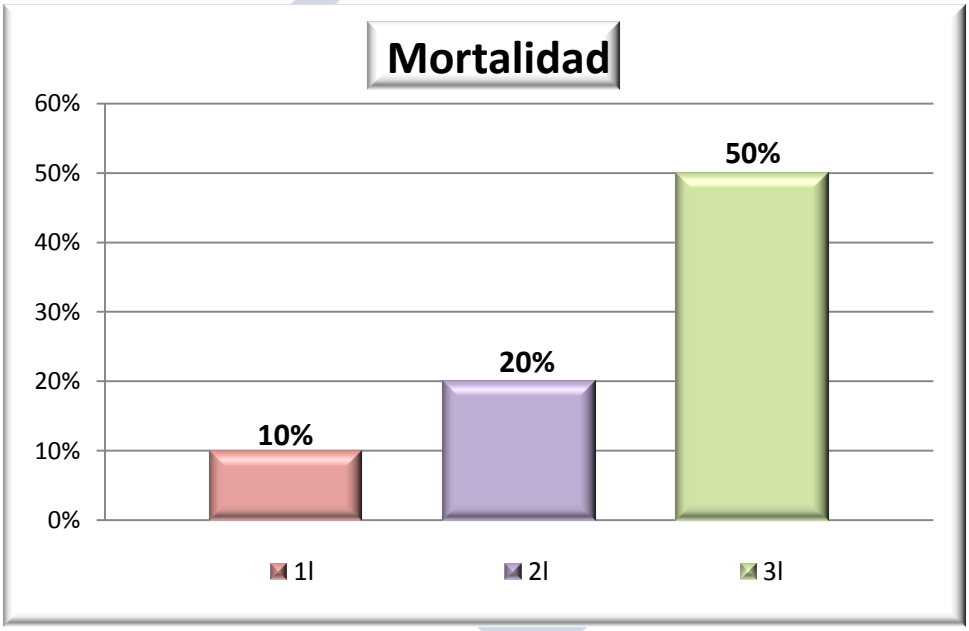


Fig. 266. Porcentajes de mortalidad de progenitores producida en cada uno de los acondicionamientos realizados con una ración de alimento del 6%.

En la figura 266 se muestra la mortalidad obtenida en los progenitores acondicionados con una ración de alimento del 6% y los tres flujos de agua ensayados. El porcentaje más elevado de mortalidad (50%) se presentaba en los individuos acondicionados con el flujo de 3l/h, seguidos por los acondicionados con 2l/h (menos de la mitad, 20%) y por los progenitores acondicionados con un flujo de 1l/h (10%).

En la tabla 44 se muestran las fechas de desove y el número de larvas obtenidas en los individuos acondicionados con una dieta del 9%. Los primeros en iniciar los desoves fueron los individuos acondicionados con un flujo de 3l/h, aunque el número de larvas obtenidas era menor que con las otras dos condiciones de flujo.

Tabla 44. Fecha de los desoves y número de larvas liberadas por los individuos acondicionados siguiendo una dieta del 9% y con los tres flujos de agua ensayados.

9%					
1l/h		**2l/h**		**3l/h**	
				03/06/06	1.800.000 larvas
09/06/06	2.000.000 larvas			16/06/06	2.000.000
12/06/06	200.000	13/06/06	1.500.000 larvas		
17/06/06	750.000	14/06/06	3.000.000		
25/06/06	1.500.000				
TOTAL	4.4500.000 larvas	**TOTAL**	4.500.000 larvas	**TOTAL**	3.800.000 larvas

El número total de larvas obtenidas con una ración de alimento del 9% (figura 267) era muy similar cuando los flujos utilizados eran del 1l/h y 2l/h y ligeramente inferior con un flujo de 3l/h, unas 700.000 larvas menos.

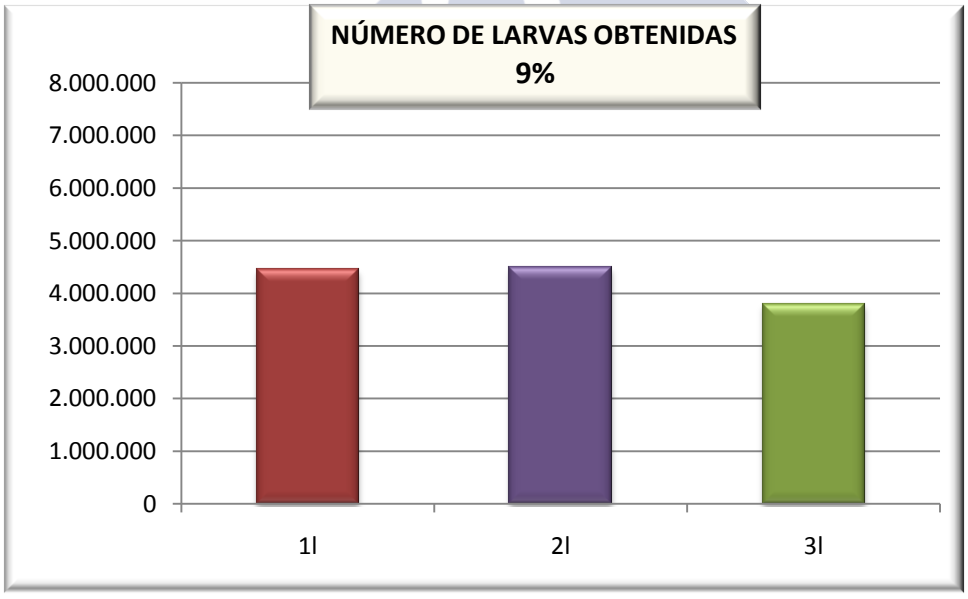


Fig. 267. Número de larvas liberadas en los distintos tipos de acondicionamientos.

MORTALIDAD:

1l/h	2l/h	3l/h
5%	30%	60%

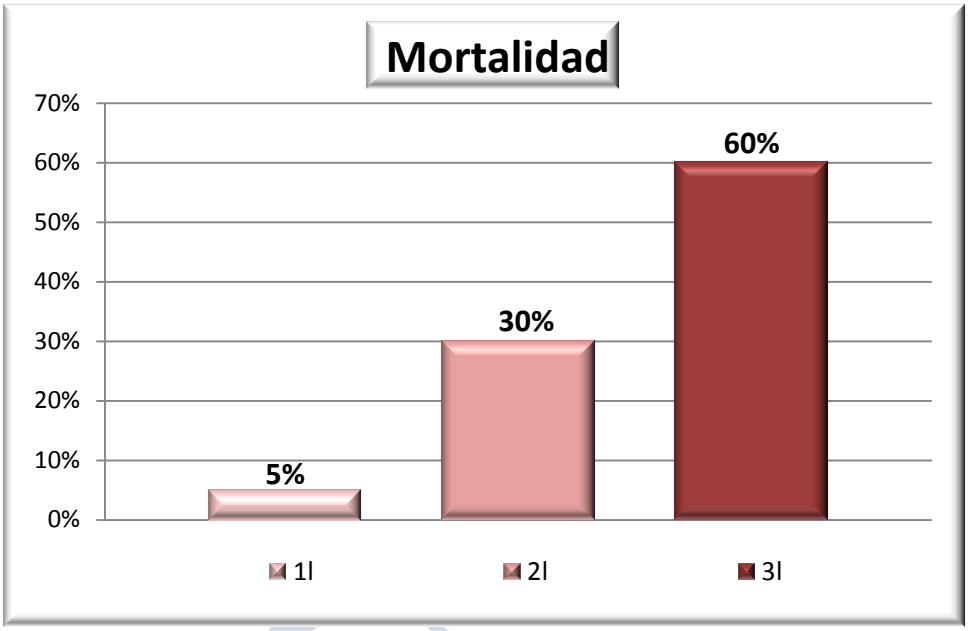


Fig. 268. Porcentajes de mortalidad de progenitores producida en cada uno de los acondicionamientos realizados con una ración de alimento del 9%.

Como se puede observar el la figura 268, la mortalidad obtenida en los reproductores acondicionados con 3l/h era muy superior a los otros dos casos (flujos de 1l/h o 2l/h), alcanzando el 60%. En los individuos acondicionados con un flujo de 2l/h, la mortalidad era del 30% mientras que los individuos acondicionados con 1l/h apenas llegaban al 5% de mortalidad.

5. RESULTADOS ESTADÍSTICA.

No había diferencias significativas entre los flujos ni tampoco entre las dietas. Pero sí era significativa la interacción de ambos factores, en concreto, se encontraron diferencias significativas en los individuos acondicionados con 2l/h entre los que recibían una dieta del 3% y los del 9%; también se veían diferencias en los alimentados con el 9% entre los flujos de 1l/h y 2l/h. (Ver Tablas personalizadas. Experimento 8. Anexo Estadística).

Tabla 45.- Resultados del ANOVA realizado en el Experimento 8, utilizando la variable dependiente Ocupación y los factores flujo y dieta.

Tests of Between-Subjects Effects

Source	Dependent Variable	F	Sig.
Corrected Model	Ocupacion	2.120	.053
Intercept	Ocupacion	289.794	.000
Flujo	Ocupacion	1.576	.218
Dieta	Ocupacion	.527	.594
Flujo * Dieta	Ocupacion	3.189	.022
Error	Ocupacion		
Total	Ocupacion		
Corrected Total	Ocupacion		

a. R Squared = .274 (Adjusted R Squared = .145)

5. DISCUSIÓN

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

5. DISCUSIÓN.

Acondicionamiento:

En este trabajo hemos utilizado un circuito abierto de agua de mar para llevar a cabo los acondicionamientos experimentales. Otros trabajos anteriores utilizaron sistemas recirculantes para el acondicionamiento de reproductores de moluscos bivalvos, pero desde los experimentos de Millican y Helm (1994), en que se puso de manifiesto el efecto positivo del suministro de microalgas durante el acondicionamiento, se ha optado por sistemas abiertos con un aporte continuo de microalgas cultivadas en el laboratorio.

El contacto físico entre las ostras puede dificultar la apertura total de las valvas y, por consiguiente, la ingestión de alimento (Jørgensen, 1990). Cuando hay contacto físico entre los organismos, se puede inhibir la ingestión de alimento por los individuos vecinos, o las valvas pueden sufrir algún daño, provocando que las ostras destinen más energía para su recuperación (Holliday *et al.*, 1991). Por esta razón, en este trabajo se han colocado durante el acondicionamiento sólo 30 individuos por cubeta con el fin de evitar el contacto físico entre los individuos acondicionados y así prevenir los posibles problemas.

Con respecto al acondicionamiento experimental de los progenitores, es importante señalar que las condiciones de luz y temperatura son diferentes de las condiciones bajo las que están sometidas las ostras en el medio natural. Es conveniente, por tanto, que las ostras se vayan aclimatando gradualmente, por ejemplo, aumentando 1 ^{o}C al día la temperatura a la que se van a acondicionar (Wilson, 1981). Por lo cual, los individuos sometidos a gradiente de temperatura se acondicionaban en un principio con agua a temperatura ambiente y se aumentaba la temperatura gradualmente, 1 ^{o}C a la semana aproximadamente, hasta alcanzar los 18 ^{o}C finales para evitar "shocks" térmicos o estrés. Lo mismo sucede con el acondicionamiento de los individuos sometidos a gradiente de fotoperíodo, a los que se les iban aumentando gradualmente las horas de luz, en un régimen temporal similar a lo anteriormente descrito para la temperatura.

La tecnología habitualmente utilizada para el acondicionamiento de ostra en criadero sigue los métodos iniciales desarrollados en diversos criaderos en Inglaterra y Francia (Polanco y Corral, 2002) donde se utilizaban temperaturas de 20 ^{o}C y superiores para estimular el desarrollo gametogénico y las puestas de larvas. Resultados previos en nuestro laboratorio mostraron que temperaturas de 20 ^{o}C y superiores suponían un incremento considerable de proliferación bacteriana, que puede afectar de forma importante a los primeros estadíos de la vida larvaria y al éxito del cultivo. Estos mismos estudios mostraron como una reducción de dos grados en la temperatura de acondicionamiento permitía mantener en niveles mucho más aceptables las poblaciones bacterianas asociadas. Por otra parte, desde el punto de vista de

manejo en el criadero este hecho supone un importante ahorro económico y energético. Para los acondicionamientos realizados en este estudio se ha utilizado una temperatura máxima de 18 ºC, que refleja aproximadamente la temperatura máxima que se encuentra en las aguas de Galicia.

Dieta y ración de alimento:

Es importante calcular la cantidad de alimento que se les suministra en el acondicionamiento a los bivalvos ya que, según Utting y Millican (1997), la fecundidad y calidad de la puesta aumenta cuando se les suministra en la dieta cultivos de microalgas como suplemento.

Inicialmente se eligió una ración de alimento del 6% (del peso seco de la ostra en peso seco de microalgas) para los estudios del efecto del fotoperíodo y temperatura ya que en experimentos previos se obtuvieron buenos resultados con estas condiciones. Utting y Millican (1997) revisaron las técnicas de acondicionamiento y propusieron un valor del 6% en peso seco de microalgas, en relación al peso del molusco, como la ración ideal de alimento para la mayoría de especies criadas a una temperatura de 20-22 ºC e indicaban que un 3% podía ser suficiente para especies cultivadas a temperaturas más bajas.

En el presente trabajo la cantidad de alimento suministrado a las ostras se controló regulando el flujo de la mezcla de algas, mediante un circuito dosificador conectado al circuito de agua de mar y reajustando la ración de alimento cada vez que se extraían individuos de las cubetas.

Las dietas mixtas de especies de microalgas de alto valor nutritivo, diseñadas en términos de calidad y/o cantidad de lípidos, producen unos mejores resultados que las dietas monoalgales. El preacondicionamiento de los reproductores en regímenes de gran cantidad de alimento antes de acondicionar a mayor temperatura y horas de luz permite aumentar las reservas metabólicas que estos animales necesitan durante la vitelogénesis (Utting y Millican, 1997).

Existen muchos estudios sobre los diversos aspectos relacionados con los ciclos de reservas en los bivalvos y su relación con la reproducción (Barber y Blake, 1991; Giese, 1969; Bayne, 1976; Gabbot, 1975 y 1983). Los moluscos bivalvos marinos muestran ciclos de almacenamiento y utilización de energía íntimamente relacionados con el ciclo gametogénico y las actividades metabólicas estacionales son un reflejo de complejas interacciones entre el alimento disponible, las condiciones ambientales, su crecimiento y la actividad reproductora (Gabbott, 1983). Sin embargo, en *Ostrea edulis* no se ve una clara separación entre la gametogénesis y el almacenamiento de reservas ya que pueden ocurrir simultáneamente

(Gabbott, 1975). Este hecho también está apoyado por los resultados obtenidos por Ruiz *et al*. (1992). Si bien, hay que admitir variaciones estacionales en la composición lipídica y de ácidos grasos en *Ostrea edulis* (Abad *et al*., 1995)

Debido a la falta de conocimiento de las necesidades nutritivas de los moluscos, y para asegurarse el suministro de una dieta óptima en calidad, los suplementos algales deberían contener siempre un mínimo de dos o tres especies de microalgas (Utting y Millican, 1997).

Según Barber y Blake (1985) los glúcidos son la fracción metabólicamente más activa, debido a su eficiente producción de ATP y a su disponibilidad para el metabolismo anaeróbico (Gabbott, 1976). Gabbott (1975) indicaba la posible existencia de un ciclo de trasformación de glucógeno en lípidos similar al existente en los vertebrados. La ruptura de la glucosa produce los precursores necesarios para la síntesis de triglicéridos



En los bivalvos, igual que en otros animales, los lípidos neutros tienen como función principal actuar como una reserva energética. Los lípidos polares son los componentes estructurales de las membranas celulares y, en algunos casos, los fosfolípidos pueden ser utilizados como reserva energética para los ovocitos.

Es importante determinar la composición química de las microalgas con el objetivo de proporcionar el equilibrio nutricional necesario para el metabolismo de las ostras acondicionadas. Muchos autores han evaluado el valor biológico de muchas de las microalgas utilizadas en acuicultura, sobre todo en lo que hace referencia a la composición en lípidos y ácidos grasos (Zhukova y Aizdaicher, 1994; Medina Reyna y Cordero Esquivel, 1998; Junior *et al*., 2007; Patil *et al*., 2006; Brown M.R., 1991; Brown *et al*., 1997; Acarli *et al*., 2011; Farías y Uriarte, 2002; Guedes *et al*., 2010; Miller *et al*., 2012; Custodio *et al*., 2014).

Dentro de lo poco que se conoce con respecto a las necesidades nutritivas de los moluscos bivalvos, está bien establecido que la composición en ácidos grasos de los lípidos complejos es esencial para el óptimo crecimiento y desarrollo de los organismos marinos (Ruiz, 1992). Las mejores dietas son las que tienen una alta proporción de PUFAs, ácido eicosapentanoico 20:5 (n-3) y ácido docosahexaenoico 22:6 (n-3), ya que la mayoría de los bivalvos son incapaces de producir éstos *de novo* desde precursores de cadena corta (Chu y Greaves, 1991).

El contenido en PUFAs de las larvas de *O. edulis* en el momento de su liberación depende de las condiciones ambientales durante el engorde de reproductores y de la

gametogénesis temprana (PUFAs de fosfolípidos, fundamentalmente) y, después, de las condiciones durante las últimas etapas del desarrollo ovocitario (PUFAs de lípidos neutros, fundamentalmente) (Helm et al., 1991). De hecho, el crecimiento larvario y su éxito en la metamorfosis ha sido relacionado con el nivel de lípidos totales y lípidos neutros en el momento de la liberación de las larvas (Helm et al., 1973).

Por tanto, el análisis de la composición en ácidos grasos de las microalgas utilizadas fue considerado imprescindible para asegurar el suministro más correcto posible de ácidos grasos esenciales a estos moluscos. De acuerdo con la composición individual de ácidos grasos de las diferentes especies de microalgas se diseñó una dieta mixta que trató de reflejar la composición en ácidos grasos de las larvas de ostra recién liberadas en el medio natural (Ruiz, 1992).

La extracción de lípidos totales se realizó mediante el método de Folch *et al*. (1957), con las modificaciones propuestas por Beninger y Lucas (1984), utilizando como mezcla extractora cloroformo-metanol 2:1 (V/V). Este método es el más comúnmente empleado, como se pone de manifiesto en la recopilación de Hubbard *et al*. (1977), quien compara siete procesos de extracción para lípidos, ácidos grasos, colesterol y otros esteroles. En el año 1992, Fenton llega a la misma conclusión después de revisar diversos métodos de extracción, saponificación, derivatización y análisis cromatográfico, para la separación y determinación del colesterol de los alimentos. Algunos autores consideran la necesidad del empleo de antioxidantes durante la extracción, pero los extractos de los lípidos totales están protegidos por los antioxidantes naturales (ácido ascórbico, tocoferol, etc.) que están presentes en la muestra y que son igualmente extraídos (Wren y Szczoabiwska, 1964), por lo tanto, no hemos considerado necesario el empleo de antioxidantes.

***Cultivo de microalgas**:*

La luz tiene una influencia directa en el crecimiento y tasa de multiplicación de las microalgas, así que es un factor limitante en el cultivo. Debe ser luz fría. También es muy importante que la intensidad de la luz que incide en el cultivo sea la suficiente para permitir la fotosíntesis.

La aireación en los cultivos microalgales, además de ayudar en el control del pH (suministro de CO_2) sirve para favorecer la exposición de las células a la luz y para evitar la sedimentación en el recipiente de cultivo (Guerrero, 1995). Las diatomeas suelen acumularse en las zonas donde el agua no se mezcla. La aireación también es un factor muy importante para la homogeneización de los nutrientes.

Además, las microalgas presentes de forma natural en el agua de las rías, en su mayoría diatomeas, fueron cultivadas de forma extensiva en piscinas exteriores, en condiciones ambientales y con aporte de nutrientes en forma de abonos agrícolas.

Cortes histológicos:

En la realización del análisis histológico se hicieron varias pruebas para seleccionar el fijador que se iba a utilizar. Hubo que tener en cuenta varias características como la velocidad de penetración y de fijación ya que ésta tiene que ser lo más rápida posible. La velocidad de difusión de la sustancia fijadora en los tejidos es el factor limitante que determina el tamaño de la pieza que queremos fijar, más pequeña cuanto menor sea la velocidad de difusión. La velocidad de fijación no depende de la velocidad de difusión sino de las propiedades químicas del fijador y condiciona el tiempo que debe permanecer el tejido en contacto con el fijador. También hay que tener en cuenta el endurecimiento del tejido, la ósmosis y el pH y el tiempo de almacenamiento. Se pueden utilizar un gran número de fijadores, cada uno con sus pros y sus contras. Después de diversos ensayos previos, se eligió el fijador de Bouin porque era el que mejor se adaptaba al grosor de las muestras y al ritmo de trabajo realizado y, además, se conseguía una coloración más brillante en los tejidos y un mayor contraste entre las distintas estructuras presentes en la gónada.

Ciclo gonadal:

Cuando se analizaba la gónada de los progenitores de ostra plana para evaluar su estado de desarrollo gametogénico, se observaba siempre una marcada variabilidad individual e interanual. Esta diversidad era ya perfectamente observable al abrir las ostras. La gónada se encuentra localizada entre el manto y los divertículos digestivos (Coe, 1932; Galtsoff, 1938; Loosanoff, 1942), volviéndose mucho más opaca y gruesa a medida que aumenta su tamaño. Posteriormente el análisis estereológico de cada individuo confirmó que esta variabilidad no afectaba solo al tamaño de la gónada si no también al grado de desarrollo gametogénico (ver capítulo de Resultados).

Sastry (1979) afirmaba que el ciclo reproductor de una especie de bivalvo era una respuesta al medioambiente, controlada genéticamente, que se producía por una interacción de factores ambientales, especialmente temperatura, salinidad, luz y alimento, y de factores endógenos. En general, los moluscos bivalvos se ven influenciados por los cambios estacionales de temperatura, dependiendo de la distribución geográfica de las poblaciones. La existencia de distintas razas fisiológicas de *Ostrea edulis* con respecto a su desarrollo gonadal y su diferenciación genética ha sido demostrada a lo largo de la costa europea, tal y como se

describió en la Introducción de esta tesis. Las poblaciones de *O. edulis*, presentes en Galicia desovan por encima de 12-13 °C, produciéndose larvas en el medio natural desde principios de primavera hasta octubre o noviembre.

En moluscos bivalvos, el desarrollo gonadal depende del almacenamiento y utilización de las reservas acumuladas en el cuerpo durante los períodos de máxima producción de fitoplancton. La gametogénesis se produce tanto a expensas del alimento recién ingerido como de la energía previamente almacenada en los tejidos. Por lo tanto, es lógico encontrar diferencias tanto en el ciclo gametogénico como en las pautas de almacenamiento y utilización de las reservas energéticas, que se deban principalmente a la influencia de las condiciones ambientales. Por otra parte, una ostra sana convierte todo el glucógeno almacenado en productos sexuales, durante el período de tiempo en que las temperaturas son suficientemente altas para la maduración. Cuando la temperatura se vuelve demasiado baja para la gametogénesis, las células sanguíneas invaden y digieren los folículos y productos sexuales residuales, y comienza el almacenamiento de glucógeno para el siguiente ciclo (Andrews, 1979).

Teniendo en cuenta que en nuestras aguas las temperaturas, durante la mayor parte del año, no son un factor limitante para la gametogénesis, la temporada de producción larvaria se extiende desde marzo-abril a octubre-noviembre y, no es de extrañar que, en algunas zonas, se encuentren dos picos reproductivos, uno en primavera y otro a final del verano (Ruíz *et al*., 1992). Hay un innegable decremento de la intensidad de las actividades de desove cerca del fin de la estación de reproducción, aunque la temperatura sea favorable. Este fenómeno de "debilidad" podría ser debido a una prolongación del período de recuperación que tiene lugar entre una fase de desove masculino y la siguiente fase femenina (Korringa, 1941).

No existe bibliografía reciente acerca de la proporción de sexos a lo largo del ciclo gonadal anual en *O. edulis*. En 1926, Orton señalaba que la proporción de hembras disminuía gradualmente durante la estación de cría, observándose un máximo al comienzo de ese período (principios de verano). Al final de la temporada de cría observaba mínimos del 0 al 5%. También era observada una mayor abundancia de machos a lo largo de todo el año (Orton, 1927, Cole, 1942). Cole (1942) señaló que durante el invierno se podían encontrar individuos en una gran variedad de formas sexuales, pero no se encontraban mórulas espermáticas en desarrollo desde enero hasta marzo. En este trabajo se han encontrado repetidas veces mórulas de esperma maduro durante este período. En general es aceptado que las ostras pasan por repetidos cambios de sexo comenzando por el desarrollo de la parte masculina, al inicio de su ciclo gonadal anual, y una vez maduras como machos y después del desove, se produce el desarrollo de los ovocitos en los folículos, comportándose como hembras (Cole, 1942). Por lo tanto, antes de abordar cualquier experimento de acondicionamiento, es necesario evaluar el estado de desarrollo gametogénico inicial de los progenitores de ostra. En

general podemos decir que en los experimentos iniciados en otoño (octubre-noviembre), las ostras se encontraban mayoritariamente en un estado de reposo gonadal, con lo cual no podían ser adjudicadas a ninguno de los dos sexos. En invierno (enero-marzo), se encontraban presentes ambos sexos en el mismo folículo, en diferente grado de desarrollo (ver capítulo de Resultados). Estos hechos se repitieron a lo largo de los diferentes años de trabajo de esta tesis doctoral.

Pesos y medidas.

En primer lugar debe destacarse las diferencias de talla y peso de los individuos existentes entre los distintos experimentos realizados. A pesar de haber sido seleccionados por similitud de talla para cada experimento de acondicionamiento, los individuos mostraban diferencias importantes de peso entre ellos, tanto en el peso del individuo como en el peso de la vianda.

La longitud de los individuos analizados no es un buen parámetro por sí sólo ya que no informa al 100% del crecimiento (Walne, 1958). En el estudio realizado por Walne, en las ostras analizadas el peso también disminuía desde principios de noviembre a finales de marzo, tanto en las ostras sembradas en el suelo como en las cestas, aumentando gradualmente a partir de esta fecha. Este autor sugirió que el principio y el final de la estación de crecimiento (entendiéndolo como incremento del diámetro y el peso total) estaban controlados en mayor medida por la temperatura y también por la disponibilidad de alimento. Estos resultados diferían de los obtenidos por Orton en 1928, donde los individuos analizados seguían dos períodos de crecimiento, cuando la temperatura del agua rondaba los 10 ^{o}C, es decir, en primavera y otoño y no aumentaban su diámetro durante el verano ya que lo utilizaban para conseguir reservas de energía para el desove. Korringa (1955) afirmaba que las ostras seguían una tasa normal de crecimiento durante el período de desove siempre que la disponibilidad de alimento fuese óptima. Andreu y Arte(1956) demostraron que el crecimiento de ostras jóvenes en la Ría de Vigo estaba más relacionado con la concentración de diatomeas de pequeño tamaño que con la temperatura, ya que la temperatura era suficientemente alta para que el crecimiento durase todo el año.

Hay que tener en cuenta que, una vez ya recogidos los animales del medio y antes de proceder al acondicionamiento experimental, se les había mantenido durante una-dos semanas en el criadero con las condiciones ambientales, es decir, con luz natural y la temperatura del agua a la que se encontraba el mar en ese momento, y con aporte extra de alimento. Esta aclimatación servía para que se recuperaran del estrés sufrido y comenzasen a alimentarse de manera normal.

Todos los Pmi (Peso medio individuo) de los individuos analizados en el muestreo inicial de los diferentes experimentos eran muy dispares, el peso más bajo se encontró en el Exp. 5 (70´98 g) y el más elevado en el Exp. 2 (149´86 g). Lo mismo sucedía con los Pmv (Peso medio vianda), encontrando el menor peso en el Exp. 1 (8´2 g) realizado en otoño y el máximo en el Exp. 8 (21´97 g) realizado en primavera. No se encontraron diferencias claras entre los pesos iniciales de los animales acondicionados en otoño y en invierno.

	OTOÑO				INVIERNO			PRIMAVERA
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Exp. 6	Exp. 4	Exp. 5	Exp. 7	Exp. 8
Pmi	82´5 g	149´86 g	92´73 g	122´75 g	106´66 g	70´98 g	147´62 g	145´55 g
Pmv	8´20 g	16´37 g	15´09 g	16´07 g	13´89 g	9´72 g	16´60 g	21´97 g

La mayoría de los individuos acondicionados mostraron caídas en los pesos medios individuales y en los pesos medios de la vianda con respecto a los analizados en el muestreo inicial. Probablemente se deba a que fueron mantenidos a temperaturas superiores a las que alcanza la temperatura del agua en el mar en esa época y necesitan un período de adaptación metabólica. El aumento de la temperatura, en general, da lugar a un aumento en las tasas metabólicas y, presumiblemente, al incremento en la demanda de energía. Esta demanda en los criaderos de ostras es cubierta con un aporte extra de comida o movilizando las reservas de glucógeno y proteínas almacenadas. Por lo tanto, las altas temperaturas y la baja disponibilidad de alimento son importantes factores de estrés que deben ser considerados cuando se acondicionan ostras adultas en criadero (Gabbot y Walker, 1971).

Durante este trabajo de tesis se pudo ver que en la mayoría de los experimentos realizados, independientemente de la época del año (lo que conlleva un estadío de desarrollo gonadal determinado), los Pmi calculados tras pesar a los individuos muestreados son menores que los Pmi de los individuos analizados antes de iniciar el acondicionamiento y, éstos sólo se recuperan en los experimentos en los que el tiempo de acondicionamiento supera los dos meses y, en mayor grado, en los individuos que habían sido acondicionados con más horas de luz (16h y GF) y con G de temperatura, siempre y cuando no hubiese desoves o grandes sueltas de esperma previas. Con el Pmv ocurría algo similar, salvo algunas excepciones, la vianda tendía a engordar, en mayor medida en los individuos sometidos a las condiciones óptimas de luz y temperatura. Después de las puestas, la gónada perdía peso. En los experimentos de acondicionamiento con diferentes niveles de ración de alimento, ocurría algo similar, en los individuos recogidos en otoño se producía un aumento en el peso medio que iba correlacionado con el porcentaje de alimento suministrado, sin embargo, los individuos recogidos en invierno mostraban pesos medios más bajos, debido a que previamente ya se habían producido desoves o soltado esperma.

Desarrollo gonadal.

Cuando se observaron al microscopio los cortes histológicos de los individuos analizados en los muestreos iniciales de los diferentes experimentos se vio que mostraban una pauta de desarrollo gonadal acorde con la época del año en el que se realizaba el acondicionamiento.

Román (1984) propuso en estudios realizados con ostras cultivadas en batea en la ría de Arousa, que los índices de madurez de los machos sugerían que había un primer ciclo de reproducción, con dos maduraciones, entre invierno y final de primavera y que correspondían con los que actuaban como machos al principio de la temporada y aquellos que comenzaban como hembras y después del desove cambiaban a macho. Posteriormente, durante el verano, tenía lugar una nueva maduración de machos, que corresponde a aquellos individuos que empezaron el año como machos y luego desovaron como hembras. Este mismo fenómeno tenía lugar en las hembras también.

En el presente trabajo, tal y como se refirió anteriormente, las ostras acondicionadas en otoño se encontraban prácticamente en estado de reposo gametogénico, mientras que las ostras acondicionadas durante el invierno presentaban un estado de desarrollo gametogénico de nivel intermedio, con presencia de ambos sexos en los mismos folículos, aunque con diferente grado de desarrollo.

Los individuos recogidos en otoño (Exp. 1, 2, 3 y 6) mostraban, por norma general, una gónada vacía, formada en su mayor parte por células vesiculares, que son las células de reserva del tejido conectivo; apenas se encontraban folículos y los que había estaban prácticamente vacios, sólo presentaban células madre de las gonias sobre las que se va a desarrollar la gónada, haciendo difícil la diferenciación entre espermatogonias y ovogonias. En algunos individuos se podían ver zonas con folículos de mayor tamaño y que presentaban espermatogonias u ovogonias en sus paredes, pero la mayor parte de la gónada seguía ocupada por células vesiculares. En otros individuos se observaban unos pocos folículos maduros llenos de ovocitos o espermatocitos maduros, que son gametos residuales que van a ser reabsorbidos. Este es un hecho reflejado por diversos autores (Steele y Mulcahy, 1999), que proponen el proceso de reabsorción como un sistema de aprovechamiento energético que permite utilizar esa energía en el metabolismo basal de la ostra. La presencia masiva de hemocitos en los folículos de estas ostras es una evidencia de este proceso degenerativo.

Esto coincide con el estudio realizado por Ruiz en 1992 que indicaba que *Ostrea edulis,* en poblaciones naturales, se encuentra en estado de reposo gonadal en los meses de septiembre y octubre y a partir de noviembre ya muestra signos incipientes de gametogénesis. La gametogénesis es más evidente en diciembre y enero, y que en los meses posteriores de invierno y primavera la gametogénesis progresa hasta alcanzar la madurez en

Junio (Ruíz, 1992). Así lo muestran los resultados obtenidos para los experimentos de principios de invierno (Exp. 5, 7) y finales (Exp. 4) donde se apreciaban folículos de mayor tamaño con células madres, espermatogonias y espermatocitos y/o ovogonias y ovocitos previtelogénicos, además las células vesiculares iban perdiendo terreno en la gónada. En algunos individuos ya se apreciaban gametos maduros (tanto espermatozoides como ovocitos).

En los individuos analizados en primavera (Exp. 8), se observaba el tejido gonadal formado por folículos de gran tamaño, dejando ver células vesiculares entre ellos, con gametos en distintos estados de madurez, muchos de ellos próximos al desove, y otros con síntomas de haber realizado puestas de esperma ya que la gónada presentaba signos de reabsorción y gran cantidad de hemocitos junto con gametos maduros en algunas zonas. Un mes después del inicio del acondicionamiento comenzaban los desoves masivos. Estos resultados coinciden con lo observado por Ruíz (1992) en el medio natural, que detectó con el índice de madurez una puesta masiva entre mayo y junio.

Después de observar todos los cortes histológicos en el microscopio quedaba patente la gran asincronía presente en el desarrollo gonadal de *O. edulis*. Esta asincronía en el desarrollo se ha observado tanto entre los distintos individuos, como dentro de la gónada de un mismo individuo, dependiendo de la zona que se observe. Para minimizar este efecto sería necesario analizar un gran número de individuos en cada muestreo. También sería conveniente obtener cortes histológicos de todo el tejido gonadal de un individuo y así poder observar como avanza el desarrollo en función de la zona de gónada o la profundidad en el tejido.

Lo ideal sería poder observar el desarrollo gonadal de los individuos mediante técnicas no invasivas, sin necesidad de abrirlos y matarlos, y así poder observar la evolución del ciclo sexual y el desarrollo gonadal en el mismo individuo. Esto se podría lograr mediante la resonancia magnética (Davenel *et al*., 2010).

Estereología.

Los métodos estereológicos incluyen métodos de reconstrucción utilizando cortes seriados, así como métodos cuantitativos de extrapolación tratando con variables numéricas, esto constituye la denominada estereología cuantitativa (Williams, 1981).

La utilización de este método se extiende desde los estudios de distribución de frecuencia de tallas de ovocitos por análisis de imagen (Morvan y Ansell, 1988; Xie y Burnell, 1994; Laurelle *et al*., 1994; Jara Jara, 2000) hasta cálculos de las fracciones de volumen ocupado por células sexuales (Navarro *et al*., 1989; Rodríguez Moscoso y Arnáiz, 1998). Es

aconsejable utilizar estos métodos para evaluar el grado de madurez de la gónada, ya que supone una determinación más objetiva que la histología o los índices gonadales.

En este trabajo se utiliza la estereología para calcular el porcentaje de volumen gonadal ocupado por células sexuales dentro de las micrografías realizadas. El porcentaje de ocupación gonadal ha sido utilizado como indicador preciso de los cambios en el desarrollo gametogénico y de la incidencia de desoves en poblaciones naturales de bivalvos (Newell *et al*., 1982; Pazos *et al*., 2003).

Efecto de la temperatura y el fotoperíodo sobre el acondicionamiento de progenitores de* Ostrea edulis*.

La **temperatura del agua** condiciona la actividad metabólica de la mayoría de las especies acuícolas (poiquilotermos). Es el factor ambiental más frecuentemente citado como el de mayor influencia en la reproducción de los bivalvos (Sastry, 1979) y afecta al inicio y al grado de desarrollo gonadal (Lubet, 1981).

La temperatura es un factor determinante en la regulación de la reproducción de bivalvos. Frecuentemente, los cambios estacionales de temperatura han sido relacionados con el crecimiento gonadal y la gametogénesis en invertebrados marinos (Sastry, 1979). El aumento relativo en la temperatura favorece el proceso de la vitelogénesis (Robinson, 1992). En contraste, la proliferación celular que precede a la vitelogénesis parece independiente de la temperatura. Según Griffond *et al*. (1992), un incremento de temperatura durante el período pre-vitelogénico podría ser contraproducente ya que, produciría un incremento en el metabolismo, estimulando el uso de las reservas energéticas que de otra manera serían necesarias para la vitelogénesis.

Hay distintos estudios en los que se relacionan el desarrollo gonadal y la gametogénesis con las variaciones estacionales de la temperatura; así en pectínidos, Paulet y Boucher (1991) indicaron que este factor podía regular la transferencia de nutrientes hacia la gónada, influyendo de esta manera sobre el ciclo reproductor. Saout *et al*. (1999) en *P. maximus*, mostraron que las condiciones primaverales favorecen el crecimiento de la gónada mientras que las condiciones invernales favorecen el crecimiento somático en la glándula digestiva y el músculo abductor.

Sin embargo, el inicio de la gametogénesis y la liberación de las larvas tienen lugar a diferentes temperaturas en diferentes partes del mundo. Aunque *O. edulis* es nativa de aguas frías (Korringa, 1976) en sus hábitats naturales las bajas temperaturas del agua detienen la gametogénesis (Loosanoff, 1962; Wilson y Simmons, 1985). Según estudios realizados, la temperatura mínima necesaria para el inicio de la gametogénesis es de 7 ^{o}C aproximadamente

(Wilson y Simmons, 1985). Delgado y Pérez-Camacho (2003) utilizaron una temperatura constante de 18 ºC en el estudio del desarrollo gonadal en *Ruditapes decussatus* y Utting y Millican (1997) utilizaron para *Tapes philippinarum* una temperatura de 20-22 ºC. Dominguez *et al*. (2010) en su trabajo con *Mytilus galloprovincialis* aumentaban progresivamente la temperatura (0,5 ºC/día) desde la temperatura del agua del mar hasta alcanzar los 18 ºC y la mantenían constante hasta el final del experimento. En *Ostrea edulis* se emplearon distintos rangos de temperatura: Wilson (1981) mantenía el cultivo a 20 ºC; Hutchinson y Hawkins (1992) en su estudio utilizaron una temperatura de acondicionamiento de 12-19 ºC; Gabbot y Walker (1971) utilizaron un rango de temperaturas de 18-21 ºC y Berntsson *et al*. (1997) acondicionaban siguiendo un gradiente de 12 ºC a 20 ºC, aumentando 1 ºC la temperatura cada día. En general, está bien establecido, por diversos estudios en diferentes países y con diferentes especies de moluscos, que la temperatura es un factor regulador de primer orden en el desarrollo gametogénico. El desarrollo gametogénico en el medio natural progresa de forma paralela al incremento de la temperatura de las aguas y las puestas tienden a producirse en los picos máximos de temperaturas anuales. En Galicia, es práctica habitual acondicionar los progenitores de ostra situándolos en tanques a 20 ºC y suministrando alimento adicional, en forma de una dieta mixta de microalgas. Experimentos en nuestro laboratorio habían demostrado que por encima de 18 ºC no se obtenían beneficios en el desarrollo gametogénico, incrementándose de forma evidente las poblaciones bacterianas asociadas al cultivo, sinónimo de problemas en los cultivos larvarios posteriores.

En este trabajo de tesis, para poder evaluar la influencia de la temperatura del agua sobre el desarrollo de la ostra plana, se han probado distintos regímenes, 15 ºC y GT (14-18 ºC), intentando imitar la temperatura que tiene el agua de mar en otoño-invierno y en primavera-verano, respectivamente. El gradiente de temperatura comenzaba con condiciones de otoño-invierno e iba aumentando 1 ºC a la semana, aproximadamente, hasta alcanzar los 18 ºC, simulando la temperatura de la época estival. Es importante que este aumento de temperatura se haga de forma gradual para evitar problemas de estrés metabólico en el organismo.

Cuando se estudió el efecto de la temperatura del agua sobre el desarrollo gonadal de *Ostrea edulis* parecía clara la influencia positiva de la temperatura en la velocidad de desarrollo (como puede observarse en los cortes histológicos representados en las figuras 36 y 37), y en los porcentajes de ocupación encontrados (Figuras 56, 72 y 81). En los individuos acondicionados con gradiente de temperatura, el grado de ocupación era prácticamente el doble del obtenido en el caso de los individuos acondicionados con la temperatura constante de 15ºC (Fig. 72). Sin embargo, los resultados del ANOVA con respecto a la temperatura no eran significativos para un $p<0,05$, aunque se aproximaban bastante ($p=0,086$). Dos hechos pueden permitir explicar este resultado, por una parte la presencia de desoves parciales entre los muestreos 2 y 3, que lógicamente afectaron al desarrollo gametogénico cuantificado y por

otra parte, la gran variabilidad individual encontrada dentro del limitado número de ostras analizadas. A partir de estos resultados se tomó la decisión de realizar todos los acondicionamientos posteriores con un gradiente de temperatura, partiendo de una temperatura similar a la del mar en el momento que se inicia el experimento e incrementándola gradualmente hasta una temperatura máxima de 18 ^{o}C.

La luz (el **fotoperíodo)** es un factor cuya influencia en el proceso de acondicionamiento ha sido poco estudiada en bivalvos y, además, los resultados obtenidos resultan contradictorios.

Paulet y Boucher (1991) sugirieron que el índice de crecimiento de los ovocitos en *Pecten maximus* estaba más relacionado con el fotoperíodo que con la temperatura. El fotoperíodo sería el factor de regulación más importante de las distintas etapas del ciclo reproductor. También en *Pecten maximus* se observó que los individuos acondicionados con fotoperiodo constante o gradiente de luz en aumento tenían mayor crecimiento gonadal que los sometidos al fotoperíodo natural y dentro de éstos los acondicionados con gradiente presentaban un estadío más avanzado (Saout *et al*., 1999). En este mismo estudio, Saout *et al*. mostraban que un aumento simultáneo en la temperatura y fotoperíodo provocaba el crecimiento de la gónada, si no había limitaciones de comida. Pero no podían concluir cuál de los dos factores tenían mayor influencia. Duinker *et al*. (1999) propusieron que el fotoperíodo afectaba fundamentalmente la reconstrucción temprana de la gónada de *P. maximus*.

Se han publicado otros estudios sobre el efecto del fotoperíodo en bivalvos, algunos en combinación con la temperatura: Sastry (1979) señalaba que en bivalvos marinos ambos factores afectan al ciclo gametogénico anual, a la tasa de desarrollo de ovocitos diferenciados y al inicio de la puesta pero sin poder concluir la influencia de cada uno de estos factores por separado. Otro estudio, relaciona también la temperatura y el fotoperíodo con el crecimiento de los ovocitos en *Crassostrea gigas* (Chávez-Villalba *et al*., 2002) pero tampoco determina cuál de los dos factores tiene mayor influencia. En el caso del mejillón *Dreissena polymorpha*, Borcherding (1995) concluye que, así como la temperatura y la disponibilidad de alimento influye significativamente en los procesos gametogénicos, el fotoperíodo por sí solo no influye en el desarrollo gonadal de esta especie. En el trabajo de Domínguez *et al*. (2010) con *Mytilus galloprovincialis* el efecto del fotoperíodo sobre la gametogénesis y sobre el desove no parecía suficientemente claro. No obstante, estos autores encontraron una significativa y positiva diferencia entre el número de desoves y el número de horas de luz acumuladas cuando los mejillones fueron acondicionados bajo fotoperíodos de 12 y 16 horas de luz frente a los acondicionados bajo 8 horas de luz.

En nuestro laboratorio se han realizado estudios anteriores sobre la influencia del fotoperíodo en distintas clases de moluscos bivalvos. Pazos *et al.*, (2003) comprobaron que, en condiciones de laboratorio, el fotoperíodo era un factor clave en el control del inicio y

desarrollo de la gametogénesis en el acondicionamiento de la almeja fina, sugiriendo que el fotoperíodo afectaba claramente el inicio del desarrollo de la gametogénesis en *Ruditapes decussatus.* Estos autores proponían que desde el punto de vista de la producción intensiva, sería deseable el acondicionamiento en condiciones de fotoperíodo positivo (16h luz/día) para la obtención de gametos en cualquier época del año y en el menor tiempo posible. Martínez *et al*., (2005) confirmaron la influencia positiva del fotoperíodo en el desarrollo gonadal de *Ruditapes decussatus* que provocaba una aceleración en los procesos de maduración de los gametos, tanto en condiciones invernales como en verano.

En el presente trabajo se estudió el efecto que producía el número de horas de luz sobre el desarrollo gonadal de los progenitores de ostra plana que están siendo acondicionados. Este efecto se midió de una manera indirecta, a través de los resultados de estereología cuantitativa y de manera directa a través del registro de los desoves obtenidos, fecha de los desoves y número de larvas obtenidas. Se han analizado distintos fotoperiodos: 8h/luz, con intención de imitar las condiciones naturales durante el otoño-invierno; 16h/luz, que serían las horas de luz que en condiciones naturales inciden sobre las ostras en primavera-verano; y dos gradientes de luz que, partiendo desde 8 horas de luz eran aumentados aproximadamente 1 hora de luz por semana llegando hasta las 12h o las 16h, intentando imitar las horas de luz que recibirían desde el inicio hasta el final de la primavera. Para este estudio se realizaron tres experimentos iniciados en otoño (Experimentos 1, 2 y 3) y dos iniciados en invierno (Experimentos 4 y 5).

En el experimento 1, se estudió de forma combinada la posible influencia del fotoperíodo y la temperatura, para poder analizar la posible interacción entre ambos factores. El análisis estadístico de los resultados estereológicos no reveló que existiesen efectos significativos de dichas interacciones, es decir, que ambos factores parecían actuar de forma independiente. Con respecto al fotoperíodo, al realizar los PostHoc (Tukey HSD) se encontraron diferencias significativas ($p=0,003$) entre los regímenes de luz de 8h y gradiente (8-16h). Los progenitores sometidos a gradiente de luz presentaban en todo momento un mayor grado de desarrollo gonadal. Este experimento no se pudo evaluar a través indicadores directos (puestas, número de larvas, etc.). Estos resultados fueron confirmados en el experimento 2, realizado en el otoño del año siguiente, dónde también se observaban diferencias significativas ($p=0,004$) entre dichos fotoperíodos. Con respecto a la evolución del desarrollo gonadal durante los experimentos 1 y 2, es importante destacar la evidente asincronía de los progenitores sometidos a las mismas condiciones de acondicionamiento; hecho destacable si tenemos en cuenta que todos partían de la misma condición inicial, estado de reposo. Después de dos meses de acondicionamiento se produjeron desoves masivos en los tanques de ostras acondicionadas con el gradiente de luz de 8-16 h, mientras que las ostras acondicionadas con 8h de luz necesitaron prácticamente cuatro meses para desovar. A pesar de que no fueron cuantificados los primeros desoves parciales de las ostras

acondicionadas con gradiente de luz, el número de larvas registradas en este caso fue significativamente mayor que en el caso de las ostras acondicionadas con 8h de luz (6,5 millones de larvas frente a 2 millones). En el experimento 3, realizado nuevamente en otoño, se evaluó un fotoperíodo intermedio (8-12h). En este último experimento el análisis estadístico de los resultados estereológicos no fue concluyente. Conviene señalar que en este experimento las ostras acondicionadas presentaban inicialmente un porcentaje importante de folículos con desarrollo residual, es decir, no se encontraban mayoritariamente en estado de reposo. Los progenitores bajo gradiente de luz produjeron desoves parciales las dos primeras semanas de acondicionamiento, mientras que los sometidos a 8h de luz siguieron incrementando su desarrollo gonadal, de ahí que el muestreo realizado después de un mes de acondicionamiento, produjera resultados aparentemente contradictorios con respecto a los experimentos 1 y 2 (ver resultados de estadística en la página 177). Sin embargo, cuando se observan los resultados directos obtenidos la diferencia entre los distintos regímenes de luz se vuelve evidente. Después de aproximadamente dos meses desde el inicio del acondicionamiento, las ostras bajo un gradiente de 8-16h comenzaron los desoves, que se mantuvieron durante un período de dos meses. Mientras que las ostras con regímenes de luz inferiores necesitaron un mínimo de tres semanas más para iniciar los desoves. Además, la luz tuvo un claro efecto sobre el éxito de la producción larvaria. Los mejores resultados se obtuvieron con el mayor gradiente de luz (casi 13 millones de larvas) seguido por las ostras acondicionadas con 8-12 h/luz con 4 millones y medio de larvas. Las ostras acondicionadas con 8h de luz no superaron los tres millones de larvas liberadas. Estos resultados son coincidentes con los obtenidos en el experimento 2.

Los experimentos 1, 2 y 3 se iniciaron en otoño, como se ha descrito anteriormente. Los experimentos 4 y 5 fueron iniciados en invierno. La diferencia fundamental entre ambas estaciones tiene que ver con el estado inicial del desarrollo gametogénico de los progenitores de ostra. En el primer caso las ostras se encuentran en estado de reposo y en el segundo caso los progenitores muestran ya gónadas donde los folículos contienen gametos en un estado de desarrollo intermedio.

En el experimento 4, iniciado en invierno, las ostras fueron sometidas a cuatro regímenes de luz y temperatura. Como control se utilizó un grupo de ostras bajo las condiciones de luz y temperatura medioambientales en ese momento. Otros tres grupos de ostras fueron sometidos a un gradiente de temperatura (14-18 ^{o}C) y a los mismos regímenes de luz que fueron estudiados en el experimento 1. Al igual que ocurría en el experimento 1, el análisis estadístico reveló diferencias significativas ($p=0,025$) entre los regímenes de 8h y gradiente de luz. Los progenitores sometidos a un gradiente de 8-16 h de luz presentaban en todo momento un mayor grado de desarrollo gonadal. En invierno, se puso también de manifiesto que la luz es un factor de primer orden en la promoción del desarrollo gametogénico y la producción larvaria en la ostra plana. Apenas un mes después de iniciado el

acondicionamiento se produjeron los primeros desoves en los grupos de ostras acondicionadas con una mayor iluminación, mientras que las ostras bajo 8h de luz necesitaron un mes adicional de acondicionamiento para madurar y desovar. Tal y como se puede observar en la tabla 27, el número de larvas liberadas era significativamente mayor en el caso de las ostras acondicionadas con régimen de 8-16h de luz (17 millones frente a los 6-7 millones de las otras condiciones).

El objetivo del experimento 5, realizado en el invierno posterior, fue confirmar los resultados obtenidos anteriormente, utilizando las condiciones óptimas de fotoperíodo y temperatura (gradiente de 8-16 h/luz y gradiente 14-18 ^{o}C). El estado de desarrollo gametogénico inicial era similar al observado en las ostras utilizadas en el experimento 4, pudiendo observarse la presencia de folículos con gametos de ambos sexos en un estado intermedio de desarrollo en todos los individuos analizados (Fig. 183). Los resultados de este experimento se evaluaron de forma directa a través de la determinación del número y fechas de los desoves obtenidos, así como del número de larvas viables liberadas. Al igual que había ocurrido en el invierno anterior, transcurrido aproximadamente un mes desde el inicio del acondicionamiento, se produjeron los primeros desoves y el período de puestas se extendió durante dos meses. El número de larvas liberadas nuevamente era superior a 16 millones y medio (Tabla 31).

Estos resultados coinciden con los obtenidos por Saout *et al*. (1999) en *P. maximus*, donde el crecimiento gonadal era significativamente mayor cuando se mantenían bajo unas condiciones de temperatura y luz que aumentaban gradualmente (imitando la primavera) que cuando lo hacían disminuyendo la temperatura y horas de luz (invierno). Estos autores pusieron de manifiesto que un aumento simultáneo de la temperatura y el fotoperíodo incrementaban el crecimiento gonadal cuando no se limitaba el alimento. De todas formas el diseño de su trabajo no era lo suficientemente sistemático, lo que no les permitió determinar con claridad cuál era la influencia relativa de cada uno de estos dos factores.

Efecto de la Ración de Alimento sobre el acondicionamiento de progenitores de* Ostrea edulis*.

La disponibilidad de alimento determina la cantidad de energía y los nutrientes adquiridos por el animal, afectando a todas las características fisiológicas que constituyen la ecuación de balance energético (Bayne y Newell, 1983), condicionando tanto el crecimiento somático como el reproductivo. También puede afectar al desarrollo gonadal; cuando hay una baja disponibilidad de alimento se reduce el número de ovocitos y se retrasa la maduración (Borcherding, 1991). Diversos autores sugieren, del mismo modo, una correlación entre el tamaño de la gónada y la abundancia de alimento en el medio (Loosanoff, 1965; Sastry, 1968).

Las dietas compuestas por la mezcla de distintas especies de microalgas producen mejores resultados que los monocultivos (Utting y Millican, 1997; Martínez *et al*., 2000). El aporte de suplementos algales a los reproductores mejora la fertilidad de los bivalvos y la calidad de los ovocitos producidos.

Existe una bibliografía reducida y contradictoria sobre la ración de alimento adecuada que debe suministrarse a los bivalvos durante el acondicionamiento. Stephenson (1973) observó que la ración de alimento del 9% era excesiva para la ostra plana, *O. edulis,* promoviendo el crecimiento de la concha, provocando un retraso en el desarrollo gametogénico dando lugar a una disminución de la producción y viabilidad larvaria. Lane (1989), trabajando con la misma especie, suministraba una ración del 6% de alimento microencapsulado con alta proporción de lípidos, lo que era insuficiente para el acondicionamiento de reproductores pero había diferencias significativas en el número de larvas producidas por estos individuos si se los comparaban con los reproductores que se alimentaban combinando un 3% de ración de microcápsulas con un 3% de ración de *Pavlova lutheri*. Como antes se ha referido, en la literatura se encuentran resultados controvertidos respecto a la ración adecuada para el acondicionamiento de reproductores de *Ostrea edulis,* hay diversos estudios que utilizan distintas raciones y dietas microalgales: Helm *et al*., 1973: 5% y 6%; Gabbot y Walker, 1971: 0´2 y 1%; Utting, 1993: 3% y 9%; Millican y Helm, 1994: 3% y 7% peso seco del individuo al día.

Los mejores resultados se obtuvieron usando raciones de entre 3 y 6%. Una ración de alimento del 6% del peso seco carne en peso seco microalga por día, era una ración conveniente para la mayoría de las especies cultivadas a 20-22 ^{o}C. La ración del 3% podría ser suficiente únicamente para especies cultivada a temperaturas más bajas.

Por estas razones, para los estudios iniciales del efecto de la temperatura y fotoperíodo sobre el acondicionamiento de ostra plana se decidió utilizar una ración del 6%. Una vez optimizadas las condiciones de temperatura y luz se abordó el estudio del efecto de la ración de alimento en dos períodos estacionales distintos (otoño e invierno) utilizando tres niveles de ración (3%, 6% y 9%). Conviene recordar que las ostras en otoño se encuentran en estado de reposo gonadal con presencia únicamente de células vesiculares de reserva, sin embargo a mediados del invierno, los folículos están presentes con evidente desarrollo de gametos masculinos y femeninos.

La importancia de la **disponibilidad de alimento** en la maduración sexual de los bivalvos se debe al elevado requerimiento de energía y nutrientes existente durante la gametogénesis. Este proceso no depende únicamente del alimento ingerido en la época de desarrollo gonadal sino también de las reservas almacenadas previamente por el animal en las células vesiculares, tejido muscular y glándula digestiva. Lubet (1981) señaló que la dieta suministrada tiene un efecto directo en la duración de la gametogénesis. Se cree que la

disponibilidad de alimento está íntimamente ligada con la gametogénesis por dos motivos; primero, porque la fase de asimilación de nutrientes debe tener una importante influencia sobre la velocidad a la que son sintetizados los gametos y segundo, porque puede haber un valor crítico del nivel de nutrientes que debe ser alcanzado antes de que comience la gametogénesis (Ruíz, 1992).

En nuestro trabajo no se midió la cantidad de partículas filtradas desde el agua de mar, así que es imposible saber a ciencia cierta el consumo real de alimento. A efectos prácticos se asume que el porcentaje de alimento suministrado es ingerido por el animal.

Los datos estereológicos no permitían encontrar diferencias significativas entre las raciones de alimento utilizadas (ver apartado de estadística, págs. 228 y 243). Sin embargo, al observar los resultados obtenidos queda claro que la ración de alimento del 3% no era suficiente para estimular el desarrollo gametogénico al mismo ritmo que los individuos acondicionados con raciones más altas. En otoño, las ostras alimentadas con raciones más altas comenzaron a desovar a los 45 días de iniciado el acondicionamiento, mientras que las del 3% tardaron casi un mes más en iniciar los desoves (Tabla 36). En invierno se repite la misma pauta de comportamiento, las ostras bajo raciones del 6% y 9% iniciaron la liberación de las larvas a los 30 días, y las ostras bajo ración del 3% necesitaron tres semanas adicionales de acondicionamiento.

Con respecto al número de larvas liberadas, en el experimento de otoño existe una clara diferencia entre las raciones del 3% (3,6 millones) frente a las raciones más elevadas (15-18 millones). Sin embargo, en invierno la producción larvaria no es significativamente diferente para las distintas raciones utilizadas (Figs. 216 y 232).

Es necesario recordar que en los experimentos en los que se querían estudiar los efectos de la ración de alimento, los individuos eran sometidos a las condiciones óptimas de temperatura y luz de acondicionamiento, aunque en dos estadíos iniciales de desarrollo gametogénico muy diferentes (ver figuras 186, 190, 218 y 220). Quizá la ración del 3% no sea la suficiente durante el otoño para satisfacer las demandas metabólicas generales y las necesarias para las primeras etapas del desarrollo gametogénico. Borcherding (1995) estudiando el mejillón de agua dulce *D. polymorpha*, encontró que el volumen gonadal disminuía a altas temperaturas cuando había baja disponibilidad de alimento si los progenitores se encontraban inicialmente en etapa de reposo.

Las raciones del 6% y 9%, en cambio, producían unos desarrollos gonadales rápidos y desoves en un plazo más breve y similar producción larvaria. Ambas raciones de alimento se presentaban como buena opción para el acondicionamiento de *O. edulis*, sin embargo cuando se analizaba la mortalidad de los progenitores (Figuras 217 y 233) ésta era muchísimo más elevada en los individuos acondicionados con la ración del 9% (20-40% de mortalidad frente al

5% obtenido para los progenitores acondicionados con el 6%). Esta mortalidad está probablemente relacionada con la importante producción de pseudoheces observada en esas condiciones y que lleva asociado un aumento considerable de la poblaciones bacterianas.

***Efecto del Flujo del Agua sobre el acondicionamiento de progenitores de* Ostrea edulis.**

Es importante recordar que las ostras son organismos filtradores que consiguen su alimento directamente del agua. Cuando se suministra un exceso de alimento aumenta la turbidez del agua, en parte debido al exceso de microalgas que no han sido ingeridas, y en parte debido a la acumulación de heces, pseudoheces y detritus. Esto provoca cambios en las características fisicoquímicas y microbiológicas del agua, que pueden afectar a la viabilidad del cultivo, de ahí que se haga necesario la renovación de agua del cultivo. En general, con el aumento del flujo de agua, la tasa de filtración de las ostras aumenta, hasta un punto en que las ostras son incapaces de captar más partículas (Walne, 1979). Por otra parte, un flujo de agua demasiado bajo puede dar lugar a una mayor sedimentación de partículas, lo que lleva asociado proliferaciones bacterianas no deseadas. Esto puede tener efecto en la reducción del peso, deterioro de la condición física y la fecundidad de los organismos.

Las ostras pueden rechazar las partículas no deseadas (Yonge, 1926) y responder al aumento en los sedimentos en suspensión mediante un incremento en la producción de pseudoheces y con un ocasional cierre rápido de las valvas para expulsar el limo acumulado (Yonge, 1960), con el consiguiente coste energético. Korringa (1952) encontró que el aumento de sedimentos en suspensión reducía la tasa de filtración en las ostras. También ha sido demostrado que los sedimentos en suspensión reducían la tasa de crecimiento de los adultos de *Ostrea edulis* y el engrosamiento de la concha (Moore, 1977). Según Hutchinson y Hawkins (1992), la reducción del crecimiento se debe probablemente a una mayor deposición de concha y a la incapacidad para alimentarse de manera eficiente. Yonge (1960) y Korringa (1952) consideraban que *Ostrea edulis* era intolerante con los ambientes turbios. Sin embargo, los bancos de ostras se encuentran en ambientes estuarinos que son relativamente turbios.

Existen pocos estudios sobre el efecto del flujo del agua sobre el cultivo de moluscos y menos aún sobre *Ostrea edulis*. En la bibliografía se ha utilizado una gran variedad de flujos en el acondicionamiento de los bivalvos; mientras que Utting y Spencer (1991) utilizaban un flujo de entrada de 1,5 l/individuo por hora para el acondicionamiento en un tanque de 120l; Saout *et al*. (1999) acondicionaban *P. maximus* con un flujo de 1,042l/individuo por hora y Chávez-Villalba *et al*. (2002) en el acondicionamiento de *C. gigas* proponían una tasa de renovación en los tanques de 700l, que mantenían 1600 ostras, de 58l/h (0,04l/individuo x h). En cuanto a *O. edulis*, Gabbot y Walker (1971) acondicionaban las ostras en grupos de 20 individuos y con un

flujo de 30l/h, es decir, 1,5l/h/individuo y Helm y Bourne (2004) proporcionaban también un flujo de 1,5l/h por adulto.

Rodhouse y O´Kelly (1981) desarrollaron una fórmula para calcular los requerimientos de flujo de la semilla y juveniles de *O. edulis*: FR = (0,47 + 0,04T) $LW^{-0,26}$, donde T es la temperatura en º C y LW es el peso vivo del animal. Siguiendo esta fórmula en nuestras condiciones de trabajo supondría un flujo de 1,95l/h. De todas formas los mismos autores sugieren que esta fórmula podría perder su valor predictivo una vez que las ostras empiezan a madurar.

Por todas las razones citadas anteriormente, consideramos conveniente estudiar el posible papel del flujo del agua a través de los tanques de acondicionamiento sobre el desarrollo gametogénico de los progenitores de ostra. Como resultado de la actividad metabólica de las ostras en los tanques de cultivo se acumula amoníaco, heces, detritus, etc. que afectan a las características fisicoquímicas y microbiológicas del medio de cultivo, lo que a su vez influye negativamente en el estado sanitario, desarrollo gametogénico y fecundidad de las ostras. Para evitar estos efectos, durante el acondicionamiento de ostra plana se procede a una cierta renovación del agua del medio, que es utilizada también para la adición de la ración diaria de alimento.

En este experimento se estudiaron nueve situaciones de acondicionamiento diferentes en función del flujo de agua suministrado a cada cultivo (1 l/h, 2 l/h y 3 l/h) combinado con tres raciones de alimento diferentes (3 %, 6 % y 9 %). Los resultados se evaluaron, como en los casos de los experimentos anteriores, mediante un análisis estereológico cuantitativo y de una forma más directa, registrando fecha y número de desoves y número de larvas obtenidas en cada caso.

El análisis estadístico de los datos estereológicos no mostró diferencias significativas entre los flujos ni entre las raciones, probablemente condicionado por la gran variabilidad individual encontrada y el limitado tamaño de la muestra. Sin embargo, si era significativa la interacción de ambos factores (p=0,022).

En cuanto a la producción larvaria, cuando se utilizó una dieta del 3%, el número de larvas liberadas fue claramente menor con un flujo de 1l/h. Con las raciones del 6% y 9% el número de larvas obtenidas era similar para los tres flujos de agua ensayados. El resultado más destacable de este experimento se refiere a la mortalidad observada en los progenitores de ostra. Con las tres raciones de alimento se observó un mismo patrón de incremento de la mortalidad a medida que aumentaba el flujo de agua (desde el 5-10% de mortalidad en las ostras con un flujo del 1l/h hasta el 50-60% en las ostras con un flujo de 3l/h) (Ver figuras 264, 266 y 268). A la luz de los conocimientos actuales no existe una explicación convincente para este resultado, aunque podría sustentarse en parte en razones de ecología bacteriana, como:

tipos y porcentajes de las distintas especies bacterianas que hayan proliferado en el medio bajo las distintas condiciones de flujo (comunicación personal de Ysabel Santos).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

6. CONCLUSIONES

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

6. CONCLUSIONES.

A partir de los resultados que se han obtenido en la presente Tesis Doctoral pueden extraerse las siguientes conclusiones generales:

1. Durante el acondicionamiento de ostra plana, el desarrollo gonadal y gametogénico es un proceso asincrónico, con una gran variabilidad individual. Los gametos masculinos y femeninos están presentes simultáneamente en los folículos, aunque en diferentes estadíos de desarrollo. Como consecuencia, la maduración no es homogénea y la puesta no es un hecho puntual si no que es un proceso continuo que se extiende durante un período aproximado de dos meses.

2. Las ostras acondicionadas con un gradiente de temperatura (14-18^{o}C), presentan un grado de ocupación gonadal que duplica el obtenido para una temperatura constante de 15^{o}C. Esto confirma que la temperatura del agua es un factor de primer orden en el acondicionamiento de la ostra plana, al igual que ocurre con otros bivalvos.

3. Tanto en otoño como en invierno, las ostras acondicionadas bajo gradiente de luz (8-16h) presentan, en todo momento, un mayor grado de desarrollo gonadal, maduran un mes antes y liberan un número significativamente mayor de larvas viables que las ostras sometidas a un fotoperíodo constante de 8 h de luz o a un gradiente menor. Estos hechos ponen de manifiesto la importancia del fotoperíodo como un factor regulador del desarrollo gametogénico de ostra plana.

4. No existe interacción entre la temperatura y el fotoperíodo, actúan de forma independiente sobre el acondicionamiento de ostra plana.

5. Una ración de alimento del 6% del peso seco por individuo y día es adecuada para el acondicionamiento óptimo de ostra plana, tanto en otoño como en invierno. Una ración del 3% es insuficiente para estimular el desarrollo gametogénico al mismo ritmo que los individuos acondicionados con raciones más altas, mientras que con una ración del 9% se produce una mortalidad elevada de los progenitores de ostra.

6. Las combinaciones de flujo de agua y ración de alimento no tienen influencia notable sobre el acondicionamiento de ostra plana, excepto en el caso de una ración del 3% y un flujo de 1l/h, donde el número de larvas liberadas es menor. El incremento del flujo de agua está asociado a un importante incremento de la mortalidad de los progenitores de ostra.

7. Los resultados permiten proponer un protocolo para el acondicionamiento óptimo de ostra plana tanto en otoño como el invierno: gradiente de temperatura (14-18 ^{o}C), gradiente de luz (8-16 h), ración de alimento (dieta mixta de microalgas al 6%) y flujo de agua 1-2l/h por individuo.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

7. BIBLIOGRAFÍA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Abad, M.; Ruiz, 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 Cibrán (Galicia, Spain). *Comp. Biochem. Physiol*. Vol. 110C, No. 2: 109-118.

Acarli, S.; Lök, L.; Kücükdermenci, A.; Yildiz, H y Serdar, S. (2011). Comparative Growth, Survival and Condition Index of Flat Oyster, Ostres edulis (Linnaeus, 1758) in Mersin Bay, Aegean Sea, Turkey. Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi. Vol. 17 (2): 203.

Álvarez Fariña, P. (2006). Dinámica reproductora de dos especies de almejas autóctonas de las Rías Gallegas, *Venerupis aurea* (Gmelin, 1790) y *Venerupis pullastra* (Montagü, 1803) ; estudio histológico, histoquímico y estereológico. *Tesis Doctoral*. Universidad de Santiago de Compostela.

Andreu, B. y Arte, P. (1956). Expériences préalables sur la fixation des larves et la croissance hivernale des jeunes huîtres dans les rias galiciennes. *Rapp. Cons. Explor. Mer*. 14: 17-22.

Andrews, J. D. (1979). Pelycypoda: Ostreidae. En Reproduction of marine invertebrates. Giese, A. C. y Pearse, J. S (eds.). Vol 5: 293-34.

Barber, B.J. y Blake, N.J., (1985). Intra-organ biochemical transformation associated with oogenesis in the bay scallop, *Argopecren irradians concentricus* (Say), as indicated by 14C incorporation. *Biol. Bull*., 168: 39-49.

Barber, B. J. y Blake, N.J. (1991). Reproductive physiology. En SE. Shumway (ed.). Scallops: Biology, Ecology and Aquaculture. Elsevier, Amsterdam. 377-409.

Barnes, H. y Blackstock, J. **(1973)**. Estimation of lipids in marine animals and tissues: detailed investigation of the sulphophosphovanillin method for total lipids. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.,* 12: 103-118.

Bayne, B. L., y Newell, R. C. (1983). Physiological energetics of marine molluscs. *The mollusca*, 4 (1): 407-515.

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* (Jeffreys) and *Tapes philippinarum* (Adams & Reeve). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.,* 79: 19-37.

Berntsson, K. M., Jonsson, P., Wängberg, S. A. y Carlsson, A. S. (1997). Effects of broodstock diets on fatty acid composition, survival and growth rates in larvae of the European flat oyster, *Ostrea edulis*. *Aquaculture*, *154* (2): 139-153.

Bligh, E. G. y Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.,* 37: 911-917.

Borcherding, J. (1991). The annual reproductive cycle of the freshwater mussel *Dreissena polymorpha* Pallas in lakes. *Oecologia*. 87: 208-218.

Borcherding, J. (1995). Laboratory experiments on the influence of food availability, temperature and photoperiod on gonad development in the freshwater mussel *Dreissena polymorpha*. *Malacología*, 36 (1-2): 15-27.

Brown, M. R. (1991). The amino acid and sugar composition of 16 species of microalgae used in mariculture. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 145: 79-99.

Brown, M.R.; Jeffrey, S.W.; Volkman, J.K. y Dunstan, G.A. (1997).Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture* 151: 315-331.

Chávez-Villalba, J.; Barret, J.; Mingant, C.; Cochard, J. y Le Pennec M. (2002). Autumn conditioning of the oyster *Crassostrea gigas*: a new approach. *Aquaculture* 210: 171-186.

Chu, F. L. E. and Greaves, J. (1991). Metabolism of palmitic, linoleic and linolenic acids in adult oysters, *Crassostrea virginica*. *Mar. Biol*., 110: 229-236.

Coe, W. R. (1932). Sexual phases in the American oyster (*Ostrea virginica*).*The Biological Bulletin*, 63(3): 419-441.

Cole, H.A. (1942). Primary Sex-Phases in *Ostrea edulis*. *Quarterly Journal of Microscopical Science*. Vol. s2-83 (331): 317-356.

Corral, J. (1992). Las rías gallegas como ecosistema. Volumen 1 de Unidades Didácticas de Acuicultura. Consellería de Pesca, Marisqueo y Acuicultura. Xunta de Galicia; 39 pp.

Custódio, L.; Soares, F.; Pereira, H.; Barreira, L.; Vizetto-Duarte, C.; Rodrigues, M. J.; Rauter, A. P.; Albericio, F. y Varela, J. (2014). Fatty acid composition and biological activities of *Isochrysis galbana* T-ISO, *Tetraselmis sp*. and *Scenedesmus sp*.: possible application in the pharmaceutical and functional food industries. *Journal of Applied Phycology*, *26* (1): 151-161.

Davenel, A.; González, R.; Suquet, M.; Quellec, S. y Robert, R. (2010). Individual monitoring of gonad development in the European flat oyster *Ostrea edulis* by in vivo magnetic resonance imaging. Aquaculture 307: 165-169.

Delesse, M.A. (1847). Procédé mecanique pour determiner la composition des roches. C. R. Acad. Sci. (Paris). 25: 544.

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 (2): 435-441.

Dominguez, L.; Villalba, A. y Fuentes, J. (2010). Effects of photoperiod and the duration of conditioning on gametogenesis and spawning of the mussel Mytilus galloprovincialis (Lamarck). Aquaculture Research. 41:e807-e818.

Duinker, A.; Saout, C. y Paulet, Y.M. (1999). Effect of photoperiod on conditioning of the great scallop*. Aquaculture International* 7: 449-457.

Elías, H.; Henning, A. y Schwartz, D. E. (1971). Stereology: Applications to biomedical research. *Physiol. Rev*., 51(1): 158-200.

FAO: Ostrea edulis. Cultured Aquatic Species Information Programme. Text by Goulletquer P. En: FAO Fisheries and Aquaculture Department [online]. Rome. Updated 1 January 2004. www.fao.org/fishery/culturedspecies/Ostrea_edulis/en.

FAO (2012). El Estado Mundial de la Pesca y la Acuicultura. Roma: FAO. Disponible en Internet, URL: http://www.fao.org/docrep/016/i2727s/i2727s.pdf**.** Consultado el 18 de Noviembre de 2012.

Farías, A. y Uriarte, I. (2002). Nutrición en Larvicultura de Pectínidos: Relevancia de Proteínas y Lípidos. En: Cruz-Suárez, L. E.; Ricque-Marie, D.; Tapia-Salazar, M.; Gaxiola-Cortés, M. G. y Simoes, N. (Eds.). Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium internacional de nutrición acuícola. 3 al 6 de Septiembre del 2002. Cancún, Quintana Roo, México. 309-313.

Fenton, M., (1992). Review: chromatographic separation of cholesterol in foods. *Journal of Chromatography B*. 624: 369–388.

Fernández, I. (1991a). Reproducción y acondicionamiento de bivalvos en el criadero. *Dirección Xeral de Formación Pesqueira e Investigación, ed*. Tema. Dirección Xeral de Formación Pesqueira e Investigación. Xunta de Galicia*.* 16 pp.

Fernández, I. (1991b). Cultivo de bivalvos en criadero. Galicia*. Dirección Xeral de Formación Pesqueira e Investigación, ed*. Tema. Dirección Xeral de Formación Pesqueira e Investigación. Xunta de Galicia. 17 pp.

Figueras, A. y Novoa, B. (2012). Enfermedades de moluscos bivalvos de interés en la acuicultura. Publicaciones Científicas y Tecnológicas de la Fundación Observatorio Español de Acuicultura. Editorial Paraninfo; 541 pp.

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.

Fundación OESA. (2013) Informe de la Acuicultura en España 2013. Disponible en Internet, URL: http://www.fundacionoesa.es/publicaciones/la-acuicultura-en-espana-2013. Consultado el 10 de Julio de 2013.

Gabbott, P. A. y Walker, A. J. M. (1971). Changes in the condition index and biochemical content of adult oysters (*Ostrea edulis* L.) maintained under hatchery conditions. *J. Cons. Int. Explor. Mer* 34 (1): 99-106.

Gabbott, P. A. (1975). Storage cycles in marine bivalve molluscs: a hypothesis concerning the relationship between glycogen metabolism and gametogenesis. En *Ninth European Marine Biology Symposium.* Aberdeen University Press: Aberdeen, UK. 191-211.

Gabbot, P. A. (1976). Energy metabolism. En: Bayne B. L. (ed.). Marine mussels, International Biological Programme. Vol. 10. Cambridge University Press. Cambridge. 293-356.

Gabbott, P. A. (1983). Developmental and seasonal metabolic activities in marine molluscs. *The mollusca*, *2*, 165-217.

Galtsoff, P. S. (1938). Physiology of reproduction of *Ostrea virginica* II. Stimulation of spawning in the female oyster. *The Biological Bulletin*, 75(2): 286-307.

Galtsoff, P. S. (1964). The American oyster *Crassostrea virginica*. Fishery Bulletin of the Fish and Wildlife Service. Vol. 64. 456 pp.

Grasse, P. (1960). Traité de zoologie. Tomo 5. Vol. 2: Mollusques laméllibranches. Masson et Cie, Paris. 1845-2133 pp.

Griffond, B.; Gomot, P. y Gomot, L. (1992). Influence de la température sur le déroulement de l´ovogénèse chez l´escargot *Helix aspersa*. *J. Therm. Biol*. 17: 185-190.

Guedes, A. C.; Meireles, L. A.; Amaro, H. M. y Malcata, F. X. (2010). Changes in lipid class and fatty acid composition of cultures of Pavlova lutheri, in response to light intensity. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *87* (7): 791-801.

Guerrero, S. (1995). Análisis de producción de ostra plana (*Ostrea edulis* L.) en las fases de cría, semilla y engorde. Estrategias para el cultivo comercial en Galicia. *Tesis Doctoral*. Universidad de Santiago de Compostela.

Helm, M. M., Holland, D. L., y Stephenson, R. R. (1973). The effect of supplementary algal feeding of a hatchery breeding stock of *Ostrea edulis* L. on larval vigour. *Journal of the Marine biological Association of the United Kingdom*, *53*(03): 673-684.

Helm, M. M., Holland, D. L., Utting, S. D., y East, J. (1991). Fatty acid composition of early non-feeding larvae of the European flat oyster, *Ostrea edulis*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*,*71*(03): 691-705.

Helm, M. M. y Bourne, N. (2004). Hatchery cultures of bivalves: A practical manual. (Vol. 471). A. Lovatelli (Ed.). Food and agriculture organization of the United Nations: Fisheries Tech. Paper. Rome. 74 pp.

Holliday, J. E.; Maguire, G. B. y Nell, J. A. (1991). Optimun stocking density for nursery culture of Sydney rock oysters (*Saccostrea commercialis*). Aquaculture 96: 7-16.

http://circulasv.blogspot.com.es/2012_09_01_archive.html

Hubbard, W. D.; Sheppard, A. J.; Newkirk, D. R.; Prosser, A. R. y Osgood, T. (1977). Comparison of various methods for the extraction of total lipids, fatty acids, cholesterol, and other sterols from food products. Journal of the American Oil Chemists' Society. Vol. 54 (2): 81-83.

Hutchinson, S. y Hawkins, L. E. (1992). Quantification of the Physiological Responses of the European Flat Oyster *Ostrea edulis* L. to the Temperature and Salinity. *Journal of Molluscan Studies*. 58 (2): 215-226.

Jara Jara, R. J. (1995). Crecimiento de semilla de *Venerupis pullastra* M. y de *Ruditapes decussatus* L. en agua residual procedente del cultivo de rodaballo (*Psetta maxima* L.). *Tesis Doctoral*, Universidad de Santiago de Compostela.

Jara Jara, R. J.; Abad, M.; Pazos, A. J.; Pérez-Parallé, M. L. y Sánchez, J. L. (2000). Growth and reproductive patterns in *Venerupis pullastra* seed reared in waste water effluent from a fish farm in Galicia (N.W. Spain). *J. shellfish res.,* 19: 949-956.

Jørgensen, C. B. (1990). Bivalve filter feeding revisited. Marine Ecology Progress Series 142: 287-302.

Junior, A. M. M.; Bezerra Neto, E.; Koening, M. L. y Eskinazi Leça, E. (2007). Chemical Composition of Three Microalgae Species for the Possible Use in Mariculture. Brazilian Archives of Biology and Technology. Vol. 50 (No. 3): 461-467.

Kates, M. (1972). Techniques of lipidology. Isolation, Analysis and Identification of Lipids, *Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. Vol. 3*. North Holland Pub. Co., Amsterdam.

Korringa, P. (1941). Experiments and observations on swarming, pelagic life and setting in the European flat oyster *Ostrea edulis* L.. Arch. Neerl. Zool., 5: 1-249.

Korringa, P. (1947). Relations between the moon and periodicity in the breeding throught the geographical ranges of *Ostrea edulis*. *Ann. Biol*., 33: 1-17.

Korringa, P. (1952). Recent advances in oyster biology. *Quart. Rev. Biol*., 27: 266-308, 339-365.

Korringa, P. (1955). Water temperature and breeding throughout the geografical range of *Ostrea edulis* L. Ann. Biol. París. 33: 1-17.

Korringa, P. (1976). Farming the flat oysters of the genus *Ostrea*. En: Developments in aquaculture and fisheries science. Elsevier. 3: 1-238.

Laing, I.; Walker, P. y Areal, F. (2005). A feasibility study of native oyster (*Ostrea edulis*) stock regeneration in the United Kingdom. CEFAS. CARD Project FC1016 Native Oyster Stock Regeneration - A Review of Biological, Technical and Economic Feasibility. 96 pp.

Lane, A. (1989). The effect of a microencapsulated fatty acid diet on larval production in the european flat oyster *Ostrea edulis*. En: de Pauw N, Jaspers E, Ackefors H, Wikins N (eds) Aquaculture - A Biotechnology in Progress, Bredene, Belgium. 657-664.

Lannan, J. E.; Robinson, A. y Breese, W. P. (1980). Broodstock management of *Crassostrea gigas*: II. Broodstock conditioning to maximize larval survival. *Aquaculture,* 21: 337-345

Laurelle, 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. Ass. U.K*, 74:351-366.

Loosanoff, V. L. (1942). Seasonal gonadal changes in the adult oyster, *Ostrea virginica,* of Long Island Sound. Biological Bulletin, Marine Biology Laboratory. Woods Hole. 82: 195-206.

Loosanoff, V.L. y Davis, H.C. (1952). Temperature requirements for maturation of gonads of northern oysters. *The Biol. Bull.* 98: 60–65.

Loosanoff, V. L., (1962). Gametogenesis and spawning of the Europe oyster, *Ostrea edulis* in waters of Maine. *Biol. Bull*., 122: 86-94.

Loosanoff, V. L. (1965). The American or eastern oyster. *US Bureau of Commercial Fisheries*. Biol. Bull., 128: 546-561.

Louro, A.; Roche, J. P. de la; Sánchez, J. L.; Silva, A.; Martínez, P.; Pérez-Parallé, M. L.; Martínez, I. y Román, G. (2005). The effect of photoperiod on the conditioning of the black scallop, *Chlamys varia*. 15th International Pectinid Workshop, Mooloolaba, Queensland.

Lubet, P. (1981). Action de la Température sur le cycle de reproduction des Lamellibranches. *Bull. Soc. Zool. Fr*., 106: 283-292.

Maneiro, V. (2008). Efecto combinado del fotoperíodo y la temperatura en el acondicionamiento de *Ostrea edulis* L. 1758. Trabajo de investigación tutelado para conseguir el Diploma de Estudios Avanzados. Universidade de Santiago de Compostela.

Mann, R. (1979). Some biochemical and physiological aspects of growth and gametogenesis in *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis* grown at sustained elevated temperatures. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, *59* (01): 95-110.

Marteil, L. (1976). La conchyliculture francaise. 2eme partie: Biologie de l´huitre et de la moule. Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes. Vol. 40 (N. 2): 149-346.

Martínez, G.; Aguilera, C. y Mettifogo, L. (2000). Interactive effects of diet and temperature on reproductive conditioning of *Argopecten purpuratus* broodstock. *Aquaculture*, 183(1): 149-159.

Martínez, I.; Silva, A.; Domínguez, L.; Álvarez Fariña, P. y Sánchez, J. L. (2005). Efecto combinado del fotoperíodo y la ración de alimento sobre el acondicionamiento de *Ruditapes decussatus* (Linné 1758) en criadero. Libro de resúmenes X Congreso Nacional de Acuicultura. Gandía (Valencia). Tomo II: 520-521.

Medina Reyna, C. y Cordero Esquivel, B. (1998). Crecimiento y composicion bioquimica de la diatomea *Chaetoceros muelleri* Lemmerman, mantenida en cultivo estatico con un medio comercial. Ciencia y Mar. Vol. II (No. 6): 19-25.

Miller, M. R.; Quek, S. Y.; Staehler, K.; Nalder, T. y Packer, M. A. (2012). Changes in oil content, lipid class and fatty acid composition of the microalga *Chaetoceros calcitrans* over different phases of batch culture. *Aquaculture Research*. 1-14.

Millican, P. F. y Helm, M. M. (1994). Effects of nutrition on larvae production in the European flat oyster, *Ostrea edulis*. *Aquaculture*, 123(1): 83-94.

Moore, P. G. (1977). Inorganic particulate suspension in the sea and their efects on marine animals. Oceanography and Marine Biology: an Annual Review. 15: 225-363.

Morvan, C. y Ansell, A. D (1988). Stereological methods applied to reproductive cycle of *Tapes rhomboides*. *Mar. Biol*., 97: 355-364.

Muranaka, M. S. y Lannan, J. E. (1984). Broodstock management of *Crassostrea gigas*: environmental influences on broodstock conditioning. *Aquaculture*, 39: 217-228.

Navarro, E. J.; Iglesias, I. P. y Larrañaga, A. (1989). Interanual variation in the reproductive cycle and biochemical composition of the cockle *Cerastoderma edule* from Mundaca Estuary (Biscay, North Spain). *Mar. biol*., 101: 503-511.

Newell, R. I. E.; Hilbish, T. J.; Koehn, R. K. y Newell, C. J. (1982). Temporal variation in the reproductive cycle of *Mytilus edulis* L.(Bivalvia, Mytilidae) from localities on the east coast of the United States. *Biol. Bull*, *162*: 299-310.

Orton, J. H. (1920). Sea-temperature, breeding and distribution in marine animals. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* (New Series). 12 (02): 339-366.

Orton, J. H. (1926). On Lunar Periodicity in Spawning of normally grown Falmouth Oysters (*O. edulis*) in 1925, with a comparison of the spawning capacity of normally grown and dumpy Oysters. *J. Mar. Biol. Ass. U. K*., *14* (01): 199-225.

Orton, J. H. (1927). Observations and experiments on sex changes in the European oyster (*Ostrea edulis*) part I. The change from female to male. *J. Mar. Biol. Ass. U. K*., 14: 1047-1055.

Orton, J. H. (1928). On Rhythmic Periods in Shell-growth in *0. edulis* with a Note on Fattening. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* (New Series). 15: 365-427.

Patil, V.; Källqvist, T.; Olsen, E.; Vogt, G. y Gislerød, H. R. (2007). Fatty acid composition of 12 microalgae for possible use in aquaculture feed. *Aquaculture International*, 15: 1-9.

Paulet, M. y Boucher, J. (1991). Is reproduction mainly regulated by temperature or photoperiod in *Pecten maximus*?. *Invertebr. Reprod. Dev*. 19, 1: 61-70.

Pazos, A. (1993). Relaciones entre Composición Bioquímica y Ciclo Gametogénico en la Vieira *Pecten maximus* L. *Tesis Doctoral.* Universidade de Santiago de Compostela.

Pazos, A. J.; Silva, A.; Sordo, A.; Abad, M. y Sánchez, J. L. (2003). Influencia del fotoperíodo sobre el acondicionamiento de la almeja fina *Ruditapes decussatus* (Linné, 1787). Libro de resúmenes IX Congreso Nacional de Acuicultura, Cádiz; 293-295.

Polanco Torres, E. y Corral, M. L. (2002). La ostricultura en el mundo en "Impulso, desarrollo y potenciación de la ostricultura en España" (Fundación Alfonso Martín Escudero), eds. Mundi-Prensa, Cap. 2: 7-20.

Ranson, G. (1951). «Les huîtres». Biologie. Culture. Ed. Lechevalier, Paris. 260pp.

Robinson, A. N. J. A. (1992). Dietary supplements for reproductive conditioning of *Crassostrea gigas kumamoto* (Thunberg). I. Effects on gonadal development, quality of ova and larvae through metamorphosis. *Journal of Shellfish Research*, *11*: 437-437.

Rodhouse, P. G. y O´Kelly, M. (1981). Flow requirements of the oysters *Ostrea edulis* L. and *Crassostrea gigas* Thunb. in an upwelling column system of culture. *Aquaculture*. Vol. 22: 1-10.

Rodriguez Moscoso, E. y Arnáiz, R. (1998). Gametogenesis and energy Storage in a population of the grooved carpet-shell clam, *Tapes decussatus* L., in the northwest Spain. *Aquaculture*, 162: 125-139.

Rodriguez Rodriguez, J.L. (1990). Metabolismo energético en el desarrollo larvario de *Ostreaedulis* L. *Tesis Doctoral*. Universidade de Santiago de Compostela.

Román G. (1984). Estudio sobre la reproducción de la ostra (Ostrea edulis L.) cultivada en bateas en la Ría de Arousa. Cuaderno de Area de Ciencias Mariñas. Seminario de Estudos Galegos. 1: 405-425.

Ruíz Blanco, C. S. (1992). Composición Bioquímica y Ciclo Reproductivo en *Ostrea edulis* L. y *Crassostrea gigas* Th. *Tesis Doctoral*. Universidade de Santiago de Compostela.

Ruíz, C.; Abad, M.; Sedano, F.; García Martín, L. O. y Sánchez López J. L. (1992). Influence of seassonal environmental changes on the gamete production and biochemical composition of *Crassostrrea gigas* (Thumberg) in suspended culture in el Grove, Galicia, Spain. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, Vol. 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 the temperature and photoperiod on reproductive physiology of *Pecten maximus* from the Bay of Brest (France). Aquaculture, 172 (3-4): 301-314.

Sastry, A. N. (1968). The relationship among food, temperature, and gonad development of the bay scallop, *Aequipecten irradians* Lamarck. *Physiology Zoological*. 41: 44-53.

Sastry, A.N. (1979). Pelecypoda (excluiding Ostreidae). En: Reproduction of Marine Invertebrates: Pelecypods and Lesser Classes. A.C. Giese y J.S. Pearse (eds.). *Academic Press N.Y*. 113-292.

Steele, S. y Mulcahy, M. F. (1999). Gametogenesis of the oyster *Crassostrea gigas* in southern Ireland. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom 79: 673-686.

Stephenson, R. R. (1973). Some aspects of reproduction of the oyster (*Ostrea edulis* L.) in the field and Laboratory. *Ph. D. Thesis*, Marine Science Laboratory, University College of North Wales.

Utting, S. D. (1993). Procedures for the maintenance and hatchery-conditioning of bivalve broodstocks. *World Aquaculture*, 24 (3): 78-82.

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

Utting, S. D. y Spencer, B. E. (1991). The hatchery culture of bivalve mollusc larvae and juveniles. MAFF Laboratory Leaflet Number 68. Directorate of Fisheries Research, Lowestoft, UK. 31 pp.

Walne, P. R. (1958). Growth of oysters (*Ostrea edulis* L.). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 37: 591-602.

Walne, P. R. (1980). Cultivo de moluscos bivalvos: 50 años de experiencia en Conway. Ed. Acribia, 208 pp.

Williams, M. A. (1981). Stereological techniques. En: *Practical Methods in Electrón Mycroscopy*. Vol. 2. Part.II. *Quantitative methods in Biology*. A.M. Glauert (Ed.), North Holland Publishing Company. 5-84.

Wilson, J. (1981). Hatchery rearing of *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas*. *Aquaculture* 4: 1-34.

Wilson, J. H. y Simmons, J. (1985). Gametogenesis and breeding of *Ostrea edulis* on the west coast of Ireland. *Aquaculture*, 46: 307-321.

Wren, J. J. y Szczepanowksa, A. D. (1964). Chromatography of lipids in presence of the antioxidant, 4-methyl-2,6-di-tert-butyphenol. *Journal of Chromatography A*. 14: 405-410.

www.asturnatura.com/moluscos/bivalvos.html

www. eurl-mollusc.es/Main-activities/Tutorials

Xie, Q. y Burnell, G. M (1994). A comparative study of the gametogenic cycles of the clams *Tapes philippinarum* and *Tapes decussatus* on the south coast of Ireland. *J, shellfish res.*, 13(2): 467-472.

Yonge, C. M. (1926). Structure and physiology of the organs of feeding and digestion in *Ostrea edulis*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom (New Series)*, 14 (02): 295-386.

Yonge, C. M. (1960). Oysters. London, UK: Collins.

Zhukova, N. V y Aizdaicher, N. A. (1995). Fatty acid composition of 15 species of marine microalgae. *Phytochemistry*, Vol. 39, No.2: 351-356.

8. ANEXOS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ANEXO A: ABREVIATURAS UTILIZADAS

≈ Similar

µg Microgramos

µl Microlitros

µm Micrómetros

‰ Salinidad

ºC Grados centígrados

a.C. Antes de Cristo

ADN Ácido desoxirribonucleico

ARN Ácido ribonucleico

cél/µl Células por microlitro

cm. Centímetros

c. v. Células vesiculares

CO_2 Dióxido de carbono

CSIC Centro Superior de Investigaciones Científicas

Cu Cobre

d.e Desviación estándar

FAO Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura (Food and Agriculture Organization of the United Nations)

Fe Hierro

g Gramo

G Gradiente

g/l. Gramos por litro

GF Gónada Femenina. Tejido gonadal ocupado por células sexuales femeninas.

GM Gónada Masculina. Tejido gonadal ocupado por células sexuales masculinas.

GT Gónada Total. Tejido gonadal ocupado por células sexuales.

h hemocitos

i.d. Diametro interno

ind. Individuos

kcal Kilocalorías

Kg Kilogramos

Km Kilómetros

l. Litro

l/h Litros por hora

LT Lípidos totales

lux. Unidad para el nivel de iluminación. Equivalente a lumen/m^2.

m Metro

m^2 Metro cuadrado

Mo Molibdeno

mcg Microgramo

mg Miligramo

mg/l Miligramo por litro

mill. Millones

min Minutos

ml. Mililitro

mm Milimetro

Mn Manganeso

N Nitrógeno

NaCl Cloruro Sódico

nº Número

O^2 Oxígeno diatómico

OESA Observatorio Español de Acuicultura

P Fósforo

p/v Peso/Volumen en porcentaje

Phc Peso húmedo de la concha

Phv Peso húmedo de la vianda

Pmi Peso medio del individuo

Pmv Peso medio de la vianda

Pt Peso total

PUFAs Ácidos grasos poliinsaturados (Polyunsaturated fatty acid)

SO Suroeste

T^{a} Temperatura

ton. Tonelada

V/V Volumen/Volumen en porcentaje

W Vatio

w/w Peso/Peso en porcentaje. (Weight/Weight)

Zn Zinc

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ANEXO B: DATOS BIOMÉTRICOS

EFECTO DEL FOTOPERÍODO Y TEMPERATURA SOBRE EL ACONDICIONAMIENTO DE PROGENITORES DE *OSTREA EDULIS*

- **EXPERIMENTO 1; EFECTO COMBINADO DE LA TEMPERATURA Y FOTOPERÍODO EN OTOÑO:**

  Muestreo inicial:

LONGITUD(mm)	ANCHURA(mm)
7,68	6,95
7,37	6,51
7,20	6,79
7,22	6,35
7,12	7,12
6,77	6,52
6,53	6,40
7,31	6,94
7,12	7,18
7,06	6,97
7,02	6,65
7,30	7,08
7,32	7,08
7,33	6,78
6,53	6,51
7,36	7,30
7,16	6,85
6,96	7,45
7,14	6,20
7,34	6,38

- **EXPERIMENTO 2; EFECTO DEL FOTOPERÍODO EN OTOÑO:**

  Muestreo inicial:

LONGITUD(mm)	ANCHURA(mm)	PESOS(g)
9,44	9,30	108,61
11,0	9,95	134,07
10,49	9,54	170,59
9,47	9,34	137,52
9,05	9,31	119,31
9,10	8,81	208,67
9,83	9,85	106,25
8,21	8,50	179,55
9,22	8,74	116,11
7,99	9,02	135,08
8,58	9,50	202,86
9,20	8,98	179,68

EXPERIMENTO 3; EFECTO DEL FOTOPERÍODO EN OTOÑO:

Muestreo inicial:

LONGITUD/mm.	ANCHO/mm.
6,85	7,55
7,86	7,93
7,81	7,98
7,45	7,70
7,58	7,90
7,65	9,60
7,69	7,60
7,47	7,90
7,39	8,20
7,39	7,69
7,17	8,27
7,42	7,18

Muestreo 1: 34 días

8h/luz 3 individuos	
LONGITUD(mm)	**ANCHURA(mm)**
8,5	6,8
7,22	8,4
6,77	7,09
Longitud y anchura media individuo	
7,5	7,43

G1 3 individuos	
LONGITUD(mm)	**ANCHURA(mm)**
6,23	7,22
7,16	7,49
7,06	7,52
Longitud y anchura media individuo	
6,82	7,41

G2 3 individuos	
LONGITUD(mm)	**ANCHURA(mm)**
8,22	9,03
7,18	7,11
7,01	7,48
Longitud y anchura media individuo	
7,47	7,87

Muestreo 2: días

8h/luz 3 individuos	
LONGITUD(mm)	ANCHURA(mm)
8,56	11,10
8,21	9,17
7,27	7,51
Longitud y anchura media individuo	
8,01	9,26

G1 3 individuos	
LONGITUD(mm)	ANCHURA(mm)
9,11	8,20
7,09	7,24
9,13	9,01
Longitud y anchura media individuo	
8,44	8,15

G2 3 individuos	
LONGITUD(mm)	ANCHURA(mm)
7,26	7,44
6,30	7,25
7,46	8,05
Longitud y anchura media individuo	
7,01	7,58

EXPERIMENTO 4; EFECTO DEL FOTOPERÍODO Y LA TEMPERATURA EN INVIERNO.

Muestreo inicial:

LONGITUD(mm)	ANCHURA(mm)
9,12	8,30
8,10	8,95
7,41	8,41
8,05	8,01
7,57	8,81
8,05	8,82
7,48	7,40
8,31	8,39
8,35	8,60
8,03	8,96

Muestreo 1: 01/04/09 (30 días)

AMBIENTE 6 individuos	
LONGITUD(mm)	ANCHURA(mm)
8,28	8,55
9,11	9,08
8,98	8,81
9,10	7,53
7,66	8,92
8,72	7,28
Longitud media individuo	**y anchura**
8,64	8,36

8h/luz 6 individuos	
LONGITUD(mm)	ANCHURA(mm)
9,03	8,79
9,43	9,72
9,10	8,48
8,72	7,68
9,41	9,27
8,69	8,86
Longitud media individuo	**y anchura**
9,06	8,8

16 h/luz 6 individuos	
LONGITUD(mm)	ANCHURA(mm)
9,89	9,47
9,12	8,87
9,11	8,32
8,22	9,51
8,61	7,57
8,81	8,01
Longitud media	**y anchura individuo**
8,96	8,62

G luz 6 individuos	
LONGITUD(mm)	ANCHURA(mm)
8,76	8,68
8,23	8,39
8,98	7,42
8,18	9,54
8,52	9,55
9,65	8,10
Longitud media	**y anchura individuo**
8,72	8,61

- **EXPERIMENTO 5; EFECTO DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE TEMPERATURA Y FOTOPERÍODO EN INVIERNO.**

Muestreo inicial:

LONGITUD(mm)	ANCHURA(mm)
6,53	6,37
6,89	6,70
6,79	6,95
7,38	6,90
7,27	7,20
7,32	6,54
8,00	8,19
7,19	8,49
7,53	7,66
6,36	7,46

EFECTO DE LA RACIÓN DE ALIMENTO SOBRE EL ACONDICIONAMIENTO DE PROGENITORES DE *OSTREA EDULIS*

EXPERIMENTO 6; EFECTO DE LA RACIÓN DE ALIMENTO EN OTOÑO:

Muestreo inicial:

LONGITUD(mm)	ANCHURA(mm)
8,55	9,12
8,22	8,60
11,51	10,75
9,40	8,62
10,24	10,34
8,67	10,20
8,34	9,33
8,97	8,49
8,25	8,84
8,70	9,17

Muestreo 1: 13/11 - 14 días

6%	6 individuos	9%	6 individuos
LONGITUD(mm)	ANCHURA(mm)	LONGITUD(mm)	ANCHURA(mm)
9,92	10,54	11,20	9,67
9,23	8,53	9,55	9,08
10,15	10,45	9,83	9,49
10,43	8,59	8,70	9,88
10,12	10,56	9,30	7,88
8,52	9,5	11,69	9,07
Longitud y anchura media individuo		**Longitud y anchura media individuo**	
9,73	9,7	10,05	9,18

Se realizaron dos muestreos más en los que no se midieron los individuos.

EXPERIMENTO 7; EFECTO DE LA RACIÓN DE ALIMENTO EN INVIERNO:

No hay medidas de los individuos del muestreo inicial.

EFECTO COMBINADO DEL FLUJO DEL AGUA Y LA RACIÓN DE ALIMENTO SOBRE EL ACONDICIONAMIENTO DE PROGENITORES DE *OSTREA EDULIS*

- **EXPERIMENTO 9; EFECTO COMBINADO DEL FLUJO DEL AGUA Y LA RACIÓN DE ALIMENTO.**

Muestreo inicial:

LONGITUD(mm)	ANCHURA(mm)
10,29	9,43
9,35	8,79
9,27	8,51
9,95	9,46
8,87	10,55
8,82	8,81
8,71	8,95
9,48	9,54
8,63	9,07
9,53	8,89

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ANEXO C: RECUENTO GONADAL.

EFECTO DEL FOTOPERÍODO Y TEMPERATURA SOBRE EL ACONDICIONAMIENTO DE PROGENITORES DE *OSTREA EDULIS*

- **EXPERIMENTO 1; EFECTO COMBINADO DE LA TEMPERATURA Y FOTOPERÍODO EN OTOÑO:**

Muestreo inicial			
% Gónada Femenina	% Gónada Masculina	% Total Gónada	
50.2	0	50.20	
15.94	0.13	16.07	
14.81	1.12	15.94	
13.69	0.79	14.48	
1.112	3.49	4.60	
4.365	0	4.37	
0	4.03	4.03	
2.78	0.95	3.73	
0	3.37	3.37	
0.1	1.59	1.69	
0	1.19	1.19	
0.4	0	0.40	
8.58	1.39	9.97	media
14.52	1.46	13.90	desv.

Muestreo 1: 33 días.

Muestreo 1 **15 °C 8h/luz**			
% Gónada Femenina	% Gónada Masculina	% Total Gónada	
0	0	0	
0	0	0	
0	4.1	4.1	
0	1.19	1.19	
0	0	0	
0	0	0	
0	0	0	
5.09	9.33	14.42	
2.51	1.52	4.03	
4.3	1.13	5.42	
0.6	0.33	0.93	
1.14	1.6	2.74	media
1.92	2.84	4.36	desv.

Muestreo 1 **15 °C 16h/luz**			
% Gónada Femenina	% Gónada Masculina	% Total Gónada	
13.33	0.8	14.13	
0	0	0	
0.79	15.21	16.01	
1.19	6.48	7.67	
0	6.55	6.55	
0.6	0.3	0.9	
0	1.39	1.39	
10.91	0.79	11.71	
0	0.13	0.13	
0	0	0	
7.67	1.19	8.86	
3.14	2.99	6.12	media
5.00	4.72	6.03	desv.

Muestreo 1	15 ºC G luz		
% Gónada Femenina	% Gónada Masculina	% Total Gónada	
0	0.4	0.4	
0	7.28	7.28	
12.98	1.49	14.46	
0	0	0	
0	0.79	0.79	
2.51	0.66	3.17	
0	1.85	1.85	
0	9.13	9.13	
0	0.26	0.26	
0	6.88	6.88	
2.78	0.53	3.31	
1.66	2.66	4.32	media
3.9	3.36	4.61	desv.

Muestreo 1	GTª 8h		
% Gónada Femenina	% Gónada Masculina	% Total Gónada	
1.26	9.06	10.32	
10.18	0	10.18	
0	0	0	
0	0	0	
19.71	0.2	19.91	
1.98	0.93	2.91	
8.93	0.2	9.13	
8.33	1.66	9.99	
0.93	1.06	1.98	
1.89	0	1.89	
0	0	0	
4.84	1.19	6.03	media
6.28	2.67	6.37	desv.

Muestreo 1	GTª 16h		
% Gónada Femenina	% Gónada Masculina	% Total Gónada	
0	0	0	
1.21	0.09	1.31	
2.47	0.23	2.71	
0	0.92	0.92	
7.41	7.40	14.81	
0	0	0	
4.10	1.19	5.29	
13.49	1.59	15.08	
25.4	8.20	33.6	
6.01	2.18	8.19	media
8.52	3.24	11.23	desv.

Muestreo 1	GTª G luz		
% Gónada Femenina	% Gónada Masculina	% Total Gónada	
7.94	2.51	10.45	
4.76	1.72	6.48	
7.80	2.78	10.58	
10.85	0.66	11.51	
14.42	6.22	20.64	
17.86	1.19	19.05	
1.06	25.66	26.72	
1.32	0.26	1.59	
4.5	14.02	18.52	
0	0.66	0.66	
14.29	3.44	17.72	
7.71	5.37	13.08	media
6.04	7.79	8.22	desv.

Muestreo 2: 61 días.

Muestreo 2	15 °C 8h/luz		
% Gónada Femenina	% Gónada Masculina	% Total Gónada	
16.00	4.23	20.24	
17.72	12.7	30.42	
1.19	17.33	18.52	
0	0	0	
7.67	9.52	17.2	
0.79	9.26	10.05	
4.46	14.49	18.95	
1.49	1.29	2.78	
0	0	0	
6.45	0	6.45	
5.58	6.88	12.46	media
6.53	6.62	10.17	desv.

Muestreo 2	15 °C 16h/luz		
% Gónada Femenina	% Gónada Masculina	% Total Gónada	
7.28	4.1	11.38	
4.1	0.92	5.023	
5.95	3.17	9.13	
13.09	1.06	14.15	
2.25	0.26	2.51	
16.26	7.14	23.40	
3.08	0.7	3.77	
0	10.82	10.82	
0	6.71	6.71	
14.36	5.45	19.81	
17.86	0.6	18.46	
6.99	3.55	10.53	media
6.60	3.47	6.91	desv.

Muestreo 2 15°C G luz			
% Gónada Femenina	% Gónada Masculina	% Total Gónada	
17,33	18,65	35,98	
0,13	7,54	7,67	
21,30	10,05	31,35	
17,33	20,50	37,83	
0,00	2,65	2,65	
22,49	6,48	28,97	
14,92	10,16	25,08	
16,77	0,00	16,77	
5,55	4,29	9,84	
12,10	10,22	22,32	
30,85	0,00	30,85	
14,43	8,23	22,66	media
9,49	6,75	11,92	desv.

Muestreo 2 GTª 8h			
% Gónada Femenina	% Gónada Masculina	% Gónada Total	
9,79	29,50	39,28	
1,32	1,32	2,65	
3,58	2,78	6,35	
25,93	18,52	44,44	
10,72	1,45	12,17	
0,00	0,79	0,79	
0,00	0,00	0,00	
1,89	4,07	5,95	
3,18	1,39	4,56	
0,00	0,00	0,00	
0,00	0,00	0,00	
5,13	5,44	10,56	media
7,89	9,58	15,95	desv.

Muestreo 2 GTª 16h			
% Gónada Femenina	% Gónada Masculina	% Gónada Total	
3,70	13,49	17,20	
0,00	0,00	0,00	
16,14	9,53	25,67	
3,70	16,27	19,97	
21,96	33,33	55,29	
12,83	4,76	17,59	
2,58	3,47	6,05	
0,00	0,00	0,00	
10,72	0,20	10,91	
14,29	11,24	25,53	
8,59	9,23	17,82	media
7,62	10,32	16,16	desv.

Muestreo 2 GTª G luz			
% Gónada Femenina	% Gónada Masculina	% Gónada Total	
74,21	0	74,21	
27,12	1,19	28,31	
33,33	5,56	38,89	
30,56	2,78	33,34	
29,97	7,14	37,11	
1,32	2,12	3,44	
15,67	0	15,67	
10,32	0	10,32	
27,81	2,35	30,16	media
21,88	2,71	22,03	desv.

Muestreo 3: 95 días.

Muestreo 3 15ºC 8h			
% Gónada Femenina	% Gónada Masculina	% Gónada Total	
35,45	3,70	39,15	
19,71	3,84	23,55	
14,78	3,57	18,36	
24,31	2,08	26,39	
1,32	10,32	11,64	
19,11	4,7	23,82	media
12,55	3,22	10,25	desv.

Muestreo 3 15ºC 16h			
% Gónada Femenina	% Gónada Masculina	% Gónada Total	
0,00	38,23	38,23	
0,26	0,00	0,26	
1,32	50,00	51,32	
0,00	10,58	10,58	
0,00	0,00	0,00	
0,00	7,67	7,67	
0,00	0,00	0,00	
0,00	7,24	7,24	
0,2	14,21	14,41	media
0,46	19,15	19,48	desv.

Muestreo 3 15ºC G luz			
% Gónada Femenina	% Gónada Masculina	% Gónada Total	
24,21	0,00	24,21	
17,72	0,00	17,72	
3,84	0,00	3,84	
18,52	0,00	18,52	
6,95	0,00	6,95	
14,25	0,00	14,25	media
8,53	0,00	8,53	desv.

EXPERIMENTO 2; EFECTO DEL FOTOPERÍODO EN OTOÑO:

Muestreo inicial: 10/10/2007

Muestreo inicial			
% Gónada Femenina	% Gónada Masculina	% Total Gónada	
0,93	0,00	0,93	
17,66	0,00	17,66	
1,99	2,12	4,10	
0,00	0,00	0,00	
0,27	7,41	7,67	
4,76	0,60	5,36	
8,07	0,13	8,20	
0,00	4,56	4,56	
0,00	2,05	2,05	
0,00	7,01	7,01	
5,49	9,99	15,48	
0,00	1,12	1,12	
3,26	2,92	6,18	media
5,28	3,48	5,57	desv.

Muestreo 1: 29 días.

Muestreo 1 8h/luz			
% Gónada Femenina	% Gónada Masculina	% Total Gónada	
5,16	10,05	15,21	
6,88	4,10	10,98	
0,00	7,01	7,01	
0,00	0,86	0,86	
0,00	0,00	0,00	
0,00	0,00	0,00	
0,00	2,18	2,18	
0,00	1,92	1,92	
0,00	0,00	0,00	
2,25	0,53	2,78	
1,43	2,67	4,09	media
2,55	3,42	5,27	desv.

Muestreo 1 G(8-16h/luz)			
% Gónada Femenina	% Gónada Masculina	% Total Gónada	
0,00	37,43	37,43	
14,68	5,36	20,04	
0,00	6,61	6,61	
24,01	2,31	26,32	
43,06	0,00	43,06	
0,00	31,68	31,68	
0,00	0,00	0,00	
0,00	0,93	0,93	
0,00	33,40	33,40	
4,03	1,59	5,62	
8,58	11,93	20,51	media
14,63	15,56	16,12	desv.

Muestreo 2: 34 días.

Muestreo 2 8h/luz			
% Gónada Femenina	% Gónada Masculina	% Total Gónada	
0,00	1,39	1,39	
0,00	4,63	4,63	
0,00	11,31	11,31	
2,85	17,06	19,91	
0,00	15,54	15,54	
0,00	7,21	7,21	
0,00	3,77	3,77	
6,55	2,85	9,39	
2,38	4,37	6,74	
1,31	7,57	8,88	media
2,27	5,72	5,91	desv.

Muestreo 2 G (8-16h/luz)			
% Gónada Femenina	% Gónada Masculina	% Total Gónada	
17,06	0,93	17,99	
0,00	0,00	0,00	
0,00	2,84	2,84	
7,28	20,57	27,84	
0,00	1,46	1,46	
0,00	27,51	27,51	
4,69	1,06	5,75	
12,83	26,99	39,82	
0,00	40,41	40,41	
13,63	8,00	21,63	
8,53	33,67	42,20	
18,19	26,19	44,38	
0,00	0,00	0,00	
6,32	14,59	20,91	media
7,07	14,92	17,44	desv.

Muestreo 3: 43 días.

Muestreo 3 8h/luz			
% Gónada Femenina	% Gónada Masculina	% Total Gónada	
0,20	16,34	16,53	
0,00	0,00	0,00	
0,00	23,35	23,35	
0,40	17,93	18,32	
11,58	7,74	19,31	
4,56	0,66	5,22	
15,15	32,34	47,49	
25,07	0,00	25,07	
0,00	30,16	30,16	
4,96	3,77	8,73	
6,19	13,23	19,42	media
8,53	12,53	13,55	desv.

Muestreo 3 G (8-16 h/luz)			
% Gónada Femenina	% Gónada Masculina	% Total Gónada	
0,66	39,62	40,28	
16,14	7,34	23,48	
0,00	24,41	24,41	
5,89	27,45	33,33	
0,00	0,00	0,00	
8,27	8,67	16,93	
4,70	14,09	18,78	
0,00	43,98	43,98	
0,00	18,52	18,52	
0,00	5,03	5,03	
3,56	18,91	22,47	media
5,36	14,81	14,03	desv.

Muestreo 4: 49 días.

Muestreo 4 8h/luz			
% Gónada Femenina	% Gónada Masculina	% Total Gónada	
1,98	18,12	20,11	
0,00	0,00	0,00	
0,73	9,06	9,79	
6,68	0,00	6,68	
0,00	52,12	52,12	
0,00	39,29	39,29	
19,18	20,63	39,81	
0,00	17,92	17,92	
32,61	6,28	38,89	
24,94	11,51	36,44	
8,61	17,49	26,10	media
12,29	16,76	17,44	desv.

Muestreo 4 G (8-16h/luz)			
% Gónada Femenina	% Gónada Masculina	% Total Gónada	
0,00	40,01	40,01	
0,00	43,25	43,25	
37,90	0,66	38,56	
8,86	38,29	47,15	
0,00	51,85	51,85	
9,46	0,00	9,46	
0,00	37,76	37,76	
25,53	24,47	50,00	
0,00	20,90	20,90	
9,08	28,58	37,66	media
13,75	18,50	13,95	desv.

Muestreo 5: 69 días.

Muestreo 5 8h/luz			
% Gónada Femenina	% Gónada Masculina	% Total Gónada	
0,00	29,63	29,63	
17,53	4,63	22,16	
0,00	49,27	49,27	
0,00	27,51	27,51	
0,00	26,12	26,12	
8,47	8,47	16,93	
1,06	39,09	40,15	
0,20	34,99	35,19	
0,73	11,97	12,70	
0,00	33,60	33,60	
2,80	26,53	29,32	media
5,80	14,24	10,87	desv.

Muestreo 5 G (8-16h/luz)			
% Gónada Femenina	% Gónada Masculina	% Total Gónada	
2,91	23,28	26,19	
36,37	12,90	49,27	
9,13	24,74	33,86	
0,99	32,41	33,40	
0,00	42,99	42,99	
30,16	0,00	30,16	
0,00	20,70	20,70	
0,00	42,46	42,46	
9,79	32,81	42,59	
0,00	48,61	48,61	
8,93	28,09	37,02	media
13,43	14,90	9,63	desv.

- **EXPERIMENTO 3; EFECTO DEL FOTOPERÍODO EN OTOÑO:**

Muestreo inicial			
% Gónada Femenina	% Gónada Masculina	% Total Gónada	
6,68	1,33	8,00	
0,00	0,00	0,00	
0,07	0,13	0,20	
4,17	0,00	4,17	
1,32	5,09	6,42	
2,45	1,31	3,76	
0,00	4,76	4,76	
3,37	0,33	3,70	
0,00	0,07	0,07	
1,32	2,98	4,30	
11,44	3,04	14,48	
0,00	7,74	7,74	
2,57	2,23	4,80	media
3,50	2,53	4,10	desv.

Muestreo 1: 35 días.

Muestreo 1 8h/luz			Muestreo 1 GRADIENTE 1			Muestreo 1 GRADIENTE 2			
% Gónada Femenina	% Gónada Masculina	% Total Gónada	% Gónada Femenina	% Gónada Masculina	% Total Gónada	% Gónada Femenina	% Gónada Masculina	% Total Gónada	
0,00	20,77	20,77	0,00	2,25	2,25	0,00	1,92	1,92	
0,00	13,69	13,69	0,00	0,00	0,00	0,00	2,58	2,58	
0,00	2,71	2,71	0,00	2,31	2,31	0,00	5,29	5,29	
0,00	1,92	1,92	0,00	3,51	3,51	0,00	6,42	6,42	
4,63	10,98	15,61	0,00	12,96	12,96	0,00	0,00	0,00	
0,20	6,61	6,81	0,00	0,00	0,00	0,93	0,13	1,06	
0,80	9,45	10,25	0,00	3,51	3,51	0,15	2,72	2,88	media
1,87	7,19	7,60	0	4,84	4,84	0,38	2,65	2,49	desv.

Muestreo 2: 63 días.

Muestreo 2 8h/luz			Muestreo 2 GRADIENTE 1			Muestreo 2 GRADIENTE 2			
% Gónada Femenina	% Gónada Masculina	% Total Gónada	% Gónada Femenina	% Gónada Masculina	% Total Gónada	% Gónada Femenina	% Gónada Masculina	% Total Gónada	
0,00	1,52	1,52	0,00	4,37	4,37	0,00	2,12	2,12	
0,00	4,57	4,57	0,00	7,54	7,54	0,00	1,19	1,19	
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	21,56	21,56	
0,00	0,86	0,86	13,30	13,76	27,05	0,33	9,13	9,46	
0,00	7,08	7,08	0,00	10,19	10,19	16,54	5,82	22,36	
0,00	4,96	4,96	0,00	4,37	4,37	16,14	4,03	20,17	
0,00	3,16	3,16	2,22	6,70	8,92	5,50	7,31	12,81	media
0,00	2,78	2,78	5,43	4,87	9,52	8,40	7,53	9,82	desv.

- **EXPERIMENTO 4; EFECTO DEL FOTOPERÍODO Y LA TEMPERATURA EN INVIERNO.**

Muestreo inicial			
% Gónada Femenina	% Gónada Masculina	% Total Gónada	
1,65	16,54	18,19	
1,79	5,95	7,74	
10,65	2,65	13,29	
3,18	6,81	9,99	
0,00	10,65	10,65	
6,15	14,75	20,90	
3,90	6,48	10,38	
2,65	14,29	16,94	
13,76	3,57	17,33	
15,87	8,20	24,07	
5,96	8,989	14,948	media
5,53	4,85	5,35	desv.

Muestreo 1: 01/04/09 (30 días)

Muestreo 2 AMBIENTE			Muestreo 1 8h/luz		
% Gónada Femenina	% Gónada Masculina	% Total Gónada	% Gónada Femenina	% Gónada Masculina	% Total Gónada
2,51	8,00	10,51	9,72	3,77	13,49
19,71	29,43	49,14	22,62	3,84	26,46
23,81	0,20	24,01	46,23	6,81	53,04
4,30	57,74	62,04	17,00	10,25	27,25
35,52	14,15	49,67	19,91	34,79	54,70
29,76	22,82	52,58	30,95	11,18	42,13
19,27	22,06	41,33	24,41	11,77	36,18
13,42	20,33	19,68	12,75	11,70	16,44
6,39	11,27	9,94			

Muestreo 1 16h/luz			Muestreo 1 G (8-16h/luz)		
% Gónada Femenina	% Gónada Masculina	% Total Gónada	% Gónada Femenina	% Gónada Masculina	% Total Gónada
11,18	1,06	12,24	0,00	0,93	0,93
4,76	0,07	4,83	7,94	44,64	52,58
16,80	0,00	16,80	6,61	5,89	12,50
23,28	4,10	27,38	0,00	40,41	40,41
21,10	17,79	38,89	10,58	24,67	35,25
14,68	24,08	38,76	0,00	15,34	15,34
15,30	7,85	23,15	4,19	21,98	26,17
6,75	10,44	14,17	4,76	17,92	19,62

Muestreo 2: 04/05/09 (63 días)

Muestreo 2 AMBIENTE			Muestreo 2 8h/luz		
% Gónada Femenina	% Gónada Masculina	% Total Gónada	% Gónada Femenina	% Gónada Masculina	% Total Gónada
2,51	8,00	10,51	34,66	0,00	34,66
19,71	29,43	49,14	0,00	65,35	65,35
23,81	0,20	24,01	44,45	14,15	58,60
4,30	57,74	62,04	0,00	46,63	46,63
35,52	14,15	49,67	1,59	58,99	60,58
29,76	22,82	52,58	1,52	47,02	48,54
19,27	22,06	41,33	13,70	38,69	52,39
13,42	20,33	19,68	20,27	25,90	11,28

Muestreo 2 16h/luz			Muestreo 2 G (8-16h/luz)		
% Gónada Femenina	% Gónada Masculina	% Total Gónada	% Gónada Femenina	% Gónada Masculina	% Total Gónada
15,81	25,46	41,27	6,02	22,95	28,97
18,32	15,54	33,86	19,12	10,12	29,24
0,46	4,17	4,63	9,66	6,95	16,60
0,00	59,26	59,26	0,00	26,19	26,19
0,00	29,43	29,43	24,43	6,91	31,35
1,06	38,89	39,95	17,59	0,00	17,59
5,94	28,79	34,73	12,80	12,19	24,99
8,66	19,10	17,93	9,14	10,20	6,34

EFECTO DE LA RACIÓN DE ALIMENTO SOBRE EL ACONDICIONAMIENTO DE PROGENITORES DE *OSTREA EDULIS*

EXPERIMENTO 6; EFECTO DE LA RACIÓN DE ALIMENTO EN OTOÑO:

Muestreo inicial			
% Gónada Femenina	% Gónada Masculina	% Total Gónada	
2,78	1,46	4,24	
2,25	0,53	2,78	
0,40	1,72	2,12	
0,20	5,56	5,76	
18,72	0,00	18,72	
7,87	0,00	7,87	
0,00	8,00	8,00	
8,07	0,00	8,07	
0,00	0,00	0,00	
0,93	0,00	0,93	
4,12	1,73	5,85	media
5,98	2,80	5,41	desv.

Muestreo 1: 14 días

Muestreo 1 6%GtGf			
% Gónada Femenina	% Gónada Masculina	% Total Gónada	
2,25	3,97	6,22	
16,07	0,00	16,07	
1,06	10,85	11,91	
19,05	0,99	20,04	
0,00	0,93	0,93	
24,34	0,33	24,67	
10,46	2,84	13,30	media
10,61	4,17	8,80	desv.

Muestreo 1 9%GtGf			
% Gónada Femenina	% Gónada Masculina	% Total Gónada	
0,47	4,10	4,57	
0,73	8,47	9,19	
1,92	0,00	1,92	
14,09	11,71	25,80	
0,00	0,00	0,00	
0,46	6,95	7,41	
2,94	5,20	8,15	media
5,50	4,72	9,29	desv.

Muestreo 2: 30 días

Muestreo 2 6%GtGf			
% Gónada Femenina	% Gónada Masculina	% Total Gónada	
3,90	5,16	9,06	
0,20	21,10	21,30	
4,63	21,63	26,26	
15,08	2,71	17,79	
8,99	25,13	34,13	
0,00	41,21	41,21	
5,47	19,49	24,96	media
5,76	14,12	11,55	desv.

Muestreo 2 9%GtGf			
% Gónada Femenina	% Gónada Masculina	% Total Gónada	
3,64	16,54	20,17	
26,26	8,73	34,99	
41,14	0,00	41,14	
35,39	11,91	47,29	
14,35	33,80	48,15	
0,00	37,30	37,30	
20,13	18,05	38,17	media
16,87	14,64	10,26	desv.

Muestreo 3: 74 días

Muestreo 3 6%GtGf			
% Gónada Femenina	% Gónada Masculina	% Total Gónada	
7,41	13,10	20,50	
4,10	15,54	19,65	
20,37	15,21	35,59	
18,39	11,24	29,63	
11,11	5,62	16,73	
0,00	0,00	0,00	
10,23	10,12	20,35	media
8,00	6,13	12,21	desv.

Muestreo 3 9%GtGf			
% Gónada Femenina	% Gónada Masculina	% Total Gónada	
0,00	5,09	5,09	
21,36	2,85	24,21	
25,20	2,18	27,38	
17,26	0,00	17,26	
40,81	0,00	40,81	
20,93	2,02	22,95	media
14,71	2,14	13,15	desv.

EXPERIMENTO 7; EFECTO DE LA RACIÓN DE ALIMENTO EN INVIERNO:

Muestreo inicial			
% Gónada Femenina	% Gónada Masculina	% Total Gónada	
12,37	30,03	42,40	
4,30	32,21	36,51	
14,29	9,19	23,48	
0,00	9,46	9,46	
18,52	18,32	36,84	
11,77	16,40	28,17	
5,23	6,15	11,38	
5,23	0,00	5,23	
0,00	4,83	4,83	
0,00	11,90	11,90	
7,17	13,85	21,02	media
6,65	10,55	14,24	desv.

Muestreo 1: 18 días

Muestreo 1 3%GtGf			Muestreo 1 6%GtGf			Muestreo 1 9%GtGf			
% Gónada Femenina	% Gónada Masculina	% Total Gónada	% Gónada Femenina	% Gónada Masculina	% Total Gónada	% Gónada Femenina	% Gónada Masculina	% Total Gónada	
13,16	20,31	33,47	18,78	21,83	40,61	3,44	13,76	17,20	
6,61	1,06	7,67	28,44	2,18	30,62	10,19	35,05	45,24	
0,00	17,66	17,66	0,00	24,41	24,41	4,10	21,63	25,73	
0,00	13,69	13,69	2,65	46,96	49,61	1,26	37,04	38,30	
30,16	8,27	38,43	7,61	33,80	41,41	0,00	62,24	62,24	
23,87	25,40	49,27	4,70	8,73	13,43	16,80	5,23	22,03	
12,30	14,40	26,70	10,36	22,99	33,35	5,97	29,16	35,12	media
12,56	8,75	16,16	10,99	16,32	13,16	6,37	20,29	16,90	desv.

EFECTO COMBINADO DEL FLUJO DEL AGUA Y LA RACIÓN DE ALIMENTO SOBRE EL ACONDICIONAMIENTO DE PROGENITORES DE *OSTREA EDULIS*

EXPERIMENTO 9; EFECTO COMBINADO DEL FLUJO DEL AGUA Y LA RACIÓN DE ALIMENTO.

Muestreo inicial			
% Gónada Femenina	% Gónada Masculina	% Total Gónada	
11,91	1,99	13,89	
25,60	0,00	25,60	
0,33	5,56	5,89	
15,81	0,60	16,40	
25,60	0,93	26,52	
16,80	0,53	17,33	
0,00	0,00	0,00	
9,19	7,87	17,06	
24,54	0,00	24,54	
17,06	4,30	21,36	
14,68	2,18	16,86	media
9,46	2,78	8,58	desv.

Muestreo 1: 26 días

Muestreo 1 1l/h 3%			Muestreo 1 1l/h 6%			Muestreo 1 1l/h 9%			
% Gónada Femenina	% Gónada Masculina	% Total Gónada	% Gónada Femenina	% Gónada Masculina	% Total Gónada	% Gónada Femenina	% Gónada Masculina	% Total Gónada	
31,42	0,13	31,55	1,72	17,73	19,45	16,60	0,40	17,00	
18,59	0,60	19,18	0,00	28,27	28,27	0,00	15,41	15,41	
0,59	50,07	50,66	18,59	27,45	46,03	0,27	7,61	7,87	
0,00	1,52	1,52	6,75	19,97	26,72	0,20	8,93	9,13	
10,05	20,90	30,95	38,69	0,00	38,69	0,07	4,76	4,83	
38,96	8,34	47,29	5,23	30,69	35,91	40,87	0,00	40,87	
16,60	13,59	30,19	11,83	20,68	32,51	9,67	6,18	15,85	media
16,11	19,53	18,20	14,69	11,32	9,54	16,65	5,80	13,10	desv.

Muestreo 1 2l/h 3%			Muestreo 1 2l/h 6%			Muestreo 1 2l/h 9%			
% Gónada Femenina	% Gónada Masculina	% Total Gónada	% Gónada Femenina	% Gónada Masculina	% Total Gónada	% Gónada Femenina	% Gónada Masculina	% Total Gónada	
4,83	14,49	19,32	19,78	0,00	19,78	10,25	27,52	37,77	
25,46	0,00	25,46	19,44	0,00	19,44	0,79	60,52	61,31	
15,74	16,20	31,95	36,44	0,60	37,04	3,37	12,30	15,67	
0,99	23,68	24,67	19,18	0,00	19,18	1,19	35,52	36,71	
6,55	17,00	23,55	9,85	11,97	21,83	19,05	26,46	45,50	
0,00	1,85	1,85	41,73	0,00	41,73	46,83	0,00	46,83	
8,93	12,20	21,13	24,40	2,09	26,50	13,58	27,05	40,63	media
9,85	9,29	10,29	12,09	4,84	10,13	17,71	20,70	15,07	desv.

Muestreo 1 3l/h 3%			Muestreo 1 3l/h 6%			Muestreo 1 3l/h 9%			
% Gónada Femenina	% Gónada Masculina	% Total Gónada	% Gónada Femenina	% Gónada Masculina	% Total Gónada	% Gónada Femenina	% Gónada Masculina	% Total Gónada	
17,00	8,67	25,66	14,09	10,12	24,21	15,81	0,99	16,80	
0,46	42,20	42,66	8,60	35,98	44,58	16,07	31,48	47,55	
1,06	41,40	42,46	17,79	0,00	17,79	18,98	12,44	31,42	
3,97	15,94	19,91	40,61	7,81	48,41	5,89	27,25	33,14	
22,03	0,00	22,03	34,86	18,39	53,24	24,80	0,00	24,80	
18,85	15,08	33,93	31,15	0,00	31,15	3,37	44,71	48,08	
10,56	20,55	31,11	24,52	12,05	36,56	14,15	19,48	33,63	media
9,77	17,42	10,08	12,78	13,60	14,26	8,10	17,95	12,40	desv.

UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ANEXO D: ANÁLISIS ESTADÍSTICO

EFECTO DEL FOTOPERÍODO Y TEMPERATURA SOBRE EL ACONDICIONAMIENTO DE PROGENITORES DE *OSTREA EDULIS*

EXPERIMENTO 1; EFECTO COMBINADO DE LA TEMPERATURA Y FOTOPERÍODO EN OTOÑO.

Descriptive Statistics

	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
Ocupacion	142	.00	74.21	12.4311	13.25999
Arcs_Ocup	142	.0000	1.0381	.302947	.2170079
Valid N (listwise)	142				

Tests of Normality

		Kolmogorov-Smirnov[a]			Shapiro-Wilk		
	Temperatura	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Ocupacion	15ºC	.160	82	.000	.875	82	.000
	GT	.185	60	.000	.823	60	.000
Arcs_Ocup	15ºC	.074	82	.200*	.961	82	.013
	GT	.090	60	.200*	.951	60	.018

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.

Fotoperiodo

Tests of Normality

		Kolmogorov-Smirnov[a]			Shapiro-Wilk		
	Fotoperiodo	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Ocupacion	8h	.204	47	.000	.807	47	.000
	16h	.184	49	.000	.814	49	.000
	GF	.132	46	.043	.872	46	.000
Arcs_Ocup	8h	.153	47	.008	.917	47	.003
	16h	.087	49	.200*	.948	49	.031
	GF	.064	46	.200*	.968	46	.243

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.

Levene's Test of Equality of Error Variances[a]

	F	df1	df2	Sig.
Ocupacion	2.763	14	127	.001
Arcs_Ocup	1.342	14	127	.192

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept + Muestreo + Temperatura + Fotoperiodo + Muestreo * Temperatura + Muestreo * Fotoperiodo + Temperatura * Fotoperiodo + Muestreo * Temperatura * Fotoperiodo

Tests of Between-Subjects Effects

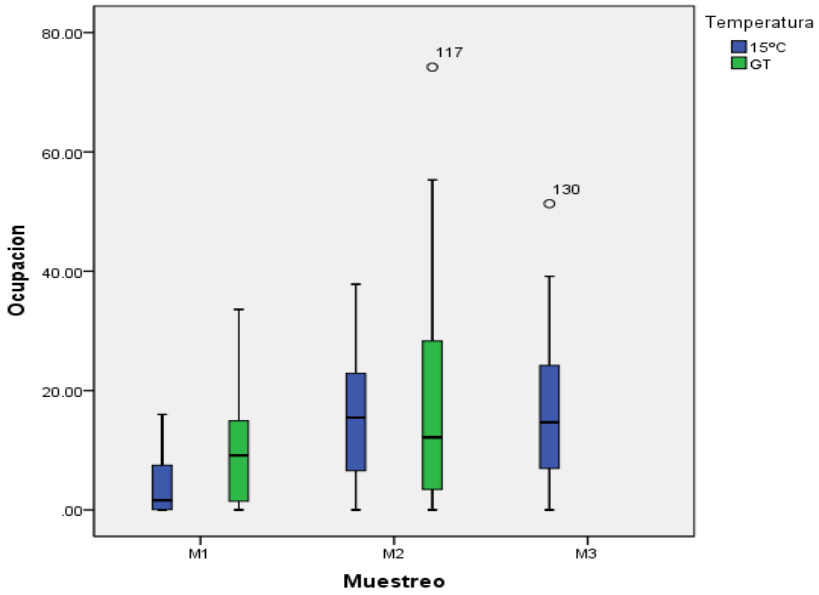
Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square
Corrected Model	Ocupacion	7449.590[a]	14	532.114
	Arcs_Ocup	2.062[b]	14	.147
Intercept	Ocupacion	22204.377	1	22204.377
	Arcs_Ocup	12.270	1	12.270
Muestreo	Ocupacion	4344.826	2	2172.413
	Arcs_Ocup	1.155	2	.577
Temperatura	Ocupacion	590.009	1	590.009
	Arcs_Ocup	.108	1	.108
Fotoperiodo	Ocupacion	689.521	2	344.760
	Arcs_Ocup	.269	2	.135
Muestreo * Temperatura	Ocupacion	4.200	1	4.200
	Arcs_Ocup	.042	1	.042
Muestreo * Fotoperiodo	Ocupacion	1244.130	4	311.032
	Arcs_Ocup	.289	4	.072
Temperatura * Fotoperiodo	Ocupacion	278.370	2	139.185
	Arcs_Ocup	.069	2	.034
Muestreo * Temperatura * Fotoperiodo	Ocupacion	122.370	2	61.185
	Arcs_Ocup	.048	2	.024
Error	Ocupacion	17342.072	127	136.552
	Arcs_Ocup	4.578	127	.036
Total	Ocupacion	46735.336	142	
	Arcs_Ocup	19.672	142	
Corrected Total	Ocupacion	24791.662	141	
	Arcs_Ocup	6.640	141	

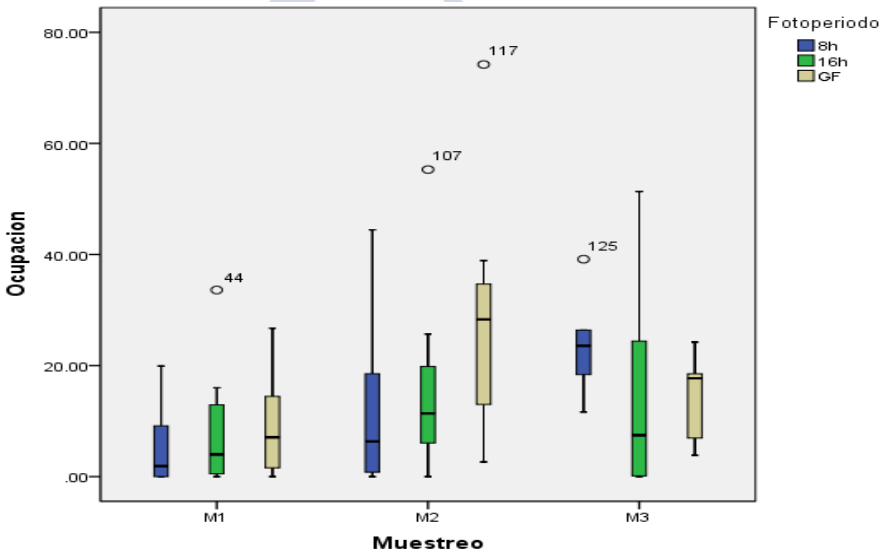
Tests of Between-Subjects Effects

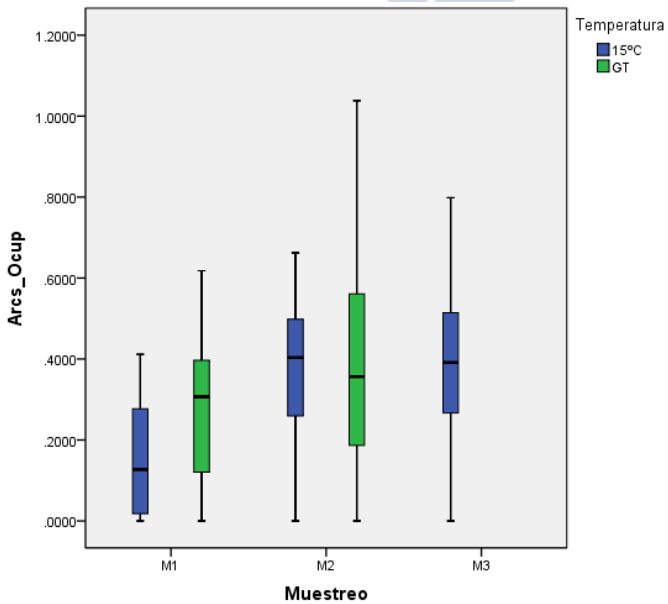
Source	Dependent Variable	F	Sig.
Corrected Model	Ocupacion	3.897	.000
	Arcs_Ocup	4.086	.000
Intercept	Ocupacion	162.608	.000
	Arcs_Ocup	340.386	.000
Muestreo	Ocupacion	15.909	.000
	Arcs_Ocup	16.020	.000
Temperatura	Ocupacion	4.321	.040
	Arcs_Ocup	2.993	.086
Fotoperiodo	Ocupacion	2.525	.084
	Arcs_Ocup	3.735	.027
Muestreo * Temperatura	Ocupacion	.031	.861
	Arcs_Ocup	1.152	.285
Muestreo * Fotoperiodo	Ocupacion	2.278	.064
	Arcs_Ocup	2.005	.098
Temperatura * Fotoperiodo	Ocupacion	1.019	.364
	Arcs_Ocup	.954	.388
Muestreo * Temperatura * Fotoperiodo	Ocupacion	.448	.640
	Arcs_Ocup	.661	.518
Error	Ocupacion		
	Arcs_Ocup		
Total	Ocupacion		
	Arcs_Ocup		
Corrected Total	Ocupacion		
	Arcs_Ocup		

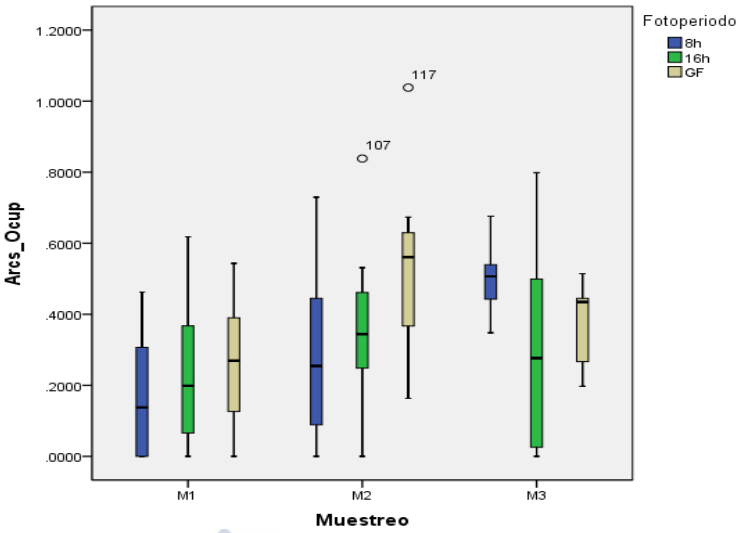
a. R Squared = .300 (Adjusted R Squared = .223)

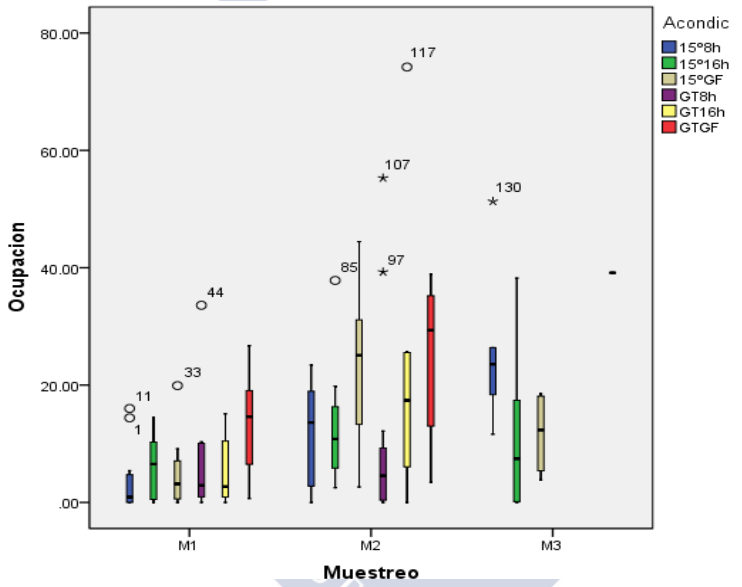
b. R Squared = .311 (Adjusted R Squared = .235)

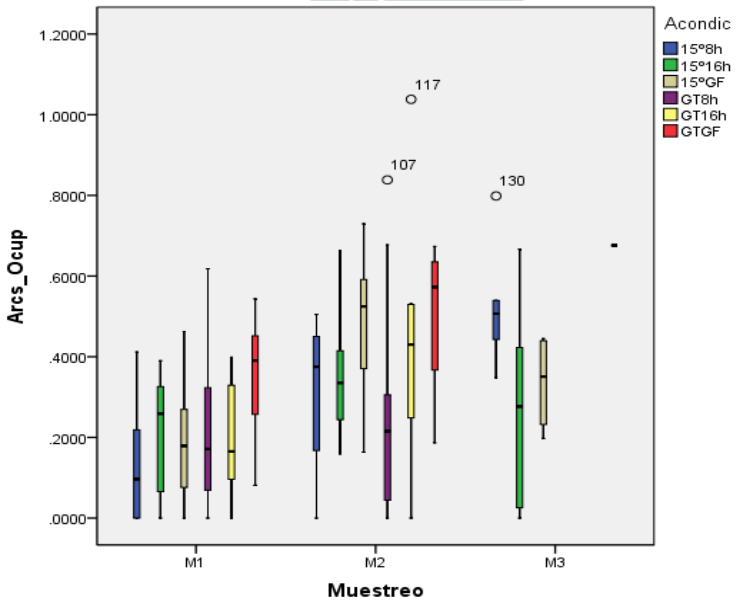

Temperatura
15ºC
GT
80.00
60.00
40.00
20.00
.00
Ocupacion
117
130
M1
M2
M3
Muestreo


Fotoperiodo
8h
16h
GF
80.00
60.00
40.00
20.00
.00
Ocupacion
117
107
125
44
M1
M2
M3
Muestreo


Temperatura
15ºC
GT
1.2000
1.0000
.8000
.6000
.4000
.2000
.0000
Arcs_Ocup
M1
M2
M3
Muestreo


Fotoperiodo
8h
16h
GF
Arcs_Ocup
1.2000
1.0000
.8000
.6000
.4000
.2000
.0000
117
107
M1
M2
M3
Muestreo


Acondic
15º8h
15º16h
15ºGF
GT8h
GT16h
GTGF
Ocupacion
80.00
60.00
40.00
20.00
.00
117
107
130
85
97
44
33
11
1
M1
M2
M3
Muestreo


Acondic
15º8h
15º16h
15ºGF
GT8h
GT16h
GTGF
Arcs_Ocup
1.2000
1.0000
.8000
.6000
.4000
.2000
.0000
117
107
130
M1
M2
M3
Muestreo

MUESTREOS 1-2

Tests of Between-Subjects Effects

Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square
Corrected Model	Ocupacion	6699.320[a]	11	609.029
	Arcs_Ocup	1.825[b]	11	.166
Intercept	Ocupacion	18029.807	1	18029.807
	Arcs_Ocup	10.813	1	10.813
Muestreo	Ocupacion	3570.649	1	3570.649
	Arcs_Ocup	.946	1	.946
Temperatura	Ocupacion	590.009	1	590.009
	Arcs_Ocup	.108	1	.108
Fotoperiodo	Ocupacion	1993.464	2	996.732
	Arcs_Ocup	.629	2	.315
Muestreo * Temperatura	Ocupacion	4.200	1	4.200
	Arcs_Ocup	.042	1	.042
Muestreo * Fotoperiodo	Ocupacion	730.754	2	365.377
	Arcs_Ocup	.101	2	.050
Temperatura * Fotoperiodo	Ocupacion	278.370	2	139.185
	Arcs_Ocup	.069	2	.034
Muestreo * Temperatura * Fotoperiodo	Ocupacion	122.370	2	61.185
	Arcs_Ocup	.048	2	.024
Error	Ocupacion	13974.324	112	124.771
	Arcs_Ocup	3.821	112	.034
Total	Ocupacion	37854.312	124	
	Arcs_Ocup	16.241	124	
Corrected Total	Ocupacion	20673.643	123	
	Arcs_Ocup	5.646	123	

Tests of Between-Subjects Effects

Source	Dependent Variable	F	Sig.
Corrected Model	Ocupacion	4.881	.000
	Arcs_Ocup	4.864	.000
Intercept	Ocupacion	144.503	.000
	Arcs_Ocup	316.955	.000
Muestreo	Ocupacion	28.618	.000
	Arcs_Ocup	27.729	.000
Temperatura	Ocupacion	4.729	.032

	Arcs_Ocup	3.162	.078
Fotoperiodo	Ocupacion	7.989	.001
	Arcs_Ocup	9.220	.000
Muestreo * Temperatura	Ocupacion	.034	.855
	Arcs_Ocup	1.218	.272
Muestreo * Fotoperiodo	Ocupacion	2.928	.058
	Arcs_Ocup	1.474	.233
Temperatura * Fotoperiodo	Ocupacion	1.116	.331
	Arcs_Ocup	1.008	.368
Muestreo * Temperatura *	Ocupacion	.490	.614
Fotoperiodo	Arcs_Ocup	.698	.500
Error	Ocupacion		
	Arcs_Ocup		
Total	Ocupacion		
	Arcs_Ocup		
Corrected Total	Ocupacion		
	Arcs_Ocup		

a. R Squared = .324 (Adjusted R Squared = .258)

b. R Squared = .323 (Adjusted R Squared = .257)

Tests of Between-Subjects Effects

Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square
Corrected Model	Ocupacion	5565.904[a]	4	1391.476
	Arcs_Ocup	1.557[b]	4	.389
Intercept	Ocupacion	17700.582	1	17700.582
	Arcs_Ocup	10.796	1	10.796
Muestreo	Ocupacion	3449.735	1	3449.735
	Arcs_Ocup	.921	1	.921
Temperatura	Ocupacion	537.247	1	537.247
	Arcs_Ocup	.103	1	.103
Fotoperiodo	Ocupacion	1873.864	2	936.932
	Arcs_Ocup	.611	2	.306
Error	Ocupacion	15107.739	119	126.956
	Arcs_Ocup	4.089	119	.034
Total	Ocupacion	37854.312	124	
	Arcs_Ocup	16.241	124	
Corrected Total	Ocupacion	20673.643	123	
	Arcs_Ocup	5.646	123	

Tests of Between-Subjects Effects

Source	Dependent Variable	F	Sig.
Corrected Model	Ocupacion	10.960	.000
	Arcs_Ocup	11.329	.000
Intercept	Ocupacion	139.423	.000
	Arcs_Ocup	314.196	.000
Muestreo	Ocupacion	27.173	.000
	Arcs_Ocup	26.812	.000
Temperatura	Ocupacion	4.232	.042
	Arcs_Ocup	2.994	.086
Fotoperiodo	Ocupacion	7.380	.001
	Arcs_Ocup	8.894	.000
Error	Ocupacion		
	Arcs_Ocup		
Total	Ocupacion		
	Arcs_Ocup		
Corrected Total	Ocupacion		
	Arcs_Ocup		

a. R Squared = .269 (Adjusted R Squared = .245)

b. R Squared = .276 (Adjusted R Squared = .251)

Tests of Normality

		Kolmogorov-Smirnov[a]			Shapiro-Wilk		
	Muestreo	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Ocupacion	M1	.187	63	.000	.840	63	.000
	M2	.132	61	.010	.894	61	.000
Arcs_Ocup	M1	.106	63	.078	.934	63	.002
	M2	.067	61	.200*	.974	61	.214

Tests of Normality

		Kolmogorov-Smirnov[a]			Shapiro-Wilk		
	Temperatura	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Ocupacion	15ºC	.163	64	.000	.871	64	.000
	GT	.185	60	.000	.823	60	.000
Arcs_Ocup	15ºC	.078	64	.200*	.954	64	.017
	GT	.090	60	.200*	.951	60	.018

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.

Tests of Normality

		Kolmogorov-Smirnov[a]			Shapiro-Wilk		
	Fotoperiodo	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Ocupacion	8h	.229	42	.000	.755	42	.000
	16h	.166	41	.006	.838	41	.000
	GF	.143	41	.034	.869	41	.000
Arcs_Ocup	8h	.168	42	.004	.901	42	.002
	16h	.075	41	.200*	.956	41	.114
	GF	.076	41	.200*	.966	41	.249

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.

Levene's Test of Equality of Error Variances[a]

	F	df1	df2	Sig.
Ocupacion	2.867	11	112	.002
Arcs_Ocup	1.202	11	112	.294

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept + Muestreo + Temperatura + Fotoperiodo + Muestreo * Temperatura + Muestreo * Fotoperiodo + Temperatura * Fotoperiodo + Muestreo * Temperatura * Fotoperiodo

Tests of Between-Subjects Effects

Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square
Corrected Model	Ocupacion	6699.320[a]	11	609.029
	Arcs_Ocup	1.825[b]	11	.166
Intercept	Ocupacion	18029.807	1	18029.807
	Arcs_Ocup	10.813	1	10.813
Muestreo	Ocupacion	3570.649	1	3570.649
	Arcs_Ocup	.946	1	.946
Temperatura	Ocupacion	590.009	1	590.009
	Arcs_Ocup	.108	1	.108
Fotoperiodo	Ocupacion	1993.464	2	996.732
	Arcs_Ocup	.629	2	.315
Muestreo * Temperatura	Ocupacion	4.200	1	4.200
	Arcs_Ocup	.042	1	.042
Muestreo * Fotoperiodo	Ocupacion	730.754	2	365.377

	Arcs_Ocup	.101	2	.050
Temperatura * Fotoperiodo	Ocupacion	278.370	2	139.185
	Arcs_Ocup	.069	2	.034
Muestreo * Temperatura * Fotoperiodo	Ocupacion	122.370	2	61.185
	Arcs_Ocup	.048	2	.024
Error	Ocupacion	13974.324	112	124.771
	Arcs_Ocup	3.821	112	.034
Total	Ocupacion	37854.312	124	
	Arcs_Ocup	16.241	124	
Corrected Total	Ocupacion	20673.643	123	
	Arcs_Ocup	5.646	123	

Tests of Between-Subjects Effects

Source	Dependent Variable	F	Sig.
Corrected Model	Ocupacion	4.881	.000
	Arcs_Ocup	4.864	.000
Intercept	Ocupacion	144.503	.000
	Arcs_Ocup	316.955	.000
Muestreo	Ocupacion	28.618	.000
	Arcs_Ocup	27.729	.000
Temperatura	Ocupacion	4.729	.032
	Arcs_Ocup	3.162	.078
Fotoperiodo	Ocupacion	7.989	.001
	Arcs_Ocup	9.220	.000
Muestreo * Temperatura	Ocupacion	.034	.855
	Arcs_Ocup	1.218	.272
Muestreo * Fotoperiodo	Ocupacion	2.928	.058
	Arcs_Ocup	1.474	.233
Temperatura * Fotoperiodo	Ocupacion	1.116	.331
	Arcs_Ocup	1.008	.368
Muestreo * Temperatura * Fotoperiodo	Ocupacion	.490	.614
	Arcs_Ocup	.698	.500
Error	Ocupacion		
	Arcs_Ocup		
Total	Ocupacion		
	Arcs_Ocup		
Corrected Total	Ocupacion		
	Arcs_Ocup		

a. R Squared = .324 (Adjusted R Squared = .258)

b. R Squared = .323 (Adjusted R Squared = .257)

ONEWAY Ocupacion Arcs_Ocup BY Muestreo

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Ocupacion	18.907	1	122	.000
Arcs_Ocup	3.747	1	122	.055

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Ocupacion	Between Groups	3237.228	1	3237.228	22.650	.000
	Within Groups	17436.416	122	142.921		
	Total	20673.643	123			
Arcs_Ocup	Between Groups	.865	1	.865	22.070	.000
	Within Groups	4.781	122	.039		
	Total	5.646	123			

ONEWAY Arcs_Ocup BY Acondic

Test of Homogeneity of Variances

Arcs_Ocup

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.036	5	118	.400

ANOVA

Arcs_Ocup

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.526	5	.105	2.422	.040
Within Groups	5.120	118	.043		
Total	5.646	123			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Tukey HSD Arcs_Ocup

(I) Acondic	(J) Acondic	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
15º8h	15º16h	-.0590457	.0635509	.938	-.243159	.125068
	15ºGF	-.1198593	.0635509	.416	-.303973	.064254
	GT8h	-.0223139	.0635509	.999	-.206427	.161799

	GT16h	-.0884679	.0659557	.761	-.279548	.102612
	GTGF	-.2029714*	.0669106	.034	-.396818	-.009125
15º16h	15º8h	.0590457	.0635509	.938	-.125068	.243159
	15ºGF	-.0608136	.0628076	.927	-.242773	.121146
	GT8h	.0367318	.0628076	.992	-.145228	.218692
	GT16h	-.0294222	.0652398	.998	-.218428	.159584
	GTGF	-.1439258	.0662051	.258	-.335728	.047877
15ºGF	15º8h	.1198593	.0635509	.416	-.064254	.303973
	15º16h	.0608136	.0628076	.927	-.121146	.242773
	GT8h	.0975455	.0628076	.631	-.084414	.279505
	GT16h	.0313914	.0652398	.997	-.157615	.220397
	GTGF	-.0831121	.0662051	.808	-.274915	.108690
GT8h	15º8h	.0223139	.0635509	.999	-.161799	.206427
	15º16h	-.0367318	.0628076	.992	-.218692	.145228
	15ºGF	-.0975455	.0628076	.631	-.279505	.084414
	GT16h	-.0661541	.0652398	.912	-.255160	.122852
	GTGF	-.1806576	.0662051	.077	-.372460	.011145
GT16h	15º8h	.0884679	.0659557	.761	-.102612	.279548
	15º16h	.0294222	.0652398	.998	-.159584	.218428
	15ºGF	-.0313914	.0652398	.997	-.220397	.157615
	GT8h	.0661541	.0652398	.912	-.122852	.255160
	GTGF	-.1145035	.0685167	.553	-.313003	.083996
GTGF	15º8h	.2029714*	.0669106	.034	.009125	.396818
	15º16h	.1439258	.0662051	.258	-.047877	.335728
	15ºGF	.0831121	.0662051	.808	-.108690	.274915
	GT8h	.1806576	.0662051	.077	-.011145	.372460
	GT16h	.1145035	.0685167	.553	-.083996	.313003

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Homogeneous Subsets

Arcs_Ocup

Tukey HSD[a,b]

Acondic	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
15º8h	21	.213595	
GT8h	22	.235909	.235909
15º16h	22	.272641	.272641
GT16h	19	.302063	.302063
15ºGF	22	.333455	.333455
GTGF	18		.416567
Sig.		.442	.068

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 20.536.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 20.536.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error

Post Hoc Tests

Arcs_Ocup
Tukey HSD

(I) Muestreo	(J) Muestreo	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% ConfidenceInterval	
					LowerBound	UpperBound
M1	M2	-.167054*	.0341040	.000	-.247931	-.086176
	M3	-.166060*	.0507417	.004	-.286394	-.045725
M2	M1	.167054*	.0341040	.000	.086176	.247931
	M3	.000994	.0509262	1.000	-.119778	.121766
M3	M1	.166060*	.0507417	.004	.045725	.286394
	M2	-.000994	.0509262	1.000	-.121766	.119778

Based on observed means.
The error term is Mean Square(Error) = .036.
*. The mean difference is significant at the .05 level.

Homogeneous Subsets

Arcs_Ocup
Tukey HSD[a,b,c]

Muestreo	N	Subset 1	Subset 2
M1	63	.210135	
M3	18		.376194
M2	61		.377189
Sig.		1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
Based on observed means.
The error term is Mean Square(Error) = .036.
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 34.160.
b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are notguaranteed.
c. Alpha = .05.

Arcs_Ocup
Tukey HSD[a,b,c]

Muestreo	N	Subset 1	Subset 2
M1	63	.210135	
M3	18		.376194
M2	61		.377189
Sig.		1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
Based on observed means.
The error term is Mean Square(Error) = .036.
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 34.160.
b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are notguaranteed.
c. Alpha = .05.

Fotoperiodo

Arcs_Ocup
Tukey HSD

(I) Fotoperiodo	(J) Fotoperiodo	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% ConfidenceInterval	
					LowerBound	UpperBound
8h	16h	-.040941	.0387631	.543	-.132868	.050985
	GF	-.130225*	.0393770	.003	-.223608	-.036842
16h	8h	.040941	.0387631	.543	-.050985	.132868
	GF	-.089283	.0389775	.061	-.181719	.003152
GF	8h	.130225*	.0393770	.003	.036842	.223608
	16h	.089283	.0389775	.061	-.003152	.181719

Based on observed means.
The error term is Mean Square(Error) = .036.
*. The mean difference is significant at the .05 level.

HomogeneousSubsets

Arcs_Ocup

TukeyHSD[a,b,c]

Fotoperiodo	N	Subset 1	Subset 2
8h	47	.246634	
16h	49	.287576	.287576
GF	46		.376859
Sig.		.548	.061

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
Based on observed means.
The error term is Mean Square(Error) = .036.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 47.301.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are notguaranteed.

c. Alpha = .05.

UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

EXPERIMENTO 2; EFECTO DEL FOTOPERÍODO EN OTOÑO.

Test of Homogeneity of Variances

Arcs_Ocup

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.005	1	99	.945

ANOVA

Arcs_Ocup

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.380	1	.380	7.197	.009
Within Groups	5.227	99	.053		
Total	5.607	100			

Levene's Test of Equality of Error Variances[a]

	F	df1	df2	Sig.
Ocupacion	3.317	9	91	.002
Arcs_Ocup	2.978	9	91	.004

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept + Muestreo + Fotoperiodo + Muestreo * Fotoperiodo

Tests of Between-Subjects Effects

Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square
Corrected Model	Ocupacion	9998.595[a]	9	1110.955
	Arcs_Ocup	2.071[b]	9	.230
Intercept	Ocupacion	51298.843	1	51298.843
	Arcs_Ocup	20.467	1	20.467
Muestreo	Ocupacion	7305.903	4	1826.476
	Arcs_Ocup	1.542	4	.385
Fotoperiodo	Ocupacion	2578.409	1	2578.409
	Arcs_Ocup	.445	1	.445
Muestreo * Fotoperiodo	Ocupacion	506.173	4	126.543
	Arcs_Ocup	.144	4	.036
Error	Ocupacion	16136.492	91	177.324

	Arcs_Ocup	3.536	91	.039
Total	Ocupacion	77611.166	101	
	Arcs_Ocup	26.123	101	
Corrected Total	Ocupacion	26135.087	100	
	Arcs_Ocup	5.607	100	

Tests of Between-Subjects Effects

Source	Dependent Variable	F	Sig.
Corrected Model	Ocupacion	6.265	.000
	Arcs_Ocup	5.924	.000
Intercept	Ocupacion	289.294	.000
	Arcs_Ocup	526.778	.000
Muestreo	Ocupacion	10.300	.000
	Arcs_Ocup	9.921	.000
Fotoperiodo	Ocupacion	14.541	.000
	Arcs_Ocup	11.459	.001
Muestreo * Fotoperiodo	Ocupacion	.714	.585
	Arcs_Ocup	.928	.451
Error	Ocupacion		
	Arcs_Ocup		
Total	Ocupacion		
	Arcs_Ocup		
Corrected Total	Ocupacion		
	Arcs_Ocup		

a. R Squared = .383 (Adjusted R Squared = .322)

b. R Squared = .369 (Adjusted R Squared = .307)

Tests of Normality

		Kolmogorov-Smirnov[a]			Shapiro-Wilk		
	Fotoperiodo	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Ocupacion	GT-8F	.117	49	.094	.921	49	.003
	GT-GF	.123	52	.048	.924	52	.003
Arcs_Ocup	GT-8F	.059	49	.200*	.970	49	.236
	GT-GF	.135	52	.019	.884	52	.000

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.

NPar Tests; Mann-Whitney Test

Ranks

	Fotoperiodo	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Ocupacion	GT-8F	49	42.24	2070.00
	GT-GF	52	59.25	3081.00
	Total	101		
Arcs_Ocup	GT-8F	49	42.24	2070.00
	GT-GF	52	59.25	3081.00
	Total	101		

Test Statistics[a]

	Ocupacion	Arcs_Ocup
Mann-Whitney U	845.000	845.000
Wilcoxon W	2070.000	2070.000
Z	-2.916	-2.916
Asymp. Sig. (2-tailed)	.004	.004

a. Grouping Variable: Fotoperiodo

Two-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

Frequencies

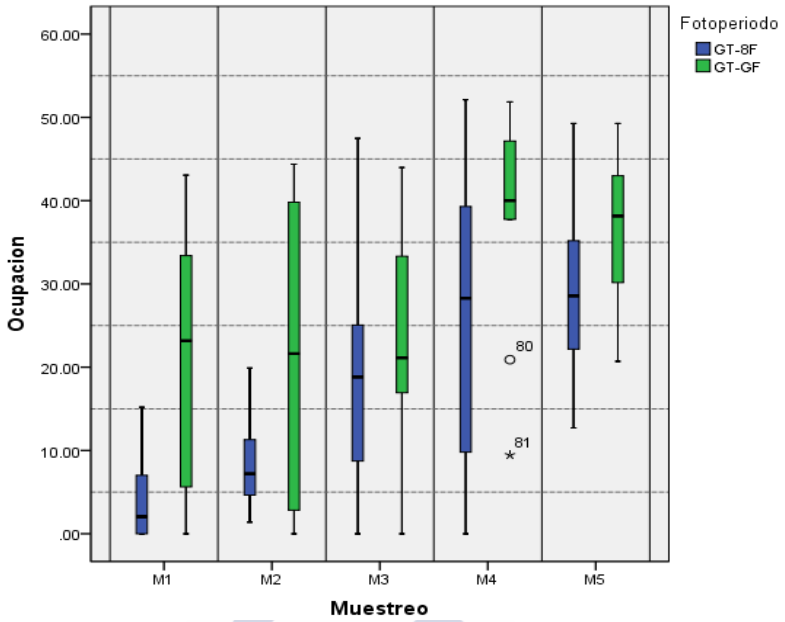
	Fotoperiodo	N
Ocupacion	GT-8F	49
	GT-GF	52
	Total	101
Arcs_Ocup	GT-8F	49
	GT-GF	52
	Total	101

Test Statistics[a]

		Ocupacion	Arcs_Ocup
Most Extreme Differences	Absolute	.326	.326
	Positive	.020	.020
	Negative	-.326	-.326
Kolmogorov-Smirnov Z		1.638	1.638
Asymp. Sig. (2-tailed)		.009	.009

a. Grouping Variable: Fotoperiodo

Ocupacion



T-Test

Group Statistics

	Fotoperiodo	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Arcs_Ocup	GT-8F	49	.387514	.2250957	.0321565
	GT-GF	52	.510242	.2341031	.0324643

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances	
		F	Sig.
Arcs_Ocup	Equal variances assumed	.005	.945
	Equal variances not assumed		

Independent Samples Test

		t-test for Equality of Means			
		t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference
Arcs_Ocup	Equal variances assumed	-2.683	99	.009	-.1227280
	Equal variances not assumed	-2.686	98.957	.008	-.1227280

Independent Samples Test

		t-test for Equality of Means		
		Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
			Lower	Upper
Arcs_Ocup	Equal variances assumed	.0457481	-.2135022	-.0319539
	Equal variances not assumed	.0456943	-.2133959	-.0320601

UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

EXPERIMENTO 3; EFECTO DEL FOTOPERÍODO EN OTOÑO.

Fotoperiodo

Tests of Normality

		Kolmogorov-Smirnov[a]			Shapiro-Wilk		
	Fotoperiodo	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Ocupacion	8h	.228	12	.087	.865	12	.056
	G1	.261	12	.024	.774	12	.005
	G2	.233	12	.072	.784	12	.006
Arcs_Ocup	8h	.137	12	.200*	.974	12	.952
	G1	.147	12	.200*	.931	12	.391
	G2	.188	12	.200*	.906	12	.187

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.

Muestreo

Tests of Normality

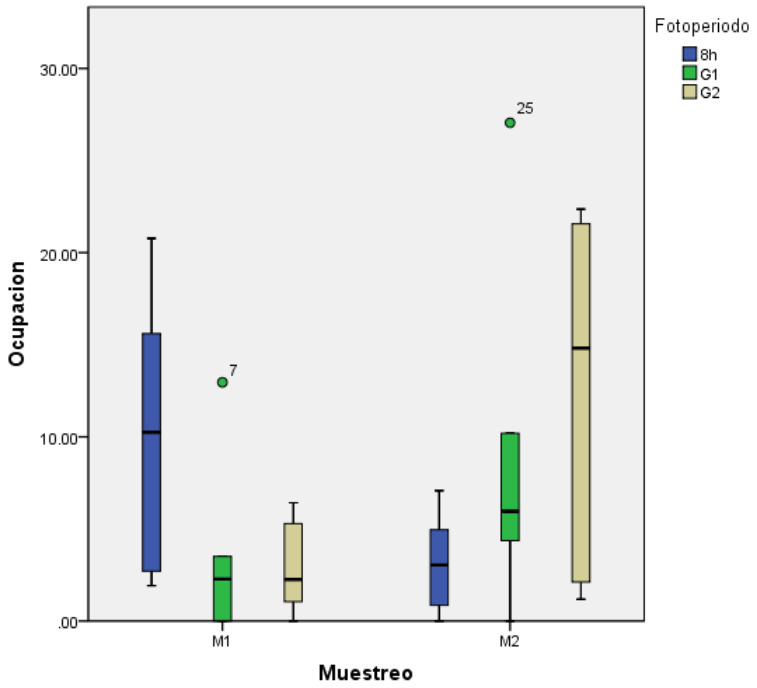
		Kolmogorov-Smirnov[a]			Shapiro-Wilk		
	Muestreo	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Ocupacion	M1	.241	18	.007	.812	18	.002
	M2	.207	18	.041	.829	18	.004
Arcs_Ocup	M1	.150	18	.200*	.937	18	.261
	M2	.127	18	.200*	.947	18	.381

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
AS_ocup	Between Groups	.010	2	.005	.197	.822
	Within Groups	.804	33	.024		
	Total	.814	35			
ocup	Between Groups	16.793	2	8.397	.142	.868
	Within Groups	1945.982	33	58.969		
	Total	1962.775	35			



USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

EXPERIMENTO 4; EFECTO DEL FOTOPERÍODO Y LA TEMPERATURA EN INVIERNO.

Prueba de homogeneidad de varianzas **fotop-temp**

	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
Ocup	,496	8	45	,852
AS_ocup	,559	8	45	,805

Prueba de homogeneidad de varianzas **temp**

	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
Ocup	1,986	2	51	,148
AS_ocup	1,823	2	51	,172

ANOVA temp

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Ocup	Inter-grupos	2805,145	8	350,643	2,120	,053
	Intra-grupos	7442,205	45	165,382		
	Total	10247,350	53			
AS_ocup	Inter-grupos	,410	8	,051	2,121	,053
	Intra-grupos	1,088	45	,024		
	Total	1,498	53			

Prueba de homogeneidad de varianzas **fotop**

	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
Ocup	,652	2	51	,525
AS_ocup	1,508	2	51	,231

ANOVA **fotop**

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Ocup	Inter-grupos	174,349	2	87,174	,441	,646
	Intra-grupos	10073,001	51	197,510		
	Total	10247,350	53			
AS_ocup	Inter-grupos	,034	2	,017	,593	,556
	Intra-grupos	1,464	51	,029		
	Total	1,498	53			

ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Ocup	Inter-grupos	521,179	2	260,590	1,366	,264
	Intra-grupos	9726,170	51	190,709		
	Total	10247,350	53			
AS_ocup	Inter-grupos	,090	2	,045	1,629	,206
	Intra-grupos	1,408	51	,028		
	Total	1,498	53			

Muestreo

Tests of Normality

		Kolmogorov-Smirnov[a]			Shapiro-Wilk		
	Muestreo	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Ocupacion	M1	.140	24	.200*	.940	24	.165
	M2	.102	24	.200*	.966	24	.561
Arcs_Ocup	M1	.091	24	.200*	.967	24	.599
	M2	.106	24	.200*	.963	24	.506

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.

Fotoperiodo

Tests of Normality

		Kolmogorov-Smirnov[a]			Shapiro-Wilk		
	Fotoperiodo	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Ocupacion	AMBIENTE	.183	12	.200*	.893	12	.130
	8h	.142	12	.200*	.949	12	.627
	16h	.145	12	.200*	.940	12	.497
	GF	.134	12	.200*	.982	12	.991
Arcs_Ocup	AMBIENTE	.180	12	.200*	.921	12	.295
	8h	.150	12	.200*	.943	12	.536
	16h	.173	12	.200*	.927	12	.345
	GF	.142	12	.200*	.955	12	.716

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.

Levene's Test of Equality of Error Variances[a]

	F	df1	df2	Sig.
Ocupacion	1.827	7	40	.109
Arcs_Ocup	1.584	7	40	.168

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept + Muestreo + Fotoperiodo + Muestreo * Fotoperiodo

Tests of Between-Subjects Effects

Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square
Corrected Model	Ocupacion	5861.258[a]	7	837.323
	Arcs_Ocup	.763[b]	7	.109
Intercept	Ocupacion	48373.031	1	48373.031
	Arcs_Ocup	16.070	1	16.070
Muestreo	Ocupacion	2100.395	1	2100.395
	Arcs_Ocup	.296	1	.296
Fotoperiodo	Ocupacion	2590.723	3	863.574
	Arcs_Ocup	.343	3	.114
Muestreo * Fotoperiodo	Ocupacion	1170.140	3	390.047
	Arcs_Ocup	.124	3	.041
Error	Ocupacion	9153.030	40	228.826
	Arcs_Ocup	1.341	40	.034
Total	Ocupacion	63387.318	48	
	Arcs_Ocup	18.175	48	
Corrected Total	Ocupacion	15014.287	47	
	Arcs_Ocup	2.104	47	

Tests of Between-Subjects Effects

Source	Dependent Variable	F	Sig.
Corrected Model	Ocupacion	3.659	.004
	Arcs_Ocup	3.252	.008
Intercept	Ocupacion	211.397	.000
	Arcs_Ocup	479.286	.000
Muestreo	Ocupacion	9.179	.004
	Arcs_Ocup	8.831	.005
Fotoperiodo	Ocupacion	3.774	.018
	Arcs_Ocup	3.408	.027

Muestreo * Fotoperiodo	Ocupacion	1.705	.181
	Arcs_Ocup	1.236	.309
Error	Ocupacion		
	Arcs_Ocup		
Total	Ocupacion		
	Arcs_Ocup		
Corrected Total	Ocupacion		
	Arcs_Ocup		

a. R Squared = .390 (Adjusted R Squared = .284)

b. R Squared = .363 (Adjusted R Squared = .251)

Levene's Test of Equality of Error Variances[a]

	F	df1	df2	Sig.
Ocupacion	1.382	7	40	.239
Arcs_Ocup	1.444	7	40	.215

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept + Muestreo + Fotoperiodo

Tests of Between-Subjects Effects

Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square
Corrected Model	Ocupacion	4691.118[a]	4	1172.779
	Arcs_Ocup	.639[b]	4	.160
Intercept	Ocupacion	48373.031	1	48373.031
	Arcs_Ocup	16.070	1	16.070
Muestreo	Ocupacion	2100.395	1	2100.395
	Arcs_Ocup	.296	1	.296
Fotoperiodo	Ocupacion	2590.723	3	863.574
	Arcs_Ocup	.343	3	.114
Error	Ocupacion	10323.170	43	240.074
	Arcs_Ocup	1.466	43	.034
Total	Ocupacion	63387.318	48	
	Arcs_Ocup	18.175	48	
Corrected Total	Ocupacion	15014.287	47	

Tests of Between-Subjects Effects

Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square
Corrected Model	Ocupacion	4691.118[a]	4	1172.779
	Arcs_Ocup	.639[b]	4	.160
Intercept	Ocupacion	48373.031	1	48373.031
	Arcs_Ocup	16.070	1	16.070
Muestreo	Ocupacion	2100.395	1	2100.395
	Arcs_Ocup	.296	1	.296
Fotoperiodo	Ocupacion	2590.723	3	863.574
	Arcs_Ocup	.343	3	.114
Error	Ocupacion	10323.170	43	240.074
	Arcs_Ocup	1.466	43	.034
Total	Ocupacion	63387.318	48	
	Arcs_Ocup	18.175	48	
Corrected Total	Ocupacion	15014.287	47	
	Arcs_Ocup	2.104	47	

Tests of Between-Subjects Effects

Source	Dependent Variable	F	Sig.
Corrected Model	Ocupacion	4.885	.002
	Arcs_Ocup	4.686	.003
Intercept	Ocupacion	201.492	.000
	Arcs_Ocup	471.518	.000
Muestreo	Ocupacion	8.749	.005
	Arcs_Ocup	8.688	.005
Fotoperiodo	Ocupacion	3.597	.021
	Arcs_Ocup	3.352	.027
Error	Ocupacion		
	Arcs_Ocup		
Total	Ocupacion		
	Arcs_Ocup		
Corrected Total	Ocupacion		
	Arcs_Ocup		

a. R Squared = .312 (Adjusted R Squared = .248)

b. R Squared = .304 (Adjusted R Squared = .239)

Post Hoc Tests
Fotoperiodo

Multiple Comparisons

Tukey HSD

Dependent Variable	(I) Fotoperiodo	(J) Fotoperiodo	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
Ocupacion	AMBIENTE	8h	-16.1108	6.32553	.067
		16h	-.7667	6.32553	.999
		GF	2.5958	6.32553	.976
	8h	AMBIENTE	16.1108	6.32553	.067
		16h	15.3442	6.32553	.087
		GF	18.7067*	6.32553	.025
	16h	AMBIENTE	.7667	6.32553	.999
		8h	-15.3442	6.32553	.087
		GF	3.3625	6.32553	.951
	GF	AMBIENTE	-2.5958	6.32553	.976
		8h	-18.7067*	6.32553	.025
		16h	-3.3625	6.32553	.951
Arcs_Ocup	AMBIENTE	8h	-.189183	.0753680	.073
		16h	-.013483	.0753680	.998
		GF	.023967	.0753680	.989
	8h	AMBIENTE	.189183	.0753680	.073
		16h	.175700	.0753680	.107
		GF	.213150*	.0753680	.034
	16h	AMBIENTE	.013483	.0753680	.998
		8h	-.175700	.0753680	.107
		GF	.037450	.0753680	.959
	GF	AMBIENTE	-.023967	.0753680	.989
		8h	-.213150*	.0753680	.034
		16h	-.037450	.0753680	.959

Multiple Comparisons

Tukey HSD

Dependent Variable	(I) Fotoperiodo	(J) Fotoperiodo	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
Ocupacion	AMBIENTE	8h	-33.0153	.7936
		16h	-17.6711	16.1378
		GF	-14.3086	19.5003
	8h	AMBIENTE	-.7936	33.0153

		16h	-1.5603	32.2486
		GF	1.8022	35.6111
	16h	AMBIENTE	-16.1378	17.6711
		8h	-32.2486	1.5603
		GF	-13.5420	20.2670
	GF	AMBIENTE	-19.5003	14.3086
		8h	-35.6111	-1.8022
		16h	-20.2670	13.5420
Arcs_Ocup	AMBIENTE	8h	-.390598	.012232
		16h	-.214898	.187932
		GF	-.177448	.225382
	8h	AMBIENTE	-.012232	.390598
		16h	-.025715	.377115
		GF	.011735	.414565
	16h	AMBIENTE	-.187932	.214898
		8h	-.377115	.025715
		GF	-.163965	.238865
	GF	AMBIENTE	-.225382	.177448
		8h	-.414565	-.011735
		16h	-.238865	.163965

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = .034.

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Homogeneous Subsets

Tukey HSD[a,b,c] **Ocupacion**

		Subset	
Fotoperiodo	N	1	2
GF	12	25.5792	
AMBIENTE	12	28.1750	28.1750
16h	12	28.9417	28.9417
8h	12		44.2858
Sig.		.951	.067

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 240.074.

Tukey HSD[a,b,c] **Arcs_Ocup**

Fotoperiodo	N	Subset 1	Subset 2
GF	12	.509975	
AMBIENTE	12	.533942	.533942
16h	12	.547425	.547425
8h	12		.723125
Sig.		.959	.073

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

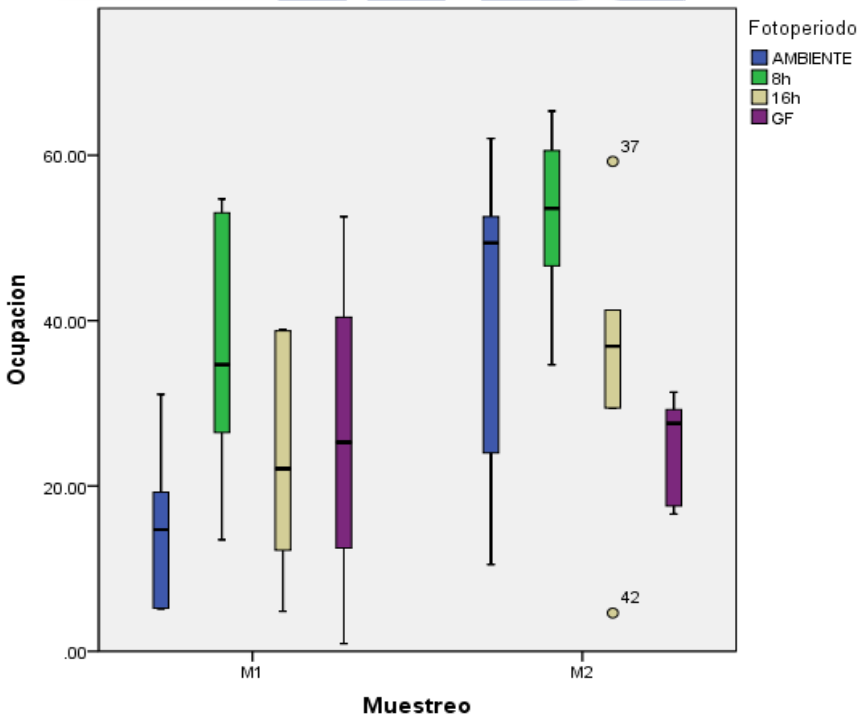
Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = .034.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 12.000.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

c. Alpha = .05.



EXPERIMENTO 6; EFECTO DE LA RACIÓN DE ALIMENTO EN OTOÑO.

Descriptive Statistics

	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation	Skewness
	Statistic	Statistic	Statistic	Statistic	Statistic	Statistic
Ocupacion	35	.00	48.15	21.2677	14.01569	.210
Arcs_Ocup	35	.0000	.7669	.445851	.2046053	-.529
Valid N (listwise)	35					

Descriptive Statistics

	Skewness	Kurtosis	
	Std. Error	Statistic	Std. Error
Ocupacion	.398	-.895	.778
Arcs_Ocup	.398	-.302	.778
Valid N (listwise)			

Tests of Normality

		Kolmogorov-Smirnov[a]			Shapiro-Wilk		
	Muestreo	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Ocupacion	M1	.151	12	.200*	.915	12	.249
	M2	.165	12	.200*	.947	12	.600
	M3	.164	11	.200*	.973	11	.919
Arcs_Ocup	M1	.089	12	.200*	.970	12	.910
	M2	.182	12	.200*	.940	12	.501
	M3	.254	11	.045	.891	11	.143

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.

Dieta

Case Processing Summary

		Cases					
		Valid		Missing		Total	
	Dieta	N	Percent	N	Percent	N	Percent
Ocupacion	6%	18	100.0%	0	.0%	18	100.0%
	9%	17	100.0%	0	.0%	17	100.0%
Arcs_Ocup	6%	18	100.0%	0	.0%	18	100.0%
	9%	17	100.0%	0	.0%	17	100.0%

Tests of Normality

		Kolmogorov-Smirnov[a]			Shapiro-Wilk		
	Dieta	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Ocupacion	6%	.105	18	.200*	.978	18	.924
	9%	.153	17	.200*	.926	17	.190
Arcs_Ocup	6%	.183	18	.113	.932	18	.214
	9%	.121	17	.200*	.944	17	.373

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.

Tests of Between-Subjects Effects

Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square
Corrected Model	Ocupacion	3228.706[a]	5	645.741
	Arcs_Ocup	.616[b]	5	.123
Intercept	Ocupacion	15827.419	1	15827.419
	Arcs_Ocup	6.957	1	6.957
Muestreo	Ocupacion	2607.317	2	1303.658
	Arcs_Ocup	.508	2	.254
Dieta	Ocupacion	109.901	1	109.901
	Arcs_Ocup	.010	1	.010
Muestreo * Dieta	Ocupacion	510.194	2	255.097
	Arcs_Ocup	.099	2	.049
Error	Ocupacion	3450.240	29	118.974
	Arcs_Ocup	.807	29	.028
Total	Ocupacion	22509.995	35	
	Arcs_Ocup	8.381	35	
Corrected Total	Ocupacion	6678.946	34	
	Arcs_Ocup	1.423	34	

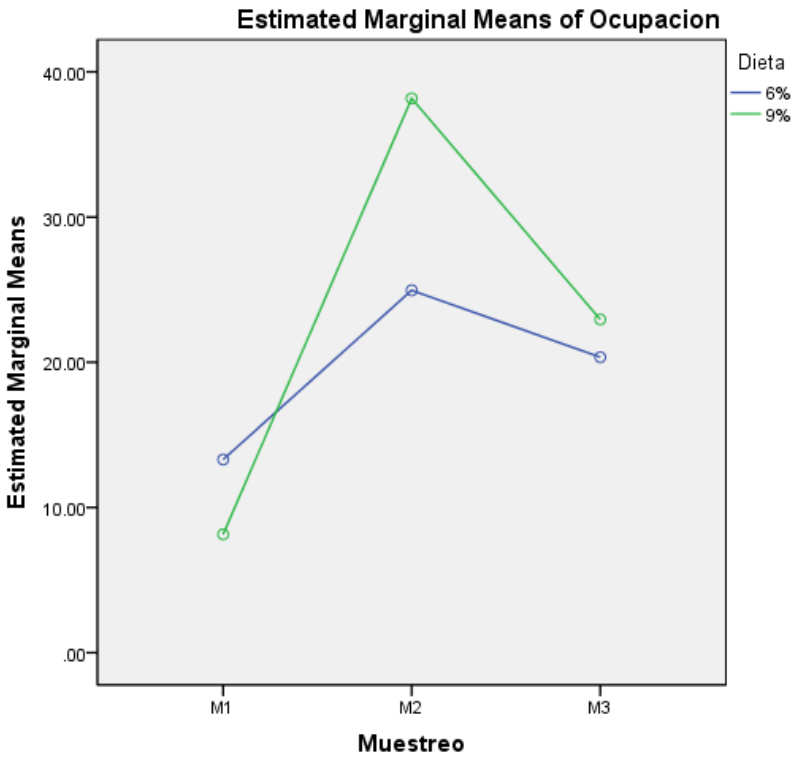
Tests of Between-Subjects Effects

Source	Dependent Variable	F	Sig.
Corrected Model	Ocupacion	5.428	.001
	Arcs_Ocup	4.425	.004
Intercept	Ocupacion	133.033	.000
	Arcs_Ocup	249.901	.000
Muestreo	Ocupacion	10.958	.000
	Arcs_Ocup	9.128	.001
Dieta	Ocupacion	.924	.344

	Arcs_Ocup	.350	.558
Muestreo * Dieta	Ocupacion	2.144	.135
	Arcs_Ocup	1.774	.188
Error	Ocupacion		
	Arcs_Ocup		
Total	Ocupacion		
	Arcs_Ocup		
Corrected Total	Ocupacion		
	Arcs_Ocup		

a. R Squared = .483 (Adjusted R Squared = .394)

b. R Squared = .433 (Adjusted R Squared = .335)




```
ONEWAY Arcs_Ocup BY Dieta
```

Test of Homogeneity of Variances

Arcs_Ocup

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.436	1	33	.128

ANOVA

Arcs_Ocup

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.009	1	.009	.213	.647
Within Groups	1.414	33	.043		
Total	1.423	34			

Levene's Test of Equality of Error Variances[a]

	F	df1	df2	Sig.
Ocupacion	.190	5	29	.964
Arcs_Ocup	.276	5	29	.923

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept + Muestreo + Dieta + Muestreo * Dieta

Tests of Between-Subjects Effects

Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square
Corrected Model	Ocupacion	3228.706[a]	5	645.741
	Arcs_Ocup	.616[b]	5	.123
Intercept	Ocupacion	15827.419	1	15827.419
	Arcs_Ocup	6.957	1	6.957
Muestreo	Ocupacion	2607.317	2	1303.658
	Arcs_Ocup	.508	2	.254
Dieta	Ocupacion	109.901	1	109.901
	Arcs_Ocup	.010	1	.010
Muestreo * Dieta	Ocupacion	510.194	2	255.097
	Arcs_Ocup	.099	2	.049
Error	Ocupacion	3450.240	29	118.974
	Arcs_Ocup	.807	29	.028
Total	Ocupacion	22509.995	35	
	Arcs_Ocup	8.381	35	
Corrected Total	Ocupacion	6678.946	34	
	Arcs_Ocup	1.423	34	

Tests of Between-Subjects Effects

Source	Dependent Variable	F	Sig.
Corrected Model	Ocupacion	5.428	.001
	Arcs_Ocup	4.425	.004
Intercept	Ocupacion	133.033	.000
	Arcs_Ocup	249.901	.000
Muestreo	Ocupacion	10.958	.000
	Arcs_Ocup	9.128	.001
Dieta	Ocupacion	.924	.344
	Arcs_Ocup	.350	.558
Muestreo * Dieta	Ocupacion	2.144	.135
	Arcs_Ocup	1.774	.188
Error	Ocupacion		
	Arcs_Ocup		
Total	Ocupacion		
	Arcs_Ocup		
Corrected Total	Ocupacion		
	Arcs_Ocup		

a. R Squared = .483 (Adjusted R Squared = .394)

b. R Squared = .433 (Adjusted R Squared = .335)

Levene's Test of Equality of Error Variances[a]

	F	df1	df2	Sig.
Ocupacion	.090	5	29	.993
Arcs_Ocup	.125	5	29	.986

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept + Muestreo + Dieta

UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tests of Between-Subjects Effects

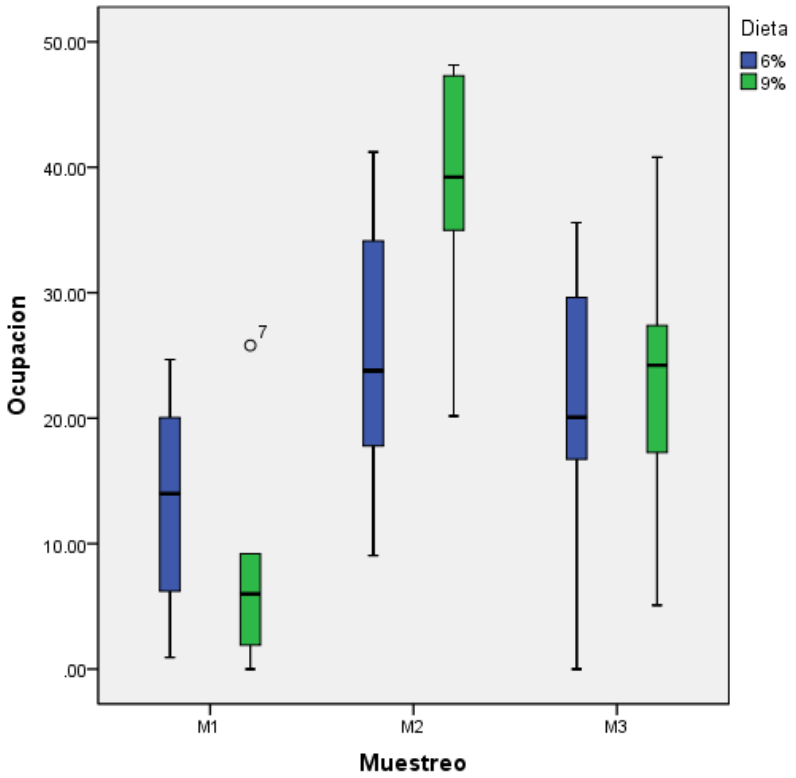
Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square
Corrected Model	Ocupacion	2718.512[a]	3	906.171
	Arcs_Ocup	.517[b]	3	.172
Intercept	Ocupacion	15881.542	1	15881.542
	Arcs_Ocup	6.961	1	6.961
Muestreo	Ocupacion	2607.678	2	1303.839
	Arcs_Ocup	.508	2	.254
Dieta	Ocupacion	111.976	1	111.976
	Arcs_Ocup	.009	1	.009
Error	Ocupacion	3960.434	31	127.756
	Arcs_Ocup	.906	31	.029
Total	Ocupacion	22509.995	35	
	Arcs_Ocup	8.381	35	
Corrected Total	Ocupacion	6678.946	34	
	Arcs_Ocup	1.423	34	

Tests of Between-Subjects Effects

Source	Dependent Variable	F	Sig.
Corrected Model	Ocupacion	7.093	.001
	Arcs_Ocup	5.898	.003
Intercept	Ocupacion	124.312	.000
	Arcs_Ocup	238.130	.000
Muestreo	Ocupacion	10.206	.000
	Arcs_Ocup	8.690	.001
Dieta	Ocupacion	.876	.356
	Arcs_Ocup	.321	.575
Error	Ocupacion		
	Arcs_Ocup		
Total	Ocupacion		
	Arcs_Ocup		
Corrected Total	Ocupacion		
	Arcs_Ocup		

a. R Squared = .407 (Adjusted R Squared = .350)

b. R Squared = .363 (Adjusted R Squared = .302)



UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

EXPERIMENTO 7; EFECTO DE LA RACIÓN DE ALIMENTO EN INVIERNO.

Dieta

Tests of Normality

		Kolmogorov-Smirnov[a]			Shapiro-Wilk		
	Dieta	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Ocupacion	3%	.212	6	.200*	.943	6	.681
	6%	.209	6	.200*	.965	6	.859
	9%	.211	6	.200*	.937	6	.634
Arcs_Ocup	3%	.186	6	.200*	.954	6	.775
	6%	.213	6	.200*	.956	6	.785
	9%	.202	6	.200*	.949	6	.736

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.

Oneway `Ocupacion Arcs_Ocup BY Dieta`

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Ocupacion	.388	2	15	.685
Arcs_Ocup	.543	2	15	.592

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Ocupacion	Between Groups	236.707	2	118.354	.493	.620
	Within Groups	3600.863	15	240.058		
	Total	3837.570	17			
Arcs_Ocup	Between Groups	.035	2	.017	.573	.576
	Within Groups	.452	15	.030		
	Total	.487	17			

EXPERIMENTO 8; EFECTO COMBINADO DEL FLUJO DEL AGUA Y LA RACIÓN DE ALIMENTO.

Flujo

Tests of Normality

		Kolmogorov-Smirnov[a]			Shapiro-Wilk		
	Flujo	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Ocupacion	1L	.115	18	.200*	.961	18	.619
	2L	.166	18	.200*	.960	18	.599
	3L	.157	18	.200*	.930	18	.192
Arcs_Ocup	1L	.113	18	.200*	.961	18	.631
	2L	.155	18	.200*	.950	18	.429
	3L	.161	18	.200*	.935	18	.241

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.

Dieta

Tests of Normality

		Kolmogorov-Smirnov[a]			Shapiro-Wilk		
	Dieta	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Ocupacion	3%	.157	18	.200*	.949	18	.410
	6%	.139	18	.200*	.914	18	.103
	9%	.172	18	.169	.946	18	.362
Arcs_Ocup	3%	.218	18	.024	.888	18	.036
	6%	.138	18	.200*	.919	18	.125
	9%	.148	18	.200*	.953	18	.467

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.

Levene's Test of Equality of Error Variances[a]

	F	df1	df2	Sig.
Ocupacion	.496	8	45	.852
Arcs_Ocup	.559	8	45	.805

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept + Flujo + Dieta + Flujo * Dieta

Tests of Between-Subjects Effects

Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square
Corrected Model	Ocupacion	2805.145[a]	8	350.643
	Arcs_Ocup	.410[b]	8	.051
Intercept	Ocupacion	47926.748	1	47926.748
	Arcs_Ocup	17.123	1	17.123
Flujo	Ocupacion	521.179	2	260.590
	Arcs_Ocup	.090	2	.045
Dieta	Ocupacion	174.349	2	87.174
	Arcs_Ocup	.034	2	.017
Flujo * Dieta	Ocupacion	2109.617	4	527.404
	Arcs_Ocup	.286	4	.072
Error	Ocupacion	7442.205	45	165.382
	Arcs_Ocup	1.088	45	.024
Total	Ocupacion	58174.098	54	
	Arcs_Ocup	18.621	54	
Corrected Total	Ocupacion	10247.350	53	
	Arcs_Ocup	1.498	53	

Tests of Between-Subjects Effects

Source	Dependent Variable	F	Sig.
Corrected Model	Ocupacion	2.120	.053
	Arcs_Ocup	2.120	.053
Intercept	Ocupacion	289.794	.000
	Arcs_Ocup	708.223	.000
Flujo	Ocupacion	1.576	.218
	Arcs_Ocup	1.860	.167
Dieta	Ocupacion	.527	.594
	Arcs_Ocup	.704	.500
Flujo * Dieta	Ocupacion	3.189	.022
	Arcs_Ocup	2.958	.030
Error	Ocupacion		
	Arcs_Ocup		
Total	Ocupacion		
	Arcs_Ocup		
Corrected Total	Ocupacion		
	Arcs_Ocup		

a. R Squared = .274 (Adjusted R Squared = .145)

b. R Squared = .274 (Adjusted R Squared = .145)

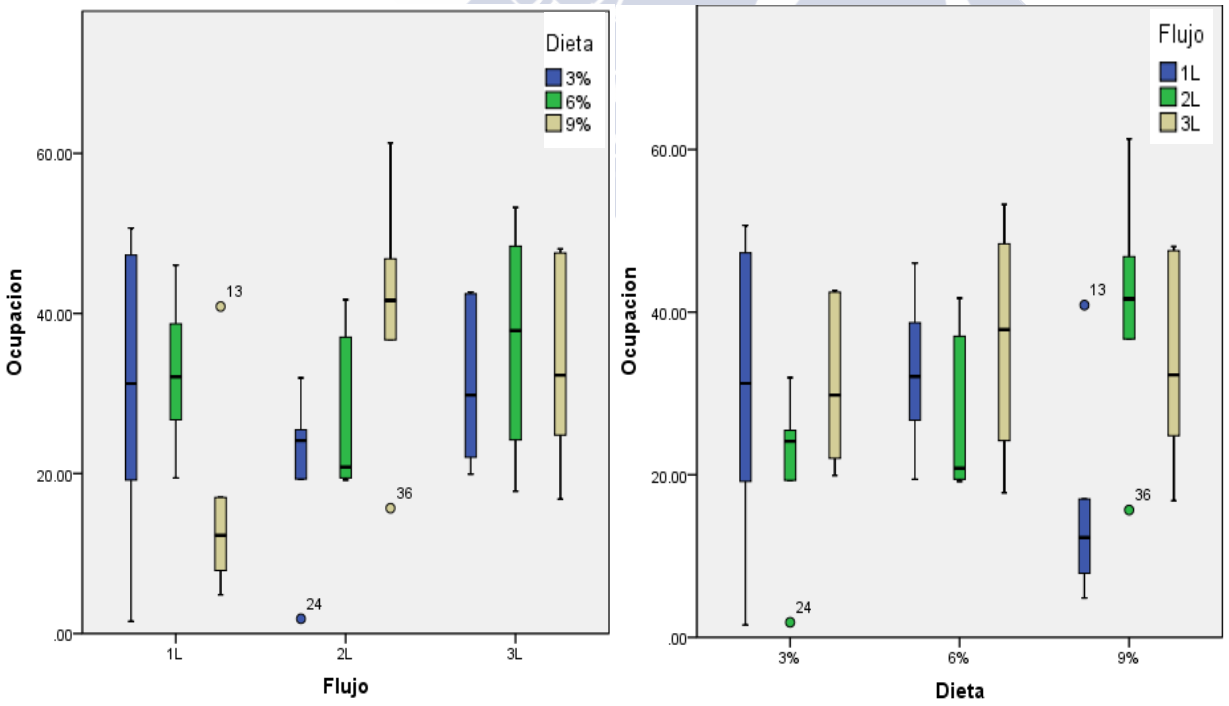
ONEWAY Ocupacion Arcs_Ocup BY FyD

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Ocupacion	.496	8	45	.852
Arcs_Ocup	.559	8	45	.805

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Ocupacion	Between Groups	2805.145	8	350.643	2.120	.053
	Within Groups	7442.205	45	165.382		
	Total	10247.350	53			
Arcs_Ocup	Between Groups	.410	8	.051	2.120	.053
	Within Groups	1.088	45	.024		
	Total	1.498	53			



Tablas personalizadas

	Flujo 1L Dieta 3%		Flujo 1L Dieta 6%		Flujo 1L Dieta 9%	
	Mean	Standard Deviation	Mean	Standard Deviation	Mean	Standard Deviation
Ocupacion	30.19[a]	18.20	32.51[a]	9.54	15.85[a]	13.10
Arcs_Ocup	.5523[a]	.2437	.6034[a]	.1033	.3892[a]	.1673

	Flujo 2L Dieta 3%		Flujo 2L Dieta 6%		Flujo 2L Dieta 9%	
	Mean	Standard Deviation	Mean	Standard Deviation	Mean	Standard Deviation
Ocupacion	21.13[a]	10.29	26.50[a,b]	10.13	40.63[b]	15.08
Arcs_Ocup	.4579[a]	.1643	.5356[a]	.1122	.6855[a]	.1630

	Flujo 3L Dieta 3%		Flujo 3L Dieta 6%		Flujo 3L Dieta 9%	
	Mean	Standard Deviation	Mean	Standard Deviation	Mean	Standard Deviation
Ocupacion	31.11[a]	10.08	36.56[a]	14.26	33.63[a]	12.40
Arcs_Ocup	.5876[a]	.1096	.6434[a]	.1527	.6132[a]	.1345

Note: Values in the same row and subtable not sharing the same subscript are significantly different at p< 0.05 in the two-sided test of equality for column means. Cells with no subscript are not included in the test. Tests assume equal variances.[1]

1. Tests are adjusted for all pairwise comparisons within a row of each innermost subtable using the Bonferroni correction.

	Dieta					
	3%					
	Flujo					
	1L		2L		3L	
	Mean	Standard Deviation	Mean	Standard Deviation	Mean	Standard Deviation
Ocupacion	30.19_{a}	18.20	21.13_{a}	10.29	31.11_{a}	10.08
Arcs_Ocup	$.5523_{a}$	.2437	$.4579_{a}$	.1643	$.5876_{a}$	.1096

	Dieta					
	6%					
	Flujo					
	1L		2L		3L	
	Mean	Standard Deviation	Mean	Standard Deviation	Mean	Standard Deviation
Ocupacion	32.51_{a}	9.54	26.50_{a}	10.13	36.56_{a}	14.26
Arcs_Ocup	$.6034_{a}$	.1033	$.5356_{a}$	.1122	$.6434_{a}$	.1527

	Dieta					
	9%					
	Flujo					
	1L		2L		3L	
	Mean	Standard Deviation	Mean	Standard Deviation	Mean	Standard Deviation
Ocupacion	15.85_{a}	13.10	40.63_{b}	15.08	$33.63_{a,b}$	12.40
Arcs_Ocup	$.3892_{a}$	.1673	$.6855_{b}$	.1630	$.6132_{a,b}$	.1345

Note: Values in the same row and subtable not sharing the same subscript are significantly different at p< 0.05 in the two-sided test of equality for column means. Cells with no subscript are not included in the test. Tests assume equal variances.[1]

1. Tests are adjusted for all pairwise comparisons within a row of each innermost subtable using the Bonferroni correction.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA