



Instituto de Acuicultura

UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

**Ciclo reproductivo, cultivo en criadero y
en el medio natural de la almeja babosa
Venerupis pullastra (Montagu, 1803)**

Memoria presentada por:

Ana Cerviño Otero

Para optar al grado de Doctora en Biología

ISBN 978-84-9887-828-8 (edición digital PDF)

Dorotea Martínez Patiño, Doctora en Biología e Investigadora del Centro de Cultivos Mariños de Ribadeo-CIMA (Xunta de Galicia)

INFORMA:

Que el trabajo titulado **“Ciclo reproductivo, cultivo en criadero y en el medio natural de la almeja babosa *Venerupis pullastra* (Montagu, 1803)”** presentado por Ana Cerviño Otero para optar al Título de Doctora en Biología, ha sido realizado bajo mi dirección. Considerándolo finalizado, autorizo su presentación y defensa.

Ribadeo, a 2 de mayo de 2011

VºB

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

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

Esta tesis ha sido desarrollada en el Centro de Cultivos Mariños de Ribadeo (CIMA) gracias a la beca para la formación de personal en temas de investigación marina, concedida por la Consellería do Mar de la Xunta de Galicia (DOG nº 173 de 08/09/2003), durante el período comprendido entre septiembre de 2003 y agosto de 2007.



XUNTA DE GALICIA
CONSELLERÍA DO MAR



CIMA
CENTRO DE
INVESTIGACIÓN
MARIÑAS

Desde diciembre de 2007 hasta noviembre de 2009, se finalizaron las experiencias en el marco del proyecto de investigación “ALBA: Mejora en la producción de almeja babosa *Venerupis pullastra* (Montagu, 1803)” (06RMA50801PR) concedido por la Dirección Xeral de Investigación, Desenvolvemento e Innovación de la Consellería de Economía e Industria de la Xunta de Galicia, en el cual disfruté de un contrato de trabajo.



XUNTA DE GALICIA
CONSELLERÍA DE ECONOMÍA
E INDUSTRIA

Parte de los resultados de esta tesis se han complementado con los trabajos realizados en el marco del proyecto de Investigación “Desarrollo de la tecnología de producción y cultivo de almejas”, de la Junta Nacional Asesora de Cultivos Marinos (JACUMAR).



GOBIERNO
DE ESPAÑA

MINISTERIO
DE MEDIO AMBIENTE
Y MEDIO RURAL Y MARINO



JACUMAR
JUNTA NACIONAL
ASESORA DE CULTIVOS MARIÑOS

A mi familia

*A todos mis compañeros de Ribadeo
y en especial, con mucho cariño, a José María*

Almejas con patatas
(Receta de Cambados)

Ingredientes: patatas, almejas,
aceite, pimentón y ajo.

Se cuecen las patatas.

Cuando estén casi cocidas se le quita media cantidad del agua que hayas utilizado para cocer. Se le añaden las almejas por encima y se dejan abrir a fuego lento con la tartera tapada. Tan pronto abran se retira del fuego y se ponen en una bandeja con un fondo de agua de cocción. Se prepara una ajada y se echa por encima.

Se sirven acompañadas con un Albariño.

Ana Otero



Cuando llegué a Ribadeo para realizar esta tesis no sabía lo que me esperaba... yo era siete años más joven e inexperta... y en el mundo todavía iban a suceder muchos acontecimientos. Mientras esta tesis iba cobrando vida, a lo largo de estos años, fui aprendiendo muchas cosas...

Hacer una tesis es un desafío a la constancia, al ingenio, a la perseverancia... Hacer una tesis es pasar horas y horas en solitario... Hacer una tesis es dejar a un lado muchos proyectos personales, los planes a corto plazo, el tiempo dedicado a una misma y a los demás... Pero gracias a esta tesis, me di cuenta que había mucha gente que confiaba en mí y que con su apoyo y ayuda algún día la iba a finalizar.

Aunque la realización de esta tesis se ha llevado a cabo gracias a la ayuda de mucha gente, me asalta un muy humano patriotismo que me lleva a concentrar la mayor parte del mérito en el aporte profesional y personal de todas y cada una de las personas que integran o integraron este Centro. Trabajar junto a ellos, ha sido para mí un gran honor y vaya de antemano mi agradecimiento a todos ellos.

En primer lugar le quiero agradecer a Dorotea Martínez, de manera especial y sincera, el constante apoyo que me ha ofrecido a lo largo de todos estos años y la confianza mostrada en mí en todo momento. **Tea**, estoy aprendiendo mucho de ti en el ámbito profesional, pero más aún en lo personal. Darte las gracias también por tu tiempo, tu cercanía, tus grandes cualidades humanas y por no dejar de luchar por este Centro ni un solo día.

A **Justa** y a **Susana**, os agradezco enormemente que estuvierais ahí siempre que os necesité y que me enseñarais pacientemente desde el primer día... eso sí, para los ácidos grasos necesitaré otros siete años más... como dije algún día... sois tan excelentes personas como profesionales. A **Fiz** no sólo le agradezco la ayuda prestada con la embriología y la estadística, sino que también, toda la ayuda que me brindó desde que llegué de becaria... y siempre con una sonrisa... estoy segura de que llegarás muy lejos. A **Conchita** porque se leyó tropecientas veces este manuscrito y porque no hubo un sólo día en el que no me animara para que lo acabara... y porque sé que lo hacía de corazón.

Al resto de compañeros que, con su trabajo diario, pusieron su granito de arena en la elaboración de esta tesis: **Ana, Escudero, Javi, M^a José, Menel, Mercedes, Merchi y Viky**. A los compañeros que en su momento lo fueron: **Alicia, Félix, Laura y Toño...** y en especial, a **José María**, porque tu recuerdo se mantiene vivo en mí y en todos los rincones de este Centro por el que tanto trabajaste... y porque estoy segura que, desde donde estés, te estarás alegrando de que “a pequena” por fin haya finalizado su tesis. A los doctorandos **Andrea, Curro y Jana** deciros que os paso encantada el testigo, pero que estaré siempre ahí... que para lo que necesitéis os echaré una mano y... ¡ánimo que con esfuerzo todo es alcanzable!... o como diría un buen amigo mío: “con paciencia y con saliva...”. A los becarios que estuvieron a lo largo de estos años: **Sonia, Diego, Diana, Mari, Sari, Belén, Iria, Ales...** y los recién llegados **Pol, Rocío y Jesús**. A *todos vosotros* os quiero agradecer el haberme brindado apoyo, colaboración, ánimo y sobre todo cariño y amistad.

Además de ser unos excelentes compañeros, quiero resaltar que sois unos GRANDÍSIMOS AMIGOS. Daros las gracias por hacer que los que llegamos de fuera y solos, nos sintamos arropados desde el primer día. Quiero recordar los muchísimos buenos momentos que pasamos juntos, desde el café diario de las mañanas a los vinos de las noches... los viajes a aldeas remotas, las bodas y despedidas de soltera... los pinchos en el Centro, las comidas, despedidas y bienvenidas... y lo que no se puede contar... todo ello me hizo pasar por momentos muy alegres y divertidos que nunca olvidaré... que hicieron, hacen y harán que mi estancia en **Ribadeo** sea un verdadero placer.

Quisiera agradecer además, al resto de personas que han colaborado en la realización de esta tesis doctoral. A **Marcelina Abad**, tutora de esta tesis y mi conexión con la Universidad de Santiago. A **mi padre**, Antonio Cerviño, y sus compañeros **Antón García** y **Alberto de Co** porque sin su trabajo no existiría uno de los capítulos de esta tesis. A **Susi Carballal** por su ayuda con la patología. A **Alejandro Guerra** y el resto de **compañeros del CIMA**. A **Josefina Méndez** y **Ana Ínsua** del departamento de genética de la UDC. A **Juan Barja** y **Susana Prado** del departamento de microbiología de la USC. A **Nel** de la empresa Proameixa Fernández. A las **Cofradías de O Grove, Cangas, Camariñas, Barallobre, Vilaxoán, O Barqueiro** y **Ribadeo...** y especialmente a sus asistencias técnicas. A **Suso Méndez, Inés Pazos** y **Alessandro Benedetti** del servicio de microscopía electrónica del CACTI de la Universidad de Vigo.

Gracias a mis **padres** he podido hacer esta tesis, algo que resulta evidente pues les debo la vida, así que.... ¿Qué menos que dedicársela y agradecerles su apoyo incondicional?. A mis **hermanos**, que aunque a veces me parecen que abultan demasiado, sé que siempre los tendré ahí. A mi **tía** y especialmente a mi **abuela**, mi madrina, que a sus 89 años sigue siendo la más inteligente de la familia... de la que aprendí muchos valores y de quien me acuerdo cuando me flaquean las piernas. Al **resto de mi familia**, incluidos los **vecinos**, me siento muy orgullosa de vosotros... hoy y siempre... ¡GRACIAS!

Quiero agradecer también a mis amigas de toda la vida: **Patri, Pochi, Bea y Carola...** al resto de "los malos": **Popy, Willy, Piwy, Charango, Edu, Machu, Blas y Beni...** y a las incorporaciones de los últimos años: **Rafa, Betty Bu, Pochirio, Marcos...** A **Moni, Rodri, Noa y Roi...** A **Eva y sus niñas...**

A los amigos que conocí en Ribadeo y de los que guardo muy buenos recuerdos... A **Rosa, Pepe, Bilu, Juan...** que junto a Viki, Andrea, Sari, Iria y el resto... pasamos grandes momentos extralaborales, principalmente en los bares. A mis excompañeros de italiano y ahora compañeros de comidas, viajes... y grandes amigos: **Marga, Paloma, Julia y Balbino...** A mis compis de inglés... A **Carlos** por su dibujo de las almejas... y en general a toda la gente que conocí en estos siete años de estancia en Ribadeo.

Agradezco a mis amigos y amigas, los de toda la vida (de Cambados) y los de nueva creación (de Ribadeo), el que continúen siéndolo a pesar de que llevo mucho tiempo postponiendo actividades y viajes con la frase... "cuando acabe la tesis...". Quiero hacer mención a todos los hombres que me pidieron matrimonio durante este período y tuve que rechazar por falta de tiempo. Ahora sí, para todos vosotros.... ¡ESTOY DISPONIBLE!

El sentido del humor es saber reírse de uno mismo
Alfredo Landa

Cuando empecé esta tesis no sabía donde me metía... ahora que sí lo sé... ¡Cuánto me alegro de haberla realizado!

Ana Cerviño Otero
Ribadeo, marzo 2011

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN GENERAL	3
-1.1 TAXONOMÍA, HÁBITAT Y DISTRIBUCIÓN	3
-1.2 ANATOMÍA	4
-1.3 FISIOLÓGÍA	7
-1.4 REPRODUCCIÓN	8
-1.5 CICLO VITAL	9
-1.6 PRODUCCIÓN	11
-1.7 PLANES DE EXPLOTACIÓN Y EXTRACCIÓN	14
2. OBJETIVOS	19
3. CAPÍTULO I: CICLO REPRODUCTIVO	23
- 3.1 INTRODUCCIÓN	23
- 3.2 MATERIAL Y MÉTODOS	29
3.2.1 RECOGIDA Y PROCESADO DE LAS MUESTRAS	29
3.2.2 OBTENCIÓN DE LOS DATOS AMBIENTALES DE LAS ZONAS DE MUESTREO	30
3.2.3 OBTENCIÓN DE LOS DATOS BIOMÉTRICOS, CÁLCULO DEL PESO SECO E ÍNDICES DE CONDICIÓN	31
3.2.4 MÉTODO HISTOLÓGICO	32
3.2.5 CONTROL PARASITOLÓGICO DE LAS POBLACIONES DE ESTUDIO	35
3.2.6 MÉTODOS BIOQUÍMICOS	36
3.2.6.1 Determinación de glucógeno	36
3.2.6.2 Determinación de proteínas totales	38
3.2.6.3 Determinación de lípidos totales	40
3.2.7 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS	42
- 3.3 RESULTADOS	43
3.3.1 PARÁMETROS AMBIENTALES DE LAS ZONAS DE MUESTREO	43
3.3.2 DATOS BIOMÉTRICOS, PESO SECO E ÍNDICE DE CONDICIÓN	44
3.3.2.1 Población de Camariñas	44
3.3.2.2 Población de O Grove submareal	46
3.3.2.3 Población de O Grove intermareal	48
3.3.2.4 Comparativa entre poblaciones	50
3.3.3 CICLO GAMETOGÉNICO	52
3.3.3.1 Descripción del ciclo gametogénico	52
3.3.3.2 Población de Camariñas	58
3.3.3.3 Población de O Grove submareal	60
3.3.3.4 Población de O Grove intermareal	61
3.3.3.5 Sex-ratio	63
3.3.4 COMPOSICIÓN BIOQUÍMICA	64
3.3.4.1 Glucógeno	64
3.3.4.2 Proteínas	67
3.3.4.3 Lípidos	70

3.3.5 EVOLUCIÓN DE LA COMPOSICIÓN BIOQUÍMICA EN RELACIÓN CON EL CICLO GAMETOGENICO	73
3.3.6 PARASITOLOGÍA DE LAS POBLACIONES DE ESTUDIO	81
- 3.4 DISCUSIÓN	89

4. CAPÍTULO II: DESARROLLO EMBRIONARIO Y LARVARIO **99**

- 4.1 INTRODUCCIÓN	99
- 4.2 MATERIAL Y MÉTODOS	102
4.2.1 OBTENCIÓN DEL DESOVE Y TOMA DE MUESTRAS	102
4.2.2 PROCESADO PARA EL MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO	102
4.2.3 PROCESADO PARA EL MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE TRANSMISIÓN	104
- 4.3 RESULTADOS	106
4.3.1 DESARROLLO EMBRIONARIO Y LARVARIO	106
- 4.4 DISCUSIÓN	126

5. CAPÍTULO III: CULTIVO EN CRIADERO **133**

- 5.1 INTRODUCCIÓN	133
- 5.2 MATERIAL Y MÉTODOS	143
5.2.1 CULTIVO DE MICROALGAS	143
5.2.2 RECOGIDA DE REPRODUCTORES Y TRASLADO	145
5.2.3 MANTENIMIENTO DE LOS REPRODUCTORES	147
5.2.4 OBTENCIÓN DE LA PUESTA Y RECOGIDA DE HUEVOS	148
5.2.5 CULTIVO LARVARIO	148
5.2.6 CULTIVO DE POSTLARVAS Y SEMILLA	149
5.2.7 PROCESADO DE LOS REPRODUCTORES	150
5.2.8 RECOGIDA DE MUESTRAS DE LARVAS	152
5.2.9 RECOGIDA DE MUESTRAS DE POSTLARVAS Y SEMILLA	153
5.2.10 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS	154
- 5.3 RESULTADOS	155
5.3.1 ESTABULACIÓN DE REPRODUCTORES	155
5.3.2 OBTENCIÓN DE LA PUESTA	156
5.3.3 CULTIVO LARVARIO	159
5.3.4 CULTIVO POSTLARVARIO	162
5.3.5 CULTIVO DE SEMILLA	163
5.3.6 OPTIMIZACIÓN DEL CULTIVO. RELACIÓN DE LA CALIDAD DE LAS PUESTAS CON LOS REPRODUCTORES	165
5.3.6.1 Índices de Condición de los reproductores	165
5.3.6.2 Composición bioquímica de los reproductores	167
5.3.6.3 Estadio gametogénico de los reproductores	170
5.3.6.4 Crecimiento de los desarrollos larvarios y postlarvarios	172
5.3.6.5 Supervivencia de los desarrollos larvarios y postlarvarios	175
5.3.6.6 Relación entre los desoves y los cultivos	178
- 5.4 DISCUSIÓN	181

6. CAPÍTULO IV: CULTIVO EN EL MEDIO NATURAL **191**

- 6.1 INTRODUCCIÓN	191
6.1.1 SISTEMAS DE PREENGORDE EN INSTALACIONES EN TIERRA	193
6.1.2 SISTEMAS DE PREENGORDE EN EL MEDIO NATURAL	195
6.1.2.1 Zonas de marismas	195
6.1.2.2 Zonas intermareales	197
6.1.2.3 Preengorde en suspensión	199
6.1.3 ENGORDE	205
- 6.2 MATERIAL Y MÉTODOS	208
6.2.1 OBTENCIÓN DE LA SEMILLA	208
6.2.2 DESCRIPCIÓN Y UBICACIÓN DE LOS SISTEMAS DE PREENGORDE	210
6.2.3 PARÁMETROS DE ESTUDIO	212
6.2.3.1 Época del año de inicio del cultivo	212
6.2.3.2 Densidad	212
6.2.3.3 Talla inicial	213
6.2.4 PARÁMETROS AMBIENTALES	214
6.2.5 CONTROL DE CRECIMIENTO Y MORTALIDAD	215
6.2.6 ESTUDIO HISTOLÓGICO DE LA SEMILLA	216
6.2.7 CRECIMIENTO DIFERENCIAL	217
6.2.7.1 Seguimiento en batea	217
6.2.7.2 Seguimiento en criadero	219
6.2.8 BIOMETRÍA Y COMPOSICIÓN BIOQUÍMICA DE LA SEMILLA	219
6.2.9 CULTIVO INTEGRAL: CRIADERO, PREENGORDE Y ENGORDE	221
- 6.3 RESULTADOS	223
6.3.1 PREENGORDE EN BATEA E INTERMAREAL	223
6.3.1.1 Épocas de cultivo	223
6.3.1.2 Efecto de la densidad en el crecimiento	228
6.3.1.3 Talla inicial de preengorde	230
6.3.2 CONTROL PATOLÓGICO Y MADURACIÓN REPRODUCTIVA DE LA SEMILLA	233
6.3.2.1 Control patológico	233
6.3.2.2 Maduración reproductiva	234
6.3.3 CRECIMIENTO DIFERENCIAL	236
6.3.3.1 Seguimiento en batea	238
6.3.3.2 Seguimiento en criadero	241
6.3.4 RELACIONES BIOMÉTRICAS Y COMPOSICIÓN BIOQUÍMICA DE LA SEMILLA	243
6.3.4.1 Relaciones biométricas	243
6.3.4.2 Composición bioquímica	245
6.3.5 EXPERIENCIA DE CULTIVO INTEGRAL: CRIADERO, PREENGORDE Y ENGORDE	247
- 6.4 DISCUSIÓN	251

7. CONCLUSIONES **265**

8. BIBLIOGRAFÍA **271**

ABREVIATURAS

abr	Abril
ad	Cilios adoriales
ago	Agosto
ANOVA	Test de Análisis de Varianza
blas	Blastoporo
CB	Cabeza
ce	Celoma
cha	Charnela
CIL	Ciliados
CL	Cola
cm	Centímetro
COCC	Coccidios
CONJ	Conjuntivo
CV	Células vesiculares
desv	Desviación estándar
dic	Diciembre
dis	Disoconcha
E0	Estadio de reposo sexual
E1	Estadio de inicio de la gametogénesis
E2	Estadio de gametogénesis avanzada
E3	Estadio de madurez y puesta
E4	Estadio de renovación gonadal
ene	Enero
EPI	Epitelio intestinal
ESPC	Espermatocito
ESPG	Espermatogonia
ESPZ	Espermatozoide
feb	Febrero
g	Gramo
g.l.	Grados de libertad
Glucgon	Glucógeno en gónada
Glucvisc	Glucógeno en víscera
GREG	Gregarina
h	Hora
HAPL	Haplosporidio
HEM	Hemocitos
Hv	Huevo
ICG	Índice de Condición Gonadal
ICV	Índice de Condición Visceral
igc	Invaginación de la glándula de la concha
ind	Individuo
INTECMAR	Instituto Tecnológico para o Control do Medio Mariño
jul	Julio
jun	Junio
kg	Kilogramo
l	Litro

Abreviaturas

L	Longitud
Ld	Larva d
Lipgon	Lípidos en gónada
Lipvisc	Lípidos en víscera
ln	Logaritmo neperiano
M	Molar
m	Metro
macr	Macrómeros
mar	Marzo
may	Mayo
MEB	Microscopio electrónico de barrido
MET	Microscopio electrónico de transmisión
METC	Metacercarias
mg	Miligramo
micr	Micrómeros
min	Minuto
mit	Mitocondrias
ml	Mililitro
mm	Milímetro
Mort	Mortalidad
MUSC	Músculo
N	Normal
n.s	No significativo
NEM	<i>Nematopsis</i> sp.
nm	Nanómetro
NO	Noroeste
nº	Número
nov	Noviembre
oct	Octubre
OVC	Ovocito
OVG	Ovogonia
OVPE	Ovocito pedunculado
OVR	Ovocito residual
p	Probabilidad
p I	Prodisoconcha I
p II	Prodisoconcha II
pa	Penacho apical
PARAV	<i>Paravortex</i> sp.
PER	<i>Perkinsus olseni</i>
peri	Periostraco
PF	Pared folicular
Ph	Peso húmedo
PI	Postlarva
post	Cilios postorales
ppa	Penacho postanal
pre	Cilios preorales

Prgon	Proteínas en gónada
pro	Prototroca
Prvisc	Proteínas en víscera
Pv	Larva pediveliger
R ²	Coefficiente de ajuste
RICK	Colonias de tipo ricketsiano
RYN	<i>Rynchodida</i> sp.
seg	Segundo
sep	Septiembre
SG	Serie gametogénica
SO	Suroeste
SPO	Esporoquiste de trematodo
STEIN	<i>Steinhausia</i> sp.
Sup	Supervivencia
T1	Células secretoras T1
T3	Células secretoras T3
tel	Telotroca
Tm	Toneladas
TRI	<i>Trichodina</i> sp.
TUB	Túbulos digestivos
URAS	<i>Urastoma</i> sp.
v	Volumen
VAC	Espacio vacío
val	Valvas
vel	Velo
χ ²	Chi cuadrado
€	Euros
μg	Microgramo
μl	Microlitro
°C	Grado centígrado

1. INTRODUCCIÓN GENERAL



1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1 TAXONOMÍA, HÁBITAT Y DISTRIBUCIÓN

Clasificación taxonómica según Bouchet y Rocroi (2010):

Phylum	Mollusca
Clase	Bivalvia (Linnaeus, 1758)
Subclase	Autobranchia (Grobben, 1894)
Superorden	Heteroconchia (Gray, 1854)
Orden	Venerida (Gray, 1854)
Superfamilia	Veneroidea (Rafinesque, 1815)
Familia	Veneridae (Rafinesque, 1815)
Subfamilia	Venerinae (Rafinesque, 1815)
Género	<i>Venerupis</i>
Especie	<i>Venerupis pullastra</i> (Montagu, 1803)

La clase Bivalvia, también llamada Pelecypoda o Lamellibranchia, incluye animales tan conocidos como las almejas, mejillones, navajas y ostras. Esta clase se diferencia del resto de los moluscos por tener el cuerpo comprimido lateralmente y recubierto por una concha formada por dos valvas, por presentar las branquias bien desarrolladas (con función respiratoria y alimenticia) y por ser animales filtradores que se alimentan principalmente de fitoplancton.

Dentro del orden Venerida se encuentran bivalvos bentónicos como las almejas, berberechos, navajas y coquinas. La almeja babosa *Venerupis pullastra* (Montagu, 1803) pertenece a la familia Veneridae, que se caracteriza por poseer ligamento externo y tres dientes cardinales.

1. Introducción general

La almeja babosa vive en bancos de arena fina, grava o arena fangosa; preferentemente en bancos situados entre la línea de bajamar y los 40 metros de profundidad. Esta especie presenta los sifones soldados y más cortos que otras almejas, por lo que no puede enterrarse a tanta profundidad, resistiendo muy mal los períodos de desecación de la bajamar. Aunque en menor número, también se encuentran bancos intermareales de esta especie.

Está ampliamente distribuida, se extiende desde Noruega hasta Marruecos, incluyendo el mar Báltico y el Mediterráneo.

1.2 ANATOMÍA

La concha de la almeja babosa es ovalada y ligeramente alargada; está constituida por dos valvas iguales de naturaleza calcárea; unidas entre sí en la región dorsal por la charnela, la cual posee tres dientes cardinales que forman el engranaje que posibilita el movimiento de apertura y cierre.

Las valvas se cierran por medio de dos músculos abductores que trabajan oponiéndose al ligamento, situado al lado de la charnela. Cuando los músculos abductores cierran las valvas, el ligamento se estira y cuando los músculos se relajan, el ligamento abre las valvas (Aguirre, 1973).

La superficie externa de la concha está surcada por líneas concéntricas muy marcadas, mientras que las líneas radiales, que en otras especies como la almeja fina y japonesa son más aparentes, en la almeja babosa son casi imperceptibles (Figura 1.1).

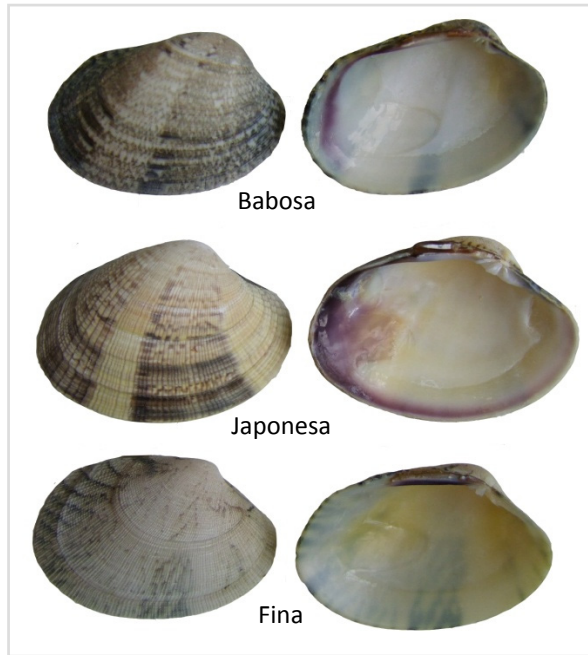


FIGURA 1.1: Morfología de la concha de las tres especies de almeja.

En la superficie interna de las valvas se observa la línea paleal, que se corresponde con la impresión dejada por el reborde del manto y que en la región anterior presenta un seno paleal a nivel de los sifones. También se encuentran las dos impresiones de los músculos abductores (Figura 1.2).

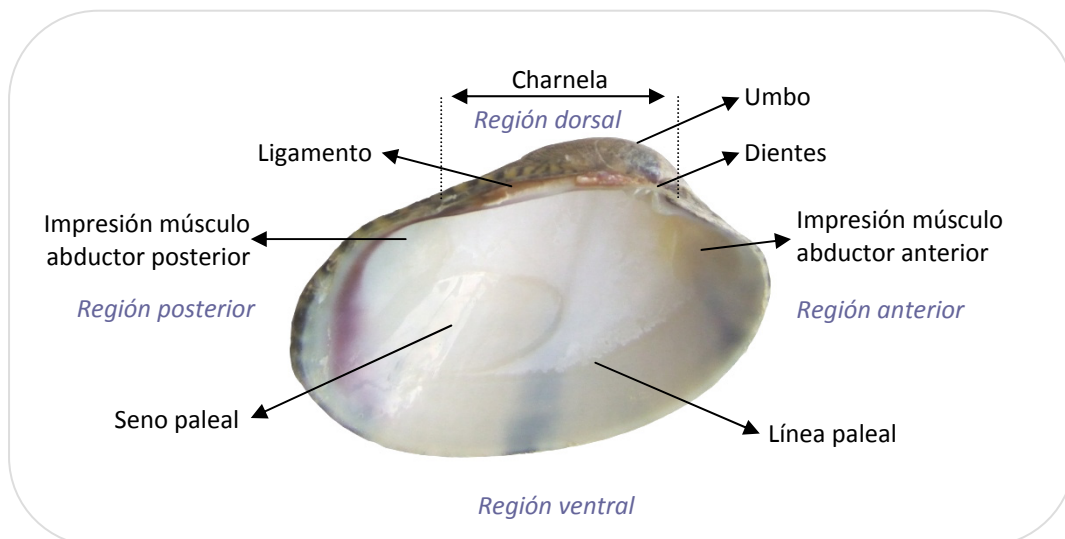


FIGURA 1.2: Morfología interna de la concha. Valva izquierda.

1. Introducción general

Las valvas encierran el cuerpo del animal, constituido principalmente por la masa visceral, las branquias, el pie y el manto (Figura 1.3). En la **masa visceral** se encuentran el aparato digestivo, reproductor, circulatorio y excretor. Las **branquias** se sitúan a cada lado de la masa visceral. El **pie** está constituido por una masa muscular localizada hacia la región posterior del animal; es un órgano contráctil que le permite desplazarse por el fondo y enterrarse en el substrato. En la base del pie se encuentra la **glándula del bisco**, que secreta un filamento que le permite fijarse al substrato, siendo más funcional en estadios juveniles en el caso de las almejas.

El **manto** está constituido por dos lóbulos unidos en la parte dorsal. Está adherido a la superficie interna de las valvas y termina en tres repliegues, de los que el más externo segrega la concha. El manto protege las partes blandas, creando entre ellas y la masa visceral el espacio denominado cavidad paleal. En las almejas los lóbulos del manto están libres hacia la región ventral siguiendo el contorno de la concha, en la región posterior se unen formando dos sifones, el inhalante y el exhalante; que en *V. pullastra* están unidos entre sí.

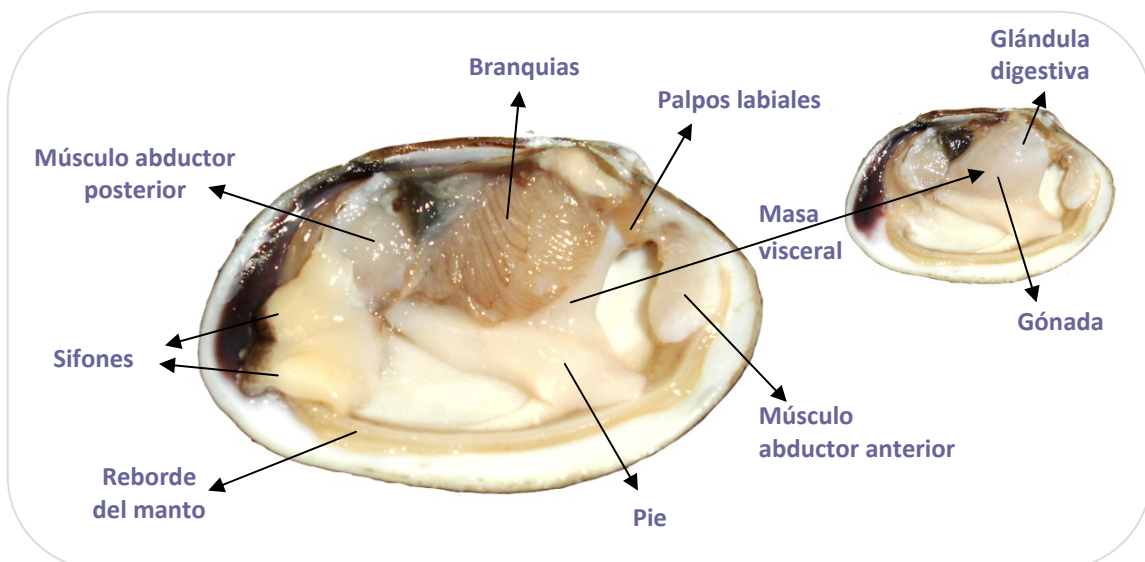


FIGURA 1.3: Anatomía interna de *V. pullastra*.

1.3 FISIOLÓGÍA

El aparato respiratorio está compuesto por un par de branquias situadas a ambos lados de la masa visceral. Cada hemibranchia está formada por dos laminillas constituidas por numerosos filamentos. Las branquias tienen doble función, realizar el intercambio gaseoso y filtrar el alimento.

Las partículas de alimento que no son rechazadas, son envueltas en una sustancia mucosa y conducidas, gracias al movimiento de los cilios branquiales, hacia la parte posterior del animal, donde se encuentran los palpos labiales y la boca. Las partículas rechazadas, por su tamaño o por su composición bioquímica, se aglutinan en la cavidad paleal formando las pseudoheces, expulsadas al exterior por el sifón exhalante.

El aparato digestivo está formado por la boca, esófago, estómago, glándula digestiva, intestino, recto y ano. A través de la boca, y pasando por un corto esófago, las partículas de alimento llegan al estómago, donde se encuentra el estilo cristalino que tiene como función triturar las partículas de alimento con las enzimas que él mismo contiene. Estas partículas semidigeridas pasan a la glándula digestiva donde se realiza una digestión intracelular para, posteriormente, dirigirse al intestino y desembocar en la cavidad paleal a través del ano, muy cerca del sifón exhalante.

El aparato circulatorio es de estructura simple y la circulación es abierta. El corazón está situado en posición dorsal, envuelto en una cavidad pericárdica, constituido por dos aurículas y un ventrículo. Las aortas, una anterior y otra posterior, expulsan la hemolinfa que se distribuye por todo el cuerpo gracias a las arterias y arteriolas, éstas terminan en unas lagunas de forma que la hemolinfa circula libremente por todos los tejidos.

El aparato excretor está compuesto por un par de riñones que purifican la hemolinfa antes de pasar por las branquias para oxigenarse y volver al corazón.

El sistema nervioso lo forman tres pares de ganglios: cerebrales, pedales y viscerales, unidos entre sí por un cordón neuronal. Los ganglios cerebrales están localizados cerca de la boca y actúan sobre la región anterior, los pedales enervan el pie y la parte posterior del manto, y los viscerales actúan sobre las branquias y la masa visceral.

1.4 REPRODUCCIÓN

Se reproducen sexualmente, es una especie dioica sin dimorfismo sexual.

La gónada está constituida por gonoductos y folículos, y en épocas de madurez ocupa una gran parte de la masa visceral. Los gonoductos carecen de células musculares, por lo que la expulsión de los gametos se realiza gracias al movimiento de los cilios que tapizan estos conductos. Los folículos son estructuras de forma acinosa y muy ramificada; en ellos tiene lugar la gametogénesis.

La gametogénesis comienza cuando las gonias (células germinales primordiales) se diferencian en ovogonias o espermatogonias. Las ovogonias son diploides y se dividen repetidamente por mitosis para producir ovocitos primarios. Éstos entran en meiosis dando lugar a los ovocitos previtelogénicos, adheridos a la pared interna del folículo, los cuales irán aumentando progresivamente de tamaño debido a que acumulan sustancias de reserva. Una vez que el ovocito alcanza la madurez, se separa de la pared del folículo y migra hacia el lumen donde permanece hasta el desove. La segunda división meiótica del ovocito tiene lugar una vez se produce la fecundación.

Las espermatogonias diploides se dividen repetidamente por mitosis para originar los espermatocitos primarios de menor tamaño que las espermatogonias. Estos espermatocitos sufren la primera división meiótica dando lugar a los espermatocitos secundarios. Éstos, a su vez, entran rápidamente en la segunda división meiótica formando las espermátidas. Los espermatozoides se forman a partir

de las espermátidas mediante una serie de reorganizaciones celulares, disponiéndose de forma radial hacia el lumen del folículo.

La gametogénesis es un proceso que requiere gran cantidad de energía, por lo que la movilización de los nutrientes del alimento ingerido hacia la gónada es esencial para el desarrollo de los gametos. En la mayoría de los bivalvos, este desarrollo no depende directamente del alimento ingerido, sino que puede estar subordinado a las reservas almacenadas o a ambos factores.

1.5 CICLO VITAL

La fecundación es externa y el desarrollo de la larva es indirecto, pasando por varias fases larvianas de vida planctónica hasta que sufren la metamorfosis, se van hacia el fondo y comienzan la vida bentónica (Figura 1.4).

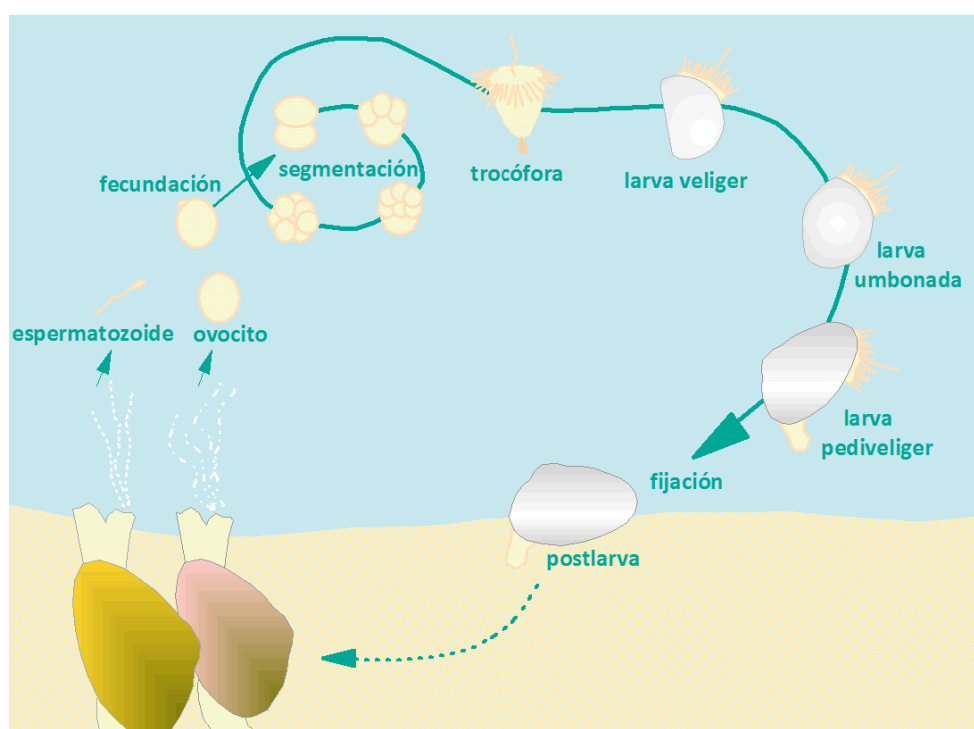


FIGURA 1.4: Ciclo vital de *V. pullastra*.

Los espermatozoides y ovocitos son expulsados al exterior por el sifón exhalante. El espermatozoide penetra en el ovocito, produciéndose poco después la

1. Introducción general

membrana de fertilización que impedirá la penetración de más espermatozoides. Tras la fertilización comienza el desarrollo embrionario hasta la aparición de la primera forma larvaria. Todos los cambios que ocurren durante el desarrollo embrionario hasta la formación de los primeros estadios larvarios, tienen lugar, gracias a las reservas almacenadas en el ovocito, durante la gametogénesis.

La segmentación de los ovocitos es espiral. Tras varias divisiones se forma la blástula ciliada, que por epibolia dará lugar a la gástrula también ciliada. Ésta se transformará en la larva trocófora provista de una corona de cilios y un penacho apical. En esta fase, la glándula de la concha secreta la primera concha larvaria o prodisoconcha I que acabará envolviendo la larva trocófora para dar lugar a la larva D.

La larva D es planctónica, comienza a alimentarse, tiene el velo totalmente desarrollado y se caracteriza por tener la charnela recta. Durante esta etapa comienza a producirse un considerable aumento de tamaño, lo que implica un crecimiento de la concha, la prodisoconcha II, en la cual se observan las líneas de crecimiento. Posteriormente la charnela se curva por la formación del umbo, dando lugar a la larva umbonada.

La larva comienza a desarrollar el pie mientras que persiste todavía el velo, es la larva pediveliger. En este momento la larva se fija al substrato pasando de una vida planctónica a un modo de vida bentónico.

Durante la metamorfosis el velo se reabsorbe, perdiendo la función de captación de alimento y desplazamiento, comenzando a desarrollarse los filamentos branquiales. Esta postlarva comienza a adoptar la forma definitiva de adulto, crece a partir de los nutrientes del medio y desarrolla la concha adulta o disoconcha.

1.6 PRODUCCIÓN

La Ley 11/2008, de 3 de diciembre de Pesca de Galicia, modificada por la Ley 6/2009, de 11 de diciembre, define en su artículo 27 el marisqueo como «el ejercicio de la actividad extractiva, desarrollada a pie o desde embarcación, en la zona marítima o marítimo-terrestre dirigida de modo exclusivo y con artes selectivas y específicas a la captura de una o varias especies de moluscos, crustáceos, tunicados, equinodermos y otros invertebrados marinos, con fines de comercialización».

En esta misma Ley se clasifican las zonas de explotación marisquera en:

-Zonas de libre marisqueo

Bancos naturales cuya explotación no está sujeta a una autorización o concesión administrativa.

-Zonas de autorización marisquera

Bancos naturales o una porción de ellos cuya explotación se otorga en uso privativo normal a título precario para su explotación en régimen de exclusividad.

-Zonas de concesión marisquera

Bancos naturales o una porción de ellos cuya explotación se otorga en uso privativo anormal que implique el derecho a ocupación, uso o gozo en régimen temporal.

La extracción de moluscos en las zonas de libre marisqueo y en las autorizaciones marisqueras es realizada por las agrupaciones de mariscadores. Su faceta más sencilla y artesanal, que tiene como objetivo la captura de moluscos en la playa y se realiza sin embarcación, es lo que se conoce como marisqueo a pie. Esta actividad tiene una gran importancia social en Galicia, ya que de ella dependen los ingresos de más de 4.000 personas, siendo más de 3.500 mujeres. El marisqueo a flote

1. Introducción general

es desempeñado principalmente por hombres, agrupando unas 3.500 personas y cerca de 3.000 embarcaciones (de Coo, 2008).

Las principales especies de bivalvos explotadas por los mariscadores en Galicia son: la almeja babosa (*Venerupis pullastra*), la almeja fina (*Ruditapes decussatus*), la almeja japonesa (*Ruditapes philippinarum*), la almeja rubia (*Venerupis rhomboides*) y el berberecho (*Cerastoderma edule*).

Los parques de cultivo, concesiones administrativas a entidades privadas situadas en la zona marítimo-terrestre, están dedicados principalmente al cultivo de almeja fina, babosa y japonesa. En Galicia existen 1.134 parques de cultivo, 1.000 de ellos situados en Carril.

En la evolución anual de las capturas (Figura 1.5), se observa a partir del año 2005 un descenso en la producción de almeja babosa y almeja fina, y un aumento en la almeja japonesa y rubia. A partir de ese año la almeja babosa pasa de ser la primera en toneladas de capturas a ser la segunda, después de la almeja japonesa.

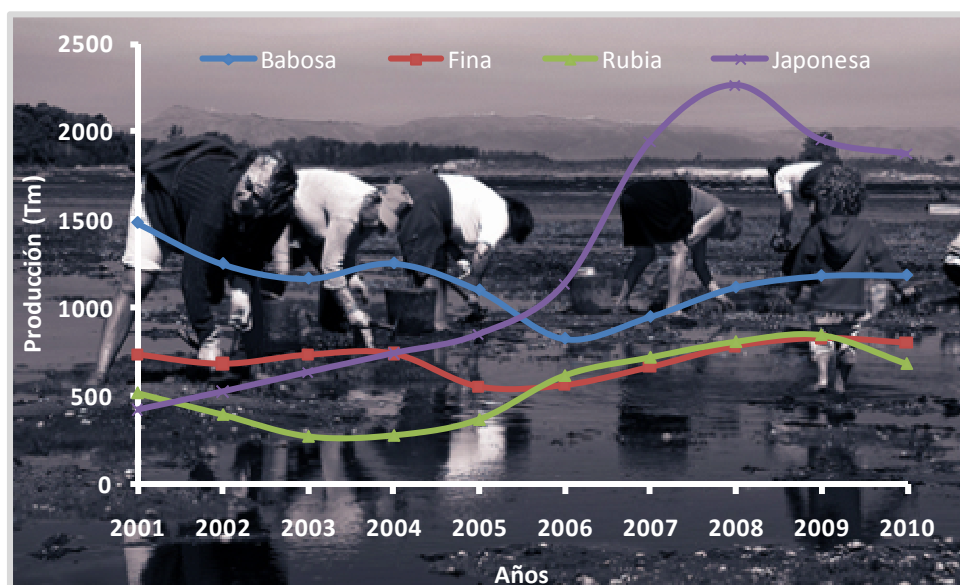


FIGURA 1.5: Evolución de las capturas (en Tm) de almeja babosa, fina, japonesa y rubia en los últimos 10 años.

En los últimos cinco años se extrajeron 5.140 toneladas de almeja babosa. La Ría con mayor producción fue la de Arousa con el 59%, seguida de las Rías de Noia (15%), Ferrol (12%) y Vigo (9%). Entre las Cofradías con mayor volumen de extracción destaca A Illa de Arousa por haber registrado en los últimos 5 años cerca del 17% de la extracción de toda Galicia, seguida de la Cofradía de Noia, con el 13,5%.

El precio medio de la almeja babosa durante estos últimos años varió entre 12 y 15 €/kg, la almeja fina osciló entre 20 y 30 €/kg, y las almejas rubia y japonesa se mantuvieron entre 7 y 10 €/kg.

Debido a la diferencia de precio de primera venta en lonja entre las distintas almejas, la cotización global de la almeja babosa le sigue en importancia a la almeja fina, y a ambas le siguen las otras especies de almejas. Durante los últimos 10 años la cotización anual media de la almeja babosa fue en torno a 15 millones de euros y la fina de 16 millones de euros (Figura 1.6). La almeja japonesa subió progresivamente de 4 millones de euros en el año 2001 a 18 millones en el 2008, bajando hasta 12 millones en el 2010. La almeja rubia pasó, en ese mismo período de tiempo, de 3 a 5 millones de euros.

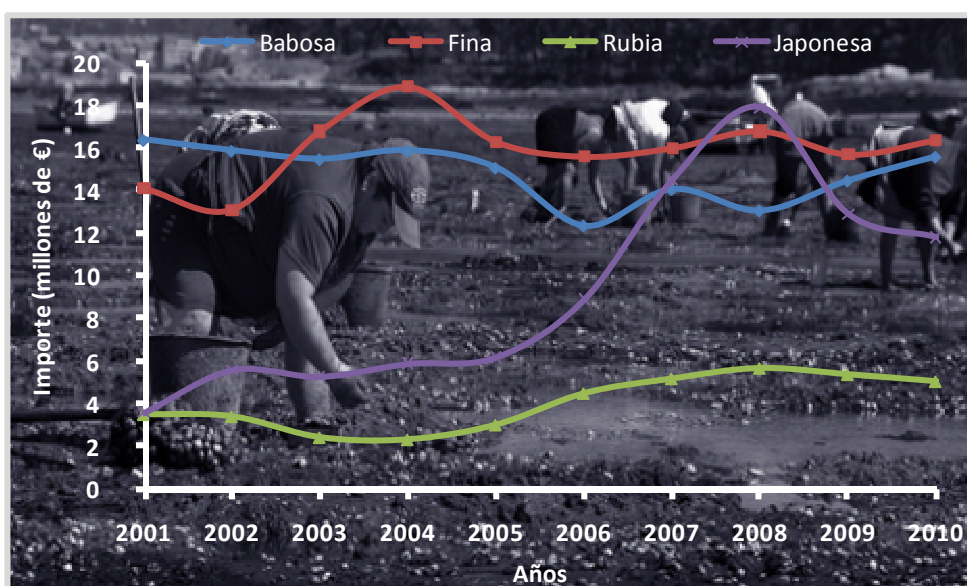


FIGURA 1.6: Cotización global (en millones de €) de almeja babosa, fina, japonesa y rubia en los últimos 10 años.

1.7 PLANES DE EXPLOTACIÓN Y EXTRACCIÓN

El Decreto 423/1993, de 17 de diciembre, por el que se refunde la normativa vigente en materia de marisqueo, extracción de algas y cultivos marinos, modificado por el Decreto 237/2002, de 11 de julio, establece que la extracción de marisco y la recolección de algas estarán sujetas al Plan General de Explotación Marisquera, aprobado con carácter anual por la Consellería de Pesca, Marisqueo e Acuicultura, hoy Consellería do Mar.

Los Planes Generales de Explotación son un conjunto de normas y orientaciones, de carácter anual, destinadas a regular y programar dicha extracción y recolección que sólo podrá ser ejercida por personas y embarcaciones con permiso de explotación. Estos planes son aprobados por orden de la Consellería do Mar, después de consultar con las entidades representativas del sector.

En estos Planes se integran:

-Planes de explotación para autorizaciones marisqueras

Elaborados por sus entidades titulares y presentados en las Delegaciones Territoriales de la Consellería do Mar ajustándose al siguiente esquema: número de mariscadores y embarcaciones propuesto; períodos y zonas de explotación; número de días previsto de actividad; normas de comercialización, vigilancia y tope de capturas por especies, por mariscador y por día.

-Normas de explotación para zonas de libre marisqueo

Elaboradas de oficio por la Consellería do Mar después de consultar con los representantes del sector y las asistencias técnicas. En este caso, puede la Dirección Xeral de Recursos Mariños, modificar las especies, períodos y zonas de extracción establecida en las normas.

-Planes específicos de explotación para zonas de libre marisqueo

Elaboradas por las cofradías o entidades asociativas del sector ajustándose a los plazos y esquema de los Planes de Explotación.

La **extracción** de almeja babosa se regula según el artículo 114 del Decreto 424/93 en el cual se definen las artes de captura de moluscos bivalvos. Entre los utilizados actualmente en Galicia para la captura de almeja babosa se distinguen dos modalidades en función de la localización de los bancos naturales (Figura 1.7):

a) A pie: Se realiza en bancos naturales a los que se tiene acceso a pie en las bajamares. En Galicia las artes más utilizadas para la extracción de almeja son: el “sacho”, el “angazo” y el “fouciño”. Son artes sencillas que provienen del interior, siendo tradicionalmente usadas en las labores de campo.

b) A flote: Se efectúa en los bancos que están siempre sumergidos, por lo que se realiza desde embarcación. Para la captura de almeja babosa en los bancos submareales se utiliza el “rastros” y el “raño”. Son artes de arrastre utilizadas en aguas poco profundas, en las que está prohibido usar aparejos mecánicos para el arrastre sobre el fondo, ni tampoco pueden ser remolcadas por la embarcación, por lo que su uso es estrictamente manual.



FIGURA 1.7: Extracción de almeja babosa en la Ría de Arousa.
A: a pie. B: a flote desde embarcación.

2. OBJETIVOS



2. OBJETIVOS

El objetivo principal de esta tesis es la optimización del cultivo de la almeja babosa *Venerupis pullastra*, con el fin de aumentar la productividad de los bancos naturales de esta especie. Para ello se abordarán los siguientes objetivos parciales:

1.- Definir el ciclo gametogénico de *V. pullastra* con el estudio histológico de la gónada y cuantificación de los componentes bioquímicos mayoritarios. Estudiar el efecto de la parasitación gonadal en la capacidad reproductora de esta especie.

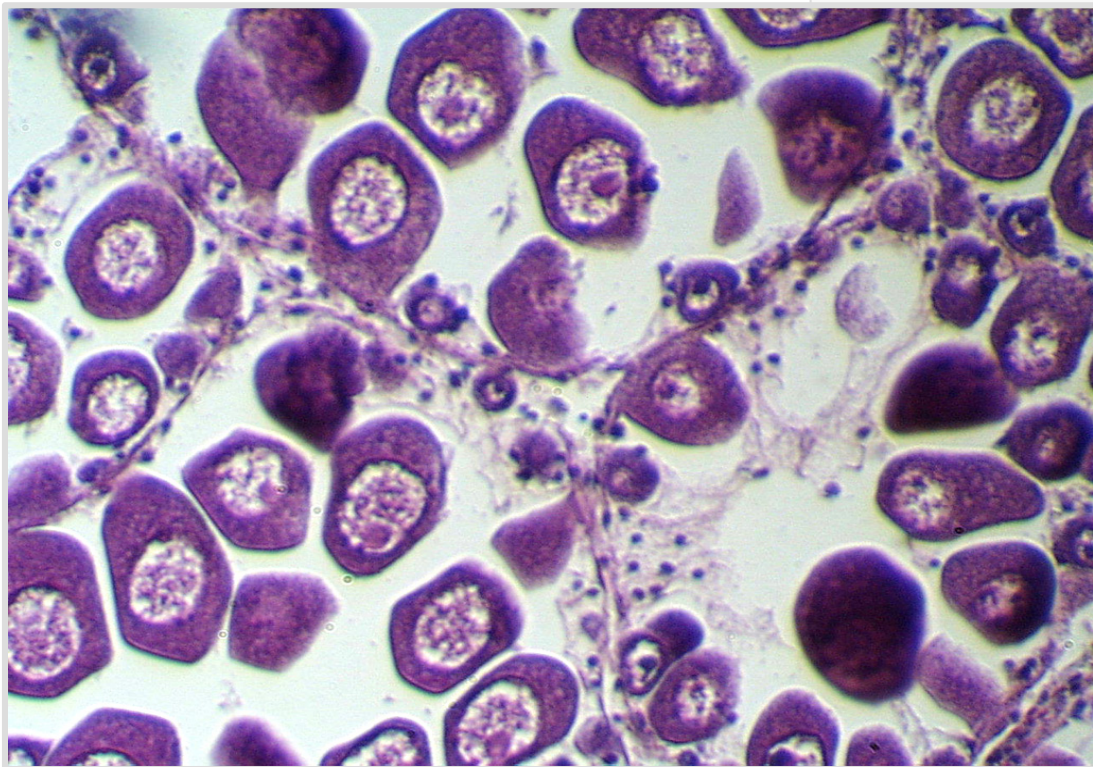
2.- Describir el desarrollo embrionario y larvario de *V. pullastra* con microscopía óptica y electrónica, como estudios básicos para llevar a cabo el cultivo larvario.

3.- Establecer un protocolo de cultivo en criadero de *V. pullastra*, determinando las condiciones óptimas en las diferentes fases; estudiando también el origen de los reproductores en base a su procedencia y época de recogida en los bancos naturales.

4.- Estudiar diferentes sistemas y parámetros de cultivo para el preengorde de *V. pullastra* como fase previa a la siembra en el medio natural. Conocer el proceso de maduración reproductiva y crecimiento diferencial por sexos durante la fase de preengorde.

5.- Estudiar la duración de un cultivo integral de *V. pullastra* (cultivo en criadero, preengorde y engorde en el medio natural) hasta talla comercial en condiciones óptimas de cultivo.

3. CAPÍTULO I: CICLO REPRODUCTIVO



3. CAPÍTULO I: CICLO REPRODUCTIVO

3.1 INTRODUCCIÓN

La determinación del ciclo reproductivo es una parte esencial en el conocimiento de la biología de una especie, su estudio proporciona la información necesaria para abordar la gestión de las pesquerías y para el desarrollo de la acuicultura de cada especie.

Generalmente los bivalvos presentan un ciclo anual de reproducción que incluye una serie de acontecimientos que tienen lugar a partir de la activación de la gónada, le sigue una etapa de desarrollo de la gametogénesis, la madurez, la emisión de gametos o puesta, y a continuación, un período vegetativo o de reposo. Estas fases que funcionan en coordinación con los cambios estacionales del medio, producen el modelo característico de cada especie, que es diferente según la localización de la población.

El calendario y duración de la actividad reproductiva viene determinada por una interacción entre factores exógenos, principalmente la temperatura y la disponibilidad de alimento, y factores endógenos de tipo endocrino y neuronal. Estos factores influyen, en mayor o menor medida, sobre la gametogénesis dependiendo de la especie, de forma que en diferentes localidades el ciclo gametogénico de una misma especie puede sufrir variaciones por algunos de estos parámetros (Barber y Blake, 1991). La sucesión de las diferentes fases del ciclo puede ser sincrónica entre los individuos de la población, o asincrónica dentro de la población (Sastry, 1979).

La formación de los gametos en machos o espermatogénesis y en las hembras u ovogénesis ocurre en los folículos gonadales. En ellos es en donde se van formando las células características de cada fase del proceso y que conducen a la formación final de espermatozoides en los machos y ovocitos maduros en las hembras, que serán

3. Ciclo reproductivo

expulsados al medio. Dentro de un mismo individuo se pueden dar casos de asincronía folicular, coexistiendo dentro de la gónada folículos en distintos estadios de desarrollo; Villalba *et al.* (1993a) encontraron en la almeja babosa que el desarrollo folicular en las hembras no era sincrónico.

Para el estudio del ciclo gametogénico se han desarrollado distintos métodos que se pueden clasificar en indirectos y directos. Los primeros se basan en estimar la presencia de larvas en el plancton o ver la posterior fijación de postlarvas o semilla y los segundos consisten en estudios del tejido gonadal de los individuos, siendo estos últimos los más fiables.

Dentro de los métodos directos existen los que simplemente son observaciones macroscópicas de la gónada (observando la coloración y el aspecto) como el de Glemarec y Bouron (1978) aplicado a Venéridos, o en los que se elaboran Índices de Condición gonadal. Otros métodos directos se basan en observaciones microscópicas, ya sean de frotis *in vivo* de la gónada, como el elaborado por Lucas (1965), o de las preparaciones histológicas de tejido gonadal.

Para determinar el grado de desarrollo gametogénico de los individuos a partir de la observación de preparaciones histológicas se pueden utilizar escalas cualitativas, que se basan en describir los distintos momentos por los que pasa la gónada durante el ciclo. A lo largo de los años se han desarrollado numerosas escalas histológicas, diferenciándose en el número y la caracterización de estos estadios gonadales. En bivalvos cabe destacar las escalas de Holland y Chew (1974) y Xie y Burnell (1994) descritas para la almeja japonesa, y las de Lubet (1959) y Wilson y Seed (1974) descritas para el mejillón.

En los últimos años se han desarrollado otros métodos de naturaleza cuantitativa como es el estereológico. En Venéridos la utilización de este método abarca desde estudios de distribución de frecuencia de talla de ovocitos por análisis de imagen (Morvan y Ansell, 1988 y Xie y Burnell, 1994) hasta cálculos de las fracciones de volumen ocupadas por los diversos tipos celulares (Rodríguez Moscoso, 2000).

El ciclo gametogénico de la almeja babosa *Venerupis pullastra* fue estudiado por Figueras (1957) y Pérez Camacho (1980), ambos mediante la técnica de frotis. Mediante histología se tiene conocimiento del trabajo realizado por Villalba *et al.* (1993a) en una población gallega y el de Maia *et al.* (2006) realizado en aguas portuguesas. Álvarez Fariña (2005) y Jara Jara (1995), estudiaron el ciclo gametogénico de esta especie mediante estereología; este último en semilla de almeja en un cultivo realizado en agua residual procedente de una piscifactoría de rodaballo.

En este capítulo se define el ciclo gametogénico de la almeja babosa *V. pullastra* en tres poblaciones gallegas, mediante la observación de preparaciones histológicas y el empleo de una escala cualitativa adaptada a esta especie.

Los bivalvos marinos presentan ciclos de almacenamiento y de utilización de energía relacionados íntimamente con el ciclo gametogénico. Las variaciones estacionales en las actividades metabólicas son fruto de una serie de interacciones entre alimento disponible, condiciones ambientales, crecimiento y actividad reproductora (Gabbott, 1983). En latitudes altas la producción de nutrientes es estacional y los bivalvos responden a esta variabilidad de diferentes maneras. Así en algunas especies, el período de producción de gametos coincide con el de mayor disponibilidad de nutrientes, por lo que muestran una flexibilidad en su estrategia reproductora asociada a un estilo de vida oportunista (MacArthur y Wilson, 1967 y Lubet, 1986). En otras especies, los nutrientes son almacenados en diferentes órganos del cuerpo y la producción de gametos tiene lugar durante los períodos de baja disponibilidad de alimento, son especies de estilo de vida conservador.

Existen trabajos que hacen referencia a las relaciones que se establecen entre el ciclo gametogénico y la composición bioquímica en bivalvos marinos. Dentro de los Venéridos se encuentran los siguientes trabajos: Ansell *et al.* (1964), Adachi (1979), Beninger y Lucas (1984), Medhioub (1986), Gouilletquer *et al.* (1988), Gimeno *et al.* (1990), Robert *et al.* (1993), Rodríguez *et al.* (1993), Rodríguez Moscoso *et al.* (1993), Jara Jara (1995), Rodríguez Moscoso y Arnáiz (1998), Delgado (2001), Ojea *et al.* (2001) y Álvarez Fariña (2005).

3. Ciclo reproductivo

De entre los componentes mayoritarios, el glucógeno está considerado como el principal componente de las reservas en bivalvos marinos (Giese, 1967). Gracias a su hidrosolubilidad son reservas de uso inmediato facilitando su movilización hacia los tejidos, cubriendo necesidades energéticas tanto de mantenimiento, en épocas de baja disponibilidad de alimento, como relacionadas con los períodos reproductivos. Gabbot y Bayne (1973), Wilson y Seed (1974) y Mann (1979) establecen el papel del glucógeno como constituyente energético esencial que sostiene el esfuerzo reproductor.

Los lípidos, generalmente menos importantes desde el punto de vista del aporte energético (Giese, 1966; Ackman, 1989 y Besnard *et al.*, 1989), presentan una excelente capacidad de ser almacenados. Según Beninger y Lucas (1984) constituyen parte de las reservas en épocas nutricionales deficitarias. Es conocida su importancia para la formación de gametos (Holland, 1978) al constituir la principal reserva de energía de los ovocitos y larvas de bivalvos, hecho que queda demostrado por una bajada de los niveles de este compuesto en épocas de puesta (Gabbott, 1975).

La función principal atribuida a las proteínas es estructural, sin descartar su papel como reserva energética en bivalvos adultos particularmente durante la gametogénesis (Holland, 1978), en situaciones de bajos niveles de glucógeno o severos desequilibrios metabólicos (Beninger y Lucas, 1984). Adachi (1979) encuentra que el nivel de proteínas tiene relación con el desarrollo de la gónada en la almeja japonesa, sugiriendo que la proteína del músculo aductor puede ser utilizada para la producción de gónada. En otro sentido, Jara Jara (1995) sostiene que el aumento de proteínas en almeja es un excelente indicador de crecimiento y que tiene poca relación con los ciclos que siguen el glucógeno y los lípidos, sugiriendo que el papel de las proteínas en el metabolismo energético es poco importante respecto a los anteriores componentes bioquímicos.

Álvarez Seoane (1960) y González (1975), realizaron el estudio de la composición bioquímica de la almeja babosa pero sin relacionarlo con el ciclo gametogénico. El primero determinó la composición bioquímica de la parte comestible

de la almeja orientando los resultados al consumo humano, y el segundo relacionándolo con los parámetros ecológicos. Álvarez Fariña (2005) describe la dinámica reproductora de esta especie apoyándose en estudios histoquímicos.

En este trabajo se estudia la variación de la composición bioquímica mayoritaria de la almeja babosa (glucógeno, lípidos y proteínas) en tres poblaciones a lo largo del ciclo gametogénico, con el fin de describir la estrategia reproductora de esta especie en Galicia.

Uno de los factores que pueden modificar el ciclo reproductivo de los bivalvos es la presencia de parásitos, que pueden afectar directamente a la gónada o bien al estado general del individuo. Existen parásitos en la almeja del tipo *Perkinsus* sp. que han sido relacionados con mortalidades de almeja fina, especialmente en épocas estivales en las que las almejas estaban sometidas a condiciones de estrés (Villalba *et al.*, 2005). Casas (2001) detectó que en una población gallega de almeja fina, al aumentar la intensidad de infección por *Perkinsus atlanticus*, aumentaba el porcentaje de individuos en reposo gonadal y descendía el porcentaje de individuos en estado de gametogénesis y madurez.

Otros parásitos que también pueden ocasionar un efecto negativo en el potencial reproductor son los trematodos. Los bivalvos marinos actúan normalmente como sus hospedadores primarios en sus fases larvarias de esporoquiste y cercaria, o como hospedador secundario en la fase de metacercarias. Los trematodos más importantes que afectan a los bivalvos son los pertenecientes a la familia Bucephalidae, sus larvas son probablemente los parásitos metazoos más nocivos que afectan a bivalvos marinos (Iglesias, 2006), causando su castración y debilitamiento. Las metacercarias normalmente no causan castración y han sido consideradas generalmente como causantes de poco o ningún daño en el hospedador. Sin embargo, existen evidencias de que pueden causar otros daños (Lauckner, 1983), entre los cuales está un debilitamiento general, alteraciones en el comportamiento, aumento en el consumo de oxígeno y la tasa metabólica.

3. Ciclo reproductivo

En Galicia se realizaron trabajos sobre la patología de las almejas: Figueras *et al.* (1992), Villalba *et al.* (1993b, 1999 y 2005), López (1995), Ordás *et al.* (2001), Casas (2001) y Casas *et al.* (2002). Ninguno de ellos relaciona el efecto de la parasitación gonadal en el ciclo reproductivo de la almeja babosa.

En este trabajo se realiza el análisis histopatológico de los individuos utilizados para el estudio del ciclo reproductivo, con el fin de identificar los parásitos que pueden incidir en el desarrollo gametogénico y, por lo tanto, disminuir la capacidad reproductora de esta especie.

La almeja babosa habita tanto en bancos submareales como en intermareales. Los primeros se encuentran siempre sumergidos y por lo tanto la disponibilidad de alimento es más constante que en una población intermareal. A su vez la población del banco intermareal está sometida a períodos de desecación y a factores ambientales como la bajada de salinidad por lluvias o la subida de las temperaturas durante el verano. Eversole *et al.* (1980) y Walker y Hefferman (1994) encontraron diferencias en el desarrollo gonadal entre ejemplares de *Mercenaria* sp. procedentes del área submareal e intermareal.

En este **capítulo** se pretende definir el ciclo reproductivo de la almeja babosa en Galicia. Se realiza el estudio histológico de la gónada utilizando una escala cualitativa, y la variación de los componentes bioquímicos mayoritarios a lo largo del ciclo.

Se escogieron para ello tres bancos naturales: uno de ellos situado al Noroeste de Galicia (en Camariñas) y los otros dos al Suroeste (en O Grove). Dentro de O Grove se han escogido dos bancos, uno intermareal y el otro submareal. Se analizan las posibles diferencias entre una población del NO y otra del SO, y dentro de una misma zona entre una intermareal de otra submareal.

Se estudia también el efecto de la parasitación en la condición gonadal y la capacidad reproductora de esta especie.

3.2 MATERIAL Y MÉTODOS

3.2.1 RECOGIDA Y PROCESADO DE LAS MUESTRAS

Cada mes se muestreó un lote de *Venerupis pullastra* de talla próxima a la comercial de cada una de las tres zonas de estudio (Figura 3.1). Se escogieron tres bancos naturales, uno de ellos es submareal y está situado en la Ría de Camariñas (NO de Galicia) y los otros dos pertenecen a la Ría de Arousa (SO de Galicia). Estos dos bancos se localizan en la zona suroeste de la Ría, uno de ellos es submareal y está situado delante del puerto de O Grove (banco de “A Cantareira”) y el otro es intermareal y está situado entre O Grove y A Toxa (banco de la “Vía Norte”). En este trabajo se hace referencia a estas poblaciones de estudio como: Camariñas, O Grove submareal y O Grove intermareal.



FIGURA 3.1: Localización de los tres bancos naturales de *V. pullastra* utilizados en este estudio.

3. Ciclo reproductivo

La extracción la realizaron mensualmente las mariscadoras de la agrupación o en algún caso directamente la asistencia técnica de la propia cofradía. En noviembre de 2003 se recogieron las primeras muestras y se concluyeron en mayo de 2005; obteniendo así datos del ciclo gametogénico a lo largo de 19 meses.

Las muestras llegaban refrigeradas y se procesaban directamente sin depuración previa; solamente se mantenían durante una hora en agua para expulsar las arenas de la cavidad paleal. Esto era debido a que se temían posibles pérdidas de gametos si se introducían las almejas de nuevo en el agua durante 24 horas; hecho que se pudo confirmar en nuestro laboratorio al observar durante todo el período de estudio, que las almejas sobrantes expulsaban gametos (en mayor o menor cantidad) al ser introducidas en agua.

3.2.2 OBTENCIÓN DE LOS DATOS AMBIENTALES DE LAS ZONAS DE MUESTREO

Los datos de salinidad (‰), temperatura (°C) y clorofila a ($\mu\text{g/l}$) de las zonas de muestreo han sido cedidos por el Instituto Tecnológico para el Control del Medio Mariño (INTECMAR). Los dos primeros fueron recogidos mediante perfiles verticales realizados con un *CTD Seabird 25* y los datos de clorofila fueron obtenidos mediante análisis espectrofluorimétrico.

Los datos correspondientes a la población de O Grove submareal proceden de la estación A8 denominada “Meloxo” y los datos de la población intermareal provienen de la estación A7. De la población de Camariñas no se ha conseguido obtener ningún dato.

3.2.3 OBTENCIÓN DE LOS DATOS BIOMÉTRICOS, CÁLCULO DEL PESO SECO E ÍNDICES DE CONDICIÓN

De cada muestreo se procesó un número de almejas comprendido entre 30 y 50. Se separaron los machos y las hembras, utilizando como mínimo 15 individuos de cada sexo.

A cada individuo se le tomaron las siguientes medidas utilizando un calibre digital *Mitutoyo* (precisión 0,01 mm) y una balanza de precisión *Gram Precision* (precisión 0,01 g):

- Longitud máxima del eje antero-posterior
- Altura máxima del eje dorso-ventral
- Anchura máxima
- Peso fresco total
- Peso fresco de la concha
- Peso fresco de la vianda
- Peso fresco de la gónada

A cada individuo se le diseccionó la gónada separándola del resto de la vianda, ambas partes se congelaron para, posteriormente, realizar los análisis bioquímicos.

El peso seco se calculó liofilizando una muestra de tejido, congelándola previamente, y manteniéndola durante 24-48 horas en un liofilizador refrigerado. Posteriormente se pesó la muestra previo paso por un desecador durante una hora. Las conchas se mantuvieron en una estufa a 100°C durante 24 horas. Se calcularon los siguientes pesos secos:

- Peso seco de la vianda
- Peso seco de la concha
- Peso seco de la gónada

3. Ciclo reproductivo

Con los datos obtenidos del peso seco se calcularon los Índices de Condición:

- Índice de Condición visceral:

$$\text{ICV} = (\text{Peso seco de la vianda} / \text{Peso seco de la concha}) \times 100$$

- Índice de Condición gonadal:

$$\text{ICG} = (\text{Peso seco de la gónada} / \text{Peso seco de la concha}) \times 100$$

3.2.4 MÉTODO HISTOLÓGICO

Para el estudio histológico el tejido gonadal se introdujo durante 24 horas en el líquido fijador. Las primeras muestras (hasta marzo 2004) se fijaron con Bouin-Hollande, posteriormente se optó por utilizar el fijador Davidson, obteniéndose mejores resultados de fijación.

Seguidamente se procedió a deshidratar las muestras en un procesador de tejidos automático *Histolab ZX-100*, para luego incluirlas en parafina. En el procesador las muestras pasaron por la siguiente serie de baños:

- etanol al 80% (1x 1 h)
- etanol al 96% (3x 2 h)
- etanol al 100% (2x 1 h)
- 1 etanol al 100%: 1 xileno (1x 1 h)
- xileno (2x 1 h)
- parafina a 60°C (2x 3 h)

El siguiente paso fue la formación de bloques de parafina con cada una de las muestras. Se realizó en un centro formador de bloques, compuesto por un dispensador de parafina caliente y una placa refrigeradora donde se enfrían. Se cortaron los bloques obtenidos con un microtomo *Microm HM 340 E*, se hicieron secciones de 5 micras de espesor que luego se extendieron en un baño de agua a 40°C,

para recogerlos sobre un portaobjetos con una capa de glicerina que facilitaba su adherencia. Se secaban en una estufa a 40°C.

El último paso fue la tinción con hematoxilina-eosina, para ello previamente se realizaba el desparafinado y la hidratación de los cortes histológicos, el proceso era manual y se realizaba pasando las preparaciones por la siguiente serie de baños:

- xileno (3x 2 min)
- etanol al 100% (1x 2 min)
- etanol al 96% (1x 2 min)
- etanol al 80% (1x 2 min)
- etanol al 70% (1x 2 min)
- etanol al 50% (1x 2 min)
- agua destilada (1x 5 min)

El siguiente paso era la tinción en sí, y comprendía los siguientes baños:

- hematoxilina de Harris (1x 5 min)
- agua corriendo (1x 5 min)
- eosina (1x 10 min)
- etanol al 100% (4x 1 min)
- xileno (3x 1 min)

Las preparaciones se montaron con Histomount y se observaron al microscopio óptico.

Análisis cualitativo:

La escala utilizada es una adaptación a esta especie de las escalas comúnmente utilizadas para otros bivalvos. Se basa en las escalas cualitativas existentes para bivalvos (Lubet, 1959; Holland y Chew, 1974 y Wilson y Seed, 1974), pero con ligeras modificaciones adaptadas a esta especie tras la observación de las preparaciones. A

3. Ciclo reproductivo

cada individuo se le asignó un estadio de la citada escala. Dado que en un mismo individuo era frecuente observar asincronía folicular, se ha asignado el estadio presente en la mayor parte de la gónada.

Se ha eliminado el estadio 0, o de reposo sexual, que en otras especies se caracteriza por la abundancia de tejido conjuntivo y ausencia de folículos y gametos. En la almeja babosa no se observó la fase de reposo, pudiendo diferenciar el sexo de los individuos a lo largo de todo el año. Después del estudio de las preparaciones, se ha decidido simplificar la escala en sólo cuatro estadios. A continuación se define la escala utilizada:

E1. Inicio de la gametogénesis

Comienza el desarrollo gonadal, los folículos están totalmente formados y repletos de células vesiculares. El sexo es fácilmente diferenciable. En las hembras hay abundancia de gonias repoblando los folículos y en algunos de ellos, los ovocitos empiezan a acumular vitelo; en los machos se observa alguna banda centrípeta de espermatogonias.

E2. Gametogénesis avanzada

En los folículos empiezan a desaparecer las células vesiculares, aunque es frecuente observarlas todavía pegadas a las paredes. En las hembras hay abundancia de ovocitos pedunculados y se observa algún ovocito maduro, en las paredes se siguen formando ovocitos previtelogénicos. Los machos presentan abundancia de líneas germinales, con predominio de espermatogonias y espermatocitos; en algún folículo pueden aparecer los primeros espermatozoides en el centro.

E3. Madurez y puesta

No hay presencia de células vesiculares en los folículos. Las hembras están llenas de ovocitos maduros y algún espacio vacío de ovocitos ya expulsados; es

frecuente seguir observando algún ovocito previtelogénico o pedunculado aunque no son los más abundantes. Los machos presentan los folículos repletos de espermatozoides organizados radialmente hacia el centro del folículo, o dispuestos desordenadamente (indicador de folículos en puesta); pero además presentan una o dos líneas de espermatogonias que seguirán generando espermatozoides.

E4. Renovación gonadal

Los mismos folículos que presentan gametos maduros en el centro empiezan a generar células vesiculares en las paredes; en algún caso puede aparecer alguna zona de tejido conjuntivo organizándose en nuevos folículos. En las hembras quedan ovocitos residuales, generalmente no atrésicos, mientras los folículos se llenan de células vesiculares y las gonias comienzan a repoblarlos. Los machos presentan en el centro de los folículos espermatozoides, varias líneas de células vesiculares y gonias en las paredes, pero en ningún caso nuevas series gametogénicas.

3.2.5 CONTROL PARASITOLÓGICO DE LAS POBLACIONES DE ESTUDIO

Para estudiar la incidencia de los parásitos en la evolución del ciclo gametogénico, se muestreó trimestralmente, durante un año, un lote de 30 individuos de las mismas poblaciones de estudio (Camariñas, O Grove submareal y O Grove intermareal). A cada individuo se le separó un fragmento de tejido branquial, masa visceral y reborde del manto. Se procesaron los tejidos de acuerdo a las técnicas histológicas que se describen en el apartado anterior.

Tras una observación minuciosa al microscopio óptico, se determinó la presencia/ausencia de los diversos parásitos y alteraciones patológicas en cada uno de los individuos. Se calculó la prevalencia mensual según la siguiente fórmula:

$$\text{Prevalencia} = (\text{n}^\circ \text{ almejas parasitadas} / \text{n}^\circ \text{ almejas examinadas}) \times 100$$

3.2.6 MÉTODOS BIOQUÍMICOS

Para realizar los análisis bioquímicos se partió de las muestras liofilizadas y finamente pulverizadas. Se analizaron (separadamente por sexos) la gónada y el resto de la vianda, para obtener la cantidad (en mg/g peso seco) de glucógeno, lípidos y proteínas.

3.2.6.1 DETERMINACIÓN DE GLUCÓGENO

Para la determinación del glucógeno se utilizó el método enzimático de Keppler y Decker (1984), con algunas modificaciones de Crespo (1989). Este método permite cuantificar la glucosa procedente de la hidrólisis del glucógeno y por otro lado, la glucosa libre. En la figura 3.2 se muestra un esquema del proceso.

La hidrólisis enzimática se realizó con la amiloglucosidasa de *Aspergillus niger* (exo-1,4- α -D-glucosidasa, E.C.3.2.1.3.), que hidroliza los enlaces glucosídicos tanto α -1,4 como los α -1,6. Para la determinación de la glucosa se empleó un kit comercial (Glucinet de Diagnóstico Sclavo).

El método comenzó con una homogenización del liofilizado (aproximadamente 200 mg) con 4 ml de ácido perclórico al 6% para inactivar los enzimas naturales que hidrolizan el glucógeno. Inmediatamente después se recogieron seis alícuotas de cada muestra a las que se les añadió 100 μ l de bicarbonato sódico 1M, para neutralizar al homogenado mientras se dejaban reposar en hielo durante 10 minutos. Posteriormente, a tres de las alícuotas se les añadió 500 μ l de la enzima amiloglucosidasa (disuelta en tampón acetato-acético a razón de 21 U/ml) que hidrolizaba los enlaces del glucógeno para convertirlo en glucosa; mientras que a las otras tres no se les añadió la enzima para poder determinar la cantidad de glucosa libre del liofilizado (se les añadió la misma cantidad de tampón). Por diferencia se obtuvo la cantidad de glucosa que procedía de la hidrólisis y, por tanto, la cantidad de glucógeno del liofilizado.

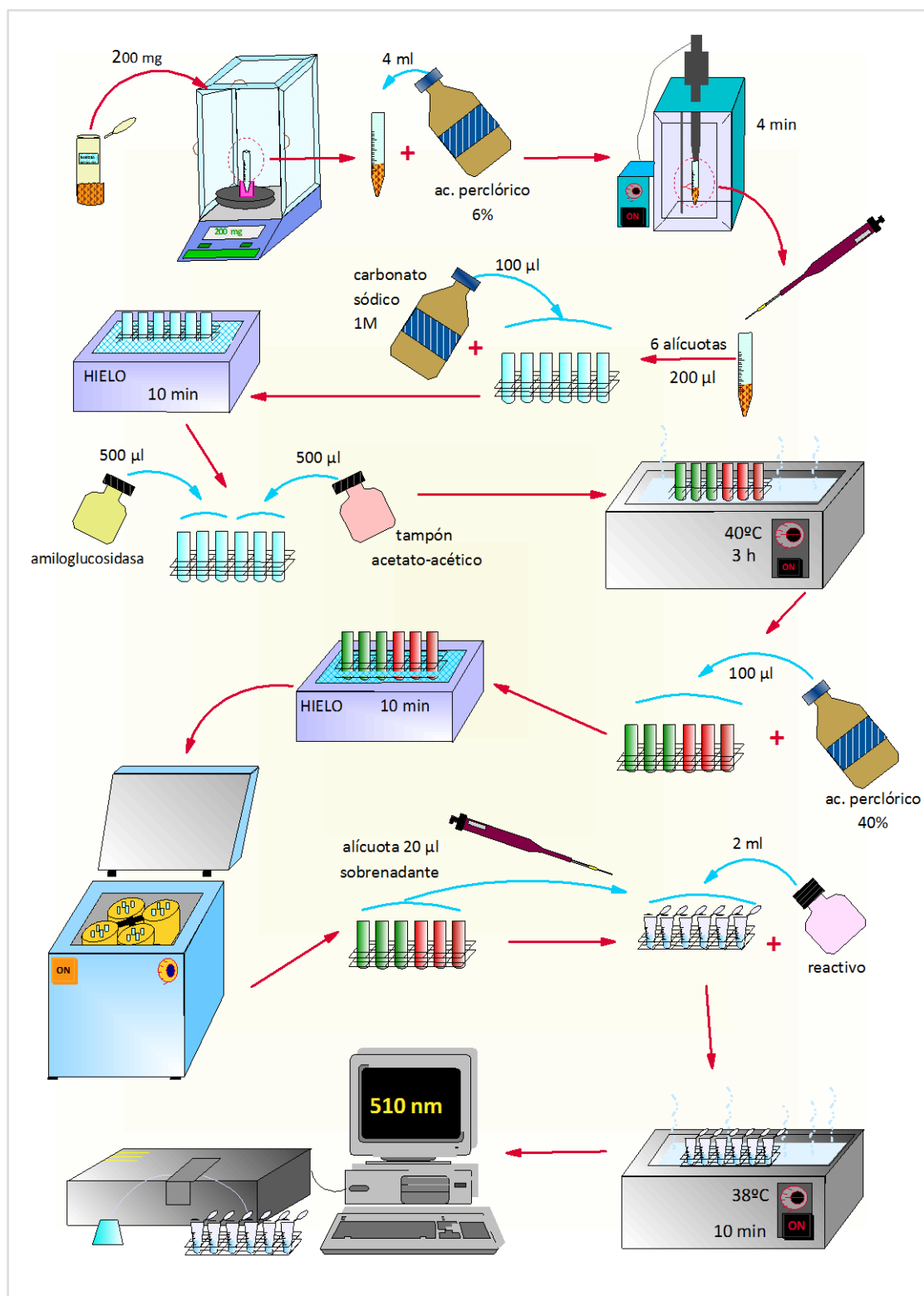


FIGURA 3.2: Esquema del método empleado para la determinación de glucógeno.

3. Ciclo reproductivo

Las muestras se incubaron en un baño a 40°C y 3 horas después se les añadió 100 µl de ácido perclórico al 40% para parar la reacción de la amiloglucosidasa. Se centrifugaron, y del sobrenadante se recogió una alícuota de 20 µl (por triplicado) a la que se le añadió 2 ml de reactivo del kit colorimétrico Glucinet. Previamente a la lectura en el espectrofotómetro a 510 nm, se realizó una recta patrón con concentraciones de 0,25; 0,50; 0,75 y 1 µg/µl de glucosa estándar.

3.2.6.2 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES

La determinación de proteínas se realizó a partir del método de Lowry *et al.* (1951). En la figura 3.3 se muestra un esquema del método empleado. Se partió de una muestra por duplicado de 1,5 mg de tejido liofilizado, a la cual se le añadió 2 ml de hidróxido sódico (2,5N) para posteriormente sonicarla y mantenerla en un baño a 56°C durante 30 minutos para favorecer la hidrólisis del tejido.

Las muestras se centrifugaron para decantar los restos de tejido y del sobrenadante se recogió una alícuota por triplicado de 100 µl, a la cual se le añadió 450 µl de reactivo I y 600 µl de reactivo II. Se agitaron vigorosamente y se dejaron incubar durante 45 minutos en oscuridad, para luego leer la absorbancia en un espectrofotómetro a 750 nm; previa realización de una recta de calibración con concentraciones de 5, 10, 15, 20 y 30 µg/µl de un estándar de seroalbúmina bovina. Los reactivos empleados se prepararon de la siguiente manera:

Reactivo I:

- 25 volúmenes de hidróxido sódico 0,8N
- 18 volúmenes de *reactivo A*: (0,2 g de tartrato disódico, 10 g de carbonato sódico y 69 ml de hidróxido sódico 0,8N; enrasados a 100 ml con agua destilada)
- 2 volúmenes de *reactivo B*: (2 g de tartrato disódico, 1 g de sulfato de cobre (II) y 12,5 ml de hidróxido sódico 0,8N; enrasados a 100 ml con agua destilada)

Reactivo II:

- reactivo del fenol (Folin-Ciocalteu) y agua destilada en proporción 1:2 (v:v).

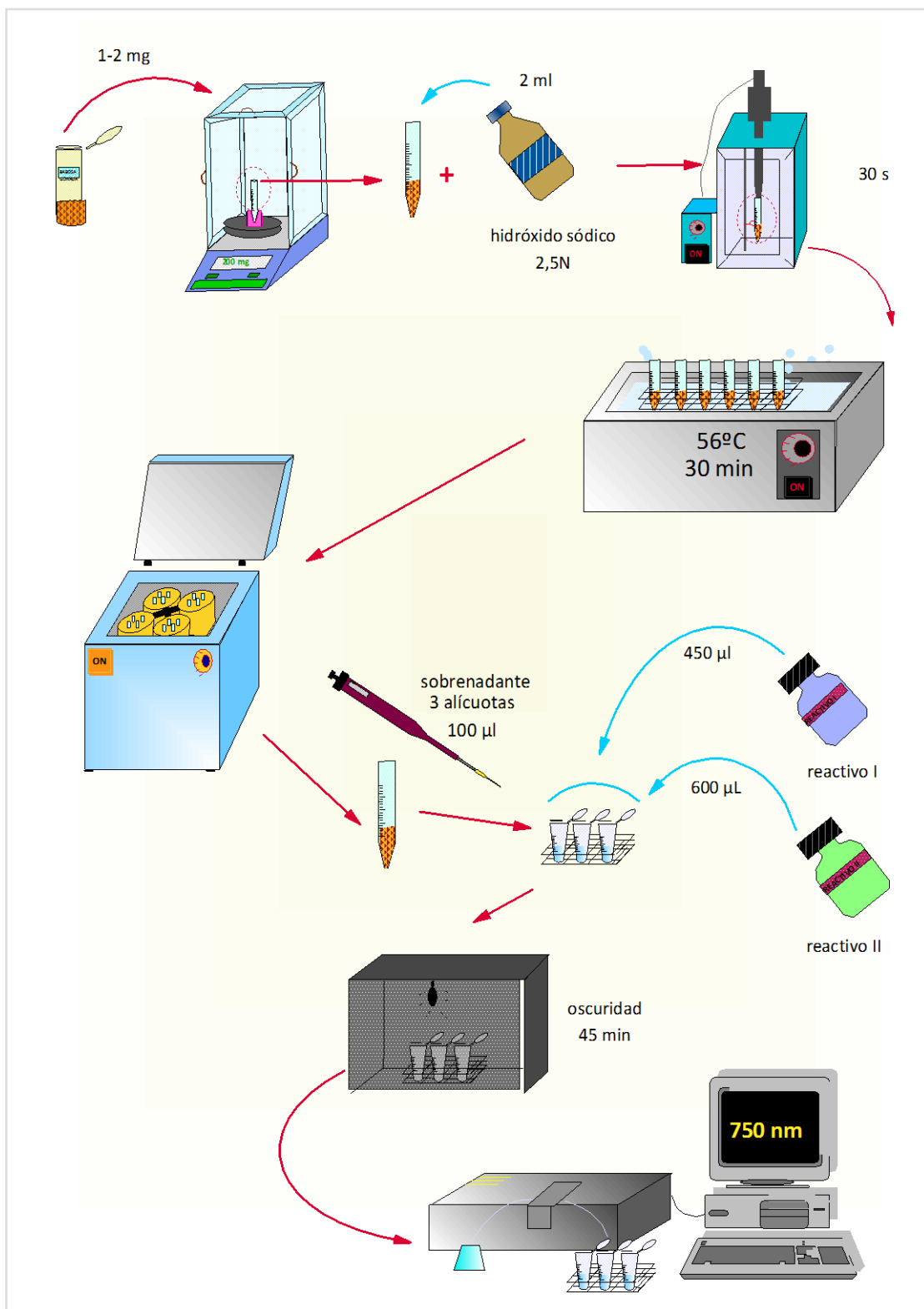


FIGURA 3.3: Esquema del método empleado para la determinación de proteínas totales.

3.2.6.3 DETERMINACIÓN DE LÍPIDOS TOTALES

Para la determinación de lípidos totales se utilizó el método gravimétrico utilizado por Folch *et al.* (1957), previa extracción con cloroformo-metanol (Figura 3.4).

Se partió de 200 mg de tejido liofilizado y pulverizado, a la cual se le extrajeron los lípidos realizando lavados sucesivos con cloroformo-metanol 2:1 (v:v). Se comenzó con un lavado con 4 ml, sonicando la muestra, centrifugándola y recogiendo el sobrenadante. El tejido sedimentado se resuspendió con otros 3 ml de cloroformo-metanol para realizar el segundo lavado; este proceso se repetía tantas veces como fuera necesario hasta extraer la totalidad de los lípidos de la muestra.

El sobrenadante recogido después de todos los lavados se transvasó a una ampolla de decantación filtrándolo a través de un embudo. Se añadieron 3 ml más de cloroformo-metanol que se utilizaban para lavar el propio tubo y el filtro del embudo y cloruro sódico 0,6N (el 25% del volumen de cloroformo-metanol de la ampolla) para arrastrar los restos de materia orgánica de la muestra. Se agitaban y se dejaban reposar durante 24 horas.

Al día siguiente se recogía la fracción inferior de la ampolla que contenía los lípidos, a la superior se le volvía a hacer otro lavado con la misma cantidad inicial de cloroformo-metanol y de cloruro sódico.

Se evaporaron los lípidos en presencia de nitrógeno y se redisolviéron en 3 ml de cloroformo. De aquí se extrajeron 3 alícuotas de 300 μ l en unas cápsulas previamente taradas, para posteriormente evaporarlas en una estufa a 50°C durante dos horas, se pesaron de nuevo las cápsulas y se hallaron así los lípidos totales por diferencia.

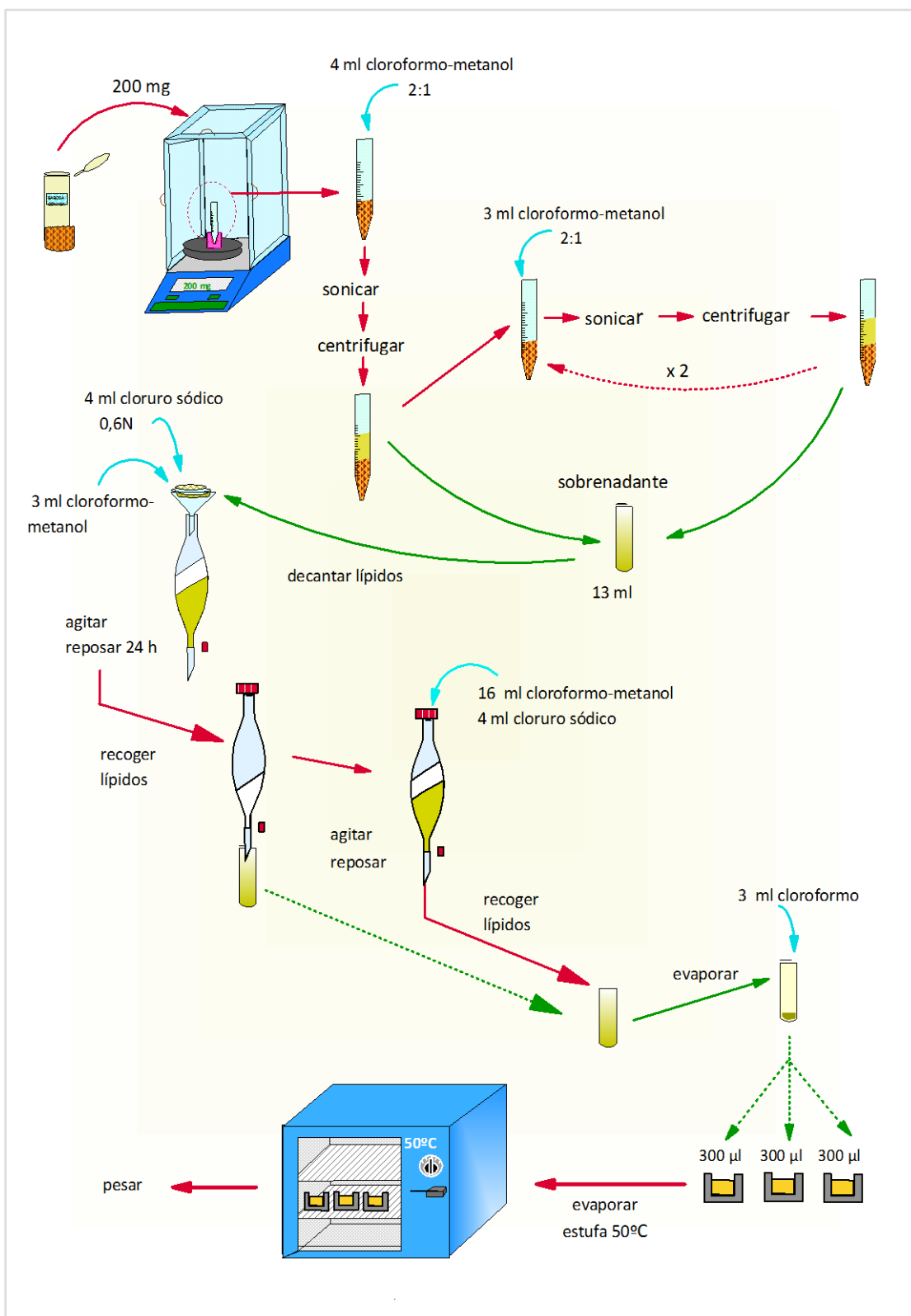


FIGURA 3.4: Esquema del método empleado para la determinación de lípidos totales.

3.2.7 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

El análisis estadístico se realizó utilizando el paquete estadístico SPSS® para Windows versión 15.0.

La comparación de medias de los distintos componentes bioquímicos entre las distintas poblaciones se analizó mediante un test de análisis de varianza (ANOVA). Se utilizó el test de Kolmogorov-Smirnov para el estudio de la normalidad. La homogeneidad de varianzas se ha comprobado mediante el test de Levene. Las comparaciones múltiples se han llevado a cabo mediante el test de comparación múltiple de rangos (test de Tukey).

Para el estudio del sex-ratio en las poblaciones se utilizó un test Chi-cuadrado.

Se realizó un Análisis de Componentes Principales para discriminar las tendencias de la composición bioquímica (lípidos gónada, lípidos víscera, proteínas gónada, proteínas víscera, glucógeno gónada y glucógeno víscera) con respecto a los estadios gametogénicos (inicio de la gametogénesis, gametogénesis avanzada, madurez y renovación) y a los Índices de Condición gonadal y visceral de acuerdo con los ejes principales.

En el estudio de asociación entre la composición bioquímica de las poblaciones, los Índices de Condición y los estadios gametogénicos, se utilizó el coeficiente de correlación de Spearman (Zar, 1996).

Los valores de porcentajes de cada estadio gametogénico y los Índices de Condición gonadal y visceral se transformaron con la función arcoseno.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 PARÁMETROS AMBIENTALES DE LAS ZONAS DE MUESTREO

En las figuras 3.5 y 3.6 se presentan los datos ambientales de las poblaciones de O Grove submareal y O Grove intermareal, desde noviembre de 2003 hasta mayo de 2005, cedidos por el INTECMAR.

En ambas poblaciones la temperatura sigue un ciclo estacional con temperaturas mínimas en invierno (12°C), que se van incrementando en primavera, hasta alcanzar el máximo en verano (18,5°C). La salinidad oscila ligeramente a lo largo de la época de estudio, entre 34‰ y 35,5‰. En relación a la clorofila *a*, en invierno se observan las mínimas concentraciones y a partir de la primavera se encuentran varios picos de distinta intensidad, 4 en O Grove submareal y 3 en O Grove intermareal, que se suceden aproximadamente cada dos meses.

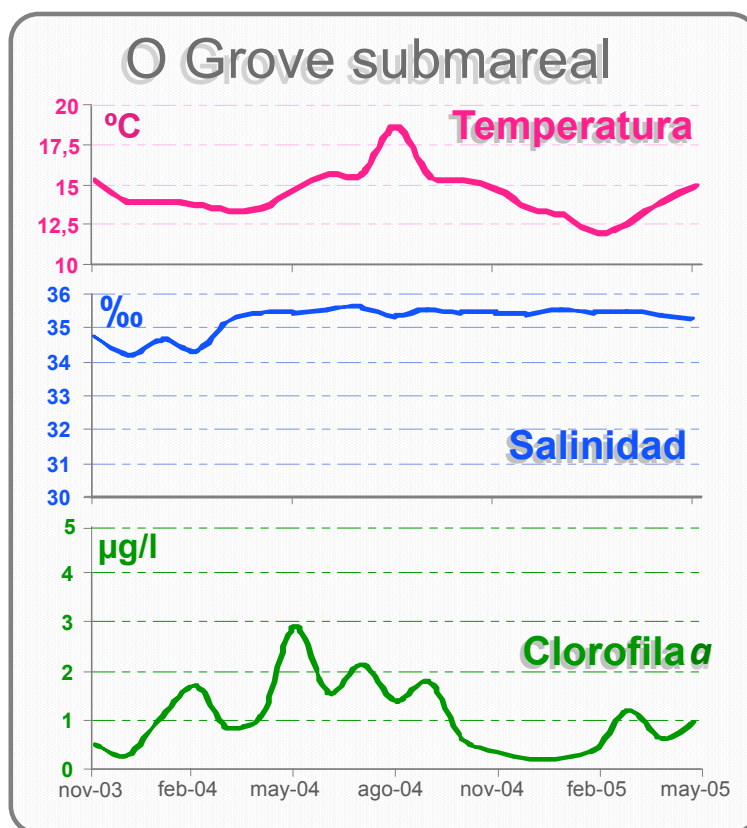


FIGURA 3.5: Gráfica con los datos de temperatura (°C), salinidad (‰) y clorofila *a* (µg/l) en la población de O Grove submareal.

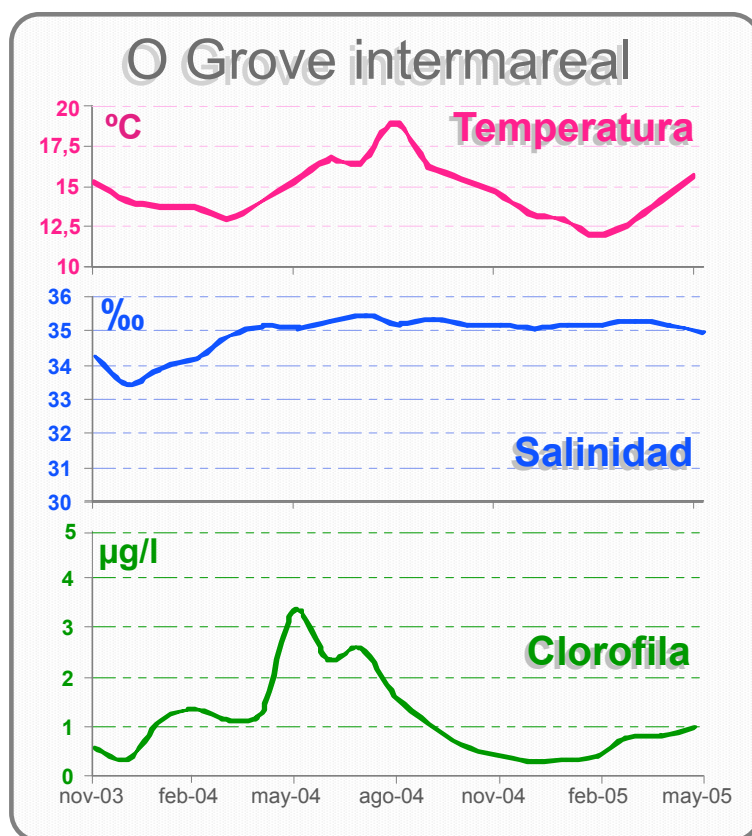


FIGURA 3.6: Gráfica con los datos de temperatura (°C), salinidad (‰) y clorofila *a* (µg/l) en la población de O Grove intermareal.

3.3.2 DATOS BIOMÉTRICOS, PESO SECO E ÍNDICE DE CONDICIÓN

3.3.2.1 POBLACIÓN DE CAMARIÑAS

En la tabla III.1 se muestran los parámetros biométricos obtenidos durante el período de estudio de la almeja babosa *Venerupis pullastra* en la población de Camariñas. Se presentan los valores medios mensuales de longitud, altura y anchura, peso fresco total y peso fresco y seco de la concha, vianda y gónada.

La longitud media mensual de los individuos estudiados de esta población fue de 40 mm, oscilando entre un mínimo de 37,65 mm del mes de diciembre de 2003 y un máximo de 44,53 mm del mes de enero de 2004.

TABLA III.1: Datos biométricos medios mensuales de *V. pullastra* de la población de Camariñas durante los meses de estudio. Media \pm desv.

FECHA	MEDIDAS (mm)			PESO FRESCO (g)				PESO SECO (g)		
	Longitud	Altura	Anchura	Total	Concha	Vianda	Gónada	Concha	Vianda	Gónada
11-nov-03	40,12 $\pm 1,78$	26,24 $\pm 1,37$	17,75 $\pm 1,09$	11,50 $\pm 1,64$	5,64 $\pm 0,83$	3,84 $\pm 0,70$	0,58 $\pm 0,21$	5,28 $\pm 0,80$	0,86 $\pm 0,15$	0,18 $\pm 0,06$
10-dic-03	37,65 $\pm 1,70$	25,11 $\pm 1,15$	17,75 $\pm 0,83$	10,21 $\pm 1,07$	5,18 $\pm 0,65$	3,51 $\pm 0,04$	0,93 $\pm 0,02$	4,83 $\pm 0,61$	0,91 $\pm 0,11$	0,27 $\pm 0,05$
15-ene-04	44,53 $\pm 2,66$	30,14 $\pm 1,67$	21,65 $\pm 1,50$	19,41 $\pm 3,93$	10,45 $\pm 2,34$	5,34 $\pm 0,95$	1,33 $\pm 0,41$	9,78 $\pm 2,26$	1,24 $\pm 0,22$	0,38 $\pm 0,12$
10-feb-04	40,30 $\pm 2,23$	26,66 $\pm 1,43$	18,60 $\pm 1,15$	12,45 $\pm 2,00$	6,26 $\pm 1,17$	3,47 $\pm 0,57$	0,96 $\pm 0,26$	5,88 $\pm 1,13$	0,73 $\pm 0,12$	0,25 $\pm 0,07$
11-mar-04	38,96 $\pm 1,77$	25,90 $\pm 1,14$	17,82 $\pm 0,86$	11,15 $\pm 1,24$	5,72 $\pm 0,76$	3,09 $\pm 0,47$	0,69 $\pm 0,15$	5,24 $\pm 0,70$	0,61 $\pm 0,08$	0,17 $\pm 0,04$
16-abr-04	42,14 $\pm 1,54$	28,89 $\pm 1,06$	20,86 $\pm 1,03$	16,83 $\pm 1,86$	9,33 $\pm 1,24$	3,85 $\pm 0,61$	0,84 $\pm 0,18$	8,72 $\pm 1,19$	0,58 $\pm 0,11$	0,15 $\pm 0,04$
14-may-04	43,39 $\pm 2,44$	30,29 $\pm 1,68$	21,54 $\pm 1,47$	19,47 $\pm 3,50$	10,41 $\pm 1,93$	4,36 $\pm 0,79$	1,24 $\pm 0,29$	9,71 $\pm 1,88$	0,84 $\pm 0,15$	0,27 $\pm 0,06$
1-jul-04	40,60 $\pm 1,58$	28,01 $\pm 1,20$	20,45 $\pm 1,26$	15,01 $\pm 2,28$	8,32 $\pm 1,42$	4,46 $\pm 0,64$	1,22 $\pm 0,27$	7,82 $\pm 1,37$	0,95 $\pm 0,17$	0,31 $\pm 0,07$
10-ago-04	40,70 $\pm 1,82$	28,04 $\pm 1,30$	20,42 $\pm 1,02$	15,25 $\pm 2,02$	8,40 $\pm 1,24$	4,96 $\pm 0,67$	1,55 $\pm 0,27$	7,88 $\pm 1,23$	1,16 $\pm 0,16$	0,43 $\pm 0,08$
14-sep-04	40,54 $\pm 1,71$	27,84 $\pm 1,14$	19,96 $\pm 0,75$	14,70 $\pm 1,65$	7,73 $\pm 1,63$	4,96 $\pm 0,73$	1,45 $\pm 0,38$	7,53 $\pm 1,12$	1,17 $\pm 0,17$	0,42 $\pm 0,11$
19-oct-04	39,81 $\pm 2,19$	26,42 $\pm 1,48$	18,17 $\pm 1,30$	12,78 $\pm 2,29$	6,46 $\pm 1,48$	4,35 $\pm 0,90$	1,09 $\pm 0,55$	6,10 $\pm 1,41$	0,93 $\pm 0,19$	0,31 $\pm 0,16$
15-dic-04	39,29 $\pm 0,98$	25,89 $\pm 0,90$	20,75 $\pm 1,96$	11,00 $\pm 1,16$	5,57 $\pm 0,68$	3,72 $\pm 0,42$	0,89 $\pm 0,17$	5,24 $\pm 0,65$	0,82 $\pm 0,09$	0,25 $\pm 0,05$
27-ene-05	38,59 $\pm 2,50$	25,80 $\pm 1,88$	17,97 $\pm 1,26$	11,10 $\pm 2,83$	5,87 $\pm 1,47$	3,21 $\pm 0,75$	0,70 $\pm 0,22$	5,53 $\pm 1,40$	0,67 $\pm 0,16$	0,17 $\pm 0,05$
25-feb-05	40,72 $\pm 3,39$	27,76 $\pm 2,35$	19,48 $\pm 3,56$	14,82 $\pm 3,81$	7,49 $\pm 2,37$	3,81 $\pm 0,99$	1,00 $\pm 0,42$	7,36 $\pm 2,00$	0,77 $\pm 0,19$	0,25 $\pm 0,10$
29-abr-05	39,93 $\pm 1,95$	25,59 $\pm 0,97$	17,70 $\pm 1,00$	10,56 $\pm 1,31$	5,21 $\pm 0,76$	3,27 $\pm 0,61$	0,63 $\pm 0,21$	4,88 $\pm 0,75$	0,64 $\pm 0,12$	0,15 $\pm 0,05$

En la figura 3.7 se representa la variación del Índice de Condición gonadal y visceral durante los meses de estudio. Ambos índices presentaron un patrón de evolución similar con un valor máximo de 5,66 para el gonadal y 18,81 para el visceral, en el mes de diciembre de 2003. Posteriormente ambos índices descendieron paulatinamente hasta el mes de abril de 2004 donde se encontraron los mínimos valores coincidiendo con un período después de la puesta (1,74 el gonadal y 6,67 el visceral). Los índices volvieron a aumentar manteniéndose en torno a valores similares desde el mes de agosto hasta diciembre. A partir del mes de diciembre de 2004 ambos índices comenzaron a descender (al igual que el año anterior) encontrándose igualmente un mínimo (en ambos índices) en el mes de abril de 2005.

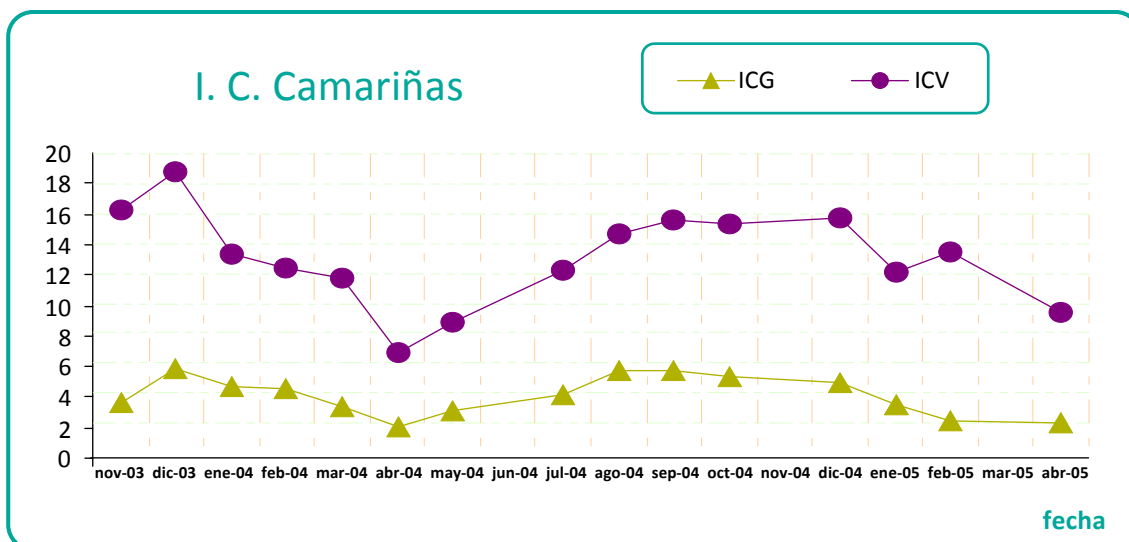


FIGURA 3.7: Evolución del Índice de Condición gonadal (ICG) y visceral (ICV) de *V. pullastra* en la población de Camariñas.

3.3.2.2 POBLACIÓN DE O GROVE SUBMAREAL

En la tabla III.2 se muestran los datos de la población de O Grove. Se presentan la media y la desviación estándar de las medidas biométricas, los pesos frescos y pesos secos durante los meses de estudio.

La longitud media de los individuos diseccionados fue en torno a 37 mm, entre un máximo de 40 mm en febrero de 2004 y un mínimo de 31,83 mm en septiembre de ese mismo año.

Ambos Índices de Condición presentan también en esta población una evolución paralela, como se representa en la figura 3.8. Sin embargo, se observan más variaciones a lo largo del año que en la población de Camariñas. En noviembre de 2003 encontramos los máximos valores, 4,61 para el Índice gonadal y 17,91 para el visceral, que posteriormente descendieron durante el mes de diciembre. En enero de 2004 se observa otra subida, seguido de un descenso en el mes de marzo, donde se encuentran los mínimos valores en ambos índices (2,47 el gonadal y 10,19 el visceral), al igual que en Camariñas debido al desove. En los meses de agosto, septiembre y octubre encontramos valores altos en ambos índices, que después disminuyeron hasta el mes de febrero (un mes antes que en el 2004).

TABLA III.2: Datos biométricos medios mensuales de *V. pullastra* en la población de O Grove submareal durante los meses de estudio. Media \pm desv.

FECHA	MEDIDAS (mm)			PESO FRESCO (g)				PESO SECO (g)		
	Longitud	Altura	Anchura	Total	Concha	Vianda	Gónada	Concha	Vianda	Gónada
19-nov-03	37,96 $\pm 2,51$	24,77 $\pm 2,51$	17,25 $\pm 1,14$	10,26 $\pm 2,10$	5,00 $\pm 1,05$	3,60 $\pm 0,82$	0,72 $\pm 0,24$	4,65 $\pm 1,00$	0,60 $\pm 0,12$	0,22 $\pm 0,02$
17-dic-03	38,03 $\pm 2,18$	25,36 $\pm 1,77$	17,94 $\pm 1,34$	11,45 $\pm 2,50$	5,87 $\pm 1,51$	2,83 $\pm 0,70$	0,54 $\pm 0,22$	5,46 $\pm 1,43$	0,39 $\pm 0,09$	0,13 $\pm 0,05$
21-ene-04	38,11 $\pm 2,25$	25,19 $\pm 1,63$	17,93 $\pm 1,22$	11,16 $\pm 2,17$	5,88 $\pm 1,16$	3,37 $\pm 0,7$	0,74 $\pm 0,28$	5,42 $\pm 1,12$	0,52 $\pm 0,13$	0,19 $\pm 0,07$
24-feb-04	39,99 $\pm 1,55$	26,23 $\pm 1,11$	18,25 $\pm 0,99$	11,89 $\pm 1,06$	5,95 $\pm 0,88$	3,55 $\pm 0,38$	0,63 $\pm 0,11$	5,44 $\pm 0,84$	0,50 $\pm 0,06$	0,15 $\pm 0,03$
23-mar-04	37,89 $\pm 2,23$	25,81 $\pm 1,65$	18,40 $\pm 1,64$	11,96 $\pm 2,59$	6,14 $\pm 1,50$	2,97 $\pm 0,74$	0,62 $\pm 0,32$	5,68 $\pm 1,44$	0,40 $\pm 0,08$	0,15 $\pm 0,07$
27-abr-04	36,45 $\pm 2,61$	23,13 $\pm 1,63$	16,18 $\pm 1,30$	8,47 $\pm 1,97$	4,33 $\pm 1,08$	2,49 $\pm 0,61$	0,45 $\pm 0,19$	4,00 $\pm 1,04$	0,35 $\pm 0,08$	0,11 $\pm 0,05$
1-jun-04	35,87 $\pm 1,93$	23,62 $\pm 1,22$	16,69 $\pm 0,80$	8,63 $\pm 1,14$	4,47 $\pm 0,67$	3,15 $\pm 0,37$	0,71 $\pm 0,13$	4,14 $\pm 0,64$	0,47 $\pm 0,06$	0,18 $\pm 0,03$
2-jul-04	38,92 $\pm 2,84$	25,40 $\pm 1,69$	17,66 $\pm 1,46$	11,23 $\pm 2,45$	5,72 $\pm 1,28$	3,42 $\pm 0,86$	0,71 $\pm 0,13$	5,34 $\pm 1,24$	0,50 $\pm 0,11$	0,17 $\pm 0,06$
3-ago-04	37,00 $\pm 1,98$	23,86 $\pm 1,35$	17,39 $\pm 1,17$	9,75 $\pm 1,65$	4,75 $\pm 0,89$	3,63 $\pm 0,61$	0,77 $\pm 0,23$	4,39 $\pm 0,85$	0,52 $\pm 0,08$	0,18 $\pm 0,07$
3-sep-04	31,83 $\pm 1,98$	21,07 $\pm 1,45$	15,18 $\pm 1,14$	6,39 $\pm 1,46$	3,28 $\pm 0,79$	2,18 $\pm 0,49$	0,48 $\pm 0,23$	3,05 $\pm 0,75$	0,31 $\pm 0,10$	0,13 $\pm 0,06$
15-oct-04	37,82 $\pm 2,54$	24,61 $\pm 1,75$	17,28 $\pm 1,20$	10,08 $\pm 2,07$	4,89 $\pm 1,07$	3,46 $\pm 0,81$	0,69 $\pm 0,24$	4,59 $\pm 0,67$	0,53 $\pm 0,13$	0,19 $\pm 0,07$
24-nov-04	35,42 $\pm 2,40$	23,60 $\pm 1,21$	16,86 $\pm 1,01$	9,11 $\pm 1,36$	4,69 $\pm 0,77$	3,77 $\pm 0,58$	0,57 $\pm 0,20$	4,39 $\pm 0,73$	0,42 $\pm 0,08$	0,17 $\pm 0,06$
21-dic-04	37,52 $\pm 2,17$	24,62 $\pm 1,18$	17,35 $\pm 0,86$	9,80 $\pm 1,38$	5,05 $\pm 0,68$	3,06 $\pm 0,58$	0,60 $\pm 0,18$	4,75 $\pm 0,64$	0,45 $\pm 0,08$	0,10 $\pm 0,07$
14-ene-05	37,30 $\pm 1,35$	24,14 $\pm 1,02$	17,23 $\pm 0,86$	10,04 $\pm 1,23$	4,99 $\pm 0,69$	2,95 $\pm 0,39$	0,59 $\pm 0,13$	4,68 $\pm 0,69$	0,40 $\pm 0,05$	0,15 $\pm 0,03$
10-feb-05	35,70 $\pm 1,05$	23,14 $\pm 0,67$	16,25 $\pm 0,70$	8,63 $\pm 0,70$	4,37 $\pm 0,46$	2,35 $\pm 0,30$	0,44 $\pm 0,13$	4,09 $\pm 0,44$	0,47 $\pm 0,66$	0,10 $\pm 0,03$
10-mar-05	37,78 $\pm 2,45$	24,59 $\pm 1,36$	17,36 $\pm 1,07$	10,70 $\pm 1,07$	5,44 $\pm 0,77$	3,23 $\pm 0,61$	0,72 $\pm 0,21$	5,10 $\pm 0,74$	0,69 $\pm 0,13$	0,19 $\pm 0,05$
7-abr-05	37,46 $\pm 2,33$	24,57 $\pm 1,36$	17,55 $\pm 0,95$	10,22 $\pm 1,60$	5,17 $\pm 0,88$	3,12 $\pm 0,46$	0,66 $\pm 0,18$	4,92 $\pm 0,85$	0,63 $\pm 0,10$	0,16 $\pm 0,04$
10-may-05	37,05 $\pm 1,85$	24,09 $\pm 1,02$	17,07 $\pm 0,98$	9,49 $\pm 1,42$	4,89 $\pm 0,74$	2,89 $\pm 0,62$	0,64 $\pm 0,22$	4,67 $\pm 0,72$	0,58 $\pm 0,13$	0,16 $\pm 0,05$

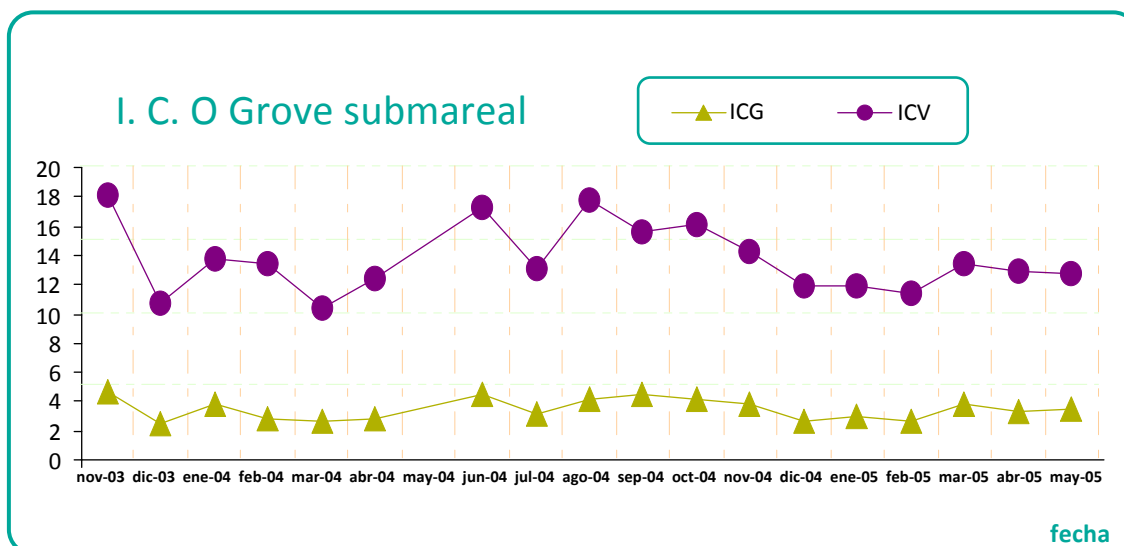


FIGURA 3.8: Evolución del Índice de Condición gonadal (ICG) y visceral (ICV) de *V. pullastra* en la población de O Grove submareal.

3.3.2.3 POBLACIÓN DE O GROVE INTERMAREAL

Se presentan en la tabla III.3 los parámetros biométricos correspondientes a la población de O Grove intermareal.

La longitud de los individuos muestreados en esta población fue menor a las otras dos, con una media de 35,5 mm. Los datos oscilaron entre un máximo de 38,54 mm (mes de octubre de 2004) y un mínimo de 33,77 mm (septiembre de ese mismo año).

En la figura 3.9 se presentan los datos del Índice de Condición gonadal y visceral de esta población. En noviembre de 2003 se encontraron valores altos en ambos índices (3,18 el gonadal y 13,86 el visceral), que comenzaron a descender hasta un mínimo anual en el mes de abril de 2004 (con un valor de 1,42 el gonadal y 8,45 el visceral). Durante el verano los índices presentaron valores altos, disminuyendo a partir del mes de diciembre, hasta llegar al mínimo que en el año 2005 se adelantó a marzo (1,69 y 9,42 el gonadal y visceral, respectivamente).

TABLA III.3: Datos biométricos medios mensuales de *V. pullastra* en la población de O Grove intermareal durante los meses de estudio. Media \pm desv.

FECHA	MEDIDAS (mm)			PESO FRESCO (g)				PESO SECO (g)		
	Longitud	Altura	Anchura	Total	Concha	Vianda	Gónada	Concha	Vianda	Gónada
25-nov-03	35,18 $\pm 1,03$	22,84 $\pm 0,63$	16,04 $\pm 0,72$	8,33 $\pm 0,68$	4,13 $\pm 0,42$	2,62 $\pm 0,37$	0,50 $\pm 0,12$	3,82 $\pm 0,40$	0,53 $\pm 0,08$	0,12 $\pm 0,03$
23-dic-03	36,45 $\pm 1,34$	24,55 $\pm 0,95$	17,71 $\pm 0,94$	10,26 $\pm 1,35$	5,30 $\pm 0,73$	3,11 $\pm 0,46$	0,73 $\pm 0,16$	4,92 $\pm 0,71$	0,45 $\pm 0,09$	0,13 $\pm 0,04$
27-ene-04	36,75 $\pm 1,38$	24,05 $\pm 0,87$	16,84 $\pm 0,66$	9,45 $\pm 0,98$	4,69 $\pm 0,59$	2,66 $\pm 0,30$	0,51 $\pm 0,11$	4,31 $\pm 0,55$	0,47 $\pm 0,06$	0,13 $\pm 0,03$
25-feb-04	37,32 $\pm 1,66$	24,81 $\pm 1,18$	17,62 $\pm 1,05$	10,47 $\pm 1,40$	5,33 $\pm 0,80$	2,62 $\pm 0,44$	0,47 $\pm 0,47$	4,90 $\pm 0,77$	0,47 $\pm 0,07$	0,10 $\pm 0,03$
24-mar-04	36,30 $\pm 1,68$	23,94 $\pm 0,95$	17,07 $\pm 0,95$	9,39 $\pm 1,30$	5,00 $\pm 0,70$	2,46 $\pm 0,40$	0,42 $\pm 0,16$	4,61 $\pm 0,67$	0,47 $\pm 0,08$	0,10 $\pm 0,04$
20-abr-04	35,14 $\pm 2,44$	23,45 $\pm 1,68$	17,12 $\pm 1,25$	9,41 $\pm 2,02$	4,98 $\pm 1,07$	2,10 $\pm 0,36$	0,30 $\pm 0,09$	4,59 $\pm 1,04$	0,39 $\pm 0,07$	0,07 $\pm 0,02$
2-jun-04	33,91 $\pm 1,73$	22,37 $\pm 1,19$	16,11 $\pm 0,87$	7,42 $\pm 1,09$	3,87 $\pm 0,62$	2,39 $\pm 0,41$	0,50 $\pm 0,11$	3,54 $\pm 0,39$	0,51 $\pm 0,09$	0,12 $\pm 0,03$
24-jun-04	33,87 $\pm 1,64$	22,66 $\pm 1,03$	16,53 $\pm 0,88$	8,00 $\pm 1,20$	4,21 $\pm 0,59$	2,83 $\pm 0,34$	0,61 $\pm 0,12$	3,91 $\pm 0,57$	0,57 $\pm 0,07$	0,13 $\pm 0,02$
3-ago-04	37,05 $\pm 1,73$	24,72 $\pm 1,01$	18,04 $\pm 0,99$	11,11 $\pm 1,50$	5,73 $\pm 0,81$	3,48 $\pm 0,66$	0,78 $\pm 0,20$	5,31 $\pm 0,79$	0,70 $\pm 0,12$	0,20 $\pm 0,05$
3-sep-04	33,77 $\pm 1,55$	22,60 $\pm 1,14$	16,49 $\pm 1,00$	8,41 $\pm 1,28$	4,30 $\pm 0,75$	2,73 $\pm 0,41$	0,61 $\pm 0,16$	4,05 $\pm 0,73$	0,59 $\pm 0,08$	0,17 $\pm 0,05$
15-oct-04	38,54 $\pm 2,14$	25,29 $\pm 1,63$	17,90 $\pm 1,25$	11,19 $\pm 1,90$	5,46 $\pm 0,97$	3,32 $\pm 0,97$	0,64 $\pm 0,26$	5,11 $\pm 0,94$	0,65 $\pm 0,23$	0,16 $\pm 0,09$
16-nov-04	35,40 $\pm 1,89$	23,74 $\pm 1,28$	17,15 $\pm 0,83$	9,02 $\pm 2,16$	4,83 $\pm 0,74$	2,79 $\pm 0,47$	0,55 $\pm 0,15$	4,53 $\pm 0,64$	0,61 $\pm 0,10$	0,15 $\pm 0,04$
14-dic-04	35,52 $\pm 1,98$	23,46 $\pm 1,14$	17,01 $\pm 0,90$	8,88 $\pm 1,88$	4,68 $\pm 0,79$	3,20 $\pm 0,73$	0,53 $\pm 0,15$	4,40 $\pm 0,75$	0,54 $\pm 0,10$	0,14 $\pm 0,04$
14-ene-05	36,17 $\pm 1,81$	24,23 $\pm 0,95$	17,42 $\pm 1,03$	10,04 $\pm 1,47$	5,33 $\pm 0,74$	2,78 $\pm 0,38$	0,59 $\pm 0,17$	5,02 $\pm 0,73$	0,54 $\pm 0,12$	0,15 $\pm 0,05$
10-feb-05	34,13 $\pm 1,48$	22,57 $\pm 1,05$	16,45 $\pm 0,82$	8,69 $\pm 1,25$	4,43 $\pm 0,71$	2,08 $\pm 0,37$	0,40 $\pm 0,11$	4,18 $\pm 0,67$	0,40 $\pm 0,07$	0,10 $\pm 0,03$
10-mar-05	34,21 $\pm 1,47$	22,80 $\pm 1,10$	16,60 $\pm 0,85$	8,14 $\pm 1,45$	4,22 $\pm 0,61$	1,94 $\pm 0,33$	0,32 $\pm 0,12$	3,97 $\pm 0,59$	0,37 $\pm 0,10$	0,07 $\pm 0,03$
7-abr-05	34,07 $\pm 1,49$	22,42 $\pm 0,92$	16,18 $\pm 0,95$	8,17 $\pm 1,09$	4,09 $\pm 0,59$	2,01 $\pm 0,36$	0,38 $\pm 0,10$	3,81 $\pm 0,57$	0,45 $\pm 0,08$	0,13 $\pm 0,03$
10-may-05	34,35 $\pm 1,65$	22,85 $\pm 1,04$	16,42 $\pm 0,87$	8,56 $\pm 1,07$	4,35 $\pm 0,60$	2,32 $\pm 0,38$	0,43 $\pm 0,12$	4,12 $\pm 0,59$	0,44 $\pm 0,07$	0,10 $\pm 0,03$

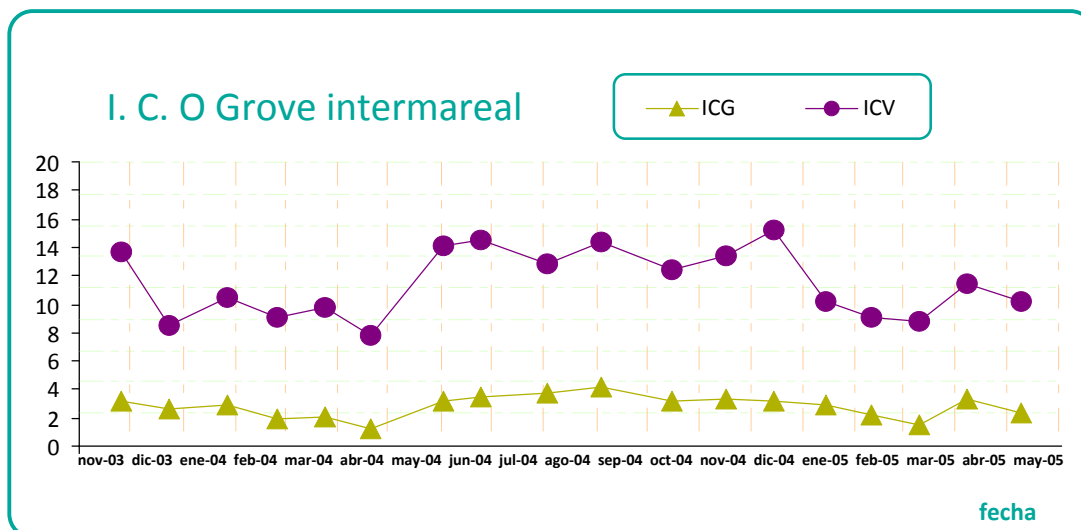


FIGURA 3.9: Índice de Condición gonadal (ICG) y visceral (ICV) de *V. pullastra* en la población de O Grove intermareal.

3.3.2.4 COMPARATIVA ENTRE POBLACIONES

En la figura 3.10 se muestran los resultados de la comparación entre el Índice de Condición entre las tres poblaciones agrupado por estaciones del año.

Durante el otoño e invierno, cuando el Índice de Condición gonadal está más alto y empieza a decrecer, no hay diferencias significativas entre las poblaciones de Camariñas y O Grove submareal, aunque sí hay diferencias entre estas dos poblaciones y la de O Grove intermareal, ésta última con menores valores. El Índice de Condición visceral se comporta de igual manera que el gonadal durante el otoño y el invierno.

En la primavera se encuentran los valores más bajos, no habiendo diferencias significativas entre los valores del Índice de Condición gonadal de Camariñas y O Grove intermareal; los valores de O Grove submareal son significativamente mayores a los de las otras dos poblaciones. El Índice de Condición visceral es significativamente distinto en las tres poblaciones, encontrándose el mayor valor en la población de O Grove submareal y el menor en Camariñas.

Durante el verano, cuando se aprecia un ascenso en los valores, ambos índices se comportan de distinta manera, mientras que el gonadal es significativamente mayor

en la población de Camariñas con respecto a las otras dos, el valor del Índice de Condición visceral es significativamente mayor en la población de O Grove submareal.

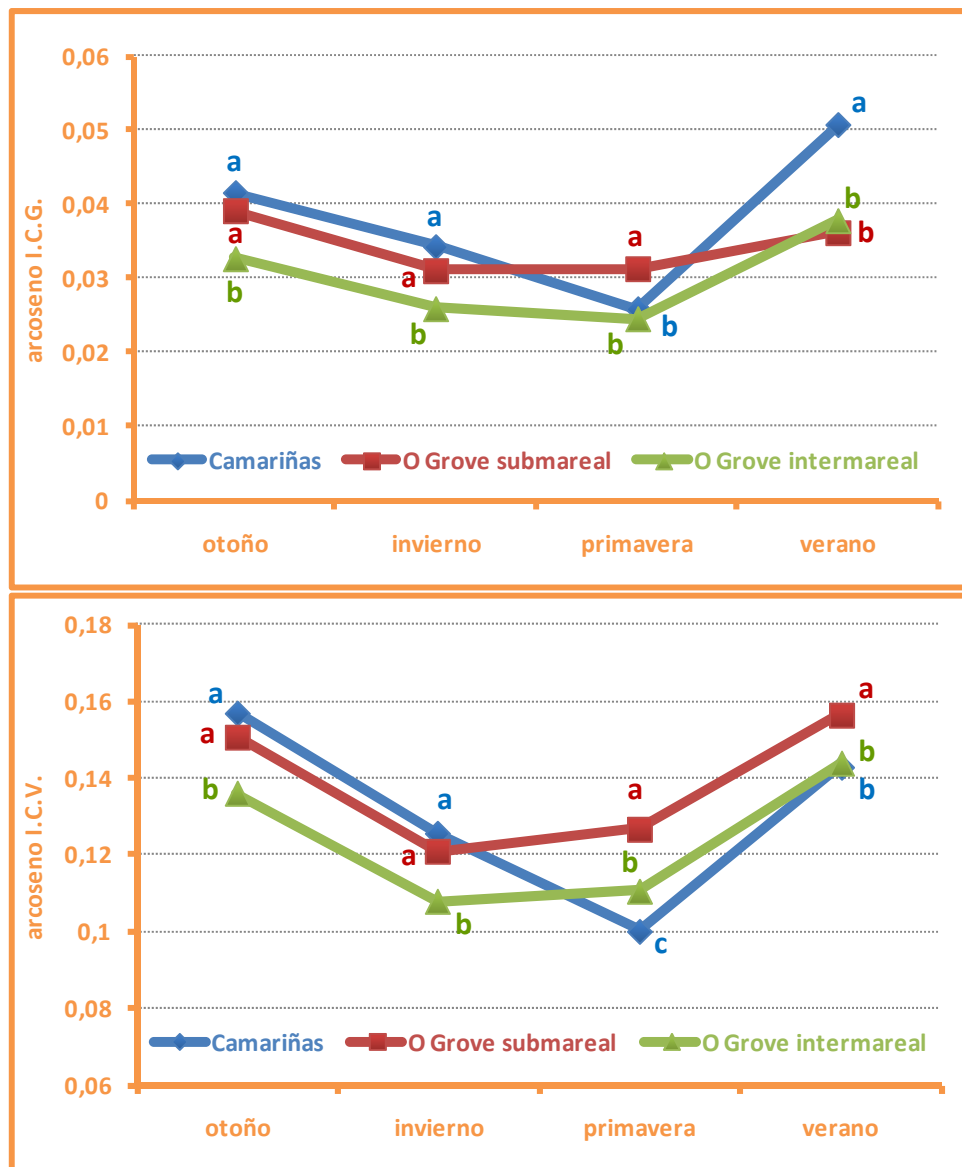


FIGURA 3.10: Índice de Condición gonadal (arriba) y visceral (abajo) en arcseno en las tres poblaciones estudiadas de *V. pullastra*. Diferentes letras representan diferencias significativas entre los valores del Índice de Condición en la misma estación del año.

3.3.3 CICLO GAMETOGÉNICO

3.3.3.1 DESCRIPCIÓN DEL CICLO GAMETOGÉNICO

Para el estudio del ciclo gametogénico se ha utilizado la escala descrita en el apartado de Material y Métodos. En las figuras 3.12, 3.13, 3.14 y 3.15 se muestran varias fotografías de la gónada de individuos de estas poblaciones.

Después de la observación de las preparaciones se ha eliminado de la escala el estadio 0, o de reposo sexual, que en otras especies se caracteriza por la abundancia de tejido conjuntivo, y ausencia de folículos y gametos. En la almeja babosa no se observó esta fase de reposo, en los propios folículos en los que aún se observan gametos residuales se comienzan a formar células vesiculares. Desde este estadio E4 de renovación gonadal se pasa al estadio E1 de inicio de la gametogénesis, en donde, además de las células vesiculares, se observan nuevas líneas germinales.

La inexistencia de un estadio 0 se confirma si tenemos en cuenta que, de los 1.633 individuos examinadas en este estudio, sólo en 12 no se podía diferenciar el sexo. Estos ejemplares presentaban los folículos completamente desarrollados y repletos de células vesiculares, pero sin ninguna célula reproductiva (ovogonias, espermatogonias, ovocitos, etc.) que permitiera diferenciar el sexo (Figura 3.11).

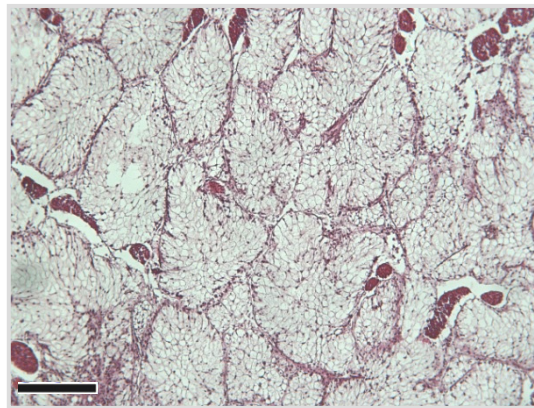


FIGURA 3.11: Individuo indeterminado de *V. pullastra*.

Estos doce individuos indeterminados podrían haber sido clasificados dentro de un estadio 0, pero debido al pequeño porcentaje de individuos que se observaron en este estadio (0,73% de los ejemplares) y a que no se podría hablar de un E0 propiamente dicho, debido a la existencia del tejido folicular totalmente desarrollado, se ha optado por incluir esos individuos en el estadio E1, de inicio de la gametogénesis.

E1. Inicio de la gametogénesis

Los folículos se encuentran repletos de células vesiculares (CV) y se observan paquetes musculares interfoliculares (MUSC). En los machos (Figuras 3.12.1 y 3.12.2) hay abundancia de espermatogonias (ESPG) cercanas a las paredes foliculares (PF) y algunos espermatocitos (ESPC) hacia el interior. En las hembras (Figuras 3.12.3 y 3.12.4) hay abundancia de ovogonias (OVG) en las paredes de los folículos y algunos ovocitos en el interior que empiezan a acumular vitelo. Es frecuente encontrar ovocitos residuales no atrésicos (OVR).

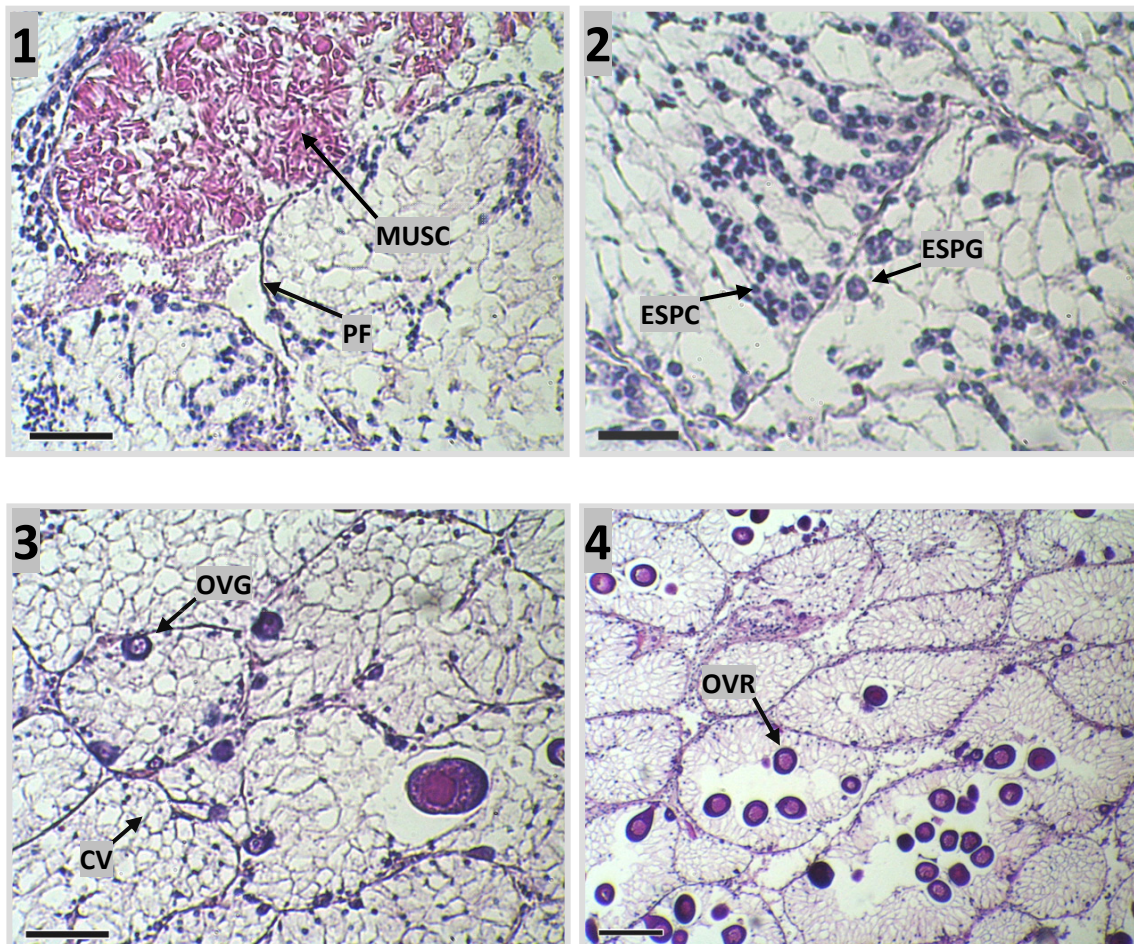


FIGURA 3.12: Imágenes de microscopía óptica de *V. pullastra* en estadio E1 de inicio de la gametogénesis. 1: Macho, MUSC (músculo), PF (pared folicular). 2: Macho, ESGP (espermatogonia), ESPC (espermatocito). 3: Hembra, OVG (ovogonia), CV (célula vesicular). 4: Hembra, OVR (ovocito residual). Barras de escala fotos 1 y 3: 50 μ m; foto 2: 25 μ m; foto 4: 100 μ m.

3. Ciclo reproductivo

E2. Gametogénesis avanzada

En este estadio los machos (Figuras 3.13.5 y 3.13.6) presentan numerosas series gametogénicas ocupando casi la totalidad del folículo (SG); en algunos ya se empiezan a observar espermatozoides hacia el interior (ESPZ). En las hembras (Figuras 3.13.7 y 3.13.8) es frecuente observar abundantes ovocitos previtelogénicos, ovocitos pedunculados (OVPE) e incluso algún ovocito maduro (OVC). Durante este estadio se siguen observando algunas células vesiculares.

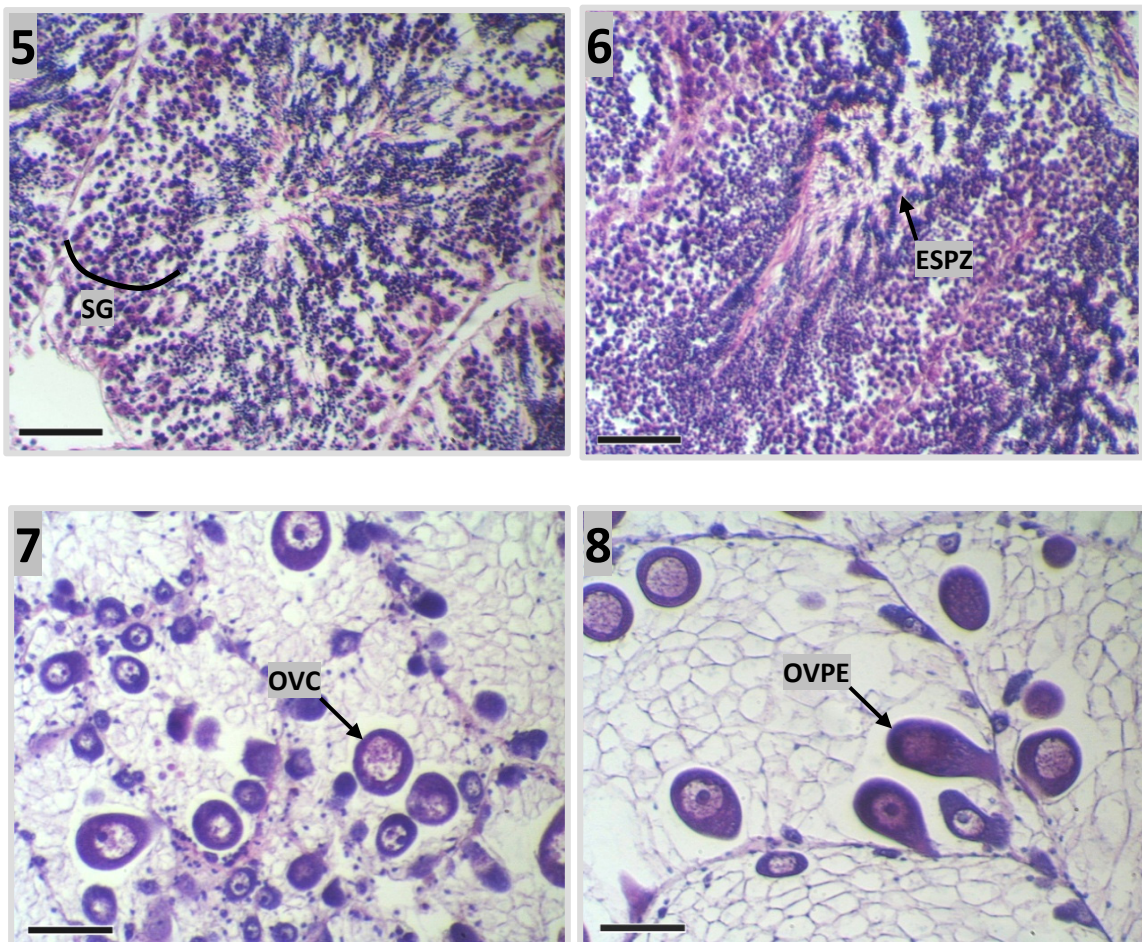


FIGURA 3.13: Imágenes de microscopía óptica de *V. pullastra* en estadio E2 de gametogénesis avanzada. 5: Macho, SG (series gametogénicas). 6: Macho, ESPZ (espermatozoide). 7: Hembra, OVC (ovocito). 8: Hembra, OVPE (ovocito pedunculado). Barras de escala 50 µm.

E3. Madurez y puesta

Los individuos macho (Figuras 3.14.9 y 3.14.10) presentan los folículos llenos de espermatozoides maduros. En algunos folículos se observan abundantes espermatozoides libres preparados para la puesta y también varias líneas de espermatogonias (ESPG). Las hembras (Figuras 3.14.11 y 3.14.12) presentan abundancia de ovocitos maduros y espacios vacíos de ovocitos ya expulsados (VAC). Se observan también, al igual que los machos, ovogonias en las paredes (OVG). Pueden aparecer algunas células vesiculares hacia las paredes del folículo.

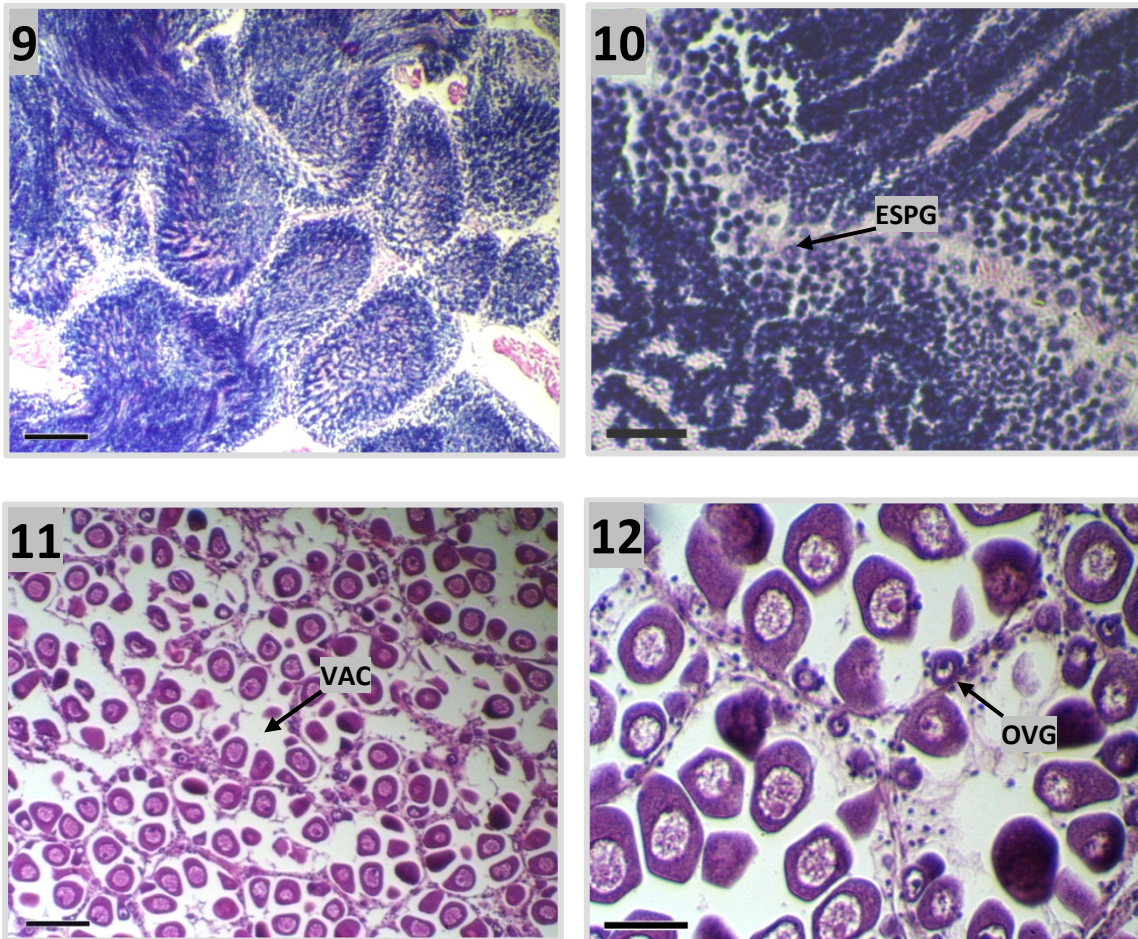


FIGURA 3.14: Imágenes de microscopía óptica de *V. pullastra* en estadio E3 de madurez y puesta. 9: Macho. 10: Macho, ESGP (espermatogonia). 11: Hembra, VAC (espacio vacío). 12: Hembra, OVG (ovogonia). Barras de escala fotos 9 y 11: 100 μm ; foto 10: 25 μm y foto 12: 50 μm .

3. Ciclo reproductivo

E4. Renovación gonadal

Los folículos presentan células vesiculares de nueva formación. En los machos (Figuras 3.15.13 y 3.15.14) los espermatozoides se sitúan en el centro del folículo rodeados de varias líneas de células vesiculares (CV). Se observan gonias repoblando los folículos pero no hay ni espermatogonias ni espermatocitos. En las hembras (Figura 3.15.15), quedan ovocitos residuales no atrésicos (OVC) rodeados de nuevas células vesiculares, no se observan ovocitos previtelogénicos. En algún caso (Figura 3.15.16) se puede encontrar alguna pequeña zona de tejido conjuntivo organizándose en folículos (CONJ).

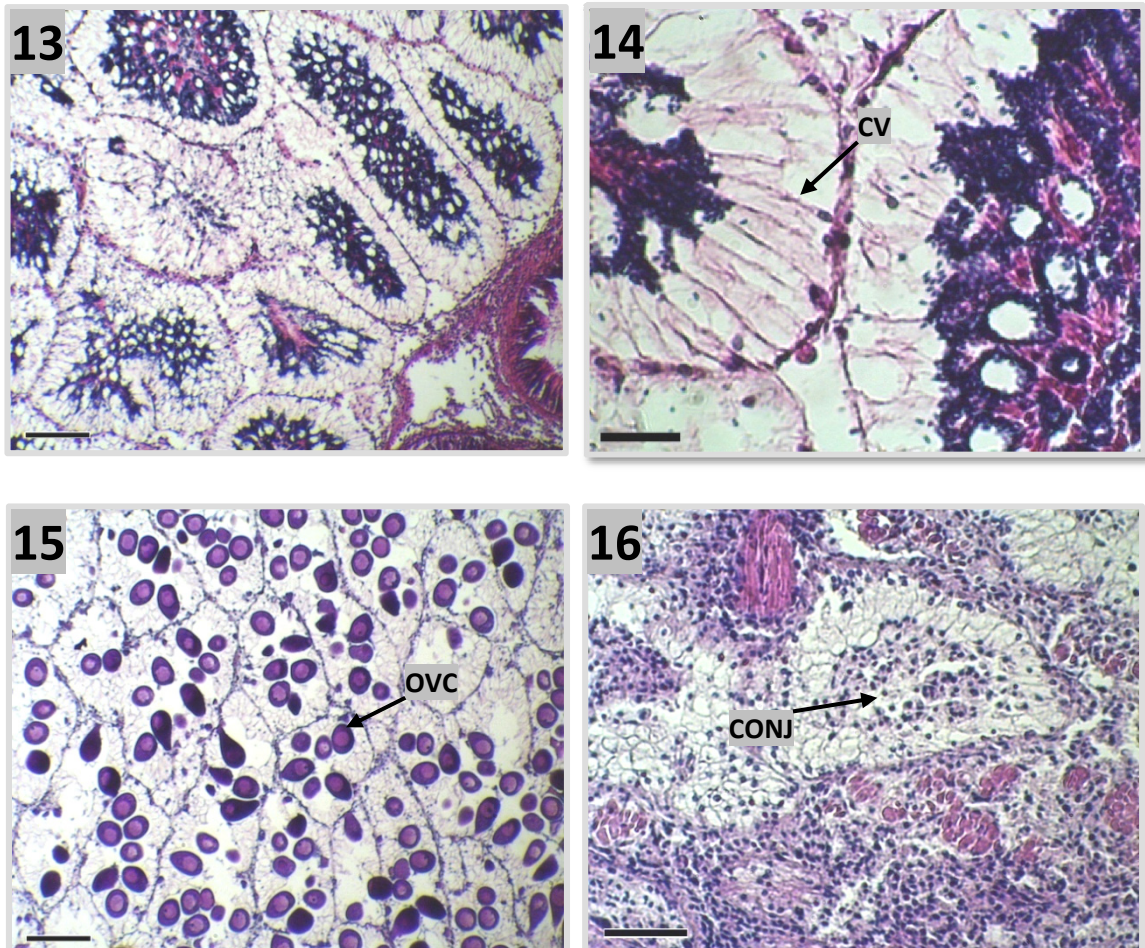


FIGURA 3.15: Imágenes de microscopía óptica de *V. pullastra* en estadio E4 de renovación gonadal. 13: Macho. 14: Macho, CV (célula vesicular). 15: Hembra, OVC (ovocito). 16: Porción de gónada invadida por tejido conjuntivo, CONJ. Barras de escala 100 μ m.

Es frecuente que durante el estadio E4 se observe asincronía folicular dentro de un mismo individuo, apareciendo principalmente durante el período verano-otoño, época de transición entre la madurez y comienzo de un nuevo ciclo de gametogénesis. En esta época encontramos folículos en madurez, folículos que empiezan a formar células vesiculares, e incluso algún folículo en reabsorción. En los individuos en los que se observó esta asincronía se ha optado por asignar aquel estadio que estaba presente en la mayor parte de la gónada. En la figura 3.16 se muestran dos fotografías pertenecientes a un individuo hembra de Camariñas del mes de agosto.

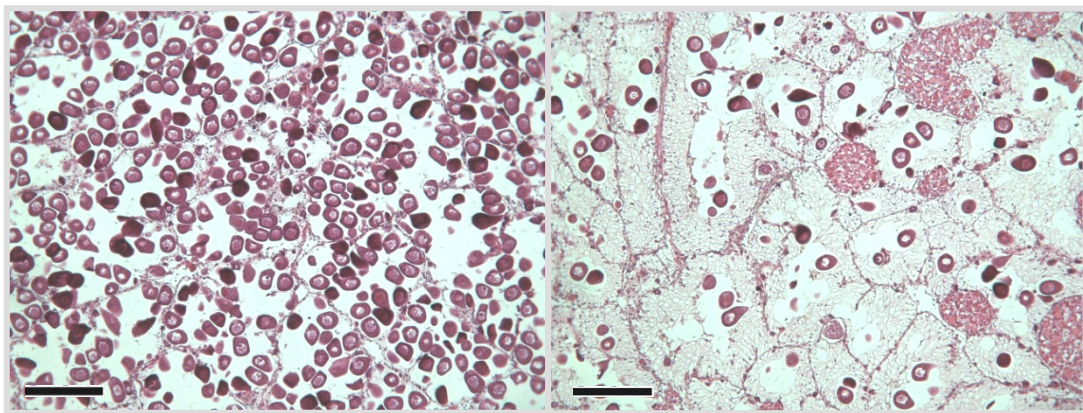


FIGURA 3.16: Dos fotografías pertenecientes al mismo individuo hembra de *V. pullastra*. Izquierda folículos en madurez y puesta, derecha folículos en renovación gonadal. Barras de escala 100 μ m.

Esta asincronía folicular le permite a la almeja babosa que durante el período de transición, hacia el comienzo de una nueva gametogénesis, la gónada presente todavía folículos con ovocitos maduros no atrésicos, y por lo tanto, con capacidad de ser expulsados.

3. Ciclo reproductivo

3.3.3.2 POBLACIÓN DE CAMARIÑAS

Siguiendo la escala descrita anteriormente, en las figuras 3.17 y 3.18 se representa el porcentaje de individuos que se encuentran mensualmente en cada estadio.

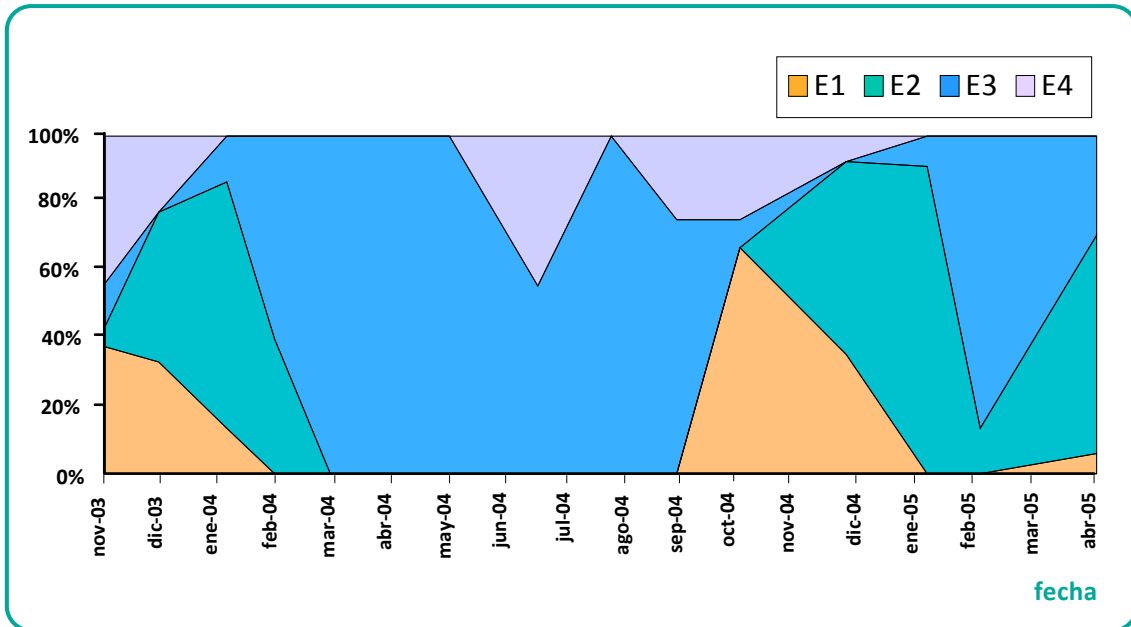


FIGURA 3.17: Ciclo gametogénico de la población de Camariñas de *V. pullastra* durante los meses de estudio. Individuos macho.

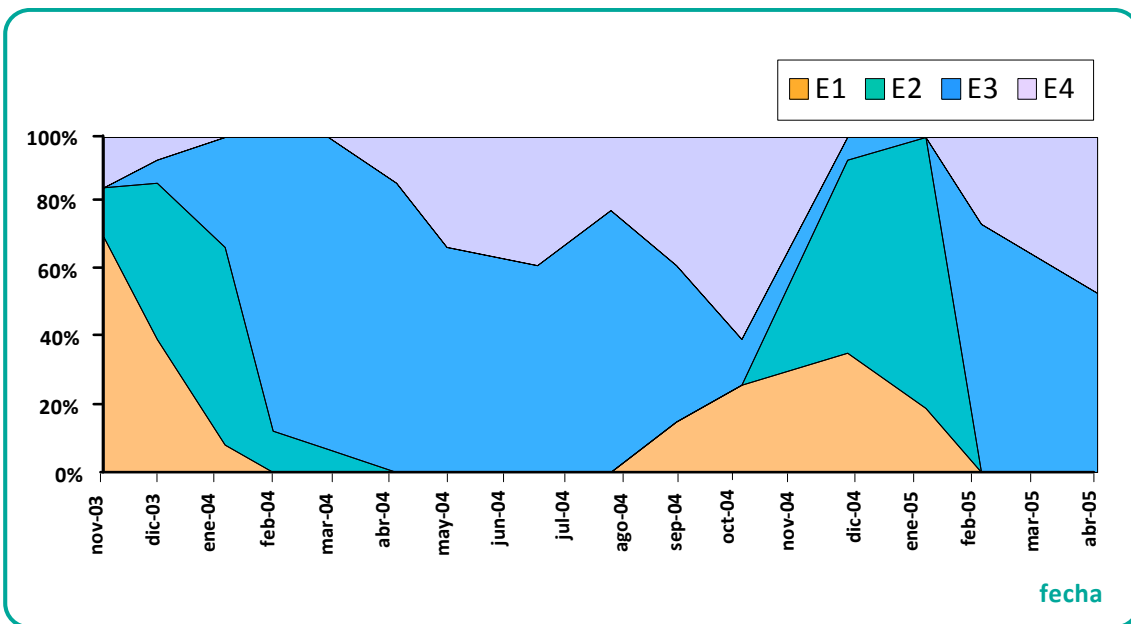


FIGURA 3.18: Ciclo gametogénico de la población de Camariñas de *V. pullastra* durante los meses de estudio. Individuos hembra.

En esta población, durante el otoño encontramos la mayoría de los individuos en el estadio E4 de renovación gonadal y en el estadio E1 de inicio de la gametogénesis. A medida que se va acercando el invierno desaparecen los individuos en estadio E4, y aunque todavía se observan individuos en estadio E1 y algunos ya en estadio E3 de madurez y puesta, la mayoría de los individuos se encuentran en estadio E2 de gametogénesis avanzada.

En Camariñas durante la primavera y verano (desde marzo a septiembre), no se observan individuos en gametogénesis y la mayoría de la población se encuentra en estadio E3 de madurez y puesta. Durante estos meses se observan algunos individuos de la población en estadio E4 de renovación gonadal.

El amplio período de madurez y puesta que presenta esta población se debe a que, en los folículos gonadales se observan nuevas gonias que darán origen, de forma continuada, a nuevos espermatozoides en el caso de los machos, y ovocitos previtelogénicos y pedunculados en el caso de las hembras. Durante este período no se observan células vesiculares en los folículos, por lo que la producción de nuevos gametos se debe realizar a expensas de los nutrientes recién asimilados, y que durante la primavera y verano son abundantes en el medio marino.

A medida que empiezan a disminuir el número de individuos en madurez, aumentan los estadios de renovación gonadal e inicio de la gametogénesis. Ambos estadios se caracterizan por la abundancia de células vesiculares y como se ve reflejada en la composición bioquímica (se muestra en apartados posteriores), coincide con los mayores contenidos de glucógeno y lípidos en gónada. Estos nutrientes, acumulados durante el verano y el otoño, proporcionan la energía necesaria para la formación de gametos durante el invierno.

Aunque se ha realizado el estudio gametogénico de machos y hembras separadamente, se observa que la evolución del ciclo es igual en ambos sexos.

3. Ciclo reproductivo

3.3.3.3 POBLACIÓN DE O GROVE SUBMAREAL

En las figura 3.19 y 3.20 se muestran los datos obtenidos tras la asignación de un estadio a cada uno de los individuos de la población de O Grove submareal.

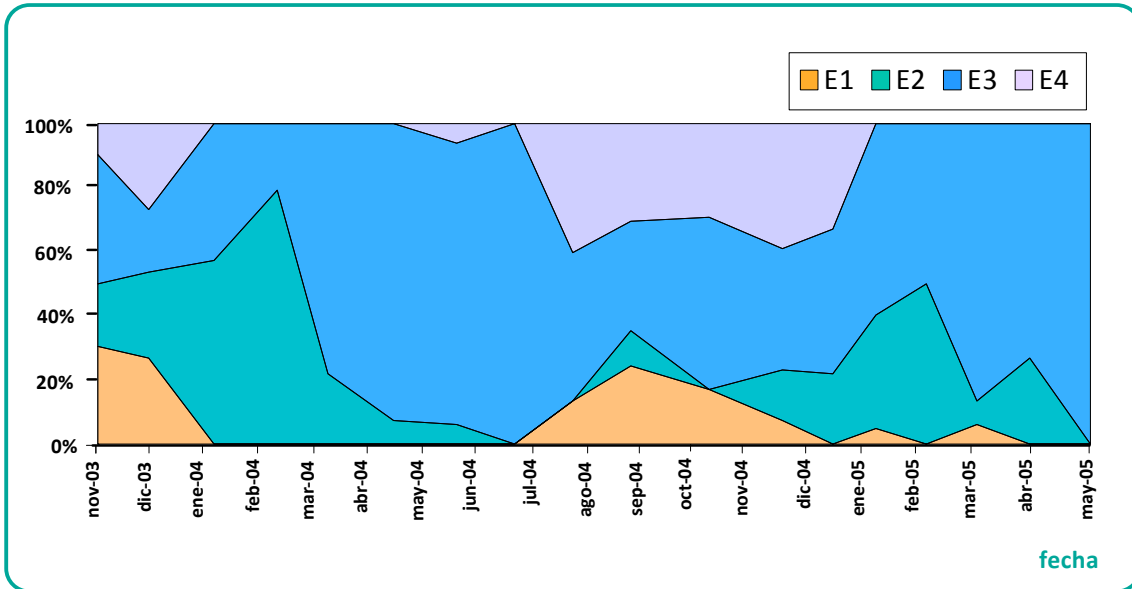


FIGURA 3.19: Ciclo gametogénico de la población de O Grove submareal de *V. pullastra* durante los meses de estudio. Individuos macho.

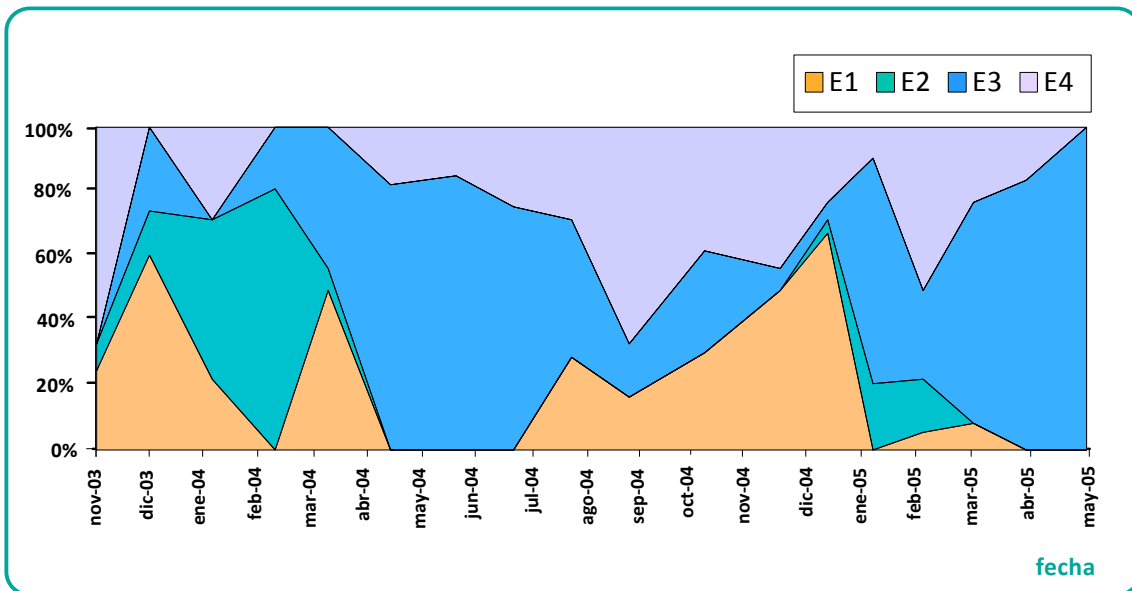


FIGURA 3.20: Ciclo gametogénico de la población de O Grove submareal de *V. pullastra* durante los meses de estudio. Individuos hembra.

A diferencia de la población de Camariñas, en la población de O Grove submareal se encuentra mayor heterogeneidad de estadios en un mismo muestreo. Mientras que en la población de Camariñas la gametogénesis (estadio E1 y E2) se observaba sólo en otoño e invierno, en O Grove submareal, durante el verano y a principios de la primavera, encontramos individuos en estos estadios.

Además, se observa que durante el otoño y el invierno se encuentra mayor número de individuos en estadio E4 (renovación gonadal) y E3 (madurez y puesta) que en la población de Camariñas.

Aunque se observan diferencias en los porcentajes de individuos en cada estadio a lo largo del año, la evolución del ciclo es similar a la población de Camariñas. A partir del verano disminuye el número de individuos maduros y comienza un nuevo ciclo de gametogénesis, aumentando el porcentaje de individuos en los estadios E4 y E1. El desarrollo de la gametogénesis avanza durante los meses de otoño e invierno hasta el mes de abril, donde se observan la mayoría de los individuos en madurez.

En ambos sexos se encuentra heterogeneidad de estadios a lo largo del año, siendo la evolución del ciclo similar en machos y hembras.

3.3.3.4 POBLACIÓN DE O GROVE INTERMAREAL

En la población intermareal de O Grove se encuentran diferencias con respecto a la población submareal, puesto que en la primera se encuentra menor proporción de individuos en madurez a lo largo del año.

En las figuras 3.21 y 3.22 se observa la evolución de los estadios en los ejemplares de O Grove intermareal.

3. Ciclo reproductivo

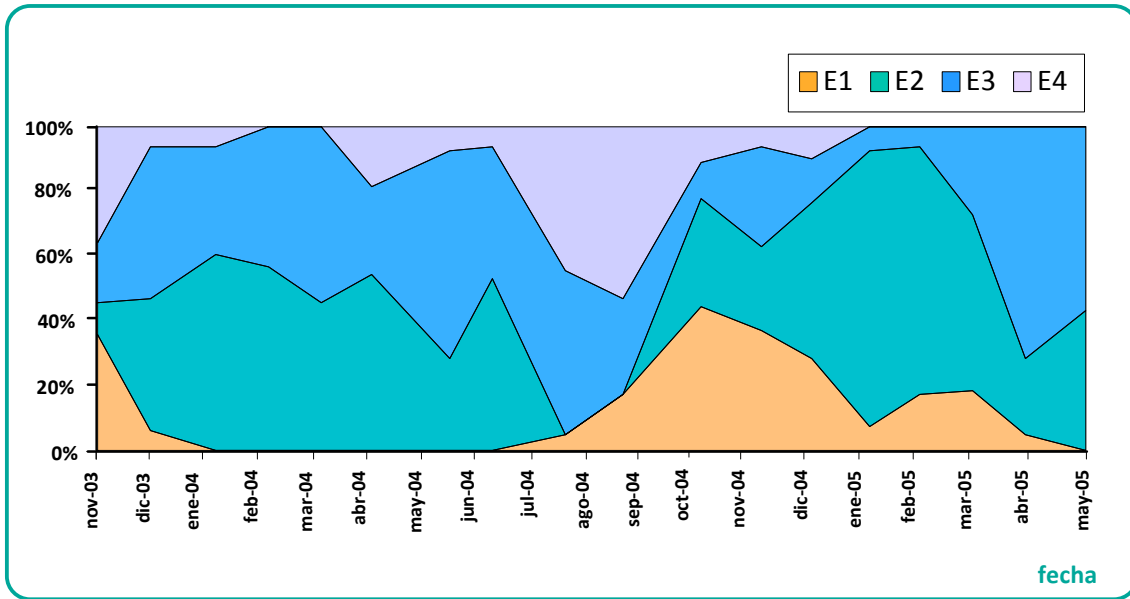


FIGURA 3.21: Ciclo gametogénico de *V. pullastra* en la población de O Grove intermareal. Individuos macho.

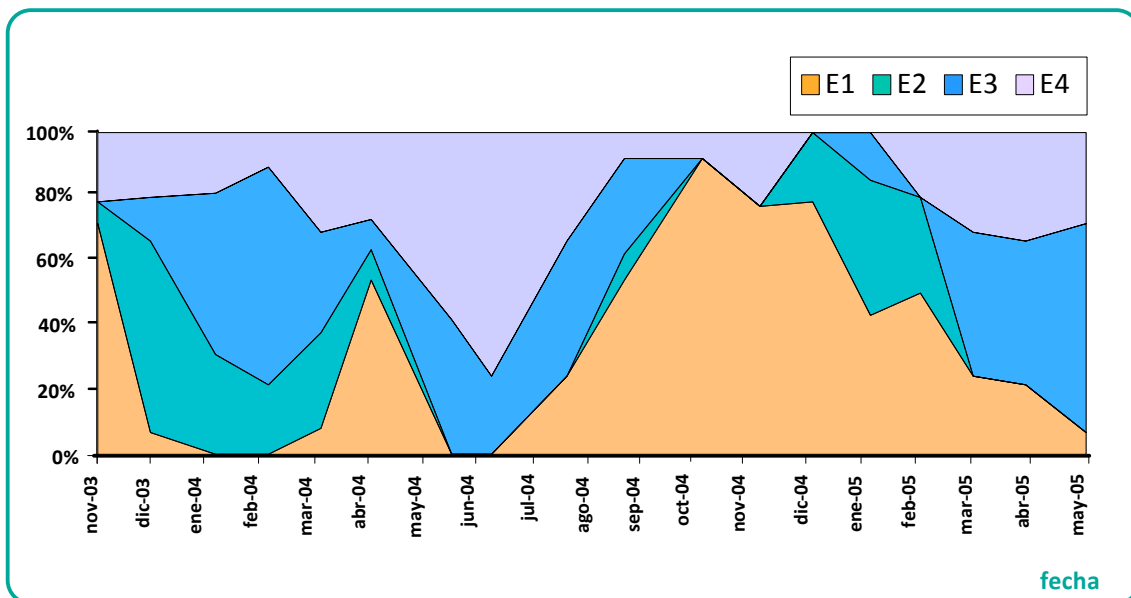


FIGURA 3.22: Ciclo gametogénico de *V. pullastra* en la población de O Grove intermareal. Individuos hembra.

Durante el otoño y el invierno la mayoría de la población intermareal de O Grove se encuentra en gametogénesis (estadios E1 y E2), observando pocos individuos en E3 y E4 (madurez y renovación gonadal). Durante la primavera se continúa observando que la mitad de la población sigue en gametogénesis, pero la otra mitad se encuentra ya en madurez y renovación gonadal.

Entre los meses de mayo y agosto se observa el mayor porcentaje de individuos en madurez en esta población. A partir de este momento la población comienza un nuevo ciclo de gametogénesis.

En ambos sexos en la población intermareal se observa mayor porcentaje de individuos en estadio E1 y E2 a lo largo del año que en la población de O Grove submareal. También dentro de O Grove intermareal, durante el otoño se encuentra mayor porcentaje de individuos en inicio de la gametogénesis (E1) en las hembras que en los machos.

3.3.3.5 SEX-RATIO

En la siguiente tabla se muestra el número de individuos macho, hembra e indiferenciados encontrados en las tres poblaciones durante todos los muestreos.

TABLA III.4: Número y porcentaje de individuos macho, hembra e indeterminados en las tres poblaciones de *V. pullastra* estudiadas.

	Machos	Hembras	Indeterminados	Total
Camariñas	258 (53,2%)	223 (46%)	4 (0,8%)	485
O Grove submareal	333 (53,2%)	291 (46,5%)	2 (0,3%)	626
O Grove intermareal	412 (55,9%)	319 (43,3%)	6 (0,8%)	737

En la población de Camariñas se encontró una proporción machos:hembras de 1,15:1; no desviándose significativamente de una proporción 1:1 ($\chi^2=2,55$; g.l.=1; $p>0,05$). En O Grove submareal la proporción fue de 1,14:1; no desviándose tampoco de una proporción 1:1 ($\chi^2=2,83$; g.l.=1; $p>0,05$). En la población de O Grove intermareal se encontró una relación machos:hembras de 1,29:1; desviándose significativamente de una proporción 1:1 ($\chi^2=11,83$; g.l.=1; $p=0,001$), encontrando más machos que hembras.

3.3.4 COMPOSICIÓN BIOQUÍMICA

Se muestran a continuación los datos obtenidos tras el análisis del contenido en glucógeno, proteínas y lípidos (en mg/g peso seco). Se analizó (por separado machos y hembras) la gónada y el resto del individuo, es decir, la vianda menos la gónada. En las gráficas se omiten los datos de desviación estándar para hacerlas más legibles, ya que en ningún caso la desviación supera el 10% de la media.

3.3.4.1 GLUCÓGENO

En la figura 3.23 se representa la evolución del glucógeno a lo largo del año. En las tres poblaciones la cantidad de glucógeno en gónada disminuye progresivamente a partir de los meses de noviembre y diciembre de 2003. En el mes de abril se encuentra el mínimo de glucógeno en las poblaciones de Camariñas y O Grove submareal. En O Grove intermareal se llega al mínimo en el mes de enero y se mantiene hasta el mes de abril.

Los valores mínimos de glucógeno coinciden con el momento en el que en las tres poblaciones se encuentra mayor porcentaje de individuos en madurez y puesta. A partir del mes de abril comienzan a aparecer individuos en estadio E4 de renovación gonadal, estadio de formación de nuevas células vesiculares, coincidiendo con un incremento de glucógeno en gónada.

Los valores del contenido de glucógeno en gónada aumentan durante la primavera para alcanzar el máximo durante los meses de octubre y noviembre. Es en este momento cuando se encuentra mayor número de individuos en estadio E4 de renovación gonadal y E1 de inicio de la gametogénesis, en ambos estadios predominan las células vesiculares dentro de los folículos. A medida que avanza la gametogénesis se va consumiendo el glucógeno y la cantidad de glucógeno en gónada vuelve a decrecer hasta encontrar de nuevo los mínimos valores a partir del mes de marzo.

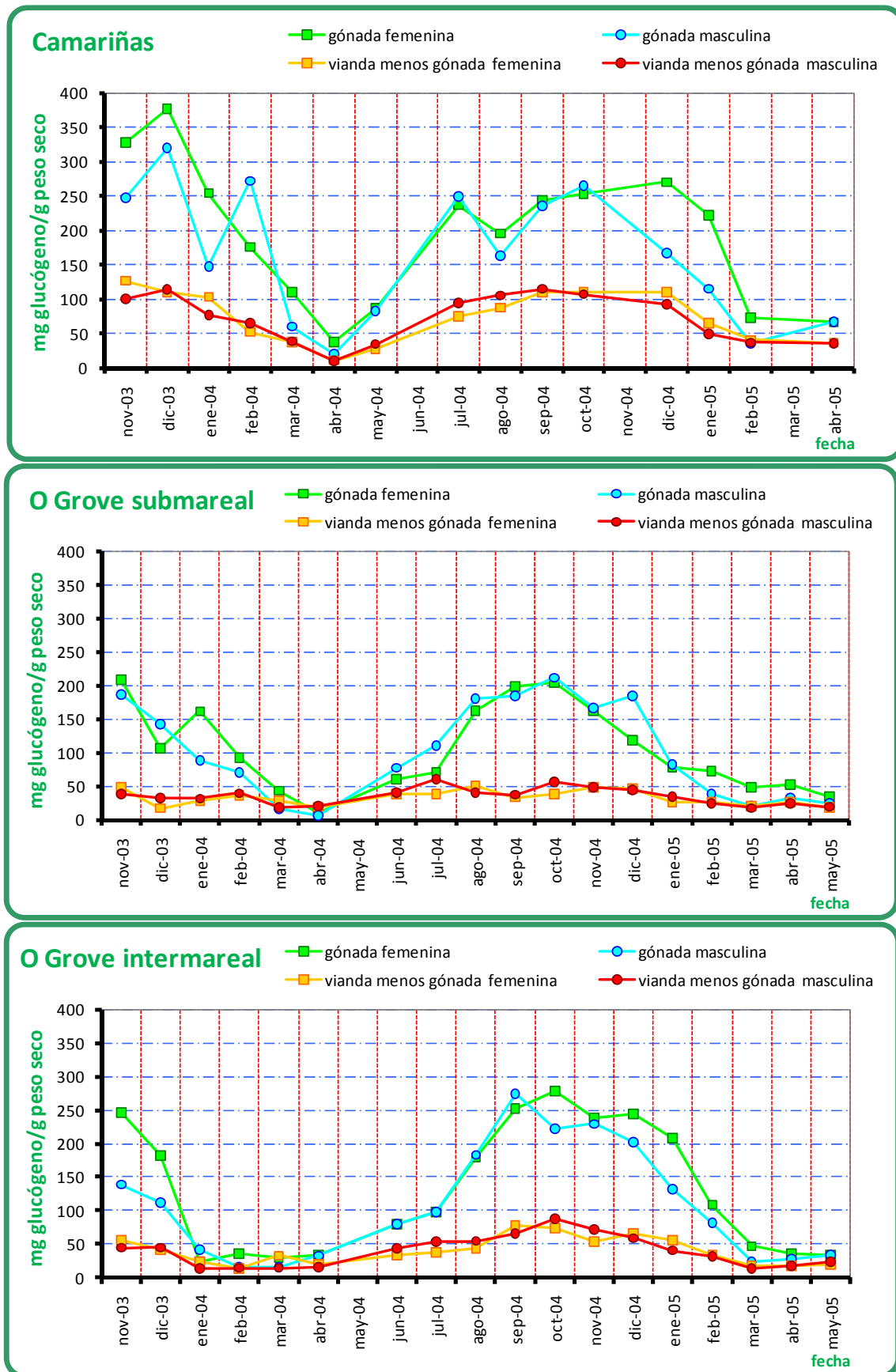


FIGURA 3.23: Variación del glucógeno (mg glucógeno/g peso seco) en *V. pullastra* en las tres poblaciones de estudio.

3. Ciclo reproductivo

En cuanto al contenido en glucógeno en el resto del individuo, ambos sexos poseen una evolución similar. Al igual que el contenido en gónada, los valores descienden entre enero y abril; a partir de este mes se incrementan hasta mantenerse en los mismos valores durante los meses de otoño. La cantidad de glucógeno en gónada oscila entre 10 y 375 mg/g peso seco, siendo superior a la del resto del individuo que varía entre 10 y 125 mg/g peso seco.

En la figura 3.24 se comparan estadísticamente los valores agrupados por estaciones de la cantidad de glucógeno en gónada y en víscera en las tres poblaciones.

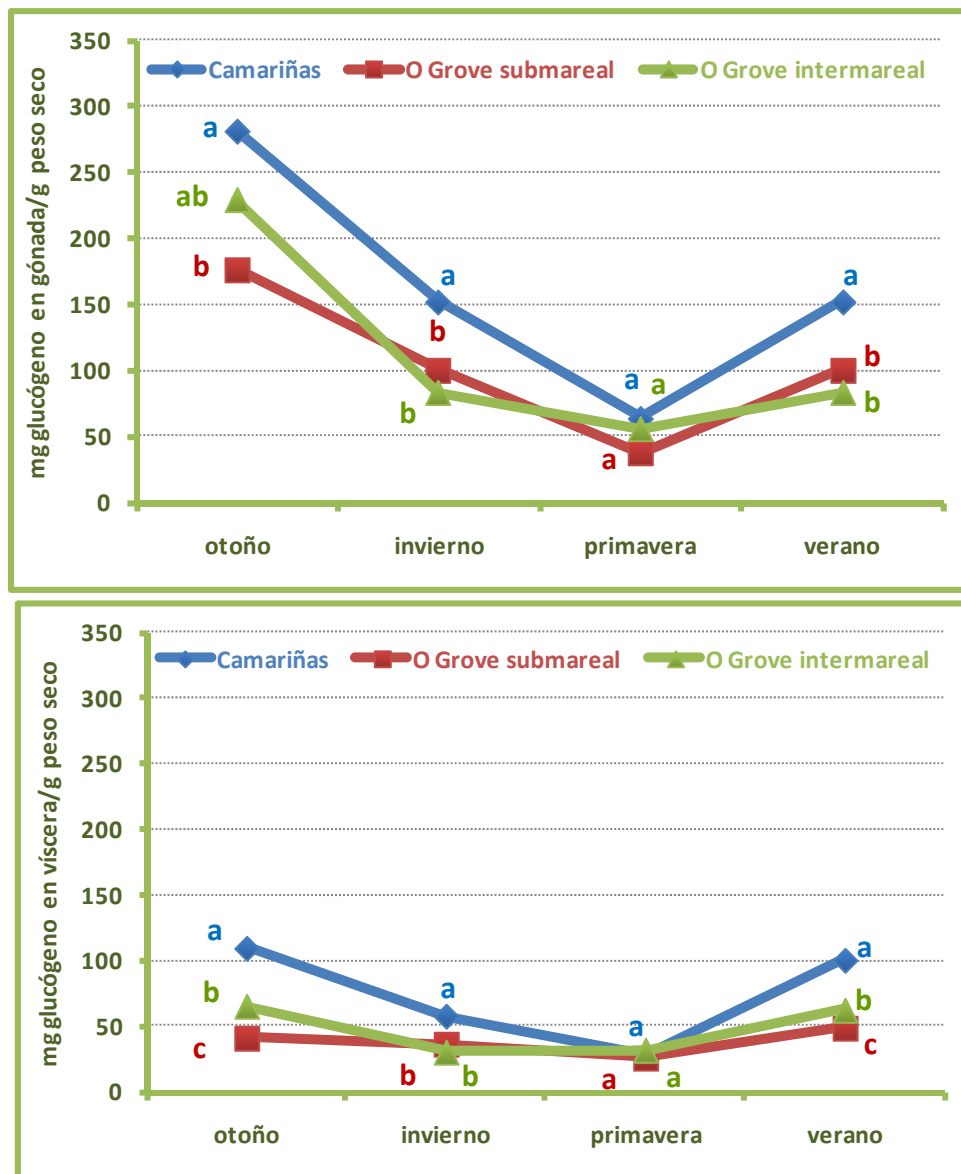


FIGURA 3.24: Cantidad de glucógeno en gónada (arriba) y en víscera (abajo) en mg/g peso seco en las tres poblaciones estudiadas de *V. pullastra*. Diferentes letras representan diferencias significativas entre los valores de la misma estación.

Comparando las poblaciones, se deduce que la población de Camariñas en otoño, invierno y verano acumula significativamente más cantidad de glucógeno en gónada y en víscera que ambas poblaciones de O Grove. En primavera no hay diferencias significativas entre las tres poblaciones.

Entre las dos poblaciones de O Grove no hay diferencias significativas en cuanto a la cantidad de glucógeno en gónada. Sin embargo, en víscera se acumula significativamente más cantidad de glucógeno durante el verano y el otoño en O Grove submareal.

3.3.4.2 PROTEÍNAS

En la figura 3.25 se muestran los datos obtenidos tras la cuantificación de las proteínas. En las tres poblaciones, las proteínas en gónada aumentan paulatinamente desde el mes de noviembre de 2003 hasta los meses de marzo y mayo. Después de este valor máximo en la primavera, los valores de proteína en gónada (de machos y hembras) descienden paulatinamente; encontrándose otra vez un mínimo valor en el otoño.

No se encuentra ninguna relación entre la variación de los contenidos gonadales y la variación del contenido proteico del resto del individuo; puesto que este último varía mensualmente sin ninguna tendencia clara.

Se observa que durante todo el año la cantidad de proteína en gónada es inferior a la del resto del individuo. Los valores del contenido proteico en el resto del individuo oscilan entre 550 y 360 mg/g peso seco, mientras que en gónada los valores se encuentran entre 190 y 450 mg/g peso seco.

3. Ciclo reproductivo

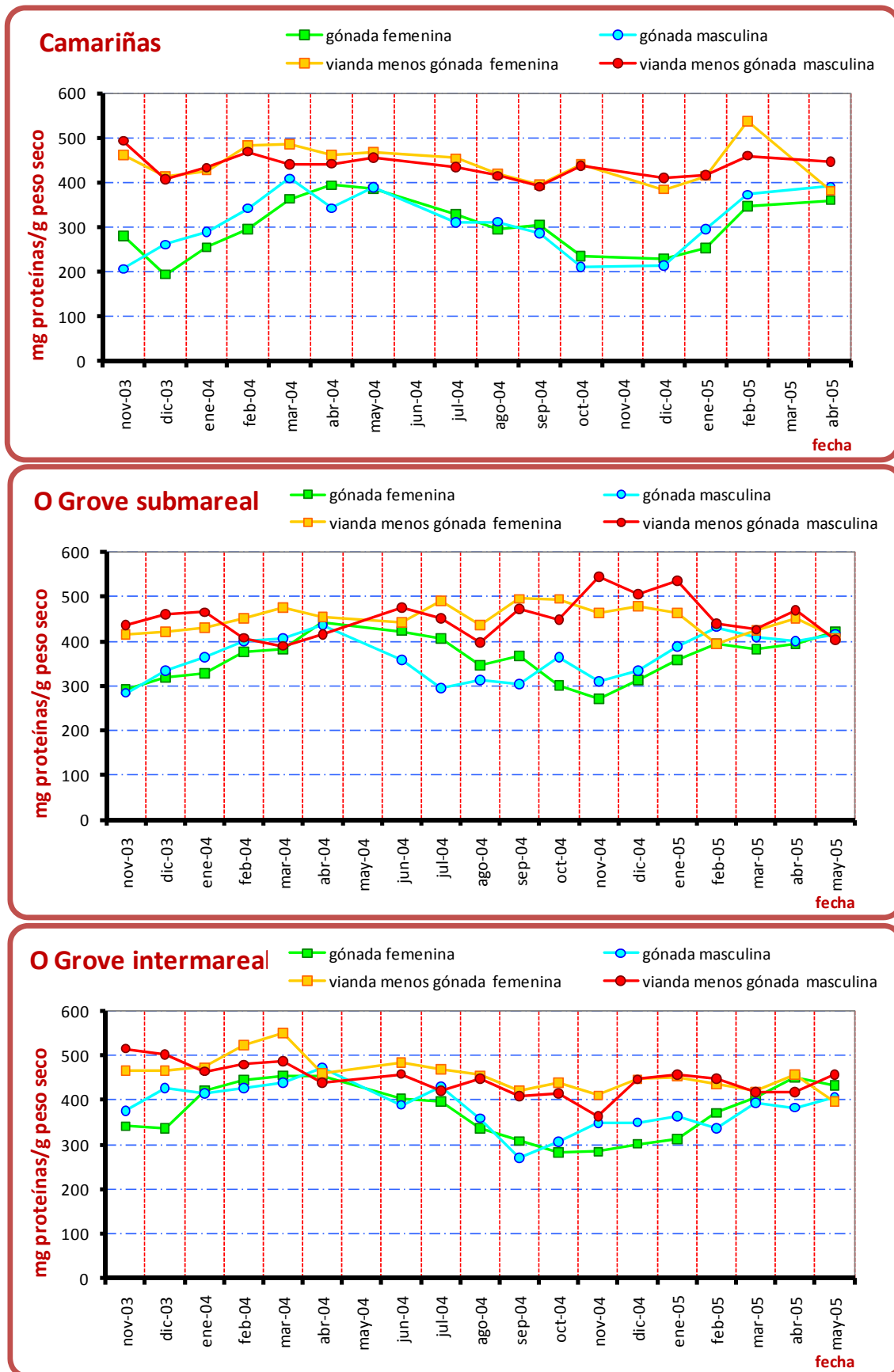


FIGURA 3.25: Evolución de las proteínas totales (en mg/g peso seco) en la población de *V. pullastra* en las tres poblaciones de estudio.

En la figura 3.26 se muestran los valores agrupados por estaciones de la cantidad de proteínas en gónada y en víscera en las tres poblaciones. En las dos poblaciones de O Grove no hay diferencias en cuanto a la cantidad de proteínas en gónada, acumulando significativamente ambas más cantidad que en la población de Camariñas; exceptuando en el verano, cuando en la población de O Grove intermareal no hay diferencias significativas con respecto a la población de Camariñas.

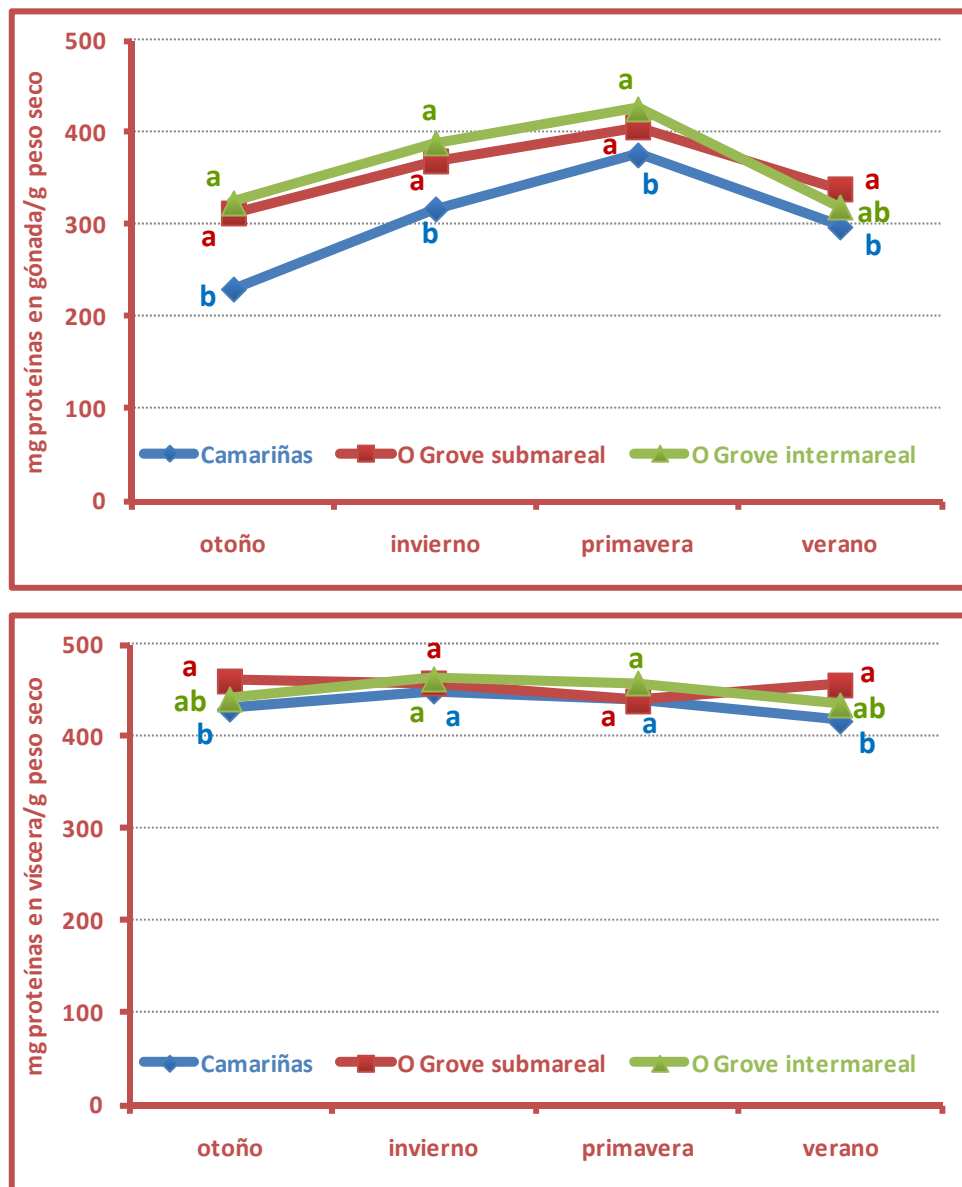


FIGURA 3.26: Cantidad de proteínas en gónada (arriba) y en víscera (abajo) en mg/g peso seco en las tres poblaciones estudiadas de *V. pullastra*. Diferentes letras representan diferencias significativas entre los valores en la misma estación.

3. Ciclo reproductivo

En cuanto a la cantidad de proteínas en víscera, en el invierno y en la primavera no hay diferencias significativas entre las tres poblaciones. En verano y otoño, en O Grove submareal se encuentra significativamente mayor cantidad de proteínas que en Camariñas. En O Grove intermareal no hay diferencias significativas con respecto a las otras dos poblaciones.

3.3.4.3 LÍPIDOS

En la figura 3.27 se representan los valores obtenidos del análisis del contenido de lípidos totales en las tres poblaciones. Se observa en las gráficas que, en general, los contenidos gonadales de lípidos presentan una evolución paralela en ambos sexos; aunque en las hembras con cantidades superiores a los machos. Las hembras presentan entre un 5 y un 10% más lípidos en gónada que los machos.

En Camariñas se halla en ambos sexos un máximo en la cantidad de lípidos en gónada en el mes de enero de 2004 disminuyendo progresivamente hasta mayo; siendo en este mes cuando se encuentra el valor mínimo. Después de mayo los valores se incrementan hasta estabilizarse en los meses de otoño. A partir del mes de diciembre de 2004 la cantidad de lípidos totales en gónada disminuye paulatinamente en ambos sexos.

La evolución temporal de los lípidos presenta en O Grove submareal numerosas oscilaciones, con continuas subidas y bajadas; se observa sin embargo, que durante el otoño e invierno los valores son más altos que durante la primavera.

Al igual que en las otras dos poblaciones, en O Grove intermareal se observa una evolución clara relacionada con el ciclo gametogénico. Desde el mes de noviembre de 2003 los valores descienden hasta el mes de abril, cuando encontramos el mínimo valor, a partir de entonces, los valores se vuelven a recuperar durante el verano, hasta que después de enero de 2005 vuelven a descender.

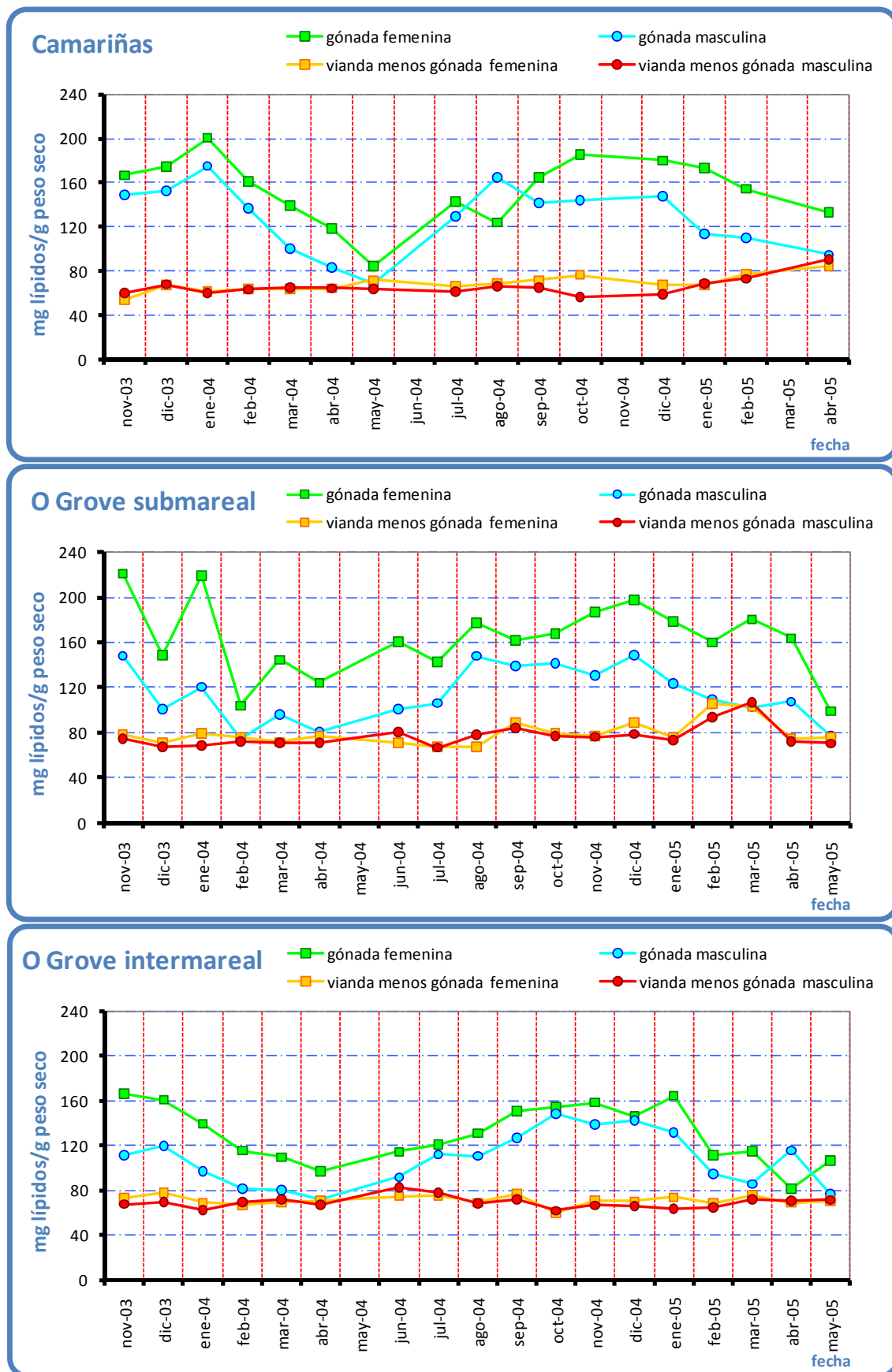


FIGURA 3.27: Representación de la variación de los lípidos totales en mg/g peso seco en la población de *V. pullastra* en las tres poblaciones de estudio.

3. Ciclo reproductivo

En cuanto a la variación de los lípidos totales en el resto del individuo, éstos no presentan ninguna tendencia a diferencia de la gónada. Los valores oscilan entre los 50 y 100 mg/g peso seco, sin diferencia entre sexos. El contenido de lípidos en gónada es superior a la del resto del individuo, variando entre 70 y 220 mg/g peso seco.

En la figura 3.28 se comparan estadísticamente los valores agrupados por estaciones de la cantidad de lípidos en gónada y en víscera en las tres poblaciones.

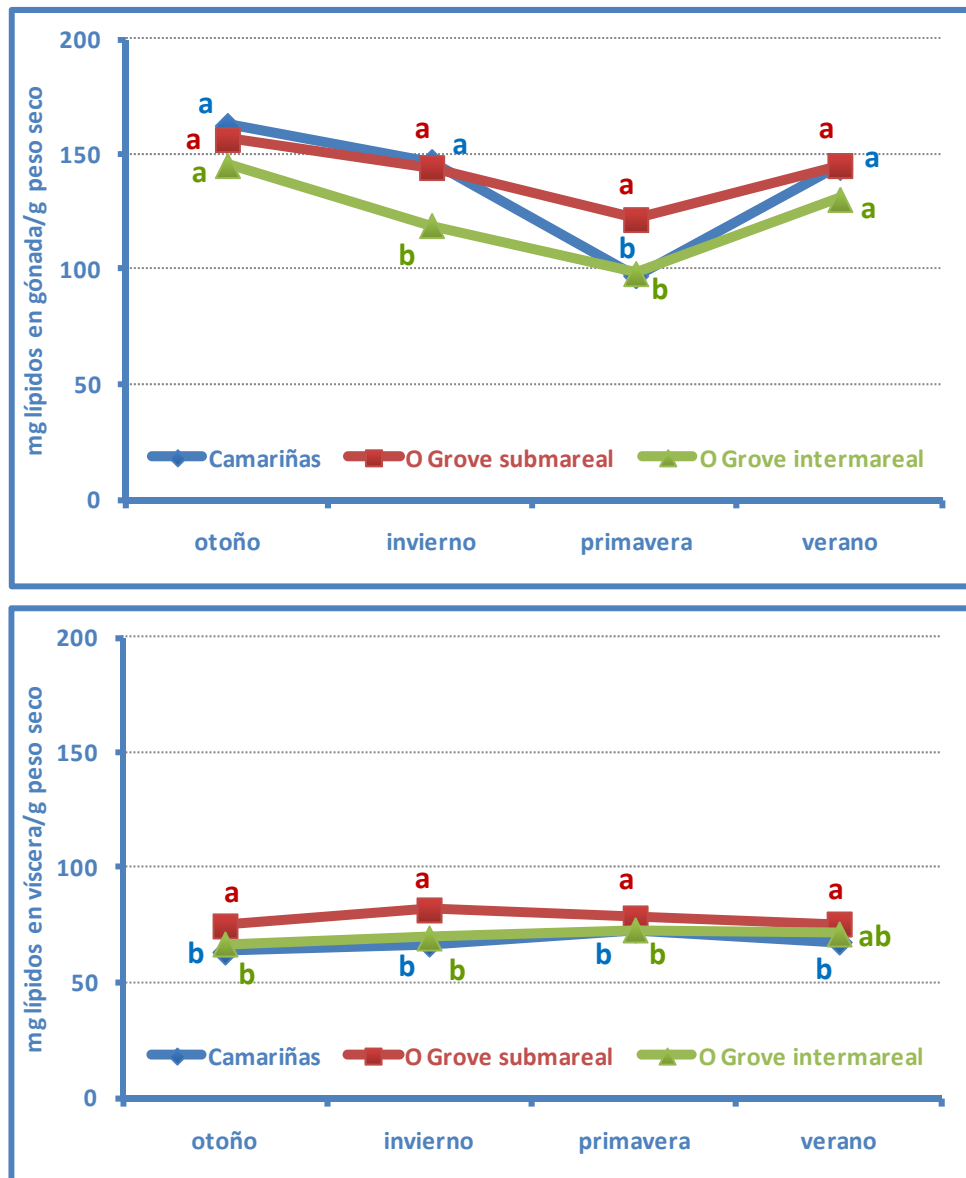


FIGURA 3.28: Cantidad de lípidos en gónada (arriba) y en víscera (abajo) en mg/g peso seco en las tres poblaciones estudiadas de *V. pullastra*. Diferentes letras representan diferencias significativas entre los valores en la misma estación.

Las tres poblaciones acumulan igual cantidad de lípidos en gónada durante el verano y el otoño. En invierno, en O Grove intermareal, se acumula significativamente menor cantidad de lípidos que en las otras dos poblaciones. En primavera hay mayor cantidad de lípidos en gónada en O Grove submareal que en las otras dos poblaciones.

En el resto del individuo se acumula significativamente mayor cantidad de lípidos en la población submareal de O Grove durante los meses de otoño, invierno y primavera con respecto a las otras poblaciones. En verano también acumula más cantidad que la población de Camariñas, aunque no se diferencia significativamente con O Grove intermareal.

3.3.5 EVOLUCIÓN DE LA COMPOSICIÓN BIOQUÍMICA EN RELACIÓN CON EL CICLO GAMETOGÉNICO

A continuación se presentan los datos anteriormente expuestos pero resumidos. Se muestra en cada población los datos conjuntos del ciclo gametogénico de machos y hembras; así como los datos del contenido bioquímico en gónada e Índice de Condición gonadal.

En la población de Camariñas (Figura 3.29), se observa durante los meses de primavera una disminución drástica en la cantidad de glucógeno y lípidos en gónada, coincidiendo con la época en la cual encontramos un número máximo de individuos en estadio de madurez y puesta, y a su vez el mínimo en el Índice de Condición gonadal. Durante los meses de otoño los valores de glucógeno y lípidos en gónada vuelven a aumentar coincidiendo con la aparición de individuos en renovación gonadal con formación de nuevas células vesiculares.

3. Ciclo reproductivo

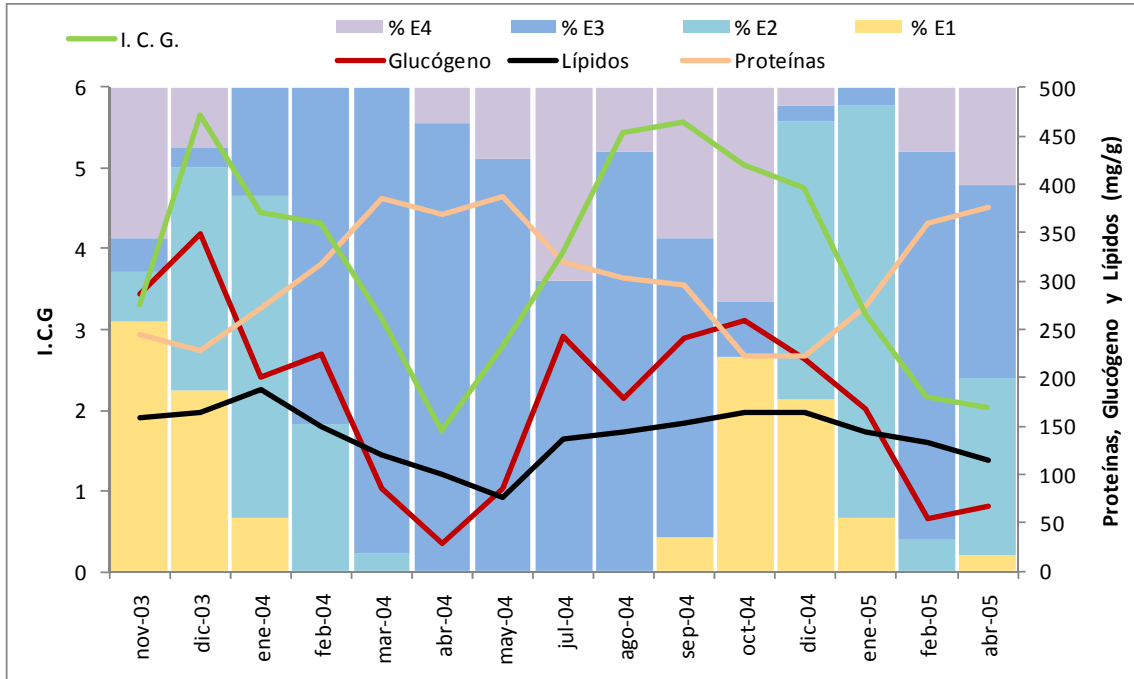


FIGURA 3.29: Representación simplificada del ciclo gametogénico, del Índice de Condición gonadal (I.C.G.) en %, y de la cantidad de glucógeno, proteínas y lípidos totales en mg/g peso seco. Población de Camariñas.

En las figuras 3.30 y 3.31 se muestran las gráficas correspondientes a las poblaciones submareal e intermareal de O Grove.

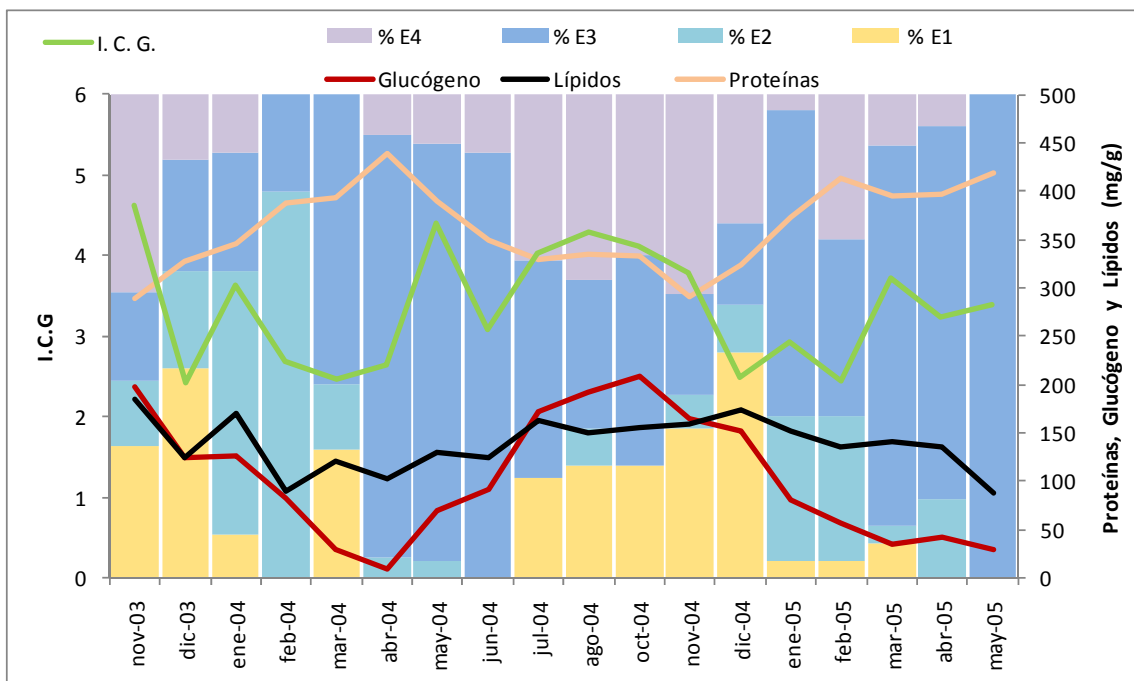


FIGURA 3.30: Representación simplificada del ciclo gametogénico, del Índice de Condición gonadal (I.C.G.) en %, y de la cantidad de glucógeno, proteínas y lípidos totales en mg/g peso seco. Población de O Grove submareal.

Aunque en las tres poblaciones se ha observado un patrón de desarrollo gonadal muy similar, se observa en las dos poblaciones de O Grove mayor heterogeneidad de estadios dentro de un mismo muestreo. En la población de Camariñas, entre los meses de abril y agosto, la totalidad de la población se encuentra en estadio E3 (madurez y puesta) y E4 (renovación gonadal), observando la época de gametogénesis (E1 y E2) en los meses de septiembre a marzo. Sin embargo, en las dos poblaciones de O Grove la época de gametogénesis, estadio E1 (inicio de la gametogénesis) y E2 (gametogénesis avanzada), se prolonga durante más meses en el año. Debido a esto, los valores de glucógeno, lípidos y proteínas en gónada, no alcanzan valores tan altos como en la población de Camariñas.

Dentro de las dos poblaciones de O Grove, en la intermareal encontramos más individuos en gametogénesis y menos en madurez y puesta con respecto a la población submareal.

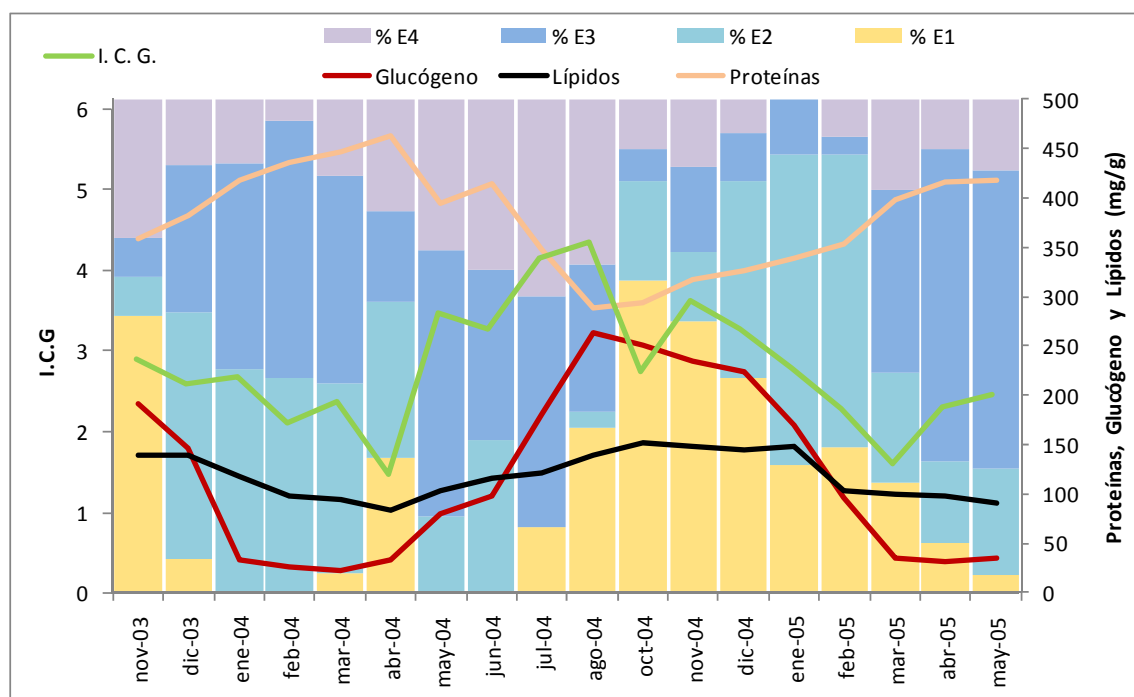


FIGURA 3.31: Representación simplificada del ciclo gametogénico, del Índice de Condición gonadal (I.C.G.) en %, y de la cantidad de glucógeno, proteínas y lípidos totales en mg/g peso seco. Población de O Grove intermareal.

3. Ciclo reproductivo

Se realizó un Análisis de Componentes Principales para discriminar las tendencias de la composición bioquímica con respecto a los estadios gametogénicos y a los Índices de Condición gonadal y visceral de acuerdo con los ejes principales. En las figuras 3.32, 3.33 y 3.34 se representan los resultados.

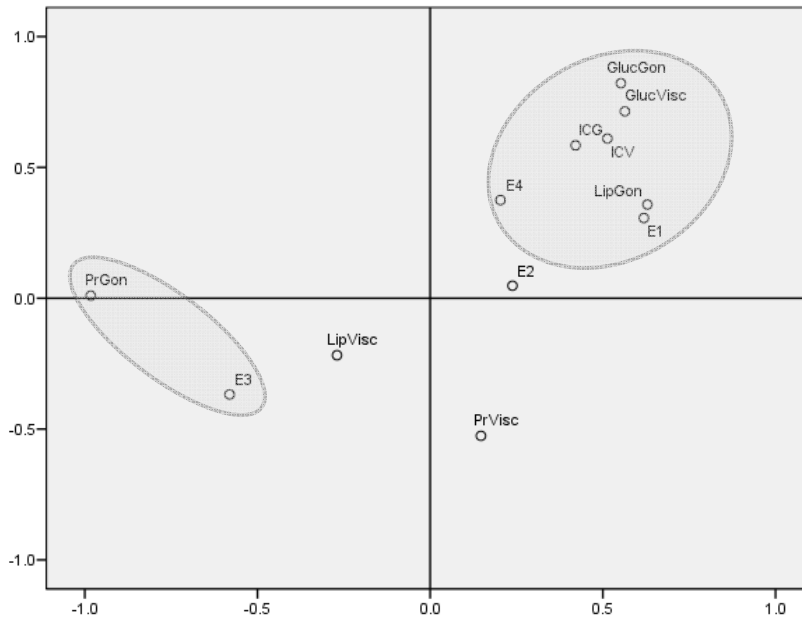


FIGURA 3.32: Análisis de Componentes Principales en la población de Camariñas. ICG: Índice de Condición gonadal; ICV: Índice de Condición visceral; GlucGon: glucógeno en la gónada; GlucVisc: glucógeno en la víscera; PrGon: proteínas en la gónada; PrVisc: proteínas en la víscera; LipGon: lípidos en la gónada; LipVisc: lípidos en la víscera; E1: inicio de la gametogénesis; E2: gametogénesis avanzada; E3: madurez y puesta; E4: renovación gonadal.

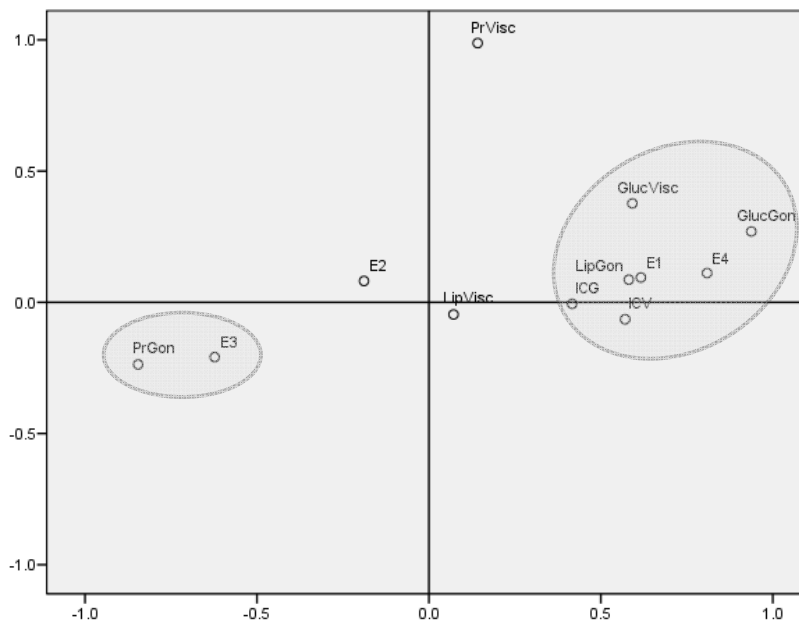


FIGURA 3.33: Análisis de Componentes Principales en la población de O Grove submareal. ICG: Índice de Condición gonadal; ICV: Índice de Condición visceral; GlucGon: glucógeno en la gónada; GlucVisc: glucógeno en la víscera; PrGon: proteínas en la gónada; PrVisc: proteínas en la víscera; LipGon: lípidos en la gónada; LipVisc: lípidos en la víscera; E1: inicio de la gametogénesis; E2: gametogénesis avanzada; E3: madurez y puesta; E4: renovación gonadal.

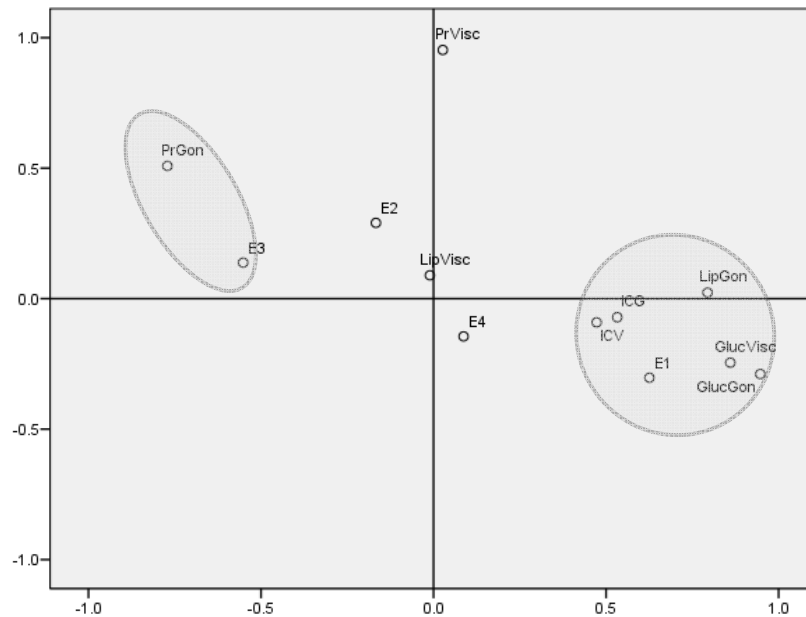


FIGURA 3.34: Análisis de Componentes Principales. Población de O Grove intermareal. ICG: Índice de Condición gonadal; ICV: Índice de Condición visceral; GlucGon: glucógeno en la gónada; GlucVisc: glucógeno en la víscera; PrGon: proteínas en la gónada; PrVisc: proteínas en la víscera; LipGon: lípidos en la gónada; LipVisc: lípidos en la víscera; E1: inicio de la gametogénesis; E2: gametogénesis avanzada; E3: madurez y puesta; E4: renovación gonadal.

Del análisis de los resultados en las tres poblaciones se deduce que ambos Índices de Condición, la cantidad de glucógeno en gónada y en víscera, la cantidad de lípidos en gónada, el porcentaje de individuos en estadio E1 de inicio de la gametogénesis y el porcentaje en E4 de renovación gonadal, tiene un comportamiento similar en cuanto a su variación temporal, indicando que siguen el mismo patrón de evolución a lo largo del año.

Por otro lado, la cantidad de proteínas en gónada presenta la misma evolución temporal que el porcentaje de individuos en estadio E3 de madurez y puesta, siguiendo ambos valores una evolución temporal similar en las tres poblaciones.

La cantidad de proteínas y de lípidos en víscera no tiene un comportamiento similar en cuanto a su variación temporal y a la del resto de componentes, lo que indicaría que su variación no estaría relacionada con la evolución del ciclo gametogénico.

3. Ciclo reproductivo

Se realizó un estudio de correlación entre los distintos componentes bioquímicos y los estadios gametogénicos en las tres poblaciones (Tablas III.5, III.6 y III.7). En las tres poblaciones se observa que la cantidad de glucógeno y lípidos en gónada está positivamente correlacionada, al 99% de confianza, con la aparición de los estadios E4 de renovación gonadal y E1 de inicio de la gametogénesis. A su vez, el glucógeno gonadal está negativamente correlacionado (al 99% de confianza) con la cantidad de proteínas en gónada y con el estadio E3 de maduración gonadal.

En cuanto al contenido bioquímico en la víscera, de los tres componentes, sólo el glucógeno tiene igual comportamiento que en gónada, por lo que parece que su evolución podría estar relacionado con el ciclo gametogénico. Se observa que a mayor cantidad de glucógeno en víscera, hay mayor cantidad de glucógeno y lípidos, y menor cantidad de proteínas en gónada. Así mismo, la cantidad de glucógeno en víscera está relacionado con el estadio gametogénico al 99% de confianza, siendo más abundante durante el estadio E4 y menos durante el E3.

TABLA III.5: Coeficiente de correlación entre los distintos componentes bioquímicos y los estadios gametogénicos en la población de Camariñas. ICG: Índice de Condición gonadal; ICV: Índice de Condición visceral; GlucGon: glucógeno en la gónada; GlucVisc: glucógeno en la víscera; PrGon: proteínas en la gónada; Prvisc: proteínas en la víscera; LipGon: lípidos en la gónada; LipVisc: lípidos en la víscera. Negrita: correlación significativa, * al 95% de confianza, ** al 99% de confianza.

	ICG	ICV	GlucGon	GlucVisc	PrGon	PrVisc	LipGon	LipVisc	E1	E2	E3	E4
ICG	-	0,801**	0,669**	0,808**	-0,437**	-0,416**	0,517**	-0,111	0,329**	0,041	-0,346**	0,259*
ICV	-	-	0,757**	0,858**	-0,516**	-0,336**	0,527**	-0,085	0,669**	0,227*	-0,650**	0,295**
GlucGon	-	-	-	0,871**	-0,516**	-0,247*	0,609**	-0,337**	0,607**	0,133	-0,611**	0,440**
GlucVisc	-	-	-	-	-0,547**	-0,326**	0,650**	-0,290**	0,607**	0,042	-0,571**	0,498**
PrGon	-	-	-	-	-	-0,004	-0,576**	0,272*	-0,591**	-0,287**	0,586**	-0,172
PrVisc	-	-	-	-	-	-	-0,115	0,066	0,026	-0,298**	0,202*	0,005
LipGon	-	-	-	-	-	-	-	-0,104	0,413**	0,337**	-0,515**	0,101
LipVisc	-	-	-	-	-	-	-	-	-0,303**	0,042	0,128	-0,085
E1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,203*	-0,768**	0,342**
E2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-0,642**	-0,476**
E3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-0,277*
E4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

TABLA III.6: Coeficiente de correlación entre los distintos componentes bioquímicos y los estadios gametogénicos en la población de O Grove submareal. ICG: Índice de Condición gonadal; ICV: Índice de Condición visceral; GlucGon: glucógeno en la gónada; GlucVisc: glucógeno en la víscera; PrGon: proteínas en la gónada; Prvisc: proteínas en la víscera; LipGon: lípidos en la gónada; LipVisc: lípidos en la víscera. Negrita: correlación significativa, * al 95% de confianza, ** al 99% de confianza.

	ICG	ICV	GlucGon	GlucVisc	PrGon	PrVisc	LipGon	LipVisc	E1	E2	E3	E4
ICG	-	0,837**	0,462**	0,367**	-0,170	0,051	0,261**	0,079	-0,067	-0,313**	0,026	0,471**
ICV	-	-	0,586**	0,561**	-0,305**	0,010	0,315**	0,020	-0,065	-0,208*	-0,109	0,573**
GlucGon	-	-	-	0,688**	-0,786**	0,392**	0,486**	0,062	0,565**	-0,147*	-0,624**	0,812**
GlucVisc	-	-	-	-	-0,543**	0,438**	0,280**	-0,129	0,182	-0,061	-0,342**	0,539**
PrGon	-	-	-	-	-	-0,345**	-0,376**	0,104	-0,633**	0,077	0,623**	-0,620**
PrVisc	-	-	-	-	-	-	0,220*	-0,008	0,186*	0,040	-0,296**	0,230*
LipGon	-	-	-	-	-	-	-	0,318**	0,381**	-0,269**	-0,372**	0,549**
LipVisc	-	-	-	-	-	-	-	-	0,000	-0,142	-0,121	0,349**
E1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-0,202*	-0,650**	0,473**
E2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-0,423**	-0,332**
E3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-0,554**
E4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

TABLA III.7: Coeficiente de correlación entre los distintos componentes bioquímicos y los estadios gametogénicos en la población de O Grove intermareal. ICG: Índice de Condición gonadal; ICV: Índice de Condición visceral; GlucGon: glucógeno en la gónada; GlucVisc: glucógeno en la víscera; PrGon: proteínas en la gónada; Prvisc: proteínas en la víscera; LipGon: lípidos en la gónada; LipVisc: lípidos en la víscera. Negrita: correlación significativa, * al 95% de confianza, ** al 99% de confianza.

	ICG	ICV	GlucGon	GlucVisc	PrGon	PrVisc	LipGon	LipVisc	E1	E2	E3	E4
ICG	-	0,821**	0,562**	0,561**	-0,357**	-0,110	0,354**	0,078	0,104	-0,470**	0,117	0,386**
ICV	-	-	0,503**	0,537**	-0,353**	-0,097	0,228*	0,133	0,164	-0,610**	0,066	0,579**
GlucGon	-	-	-	0,910**	-0,826**	-0,285**	0,735**	-0,030	0,695**	-0,285**	-0,564**	0,164
GlucVisc	-	-	-	-	-0,705**	-0,269**	0,659**	0,021	0,600**	-0,284**	-0,515**	0,256*
PrGon	-	-	-	-	-	0,353**	-0,555**	0,103	-0,616**	0,187	0,497**	-0,042
PrVisc	-	-	-	-	-	-	-0,040	0,027	-0,275**	0,320**	0,112	-0,194*
LipGon	-	-	-	-	-	-	-	0,140	0,410**	-0,001	-0,411**	-0,035
LipVisc	-	-	-	-	-	-	-	-	-0,267**	-0,149	0,238*	0,291**
E1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-0,219*	-0,768**	-0,144
E2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-0,303**	-0,671**
E3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,177
E4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

3. Ciclo reproductivo

La evolución de las proteínas y los lípidos en la víscera parece que no está relacionado con el avance del ciclo gametogénico, puesto que las tres poblaciones muestran comportamientos distintos, sin relación con la evolución de los mismos en gónada.

En la tabla III.8 se muestra una media de los datos de composición bioquímica de *V. pullastra* a lo largo del año. En general, en las tres poblaciones el componente mayoritario de la gónada son las proteínas, encontrándose valores entre un 25% durante el otoño y un 45% durante la primavera. El siguiente componente mayoritario es el glucógeno, que en épocas de acumulación llega a constituir hasta el 30% de la gónada, mientras que después de su utilización para la formación de gametos tan sólo representa el 5%. Por último, los lípidos en su época de máxima acumulación no superan el 15% del contenido en peso seco de la gónada.

En el resto del individuo las proteínas son también el componente mayoritario, representando entre el 40 y el 55% del peso seco de la víscera. Los lípidos y el glucógeno no sobrepasan cada uno el 10% del peso seco de la víscera.

TABLA III.8: Componentes mayoritarios (en porcentaje) de la gónada y la víscera de *V. pullastra*.

	PROTEÍNAS	GLUCÓGENO	LÍPIDOS
GÓNADA	25-45	5-30	5-15
VÍSCERA	40-55	5-10	5-10
TOTAL	40-50	5-20	5-10

3.3.6 PARASITOLOGÍA DE LAS POBLACIONES DE ESTUDIO

Tras la observación al microscopio óptico de las preparaciones histológicas realizadas para el estudio parasitológico, se detectaron los parásitos y alteraciones patológicas que se describen a continuación:

BACTERIAS:

- Colonias intracelulares de tipo rickettsiano (Figuras 3.35.1 y 3.35.2):

Colonias basófilas intracelulares, tamaño 2-7 μm , aparecen en las células epiteliales de las branquias y túbulos digestivos.

- Quistes bacterianos:

Colonias extracelulares, 100-200 μm de tamaño, rodeadas por una cubierta fibrosa, se localizan en la base del epitelio branquial y tejido conjuntivo.

PROTISTAS:

- Ciliados (Figuras 3.35.3, 3.35.4, 3.35.5 y 3.35.6):

Se encuentran principalmente en branquias y cavidad paleal, aunque también en el lumen intestinal. Presentan un macronúcleo y un micronúcleo. Dentro de los ciliados observados se encuentran individuos del género *Trichodina* sp. y *Rynchodida* sp.

- Gregarina no identificada (Figura 3.36.7):

Localizada en el epitelio intestinal y conjuntivo adyacente.

- Coccidios (Figura 3.36.8):

Se encuentran en el riñón, pueden aparecer en diversas fases: microgamontes, macrogamontes, esporoquistes, etc.

- Microsporidio tipo Steinhausia (Figura 3.36.9):

Se encuentra en forma de quistes con esporas dentro de los ovocitos.

3. Ciclo reproductivo

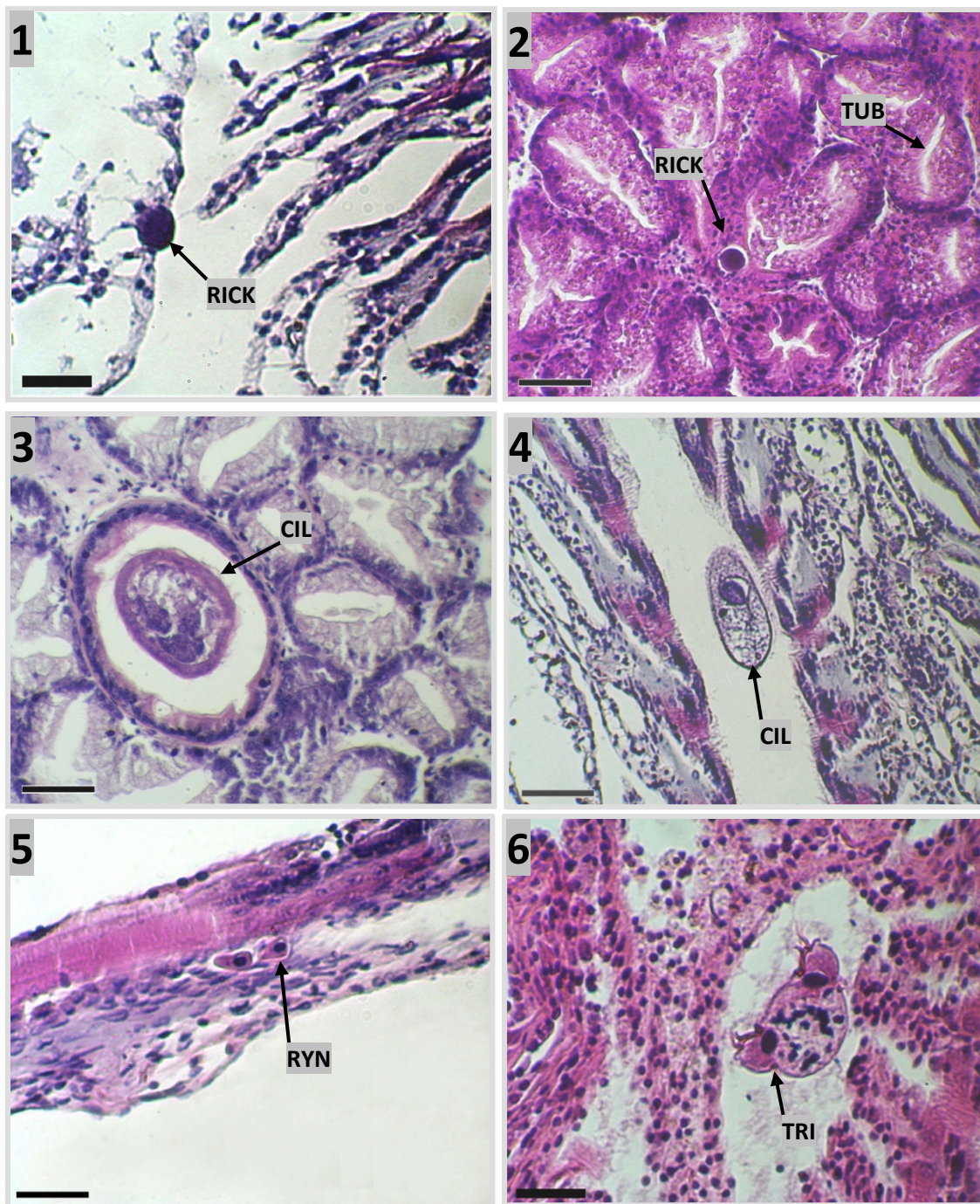


FIGURA 3.35: Cortes histológicos de *V. pullastra* donde se observan diversos parásitos. 1: Colonias bacterianas de tipo rickettsiano (RICK) en branquia. 2: Las mismas colonias localizadas en los túbulos digestivos (TUB). 3: Ciliado en la glándula digestiva (CIL). 4: Ciliado en la cavidad paleal (CIL). 5: Ciliado del género *Rynchodida* sp. (RYN). 6: Ciliado del género *Trichodina* sp. (TRI). Barras de escala fotos 1, 5 y 6: 25 μ m; fotos 2, 3 y 4: 50 μ m.

- Haplosporidio (Figura 3.36.10):
Plasmodios con esporas que se localizan en el epitelio intestinal.
- Nematopsis sp. (Figuras 3.36.11 y 3.36.12):
Se presenta en forma de ovoquistes intrahemocitarios en el tejido conjuntivo de branquias y masa visceral.
- Perkinsus olsenii (Figura 3.37.13):
La fase de trofozoito es la más común. Es una célula esférica con una gran vacuola central y núcleo periférico. Presenta división vegetativa que da lugar a estructuras pluricelulares (llamadas tomontes). La reacción hemocitaria es intensa, llegando incluso a observarse macroscópicamente pústulas de color blanco. Aparece en el tejido conjuntivo de branquias y masa visceral.

METAZOOS:

- Metazoo no identificado (Figura 3.37.14):
Metazoo no identificado localizado en el lumen intestinal.
- Trematodos (Figura 3.37.15 y 3.37.16):
Parásitos platelmintos con ciclo de vida complejo. Se encuentra tanto en la fase de esporoquiste con cercarias (la almeja actúa como hospedador primario), como en la fase de metacercaria (la almeja es el hospedador secundario). Los esporoquistes llegan a ocupar la totalidad de la gónada provocando incluso la castración; mientras que las metacercarias aparecen enquistadas en el pie, manto o tejido conjuntivo adyacente a la gónada, y suelen desencadenar una reacción hemocitaria ligera.
- Paravortex sp. (Figura 3.37.17):
Turbelario que se encuentra en el tracto digestivo.
- Urastoma sp. (Figura 3.37.18):
Turbelario del epitelio branquial.

3. Ciclo reproductivo

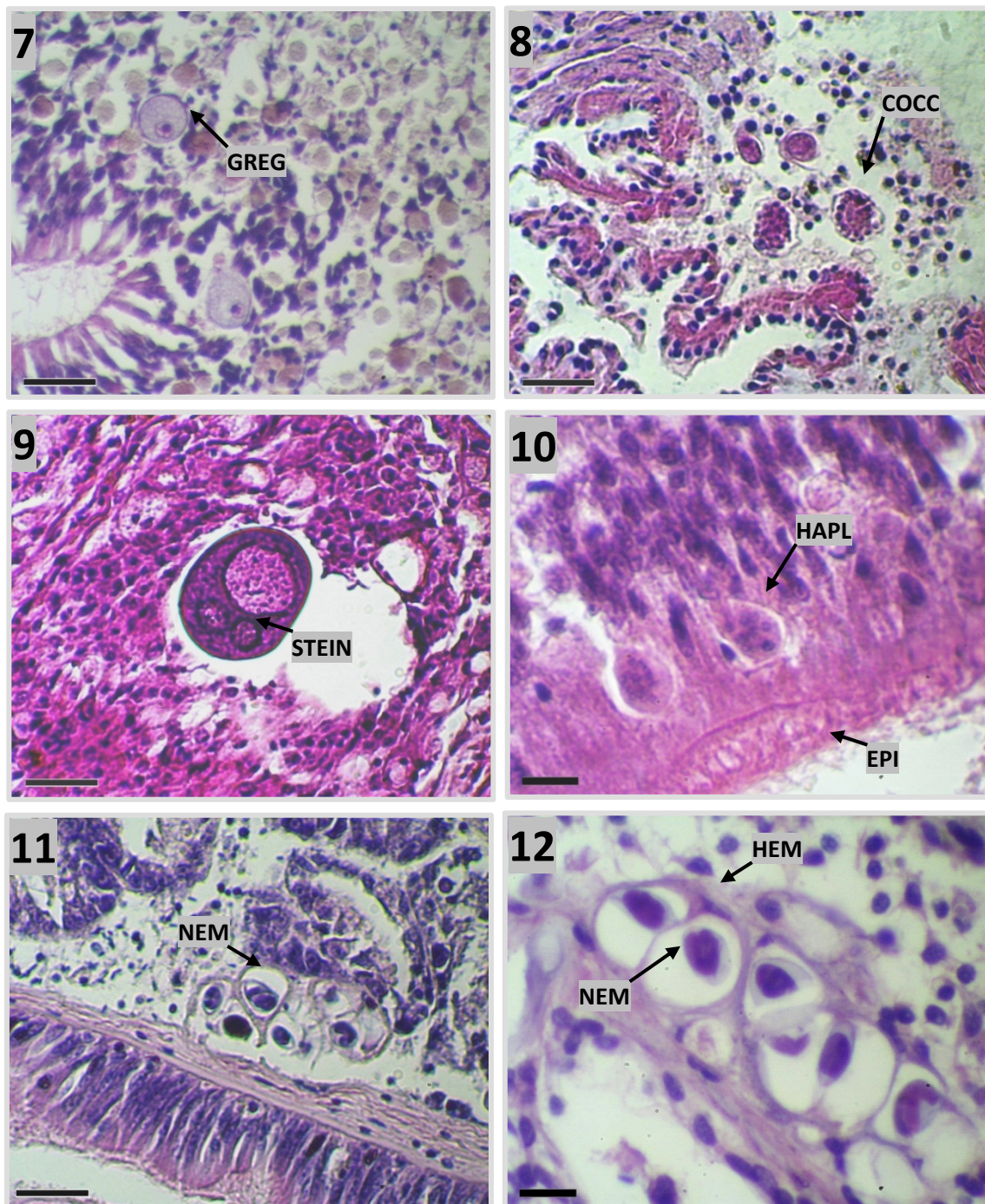


FIGURA 3.36: Cortes histológicos de *V. pullastra* donde se observan diversos parásitos. 7: Gregarina no identificada (GREG). 8: Coccidios (COCC) localizados en el tejido conjuntivo adyacente al riñón. 9: Quistes con esporas del tipo *Steinhausia* sp. (STEIN) dentro de un ovocito. 10: Plasmodios con esporas de haplosporidio (HAPL) en el epitelio intestinal (EPI). 11: Ovoquistes intrahemocitarios de *Nematopsis* sp. (NEM) en tejido conjuntivo de la masa visceral. 12: *Nematopsis* sp. en branquia, (HEM, hemocito). Barras de escala fotos 7, 8, 9 y 11: 25 μm ; fotos 10 y 12: 10 μm .

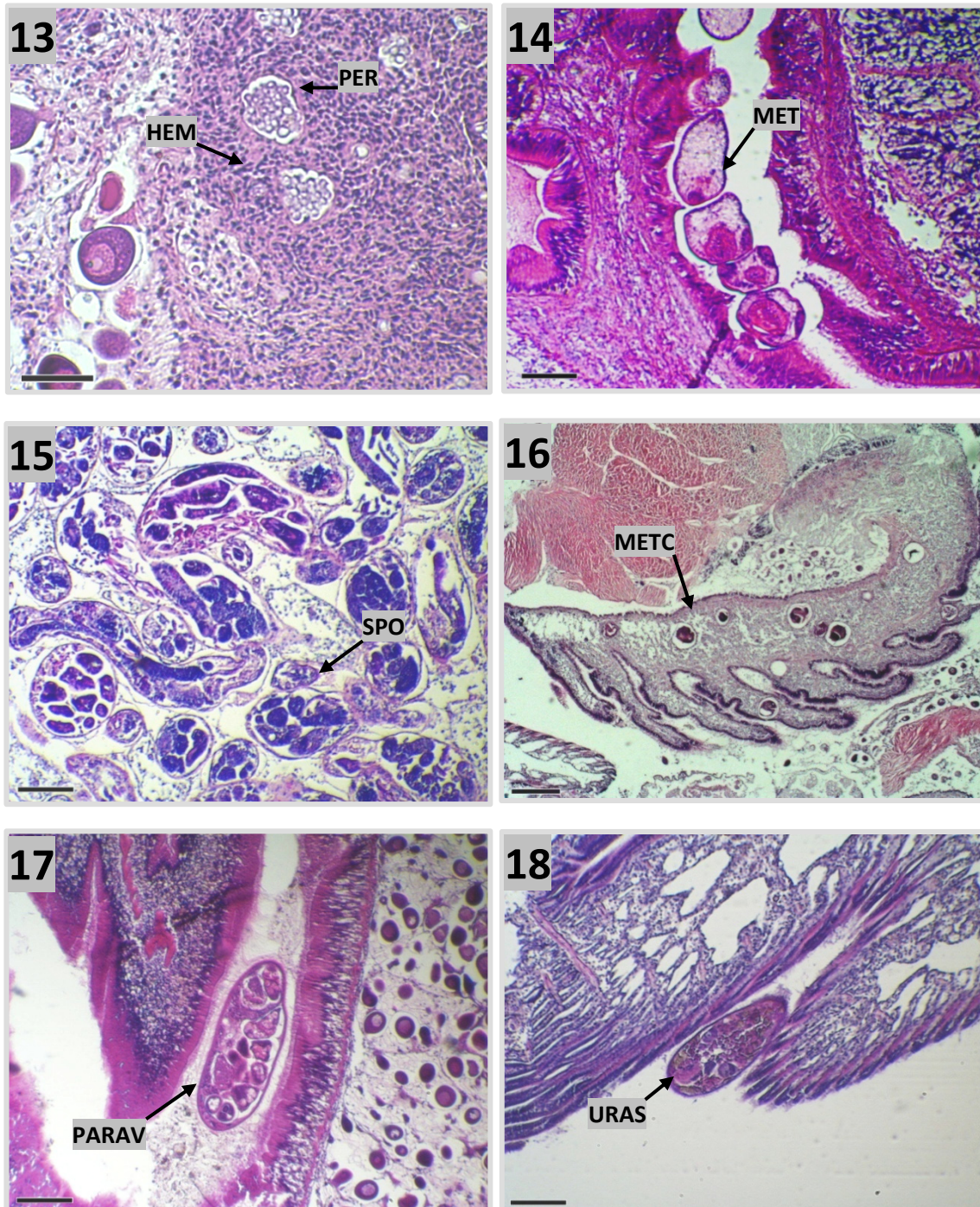


FIGURA 3.37: Cortes histológicas de *V. pullastra* con la presencia de diversos parásitos. **13:** Porción de gónada infectada por *Perkinsus olseni* (PER) con una fuerte reacción hemocitaria (HEM). **14:** Varios ejemplares de metazoos (MET) en el lumen intestinal. **15:** Gónada castrada por esporozoites (SPO) de trematodos. **16:** Metacercarias (METC) de trematodos enquistadas en el palpo labial. **17:** Ejemplar de *Paravortex* sp. (PARA) en el lumen intestinal. **18:** *Urastoma* sp. en branquia (URAS). Barras de escala fotos 14, 15, 16, 17 y 18: 100 μm; foto 13: 50 μm.

3. Ciclo reproductivo

Después de la observación detallada de cada una de las preparaciones histológicas, se calcularon las prevalencias (en cada fecha de muestreo) para cada uno de los parásitos detectados (Tabla III.9).

TABLA III.9: Prevalencias de los parásitos (%) en cada una de las poblaciones durante los meses de muestreo.

	Bacterias			Protistas									Metazoos				
	Colonias tipo rickettsiano en branquia	Colonias tipo rickettsiano en digestivo	Quiistes bacterianos	Ciliados en branquia	Ciliados en digestivo	Ciliados género <i>Trichodina</i> sp.	Gregarinas	Coccidios	<i>Steinhausia</i> sp.	Haplosporidio	<i>Nematopsis</i> sp.	<i>Perkinsus</i> sp.	Metazoo en digestivo	Esporoquistes de trematodos	Metacercarias de trematodos	<i>Paravortex</i> sp.	<i>Urastoma</i> sp.
CAMARIÑAS																	
17-abr-04	3,3	0	0	70,0	3,3	6,6	23,3	0	0	6,6	53,3	3,3	0	13,3	16,6	10,0	13,3
11-ago-04	16,6	3,3	3,3	0	3,3	0	20,0	0	16,6	0	26,6	0	0	20,0	3,3	0	0
17-dic-04	24,1	0	3,4	0	0	0	20,8	0	6,3	0	6,9	0	0	0	0	0	0
26-feb-05	30,0	0	0	26,6	0	3,3	30,0	0	0	3,3	26,6	0	0	10,0	10,0	13,3	0
O GROVE SUBMAREAL																	
28-abr-04	20,0	3,3	0	66,6	13,6	6,6	0	0	0	0	46,6	0	3,3	0	6,6	3,3	3,3
04-ago-04	13,3	10,0	0	80,0	3,3	16,6	0	0	5,8	16,6	30,0	0	3,3	0	0	10,0	3,3
25-nov-04	16,6	0	0	80,0	0	13,3	0	3,3	6,6	0	23,3	3,3	3,3	3,3	0	3,3	0
11-feb-05	26,6	0	0	63,3	0	0	6,6	6,6	0	0	10,0	0	6,6	0	0	6,6	0
11-may-05	6,6	10,0	0	93,3	3,3	13,3	0	0	14,3	0	40,0	3,3	3,3	0	6,6	3,3	0
O GROVE INTERMAREAL																	
21-abr-04	13,3	0	0	80,0	0	0	0	0	0	0	6,6	3,3	10,0	0	3,3	6,6	0
04-ago-04	10,0	3,3	0	90,0	0	20,0	0	0	0	3,3	3,3	40,0	3,3	0	16,6	0	0
17-nov-04	16,6	0	0	86,6	6,6	0	6,6	0	22,2	0	0	33,3	0	3,3	23,3	0	0
11-feb-05	23,3	0	3,3	60,0	0	10,0	6,6	0	0	6,6	0	20,0	10,0	0	0	0	0
11-may-05	13,3	3,3	0	80,0	0	13,3	3,3	0	0	0	0	26,6	0	0	23,3	0	0

Dentro del grupo de las bacterias, las colonias de tipo rickettsiano en branquia fueron las más abundantes, se observaron en todos los muestreos pero con prevalencias variables (entre un 3,3 y un 30%). También se observaron este tipo de colonias en los túbulos digestivos, aunque en menor prevalencia y no en todos los muestreos. Los quistes bacterianos se observaron en menor proporción de individuos y no en todas las fechas de muestreo.

Dentro de los protistas, los ciliados en branquia son el grupo con las mayores prevalencias observadas, puesto que aparecen hasta en un 93% de los individuos. Se han encontrado en todos los muestreos excepto en dos de ellos (Camariñas en los meses de agosto y diciembre). En el digestivo también se detectaron ciliados, aunque en menor proporción en comparación con la branquia. Se han calculado también las

prevalencias de los ciliados del género *Trichodina* sp., por ser uno de los más aparentes.

Se ha detectado una gregarina localizada principalmente en el epitelio intestinal, aunque también en el conjuntivo adyacente. Esta gregarina no identificada está presente en mayor proporción en la población de Camariñas (entre un 20-30% de prevalencia), en las dos poblaciones de O Grove aparece ocasionalmente.

Los coccidios renales sólo se han detectado en dos muestreos pertenecientes a la población submareal de O Grove. El microsporidio tipo *Steinhausia* sp. que aparece parasitando el interior de los ovocitos, fue detectado en las tres poblaciones, aunque no en todas las fechas de muestreo; la prevalencia de este parásito se calculó teniendo en cuenta sólo las hembras de cada muestreo.

Se observaron plasmodios de haplosporidio en las tres poblaciones, aunque no estuvieron presentes en todos los muestreos. Otra gregarina del género *Nematopsis* sp. (cuya localización principal es la branquia) se observó también en las tres poblaciones, en la de O Grove intermareal no fue detectado en todas las fechas de muestreo, y en las que apareció (abril y agosto), lo hizo con menor prevalencia que en las otras dos poblaciones.

Se ha visto que los parásitos mencionados anteriormente no causaban mayor trastorno en el individuo, como mucho desencadenaban una reacción hemocitaria ligera alrededor del parásito. Sin embargo, se han observado infecciones graves por *Perkinsus olseni*, que en algunos casos llegaba a ocupar hasta un 50% de la gónada. La prevalencia de este parásito en la población intermareal de O Grove es en algunos meses muy elevada, hasta un 40%. En las otras dos poblaciones se dio algún caso aislado en alguno de los muestreos.

Se ha observado un tipo de metazoo sin identificar localizado en el lumen intestinal, en las dos poblaciones de O Grove.

3. Ciclo reproductivo

Se observaron también trematodos en la fase de cercarias y metacercarias. En el caso de las cercarias, los esporoquistes llegaban a ocupar la totalidad de la gónada provocando la castración; mientras que las metacercarias aparecían enquistadas en el pie, manto o palpos labiales, con una ligera reacción hemocitaria. Estas dos fases aparecieron con mayor frecuencia en Camariñas, en O Grove submareal la prevalencia fue ligera y ocasional. En la población intermareal de O Grove destaca la aparición de metacercarias enquistadas entre los pliegues de formación de la concha en el reborde del manto.

El turbelario *Paravortex* sp. fue detectado en las tres poblaciones, mientras que *Urastoma* sp. sólo apareció en dos de ellas.

3.4 DISCUSIÓN

La almeja babosa *Venerupis pullastra* posee un **período muy dilatado de madurez y puesta**, abarcando principalmente los meses desde febrero a julio, y observándose en los meses de abril-mayo un pico de máxima puesta. En estos meses es cuando empieza a aumentar la temperatura del agua y hay mayor disponibilidad de alimento, por lo que este período de puesta podría ser una estrategia para maximizar el crecimiento de larvas y semilla en primavera-verano (Holland, 1978).

Se observa que durante el período de madurez y puesta, los folículos gonadales presentan abundantes gametos maduros y a su vez espacios vacíos de gametos ya expulsados, pero además, en las paredes del folículo aparecen nuevas líneas germinales permitiendo que este período se prolongue durante meses en esta especie. Esta simultaneidad de procesos también la encontraron Rodríguez Moscoso (2000) y Ojea *et al.* (2002) en *Ruditapes decussatus*.

Otra de las características del ciclo reproductivo de *V. pullastra*, a diferencia de otros venéridos como la almeja fina *R. decussatus* (Ojea *et al.*, 2002) o la almeja japonesa *R. philippinarum* (Drummond *et al.*, 2006), es que **no posee un período de reposo**; es decir, cuando la gónada deja de producir gametos se comienzan a formar células vesiculares para comenzar un nuevo ciclo de gametogénesis. Desde este estadio E4 de renovación gonadal, con gametos residuales y células vesiculares, se pasa al estadio E1 de inicio de la gametogénesis, donde, además de las células vesiculares, se observan nuevas líneas germinales.

La inexistencia de un estadio de reposo se confirma si tenemos en cuenta que de las 1.633 preparaciones histológicas examinadas en este estudio, sólo 12 se correspondían con individuos indeterminados. Estos individuos presentaban el tejido folicular totalmente desarrollado y repleto de células vesiculares, pero la ausencia de gametos impidió la diferenciación sexual de estos individuos. En esta especie Álvarez

3. Ciclo reproductivo

Fariña (2005), afirmaba que el estadio 0 como tal era escaso, debido a la rápida colonización del tejido de reserva por protogonias.

Es frecuente que durante el estadio E4 de renovación gonadal se observe asincronía folicular, observándose **folículos en diferentes estadios dentro de un mismo individuo**. Este estadio aparece principalmente durante el período verano-otoño, época de transición entre la madurez y comienzo de un nuevo ciclo de gametogénesis. En esta época encontramos folículos en madurez, folículos que empiezan a formar células vesiculares, e incluso algún folículo en reabsorción.

En un estudio realizado en esta misma especie, Villalba *et al.* (1993a) detectaron desarrollo sincrónico en todos los folículos en los individuos macho, mientras que en las hembras, en general, observaron folículos en distinto estadio gametogénico. En el presente estudio, los individuos con asincronía folicular, se clasificaron según el estadio predominante en la gónada.

Es de destacar que en las tres poblaciones se ha observado un patrón de desarrollo gonadal muy similar, aunque en las dos poblaciones de O Grove hay mayor **heterogeneidad de estadios en los distintos muestreos**, ya que a lo largo del año encontramos individuos en todos los estadios. Por el contrario, en la población de Camariñas, entre los meses de abril y agosto, la totalidad de la población se encuentra en estadio E3 (madurez y puesta) y E4 (renovación gonadal), quedando la época de gametogénesis activa restringida a los meses de septiembre a marzo. Álvarez Fariña (2005), en una población de A Illa de Arousa (SO de Galicia) también encontró heterogeneidad de estadios en los distintos muestreos.

Este hecho probablemente es debido a que sean poblaciones sometidas a distintos factores ambientales, y aunque el ciclo gametogénico es característico de la especie, las condiciones ambientales lo modifican; la temperatura y la disponibilidad de alimento de una población son dos factores exógenos que condicionan los procesos reproductivos (MacArthur y Wilson, 1967; Thompson *et al.*, 1974; Lubet, 1986 y Le Pennec *et al.*, 1991).

El amplio período de madurez y puesta, la ausencia de reposo, la asincronía folicular y la heterogeneidad de estadios dentro de un mismo muestreo permiten, que **la almeja babosa presente gametos maduros durante todo el año** con posibilidad de ser expulsados y de generar nuevos reclutamientos.

Esta presencia continuada de ovocitos maduros, ya fue confirmada en el trabajo de Pérez Camacho (1980) con la técnica de frotis, apuntando que en esta especie encontraba al menos un 80% de las hembras con ovocitos maduros durante todo el año. Villalba *et al.* (1993a), también detectaron hembras con folículos maduros a lo largo de todo el año.

Al estudiar las preparaciones histológicas de este trabajo, se observa que las células vesiculares comienzan a aparecer durante el estadio E4 de renovación gonadal, ocupan casi la totalidad de la gónada en el estadio E1 de inicio de la gametogénesis, comienzan a desaparecer en el E2 de gametogénesis activa y son inexistentes en el estadio E3 de madurez y puesta. Durante los meses de primavera se observa una disminución drástica en la cantidad de glucógeno y lípidos en gónada, coincidiendo con la época en la cual encontramos un número máximo de individuos en estadio E3 (cuando no se observan células vesiculares). Durante los meses de otoño, los valores de glucógeno y lípidos en gónada vuelven a aumentar coincidiendo con la aparición de individuos en gametogénesis y, por lo tanto, de células vesiculares en los folículos gonadales. Con este estudio se puede deducir que **las células vesiculares, características de la almeja babosa, tienen la capacidad de acumular glucógeno y lípidos** para ser utilizados principalmente en la gametogénesis. Álvarez Fariña (2005) en un trabajo realizado mediante histoquímica, observó que en esta especie las células vesiculares tienen la capacidad de acumular glucógeno y lípidos neutros.

En la figura 3.38 se representa un esquema con la evolución general del ciclo gonadal de la almeja babosa a lo largo del año.

CICLO GAMETOGENICO DE LA ALMEJA BABOSA

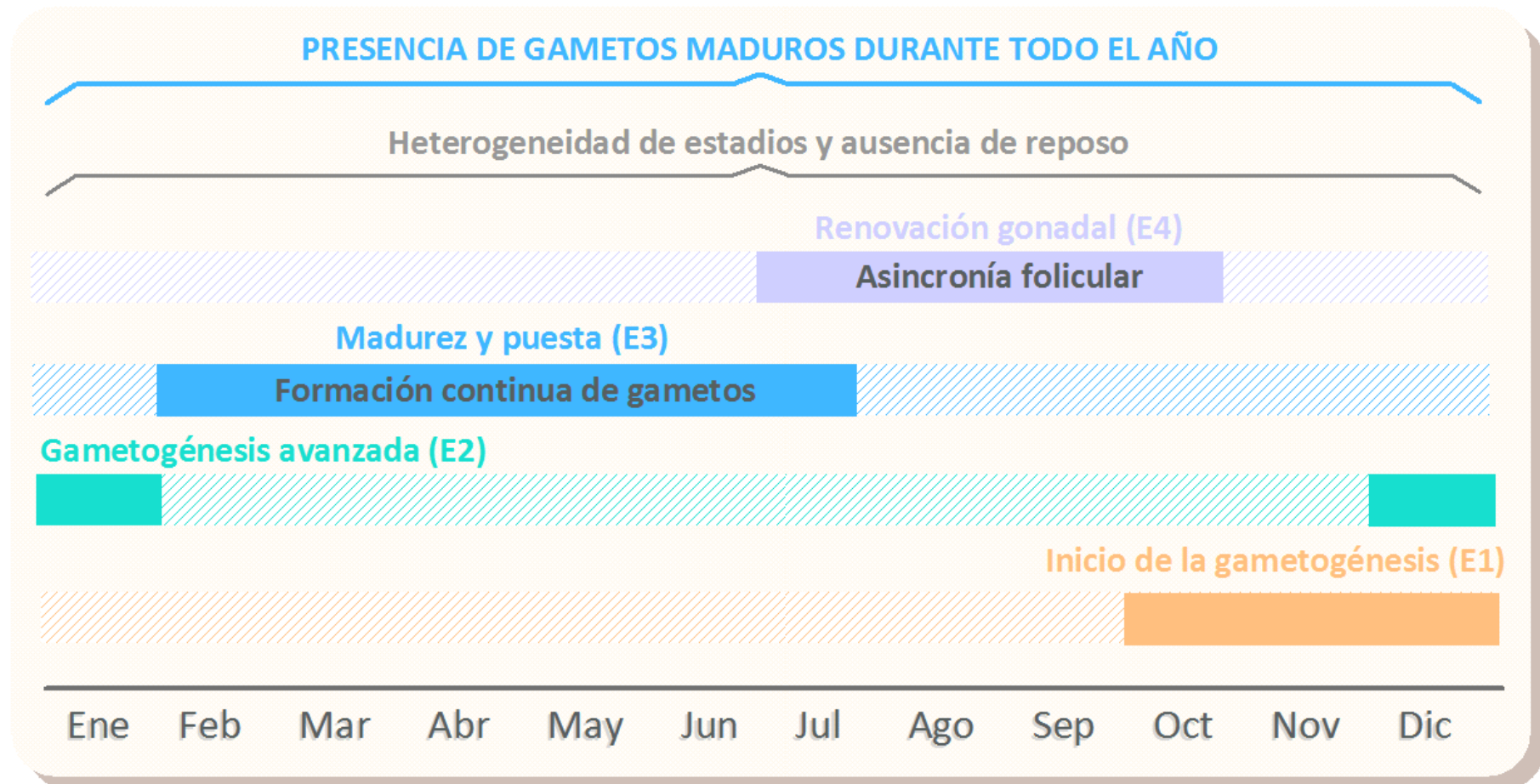


FIGURA 3.38: Representación esquemática del ciclo gametogénico de *V. pullastra* a lo largo del año.

Se ha realizado el estudio del ciclo gametogénico separando ambos sexos y en esta especie **no se observó asincronía temporal entre machos y hembras**. Maia *et al.* (2006) en un estudio realizado en Portugal también encontraron sincronismo de maduración entre machos y hembras; sin embargo, Villalba *et al.* (1993a), en un banco de O Grove sí encontraron asincronía en esta misma especie.

Dentro de las dos poblaciones de O Grove, **en la del banco intermareal el número de individuos en madurez durante todo el año, es menor que en la población submareal**, siendo también los Índices de Condición significativamente inferiores en la población intermareal. Esto puede ser debido a que ésta se encuentra siempre sumergida y por lo tanto, la disponibilidad de alimento es más constante que en la población intermareal. A su vez, la población del banco intermareal está sometida a períodos de desecación y a factores ambientales como la bajada de salinidad por lluvias o la subida de las temperaturas durante el período de verano.

Walker y Hefferman (1994), encontraron diferencias en el desarrollo gonadal entre almejas (*Mercenaria mercenaria*) sembradas en cuatro niveles mareales distintos, presentando las del intermareal mayor porcentaje de individuos indiferenciados que las del submareal. Eversole *et al.* (1980) encontraron en *M. mercenaria* mayor Índice de Condición gonadal en las almejas procedentes del área submareal. Sin embargo, no está claro si estas almejas responden a diferencias de temperatura, abundancia de fitoplancton, tiempo de exposición al alimento o algún otro factor físico causado por la exposición a las mareas (Eversole, 2001). En los trabajos realizados por Borrero (1987) y Franz (1996) en el mejillón *Geukensia demissa* demostraron que existía un retraso temporal en el ciclo gametogénico y una disminución en el crecimiento en aquellos mejillones situados a un nivel intermareal alto en comparación con los situados en un nivel intermareal bajo.

La composición bioquímica de la almeja babosa, a lo largo del ciclo gametogénico, varía principalmente debido a los cambios que se producen en la gónada. La evolución de la **cantidad de proteínas y de lípidos totales en el resto del individuo, no presenta ninguna relación con la evolución del ciclo gametogénico**,

3. Ciclo reproductivo

manteniéndose más o menos constantes a lo largo del año; **la evolución de estos componentes en la gónada presenta una variación clara a lo largo del ciclo. En cuanto al glucógeno, se presenta una evolución paralela en la gónada y en el resto del individuo.**

En las tres poblaciones **la cantidad de glucógeno y lípidos disminuye notablemente en aquellos meses en los cuales los individuos están en la máxima madurez y puesta. La variación de las proteínas es inversa a la del resto de componentes**, aumentando cuando éstos disminuyen. González (1975) en esta misma especie, ya observaba que había una relación inversa entre proteínas y glucógeno, disminuyendo la fracción proteica desde un máximo en primavera a un mínimo en otoño, y alcanzando el glucógeno su máximo en otoño y su mínimo en primavera.

Esta evolución de los componentes bioquímicos, en relación con el ciclo gametogénico, también se da en otras especies de bivalvos como en la ostra *Ostrea edulis* (Ruiz, 1992), la almeja fina *R. decussatus* (Rodríguez Moscoso, 2000) y el longueirón *Ensis siliqua* (Martínez Patiño, 2002).

En estudios realizados en diferentes moluscos bivalvos se describen dos tipos de estrategias: la oportunista y la conservadora. Así, en algunas especies el período de producción de gametos coincide con el de mayor disponibilidad de nutrientes, por lo que muestran una flexibilidad en su estrategia reproductora asociada a un estilo de vida oportunista (MacArthur y Wilson, 1967 y Lubet, 1986). En las especies de estilo de vida conservador, los nutrientes se almacenan en diferentes órganos del cuerpo y la producción de gametos tiene lugar durante los períodos de baja producción de nutrientes. Otras especies siguen una estrategia intermedia, utilizando los nutrientes almacenados como complemento de los recientemente asimilados, satisfaciéndose así los requerimientos energéticos de la reproducción (Sastry, 1979).

La almeja babosa tiene la capacidad de almacenar reservas en tejidos especializados (células vesiculares), que le dan cierta independencia para el desarrollo de la gametogénesis con respecto a las condiciones medioambientales. Así, acumula

glucógeno y lípidos durante el verano y otoño (estilo de vida conservador) para comenzar la gametogénesis en el invierno, permitiéndole empezar a desovar cuando comienza a incrementarse la temperatura del mar. A partir de la primavera se produce un aumento en la disponibilidad de alimento en el mar, por lo que durante esta época se siguen produciendo gametos (estilo de vida oportunista). Esto le hace tener ventaja competitiva frente a otras especies, siendo la inversión energética más eficiente a la hora de repartir el gasto energético entre reproducción y crecimiento (Álvarez Fariña, 2005).

Es en la **primavera donde se encuentran los valores más bajos en los Índices de Condición gonadal y visceral** en las tres poblaciones de estudio. Este dato coincide con Pérez Camacho (1980), que afirma que en esa época se observan menores contenidos en carne en la almeja babosa.

Observando los datos del ciclo gametogénico, la población de Camariñas presentaba una mayor sincronía entre los individuos; mientras que en las poblaciones de O Grove los estadios se encuentran más solapados. Es por ello que en la primera población, la evolución de los componentes bioquímicos se encuentra más marcada. Al encontrar mayor proporción de individuos en gametogénesis durante el otoño en Camariñas, la cantidad de glucógeno es significativamente mayor que en las otras dos poblaciones. En las de O Grove, al no haber tanta sincronía entre los individuos, la variación de los componentes bioquímicos presenta más oscilaciones a pesar de tener la misma evolución que en Camariñas.

Todos los parásitos detectados en este estudio ya habían sido descritos en la almeja fina (*R. decussatus*), babosa (*V. pullastra*) y rubia (*V. rhomboides*) de Galicia (Villalba *et al.*, 1993b; López, 1995 y Ordás *et al.*, 2001). Sin embargo, no hay estudios sobre el efecto en la reproducción de estos parásitos en la almeja babosa de Galicia.

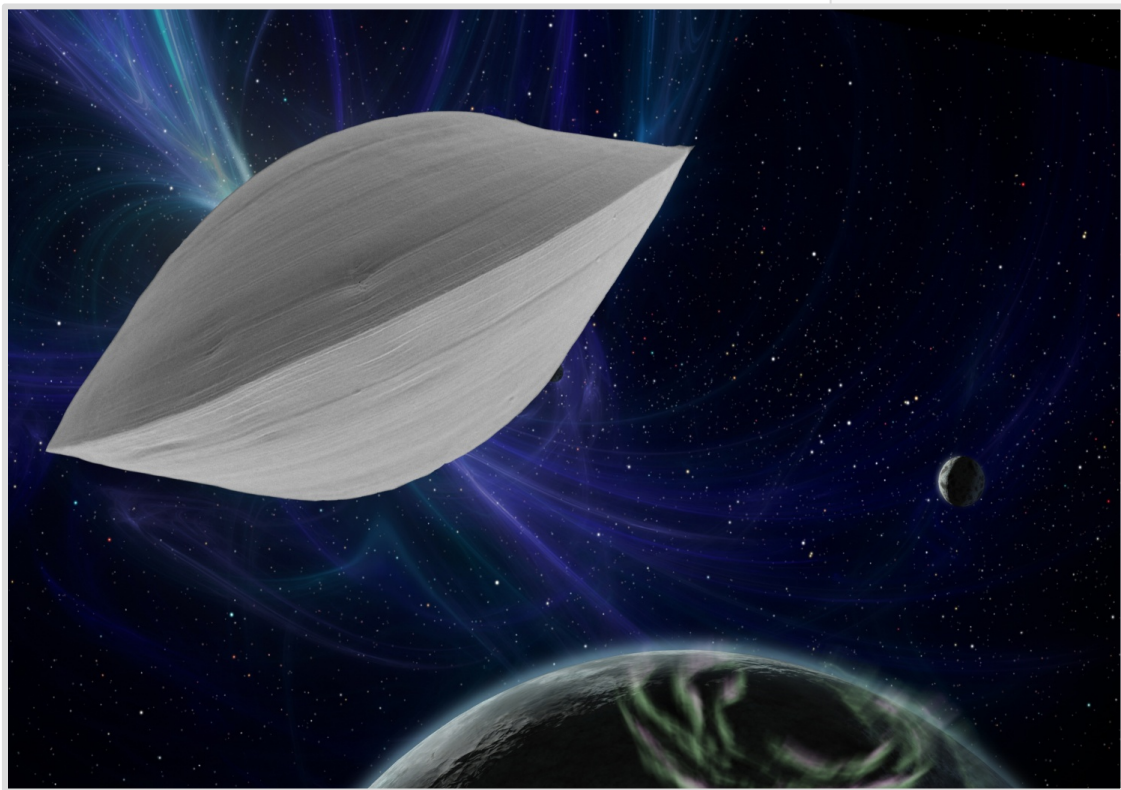
Los resultados muestran que **a excepción de *Perkinsus olseni* y los esporoquistes de trematodos, el resto de los parásitos no causan mayor trastorno en el individuo**, como mucho desencadenan una reacción hemocitaria ligera alrededor

3. Ciclo reproductivo

del parásito. Sin embargo, se han observado infecciones graves por *P. olseni*, que en algunos casos llegaba a ocupar hasta un 50% de la gónada. En el caso de los esporoquistes con cercarias de trematodos, éstos llegan a invadir la totalidad de la gónada provocando la castración.

Estas infecciones ya se habían observado en otras especies de bivalvos de Galicia, como en la almeja fina parasitada por *P. olseni* (Casas, 2001), en la navaja y el berberecho por esporoquistes de trematodos (Darriba, 2001 e Iglesias, 2006). Con relación a las 3 zonas de estudio, destaca la mayor prevalencia de *P. olseni* en la zona intermareal de O Grove con relación a las zonas submareales, lo que podría indicar una influencia del nivel mareal sobre la presencia de este parásito en la almeja babosa. Son necesarios más estudios para confirmar estos datos.

4. CAPÍTULO II: DESARROLLO EMBRIONARIO Y LARVARIO



4. CAPÍTULO II: DESARROLLO EMBRIONARIO Y LARVARIO

4.1 INTRODUCCIÓN

El estudio de larvas del plancton es crucial para conocer la dispersión larvaria, la fijación y los niveles de reclutamiento, así como las tasas de crecimiento de los bivalvos infaunales (Gribben y Hay, 2003). Para la identificación larvaria existen numerosos métodos y éstos han sido ampliamente revisados por Garland y Zimmer (2002).

Hasta hace unos años, la única técnica disponible para la identificación de larvas en el plancton era la observación directa al microscopio, ya sea basándose en las características morfométricas de la concha (Dinamani, 1973 y Hooker, 1997) o en la morfología interna de valvas y partes blandas (Elston, 1980; Hodgson y Burke, 1988 y Cragg, 1985 y 1989). Sin embargo, algunas especies cercanas presentan estructuras valvares similares, lo que dificulta su identificación (Le Pennec, 1980 y Fuller y Lutz, 1989).

Actualmente, además de la identificación directa al microscopio, se pueden encontrar una serie de métodos alternativos que presentan ventajas en cuanto a rapidez y especificidad. Entre ellos se encuentran los métodos inmunológicos (Demers *et al.*, 1993; Paugam *et al.*, 2000; Lorenzo *et al.*, 2003 y 2005 y Pérez *et al.*, 2009) y los métodos moleculares y bioquímicos (Miller *et al.*, 1991; Olson *et al.*, 1991; Hu *et al.*, 1992; Coffroth y Mulawka, 1995; Medeiros-Bergen *et al.*, 1995; Toro, 1998; André *et al.*, 1999; Hare *et al.*, 2000; Larsen *et al.*, 2005; Patil *et al.*, 2005; Livi *et al.*, 2006; Jones *et al.*, 2008; Phillips *et al.*, 2008 y Henzler *et al.*, 2010).

Estos métodos, menos subjetivos y más selectivos a la hora de identificar muestras de larvas del plancton, no permiten conocer la morfología y estructura de las

4. Desarrollo embrionario y larvario

larvas, lo cual posibilitaría mejorar su manejo en criadero e identificar posibles malformaciones.

La descripción del desarrollo larvario de numerosas especies de bivalvos se ha realizado proporcionando conocimientos básicos para la acuicultura o para la identificación de sus estadios larvarios en el plancton (Loosanoff y Davies, 1963 y Loosanoff *et al.*, 1966). El estudio de diferentes aspectos de larvas y postlarvas con microscopía electrónica de barrido, se ha llevado a cabo en diversas especies de Venéridos (Goodsell *et al.*, 1992; Mouëza *et al.*, 1999 y 2006; Evseev *et al.*, 2001; Semenikhina *et al.*, 2006 y Silberfeld y Gross, 2006).

En el Centro de Cultivos Mariños de Ribadeo en los últimos años se comenzaron a realizar estudios de embriología y desarrollo larvario con microscopía electrónica de barrido, de las distintas especies de bivalvos que se cultivan en Galicia: *Ensis arcuatus*, *E. siliqua* y *Solen marginatus* (da Costa *et al.*, 2008 y da Costa, 2009), *Ruditapes decussatus* (Aranda, 2010) y *Donax trunculus* (Louzán, comunicación personal).

Aunque existe el trabajo realizado por Pérez Camacho y Román (1973) sobre la embriología y desarrollo larvario de *Venerupis pullastra* al microscopio óptico, no consta ninguno realizado con microscopía electrónica de barrido. En este capítulo se describe por primera vez el patrón de desarrollo de *V. pullastra* utilizando el microscopio electrónico de barrido.

En la actualidad, existe cierta controversia en la diferenciación de la concha durante el desarrollo embrionario de bivalvos. Los primeros trabajos sobre la diferenciación de la concha en bivalvos de Stepanoff (Kniprath, 1980) se basaban en el modelo descrito para gasterópodos. En este modelo se proponía que la invaginación de la glándula de la concha se debía cerrar por completo antes de la secreción del periostraco para la formación de la primera concha larvaria, la prodisoconcha I. Kniprath (1980) en *Mytilus galloprovincialis* y Casse *et al.* (1998) en *Pecten maximus*, confirmaban esta teoría. Sin embargo, Mouëza *et al.* (2006) en el Venérido *Chione cancellata* proponen una interpretación alternativa. En su estudio, con análisis de

microscopía electrónica de barrido y transmisión, proponen que la invaginación de la glándula de la concha es una hendidura abierta, situada debajo de la prototroca y a partir de la cual se secreta la concha, sin que sea necesario que se cierre por completo para comenzar la secreción de la misma. Para poder verificar qué teoría es la que se ajusta a *V. pullastra*, en este trabajo se han recogido muestras secuencialmente para el análisis con microscopía electrónica de transmisión.

El objetivo de este **capítulo** es describir, con microscopía óptica y electrónica, el desarrollo embrionario y larvario de *V. pullastra*, desde la puesta hasta la metamorfosis. Asimismo, se pretende describir con la ayuda de la microscopía electrónica de transmisión, el proceso de formación de la concha. La finalidad principal de este estudio, además de una posible aplicación a la identificación de muestras de plancton y bentos, es conocer en profundidad la biología de esta especie con el fin de mejorar su cultivo en criadero.

4.2 MATERIAL Y MÉTODOS

4.2.1 OBTENCIÓN DEL DESOVE Y TOMA DE MUESTRAS

Para el estudio del desarrollo embrionario y larvario de la almeja babosa, *Venerupis pullastra*, se obtuvieron dos desoves espontáneos de progenitores procedentes de O Barqueiro y de Cangas. Los huevos obtenidos fueron recogidos e incubados en tanques de 500 l con agua de mar a una temperatura de $19\pm 1^{\circ}\text{C}$ y una ligera aireación constante. Las larvas se alimentaron diariamente con una dieta mixta de microalgas compuesta por *Tetraselmis suecica*, *Isochrysis galbana*, *Pavlova lutheri* y *Chaetoceros calcitrans*. El cultivo larvario se realizó siguiendo el método descrito en el capítulo III.

Con el fin de controlar el tiempo de aparición de las distintas fases del desarrollo embrionario, las muestras se observaron *in vivo* al microscopio óptico cada 5-10 min. Desde larva trocófora hasta larva D las muestras se observaron cada hora y las posteriores diariamente. En cada estadio de desarrollo se recogieron al menos 100 individuos, se fotografiaron y se midieron en el programa de análisis de imagen *NIS-Elements BR 3.0*, acoplado a un microscopio óptico. Se consideró la aparición de un nuevo estadio cuando más de la mitad de los individuos lo habían alcanzado.

4.2.2 PROCESADO PARA EL MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO

En cada uno de los estadios se recogió una muestra que fue procesada para su posterior visionado en el microscopio electrónico de barrido.

Para la fijación de las muestras se empleó glutaraldehído al 2,5% en tampón cacodilato sódico 0,1M durante 4 h. Posteriormente, se realizaron varios lavados con cacodilato sódico y se postfijaron en tetraóxido de osmio al 1% durante 1 h, para finalizar con la fijación se volvieron a lavar las muestras con cacodilato sódico. Todo este proceso se realizó a 4°C .

El siguiente paso fue la deshidratación de las muestras con la siguiente serie de baños:

- etanol al 30% (1x 15 min)
- etanol al 50% (2x 15 min o 3x 10 min)
- etanol al 70% (2x 15 min o 3x 10 min)
- etanol al 80% (2x 15 min o 3x 10 min)
- etanol al 90% (2x 15 min o 3x 10 min)
- etanol al 100% (3x 15 min)

Después de que las muestras fueron deshidratadas, se sustituyó el etanol por un líquido miscible con el CO₂ líquido, con el fin de llevar a cabo la desecación total en la cámara de Punto Crítico. Se realizaron los siguientes baños en amiloacetato-etanol:

- 1 amiloacetato: 3 etanol (2x 15 min o 3x 10 min)
- 2 amiloacetato: 2 etanol (2x 15 min o 3x 10 min)
- 3 amiloacetato: 1 etanol (2x 15 min o 3x 10 min)
- amiloacetato al 100% (3x 15 min)

Finalmente, se montaron las muestras en unos portamuestras de aluminio, se recubrieron con oro y se visionaron en el microscopio electrónico de barrido *Philips XL30*, perteneciente al CACTI de la Universidad de Vigo.

Además, una muestra de espermatozoides, sin más procesado que la fijación en glutaraldehído y posterior inclusión en cacodilato, se observó en un microscopio de barrido medioambiental *FEI Quanta 200* para ver si aparecían artefactos por el procesado.

4. Desarrollo embrionario y larvario

4.2.3 PROCESADO PARA EL MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE TRANSMISIÓN

Desde la aparición de la gástrula hasta la larva D se recogió una muestra cada dos horas, para su posterior visionado en el microscopio electrónico de transmisión.

Al igual que para el microscopio electrónico de barrido, la fijación de las muestras se realizó con glutaraldehído y la postfijación con tetraóxido de osmio. Posteriormente se deshidrataron con la siguiente escala de acetonas:

- acetona al 50% (1x 10 min)
- acetato de uranilo 1% en acetona al 70% (1x 60 min)
- acetona al 70% (2x 15 min)
- acetona al 80% (2x 15 min)
- acetona al 90% (2x 15 min)
- acetona al 95% (2x 15 min)
- acetona al 100% (2x 15 min)

Después de que las muestras fueron deshidratadas se impregnaron en resina Spurr, en nevera a 4°C y rotor:

- 1 Spurr: 3 acetona (1x 2 h)
- 1 Spurr: 1 acetona (1x 2 h)
- 3 Spurr: 1 acetona (1x 3-4 h)

Posteriormente se incluyeron en resina total a temperatura ambiente:

- resina total (1x 2-5 h)
- resina total (1x 12 h)
- resina total (1x 2 h)

Finalmente se incluyeron en resina Spurr, a 60°C durante 48 h.

Para poder realizar cortes de los bloques se realizó el piramidado del bloque con el piramidotomo *Leica Ultratim*. Posteriormente se realizaron semifinos que se tiñeron con azul de metileno y se observaron con el microscopio óptico, para seleccionar las zonas de interés. Se repiramidó el bloque y se realizaron los cortes ultrafinos, de aproximadamente 70-90 nm, con el ultramicrotomo *Leica Reichert Ultracut*.

Para el contrastado de las muestras se impregnaron los ultrafinos con disoluciones de metales pesados; se aplicó una disolución acuosa de acetato de uranilo 2% durante 30 min y una disolución de citrato de plomo durante 10 min.

Finalmente las muestras se observaron con un microscopio Dual Beam Focused Ion Beam (FIB) *FEI Helios 600 Nanolab* un *FIB FEI Helios* para las microfotografías de los embriones completos y con el microscopio electrónico de transmisión *Jeol Jem 1010* para los detalles.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 DESARROLLO EMBRIONARIO Y LARVARIO

En la tabla IV.1 se muestra el tiempo de aparición de cada uno de los distintos estadios embrionarios y larvarios observados y el rango de tallas medio obtenido en los dos cultivos estudiados.

TABLA IV.1: Estadios embrionarios y larvarios de *V. pullastra*. Tiempos de aparición desde la fertilización y rango de tallas de cada estadio.

Estadio	Tiempo desde fertilización	Tamaño (μm)
Huevo sin fecundar	0 h	65-75
Estadio de 2 células	1 h 30 min	80-90
Estadio de 4 células	2 h	80-90
Estadio de 8 células	2 h 30 min	80-90
Estadio de 16 células	3 h 30 min	80-90
Estadio de 32-64 células	4 h	80-90
Blástula	5 h 30 min	80-90
Gástrula	7-8 h	80-90
Trocófora	13-14 h	80-90
Larva D	30-32 h	100-105
Larva Umbonada	8-9 días	140-150
Larva Pediveliger	16-18 días	220-240
Postlarva	21-22 días	250-270

El ovocito sin fecundar es esférico, marrón y está recubierto de microvellosidades (Figuras 4.1 y 4.11). El diámetro de los ovocitos es de entre 65 y 75 μm . Los espermatozoides poseen una cabeza con unos 4 μm de largo y un flagelo de unas 45 μm de longitud (Figura 4.9). La cabeza del espermatozoide presenta una forma cilíndrica y en la base se observan 4 mitocondrias (Figura 4.10). A los 30 minutos tras la fecundación aparece el primer corpúsculo polar.

El estadio de 2 células se alcanza 1 h y 30 min tras la fecundación. Presenta el corpúsculo polar en el plano de división y se observan dos blastómeros desiguales, uno más pequeño (AB) en el polo animal y uno más grande (CD) en el polo vegetal (Figuras 4.2 y 4.12).

Después de 2 h post-fertilización se alcanza el estadio de 4 células, con 3 blastómeros iguales (A, B, C) en el polo animal y un macrómero (D) en el polo vegetal (Figuras 4.3 y 4.13). A las 2 h y 30 min se observa el estadio de 8 células con 7 micrómeros dispuestos en el polo animal sobre un macrómero localizado en el polo vegetal (Figuras 4.4 y 4.14).

Las divisiones se van sucediendo y a las 4 h después de la fertilización, la mayoría de los embriones están en estadio de 32-64 células (Figuras 4.6, 4.7 y 4.15). A medida que van aumentando las divisiones es difícil precisar el número exacto de células, tanto al microscopio óptico como al microscopio electrónico de barrido. Los micrómeros van recubriendo el macrómero hasta quedar totalmente envuelto por ellos, dando lugar 5 h 30 min post-fertilización a la blástula (Figuras 4.8 y 4.16). Es el primer estadio embrionario ciliado y móvil. La movilidad de la blástula es reducida, limitándose a movimientos circulares sin desplazamiento lateral.

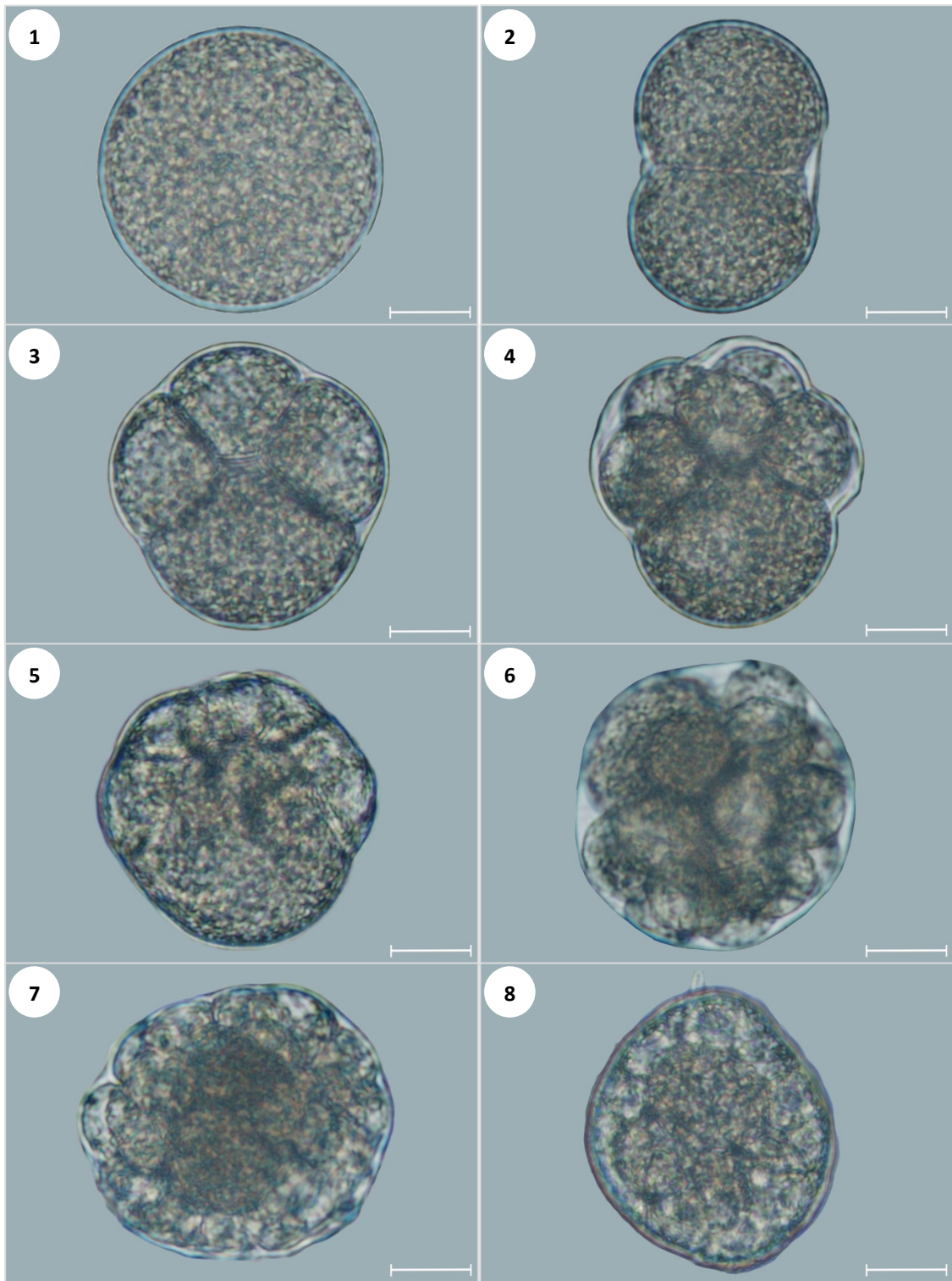


FIGURA 4 (1-8): Microfotografías al microscopio óptico del desarrollo embrionario de *V. pullastra*. 1: Ovocito sin fecundar. 2: Estadio de 2 células. 3: Estadio de 4 células. 4: Estadio de 8 células. 5: Estadio de 16 células. 6: Estadio de 32 células. 7: Estadio de 64 células. 8: Blástula. Barras de escala: 20 μ m.

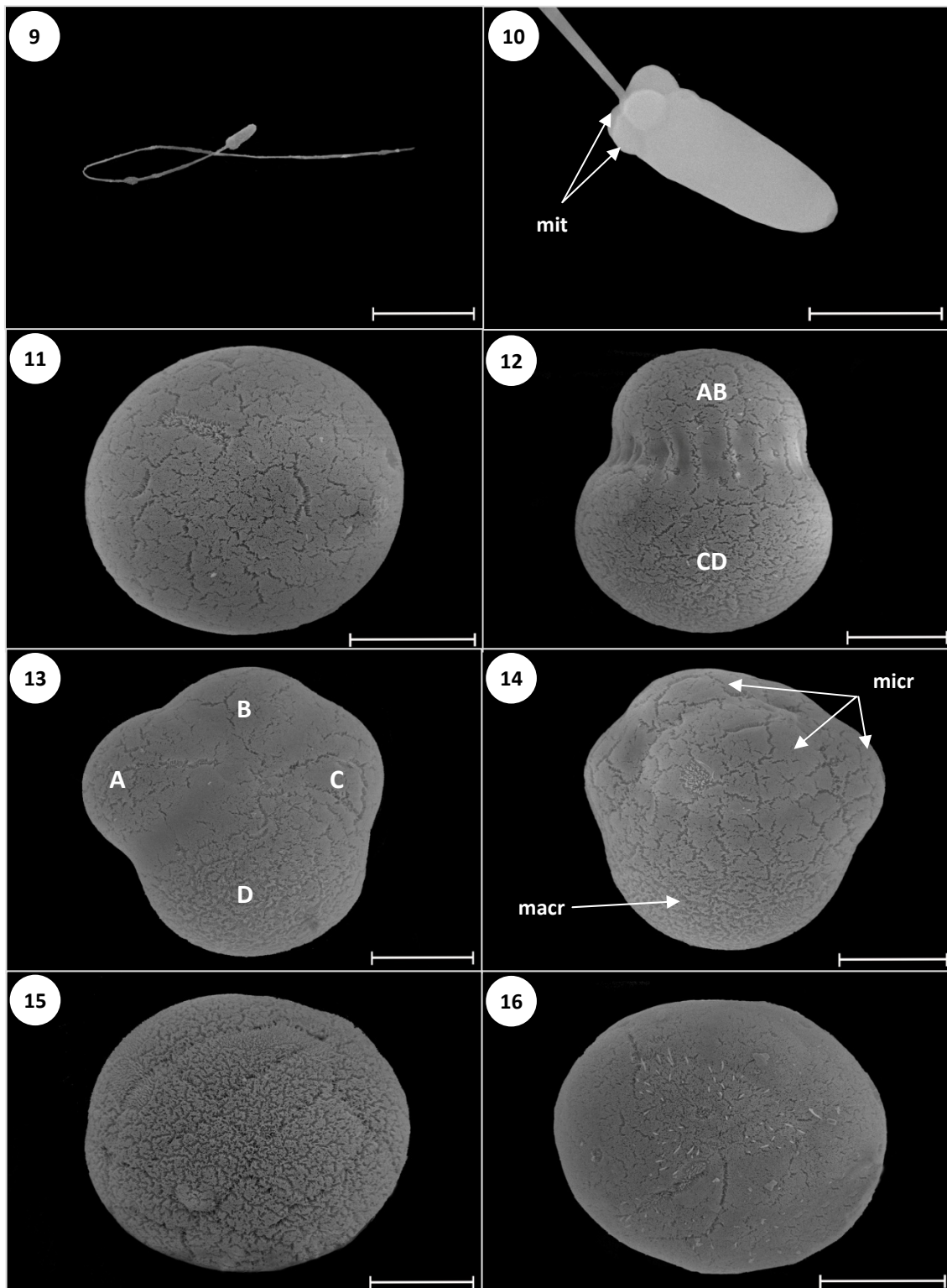


FIGURA 4 (9-16): Microfotografías al microscopio electrónico de barrido del desarrollo embrionario de *V. pullastra*. **9:** Espermatozoide. **10:** Detalle de la cabeza del espermatozoide, mitocondria (mit). **11:** Ovocito sin fecundar. **12:** Estadio de 2 células (AB, CD), vista lateral. **13:** Vista lateral del estadio de 4 células (A, B, C, D). **14:** Estadio de 8 células mostrando el macrómero (macr) y los micrómeros (micr), vista lateral. **15:** Estadio de 32 a 64 células. **16:** Blástula. Barras de escala fotos 11, 12, 13, 14, 15 y 16: 20 μ m; foto 9: 10 μ m; foto 10: 2 μ m.

4. Desarrollo embrionario y larvario

La gastrulación ocurre por epibolia, en ella los micrómeros se multiplican rápidamente y se sitúan rodeando a los macrómeros que quedan en una posición interna. Entre las 7 y 8 horas después de la fecundación se observa la gástrula, con cilios de mayor longitud que la blástula (Figuras 4.17, 4.18 y 4.19) y con mayor movilidad que ésta.

En este estadio aparece el blastoporo, como resultado de una invaginación, que inicialmente se observa en el polo vegetal y que según transcurre la gastrulación, se desplaza hacia la parte ventral de la futura larva. También aparece otra hendidura, opuesta al blastoporo, correspondiente a la glándula de la concha, que tiene una forma más alargada (Figuras 4.20 y 4.21).

Una sección del embrión, vista a microscopía electrónica de transmisión (MET), muestra que la base de esta hendidura constituye la glándula de la concha (Figuras 4.22 y 4.23). La glándula de la concha está formada por unas pocas células en las que las microvellosidades van desapareciendo progresivamente. Estas células son las que van a elaborar el periostraco y por el momento son células indiferenciadas.

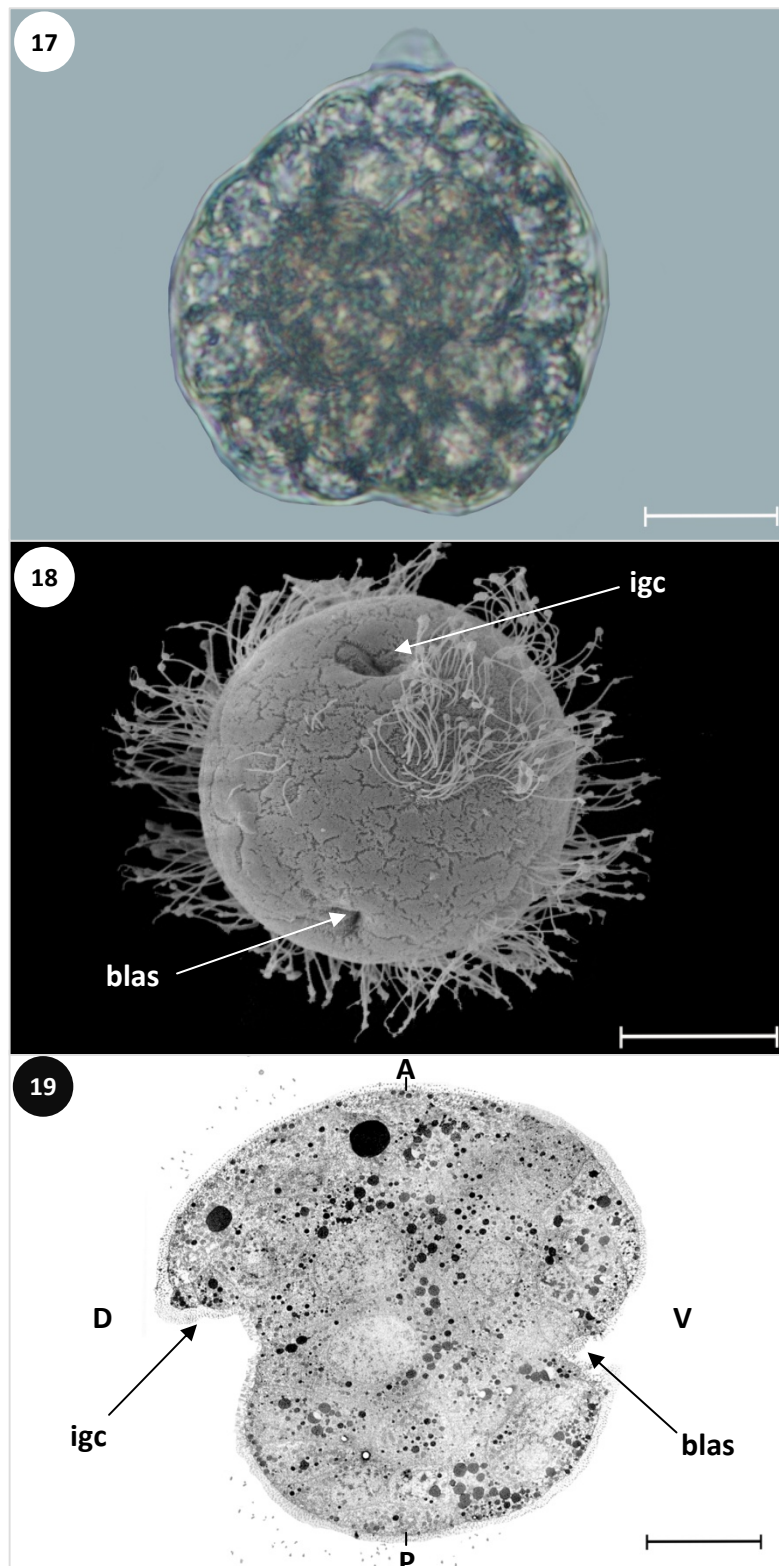


FIGURA 4 (17-19): Gástrula de *V. pullastra* (7-8 h post-fertilización). **17:** Microfotografía al microscopio óptico. **18:** Gástrula mostrando el blastoporo (blas) y la invaginación de la glándula de la concha (igc). Microscopio electrónico de barrido. **19:** Sección sagital al microscopio electrónico de transmisión de una gástrula mostrando ambas invaginaciones, el blastoporo (blas) y la invaginación de la glándula de la concha (igc). V: ventral, D: dorsal, A-P: eje anteroposterior. Barras de escala 20 μm.

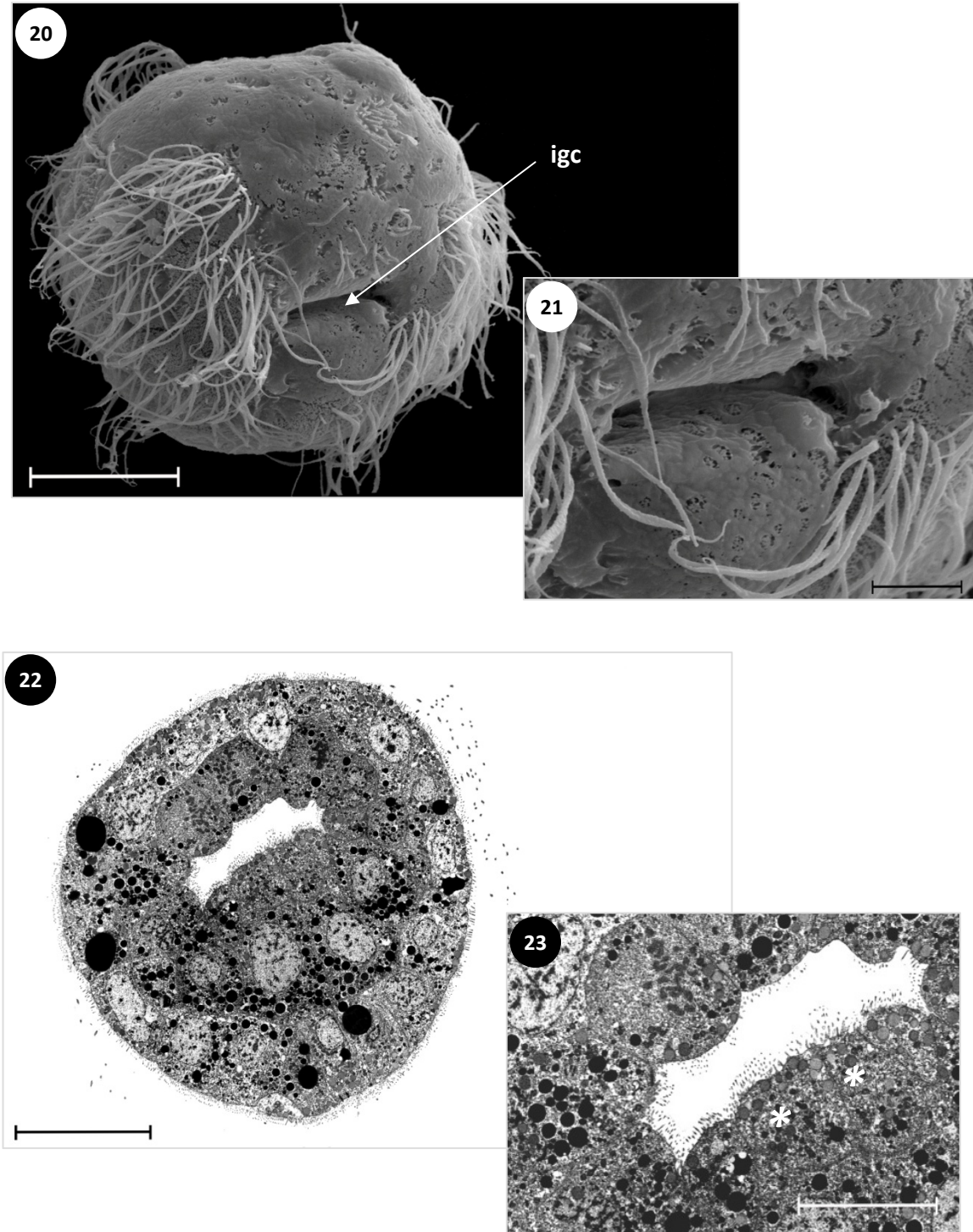


FIGURA 4 (20-23): Microfotografías al microscopio electrónico de barrido y de transmisión de una gástrula tardía de *V. pullastra*. **20:** Gástrula tardía mostrando la invaginación de la glándula de la concha (igc). Microscopio electrónico de barrido. **21:** Detalle de la invaginación de la glándula de la concha. **22:** Sección transversal de la gástrula tardía a través de la invaginación de la glándula de la concha. Microscopio electrónico de transmisión. **23:** Detalle de la invaginación mostrando las células de la glándula de la concha (asteriscos). Barras de escala fotos 20 y 22: 20 μm ; fotos 21 y 23: 5 μm .

Entre las 13-14 horas post-fertilización la gástrula se transforma en una típica larva trocófora piriforme ciliada, de unas 60 μm de longitud apico-basal y que nada más activamente que los estadios anteriores (Figuras 4.24 y 4.25). La trocófora posee una región ciliada a modo de corona llamada prototroca, que la divide en dos regiones desiguales. En la región anterior aparece la metatroca, una corona de cilios formada por un mechón de cilios más largos conocido como penacho apical (Figuras 4.26 y 4.27). En la región posterior un conjunto de cilios junto al ano forma la llamada telotroca. En esta región posterior también se encuentra el blastoporo que dará lugar a la boca en la parte ventral y la glándula de la concha situada en la parte dorsal, que en este momento presenta una película de aspecto membranoso y continuo, sin que se pueda observar la charnela y el ligamento (Figuras 4.28, 4.29 y 4.30).

La glándula de la concha va secretando la prodisoconcha I de aspecto membranoso y no calcificada (Figuras 4.31, 4.32 y 4.33); en la trocófora tardía la prodisoconcha I se extiende cubriendo los segmentos izquierdo y derecho conectados por una banda más gruesa, que es la primera charnela, estableciéndose la simetría bilateral (Figuras 4.34 y 4.35). Con MET se puede observar como el periostraco se inserta en el borde del manto, donde se encuentran las células secretoras (T1) (Figuras 4.36 y 4.37). Las células secretoras (T1) presentan unas microvellosidades, mientras que en las no secretoras (T3), cubiertas por el periostraco, éstas no están presentes. No se ha conseguido obtener imágenes de las células secretoras del ligamento (T2).

La prodisoconcha I se extiende totalmente hasta que envuelve las partes viscerales de la larva, la prototroca va a dar lugar al velo y la telotroca al mechón postanal (Figuras 4.38 y 4.39). Entre las 30 y 32 horas después de la fertilización se observa el estadio de larva D veliger, con un tamaño de entre 100 y 105 μm y las valvas todavía no calcificadas pero ya envolviendo todas las partes blandas de la larva (Figura 4.40).

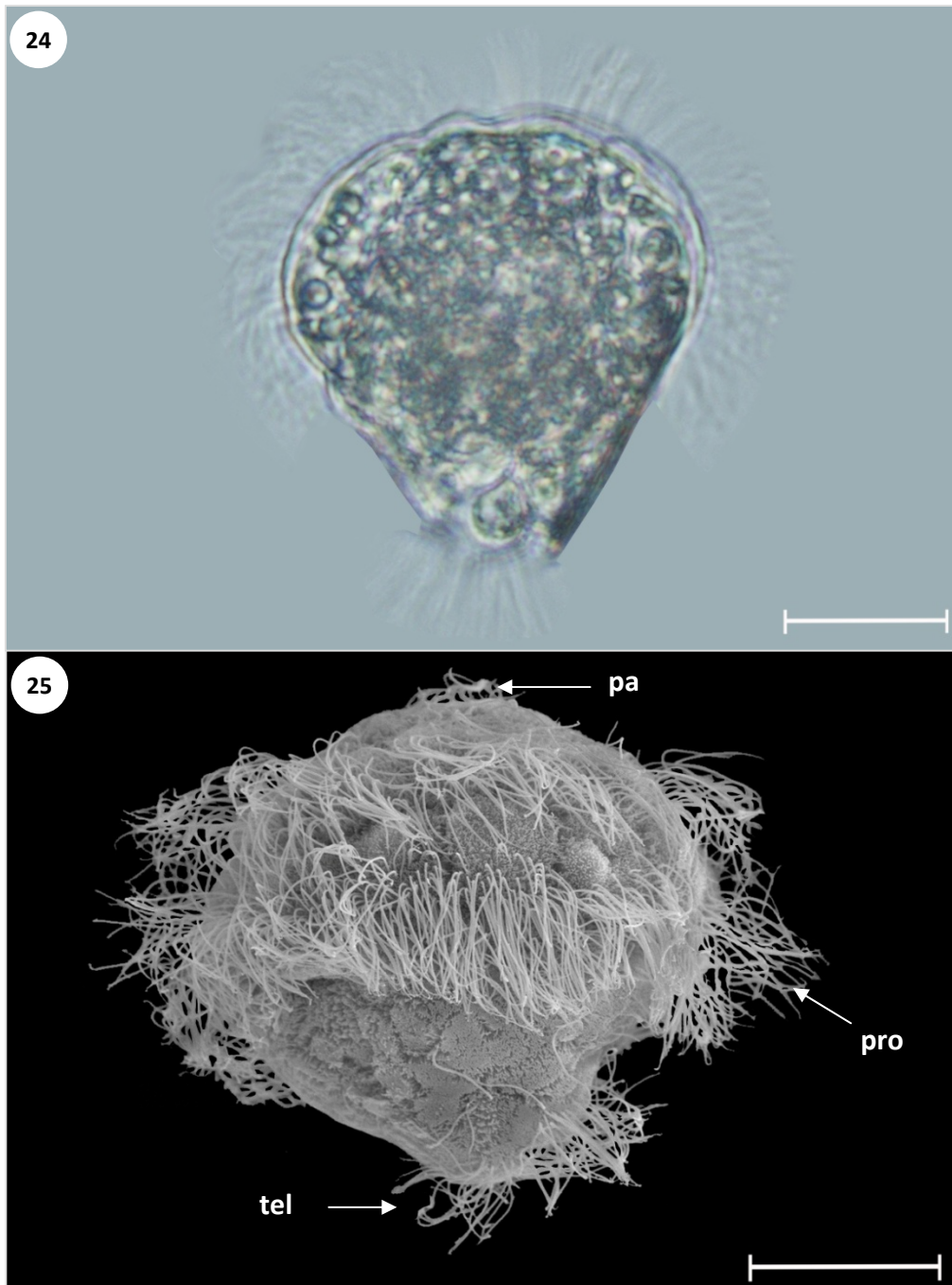


FIGURA 4 (24-25): Larva trocófora de *V. pullastra* 13-14 h después de la fertilización. **24:** Microfotografía al microscopio óptico. **25:** Vista lateral de la trocófora al microscopio electrónico de barrido con el penacho apical (pa), la telotroca (tel) y la prototroca (pro). Barras de escala: 20 μ m.

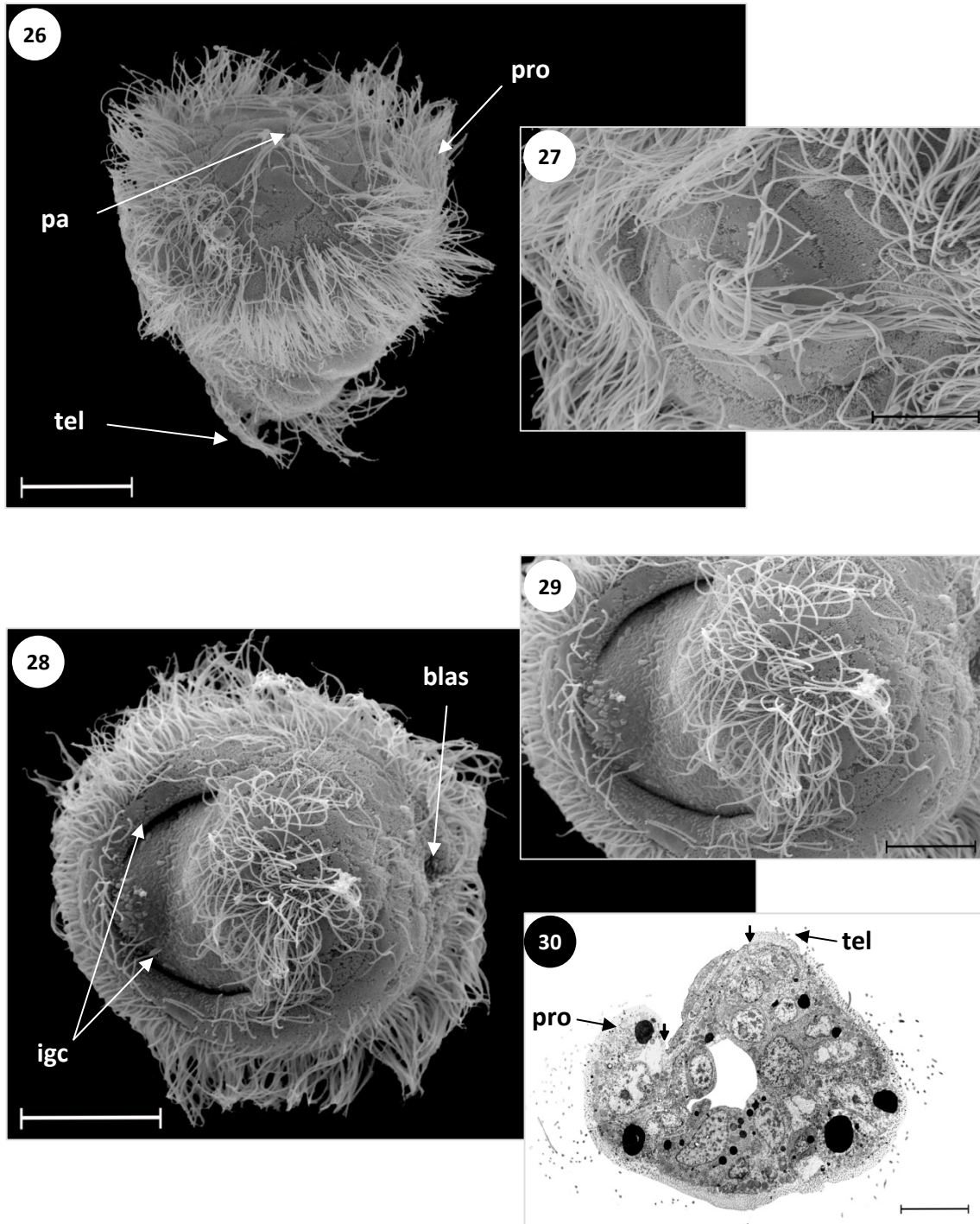


FIGURA 4 (26-30): Microfotografías al microscopio electrónico de barrido (MEB) y de transmisión (MET) de la larva trocófora de *V. pullastra*. **26:** Vista apical de la trocófora con el penacho apical (pa), la telotroca (tel) y la prototroca (pro). MEB. **27:** Detalle del penacho apical. MEB. **28:** Vista basal de la trocófora tardía mostrando la invaginación de la glándula de la concha (igc) y el blastoporo (bla). MEB. **29:** Detalle de la invaginación de la glándula de la concha. MEB. **30:** Sección sagital mostrando la prototroca (pro), la telotroca (tel) y la secreción del periostraco (entre flechas). MET. Barras de escala fotos 26 y 28: 20 μm ; foto 27: 5 μm ; foto 29 y 30: 10 μm .

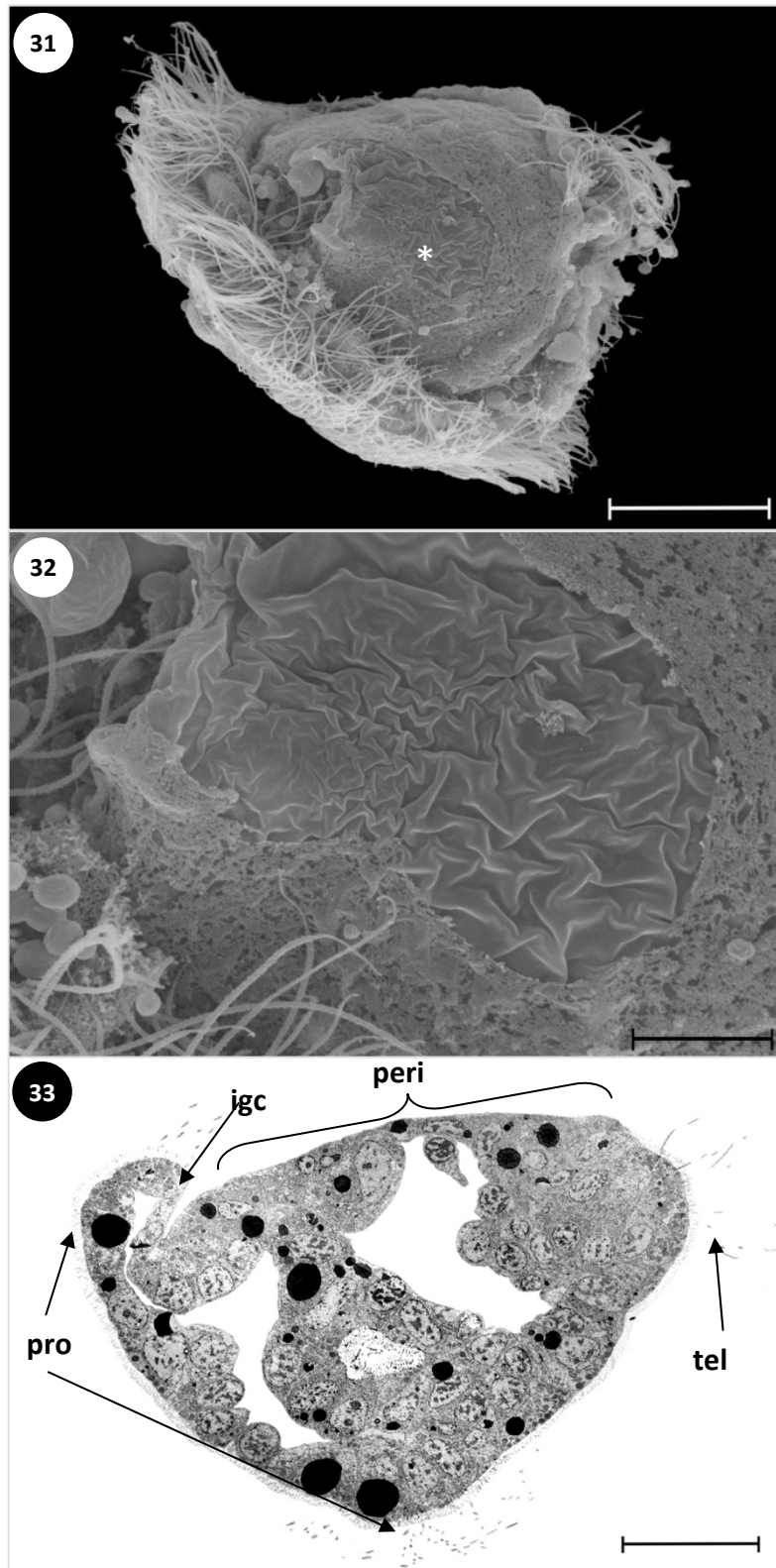


FIGURA 4 (31-33): Microfotografías al microscopio electrónico de barrido (MEB) y de transmisión (MET) de la transición de trocófora a larva D de *V. pullastra*. **31:** Transición de trocófora a larva D mostrando la secreción de la glándula de la concha (*). MEB. **32:** Detalle de la secreción. **33:** Sección longitudinal de la trocófora tardía con la telotroca (tel), prototroca (pro), la invaginación de la glándula de la concha (igc) y el periostraco (peri). MET. Barras de escala fotos 31 y 33: 20 μm ; foto 32: 5 μm .

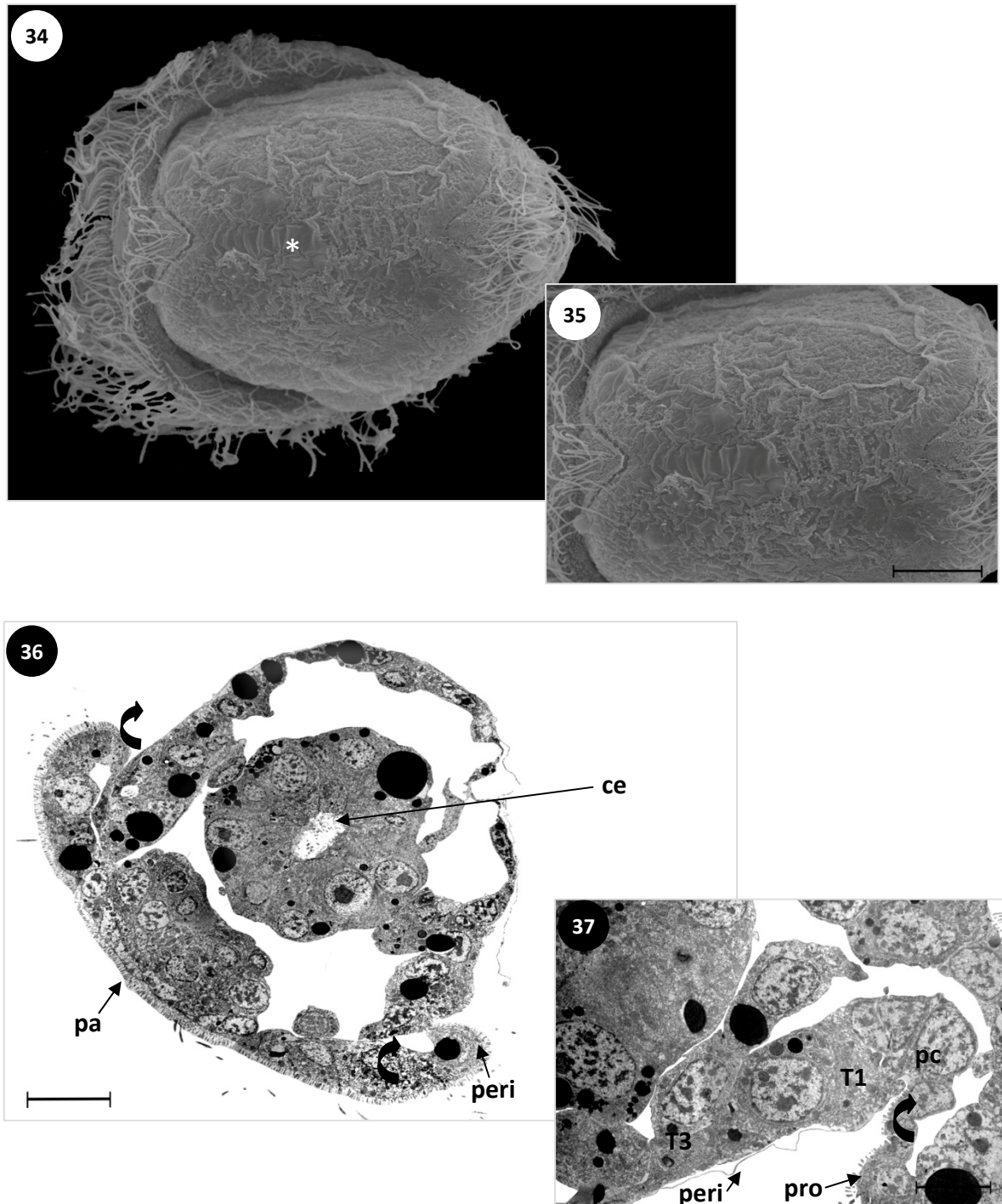


FIGURA 4 (34-37): Microfotografías al microscopio electrónico de barrido (MEB) y de transmisión (MET) de la transición de trocófora a larva D de *V. pullastra*. **34:** Transición de trocófora a larva D mostrando la charnela (*). MEB. **35:** Detalle de la charnela. MEB. **36:** Sección transversal de la trocófora tardía mostrando el periostraco (peri) secretado por la glándula de la concha, aparece como una línea fina unida a ambos bordes del manto (flechas curvadas). Se observa el penacho apical (pa) y el conducto del esófago (ce). MET. **37:** Detalle del periostraco (peri), mostrando su origen (flecha curvada) en el margen del manto secretado por las células secretoras T1 (T1). Células no secretoras T3 (T3) en contacto con las células de debajo de la prototroca (pc). Prototroca (pro). MET. Barra de escala fotos 34 y 36: 20 μm ; foto 35: 10 μm ; foto 37: 5 μm .

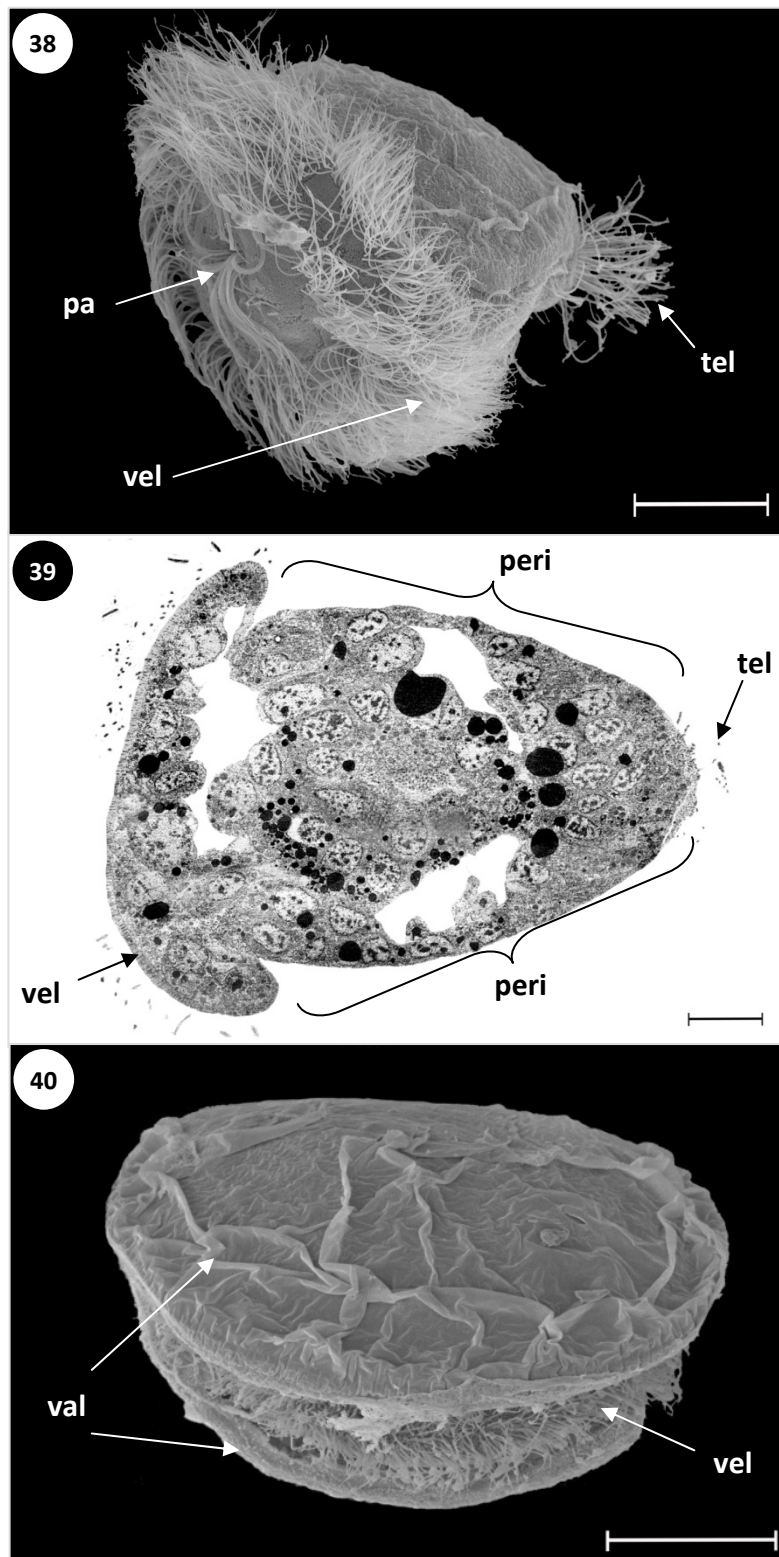


FIGURA 4 (38-40): Microfotografías al microscopio electrónico de barrido (MEB) y de transmisión (MET) de la transición de trocófora a larva D de *V. pullastra*. **38:** Transición de trocófora a larva D con el periostraco envolviendo las partes viscerales de la larva. Penacho apical (pa), velo (vel) y telotroca (tel). **MEB. 39:** Sección transversal de la trocófora tardía mostrando el periostraco (peri) secretado por la glándula de la concha, la telotroca (tel) y el velo (vel). **MET. 40:** Larva D temprana de 30 h con las valvas (val) todavía no calcificadas y el velo (vel). Barras de escala fotos 38 y 39: 20 μ m; foto 40: 10 μ m.

Tendrán que pasar 48 h desde la fecundación para observar la prodisoconcha I totalmente calcificada (Figuras 4.41 y 4.42). En la larva D se puede observar la charnela recta, característica de este estadio larvario (Figura 4.43, 4.45 y 4.46) y el velo (Figura 4.47). El velo es una corona ciliada ovalada formada por una banda de cilios preorales, una segunda de cilios cortos llamada banda adoral y una tercera más externa denominada postoral (Figura 4.42).

A partir de la formación de la larva D, con el velo totalmente desarrollado, la larva comienza a alimentarse y se produce un considerable aumento de tamaño, lo que implica un crecimiento de la concha, la prodisoconcha II. El estudio en detalle de microfotografías de MET permite observar una capa secundaria entre el tejido del manto y la capa simple del periostraco (Figura 4.44). La organización interna de esta capa secundaria aún no es obvia en este estadio, pero sí se pueden observar cristales de calcio en ella.

A los 8-9 días la larva comienza a umbonarse a nivel de la charnela, perdiendo la forma característica de "D". La larva umbonada mide en torno a 130-150 μm (Figuras 4.48, 4.49, 4.51, 4.52 y 4.53). En esta larva umbonada se distingue la prodisoconcha I de aspecto punteado y la prodisoconcha II con anillos concéntricos (Figura 4.50).

Entre los 16 y 18 días aparece la larva pediveliger en la que se observa todavía el velo ciliado y el pie también ciliado (Figuras 4.54, 4.55 y 4.56). Durante la metamorfosis el velo se reabsorbe, perdiendo la función de captación de alimento y desplazamiento, comenzando a desarrollarse los filamentos branquiales.

Veintidós días después de la fecundación, la postlarva con pie y sin velo, mide en torno a 250-270 μm . En ella se observa, además de la prodisoconcha I y II, la disoconcha secretada por el lóbulo del manto después de la fijación, y que en esta especie, además de unas líneas de crecimiento más marcadas, presenta microvellosidades (Figuras 4.57, 4.58, 4.59 y 4.60).

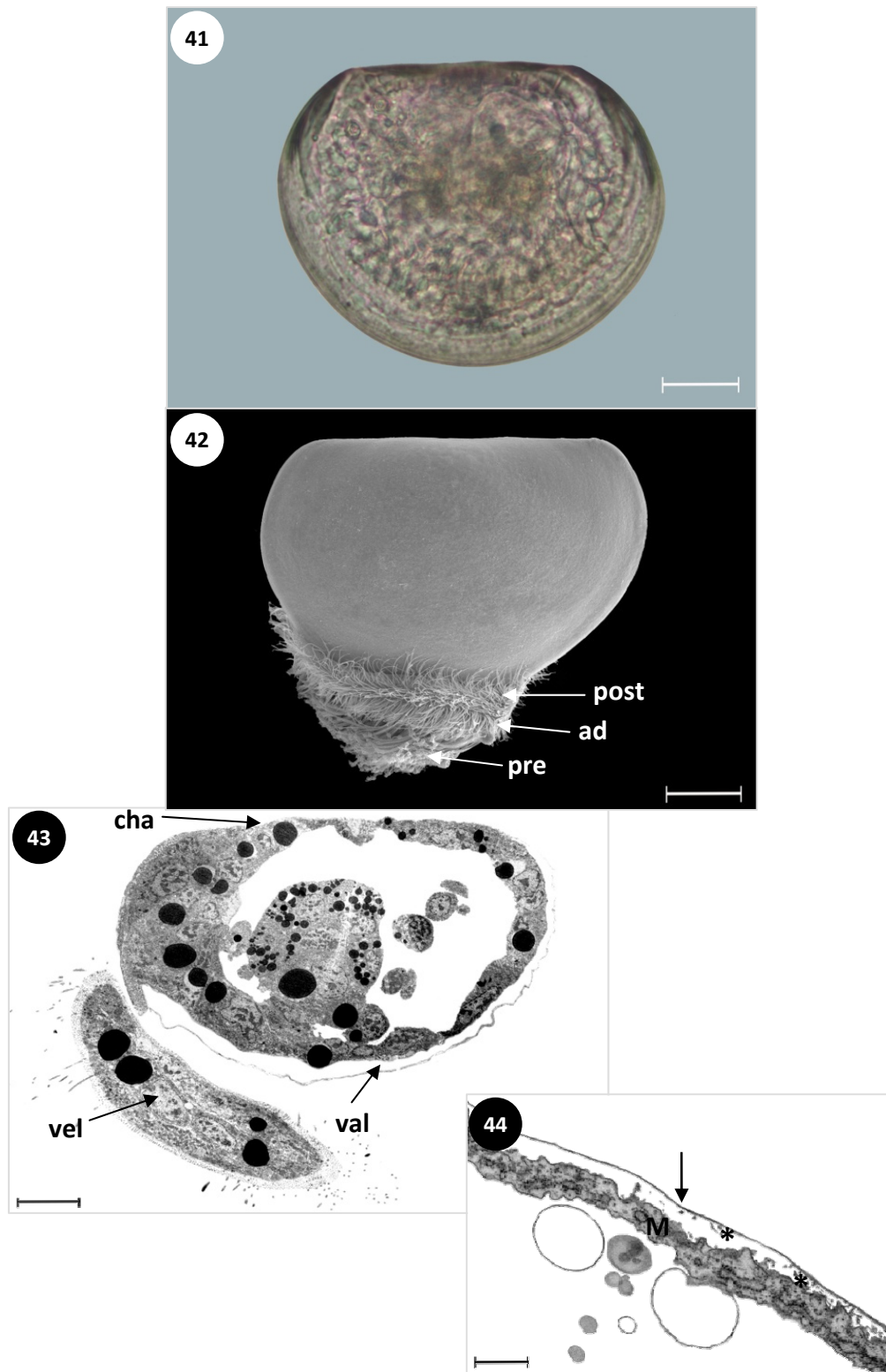


FIGURA 4 (41-44): Larva D de *V. pullastra* 48 horas después de la fertilización. **41:** Microfotografía al microscopio óptico. **42:** Microfotografías al microscopio electrónico de barrido de la larva D con el velo, vista lateral. Cilios preorales (pre), adorales (ad) y postorales (post). **43:** Sección longitudinal de la larva D al microscopio electrónico de transmisión con las valvas (val), el velo (vel) y la charnela (cha). **44:** Sección transversal de la prodisoconcha I de la larva D. Se observa una capa secundaria, localizada entre el manto (M) y el periostraco (flecha), en la que se incluyen los primeros cristales de calcio de la concha (asteriscos). Barras de escala fotos 41, 42 y 43: 20 μm ; foto 44: 0,5 μm .

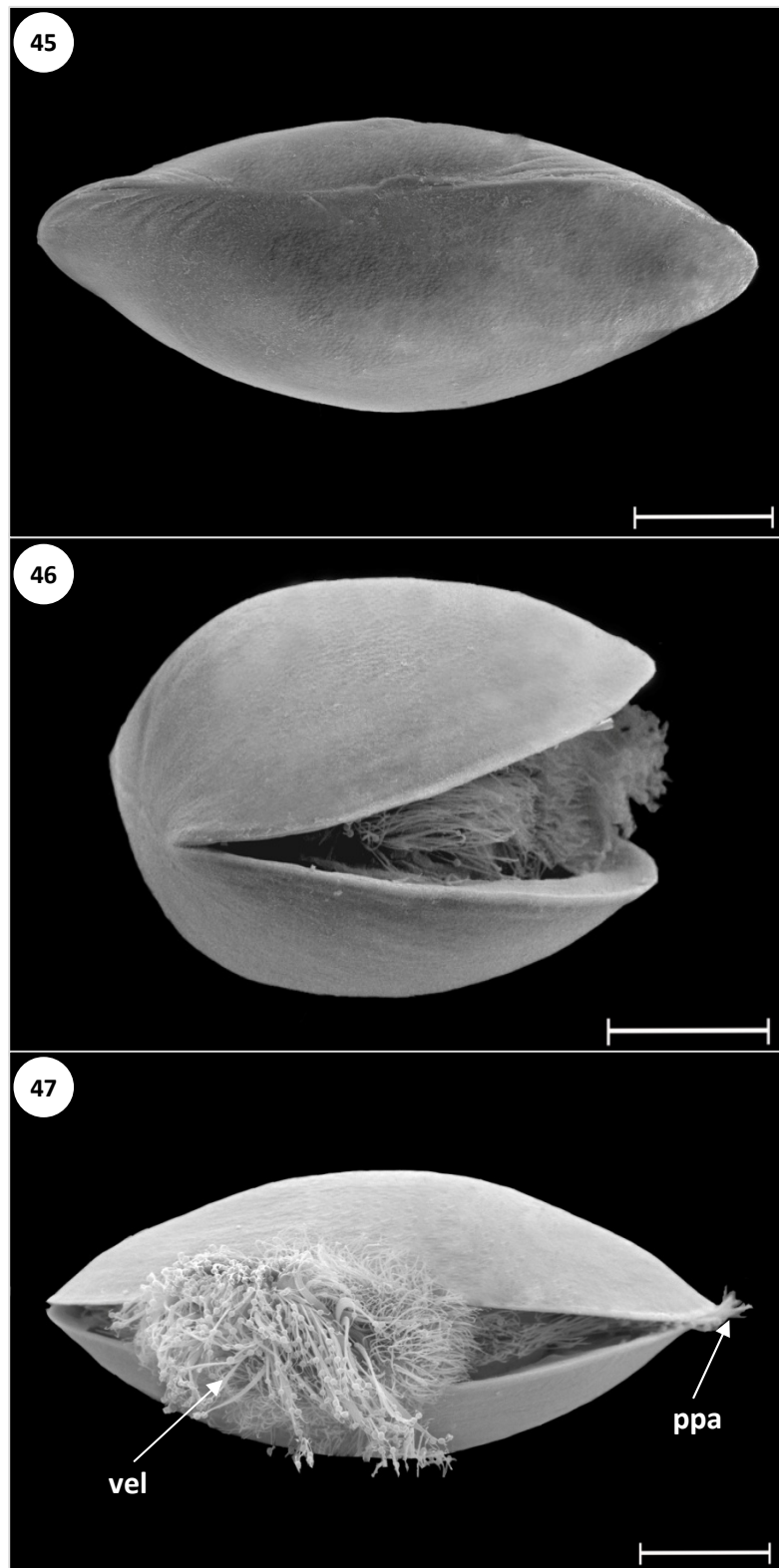


FIGURA 4 (45-47): Microfotografías al microscopio electrónico de barrido de la larva D de *V. pullastra*. **45:** Vista dorsal de la larva D con la charnela. **46:** Larva D con la charnela y el velo. **47:** Vista ventral de la larva D con el velo (vel) y el penacho postanal (ppa). Barras de escala: 20 μm .

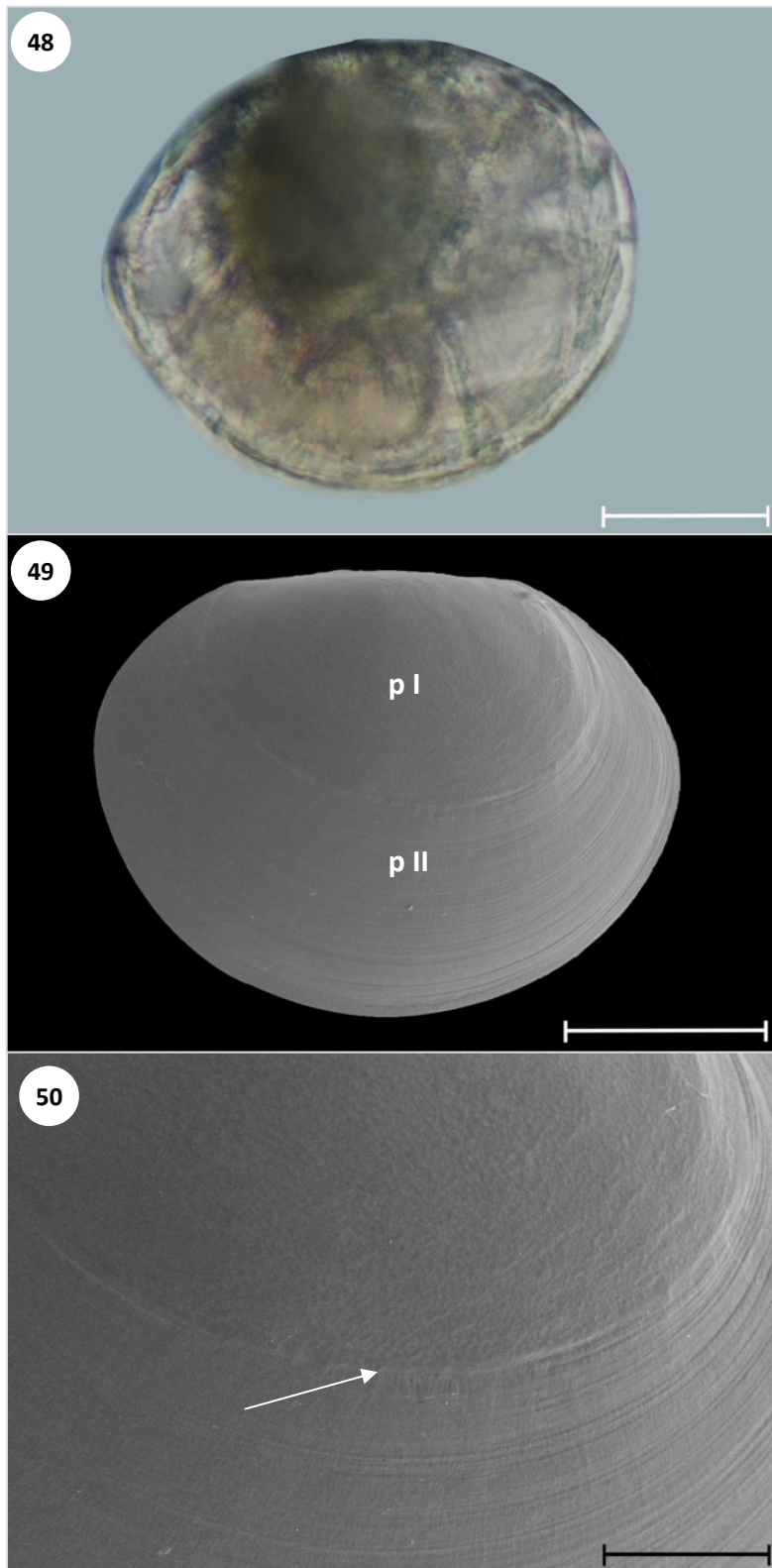


FIGURA 4 (48-50): Larva umbonada de *V. pullastra* 8-9 días después de la fertilización. **48:** Microfotografía al microscopio óptico de la larva umbonada. **49:** Larva umbonada al microscopio electrónico de barrido mostrando la transición de la prodisconcha I (pI) a la prodisconcha II (pII). **50:** Detalle de la transición (flecha). Barras de escala fotos 48 y 49: 50 μm ; foto 50: 20 μm .

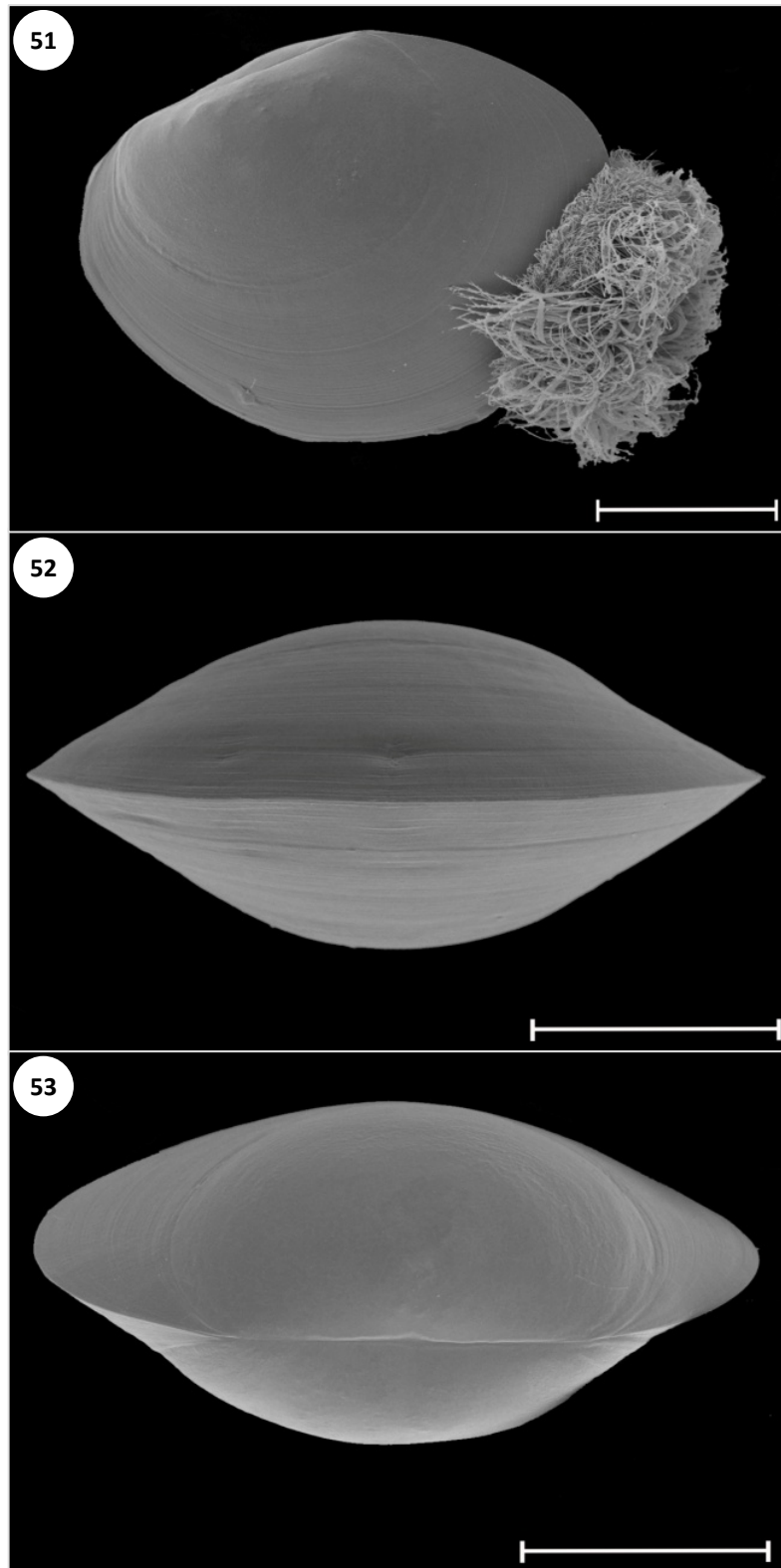


FIGURA 4 (51-53): Microfotografías al microscopio electrónico de barrido de la larva umbonada de *V. pullastra*. **51:** Larva umbonada mostrando el velo. **52:** Larva umbonada, vista ventral. **53:** Vista dorsal de la larva umbonada con la charnela. Barras de escala: 50 µm.

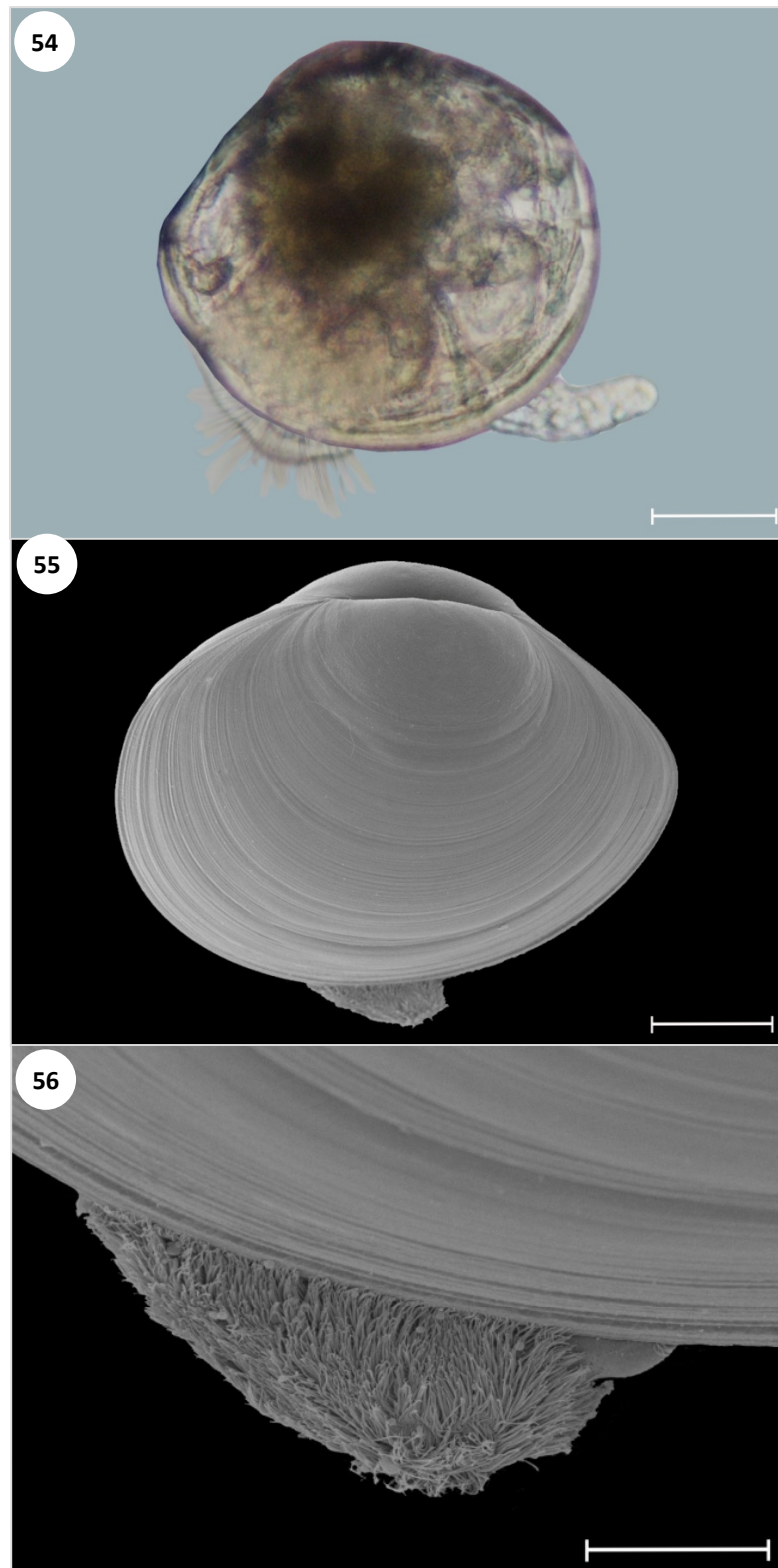


FIGURA 4 (54-56): Larva pediveliger de 16-18 días de *V. pullastra*. **54:** Microfotografías al microscopio óptico de una larva pediveliger mostrando el pie y el velo. **55:** Microfotografías al microscopio electrónico de barrido de una larva pediveliger con el pie. **56:** Detalle del pie ciliado de la larva pediveliger. Barras de escala fotos 54 y 55: 50 μm ; foto 56: 20 μm .

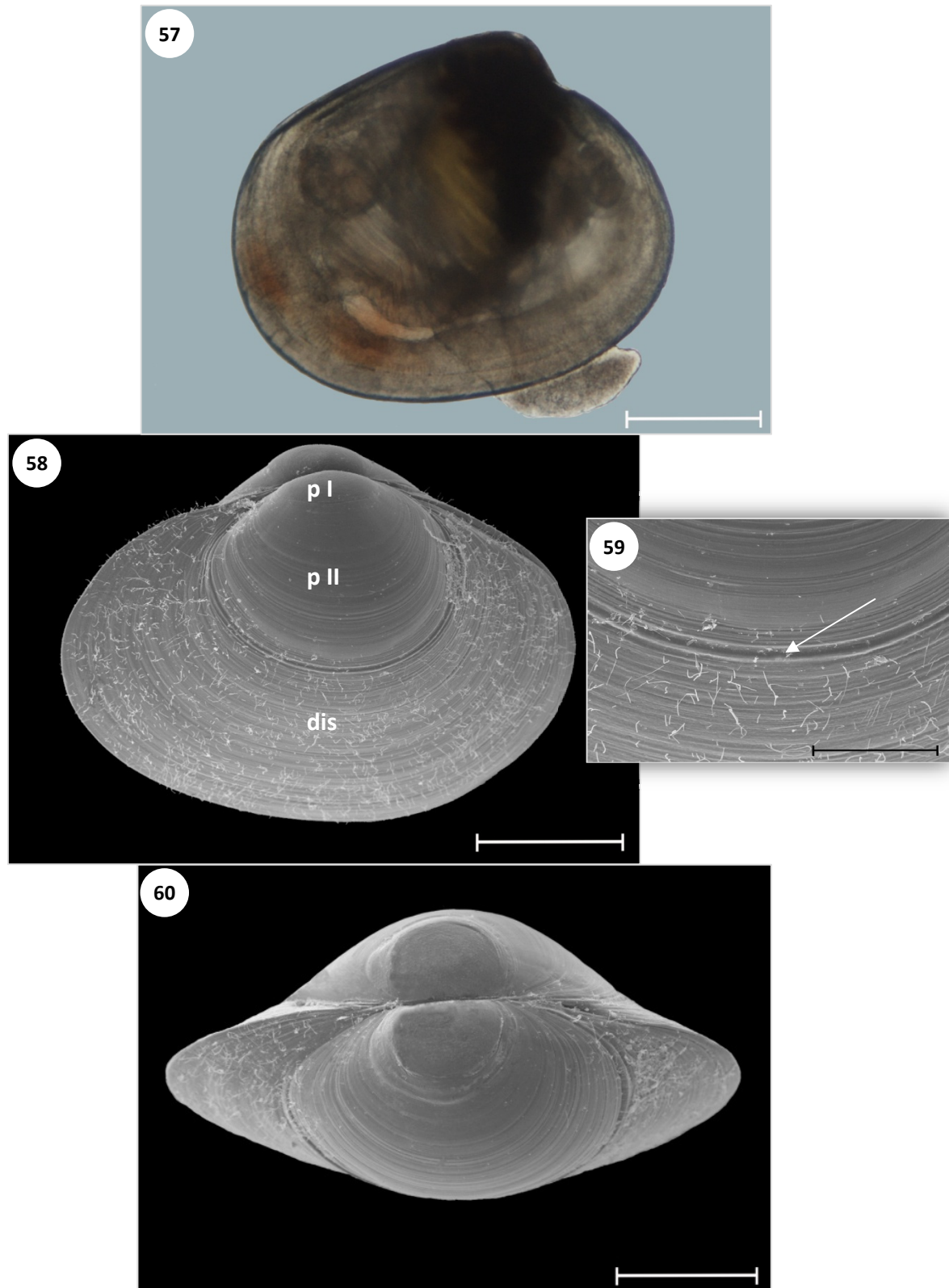


FIGURA 4 (57-60): Postlarva de 21-22 días de *V. pullastra*. **57:** Fotografía al microscopio óptico de la postlarva. **58:** Fotografía al microscopio electrónico de barrido de la postlarva con la prodissoconcha I (p I), la prodissoconcha II (p II) y la dissoconcha (dis). **59:** Detalle de la transición de la prodissoconcha II a la dissoconcha (flecha). **60:** Vista dorsal de la postlarva con la charnela. Barras de escala fotos 57, 58 y 60: 100 μm ; foto 59: 50 μm .

4.4 DISCUSIÓN

Aunque existen estudios sobre el desarrollo embrionario y morfología larvaria de otros bivalvos utilizando microscopía electrónica de barrido (Hodgson y Burke, 1988; Bellolio *et al.*, 1993; Tardy y Dongrad, 1993; Gros *et al.*, 1997; Mouëza *et al.*, 1999 y 2006; Raleigh y Keegan, 2007; Cannuel *et al.*, 2009; da Costa *et al.*, 2008; da Costa, 2009 y Aranda, 2010), éste es el primero que se realiza en la almeja babosa *Venerupis pullastra*.

El tamaño de los ovocitos de *V. pullastra* es similar al de otras especies de Venéridos de interés comercial en Galicia, como *Ruditapes decussatus*, *R. philippinarum* y *V. rhomboides* (Martínez Patiño *et al.*, 2008 y 2010).

La cabeza de los espermatozoides de *V. pullastra* presenta una forma cilíndrica, y es más pequeña que la de *R. decussatus* (Aranda, 2010), la cual presenta una forma de trompeta. El tamaño de los espermatozoides, incluida la cola, es similar al de *Ensis siliqua* (da Costa, 2009) y al de otras especies de Venéridos, como *Anomalocardia brasiliana* y *Chione cancellata* (Mouëza *et al.*, 1999 y 2006).

La segmentación del huevo es, al igual que en el resto de los bivalvos, espiral y conduce a la formación de una blástula del tipo esteroblástula, en la que los macrómeros recubren totalmente los micrómeros. **La blástula en *V. pullastra*, primer estadio ciliado, aparece 5 h y 30 min después de la fertilización.** Pérez Camacho y Román (1973) en un estudio realizado en esta misma especie detectaron la aparición de los primeros estadios móviles entre 6 y 7 horas después de la fertilización, un tiempo similar al encontrado en este estudio. De entre las especies cultivadas en Galicia, el tiempo de aparición de la blástula en *V. pullastra* es similar a *Ensis siliqua* y *R. decussatus*, y más rápido que en *E. arcuatus* y *Donax trunculus* (da Costa *et al.*, 2008; Aranda *et al.*, 2009; da Costa, 2009 y Louzán, comunicación personal).

Al igual que ocurre en otros bivalvos la gastrulación ocurre por epibolia. En ella los micrómeros se multiplican rápidamente, y se sitúan rodeando a los macrómeros, formándose así el ectodermo y el endodermo. **En *V. pullastra*, 7-8 h después de la fecundación, se desarrolla una gástrula**, tiempo similar al obtenido por da Costa (2009) en *E. siliqua* y Aranda (2010) en *R. decussatus*.

Con el microscopio electrónico de barrido se confirma que **en la gástrula de *V. pullastra*, se observan dos invaginaciones, el blastoporo y la invaginación de la glándula de la concha**. En otras especies de bivalvos, como *C. cancellata* (Mouëza *et al.*, 2006), *A. brasiliiana* (Mouëza *et al.*, 1999), *R. decussatus* (Aranda, 2010), *E. arcuatus* y *E. siliqua* (da Costa *et al.*, 2008 y da Costa, 2009), también se confirma la presencia de ambas invaginaciones cuando la gástrula presenta unos pocos cilios, antes de formarse la prototroca característica de la trocófora.

La larva trocófora en *V. pullastra* aparece 13-14 h después de la fertilización, siendo un tiempo similar al de la aparición de la trocófora en otras especies de bivalvos, como en *R. decussatus*, *E. siliqua* y *D. trunculus* (Aranda *et al.*, 2009; da Costa, 2009 y Louzán, comunicación personal). La larva trocófora nada activamente gracias a la corona de cilios que presenta, la prototroca.

La invaginación de la glándula de la concha que se desarrolla en el estadio de gástrula, **en la trocófora aparece situada debajo de la prototroca**. Gracias a las observaciones realizadas con el microscopio electrónico de transmisión, **ambas constituyen una hendidura abierta en la parte dorsal de la trocófora, a partir de la cual se secreta el periostraco**. En la trocófora tardía la secreción de la glándula de la concha, de aspecto membranoso, se va expandiendo en direcciones opuestas, quedando las dos regiones unidas por una banda más gruesa que será la futura charnela. Finalmente, **30 h después de la fertilización, el periostraco acaba envolviendo las partes blandas de la larva y se forma la larva D, característica por la presencia del velo y la charnela recta**.

La formación de la primera concha larvaria, según lo observado en *V. pullastra*, se ajusta con el modelo descrito por Mouëza *et al.* (2006) para el venéreo *C. cancellata*, en el cual se proponía una interpretación distinta a la propuesta por Kniprath (1980) en *Mytilus galloprovincialis* y Casse *et al.* (1998) en *Pecten maximus*, las cuales se basaban en el modelo descrito para gasterópodos. Tanto en *V. pullastra* como en *C. cancellata*, no es necesario que la invaginación de la glándula de la concha se cierre por completo para comenzar la secreción del periostraco.

El estudio comparativo realizado con MEB y MET muestra los movimientos morfogénicos que hacen que la glándula de la concha se localice en posición dorsal debajo de la futura prototroca, en el que se desarrollan una capa de células ciliadas de distintos tipos cubriendo la glándula de la concha, a partir de la cual se forma la prodisoconcha. En el trabajo realizado por Mouëza *et al.* (2006) en la especie *C. cancellata* describen los distintos tipos de células. El periostraco es la primera parte visible de la concha y se forma a partir de células secretoras T1. En un primer momento, el periostraco es continuo ya que los polos apicales de las células secretoras del ligamento T2 están recubiertas por las células secretoras T1. En nuestro estudio con *V. pullastra* no se ha podido observar las células secretoras del ligamento T2. Las células no secretoras T3 se derivan de células madre T1 y no elaboran el material del periostraco, sino que producen la capa orgánica segunda de la concha y están ligadas con la calcificación de la misma.

Tras la observación al microscopio electrónico de barrido se ha podido confirmar que, al igual que en *R. decussatus* (Aranda, 2010), en la larva D recién formada, la prodisoconcha I es todavía de aspecto membranoso, **teniendo que pasar 48 h tras la fecundación para que las valvas de la prodisoconcha estén totalmente calcificadas.**

El órgano más característico de la larva D es el velo, que debido a su naturaleza ciliada, es utilizado para la natación y la captura de alimento. A partir de este estadio, la larva comienza a alimentarse y la prodisoconcha comienza a crecer. **La**

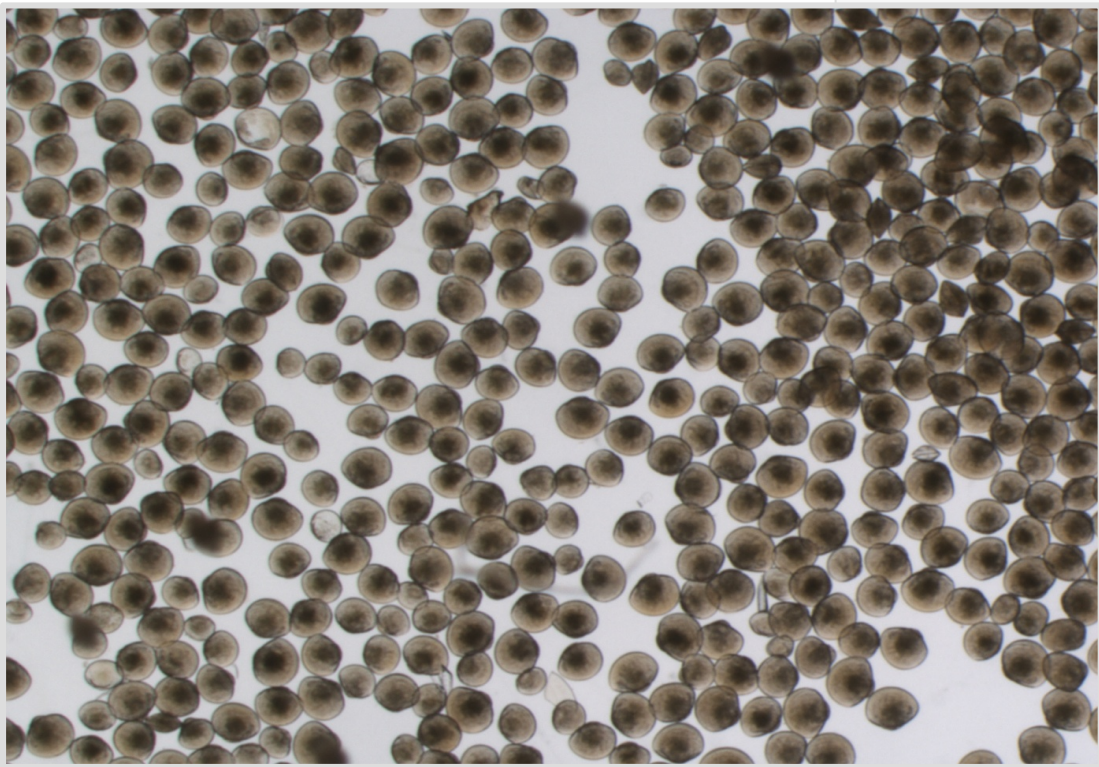
prodisoconcha I, secretada por la glándula de la concha, **presenta una superficie punteada**, mientras que **la prodisoconcha II**, secretada por el lóbulo del manto cuando la larva D comienza a alimentarse, **presenta una superficie estriada concéntricamente**.

En *V. pullastra*, entre los 16 y 18 días después de la fecundación, aparece la larva pediveliger en la que se observa todavía el velo y el pie, ambos ciliados. En este momento la larva comienza a buscar un substrato para fijarse, pudiendo nadar por breves períodos de tiempo y reptar por el substrato. Durante la metamorfosis el velo se reabsorbe, perdiendo la función de captación de alimento y desplazamiento, comenzando a desarrollarse los filamentos branquiales.

Después de la fijación y metamorfosis, 22 días después de la fecundación, la postlarva comienza a crecer y el manto inicia la secreción de la disoconcha, observándose unas líneas de crecimiento más marcadas. A diferencia de otros bivalvos, como *E. arcuatus* y *E. siliqua* (da Costa *et al.*, 2008 y da Costa, 2009), *R. decussatus* (Aranda, 2010) y *D. trunculus* (Louzán, comunicación personal), la disoconcha de *V. pullastra* presenta microvellosidades. Éstas podrían servir como una adaptación al medio para mantenerse enterrados y evitar el desplazamiento por las corrientes en las primeras fases postlarvarias tras la fijación. Un estudio secuencial de la morfología de la concha de postlarvas y semilla permitiría determinar durante qué fases están presentes estas microvellosidades. Además, puesto que no se ha descrito la presencia de éstas en otras especies de bivalvos comerciales de Galicia, podría ser un buen carácter taxonómico para la identificación de postlarvas de *V. pullastra*.

En relación a otros bivalvos de interés comercial en Galicia cultivados en las mismas condiciones en el Centro de Cultivos Mariños de Ribadeo, la metamorfosis en *V. pullastra* tiene lugar más tarde que en *E. arcuatus* (da Costa *et al.*, 2008), *E. siliqua* y *Solen marginatus* (Martínez Patiño, 2002) y es más rápida que en *R. decussatus* (Martínez Patiño *et al.*, 2001), *R. philippinarum* (Martínez Patiño *et al.*, 2008) y *D. trunculus* (Louzán *et al.*, 2009).

5. CAPÍTULO III: CULTIVO EN CRIADERO



5. CAPÍTULO III: CULTIVO EN CRIADERO

5.1 INTRODUCCIÓN

La producción de moluscos bivalvos y en concreto de almejas, constituye un sector económico de elevadas posibilidades en el litoral español. Es un dato conocido que la producción de almejas sólo alcanza una sexta parte de la demanda de nuestro mercado nacional, siendo cubierta básicamente con importaciones. Dentro de la relativa situación socioeconómica de diversas zonas del litoral, la extracción, semicultivo y acuicultura de moluscos, representa una dedicación de miles de personas y muy diversas empresas, constituyendo una alternativa real de desarrollo local. Esta importancia socioeconómica se expresa de forma relevante en Galicia.

Entre las especies de moluscos bivalvos, concretamente de almejas, que inciden de forma clara en la actividad económica de algunas poblaciones ribereñas gallegas destacan: la almeja fina (*Ruditapes decussatus*), la almeja babosa (*Venerupis pullastra*), la almeja rubia (*V. rhomboides*) y la almeja japonesa (*R. philippinarum*), especie introducida en Galicia.

De estas cuatro especies, la almeja babosa, tiene una gran importancia en Galicia por la cuantía económica que representa su explotación comercial. Como se ha comentado en la Introducción General, según los datos del Servicio de Estadística de la Consellería do Mar, su evolución en la producción comercial pasó de 2.700 Tm en 1998 a 1.200 Tm en el año 2010, pasando por un mínimo de producción en el 2006 con 821 Tm. Esta disminución progresiva es debida a la sobreexplotación de los bancos naturales y también, a mortalidades ocurridas en algunas zonas donde hubo abundantes lluvias (con bajadas de salinidad), que provocaron la muerte en esta especie, poco tolerante a variaciones de este parámetro. Para aumentar la producción de almeja babosa en los bancos naturales se puede recurrir a la siembra de semilla procedente de criadero.

5. Cultivo en criadero

El cultivo en criadero de bivalvos ha sido la línea de investigación de moluscos que quizás ha experimentado la progresión más significativa a lo largo de los últimos cincuenta años. Los primeros trabajos se iniciaron en los laboratorios de Milford (EEUU) por el equipo de Loosanoff y en Conway (Reino Unido) con los estudios de Walne. Sus trabajos esencialmente consistían en determinar los parámetros óptimos que favorecían el éxito del cultivo y entre las especies que cultivaron se encuentran: *Ostrea edulis*, *Crassostrea gigas*, *Mytilus edulis* y *R. philippinarum*.

Estos trabajos, recopilados en dos publicaciones (Loosanoff y Davis, 1963 y Walne, 1966), obtuvieron resultados reproducibles que permitieron aplicar la tecnología al cultivo de especies de interés comercial y pasar de una escala experimental a un nivel industrial de producción en criaderos.

En la década de los 70 se constituyeron los primeros criaderos industriales para el cultivo de bivalvos en Galicia. Entre los años 1972 y 1975 se realiza un programa de investigación conjunta entre el Instituto Español de Oceanografía y el Plan de Explotación Marisquera de Galicia, donde se estudian las posibilidades de cultivo en criadero de las especies de bivalvos de mayor interés comercial. En este trabajo, realizado por Pérez Camacho, Román Cabello y Torres Cervigón, se realizan las primeras experiencias de cultivo de *V. pullastra*, *R. decussatus* y *O. edulis* (Pérez Camacho *et al.*, 1977).

La Administración Pública ubica un criadero en Ribadeo a finales de esta década. Desde 1978 se vienen realizando en esta instalación cultivos larvarios, postlarvarios y de semilla de especies de moluscos bivalvos de interés comercial, hasta una talla adecuada para su traslado al medio natural (Guerra, 1979). Los primeros trabajos se hicieron con la ostra plana (*O. edulis*) y la almeja fina (*R. decussatus*), posteriormente basándose en la técnicas empleadas para estas especies, y con adaptaciones en cada caso, se han cultivado otras de interés comercial en Galicia. En la actualidad, en el Centro de Cultivos Mariños de Ribadeo se cultivan las siguientes especies (Martínez Patiño *et al.*, 2008): almeja babosa (*V. pullastra*), almeja fina (*R. decussatus*), almeja japonesa (*R. philippinarum*), almeja rubia (*V. rhomboides*), coquina

(*Donax trunculus*), navaja (*Ensis arcuatus*), longueirón (*E. siliqua*), longueirón vello (*Solen marginatus*) y erizo (*Paracentrotus lividus*).

Las técnicas empleadas en los criaderos son conocidas y se practican a nivel industrial desde hace más de 30 años, sin embargo, es necesario abordar diversas problemáticas que se plantean en las distintas etapas de los cultivos. Así, en el Centro de Cultivos Mariños de Ribadeo, se han realizado numerosos estudios sobre el acondicionamiento de reproductores (Ojea *et al.*, 2007 y 2008 y da Costa *et al.*, 2005), cultivo larvario (Martínez Patiño *et al.*, 2001; Louzán *et al.*, 2007; Nóvoa, 2007; Aranda *et al.*, 2009; Ojea *et al.*, 2009 y da Costa *et al.*, 2010a y 2010b), cultivo postlarvario y producción de semilla (Martínez Patiño *et al.*, 2001 y da Costa y Martínez Patiño, 2009), la alimentación (Ojea *et al.*, 1999; Nóvoa *et al.*, 2002 y Martínez Patiño *et al.*, 2007), o la composición bioquímica y de ácidos grasos (Martínez Patiño *et al.*, 2002; Nóvoa *et al.*, 2003 y 2007 y da Costa, 2009), todos ellos encaminados a la optimización del cultivo.

Los criaderos varían enormemente en cuanto a su diseño, configuración y construcción, a la ubicación, en función de las especies cultivadas, y sobre todo, de los objetivos de producción. Sin embargo, los elementos básicos son los mismos para cualquier criadero de bivalvos e incluyen una zona para estabular, acondicionar los reproductores e inducirlos a la puesta, una zona para cultivar las larvas y postlarvas y para mantener la semilla hasta una talla adecuada, y unas instalaciones para la producción de fitoplancton a pequeña y gran escala.

El cultivo de fitoplancton en un criadero es necesario debido a que el contenido de microalgas natural del agua de mar utilizada, es insuficiente para garantizar el crecimiento óptimo de las grandes densidades de larvas y juveniles que se cultivan. Además, durante los tratamientos a los que es sometida el agua utilizada en el criadero se elimina el fitoplancton natural, por lo que debe de ser substituido por microalgas cultivadas.

5. Cultivo en criadero

Las microalgas marinas unicelulares son productoras primarias y se encuentran en la base de la cadena trófica marina. De entre ellas, las especies flageladas y las diatomeas se cultivan como alimento para las diferentes etapas del cultivo en criadero de bivalvos. Las especies más empleadas en climas templados son: *Tetraselmis suecica*, *Isochrysis galbana* y *Pavlova lutheri* dentro de las flageladas, y *Chaetoceros calcitrans*, *C. mulleri*, *Skeletonema costatum*, *Thalassiosira pseudonana* y *Phaeodactylum tricornutum* dentro de las diatomeas.

La calidad y cantidad de alimento que se suministra, son parámetros importantes en el éxito de las distintas fases del cultivo. Además de que tengan un tamaño adecuado para ser ingeridas, generalmente entre 2 y 10 μm , el valor nutricional de las microalgas y la digestibilidad son aspectos importantes en la elección de las especies que se van a suministrar en la dieta. En general, se observa que la mezcla de varias especies microalgales (dietas multiespecíficas) tienen un efecto sinérgico sobre el crecimiento y supervivencia de las larvas de los bivalvos marinos (Epifanio, 1976).

El fitoplancton se cultiva en agua de mar natural tratada y enriquecida con nutrientes adicionales como nitratos, fosfatos, oligoelementos esenciales, vitaminas y dióxido de carbono como fuente de carbono. Además, en el cultivo de las diatomeas se añaden silicatos. En los criaderos el cultivo puede ser intensivo en el interior, con iluminación artificial, o bien el sistema de cultivo extensivo en el exterior, en grandes tanques o estanques haciendo uso de la luz natural.

La estabulación de reproductores en un criadero para la obtención de puestas controladas se puede realizar siguiendo dos estrategias. Por un lado, se puede aprovechar la época de puesta natural, estabulando los reproductores en la época de madurez y obteniendo los desoves de los reproductores recién traídos del medio. Por el otro lado, se pueden acondicionar reproductores fuera de su época de puesta natural. Para ello se manipula el medio físico y la alimentación, promoviendo el desarrollo gonadal y la gametogénesis, para así conseguir adelantar la madurez sexual y ampliar los períodos de puesta de gametos.

Durante el acondicionamiento los factores ambientales más importantes sobre los que generalmente se inciden son la temperatura y la alimentación. Los cambios estacionales de temperatura y abundancia de fitoplancton en el medio natural frecuentemente están relacionados con el desarrollo gonadal y la gametogénesis en invertebrados marinos (Sastry, 1979). Es por ello que, para favorecer la maduración de los reproductores durante el acondicionamiento, se someten a incrementos de temperatura y a suministros de alimento elevados.

Además de la alimentación y la temperatura en especies como *R. decussatus* y *C. gigas*, las condiciones de fotoperíodo es otro de los factores que inciden en la gametogénesis (Fabioux *et al.*, 2005 y Martínez *et al.*, 2005).

La inducción a la puesta en un criadero permite obtener desoves cuando se necesitan, siempre que los individuos presenten gametos maduros. Esto permite planificar los cultivos, además de realizar una fecundación controlada. En la inducción a la puesta o “spawning”, los bivalvos maduros son estimulados a liberar sus gametos en respuesta al estímulo que se les ha aplicado. Existen diversos métodos para la inducción en bivalvos:

-Métodos físicos: choque térmico, como en *V. pullastra* y *V. aurea* (Le Pennec, 1970) o en *Pecten maximus* (Román y Pérez Camacho, 1976); adición de gametos, en *C. gigas* y *C. virginica* (Galtstoff, 1930); y el efecto combinado de los cambios de temperatura y la adición de gametos, como en *C. gigas* (Davis, 1953 y Loosanoff, 1954).

-Métodos químicos: como la inyección de serotonina en *R. decussatus*, *R. philippinarum* y *P. maximus* (Pérez Camacho y Román, 1987); de peróxido de hidrógeno en *M. edulis* y *M. californianus* (Morse *et al.*, 1977); de cloruro potásico en *M. edulis* (Iwata, 1951a); de hidróxido amónico o cloruro de bario en *M. edulis* y *R. philippinarum* (Iwata, 1951b); hidróxido potásico en *Patinopecten yessoensis* (Kinoshita, 1943); e inyectar soluciones de amoniaco en la gónada de *Mercenaria mercenaria* y *R. philippinarum* (Loosanoff y Davis, 1963).

5. Cultivo en criadero

-Otros métodos: flujo de agua pasada por ultravioleta sin añadir alimento en *Chlamys opercularis* (Le Penneq, 1981); o concentraciones elevadas de alimento en *Siliqua patula* (Breese y Robinson, 1981).

Cuando se obtienen los huevos, ya sea de una puesta espontánea o inducida, se incuban para que tenga lugar la **embriogénesis**. Ésta incluye una serie de procesos que se inician con la fecundación, continúan con la segmentación del huevo, la formación de la blástula y la gástrula, y finalizan con la aparición del primer estadio larvario, la trocófora. En este estadio aparece la glándula de la concha, la cual secreta la primera concha larvaria, que acabará envolviendo la larva trocófora para dar lugar a la larva D. Esta fase dura, dependiendo de la especie, entre 24 y 48 h.

Todos los cambios que ocurren durante el desarrollo embrionario hasta la formación de los primeros estadios larvarios, tienen lugar gracias a las reservas almacenadas en el ovocito. A partir de la aparición de la larva D, el velo está totalmente desarrollado, la larva comienza a alimentarse y se inicia el cultivo larvario.

Durante el **cultivo larvario** las larvas pasan por los distintos estadios larvarios, hasta que se forma la larva pediveliger, con el pie totalmente desarrollado y el velo todavía funcional.

Entre los factores ambientales que afectan al crecimiento de las larvas, la temperatura y la alimentación son los que han recibido más atención (Bayne, 1983). En el control de la nutrición, además de la cantidad, se debe controlar la calidad del alimento suministrado para cubrir todas las necesidades nutricionales de las larvas. Otro de los factores importantes en el cultivo larvario es la temperatura a la que se desarrolla, puesto que cada especie tiene un rango óptimo en el que se maximiza crecimiento y supervivencia hasta la metamorfosis.

La duración del cultivo larvario depende de la especie cultivada y de las condiciones generales del cultivo.

En el momento que la larva pediveliger se fija al fondo finaliza la vida planctónica y comienza la metamorfosis, fase crítica en la que el éxito depende de las reservas adquiridas durante el cultivo larvario. Durante ésta se reabsorbe el velo, perdiendo la función de captación de alimento y desplazamiento, comenzando a desarrollarse los filamentos branquiales.

Además, en la postlarva, se producen cambios como la reorientación de los órganos, aparición de los palpos labiales, el desarrollo del sistema digestivo, aumentando la complejidad del mismo (desarrollo de la glándula digestiva, las distintas porciones del estómago y alargamiento del saco del estilo), diferenciación de los nervios y ganglios, desarrollo del corazón y los sistemas vascular y excretor, y desarrollo de los pliegues del manto, musculatura y tentáculos (Elston, 1999).

En cuanto finaliza la metamorfosis los individuos resultantes tienen ya el mismo aspecto externo que un individuo adulto e internamente presenta todos los órganos desarrollados. En este momento se inicia el cultivo postlarvario.

En el cultivo de las postlarvas hay diversos factores que influirán en el éxito del cultivo: la densidad, el flujo de agua, la calidad del agua, la temperatura y por supuesto, la alimentación. Además, hay que tener en cuenta las operaciones de manejo.

A partir de que las postlarvas adquieren un tamaño adecuado se trasladan al semillero que, dependiendo de cada productor, tendrá unas características determinadas. En este momento comienza el cultivo de semilla que durará hasta que ésta tenga un tamaño adecuado para su cultivo en el medio natural.

Como se expone en la Introducción del capítulo IV, los criaderos cultivan la semilla hasta una talla determinada, que viene dada principalmente por los requisitos de los productores, que normalmente requieren semilla de gran tamaño. Sin embargo, los criaderos prefieren suministrarla del menor tamaño posible, ya que el cultivo de semilla lleva implícito el cultivo de fitoplancton en volúmenes cada vez mayores y a

medida que ésta crece las necesidades de espacio aumentan. En el siguiente capítulo se estudiarán diferentes sistemas y parámetros de cultivo en el preengorde de *V. pullastra* como fase previa a la siembra en el medio natural.

En este trabajo se definen las condiciones óptimas para el cultivo de almeja babosa en criadero en todas sus fases, desde la estabulación de reproductores y obtención de la puesta, hasta el crecimiento de la semilla para su cultivo en el medio natural, con el fin de establecer un protocolo de cultivo en criadero.

El cultivo de *V. pullastra* se realiza con éxito en todas sus fases (criadero, preengorde y engorde), siendo la especie que se cultiva en criadero con mayor porcentaje de supervivencia (Martínez Patiño *et al.*, 2008). En los estudios previos realizados en el criadero del Centro de Cultivos de Ribadeo, se observa que existe variabilidad en los resultados. Las supervivencias obtenidas en las distintas experiencias realizadas son diferentes, y aunque se obtienen desoves en todos los meses del año, la cantidad de ovocitos recolectados es variable, siendo difícil afirmar si el tamaño de la puesta es indicativo de un futuro desarrollo larvario de buena calidad. Se pensó que estas diferencias podían deberse a la calidad de los reproductores ya que, como pudimos ver en el capítulo I, aunque esta especie presenta gametos maduros durante todo el año, su estadio gametogénico, su Índice de Condición y su composición bioquímica son distintos. Estas diferencias podían ser importantes en los desoves y posterior éxito de los cultivos larvarios.

Hay estudios anteriores realizados en otras especies de bivalvos, como es el trabajo de Massapina *et al.* (1999) con *C. gigas*, en el que se afirma que la calidad del ovocito y la viabilidad de las larvas cultivadas en criadero procedentes del medio natural parece depender de las características intrínsecas de los reproductores. Así, en esta especie, encontraron que la viabilidad larvaria dependía fuertemente de la cantidad de lípidos y proteínas aportada por los progenitores a los ovocitos. Esta afirmación coincide con la propuesta por Dorange *et al.* (1989) y Le Pennec *et al.* (1990) para *Pecten maximus*.

En la especie *V. pullastra*, Joaquim *et al.* (2010) en Portugal, encontraron una asociación entre la cantidad de proteínas de los ovocitos y el porcentaje de transformación de éstos a larvas D. En el trabajo realizado por Nóvoa (2007) se afirma que la relación de ácidos grasos $\omega 3/\omega 6$ de los ovocitos, y por lo tanto procedentes de la dieta de los progenitores, influyen en la calidad de los ovocitos y en el éxito de los desarrollos larvarios.

Para confirmar si existe alguna época más idónea para la obtención de desoves de almeja babosa, se recogieron reproductores en las distintas épocas del año. Se evaluó el grado de madurez mediante técnicas histológicas y sus reservas mediante analíticas bioquímicas. Se obtuvieron puestas controladas de estos reproductores, que se cultivaron llevando el control de crecimiento y mortalidad. Se asocia la calidad de los reproductores con el número de huevos emitidos por puesta y la supervivencia de los desarrollos larvarios y postlarvarios obtenidos a partir de éstos.

Aunque, como se vio en el capítulo I, el ciclo reproductivo de las tres poblaciones estudiadas presentaba un patrón de desarrollo gonadal muy similar, existían ligeras diferencias entre ellas. Así, en las dos poblaciones de O Grove había mayor heterogeneidad de estadios en los distintos muestreos, que en la población de Camariñas. A su vez, dentro de las dos poblaciones de O Grove, en la del banco intermareal el número de individuos en madurez durante todo el año, era menor que en la población submareal, siendo también los Índices de Condición significativamente inferiores en la población intermareal.

En los estudios de acondicionamiento de las especies *R. decussatus* (Matias *et al.*, 2009) y *C. gigas* (Chávez Villalba *et al.*, 2002), con progenitores de distintos bancos naturales, encontraron que el inicio y la duración de la gametogénesis son distintos según la localización de la población, por lo que los resultados finales varían dependiendo de la población de origen. Estas diferencias gametogénicas en distintas ubicaciones geográficas, también se observaron en las especies *M. galloprovincialis* (Iglesias *et al.*, 1996) y *Argopecten purpuratus* (Avendaño y Le Pennec, 1997).

5. Cultivo en criadero

En este trabajo se utilizan reproductores de *V. pullastra* de cinco poblaciones diferentes localizadas a lo largo de la costa gallega, con el fin de estudiar la influencia del origen en la obtención de desoves y en el éxito del cultivo larvario.

En este **capítulo** se aborda el cultivo de almeja babosa en criadero en todas sus fases, desde la obtención de la puesta hasta el crecimiento de la semilla. Se relaciona la obtención de desoves y la viabilidad de los mismos con la calidad de los reproductores, en relación a las distintas épocas del año y según el origen de éstos.

5.2 MATERIAL Y MÉTODOS

5.2.1 CULTIVO DE MICROALGAS

Para la producción de las microalgas necesarias para la alimentación de la almeja babosa, *Venerupis pullastra*, en las distintas fases de cultivo (progenitores, larvas, postlarvas y semilla), se emplean sistemas de cultivo intensivo monoespecíficos. El cultivo de fitoplancton en el Centro de Cultivos Mariños de Ribadeo se realiza por lotes, comenzando con cepas de 20 ml y finalizando con bolsas de 30 l (Figura 5.1).

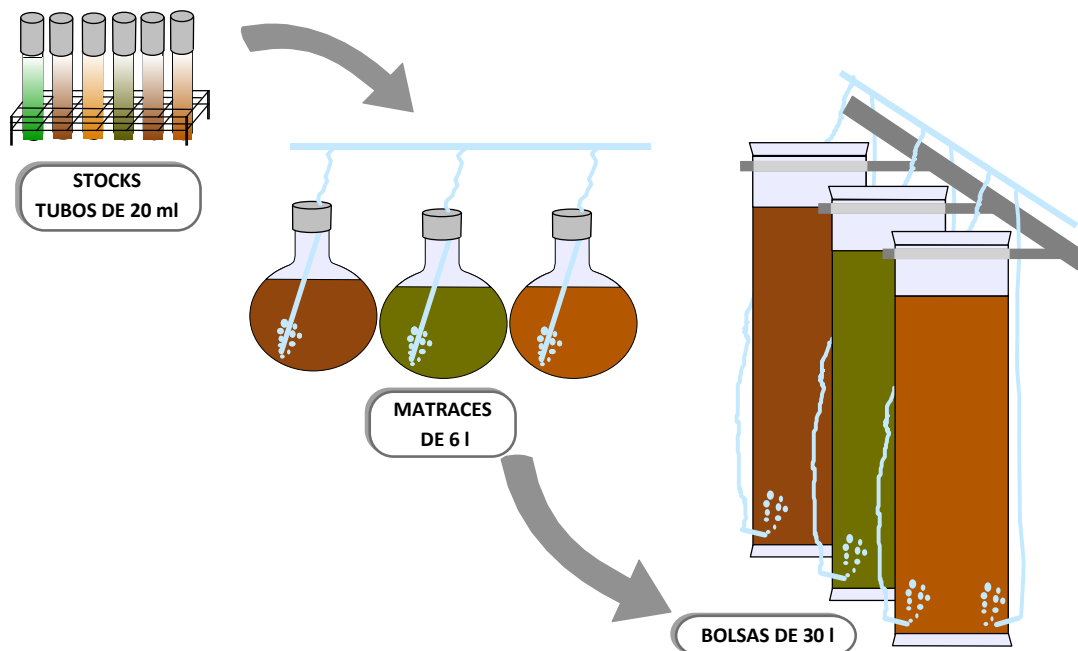


FIGURA 5.1: Esquema del cultivo de fitoplancton en el Centro de Cultivos Mariños de Ribadeo.

Las cepas de las microalgas se adquieren en laboratorios o se intercambian con otras instalaciones y se mantienen en tubos de 20 ml, repicándolas para mantener un stock (Figura 5.2). Estas cepas se utilizan como inóculo para recipientes de mayor volumen, matraces de 2 y 6 l (Figura 5.3).

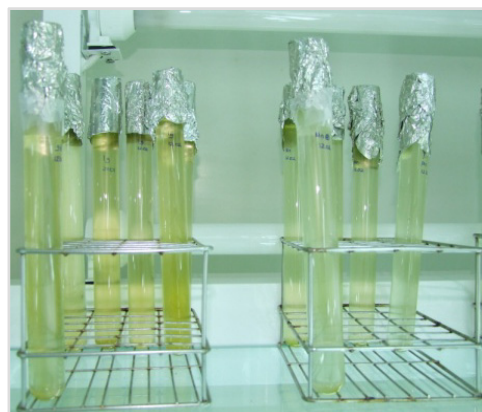


FIGURA 5.2: Cepas de microalgas.

5. Cultivo en criadero



FIGURA 5.3: Matraces de 2 y 6 l para el cultivo de fitoplancton en la cámara isoterma.

El agua de mar utilizada, 32-35‰ de salinidad, es filtrada por filtros de arena y filtros de cartucho de 5 μm . Los recipientes y el agua para el cultivo de fitoplancton, se esterilizan en autoclave. El agua se enriquece con una solución de sales nutritivas (Algal-1), compuesta por nitrato potásico, fosfato monosódico, oligoelementos (Fe, Zn, Mn, Mo, Co, Cu y EDTA) y vitaminas. Además, en el cultivo de las diatomeas, se añade sodio silicato.

Las primeras fases del cultivo de microalgas se desarrollan en una cámara isoterma, con iluminación artificial constante y a una temperatura de $19\pm 1^\circ\text{C}$. Los matraces se mantienen con un burbujeo de aire enriquecido con CO_2 .

Este fitoplancton, además de servir de inóculo para volúmenes superiores, se utiliza para la alimentación larvaria y postlarvaria. Las especies cultivadas en matraces que se utilizan para el cultivo larvario y postlarvario son: *Isochrysis galbana*, *Paulova lutheri*, *Chaetoceros calcitrans* y *Tetraselmis suecica*.

El siguiente volumen cultivado son bolsas plásticas de 30-40 l (Figura 5.4), que se mantienen con aireación y con iluminación natural en invernadero. Como medio nutritivo se utiliza una solución (Solución C) formada por nitrato potásico, fosfato potásico y una traza de metales (Fe, Mn, Zn, Cu, Co y Mo). En las bolsas donde se cultivan diatomeas se complementan con sodio silicato.



FIGURA 5.4: Bolsas plásticas de 30 l para el cultivo de fitoplancton en invernadero.

El fitoplancton producido en este sistema se utiliza para alimentar a la semilla y a los reproductores. Además de las especies utilizadas para el cultivo larvario, se utiliza también *Skeletonema costatum* y *Phaeodactylum tricornutum*.


5.2.2 RECOGIDA DE REPRODUCTORES Y TRASLADO

-Con el fin de establecer un protocolo de cultivo de *V. pullastra* se recogieron reproductores de talla comercial a lo largo de dos años, procedentes de dos bancos naturales de Galicia: Barallobre (NO de Galicia) y Vilaxoán (SO de Galicia), el primero submareal y el segundo intermareal.

La extracción la realizaron las propias mariscadoras y las muestras llegaban refrigeradas en una nevera isoterma al Centro de Cultivos, 24 h después de su extracción en el banco natural.

-Para el estudio de la calidad de los reproductores, durante tres años, se recogieron reproductores de *V. pullastra*, procedentes de 5 bancos naturales de Galicia en distintas épocas del año: otoño (noviembre), invierno (enero-febrero), primavera (abril-mayo) y verano (julio-agosto). En la tabla V.1 se muestran las localidades y las épocas de cada muestreo.

TABLA V.1: Procedencia y época de cada uno de los lotes muestreados de almeja babosa.

 OTOÑO	 INVIERNO	 PRIMAVERA	 VERANO
Barallobre (14/11/06)	Barallobre (10/01/06)	Barallobre (15/05/08)	Barallobre (28/07/07)
Cangas 1 (21/11/07) Cangas 2 (14/11/08)	Cangas 1 (23/01/08) Cangas 2 (18/02/09)	Cangas (26/04/07)	Cangas (20/07/07)
Vilaxoán (29/11/07)	Vilaxoán 1 (14/02/06) Vilaxoán 2 (25/01/07)	Vilaxoán 1 (2/05/06) Vilaxoán 2 (20/04/07)	Vilaxoán (21/08/08)
Camariñas (13/11/08)	Camariñas (26/01/07)	x	Camariñas (22/08/08)
O Barqueiro (27/11/07)	O Barqueiro (23/01/08)	x	x

5. Cultivo en criadero

En cada muestreo se recogió un lote de almejas de talla próxima a la comercial. En las poblaciones de Barallobre, Cangas y Vilaxoán se obtuvieron muestras en las cuatro estaciones. Además, en Cangas se repitieron en dos años distintos los muestreos de otoño e invierno, y en Vilaxoán el de invierno y primavera. En la población de Camariñas se recogieron muestras en otoño, invierno y verano y en la de O Barqueiro, se recogieron en otoño e invierno. En total se utilizaron 21 lotes de reproductores.

Al igual que en las primeras experiencias, la extracción la realizaron las propias mariscadoras y las muestras, 24 h después de su extracción en el banco natural, llegaban refrigeradas en una nevera isoterma.

Los bancos de Camariñas y Barallobre en el noroeste de Galicia y el de Cangas en el suroeste de Galicia, son bancos submareales, por lo que la extracción de las almejas la realizaron desde embarcación con rastros de vara. Los bancos de Vilaxoán (suroeste de Galicia) y O Barqueiro (norte de Galicia) son bancos intermareales, por lo que las almejas se recogieron a pie con rastrillos. En la figura 5.5 se localizan los bancos de muestreo.

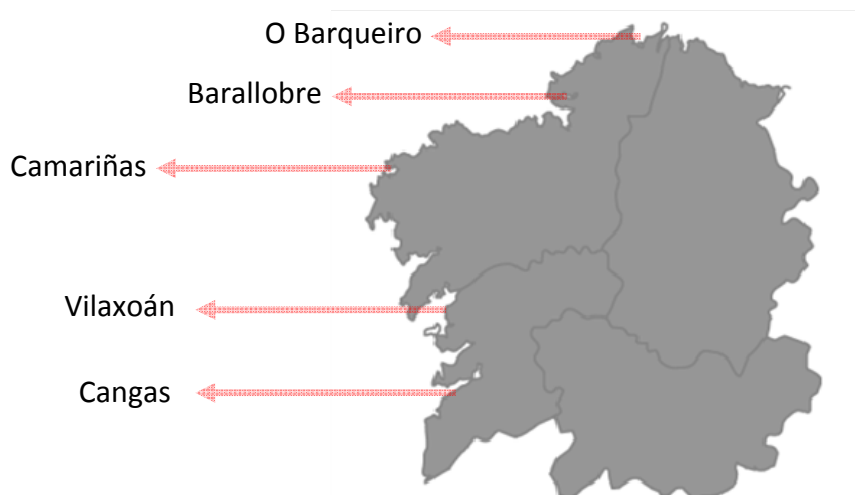


FIGURA 5.5: Localización de los bancos naturales de almeja babosa utilizados en el criadero.

5.2.3 MANTENIMIENTO DE LOS REPRODUCTORES

Para la realización de las distintas experiencias se emplearon lotes de aproximadamente 3 kg. De cada lote de reproductores, se cogió una muestra de 20 individuos para el procesado y posterior estudio histológico y de composición bioquímica. El resto se estableció en el tanque.

Los reproductores se colocaron en tanques rectangulares de fibra de vidrio de 100 l de capacidad, con un área de 90 x 45 cm y una altura de 30 cm (Figura 5.6). Las almejas se colocaron en bandejas perforadas para dejar pasar las heces y los residuos. La biomasa en peso fresco de todos los individuos colocados en el tanque (peso total incluidas las conchas), estuvo en torno a 3 g por l. A los tanques se les suministró un aporte continuo de agua de mar con un flujo de 30-40 l/h y aireación constante.

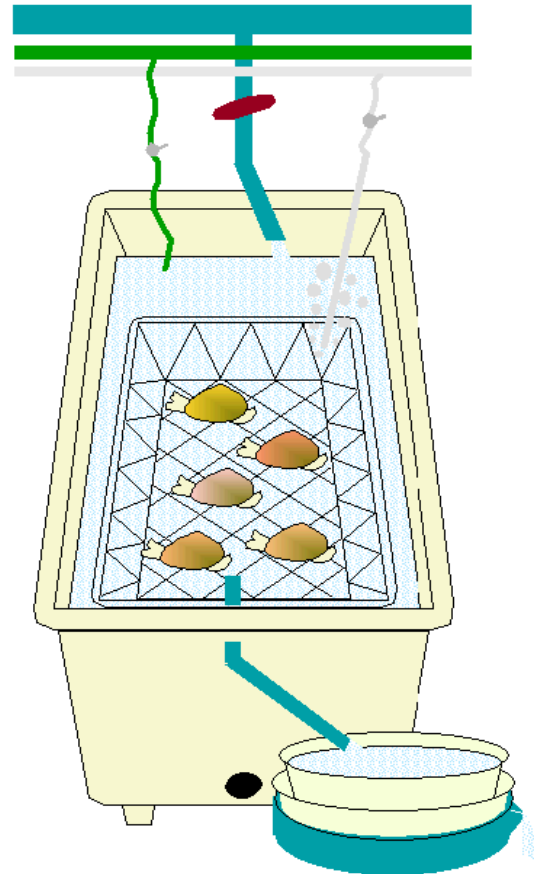


FIGURA 5.6: Esquema de los tanques de estabulación de reproductores.

La alimentación fue diaria, con una dieta mixta compuesta por *I. galbana*, *P. lutheri*, *C. calcitrans*, *S. costatum*, *P. tricornutum* y *T. suecica*. El agua de mar utilizada era previamente filtrada con filtros de arena. La temperatura del agua de los tanques varió entre 17 y 19°C.

Tres veces a la semana se vaciaban los tanques, se limpiaban y se volvían a llenar de agua para evitar la acumulación de metabolitos y bacterias. Diariamente se

5. Cultivo en criadero

medía la temperatura de los tanques, se retiraban los ejemplares muertos y se controlaba la alimentación.

5.2.4 OBTENCIÓN DE LA PUESTA Y RECOGIDA DE HUEVOS

A la salida de los tanques se colocaban tamices para la recogida de las puestas cuando éstas eran espontáneas. Si no se producía la puesta espontáneamente, las almejas se sometían a shocks térmicos para inducir las.

En los casos en los que se pudo observar el momento de la puesta, se trató de separar los ejemplares que estaban desovando, con el fin de poder aislar e individualizar los individuos macho de las hembras. Con las almejas hembras desovando que se pudieron aislar, se calculó la media del número de huevos que emite una hembra.

Para realizar el conteo de los huevos se recogían 10 alícuotas que se depositaban en portas excavados. Posteriormente se calculaba el número de huevos en cada submuestra y por extrapolación al volumen total el número de huevos obtenidos. Los huevos, tras ser contados y medidos con un analizador de imagen (*PC Image*) acoplado a una lupa, se trasladaron a los tanques de cultivo.

5.2.5 CULTIVO LARVARIO

El desarrollo larvario se realizó en tanques troncocónicos de 500 l, con agua de mar filtrada y esterilizada por UV (Figura 5.7). Los tanques se mantuvieron a una temperatura de $18 \pm 1^\circ\text{C}$ y estaban provistos de aireación. La densidad larvaria inicial en el cultivo fue variando según las experiencias entre 5 y 10 larvas/ml. La alimentación se añadió diariamente con una dieta compuesta por una mezcla de *T. suecica*, *P. lutheri*, *I. galbana* y *C. calcitrans* en igual proporción.

Tres veces a la semana se vaciaban los tanques, se tamizaban las larvas y se volvían a introducir en el tanque lleno de agua limpia. Diariamente se tomaba el dato de la temperatura de cultivo y se controlaba la presencia o ausencia de fitoplancton para ajustar la dieta.

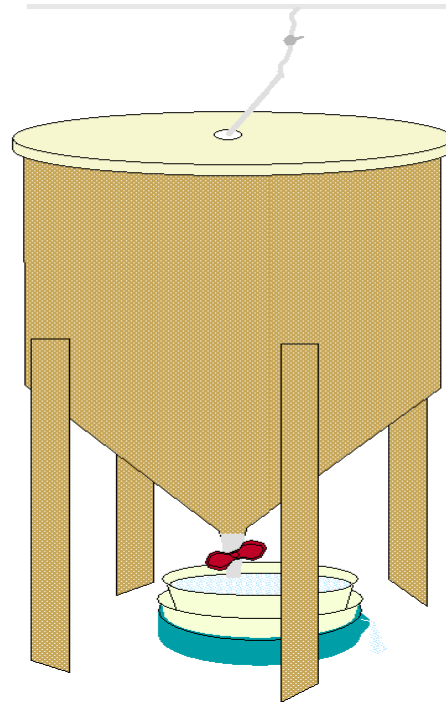


FIGURA 5.7: Esquema de los tanques de cultivo larvario en el momento del cambio de agua.

5.2.6 CULTIVO DE POSTLARVAS Y SEMILLA

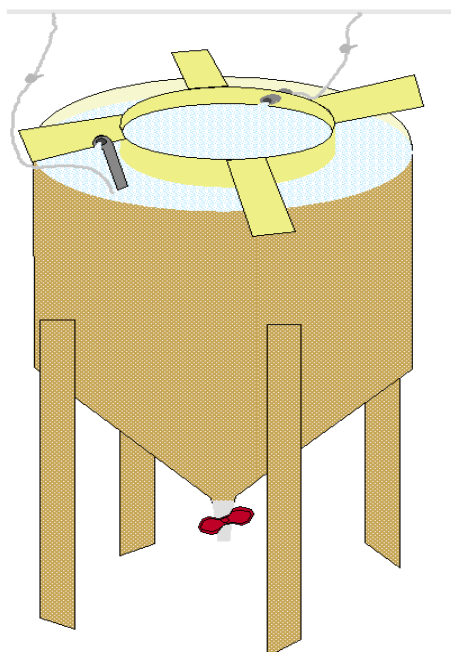


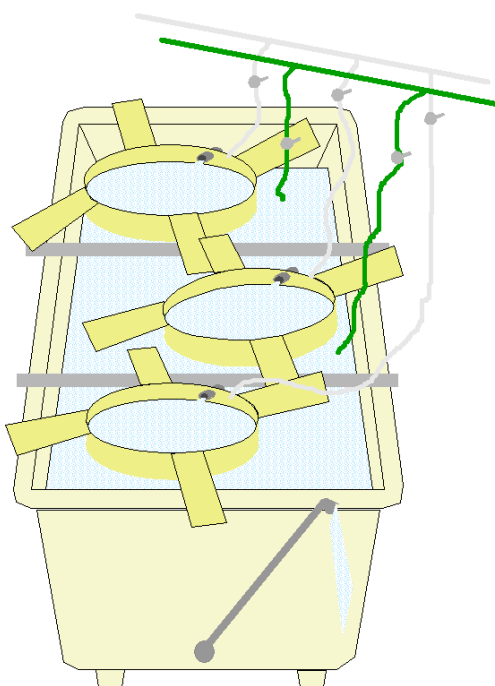
FIGURA 5.8: Tanques de cultivo durante la metamorfosis.

Cuando más del 50% de las larvas presentaban pie, el cultivo se ponía a fijar. Para ello se utilizaron cilindros con fondo de malla con flujo forzado descendente, que se colocaron en circuito cerrado en los mismos tanques del cultivo larvario (Figura 5.8). Los tanques se mantuvieron a una temperatura de $18 \pm 1^\circ\text{C}$.

Una vez que las postlarvas quedaban retenidas en el tamiz de $300 \mu\text{m}$ se consideraban semilla y se trasladaban a tanques de mayor volumen.

5. Cultivo en criadero

El cambio de agua se realizó cada dos días. La alimentación fue diaria, compuesta de la misma mezcla de microalgas, cultivadas en matraces, que para el cultivo de larvas.



La semilla se cultivaba en tanques de 1.500 l de capacidad. En ellos se mantuvieron en circuito abierto (18 l/h) con agua de mar a temperatura ambiente y con flujo forzado descendente (Figura 5.9).

Cada dos días se realizaba el cambio de agua del tanque. La alimentación fue diaria, compuesta de una mezcla de distintas microalgas cultivadas en bolsas. Además de las microalgas utilizadas para el cultivo larvario y postlarvario, en el caso de la semilla, se añadió *P. tricornutum* y *S. costatum*.

FIGURA 5.9: Tanques de cultivo de semilla.

5.2.7 PROCESADO DE LOS REPRODUCTORES

Los métodos utilizados para el análisis de los reproductores que a continuación se describen, coinciden con los empleados para el estudio del ciclo gametogénico, por lo que están más ampliamente descritos en el capítulo I.

-Obtención de los datos biométricos, cálculo del peso seco e Índices de Condición:

A cada individuo analizado se le tomaron las siguientes medidas utilizando un calibre digital *Mitutoyo* (precisión 0,01 mm) y una balanza de precisión *Gram Precision* (precisión 0,01 g): longitud máxima del eje antero-posterior, altura máxima del eje dorso-ventral, anchura máxima, peso fresco total, peso fresco de la concha, peso fresco de la vianda y peso fresco de la gónada.

Liofilizando una muestra de tejido durante 24-48 h, se calcularon los pesos secos: peso seco de la vianda y peso seco de la gónada. Las conchas se mantuvieron en una estufa a 100°C durante 24 h.

Con los datos obtenidos del peso seco se calcularon los Índices de Condición:

- $ICV = (\text{Peso seco de la vianda} / \text{Peso seco de la concha}) \times 100$
- $ICG = (\text{Peso seco de la gónada} / \text{Peso seco de la concha}) \times 100$

-Método histológico:

Para el estudio histológico el tejido gonadal se introdujo durante 24 h en el líquido fijador Davidson. Seguidamente se procedió a deshidratar las muestras en alcoholes de graduación creciente, en un procesador de tejidos automático *Histolab ZX-100*, para luego poder incluirlas en parafina.

Se cortaron los bloques obtenidos con un microtomo *Microm HM 340 E*, haciendo secciones de 5 μm que luego se tiñeron con la tinción de Hematoxilina-Eosina. Las preparaciones se montaron con *Histomount* y se observaron al microscopio óptico.

Después del estudio de las preparaciones, a cada individuo se le asignó un estadio de la escala descrita para esta especie en el capítulo I: E1. Inicio de la gametogénesis, E2. Gametogénesis avanzada, E3. Madurez y puesta y E4. Renovación gonadal.

-Métodos bioquímicos:

Para realizar los análisis bioquímicos se partió de las muestras liofilizadas y finamente pulverizadas. Se analizó por separado la gónada y el resto de la vianda, para obtener la cantidad (en mg/g peso seco) de carbohidratos, lípidos y proteínas.

5. Cultivo en criadero

La determinación de proteínas se realizó a partir del método de Lowry *et al.* (1951). La extracción de los lípidos se realizó con cloroformo-metanol y se cuantificaron por gravimetría, según el método utilizado por Folch *et al.* (1957).

Para la determinación de carbohidratos se utilizó el método de la antrona (Fraga, 1956), un método distinto al utilizado para el estudio del ciclo gametogénico, el método enzimático de Keppler y Decker (1984). Con este método se podía cuantificar la glucosa procedente de la hidrólisis del glucógeno y, por otro lado, la glucosa libre. Después de utilizarlo para el estudio del ciclo gametogénico, se observó que la presencia de glucosa libre en las muestras era muy pequeña (entre un 1 y un 3% con respecto al glucógeno), por lo que la utilización de este método selectivo y más costoso, se dejó de utilizar.

El método de la antrona (Fraga, 1956) es un método colorimétrico basado en una reacción específica para los carbohidratos, la reacción de Dreywood. Este método da buenos resultados cuando se aplica a moluscos marinos. Se partió de 2-3 mg por duplicado de tejido liofilizado, al que se le añadió 2 ml de hidróxido potásico. Se sonicaron las muestras durante 30 seg, se mantuvieron en baño a 90°C durante una hora para realizar una hidrólisis y posteriormente, en agitación durante 24 h. El siguiente paso fue la neutralización con 6 ml de ácido sulfúrico 1N, agitación y centrifugado a 3.000 rpm durante 5 min. Del sobrenadante se tomaron 3 alícuotas de 1 ml las cuales se sometieron a un baño de hielo en el que se añadió a cada tubo 5 ml del reactivo de la antrona. Las muestras se agitaron y se colocaron en un baño a 90°C durante 16 min. Se enfriaron y leyeron en espectrofotómetro a 625 nm; previa realización de una recta de calibración con concentraciones de 15 a 105 µg/µl de un estándar de D(+) glucosa anhidra.

5.2.8 RECOGIDA DE MUESTRAS DE LARVAS

Durante el cultivo larvario se aprovechaban los cambios de agua (cada dos días) para observar las muestras *in vivo* al microscopio. Dos veces a la semana se medían y una vez a la semana se contaban.

Para realizar los conteos de las larvas, éstas se disponían en un vaso de precipitado de volumen conocido. Se homogeneizaba la muestra y se recogían 10 alícuotas que se depositaban en portas excavados. Posteriormente se calculaba el número de individuos en cada submuestra y por extrapolación al volumen total el número de larvas del cultivo.

Para el seguimiento del crecimiento se midió la longitud y la altura a una muestra de 100 larvas con un programa de análisis de imagen (*PC Image*), acoplado a una lupa.

La supervivencia larvaria se calculó desde el número inicial de ovocitos liberados o larvas D hasta pediveliger. La supervivencia postlarvaria se calculó desde larvas pediveliger hasta postlarvas retenidas en un tamiz de 300 μm . La supervivencia total se calculó desde huevos o larvas D, hasta postlarvas.

5.2.9 RECOGIDA DE MUESTRAS DE POSTLARVAS Y SEMILLA

Durante el cultivo postlarvario se aprovechaban los cambios de agua (cada dos días) para observar las muestras *in vivo* al microscopio. Dos veces a la semana se medían y una vez a la semana se contaban. La semilla se contaba y medía cada 15 días.

Una vez que las postlarvas alcanzaban un tamaño adecuado para su manipulación (alrededor de 300 μm), se comenzó a calcular el número de individuos del cultivo a partir del peso total de la muestra. Para ello se pesaban 10 sublotos del total de la muestra usando para ello, una balanza de precisión *Gram Precision* (0,01 g de precisión), se contaba el número de individuos en cada sublote y por extrapolación, se calculaba el número total de individuos de la muestra.

Al principio, debido a su pequeño tamaño, las postlarvas se midieron con un programa de análisis de imagen (*PC Image*) acoplado a una lupa. Posteriormente, la semilla se midió con un calibre digital *Mitutoyo* (0,01 mm de precisión).

5.2.10 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

El análisis estadístico se realizó utilizando el paquete estadístico SPSS® para Windows versión 15.0.

La comparación de medias de los distintos componentes bioquímicos en los progenitores, entre las distintas estaciones y localizaciones, se realizó con tests no paramétricos debido: al tamaño muestral, al incumplimiento por parte de algunos grupos de datos de la distribución normal y que no presentaban homogeneidad de varianzas. Para el contraste de más de dos muestras se aplicó el test H de Kruskal-Wallis y para el contraste dos a dos, se aplicó el test de contraste de dos muestras independientes U de Mann-Whitney. Los valores de porcentajes se transformaron con la función arcoseno.

En el estudio de asociación entre la composición bioquímica de los progenitores, la obtención de desoves y la supervivencia de éstos se utilizó el coeficiente de correlación de Spearman (Zar, 1996).

Se utilizaron los siguientes símbolos según el nivel de significación:

n.s. = $p > 0,050$ diferencias no significativas

* = $0,010 < p < 0,050$ diferencias significativas al nivel del 95%

** = $0,001 < p < 0,010$ diferencias altamente significativas al nivel del 99%

5.3 RESULTADOS

5.3.1 ESTABULACIÓN DE REPRODUCTORES

Los lotes de reproductores de almeja babosa, *Venerupis pullastra*, que se estabularon en el criadero, llegaban 24 horas después de ser recogidos en el medio natural. Los reproductores se introducían en tanques de 100 l de capacidad a la salida de los cuales se colocaban los tamices para la recogida de los desoves, uno inferior de 40-45 μm para la recogida de los huevos y uno superior, de 90-120 μm , para los desechos.

Los reproductores se mantenían en circuito abierto. La temperatura del agua de los tanques se mantuvo entre 17-18°C en invierno (agua calentada) y 19-20°C en verano (temperatura ambiente). Temperaturas superiores a 22°C provocan la mortalidad paulatina de los mismos.

Durante las primeras 48 horas desde la llegada al Centro, los reproductores se mantenían sin alimentación, pues si se obtenían desoves espontáneos se podrían mezclar los huevos con las heces y desechos, favoreciendo así que se tupieran los tamices.

La alimentación de los reproductores fue diaria, con una dieta mixta a una ración de entre el 3 y el 6% del peso seco de las microalgas con respecto al peso seco de los reproductores. El fitoplancton utilizado fue cultivado en bolsas de 30 l y las especies empleadas fueron: *Tetraselmis suecica*, *Isochrysis galbana* y *Pavlova lutheri* dentro de las flageladas, y *Chaetoceros calcitrans*, *Skeletonema costatum*, *Thalassiosira pseudonana* y *Phaeodactylum tricornutum* dentro de las diatomeas.

Los reproductores normalmente desovaban en los primeros días de su llegada, pero si se querían obtener más desoves de los mismos reproductores, éstos se mantenían en el criadero alrededor de unos tres meses. Durante este tiempo se

5. Cultivo en criadero

podían obtener unos 2 o 3 desoves más. La mortalidad media de los reproductores estabulados en el criadero fue de un 10% mensual.

5.3.2 OBTENCIÓN DE LA PUESTA

El período que pasaban en desecación los reproductores de *V. pullastra*, desde que eran recogidos en el medio natural hasta que se estabulaban en el criadero, era un buen estímulo para la puesta, pues al introducir las almejas en los tanques con agua, con frecuencia desovaban el mismo día de su llegada.

Cuando no se obtenía así la puesta, las almejas se sometían los días sucesivos a cambios de temperatura del agua en los mismos tanques, intercalando con períodos de desecación. Los rangos de temperatura utilizados estaban entre los 12 y 20°C, en intervalos de dos horas durante toda la mañana. A los tanques de reproductores se le añadían ciertos estímulos en el mismo tanque para inducir la puesta, como la adición de fitoplancton y esperma de algún macho abierto. No se deben someter más de dos días seguidos a estos cambios térmicos, ni con temperaturas superiores a 22°C. La babosa es una especie menos resistente que otras almejas, por lo que altas temperaturas y choques térmicos durante días podrían provocar la muerte de gran parte de los individuos.

Los primeros en desovar fueron los individuos machos y sobre media hora después comenzaban las hembras. Los machos emiten un chorro continuo de aspecto lechoso, mientras que las hembras emiten chorros por impulsos con aspecto granular. A veces nos interesaba separar los huevos antes de la fecundación ya bien para hacer estudios de composición bioquímica de los mismos o para realizar estudios

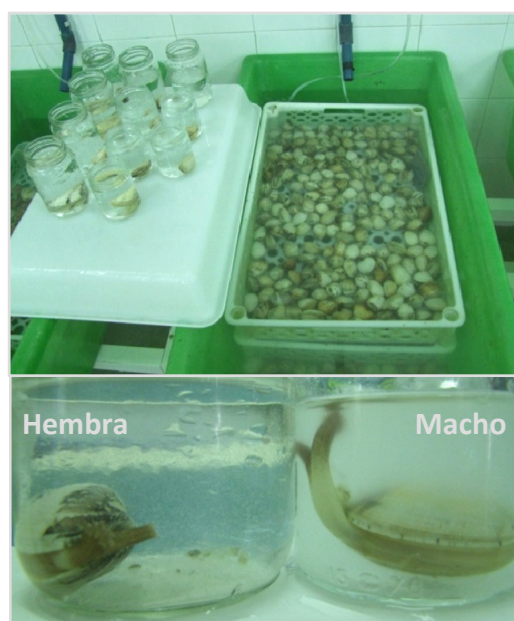


FIGURA 5.10: Separación por sexos de individuos desovando.

controlados de embriología. Para ello, conforme empezaban a desovar, había que ir retirándolos del tanque y colocándolos en recipientes individualizados llenos de agua para que continuaran desovando (Figura 5.10).

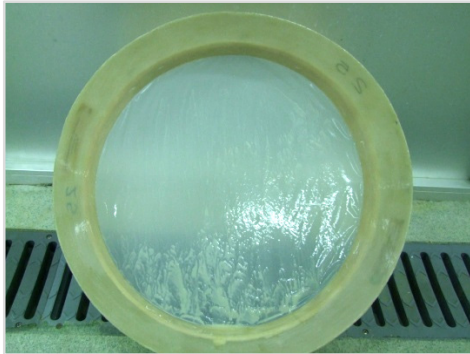


FIGURA 5.11: Tamiz con desove.

Una vez se recogieron los huevos necesarios y se tomaron las muestras oportunas para la experimentación, la puesta se filtraba por un tamiz de 90 μm para separar posibles restos y los huevos se recogían con un tamiz de 40-45 μm (Figura 5.11).

Los huevos se fecundaban con una mezcla de esperma de varios machos (entre 5 y 10 ml) y se distribuían en los tanques de cultivo a una densidad en torno a 5-10 huevos/ml.

Cuando los desoves eran espontáneos o después de separar los huevos antes de la fecundación, las almejas se dejaban desovando en los mismos tanques (Figura 5.12). A la salida de los tanques se colocaban dos tamices, uno superior de 90-120 μm para que no retuviera los huevos pero sí los residuos y otro inferior de 40-45 μm para separar los huevos, que en el momento de la recogida ya estaban fecundados y en división.



FIGURA 5.12: Tanques de estabulación de reproductores.
Tanque de la izquierda con individuos desovando.

5. Cultivo en criadero

La duración del desove va a depender del tamaño del mismo, aunque en general la mayor intensidad se produce durante las primeras 3-4 horas y, en la mayoría de los casos, seguida de pequeñas emisiones que se suceden durante más o menos 24 horas.

Para saber si existía alguna diferencia en la supervivencia de los desarrollos larvarios obtenidos en los desoves espontáneos y en los desoves inducidos, se compararon los resultados obtenidos a lo largo de varios años. En el análisis estadístico no se ha encontrado ninguna diferencia de supervivencia entre los desoves espontáneos y los obtenidos induciendo los reproductores.

Para calcular el número de huevos que llega a emitir una hembra se lograron separar varias de ellas en diversos desoves, colocándolas en tarros individualizados y dejándolas desovar alrededor de una hora. Se lograron separar hembras desovando en ocho experiencias, en la tabla V.2 se muestran los resultados. El número de huevos que desovaron las hembras en cada una de las experiencias varió entre 317.000 y 671.000. Haciendo una media de las ocho experiencias, una almeja hembra de *V. pullastra*, desova alrededor de 500.000 huevos.

TABLA V.2: Cálculo del número de huevos que emite un individuo de *V. pullastra* a partir de ocho experiencias en las que se aislaron hembras desovando.

Experiencia	Fecha	Nº huevos	Nº hembras	Nº huevos/hembra
1	16/12/05	1.600.000	4	400.000
2	31/01/06	7.200.000	19	379.000
3	14/11/06	4.700.000	7	671.000
4	26/01/07	4.700.000	12	392.000
5	27/01/07	5.500.000	9	611.000
6	28/06/07	1.900.000	6	317.000
7	24/01/08	7.400.000	14	529.000
8	13/11/08	5.200.000	8	650.000

**Número medio de huevos emitidos por hembra:
494.000±139.000**

5.3.3 CULTIVO LARVARIO

Una vez recolectados los huevos, después de contados y medidos, se distribuyeron en los tanques de cultivo a una densidad inicial de 5-10 huevos/ml. El tamaño medio de los huevos de *V. pullastra* está entre 65 y 75 μm .

Aproximadamente 30 h después del desove, las larvas llegan a la fase de larva D veliger, llamada así por su característica forma en D de las valvas de la concha. En este momento las larvas que tienen un tamaño en torno a 100-105 μm , ya se empiezan a alimentar con fitoplancton. El porcentaje de transformación de huevo a larva D varió entre el 74 y el 94%, obteniéndose una media en todos los cultivos del 84%.

Los tanques empleados para el cultivo de larvas de *V. pullastra* eran troncocónicos con una capacidad de 500 l (Figura 5.13). Se llenaban con agua de mar filtrada por filtros de arena, filtros de cartucho de 1 μm y, finalmente, por un sistema de luz ultravioleta. El agua se calentaba a una temperatura de $18\pm 1^\circ\text{C}$ y en los tanques se colocaban unos termostatos para mantener la temperatura en los meses de invierno, ya que la sala no estaba acondicionada. En el centro de los tanques se adaptaba una varilla de cristal o metacrilato que permitía la aireación de los cultivos.



FIGURA 5.13: Tanque de cultivo larvario.

5. Cultivo en criadero

El protocolo de cultivo realizado era: cambio total de agua cada dos días. Para ello se situaban debajo del desagüe, como se observa en la figura 5.14, una serie de tamices de menor a mayor luz de malla, colocando al final una bandeja para permitir que las larvas se mantuvieran en agua. La luz de malla de los distintos tamices fue aumentando a medida que avanzaron los días de cultivo y nos permitía ir separando por tamaños las larvas, a la vez que se vaciaba el tanque.



FIGURA 5.14: Vaciado del tanque de larvas.

Una vez vaciado el tanque se lavaban las larvas retenidas en los distintos tamices, se observaban al microscopio para ver su estado, se contaban y se cogían muestras para hacer una medición posterior de la longitud de la concha para estudiar su crecimiento (Figura 5.15).



FIGURA 5.15: Operaciones de tamizado, limpieza y observación al microscopio de las larvas.

La dieta suministrada a las larvas estaba compuesta desde el primer día por las microalgas flageladas *T. suecica*, *I. galbana*, *P. lutheri* y la diatomea *C. calcitrans*, cultivadas en matraces de 6 y 10 l. La dieta se suministraba con periodicidad diaria, comenzando la alimentación desde la larva D con una ración de 40 células/ μ l, aumentándola según las necesidades del cultivo hasta 80 células/ μ l. Las microalgas *I.*

galbana, *P. lutheri* y *C. calcitrans* se suministraban en igual proporción. De la especie *T. suecica* se suministraba diez veces menos número de células que de las otras, debido a que ésta es mucho mayor que el del resto de especies utilizadas.

Entre los días 16 y 18 desde el inicio del cultivo, las larvas de mayor tamaño quedaban ya retenidas en el tamiz de 150 μm y se empezaban a observar las primeras larvas pediveliger. A partir de este momento, se podía ver ya como las larvas tendían a fijarse en las paredes y fondo del tanque, por lo que era necesario chorrearlo cuidadosamente para despegarlas cada vez que se vaciaba el tanque. En torno a los 20 días de cultivo la mayoría de las larvas quedaban retenidas en el tamiz de 170 μm , presentaban ya el pie completamente desarrollado y el velo todavía funcional, aunque se podían observar todavía algunas larvas nadando y otras ya con las branquias desarrolladas. En este momento finalizaba el cultivo larvario y comenzaba el cultivo postlarvario.

Durante el cultivo larvario el crecimiento en longitud de *V. pullastra* se ajustó a un crecimiento lineal, con un crecimiento diario de 7,65 $\mu\text{m}/\text{día}$ (Figura 5.16). Las larvas cuando se ponían a fijar rondaban entre los 210-250 μm . La supervivencia desde larva D hasta larva pediveliger osciló entre el 87 y el 19%, obteniéndose una media del 56% de supervivencia en esta fase.

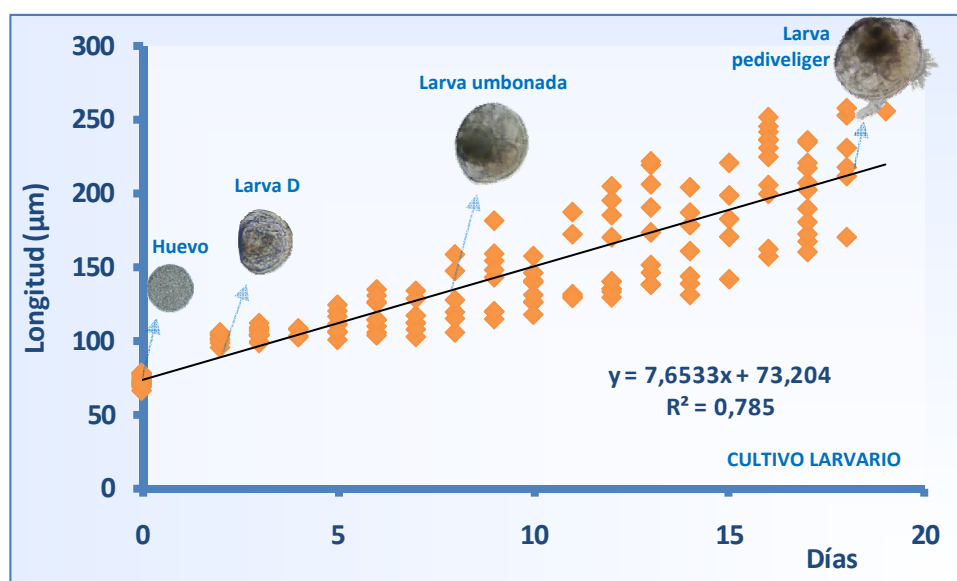


FIGURA 5.16: Crecimiento en longitud de *V. pullastra* durante el cultivo larvario.

5.3.4 CULTIVO POSTLARVARIO

Para realizar la fijación y metamorfosis las larvas se colocaban dentro de los tanques en cilindros con fondo de malla de 150 μm (Figura 5.17). Para su alimentación se usó la misma dieta de microalgas utilizada durante el cultivo larvario a una ración inicial de 80 células/ μl , que se fue incrementando según las necesidades del cultivo. Cada dos días se vaciaban los tanques de cultivo y se chorreaban con agua las postlarvas. Una vez a la semana se tamizaban y se medían para estudiar su crecimiento.



FIGURA 5.17: Cilindros para la fijación y metamorfosis de las larvas.

En los cilindros con fondo de malla las larvas pediveliger, con unos 20 días de vida, completaban la metamorfosis. En torno al día 22-25, desde el inicio del cultivo, las postlarvas ya estaban todas transformadas y presentaban una talla entre 300-350 μm . Se mantenían en el mismo sistema hasta los 35-40 días del inicio del cultivo, momento en el cual ya quedaban retenidas en el tamiz de 300-400 μm y ya se consideraba semilla. En la figura 5.18 se muestra el crecimiento en longitud de *V. pullastra* durante el cultivo postlarvario.

Durante esta fase de cultivo la supervivencia media fue del 48%, oscilando entre el 89% en el mejor de los casos y el 9% en el peor.

Desde el inicio del cultivo hasta que las postlarvas tenían 40 días de vida, la supervivencia media de todos los cultivos fue del 29%, obteniéndose en el peor de los casos un 5% de supervivencia y en el mejor un 78%.

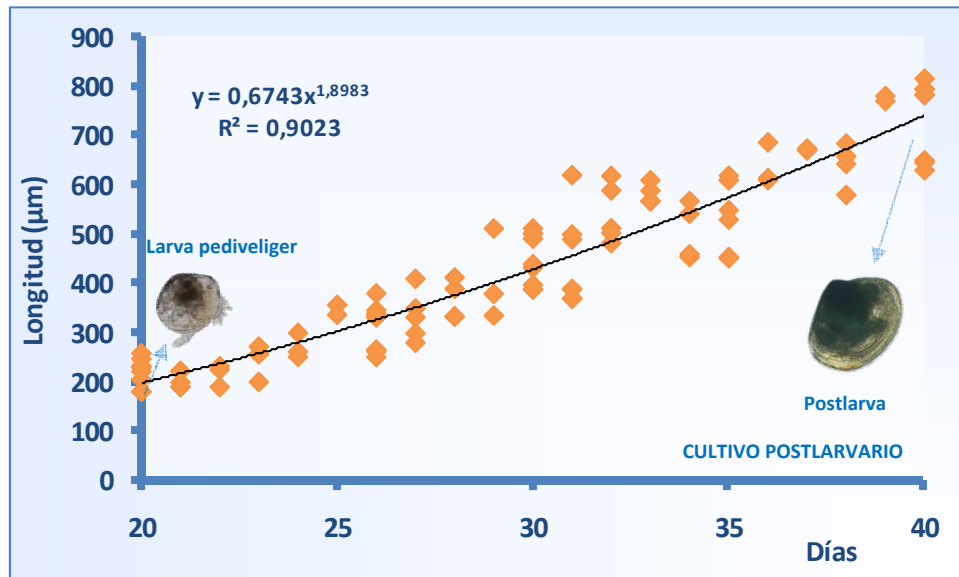


FIGURA 5.18: Crecimiento en longitud de *V. pullastra* durante el cultivo postlarvario.

5.3.5 CULTIVO DE SEMILLA

La semilla que ya quedaba retenida en tamices de 300-400 µm de luz de malla, se trasladaba a unos tanques de mayor volumen donde se podían colocar varios contenedores (Figura 5.19). Presentaba ya una talla en torno a 600-700 µm.

Los tanques que se utilizaron para el cultivo de semilla en criadero fueron de 1.500 l, que se llenaban con agua de mar filtrada con filtros de arena. La temperatura del agua de cultivo osciló entre los 17-18°C en invierno y los 19-20°C en verano.

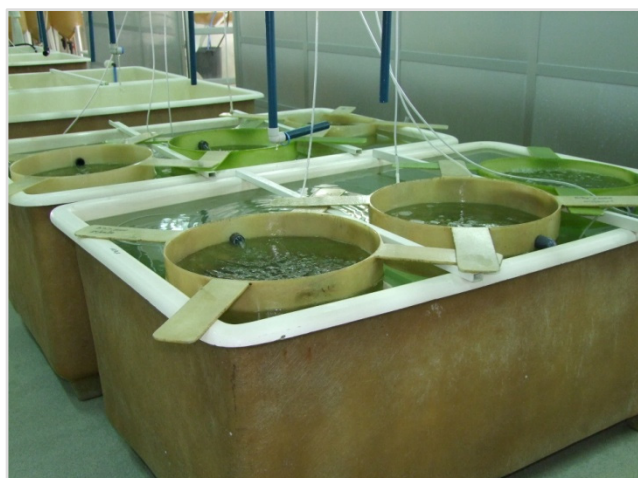


FIGURA 5.19: Tanques para el cultivo de semilla en criadero.

5. Cultivo en criadero

La semilla se colocó en cilindros con una luz de malla ligeramente inferior a su tamaño, facilitando su limpieza y evitando su pérdida. En estos cilindros se provocaba un flujo de agua descendente con un sistema "airlift". La alimentación fue diaria, compuesta de una mezcla de distintas microalgas cultivada en bolsas: *T. suecica*, *I. galbana* y *P. lutheri* dentro de las flageladas, y *C. calcitrans*, *S. costatum* y *P. tricornutum* dentro de las diatomeas.

A los 3 meses del inicio del cultivo la semilla ya quedaba retenida en los tamices de malla de 1 a 3 mm, con una talla entre 2,5 y 5,5 mm. A los 5 meses, toda la semilla superaba la malla de 3 mm y continuaba su cultivo en el medio natural. La supervivencia en esta fase de cultivo fue entre el 30 y el 50 %.

En la figura 5.20 se muestra el crecimiento en longitud de la semilla de *V. pullastra* durante su cultivo en criadero, desde el cultivo postlarvario hasta el cultivo en el medio natural.

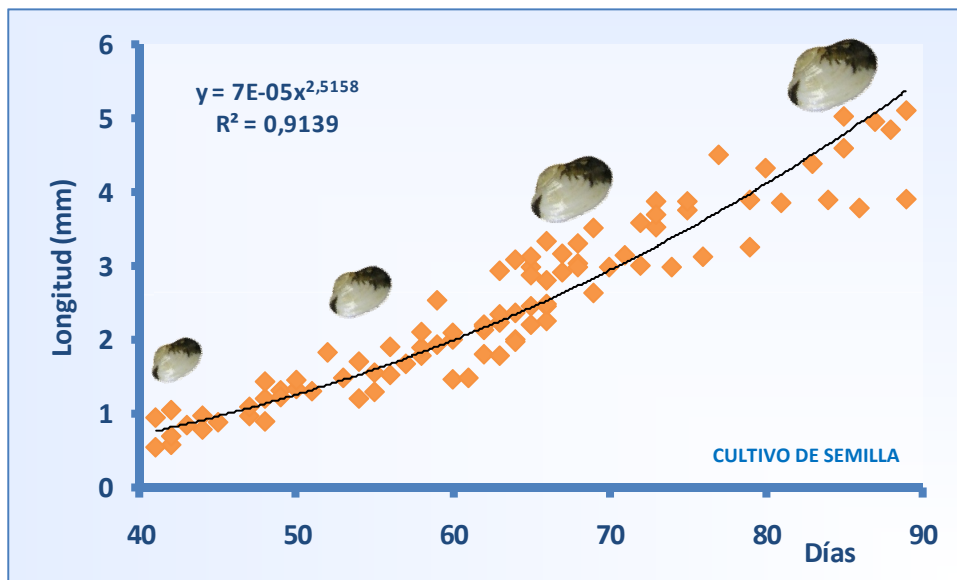


FIGURA 5.20: Crecimiento en longitud de semilla de *V. pullastra*.

5.3.6 OPTIMIZACIÓN DEL CULTIVO. RELACIÓN DE LA CALIDAD DE LAS PUESTAS CON LOS REPRODUCTORES

En estas experiencias se trató de relacionar los reproductores con la calidad de las puestas, es decir, se quería ver si existía alguna época del año en la que los reproductores estaban en unas condiciones óptimas que se tradujesen en unos buenos resultados en los cultivos y también si los reproductores procedentes de alguna zona son más idóneos que los de otras. En los siguientes apartados se relacionan los datos obtenidos del estudio de los reproductores a su llegada al Centro y la obtención de desoves. Los desoves que se citan se obtuvieron desde la llegada al Centro de los reproductores y los 5 días posteriores. En el caso de aquellos desoves en los que no se ha podido recoger los huevos, se presenta el número de larvas D obtenidas.

5.3.6.1 ÍNDICES DE CONDICIÓN DE LOS REPRODUCTORES

En la tabla V.3 se muestran los Índices de Condición de los reproductores de diferentes procedencias en las distintas estaciones y los desoves obtenidos.

Aunque los datos del Índice de Condición difieren entre los distintos lotes de reproductores, en general se encuentra que siguen una tendencia similar a la observada en el estudio del ciclo reproductivo del capítulo I.





Los valores más altos del Índice de Condición gonadal (ICG) se dan en los meses de otoño. Los valores oscilaron entre 7,69 en los reproductores de Vilaxoán y 4,44 en los de Camariñas.

En invierno se dieron los valores más bajos del ICG, oscilando entre 4,94 en los reproductores de Cangas 1 y 2,36 de los reproductores de Vilaxoán 1.

En primavera los valores del ICG son algo más altos que los del invierno y más bajos que los del verano. En primavera los valores oscilaron entre 5,82 de Vilaxoán 2 y 2,92 de Vilaxoán 1 y en verano entre 6,52 de Barallobre y 3,96 de Vilaxoán.

5. Cultivo en criadero

TABLA V.3: Talla media, Índice de Condición gonadal (ICG) y visceral (ICV) de cada uno de los lotes de reproductores de *V. pullastra* y los desoves obtenidos.

Población	 OTOÑO			Desoves	
	Talla	ICG	ICV	Nº huevos	Nº larvas D
Barallobre (2006)	38,28 ± 2,42	4,71	17,08	32 mill	30 mill
Vilaxoán (2007)	39,44 ± 2,96	7,69	20,29		6 mill
Cangas 1 (2007)	37,99 ± 3,28	6,87	17,36		
Cangas 2 (2008)	40,48 ± 2,19	4,91	13,91	12,3 mill	11 mill
Camariñas (2008)	41,10 ± 2,81	4,44	13,55		11,3 mill
O Barqueiro (2007)	40,37 ± 1,71	6,13	16,49	10,4 mill	8,3 mill
Población	 INVIERNO				
	Talla	ICG	ICV	Nº huevos	Nº larvas D
Barallobre (2006)	35,82 ± 4,23	4,41	14,80	8,2 mill	6 mill
Vilaxoán 1 (2006)	38,04 ± 2,50	2,36	11,74		25 mill
Vilaxoán 2 (2007)	36,43 ± 1,51	3,75	12,30	6,3 mill	4,7 mill
Cangas 1 (2008)	39,05 ± 3,17	4,94	14,95		1,8 mill
Cangas 2 (2009)	38,48 ± 1,67	3,50	10,50		6,4 mill
Camariñas (2007)	41,44 ± 9,16	2,69	11,53	6,7 mill	5,5 mill
O Barqueiro (2008)	41,44 ± 1,77	3,93	13,38	7 mill	6,2 mill
Población	 PRIMAVERA				
	Talla	ICG	ICV	Nº huevos	Nº larvas D
Barallobre (2008)	38,55 ± 4,23	3,41	14,95		1,5 mill
Vilaxoán 1 (2006)	39,88 ± 2,21	2,92	9,05	14,3 mill	13 mill
Vilaxoán 2 (2007)	35,27 ± 1,77	5,82	18,22		
Cangas (2007)	35,47 ± 2,73	5,01	17,36		7,9 mill
Población	 VERANO				
	Talla	ICG	ICV	Nº huevos	Nº larvas D
Barallobre (2007)	37,52 ± 2,28	6,52	20,58	2,3 mill	2 mill
Vilaxoán (2008)	37,21 ± 1,26	3,96	15,68		3,8 mill
Cangas (2007)	39,74 ± 2,53	5,98	17,27		2,3 mill
Camariñas (2008)	39,90 ± 2,25	4,31	16,85		

Los valores del Índice de Condición visceral presentan la misma evolución a lo largo de las estaciones que el Índice de Condición gonadal, con máximos en los meses de verano y otoño, y mínimos durante el invierno.

Del análisis estadístico de los resultados se deduce que hay diferencias estacionales en los Índices de Condición al 95% de confianza, con valores altos en verano-otoño y bajos en invierno-primavera. Esta oscilación de valores a lo largo del año ocurre igual en todas las poblaciones, por lo que no hay diferencias poblacionales, al 95% de confianza, en los valores del Índice de Condición.

En cuanto a la relación de los desoves con los Índices de Condición gonadal y visceral, del análisis estadístico de los resultados se concluye que, no existe ninguna relación entre los Índices de Condición de los lotes de reproductores y el número de huevos o larvas D obtenidos a partir de éstos.

Así, en otoño se obtuvo un desove de 32 millones de huevos de los reproductores de Barallobre que tenían un 4,71 de ICG y 6 millones de larvas D de los reproductores de Vilaxoán con un ICG de 7,69.

En invierno, de los reproductores de Vilaxoán 1 con un ICG de 2,36 se obtuvieron 25 millones de larvas D, mientras que de los reproductores de Camariñas con un valor similar en el ICG (2,69) sólo se obtuvieron 5,5 millones de larvas D.

Los Índices de Condición de los reproductores son diferentes según la época del año, no difieren entre localidades y no dan información sobre la cantidad de desove de los mismos.

5.3.6.2 COMPOSICIÓN BIOQUÍMICA DE LOS REPRODUCTORES

La composición bioquímica de los distintos lotes de progenitores de *V. pullastra* utilizados en el criadero en las distintas estaciones tiene, en todas las poblaciones, una evolución similar. En la figura 5.21 se muestra la evolución de los distintos componentes en cada una de las estaciones del año.

En los meses de verano y otoño se observan los valores más altos de contenido de carbohidratos y lípidos en gónada, coincidiendo con un valor alto en el ICG En los

5. Cultivo en criadero

meses de invierno y primavera es cuando los progenitores presentan mayor cantidad de proteínas en gónada y menor de carbohidratos y lípidos. Estos valores en la composición bioquímica de los distintos lotes de progenitores, se asemejan a los encontrados en el estudio del ciclo reproductivo del capítulo I.

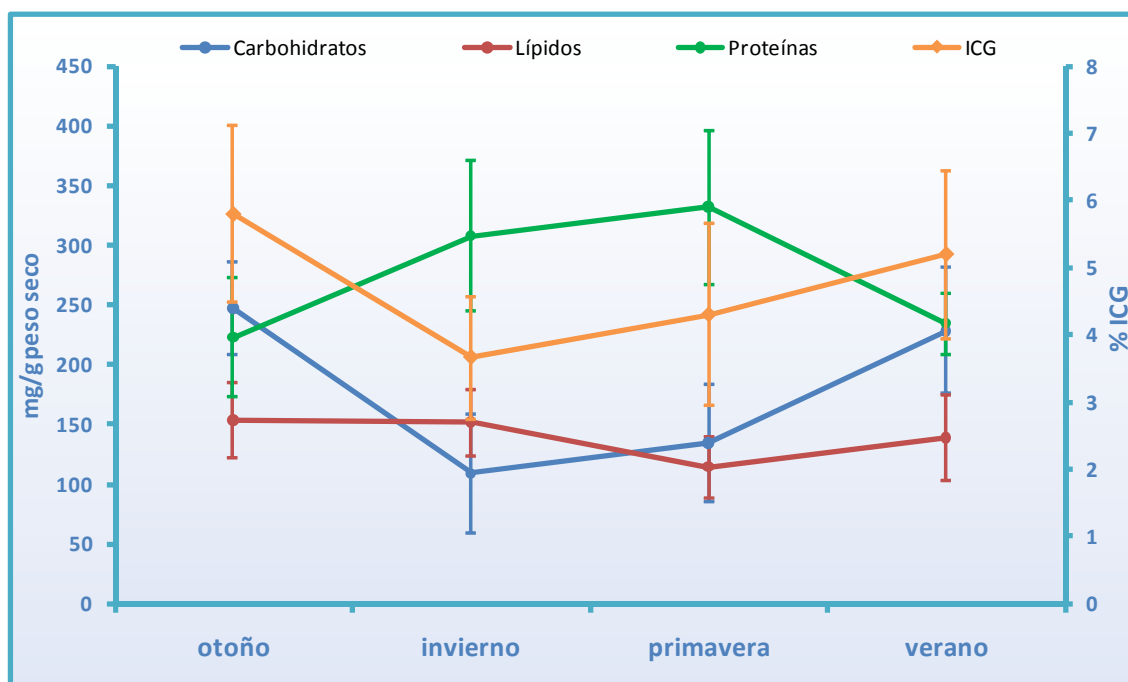






FIGURA 5.21: Valor medio y desviación típica de la cantidad de carbohidratos, lípidos y proteínas (en mg/g peso seco) y del ICG (en %) en los distintos lotes de reproductores de *V. pullastra*.

El análisis estadístico de los resultados muestra que hay diferencias estacionales en la composición bioquímica de los reproductores, pero ésta varía de igual forma en las distintas localidades, por lo que no hay diferencias poblacionales en la variación de los componentes bioquímicos mayoritarios de los reproductores.

La composición bioquímica mayoritaria de los distintos lotes de reproductores utilizados no tiene relación con la cantidad de desove obtenido a partir de éstos (Tabla V.4). Así, los desoves más abundantes fueron los de Barallobre de otoño y Vilaxoán 1 de invierno. El primero, con 32 millones de huevos, se obtuvo con unos progenitores que tenían 215 mg/g peso seco de carbohidratos en gónada y el segundo, de 25 millones de larvas D, con unos progenitores con 48 mg/g peso seco de carbohidratos en gónada. La mayor cantidad de lípidos en gónada se corresponde con los progenitores de invierno de Cangas 1, de los que sólo se obtuvo un desove de 1,8

millones. En otoño, con la mitad de lípidos en gónada (110,40 mg/g peso seco), se obtuvo un desove de 11,3 millones de los progenitores de Camariñas.

TABLA V.4: Composición bioquímica en mg/g peso seco de los reproductores de *V. pullastra* utilizados en el criadero y la cantidad de desove recogido en cada uno de ellos.

	Carbohidratos		Lípidos		Proteínas		Desoves	
	Gónada	Vianda menos gónada	Gónada	Vianda menos gónada	Gónada	Vianda menos gónada		
	 OTOÑO						Nº huevos	Nº larvas D
Barallobre (2006)	215,16	92,95	144,70	61,03	303,39	378,95	32 mill	30 mill
Vilaxoán (2007)	288,72	137,38	164,60	66,03	222,06	389,94		6 mill
Cangas 1 (2007)	249,97	94,88	203,55	71,24	234,07	396,34		
Cangas 2 (2008)	190,11	88,45	136,64	67,38	159,57	219,28	12,3 mill	11 mill
Camariñas (2008)	252,27	65,71	110,40	58,22	179,34	296,45		11,3 mill
O Barqueiro (2007)	283,90	102,68	158,68	59,23	236,9	404,75	10,4 mill	8,3 mill
 INVIERNO								
Barallobre (2006)	109,83	68,86	137,20	62,13	292,71	305,97	8,2 mill	6 mill
Vilaxoán 1 (2006)	47,85	35,33	133,82	87,09	385,47	392,10		25 mill
Vilaxoán 2 (2007)	70,81	48,35	132,93	63,78	344,06	383,46	6,3 mill	4,7 mill
Cangas 1 (2008)	152,19	73,00	210,44	67,48	255,70	410,56		1,8 mill
Cangas 2 (2009)	130,02	63,69	162,56	60,67	207,80	246,57		6,4 mill
Camariñas (2007)	65,10	38,25	146,19	64,99	369,23	404,35	6,7 mill	5,5 mill
O Barqueiro (2008)	184,33	67,00	136,62	64,41	297,01	409,53	7 mill	6,2 mill
 PRIMAVERA								
Barallobre (2008)	99,26	30,04	91,38	67,63	350,51	409,12		1,5 mill
Vilaxoán 1 (2006)	86,06	64,09	96,37	63,21	413,19	416,81	14,3 mill	13 mill
Vilaxoán 2 (2007)	162,03	97,18	146,90	90,22	288,73	320,42		
Cangas (2007)	189,02	108,68	121,90	74,1	272,58	364,1		7,9 mill
 VERANO								
Barallobre (2007)	179,69	124,53	150,49	60,04	248,16	234,32	2,3 mill	2 mill
Vilaxoán (2008)	208,98	92,88	105,46	59,62	244,33	315,56		3,8 mill
Cangas (2007)	302,98	118,34	183,75	71,72	195,66	367,21		2,3 mill
Camariñas (2008)	220,01	91,75	114,69	53,04	248,54	382,84		

En el análisis estadístico de los resultados se observa que no hay correlación entre los valores de carbohidratos, lípidos y proteínas y la cantidad de desove obtenido de cada lote de reproductores.

La composición bioquímica de los progenitores varía de igual forma a lo largo del año en las distintas localizaciones y ninguno de los componentes está relacionado con la cantidad de desove de los mismos.

5.3.6.3 ESTADIO GAMETOGENICO DE LOS REPRODUCTORES

En la tabla V.5 se muestra el porcentaje de individuos en cada estadio gametogénico en los diferentes lotes de *V. pullastra* usados como reproductores en las distintas estaciones.

Aunque esta especie presenta ovocitos maduros a lo largo del año, existe un período donde el porcentaje de individuos en estadio E3, de madurez y puesta, es más elevado o está presente en la mayoría de la población. Así, en el invierno y primavera la mayoría de la población en los distintos lotes de reproductores se encuentra en estadio E3, aunque también se encuentra parte de la población en estadio E2, de gametogénesis avanzada. En verano y otoño presentan más individuos en el estadio E4, de renovación gonadal y en E1, de inicio de la gametogénesis.

Como se vio en el estudio del ciclo reproductivo del capítulo I, además del amplio período de madurez y puesta, esta especie presenta folículos en distintos estadios dentro de un mismo individuo y heterogeneidad de estadios dentro de un mismo lote. Esto permite que, en lotes de reproductores con pequeño porcentaje de individuos en estadio E3 de madurez, se puedan obtener igualmente desoves abundantes. Así, en otoño se recoge un desove de 30 millones de la población de Barallobre, en la que sólo había un 7% de individuos en el estadio E3 de madurez, y 8 millones de la población de O Barqueiro, con ninguno de los individuos maduros. En invierno se obtiene un desove de 25 millones de la población Vilaxoán 1 en la que ya había un 30% de individuos en renovación gonadal. En verano se obtienen 3,8 y 2,3 millones de las poblaciones de Vilaxoán y Cangas en las que ninguno de los individuos estaba en madurez.

TABLA V.5: Porcentaje de individuos en cada estadio gametogénico. E1: Inicio de la gametogénesis; E2: Gametogénesis avanzada; E3: Madurez y puesta y E4: Renovación gonadal.


OTOÑO

Población	E1	E2	E3	E4	Nº huevos	Nº larvas D
Barallobre (2006)	47%	33%	7%	13%	32 mill	30 mill
Vilaxoán (2007)	43%	36%	14%	7%		6 mill
Cangas 1 (2007)	62%	23%		15%		
Cangas 2 (2008)	14%	29%	14%	43%	12,3 mill	11 mill
Camariñas (2008)	50%	8%	17%	25%		11,3 mill
O Barqueiro (2007)	47%	53%			10,4 mill	8,3 mill


INVIERNO

Población	E1	E2	E3	E4	Nº huevos	Nº larvas D
Barallobre (2006)		27%	73%		8,2 mill	6 mill
Vilaxoán 1 (2006)			70%	30%		25 mill
Vilaxoán 2 (2007)		55%	45%		6,3 mill	4,7 mill
Cangas 1 (2008)	13%	53%	33%			1,8 mill
Cangas 2 (2009)	14%	71%		14%		6,4 mill
Camariñas (2007)	44%	50%	6%		6,7 mill	5,5 mill
O Barqueiro (2008)	29%	43%	14%	14%	7 mill	6,2 mill


PRIMAVERA

Población	E1	E2	E3	E4	Nº huevos	Nº larvas D
Barallobre (2008)	20%	80%				1,5 mill
Vilaxoán 1 (2006)			100%		14,3 mill	13 mill
Vilaxoán 2 (2007)		88%	13%			
Cangas (2007)	7%	20%	33%	40%		7,9 mill


VERANO

Población	E1	E2	E3	E4	Nº huevos	Nº larvas D
Barallobre (2007)	22%	39%	6%	33%	2,3 mill	2 mill
Vilaxoán (2008)	86%	14%				3,8 mill
Cangas (2007)	67%	27%		7%		2,3 mill
Camariñas (2008)	28%	17%	11%	44%		

5. Cultivo en criadero

Después de la observación por histología del estadio gametogénico de los distintos lotes de reproductores utilizando la escala descrita en el capítulo I, se observa que independientemente del estadio presente en la mayor parte del lote, se obtuvieron desoves de *V. pullastra* a lo largo de todo el año.

5.3.6.4 CRECIMIENTO DE LOS DESARROLLOS LARVARIOS Y POSTLARVARIOS

En la figura 5.22 se representa el crecimiento en longitud de los distintos desarrollos larvarios estudiados.

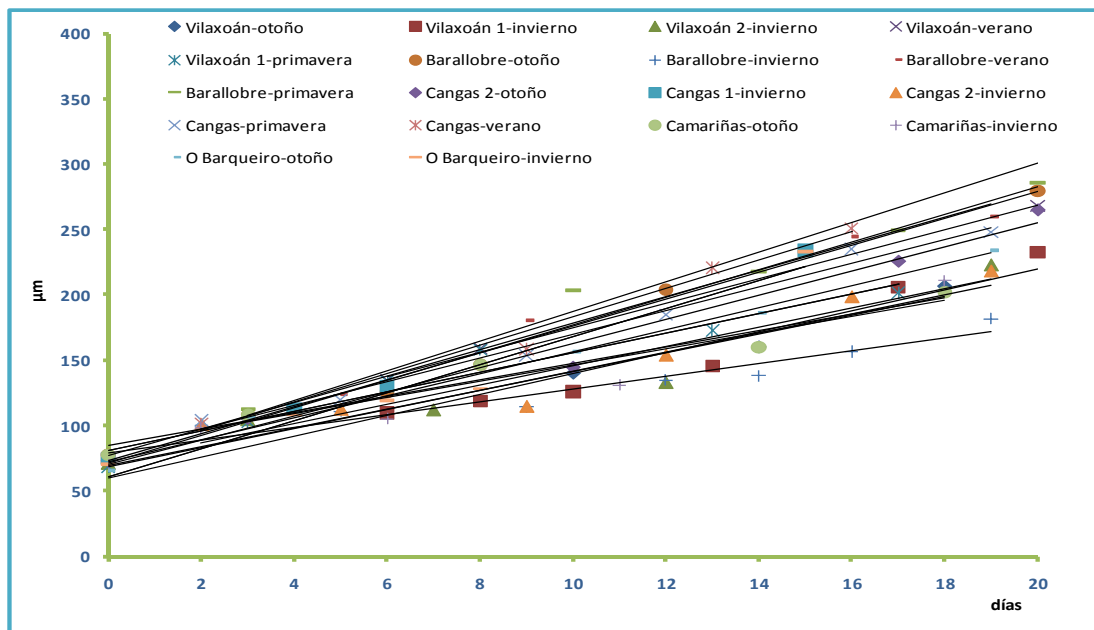


FIGURA 5.22: Crecimiento en longitud (en μm) durante el desarrollo larvario de *V. pullastra*.

El crecimiento larvario siguió un modelo lineal con un coeficiente de ajuste (R^2) superior a 0,92. El crecimiento diario en longitud durante el cultivo larvario osciló entre 10,88 $\mu\text{m}/\text{día}$ en el desove de Cangas de verano y 4,85 $\mu\text{m}/\text{día}$ en el desove de Barallobre invierno. La media para todos los cultivos fue de 8,38 $\mu\text{m}/\text{día}$.

Comparando las distintas poblaciones, en las tres que se obtuvieron desoves en todas las estaciones, los resultados de crecimiento en la de Cangas fueron superiores a los de Vilaxoán y Barallobre (Tabla V.6). En la primera, las tasas de crecimiento diario oscilaron entre un valor de 10,88 en el cultivo de verano y 7,12 en el de primavera. En

Vilaxoán la tasa más alta fue de 9,38 en verano y la más baja de 6,20 en otoño. En la población de Barallobre, aunque se obtuvieron tasas altas en los cultivos de otoño y verano (10,30 y 10,08), se obtuvo en invierno un cultivo con una tasa de crecimiento baja de 4,85.

Entre las distintas estaciones, en otoño e invierno se obtuvieron desarrollos larvarios con tasas de crecimiento muy variables, entre 4,85 y 10,74, mientras que en verano las tasas de crecimiento fueron superiores a un valor de 9,38.

TABLA V.6: Rectas de regresión y coeficiente de regresión de los cultivos larvarios de *V. pullastra*.

	Puesta	Recta de Regresión	Coficiente de Regresión
Otoño	Barallobre (2006)	$y = 10,3030x + 73,027$	0,9910
	Vilaxoán (2007)	$y = 6,2086x + 84,259$	0,9403
	Cangas 2 (2008)	$y = 9,2580x + 70,272$	0,9812
	Camariñas (2008)	$y = 6,2883x + 84,927$	0,9576
	O Barqueiro (2007)	$y = 8,4295x + 72,487$	0,9923
Invierno	Barallobre (2006)	$y = 4,8573x + 79,556$	0,9386
	Vilaxoán 1 (2006)	$y = 7,9942x + 60,461$	0,9445
	Vilaxoán 2 (2007)	$y = 7,2916x + 68,902$	0,9200
	Cangas 1 (2008)	$y = 10,5360x + 72,029$	0,9985
	Cangas 2 (2009)	$y = 7,3436x + 72,624$	0,9237
	Camariñas (2007)	$y = 7,1731x + 70,078$	0,9389
	O Barqueiro (2008)	$y = 10,742x + 61,179$	0,9578
Primavera	Barallobre (2008)	$y = 9,6808x + 90,287$	0,9753
	Vilaxoán 1 (2006)	$y = 7,4742x + 81,313$	0,9493
	Cangas (2007)	$y = 7,1288x + 69,879$	0,9362
Verano	Barallobre (2007)	$y = 10,0830x + 77,696$	0,9987
	Vilaxoán (2008)	$y = 9,3823x + 81,138$	0,9984
	Cangas (2007)	$y = 10,8800x + 74,228$	0,9812

En la figura 5.23 se representa el crecimiento en longitud en los distintos desarrollos postlarvarios estudiados.

5. Cultivo en criadero

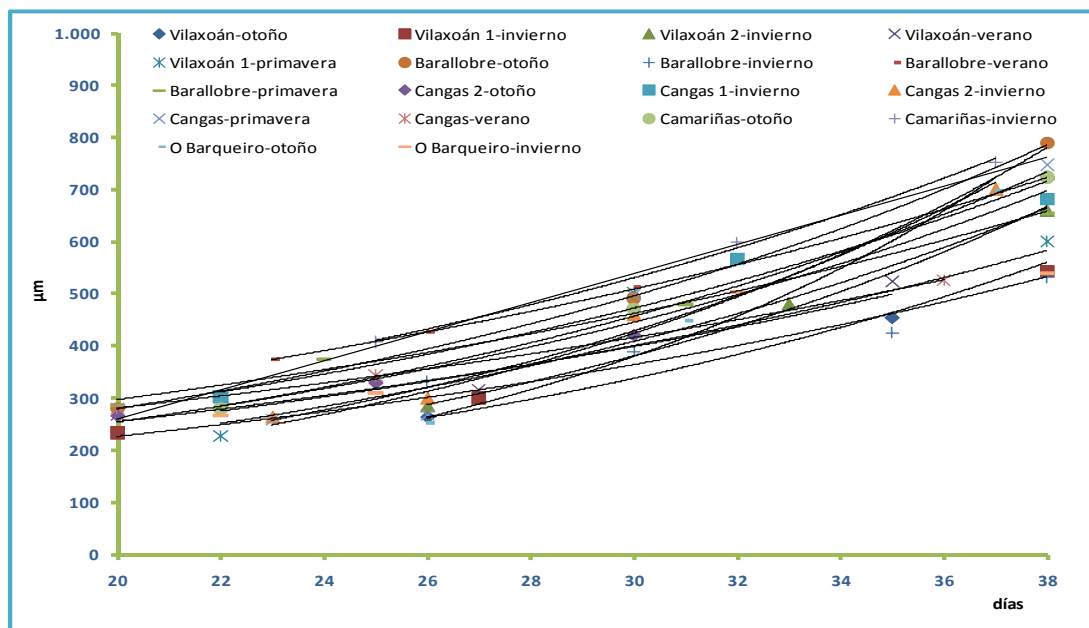


FIGURA 5.23: Crecimiento en longitud (en μm) durante el desarrollo postlarvario de *V. pullastra*.

TABLA V.7: Curvas de ajuste y coeficiente de regresión de los cultivos postlarvarios de *V. pullastra*.

	Puesta	Curvas de ajuste	Coefficiente de Regresión
Otoño	Barallobre (2006)	$y = 88,319e^{0,0575x}$	0,9998
	Vilaxoán (2007)	$y = 50,294e^{0,0635x}$	0,9984
	Cangas 2 (2008)	$y = 82,549e^{0,0562x}$	0,9871
	Camariñas (2008)	$y = 77,145e^{0,0593x}$	0,9969
	O Barqueiro (2007)	$y = 24,060e^{0,0920x}$	0,9932
Invierno	Barallobre (2006)	$y = 48,548e^{0,0710x}$	0,9711
	Vilaxoán 1 (2006)	$y = 87,185e^{0,0476x}$	0,9899
	Vilaxoán 2 (2007)	$y = 46,353e^{0,07202x}$	0,9981
	Cangas 1 (2008)	$y = 99,121e^{0,0520x}$	0,9744
	Cangas 2 (2009)	$y = 48,162e^{0,0729x}$	0,9827
	Camariñas (2007)	$y = 13,909e^{0,0513x}$	0,9969
	O Barqueiro (2008)	$y = 97,902e^{0,0470x}$	0,9303
Primavera	Barallobre (2008)	$y = 122,460e^{0,0443x}$	0,9889
	Vilaxoán 1 (2006)	$y = 65,722e^{0,0609x}$	0,8827
	Cangas (2007)	$y = 42,897e^{0,0764x}$	0,9322
Verano	Barallobre (2007)	$y = 136,130e^{0,0439x}$	0,9998
	Vilaxoán (2008)	$y = 103,540e^{0,0449x}$	0,9984
	Cangas (2007)	$y = 127,870e^{0,0343x}$	0,9999

El cultivo postlarvario siguió un modelo de crecimiento exponencial con un coeficiente de ajuste (R^2) superior a 0,88 (Tabla V.7).

Las larvas que llegaron a la fijación hacia los 19-20 días con una talla en torno a 210-250 μm , durante el cultivo postlarvario alcanzaron a los 38 días una talla entre 500-800 μm . A medida que las larvas aumentaron de tamaño, aumentó la dispersión de tallas dentro de cada cultivo.

Los cultivos con mayores crecimientos fueron los de Barallobre otoño y Cangas primavera que a los 38 días de cultivo alcanzaron una talla en torno a 750-800 μm . Los peores cultivos en cuanto crecimiento fueron los de Vilaxoán otoño, Barallobre invierno y Barqueiro invierno, que a los mismos días de cultivo sólo alcanzaron una talla entre 500-550 μm .

5.3.6.5 SUPERVIVENCIA DE LOS DESARROLLOS LARVARIOS Y POSTLARVARIOS

En la tabla V.8 se muestran los resultados de supervivencia de los desoves obtenidos en distintas épocas del año de los reproductores de distintas localidades.

La supervivencia desde larva D hasta larva pediveliger (supervivencia larvaria) osciló entre el 87% en el cultivo de Barallobre de otoño y el 19% en el de Cangas 1 de invierno, obteniéndose una media en todos los cultivos del 56% de supervivencia en esta fase.

Durante el cultivo postlarvario la supervivencia media desde la fijación (larva pediveliger) hasta la postlarva de 38-40 días de cultivo fue del 49%, oscilando entre 89% en el cultivo de otoño procedente de los reproductores de Barallobre y 9% en el de otoño de los reproductores de Cangas 2.

Desde el inicio del cultivo (larva D) hasta que la semilla tenía 38-40 días de vida, la supervivencia media de todos los cultivos fue del 29%, obteniéndose en el peor cultivo un 5% de supervivencia y en el mejor un 78%.

5. Cultivo en criadero

TABLA V.8: Número de larvas D, supervivencia larvaria, postlarvaria y total de cada desove de *V. pullastra* en las distintas estaciones.

OTOÑO

Procedencia	Nº larvas D	Supervivencia larvaria	Supervivencia postlarvaria	Supervivencia total
Barallobre (2006)	30.000.000	87%	89%	78%
Vilaxoán (2007)	6.000.000	67%	17%	12%
Cangas 2 (2008)	11.000.000	50%	9%	5%
Camariñas (2008)	11.300.000	38%	33%	10%
O Barqueiro (2007)	8.300.000	24%	27%	7%

INVIERNO

Procedencia	Nº larvas D	Supervivencia larvaria	Supervivencia postlarvaria	Supervivencia total
Barallobre (2006)	6.000.000	41%	44%	18%
Vilaxoán 1 (2006)	25.000.000	36%	18%	7%
Vilaxoán 2 (2007)	4.700.000	69%	40%	27%
Cangas 1 (2008)	1.800.000	19%	61%	12%
Cangas 2 (2009)	6.400.000	73%	73%	54%
Camariñas (2007)	5.500.000	33%	36%	12%
O Barqueiro (2008)	6.200.000	64%	41%	27%

PRIMAVERA

Procedencia	Nº larvas D	Supervivencia larvaria	Supervivencia postlarvaria	Supervivencia total
Barallobre (2008)	1.500.000	86%	76%	66%
Vilaxoán 1 (2006)	13.000.000	69%	83%	58%
Cangas (2007)	7.900.000	33%	64%	20%

VERANO

Procedencia	Nº larvas D	Supervivencia larvaria	Supervivencia postlarvaria	Supervivencia total
Barallobre (2007)	2.000.000	57%	78%	45%
Vilaxoán (2008)	3.800.000	64%	45%	29%
Cangas (2007)	2.300.000	83%	44%	37%

Teniendo en cuenta que la supervivencia media desde el inicio del cultivo (larva D) hasta el final del cultivo postlarvario (aproximadamente 40 días) fue en torno al 29%, en la población de Barallobre se obtuvieron los mejores resultados de supervivencia, pues de los 4 desoves estudiados, tres de ellos superaron la supervivencia total media (78, 66 y 45%). Por el contrario, en ninguno de los desoves

obtenidos de las poblaciones de Camariñas y O Barqueiro, la supervivencia superó el 30%.

Aunque se obtuvieron mejores resultados en los desoves obtenidos de los reproductores de Barallobre, el análisis estadístico de los datos no reveló ninguna relación en la supervivencia de los desoves y la procedencia de los lotes.

En cuanto a la relación entre los desoves obtenidos y la estación del año, se observa que el número de larvas D es mayor al 95% de confianza en otoño que en verano (Tabla V.9). En otoño se obtuvieron desoves de entre 6 y 30 millones de larvas D, mientras que en el verano el más abundante fue de sólo 3,8 millones de larvas. En las estaciones de invierno y primavera el tamaño de los distintos desoves fue muy variable, entre 1,8 y 25 millones en invierno y 1,5 y 13 millones en primavera.

En relación a las supervivencias obtenidas en las distintas estaciones del año, no hay diferencias significativas entre las supervivencias larvarias obtenidas, aunque la supervivencia postlarvaria fue mayor al 95% de confianza en primavera que en invierno (Tabla V.9).

En cuanto a la supervivencia total de los cultivos, desde el inicio hasta que la semilla tenía 38-40 días de vida, ésta fue menor (al 95% de confianza) en invierno, con respecto a la primavera y el verano.

A pesar de que en otoño se obtuvo una supervivencia del 78% en el cultivo procedente de los reproductores de Barallobre, el resto de los cultivos tuvieron una supervivencia inferior al 12%. La mayoría de los cultivos de invierno, a excepción del de Cangas 2, tuvieron supervivencias finales inferiores a la media de todo el año.

Los cultivos de primavera y verano tuvieron supervivencias mayores a los de otoño e invierno, entre un 20 y un 66% en primavera y un 29 y un 45% en verano.

5. Cultivo en criadero

TABLA V.9: Niveles de significación exacta (U de Mann-Whitney) en la comparación del número de larvas D y las supervivencias de los cultivos entre las distintas estaciones. Negrita: correlación significativa, * al 95% de confianza, n.s. no significativo.

Nº Larvas D	Otoño	Invierno	Primavera	Verano
Otoño	-	0,397 ^{n.s.}	1,000 ^{n.s.}	0,038 *
Invierno	-	-	0,721 ^{n.s.}	0,192 ^{n.s.}
Primavera	-	-	-	0,343 ^{n.s.}
Verano	-	-	-	-
Sup. Larvaria	Otoño	Invierno	Primavera	Verano
Otoño	-	0,494 ^{n.s.}	1,000 ^{n.s.}	0,352 ^{n.s.}
Invierno	-	-	0,327 ^{n.s.}	0,061 ^{n.s.}
Primavera	-	-	-	0,686 ^{n.s.}
Verano	-	-	-	-
Sup. Postlarvaria	Otoño	Invierno	Primavera	Verano
Otoño	-	0,494 ^{n.s.}	0,067 ^{n.s.}	0,171 ^{n.s.}
Invierno	-	-	0,003 *	0,158 ^{n.s.}
Primavera	-	-	-	0,486 ^{n.s.}
Verano	-	-	-	-
Sup. total	Otoño	Invierno	Primavera	Verano
Otoño	-	0,968 ^{n.s.}	0,171 ^{n.s.}	0,114 ^{n.s.}
Invierno	-	-	0,018 *	0,012 *
Primavera	-	-	-	0,886 ^{n.s.}
Verano	-	-	-	-

5.3.6.6 RELACIÓN ENTRE LOS DESOVES Y LOS CULTIVOS

En la tabla V.10 se muestran los datos estadísticos de la correlación de Spearman entre el tamaño del desove (número de huevos o larvas D), el tamaño de los huevos, el porcentaje de transformación, la duración de las distintas fases del cultivo, el crecimiento (talla de larva D, larva pediveliger y postlarva) y la supervivencia del cultivo larvario y postlarvario.

TABLA V.10: Coeficiente de correlación de Spearman entre el tamaño del desove y la duración, crecimiento y supervivencia del cultivo larvario y postlarvario. Nº Hv: número de huevos; Talla Hv: talla de los huevos; Sup Hv-Ld: porcentaje de transformación a larva D; Nº Ld: número de larvas D; Talla Ld: talla de la larva D; Días Larv: duración cultivo larvario; Sup Ld-Pv: supervivencia desde larva D a pediveliger; Talla Pedivel: talla de pediveliger; Días Postlarv: duración cultivo postlarvario; Sup Pv-Pl: supervivencia de pediveliger a postlarva; Talla Postlarv: talla postlarva.
Negrita: correlación significativa, * al 95% de confianza, ** al 99% de confianza.

	Nº Hv	Talla Hv	Sup Hv-Ld	Nº Ld	Talla Ld	Días Larv	Sup Ld-Pv	Talla Pedivel	Días Postlarv	Sup Pv-Pl	Talla Postlarv
Nº Hv	-	0,071	0,216	1,000**	-0,214	-0,436	0,190	-0,238	0,430	0,167	0,143
Talla Hv	-	-	0,802*	-0,029	0,119	-0,138	-0,096	0,254	-0,301	-0,003	-0,196
Sup Hv-Ld	-	-	-	0,216	-0,071	-0,329	0,240	0,647	-0,370	0,826*	-0,287
Nº Ld	-	-	-	-	-0,042	0,116	-0,276	-0,206	0,285	-0,243	-0,129
Talla Ld	-	-	-	-	-	0,025	0,273	0,188	-0,022	0,022	-0,009
Días Larv	-	-	-	-	-	-	-0,400*	0,008	0,195	-0,309	0,004
Sup Ld-Pv	-	-	-	-	-	-	-	0,021	-0,423*	0,367	-0,325
Talla Pedivel	-	-	-	-	-	-	-	-	-0,364	0,075	-0,199
Días Postlarv	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-0,212	0,505**
Sup Pv-Pl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,241
Talla Postlarv	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

No hay correlación estadística entre la cantidad de desove obtenido de un lote de reproductores y la supervivencia del mismo. Así, entre los desoves más abundantes, el de 30 millones de larvas D de Barallobre en otoño tuvo un 78% de supervivencia al final del cultivo, mientras que el desove de 25 millones de larvas de Vilaxoán 1 de invierno, tan sólo tuvo una supervivencia del 7%. Esta diferencia de supervivencias también ocurrió en los desoves poco abundantes, ya que del desove de 1,8 millones de Cangas 1 de invierno se consiguió una supervivencia del 12% mientras que del desove de 1,5 millones de Barallobre primavera se obtuvo una supervivencia del 66%.

La supervivencia larvaria y la postlarvaria tampoco están relacionadas, una buena supervivencia larvaria no implica buenos resultados en el cultivo postlarvario y viceversa. Por ejemplo, en el desove de Cangas 2 de otoño se obtuvo una supervivencia larvaria del 50% y una postlarvaria del 9%, por el contrario, en el desove de Cangas 1 de invierno ocurrió lo contrario, con una supervivencia larvaria del 19% se obtuvo una supervivencia postlarvaria del 61%.

5. Cultivo en criadero

El porcentaje de transformación de huevo a larva D está relacionada al 95% de confianza con el tamaño de los huevos, por lo que a mayor tamaño de los huevos, mayor supervivencia de éstos.

Por otro lado, cuanto menor tiempo dure el cultivo larvario, mayor será la supervivencia larvaria al 95% de confianza; y cuanto mayor sea la supervivencia larvaria, menor durará el cultivo postlarvario.

5.4 DISCUSIÓN

Debido al amplio período de madurez y puesta, la asincronía folicular dentro de un mismo individuo y a la heterogeneidad de estadios dentro de una población, **se pueden obtener desoves de *Venerupis pullastra* a lo largo de todo el año, a partir de reproductores traídos del medio natural.** En otras especies de venéridos de interés comercial en Galicia, como la almeja fina (*Ruditapes decussatus*) y la almeja japonesa (*R. philippinarum*), la obtención de desove a partir de individuos procedentes del medio natural está restringida a los meses de primavera y verano, época de madurez en el medio natural (Rodríguez Moscoso *et al.*, 1992; Rodríguez Moscoso, 2000 y Ojea *et al.*, 2002 y 2005); con lo cual para ampliar sus períodos de puesta, a diferencia de *V. pullastra*, es necesario realizar el acondicionamiento de reproductores en criadero para obtener desoves fuera de su época natural.

En la almeja babosa se puede realizar el acondicionamiento de reproductores con el fin de obtener varios desoves de un mismo lote. **Los reproductores que desovan a su llegada del medio natural, se pueden mantener acondicionados en el criadero y obtener en un plazo de 20-30 días más puestas, no habiendo diferencias de calidad entre los desoves obtenidos de los reproductores traídos del medio natural y los acondicionados en el criadero.**

La mayoría de lotes de reproductores de *V. pullastra* desovan a su llegada al criadero, tras pasar 24 horas en frío y seco después de su extracción, al ser de nuevo introducidos en agua. En el caso de que no se produzca la puesta **se pueden inducir los reproductores mediante choques térmicos, con temperaturas del agua entre 12 y 20°C, intercalando con períodos de desecación.** También en ocasiones, cuando se mantienen los reproductores estabulados en el criadero, **se pueden obtener desoves de manera espontánea. No se encuentra diferencia en cuanto a la calidad de los desoves y la supervivencia de los cultivos larvarios entre los desoves espontáneos y los inducidos con choques térmicos.**

La inducción a la puesta con choques térmicos da resultados positivos en otras especies de venéridos como *R. decussatus* (Ojea *et al.*, 2008) y *R. philippinarum* (Aranda *et al.*, 2009), en las especies de solénidos *Ensis siliqua* y *Solen marginatus* (Martínez Patiño, 2002) y en *Donax trunculus* (Louzán, 2008). En el solénido *E. arcuatus* la estimulación a la puesta es efectiva mediante la modificación del nivel del agua, intercalando con períodos de desecación (da Costa *et al.*, 2008). Aunque la estimulación a la puesta se realiza satisfactoriamente en todas estas especies, de los resultados obtenidos en el Centro de Cultivos, se puede afirmar que en *V. pullastra*, *R. philippinarum*, *D. trunculus*, *E. siliqua* y *E. arcuatus* es más fácil conseguir resultados positivos que en las especies *R. decussatus* y *S. marginatus* (datos sin publicar).

El número medio de huevos emitidos por hembra en *V. pullastra* calculado a partir de diversas experiencias realizadas a lo largo del año fue de 500.000 ovocitos, coincidiendo con los resultados de Nóvoa (2007) en esta misma especie y en las mismas instalaciones. En otros venéridos, en la especie *R. decussatus* Pérez Camacho *et al.* (1977) encontraron que el número medio de ovocitos por hembra era de 1 millón, aunque en el Centro de Cultivos la variabilidad de las puestas obtenidas fue muy grande, oscilando entre valores de 0,36 y 1,9 millones de huevos por hembra (Ojea *et al.*, 2008). Helm *et al.* (2004) señalan para la especie *R. philippinarum* una fecundidad de entre 5 y 12 millones y Davis y Chanley (1956) para la especie *Venus mercenaria* de entre 3,6 y 4,7 millones de huevos.

Debido al gran período de madurez y puesta y a la asincronía folicular que se observa en la especie *V. pullastra*, la emisión de gametos en el medio natural se prolonga durante un período más amplio de tiempo en relación a las otras especies de venéridos, en las que el período de madurez está restringido a los meses de primavera y verano. Esta emisión de gametos más continuada a lo largo del tiempo podría explicar la menor cantidad de huevos emitidos por *V. pullastra* en relación a las otras especies. Aunque Pérez Camacho *et al.* (1977) encontraron que el número de ovocitos emitidos por hembra, calculado en 25 ejemplares de *V. pullastra*, era de 2,3 millones, muy superior a los resultados obtenidos en este trabajo.

El tamaño medio de los huevos de *V. pullastra* es de 65-75 μm , similar al de otras especies de almejas de interés comercial en Galicia, como *R. decussatus* y *R. philippinarum* y más pequeño que *D. trunculus*, *E. siliqua*, *E. arcuatus* y *S. marginatus* (Martínez Patiño *et al.*, 2008; Ojea *et al.*, 2008; da Costa y Martínez Patiño, 2009; Louzán *et al.*, 2009; da Costa *et al.*, 2010a y 2010b).

El porcentaje de transformación medio desde huevo a larva D en *V. pullastra* fue del 84%, coincidiendo con los resultados obtenidos por Pérez Camacho *et al.* (1977) en esta misma especie. Este porcentaje de transformación fue similar al obtenido por da Costa (2009) en las especies de solénidos *E. siliqua*, *E. arcuatus* y *Solen marginatus*. Sin embargo, en la especie *R. decussatus*, los porcentajes de transformación obtenidos en las mismas instalaciones suelen ser inferiores.

En este trabajo se ha observado que en la especie *V. pullastra*, **a mayor tamaño de los huevos, mayor porcentaje de transformación de éstos en larvas D**. Kraeuter *et al.* (1982) estudiando el venérico *Mercenaria mercenaria* y el pectínido *Argopecten irradians* vieron que pequeñas diferencias en el tamaño de los ovocitos pueden ser importantes en la supervivencia larvaria, indicando que éstas podían reflejar cambios en la cantidad de reservas bioquímicas almacenadas en el huevo. Así, Bayne *et al.* (1975) encontraron que individuos adultos de *Mytilus edulis* sometidos a estrés nutricional producían ovocitos más pequeños y con menor cantidad de proteínas y lípidos que los producidos por adultos normales, afectando posteriormente al crecimiento de los desarrollos larvarios. En el trabajo realizado con las especies *M. mercenaria* y *Crassostrea virginica*, Gallager y Mann (1986) obtuvieron correlaciones significativas entre el diámetro del huevo y el contenido lipídico, y entre éste y las supervivencias hasta larva D y larva pediveliger.

El crecimiento de *V. pullastra* durante la fase larvaria se ajusta a un modelo lineal, con un incremento diario medio de 7,65 $\mu\text{m}/\text{día}$, oscilando los resultados entre 4,85 y 10,88 $\mu\text{m}/\text{día}$. En esta misma especie y en las mismas condiciones de cultivo, en un estudio realizado sobre la composición de ácidos grasos de diferentes desarrollos larvarios, Nóvoa (2007) cita crecimientos de entre 11,45 $\mu\text{m}/\text{día}$ para los desarrollos

5. Cultivo en criadero

más rápidos y 7,42 $\mu\text{m}/\text{día}$ para los desarrollos más lentos. Pérez Camacho *et al.* (1977) en una experiencia llevada a cabo con diferentes temperaturas de cultivo, vieron que el crecimiento durante la fase larvaria era directamente proporcional a la temperatura, hasta un máximo de 26°C a partir de donde se ralentizaba el crecimiento y aumentaba la mortalidad. A la misma temperatura de cultivo que la utilizada en este trabajo (18 \pm 1°C) el crecimiento obtenido por estos autores fue de 6,72 $\mu\text{m}/\text{día}$.

Este crecimiento lineal a lo largo de los desarrollos larvarios también se da en otras especies de bivalvos: *M. edulis* (Bayne, 1965), *Ostrea edulis* (Román, 1989), *M. galloprovincialis* (Sedano, 1992), *S. marginatus* y *E. siliqua* (Martínez Patiño, 2002) y *E. arcuatus* (da Costa, 2009).

La fijación y finalización del cultivo larvario en *V. pullastra* ocurre hacia los 18-20 días desde la obtención del desove, con una talla en torno a los 210-230 μm . Los resultados obtenidos en este trabajo, en cuanto a la duración del cultivo larvario de *V. pullastra*, son similares a los de Martínez Patiño *et al.* (2001) y Nóvoa (2007) en las mismas condiciones de cultivo, y Pérez Camacho *et al.* (1977) y Fernández Reiriz *et al.* (2011) en otras instalaciones.

En la tabla V.11 se muestra una comparación de los resultados de crecimiento obtenidos en este trabajo en *V. pullastra* y en las distintas especies de bivalvos de interés comercial en Galicia cultivados en el Centro de Cultivos Mariños de Ribadeo (*R. decussatus*, *R. philippinarum*, *E. siliqua*, *E. arcuatus*, *S. marginatus* y *D. trunculus*). Estos resultados se encuentran recopilados en los siguientes trabajos: Martínez Patiño *et al.* (2001 y 2008), Martínez Patiño (2002), Nóvoa (2007), Louzán (2008), Ojea *et al.* (2008), da Costa *et al.* (2008), Aranda *et al.* (2009), da Costa (2009), da Costa y Martínez Patiño (2009) y da Costa *et al.* (2010a y 2010b).

TABLA V.11: Talla (en μm) y tiempo de aparición de las distintas fases de cultivo en *V. pullastra* y en el resto de especies cultivadas en el Centro de Cultivos de Ribadeo.

	Huevo	Larva D	Umbonada		Pediveliger		Postlarva	
	Cultivo larvario				Fijación y metamorfosis			
	Talla	Talla	Talla	Días	Talla	Días	Talla	Días
<i>V. pullastra</i>	65-75	100-105	140-150	8	210-250	16-18	300-350	22-25
<i>R. decussatus</i>	65-75	95-100	130-150	8	200-220	25-27	260-330	35-40
<i>R. philippinarum</i>	65-70	95-105	145-160	8	215-240	20-25	280-350	30-35
<i>E. siliqua</i>	75-95	120-140	200-210	5	240-270	10	360-400	14
<i>E. arcuatus</i>	70-90	110-125	160-200	7	250-310	14	330-380	20
<i>S. marginatus</i>	140-150	160-170	200-210	3	230-240	5-6	260-300	8-9
<i>D. trunculus</i>	75-80	105-110	160-170	8	200-250	20-25	200-300	30

En relación a otros bivalvos de interés comercial en Galicia cultivados en las mismas condiciones en el Centro de Cultivos Mariños de Ribadeo, **la fijación y finalización del cultivo larvario en *V. pullastra*, ocurre más tarde que en las especies de solénidos *E. arcuatus*, *E. siliqua* y *S. marginatus*, y antes que *R. decussatus*, *R. philippinarum* y *D. trunculus*.**

Así, en las especies de solénidos *E. arcuatus*, *E. siliqua* y *S. marginatus*, la fijación y metamorfosis tiene lugar hacia los días 14, 10 y 6 desde el inicio del cultivo, respectivamente, llegando a la fijación con una talla superior a la del resto de los venéridos. Entre éstos, aunque se llega a la fijación a tallas similares, tendrán que pasar entre 20 y 25 días en *R. philippinarum* y *D. trunculus* y de 25 a 27 días en *R. decussatus*.

La metamorfosis en *V. pullastra* finaliza 22-25 días después del inicio del cultivo, alcanzando las postlarvas una talla entre 300-350 μm . En las especies *R. decussatus*, *R. philippinarum* y *D. trunculus* el proceso de metamorfosis es más lento, teniendo que pasar más de 30 días para que las postlarvas estén transformadas, con tallas inferiores a las de *V. pullastra*. En las especies de solénidos *E. arcuatus*, *E. siliqua* y *S. marginatus*, la finalización de la metamorfosis tiene lugar, al igual que la finalización del cultivo larvario, antes que en *V. pullastra*.

La supervivencia larvaria media en *V. pullastra* desde el inicio del cultivo hasta la fijación fue de un 56%. Comparándola con otras especies de bivalvos cultivados en las mismas condiciones, esta supervivencia es similar a la encontrada en *S. marginatus*, especie con desarrollo larvario más corto, y superior a *E. siliqua*, *E. arcuatus*, *D. trunculus* y *R. decussatus* (Martínez Patiño *et al.*, 2008 y da Costa, 2009). Los resultados de supervivencia obtenidos con la especie *R. philippinarum* en nuestras instalaciones son muy variables, principalmente debido a que se realizaron escasas experiencias, pero otros autores hablan de supervivencias parecidas a las obtenidas en *V. pullastra* en este trabajo (Yan *et al.*, 2006 y Zhang *et al.*, 2006).

Desde el inicio del cultivo hasta el día 40, momento en el que las postlarvas quedaban retenidas en el tamiz de 300 μm con una talla en torno a 500-600 μm , la supervivencia media de los cultivos de *V. pullastra* fue del 29%, con valores entre el 5 y el 78%. Estas supervivencias son superiores a las obtenidas en nuestras instalaciones en *R. decussatus* y *D. trunculus* (Ojea *et al.*, 2008 y Louzan *et al.*, 2009), especies en las que a veces se produce la muerte de la totalidad del cultivo.

En cuanto a la calidad de los reproductores empleados en el criadero, los **Índices de Condición** expresados en porcentaje de carne y gónada con respecto a la concha, **no dan información sobre el resultado de los desoves y el éxito de los cultivos larvarios**. Aunque estos índices son diferentes a lo largo del año, mantienen la misma tendencia en todos los lotes estudiados procedentes de poblaciones de diferente origen. Así, los valores más altos del Índice de Condición gonadal se encuentran en los meses de verano-otoño y no coinciden con la mayor cantidad de desove obtenido ni con las mejores supervivencias de los desarrollos larvarios.

La **composición bioquímica de los lotes de reproductores** de *V. pullastra* utilizados en criadero **no guarda relación con la cantidad de desove obtenido de éstos, ni con el posterior éxito en el cultivo larvario**. Estos componentes varían de igual forma a lo largo del año en las distintas localizaciones. Así, los valores del contenido en carbohidratos y lípidos en gónada son más elevados en los meses de verano y otoño coincidiendo con los valores más altos del Índice de Condición gonadal.

En los meses de invierno y primavera es cuando los progenitores presentan los mayores porcentajes de proteínas en gónada y menores de carbohidratos y lípidos, coincidiendo con los meses en los que se encuentra menor Índice de Condición.

En la especie *V. pullastra*, Joaquim *et al.* (2010), en un trabajo en el cual pretendían definir criterios de calidad entre los reproductores y los ovocitos emitidos, vieron que el contenido en proteínas de los ovocitos estaba asociado a la calidad larvaria, lo mismo que observaron en *C. gigas* Massapina *et al.* (1999). La interacción encontrada en el estudio realizado por Massapina *et al.* (1999) para *C. gigas* entre el Índice de Condición de los reproductores, la cantidad de lípidos y proteínas de los ovocitos y el porcentaje de transformación sugiere que, la supervivencia larvaria depende altamente de la cantidad de lípidos totales aportados a los ovocitos por los padres durante la vitelogénesis. Esta relación entre los lípidos y el desarrollo larvario en los primeros estadios también se encontró en *M. edulis* (Bayne *et al.*, 1975) y *Pecten maximus* (Dorange *et al.*, 1989 y Le Pennec *et al.*, 1990).

En relación al índice de madurez de los lotes de reproductores, se observa que independientemente del estadio presente en la mayor parte del lote, se obtuvieron desoves de *V. pullastra* a lo largo de todo el año. Durante el invierno y primavera el porcentaje de individuos en estadio E3, de madurez y puesta, es más elevado o está presente en la mayoría de la población. En el verano y en el otoño, gracias a la asincronía folicular dentro de un mismo individuo y la heterogeneidad de estadios dentro de un mismo lote, en lotes de reproductores con pequeño porcentaje de individuos en estadio E3, de madurez, se pueden obtener igualmente desoves abundantes.

Esta presencia continuada de ovocitos maduros permite obtener desoves de *V. pullastra* a lo largo de todo el año, independientemente del índice de madurez predominante en el lote de reproductores.

La variación de los componentes bioquímicos, del Índice de Condición y del porcentaje de individuos en madurez a lo largo del año en los distintos lotes de

reproductores utilizados en el criadero, coincide con lo observado en las poblaciones de Camariñas y O Grove estudiadas en el capítulo I de esta tesis.

De los resultados obtenidos, se puede afirmar que **la calidad de las puestas en *V. pullastra* no está relacionada con los valores del Índice de Condición, de la composición bioquímica y del índice de madurez de los distintos lotes de *V. pullastra* usados como progenitores**, ya que estos parámetros no dan información de la cantidad de desove que se puede obtener, ni del éxito de los desarrollos larvarios.

En cuanto a la procedencia de los reproductores, se obtuvieron mejores resultados de supervivencia de los desarrollos larvarios con los reproductores procedentes de Barallobre, Cofradía que extrae almeja en uno de los bancos naturales más productivos de *V. pullastra*, el de As Pías, en Ferrol. Sin embargo, del análisis estadístico de los resultados no se observó que hubiera ninguna relación en la supervivencia de los desoves y la procedencia de los lotes.

En otras especies de bivalvos el inicio y la duración de la gametogénesis varían dependiendo de la localización de la población. Estas diferencias en los ciclos gonadales tienen que ser consideradas a la hora del cultivo en criadero (Lannan *et al.*, 1980 y Devauchelle y Mingant, 1991). Así, en un estudio de acondicionamiento de *R. decussatus* con dos poblaciones distintas de la Península Ibérica, Matias *et al.* (2009) encontraron que las del norte respondían más favorablemente a la inducción a la puesta que las del sur. En la especie *C. gigas*, Chávez Villalba *et al.* (2002), en el acondicionamiento con distintas poblaciones de la costa de Francia, encontraron que aquellas localizadas más al norte presentaban mayor porcentaje de ovocitos maduros que las del sur. En la especie *V. pullastra* las ligeras diferencias observadas, dentro de una misma estación entre las distintas poblaciones, no influyeron en la cantidad de desove obtenido ni con el posterior éxito del desarrollo larvario, puesto que el Índice de Condición, la composición bioquímica y el porcentaje de individuos en madurez de los distintos lotes de reproductores, no está relacionado con la calidad de las puestas.

6. CAPÍTULO IV: CULTIVO EN EL MEDIO NATURAL



6. CAPÍTULO IV: CULTIVO EN EL MEDIO NATURAL

6.1 INTRODUCCIÓN

Al cultivo de almeja en criadero le siguen dos fases, el preengorde de semilla desde una talla de 2-3 mm hasta los 12-15 mm, y posteriormente, el engorde hasta alcanzar la talla comercial.

Los criaderos cultivan la semilla hasta una talla determinada, que viene dada principalmente por los requisitos de los productores, ya que para ellos es más fácil realizar el engorde partiendo de tallas grandes que permitan sembrar la semilla directamente. Sin embargo, los criaderos prefieren suministrar la semilla del menor tamaño posible debido a las importantes implicaciones de cultivarla más tiempo en condiciones controladas. A medida que la semilla crece, la biomasa se va multiplicando en poco tiempo de forma exponencial, lo que implica un considerable aumento en las necesidades de espacio, volumen de agua bombeada y producción de microalgas, así como la disponibilidad del tiempo y la mano de obra necesaria para realizar las operaciones de limpieza, desdobles, clasificación y mantenimiento en general.

En los últimos años se han adoptado varias soluciones para intentar abordar el problema de los costes del cultivo de semilla en criadero, desarrollando distintos métodos de preengorde en el medio natural. En el criadero habitualmente se cultiva la semilla en condiciones muy controladas hasta que quedan retenidas en tamiz de 1 mm a 1,5 mm, que se corresponde con semilla de 2-3 mm de tamaño, posteriormente se transfieren a semilleros en el exterior. Éstos están pensados para mantener la semilla de poco tamaño a unas densidades elevadas y protegidas de los depredadores. La característica clave de estos semilleros es obtener la mayor productividad de fitoplancton con el menor coste posible. Para ello, se pueden provocar “blooms” añadiendo fertilizantes al plancton natural para potenciar su crecimiento, así como

desarrollar cultivos en grandes volúmenes a partir de microalgas cultivadas en los propios criaderos.

Hasta hace poco, en la práctica habitual de producción de semilla en instalaciones de puesta inducida, se utilizaban sistemas de preengorde en tierra (normalmente en los propios criaderos) para conseguir semilla de moluscos apta para la siembra. Son sistemas donde la semilla se encuentra estabulada en recipientes por los cuales se hace pasar agua de mar enriquecida en alimento que se produce de forma masiva en grandes tanques o piscinas. Algunos semilleros funcionan aprovechando el fitoplancton que se produce de forma natural en grandes estanques o lagunas naturales, las cuales se vacían y rellenan con el empleo de sistemas de bombeo o mediante el juego de mareas, utilizando para ello sistemas de compuertas.

El método habitual de preengorde en tierra supone que la capacidad de producción de los criaderos se ve más limitada, al utilizar parte de sus recursos para este fin. Por tanto, cuanto menor sea el tamaño de la semilla transferida del criadero para otras instalaciones de preengorde, los criaderos dispondrán de una mayor capacidad de producción. Esta circunstancia es la que induce a que el preengorde se realice cuanto antes en el medio natural, bien en sistemas ubicados en las zonas intermareales o mediante el uso de estructuras o viveros flotantes en lugares adecuados de nuestras rías.

A continuación se describen los sistemas comúnmente utilizados para el preengorde y engorde de semilla de almeja, con el fin de comparar los resultados obtenidos por otros autores con los de este capítulo.

6.1.1 SISTEMAS DE PREENGORDE EN INSTALACIONES EN TIERRA

Una vez que la semilla alcanza tallas superiores a las 750-1.500 μm (depende de las estrategias de cada instalación), la semilla suele mantenerse en recipientes de diámetro variable, con mallas en consonancia con el tamaño de la semilla y alimentados con agua procedente de grandes piscinas exteriores donde se producen “blooms” de fitoplancton (Figura 6.1). Para ello se llenan las piscinas con agua de mar a la que se le añaden nutrientes, potenciando así la proliferación de las microalgas que se hallan de forma natural en el agua. Las piscinas cuentan con aireación constante para impedir la sedimentación de las microalgas. En este tipo de instalación es aconsejable contar con varias piscinas para la producción de “blooms”, de forma que se encuentren en distintas fases de cultivo, rotando la utilización de cada uno de los estanques para garantizar una producción constante de fitoplancton.

El agua, una vez que ha sido bombeada hacia las piscinas de la semilla, vuelve al estanque origen hasta que se considera que la producción de fitoplancton se ha minimizado y se cambia de piscina (Empresa A’Ostreira, S.L. Malpica. Comunicación personal).



FIGURA 6.1: Cultivo de fitoplancton y sistema de preengorde de semilla. A’Ostreira, S.L. Malpica.

Las ventajas de este sistema son que el preengorde se controla bien y la producción del alimento no es muy costosa (“blooms”). No obstante, como inconveniente destaca la oscilación de la temperatura a lo largo de los meses del año, dada la gran exposición que soporta el agua de las piscinas de producción de

microalgas (normalmente son de gran superficie y poca profundidad). Durante el invierno la temperatura suele bajar de forma excesiva, lo que implica mal crecimiento del fitoplancton, a la vez que un descenso en el metabolismo de las almejas, e incluso, altas tasas de mortalidad.

En los meses estivales se produce el efecto contrario ya que, debido a la alta insolación de los meses de verano, la temperatura del agua puede aumentar considerablemente (hasta 26-28°C), por lo que los “blooms” no se desarrollan de forma óptima y se agotan rápidamente. A estas temperaturas, la tasa de saturación de oxígeno en el agua disminuye de forma brusca y a su vez el metabolismo de las almejas se acelera, lo que implica riesgos de anoxia en la semilla, sobre todo con densidades de trabajo elevadas.

Evidentemente estas consecuencias dependerán, en mayor o menor medida, de cada especie preengordada y de las condiciones climáticas particulares de cada año.

Otro problema de este tipo de instalaciones es que, a medida que la semilla crece, lo hace de forma exponencial, lo que significa que las necesidades de espacio, bombeo de agua y operaciones de mantenimiento de la semilla se multiplican. Los costes energéticos se hacen muy elevados por los bombeos de agua.

Hoy en día, la semilla solamente se mantiene en esta fase de preengorde hasta que alcanza T2/T4 (5-8 mm), siguiendo con el preengorde en el medio natural.

Se han realizado estudios de preengorde alimentando la semilla con agua procedente de efluente de piscifactoría de rodaballo (Guerrero y González, 1991; Jara Jara, 1995 y Guerra *et al.*, 2007). La semilla se estabula en tambores de flujo invertido por los que se hace pasar el agua canalizada desde la granja de rodaballo (Figura 6.2).

Las ventajas de este sistema de preengorde son la disponibilidad de grandes volúmenes de agua sin coste adicional en el bombeo, rica en materia orgánica disuelta procedente de la propia actividad de los peces y de la degradación de los restos de

pienso, y que además contiene microalgas presentes de forma natural en el agua de mar (Jara Jara, 1995).



FIGURA 6.2: Sistema de aprovechamiento de agua procedente de granja de rodaballo.

6.1.2 SISTEMAS DE PREENGORDE EN EL MEDIO NATURAL

6.1.2.1 ZONAS DE MARISMAS

Uno de los sistemas de preengorde en el medio natural es el que aprovecha la producción natural de las marismas.

Una marisma es una depresión, normalmente causada por un río, que está anexa al mar, lo que produce un terreno bajo y pantanoso que se inunda por efecto de las mareas y de la llegada de las aguas de los ríos que desembocan en sus proximidades. Las marismas son humedales que se consideran un auténtico ecosistema debido al sinfín de organismos que habitan en él, desde las microalgas planctónicas, hasta una abundante cantidad de flora y fauna.

En este tipo de semilleros se aprovechan grandes superficies de estanques naturales, controlados mediante compuertas, de forma que se renueva parcial o totalmente el agua mediante el juego de mareas (Figura 6.3). En ellos se producen “blooms” naturales de fitoplancton que se suministra a la semilla. Ésta se estabula en grandes recipientes de hasta 1 metro de diámetro sumergidos en alguno de los estanques (Empresa Tinamenor, Cantabria. Informe Jacumar, 2007).

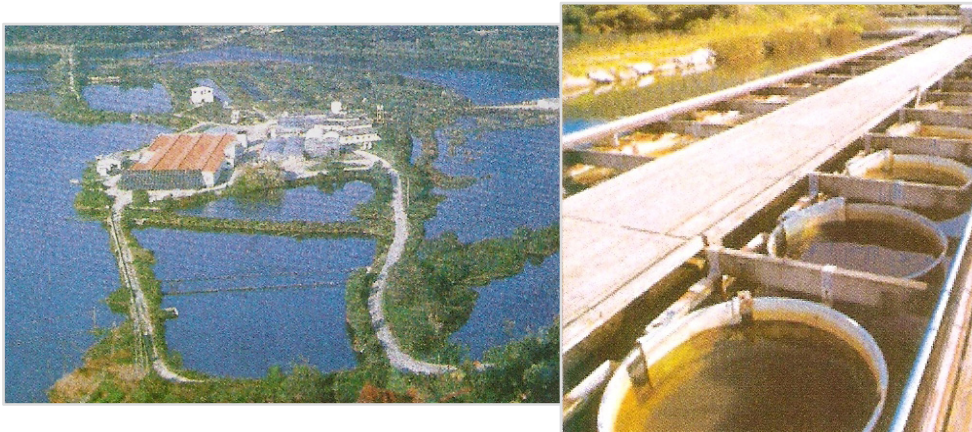


FIGURA 6.3: Estanques naturales de producción de fitoplancton y recipientes de estabulación de la semilla. Empresa Tinamenor. Pesues, Cantabria.

La producción del fitoplancton no es costosa, los costes energéticos son bajos ya que los bombeos se hacen a nivel 0 (realmente no se bombea el agua sino que se mueve) y la superficie disponible para las instalaciones antiguamente solía conseguirse fácilmente. Uno de los inconvenientes es que no es fácil controlar los parámetros medioambientales, con oscilaciones muy grandes de las temperaturas y de la salinidad, e incluso, el sistema puede verse alterado por la influencia externa de agentes contaminantes en determinadas épocas del año (básicamente por pesticidas arrastrados por las lluvias a las zonas de producción).

Sin embargo, el principal problema hoy en día es que este tipo de instalaciones cuenta con enormes trabas medioambientales. En la actualidad las marismas son espacios naturales protegidos, por lo que las concesiones para esta clase de actividades son difíciles o casi imposibles de conseguir.

6.1.2.2 ZONAS INTERMAREALES

La zona intermareal es la zona del litoral situada entre los niveles de las máximas y mínimas mareas, cubriéndose durante las mareas altas y quedando al descubierto durante las mareas bajas.



FIGURA 6.4: Mesas de preengorde situadas en la zona intermareal.

Para el preengorde de almeja se adaptó el sistema de bolsas utilizado para el cultivo de ostra. Estas bolsas ostrícolas se colocan sobre mesas de hierro en la zona intermareal de la playa (Figura 6.4).

A partir de la puesta en marcha del Plan 10 y del Plan Galicia a finales de los años 90, se desarrollaron técnicas de preengorde en estas bolsas ostrícolas en las playas de numerosos puntos de Galicia, implicando alrededor de 30 agrupaciones de mariscadoras (Cerviño, 1996).

Inicialmente se utilizaban bolsas de dimensiones 100 x 40 cm de 2 y 3 mm de luz de malla, y de 100 x 50 cm con luces de malla de 4 y 6 mm. En su interior se colocaban entre 250 a 500 gramos de semilla de almeja. Éstas estaban situadas en un nivel mareal de +50 sobre la BVE (bajamar viva equinoccial). Posteriormente, para evitar acumulación de semilla en los extremos, se utilizaron medidas de bolsas más reducidas, cortándolas por la mitad o la tercera parte e introduciéndolas en el interior de bolsas de malla de 18 mm que actuaban como soporte.

En la actualidad este preengorde puede hacerse utilizando secciones de las bolsas con anchura entre 15 y 19 mm que se cierran a lo largo con tubos de PVC ranurados y que posteriormente se introducen en unas guías en forma de “U” que se sueldan sobre las mesas de hierro (Figura 6.5).

La fase de preengorde se realiza introduciendo la semilla de un tamaño de entre 5 y 7 milímetros de longitud en las bolsas.



FIGURA 6.5: Minibolsas ubicadas en las mesas de preengorde.

Hoy en día, en algunas agrupaciones de mariscadoras, como por ejemplo en la de Cambados, realizan una fase intermedia entre el preengorde y el engorde tradicional. Consiste en aplicar las técnicas de engorde en el suelo, acondicionando una parcela en la zona intermareal, sembrando semilla a alta densidad y cubriéndola con una malla protectora. Esta fase comienza con semilla de una talla inicial de 8 mm y finaliza a una talla de 20 mm. En la figura 6.6 se muestra una imagen de las mariscadoras preparando los parques para realizar la siembra.



FIGURA 6.6: Mariscadoras de Cambados preparando un parque para la siembra de semilla.

6.1.2.3 PREENGORDE EN SUSPENSIÓN

El cultivo en suspensión se diferencia del intermareal en que los sistemas de preengorde se encuentran totalmente sumergidos, por lo que las condiciones ambientales son más estables y la disponibilidad de fitoplancton es continua.

Para colocar los sistemas de preengorde se puede utilizar:

- bateas empleadas para el cultivo de mejillón
- bateas especialmente diseñadas para este fin
- sistemas de “long-line”

El cultivo suspendido en “long-line” se compone de un cabo, que se mantiene en el agua con un sistema de flotadores y de fondeo, los sistemas de preengorde se cuelgan verticalmente en la línea madre.

El cultivo en suspensión se puede realizar con diversos sistemas:

- SISTEMA DE CESTILLOS

Uno de los primeros métodos utilizados para el preengorde de semilla de almejas en batea fue la adaptación del sistema de cestillos ostrícolas (Figura 6.7). La semilla se estabula en cuarterones plásticos (cuatro por cestillo), con mallas de 2,5 mm para tamaños superiores a T3 y de 4 mm para semilla que queda retenida en T6. Normalmente suelen colocarse un conjunto de 7 cestos por cuerda que se denominan “atados”, colgados en los pontones de la batea separados por una distancia de 50/70 cm para evitar que puedan liarse entre ellos con los movimientos de las corrientes (Cerviño *et al.*, 1989).

La densidad de trabajo inicial es de unos 150 g por cuarterón, pudiendo alcanzar los 250 g para los tamaños mayores. Los desdobles deben hacerse cuando la biomasa se duplica y, dependiendo de la época del año, este desdoble suele hacerse a los 30/40 días en invierno y a los 15/20 días en las fechas estivales, cuando la

6. Cultivo en el medio natural

temperatura del agua alcanza los valores mayores y además se produce un alto crecimiento de los epibiontes que dificultan el paso del agua a través de las mallas de los cestillos.



FIGURA 6.7: Cestillos para preengorde de almeja en batea.

El preengorde de semilla de almeja superior a T4/T5 (7-9 mm) puede ser adecuado, si se aplican correctamente las densidades de trabajo y se practican los desdobles y limpieza de cestillos y cuarterones cuando el crecimiento de los epibiontes es desmesurado.

No obstante, sobre todo en los meses de mayor crecimiento, que suele coincidir con temperaturas más elevadas y altos niveles de productividad primaria, aparecen algunos problemas inherentes a la época, que si bien no suelen manifestarse en elevadas mortandades, sí produce una ligera merma y una alta variabilidad en el crecimiento. Ello se debe en parte a que la circulación del agua, a través de los cuarterones, no es la correcta con lo que la almeja, que se encuentra en la parte interior, no dispone de la misma cantidad de alimento y oxígeno que aquella que se encuentra en la periferia de los cuarterones. Por ello este es un método recomendable básicamente como complemento al preengorde en bolsas para los tamaños mayores, antes de efectuar las siembras en los arenales.

La ventaja del sistema de cestillos es la facilidad de manipulación de la semilla ya que los cestos encajan perfectamente en grupos y mediante una cuerda que pasa por un canal interior, su atado a los pontones se hace muy sencillo. Los cuarterones

pueden utilizarse con tapa, aunque el cierre en ocasiones no es perfecto y, sobre todo si la semilla es muy pequeña y especialmente de almeja babosa y japónica, se pierden muchos ejemplares durante la fase de cultivo.

- SISTEMA DE PLATILLOS Y LINTERNAS

Hoy en día se está trabajando con alternativas a este sistema de cestillos, con algunas modificaciones que permitan una mejor circulación de agua a través del sistema de preengorde.

Entre ellos podría citarse el sistema de platillos (Pérez Corvacho y Pardo Vuelta, 2007) consistente en unidades de bandejas plásticas circulares, con un eje tubular en su centro de forma que se encajan varias unidades entre sí y todo el sistema va rodeado de una malla plástica de diferentes luces según el tamaño de la almeja estabulada (Figura 6.8). El conjunto del sistema va colgado del emparrillado de la batea o incluso podrían utilizarse sistemas “long-line”.

Otro sistema utilizado es el de las linternas. Presenta la misma estructura que el sistema de platillos, pero a diferencia de éste, la estructura está totalmente compuesta por una malla plástica.



FIGURA 6.8: Sistema de platillos (izquierda) y linternas (derecha) para el cultivo de semilla en batea.

6. Cultivo en el medio natural

- SISTEMAS DE FLUJO FORZADO

En los últimos años se desarrolló un sistema de preengorde de flujo forzado que inicialmente se colocaba en el pantalán del puerto deportivo de Camariñas y que, posteriormente, se diseñó una batea para este fin (de Santiago *et al.*, 2007 y Guerra *et al.*, 2007). El sistema consta de 2 partes diferenciadas: un generador de aire y unos contenedores para estabular la semilla (Figura 6.9).

El generador de aire es un soplante capaz de suministrar un caudal de 79 m³/h de aire, que se encuentra instalado en un arcón de material plástico, para protegerlo de la intemperie. El aire se distribuye mediante una tubería de PVC, a lo largo de la cual, se practican orificios en los que se introducen boquillas roscadas, a las que se conectan los contenedores, que contienen las semillas de almejas.



FIGURA 6.9: Sistema de preengorde en flujo forzado en el pantalán de Camariñas.

Los contenedores para estabular la semilla son de polietileno de 50 litros de capacidad y provisto de fuertes asas. El fondo puede estar perforado con numerosos agujeros de 2 mm o se puede colocar una malla. Se cierra mediante una tapa en la que se coloca un tubo periscopico, constituido por una tubería de PVC, en cuya parte distal se pega una "T" del mismo material y diámetro; bajo ella se inserta un flotador que

dará estabilidad al sistema. Al inyectarle el aire, se fuerza la entrada de agua por la base del contenedor, haciéndola salir por ambos ramales de la “T”.

- SISTEMA DE BOLSAS

El sistema de preengorde en bolsas utilizado en el intermareal se adaptó para su ubicación en batea, con una jaula que permite mantener estas bolsas en diferentes niveles.

La jaula es de acero inoxidable y se colocan unas barras del mismo material en forma de “U” con una separación entre ejes de 7 cm, de forma que permite colocar las bolsas de preengorde en numerosos pisos o hileras (Figura 6.10).



FIGURA 6.10: Jaula para preengorde de almeja en batea con el sistema de minibolsas.

Las dimensiones de la jaula pueden variar según las características de cada cultivo. Se cuelgan directamente a la estructura flotante para llevar a cabo el preengorde.

Los tubos de PVC ranurado que forman el cierre de las bolsas de malla (2, 3 y 4 mm de luz, según tamaño de almeja), son los que se introducen en la canaleta formada por la “U” y sirven de sostén a las mallas de estabulación.

Las medidas de las bolsas de preengorde son de 40 x 19 cm para 2 y 3 mm de luz de malla y de 50 x 19 cm para mallas de 4 mm o superiores. Estas bolsas, una vez introducida la almeja, se cierran con los tubos de PVC ranurados de 20 mm de diámetro.

El sistema de trabajo (desdobles, limpiezas, etc.), sobre todo si se mecaniza la clasificación de semilla, el llenado y cierre de bolsas se hace de forma bastante sencilla y se puede manejar grandes cantidades de semilla en poco tiempo. Evidentemente, a la hora de trabajar en una batea con cantidades elevadas de almeja, es necesario el empleo de embarcaciones dotadas de grúa para las operaciones de izado y colocación de las jaulas. La adecuación de las bateas tradicionales a este sistema de jaulas favorece la sencillez de manejo de estos sistemas de preengorde.

Una batea de tamaño normal, con la instalación de aproximadamente 30 jaulas con las dimensiones de 2 x 1 x 1 m, permite el preengorde de unos 30 millones de unidades/año. Estas cantidades estarán condicionadas por el tamaño inicial de las almejas y por las cantidades de cada una de las especies que se pretendan preengordar. Para optimizar el proceso es necesario planificar las entradas de semilla, de forma que, a lo largo de la temporada de preengorde (de marzo a octubre), puedan introducirse hasta 5 partidas de 6,2 millones de unidades por ciclo (Cerviño, 2010).

El sistema, dadas sus características, puede ser utilizado en otras ubicaciones diferentes de la batea. Módulos completos, con los niveles y dimensiones que se consideren aconsejables, se pueden utilizar directamente en fondos marinos de zonas acotadas para labores de preengorde o en sistemas de “long-line”.

En este capítulo se realizaron pruebas de preengorde utilizando el sistema de minibolsas en dos localizaciones distintas. En mesas de preengorde en intermareal y en una jaula suspendida en batea. En ambos sistemas se ensayaron distintas densidades, épocas del año para iniciar el cultivo y la talla inicial de la semilla.

6.1.3 ENGORDE

Esta fase de cultivo se inicia con semilla de 14-18 mm de longitud y finaliza cuando la almeja alcanza la talla mínima de consumo (38 mm para *Venerupis pullastra* y 40 mm para *Ruditapes decussatus* y *R. philippinarum*).

El engorde se realiza principalmente en los parques de cultivo, aunque en los últimos años se están realizando trabajos de engorde de almeja en cultivo suspendido en batea: en cajas sin sustrato (Rama Villar y Rey Méndez, 1997) y en cestillos ostrícolas con sustrato colocados en armazones metálicos (Parada, 2007).

En los parques de cultivo, previamente a la siembra de semilla, hay que acondicionar el sustrato para facilitar el enterramiento de la semilla, así como para eliminar depredadores. Con el terreno ya acondicionado se prepara la parcela para la siembra, para ello se extiende una red de luz de malla inferior al tamaño de la semilla y se excava un canal para sujetarla por uno de sus lados. Posteriormente se siembra la semilla y se coloca la red por encima sujetándola al terreno por el otro extremo.

Para optimizar el crecimiento y la supervivencia de la semilla es necesario realizar una serie de labores de limpieza y sustitución de redes, eliminación de depredadores y desdoble de la semilla. En la figura 6.11 se muestra una fotografía de los parques de cultivo de almeja de Carril.



FIGURA 6.11: Parques de cultivo de almeja en Carril.

Aunque la almeja babosa habita principalmente en bancos submareales, sería muy difícil realizar y controlar el engorde de esta especie en un banco permanentemente sumergido.

En este capítulo se realizó un trabajo de engorde en un parque intermareal de la Cofradía de Barallobre, con semilla de *V. pullastra* preengordada en esta misma Cofradía con el sistema de bolsas colocadas en mesas en intermareal y procedente de un cultivo controlado en criadero. Con este trabajo se estima el tiempo necesario para la obtención de almejas de talla comercial desde la obtención de un desove en criadero.

El aumento de la profesionalización del sector y la implantación de sistemas de cultivo, ha provocado un aumento en la demanda de semilla procedente de criadero para ser preengordada y posteriormente sembrada en los bancos naturales.

Se han realizado numerosos estudios sobre los patógenos en almejas comerciales (Villalba *et al.*, 1993b; López, 1995 y Ordás *et al.*, 2001). Sin embargo, casi no hay estudios histológicos de semilla de almeja en Galicia. En el trabajo realizado por Carballal *et al.* (2006 y 2007) con semilla de *V. pullastra*, *R. decussatus* y *R. philippinarum* preengordada en diferentes sistemas de Galicia, encontraron que la semilla que inicialmente presentaba ciliados en branquia y glándula digestiva, finalizaba el preengorde afectada por varios tipos de parásitos y simbiontes.

En este trabajo se realiza el estudio histopatológico de los distintos lotes de semilla de *V. pullastra* utilizados en el preengorde, con el fin de determinar la presencia de parásitos en la semilla procedente de criadero y la posible acumulación de patógenos durante la fase de preengorde.

Tradicionalmente no se ha considerado el efecto del proceso de la primera maduración reproductiva de las almejas durante la fase de preengorde. La mayoría de los estudios sobre la reproducción de estos bivalvos se centran en estudios histológicos sobre individuos estándar de tallas altas (± 30 mm) para establecer épocas de puesta y

evolución del ciclo gametogénico, aunque Jara Jara (1995) estudió el ciclo gametogénico de la semilla de almeja babosa cultivada con agua residual.

Dado que los procesos de maduración y puesta presentan una indudable influencia en el crecimiento y supervivencia y, asimismo, provocan un estado de debilidad post-puesta que hace que no se considere un momento adecuado para trasladar la semilla a parques de arena, se han iniciado estudios de los procesos de primera maduración reproductiva en esta especie y su influencia en los resultados del preengorde.

En este **capítulo** se presentan los resultados de las pruebas de preengorde con el sistema de minibolsas. Se realizaron ensayos en paralelo en batea y en intermareal, iniciándolas en diferentes épocas del año y con distintas densidades. Se pretende estudiar el comportamiento de esta especie durante el preengorde con el fin de determinar las épocas y condiciones más óptimas para su realización.

Como uno de los objetivos más interesantes consiste en la posibilidad de introducir en sistemas naturales de preengorde, semilla del menor tamaño posible con el fin de aumentar la rentabilidad, se realizó una prueba introduciendo semilla del menor tamaño al habitual, utilizando bolsas de luz de malla de 1 mm (T1).

Además, en este capítulo se muestran los resultados del estudio histológico de maduración reproductiva, del estudio patológico y de composición bioquímica de la semilla durante la fase de preengorde. Se estudia la primera maduración reproductiva de esta especie y el crecimiento diferencial entre machos y hembras durante esta fase de cultivo.

Para estimar el tiempo necesario para la obtención de almejas de talla comercial, se realizó el cultivo integral de esta especie, comenzando con el cultivo en criadero de una puesta controlada, el preengorde en intermareal y el engorde en un parque de cultivo.

6.2 MATERIAL Y MÉTODOS

6.2.1 OBTENCIÓN DE LA SEMILLA

La semilla de almeja babosa *Venerupis pullastra* utilizada en las pruebas de preengorde procedía de puestas controladas en el Centro de Cultivos Mariños de Ribadeo y de un criadero privado.

- Pruebas de épocas de cultivo:

Se realizaron cinco pruebas de preengorde en minibolsas en distintas épocas del año, todas ellas en paralelo en jaula suspendida en batea y en mesas de cultivo en intermareal. En cuatro de las pruebas la semilla procedía de criadero industrial privado y en la otra del Centro de Cultivos. La talla inicial de la semilla en todas estas pruebas estaba entre 5,7 y 7,8 mm. La semilla procedía de desoves controlados que se mantuvieron en el criadero, alimentados con “bloom” natural de fitoplancton en el caso del criadero industrial y de fitoplancton cultivado en bolsas en el caso del Centro de Cultivos. Con estas pruebas se estudió el efecto de la época del año de cultivo y la ubicación del sistema (batea e intermareal) en el crecimiento de los distintos lotes de semilla. Se realizó también el estudio patológico y de maduración de la semilla durante la etapa de preengorde.

- Prueba de densidades:

Se llevó a cabo una prueba de preengorde con semilla procedente del Centro de Cultivos, estabulándola a diferentes densidades tanto en batea como en intermareal. Se estudió así la relación entre la densidad de cultivo y el crecimiento de la semilla.

- Prueba de talla inicial:

Se realizó también una prueba de preengorde en batea con semilla de tamaño menor al de las anteriores pruebas (3,85 mm), procedente también del Centro de Cultivos. Con esta prueba se estudió la viabilidad de preengorde de semilla de menor tamaño al habitual utilizando bolsas de luz de malla de 1 mm (T1).

- Pruebas de crecimiento diferencial:

Para el estudio del crecimiento diferencial entre machos y hembras se realizaron dos tipos de ensayos. En el primero se obtuvo un desove que se cultivó de manera totalmente controlada en criadero y, posteriormente, se preengordó en el medio natural en bolsas en batea. En el otro se estudiaron dos desoves, manteniéndolos siempre en el Centro de Cultivos de Ribadeo, en condiciones totalmente controladas y alimentando la semilla con fitoplancton cultivado. Con estos ensayos se trató de establecer si existía un posible crecimiento diferencial entre machos y hembras. También se estudió la composición bioquímica de la semilla de los desoves controlados en Ribadeo y alimentados con fitoplancton cultivado.

- Prueba de cultivo integral:

La última prueba realizada consistió en el cultivo integral de almeja babosa. Para ello se obtuvo una puesta controlada en el Centro de Cultivos Mariños de Ribadeo, se preengordó en mesas en intermareal en una playa de la Cofradía de Barallobre y se engordó en un parque intermareal de esa misma Cofradía. Con este trabajo se cuantificó la duración de las distintas fases del cultivo de esta especie desde el criadero hasta la talla comercial. Se compara con los resultados de otros autores en otros sistemas con el fin de definir la mejor época de cultivo, los sistemas más idóneos y la posible duración de un cultivo integral.

6.2.2 DESCRIPCIÓN Y UBICACIÓN DE LOS SISTEMAS DE PREENGORDE

Para el preengorde de semilla se utilizó el sistema de bolsas de malla plástica. Con el fin de evitar los problemas que surgían al utilizar directamente bolsas ostrícolas, como la acumulación de semilla en los extremos, se optó por utilizar bolsas de menor tamaño (Figura 6.12). Para ello se cortaron las bolsas ostrícolas obteniendo por cada una 5 ó 6 bolsas de dimensiones 400/500 x 190/150 mm. Las bolsas se cerraban en sus extremos con un tubo de PVC ranurado.

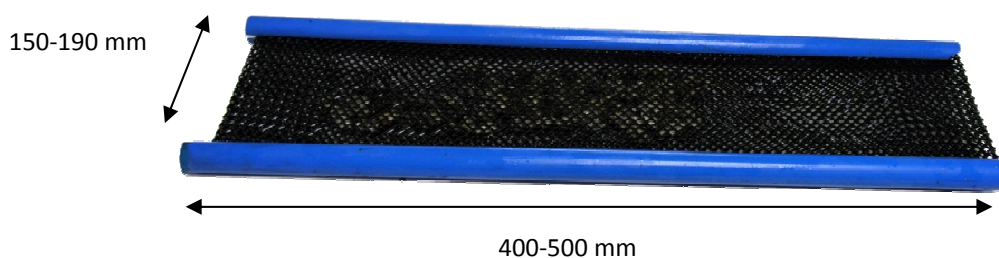


FIGURA 6.12: Dimensiones de las bolsas utilizadas en el preengorde.

Las distintas pruebas se realizaron en paralelo en intermareal y en batea (Figura 6.13).

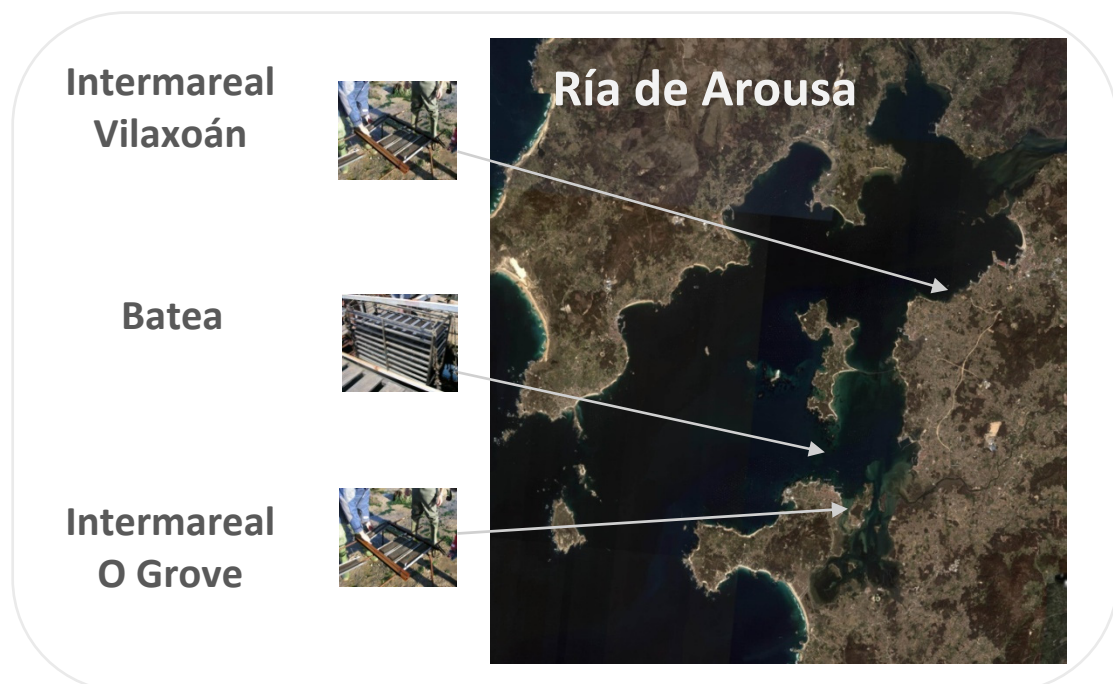


FIGURA 6.13: Localización de los sistemas de preengorde.

Las pruebas en intermareal se realizaron en dos zonas de la Ría de Arousa: en la Vía Norte de O Grove y en la playa de la Aduana en Vilaxoán. Para las pruebas de cultivo en batea, se utilizó una batea propiedad de la empresa A'Ostreira, S.L., ubicada en la cuadrícula 220 del polígono "Cambados D", en la Ría de Arousa.

- En el intermareal las bolsas se colocaban sobre mesas construidas con varillas de tetra-acero utilizado en la construcción, con unas dimensiones de 2,5 x 1 m, y una altura de 0,5 m. Las mesas estaban situadas en un nivel mareal de +50 sobre la bajamar viva equinoccial. Se soldaron unas guías en forma de "U", que permitían insertar las bolsas (Figura 6.14).



FIGURA 6.14: Mesas de preengorde en intermareal.

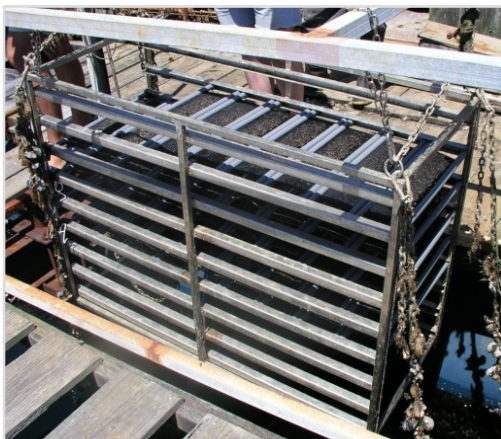


FIGURA 6.15: Jaula de preengorde en batea.

- En la batea se utilizaron las mismas bolsas que para el sistema sobreelevado, pero en este caso se colocaron en jaulas de acero inoxidable con una separación entre ejes de 7 cm (Figura 6.15). La jaula disponía de unos carriles en forma de "U" donde se insertaban las bolsas, se sumergía a una profundidad entre 3 y 5 m.

6. Cultivo en el medio natural

6.2.3 PARÁMETROS DE ESTUDIO

6.2.3.1 ÉPOCA DEL AÑO DE INICIO DEL CULTIVO

Para comparar el efecto de las distintas épocas del año en el potencial de crecimiento de esta especie, se realizaron cinco pruebas de preengorde: una en otoño (2004), dos en primavera (2005 y 2006), otra en verano (2005) y por último una en invierno (2006). Todas estas pruebas se realizaron en paralelo en batea e intermareal. En la prueba de verano de 2005 se ensayaron dos localizaciones para el sistema intermareal (Tabla VI.1).

TABLA VI.1: Fechas de inicio, tallas (mm) y pesos (mg/ind) iniciales, y ubicación de las pruebas de preengorde con semilla de *V. pullastra* en las distintas épocas del año.

Estación	Fecha inicio	Talla inicial (mm)	Peso inicial (mg/ind)	Ubicación
Otoño 2004	27/10/04	7,14 ± 0,84	52,40 ± 1,15	Batea Intermareal O Grove
Primavera 2005	08/04/05	7,87 ± 1,21	78,92 ± 5,01	Batea Intermareal O Grove
Verano 2005	06/07/05	5,71 ± 0,79	31,43 ± 1,92	Batea Intermareal O Grove Intermareal Vilaxoán
Invierno 2006	01/02/06	6,30 ± 1,23	47,52 ± 4,50	Batea Intermareal Vilaxoán
Primavera 2006	27/04/06	5,85 ± 0,80	26,32 ± 0,42	Batea Intermareal Vilaxoán

En los lotes utilizados en estas pruebas, la semilla presentaba una longitud inicial media entre 5,71 y 7,87 mm; y un peso medio entre 26,32 y 78,92 mg/ind. La densidad empleada en estas pruebas fue de 1,79 kg/m².

6.2.3.2 DENSIDAD

Con el fin de estudiar el efecto de la densidad de cultivo en el crecimiento durante la fase de preengorde, se realizó una prueba ensayando con distintas cargas iniciales. La prueba se realizó en paralelo en batea e intermareal. En batea se ensayaron tres densidades de cultivo: 0,89; 1,79 y 3,58 kg/m². En intermareal se ensayaron dos: 0,89 y 1,79 kg/m². La prueba se inició en primavera (28/04/06) y el

tamaño inicial de la semilla fue de 5,91 mm. En la siguiente tabla se muestra un esquema de la prueba.

TABLA VI.2: Fecha de inicio, talla (mm) y peso (mg/ind) inicial, y distintas densidades estudiadas en los dos sistemas ensayados para el preengorde de *V. pullastra*.

Fecha inicio: 28/04/06	
Talla inicial: 5,91 mm	
Peso inicial: 26,32 mg/ind	
Sistema	Densidad kg/m ²
Batea	0,89
	1,79
	3,58
Intermareal	0,89
	1,79

6.2.3.3 TALLA INICIAL

Como uno de los objetivos más interesantes consiste en la posibilidad de introducir en sistemas naturales de preengorde, semilla del menor tamaño posible con el fin de aumentar la rentabilidad final del cultivo, se realizó una prueba en el mes de abril en batea, introduciendo con diferentes densidades semilla retenida en 2 mm (T2) en bolsas de luz de malla de 1 mm (T1). El tamaño inicial de la semilla era de 3,85 mm y el peso de 6,74 mg/ind (Tabla VI.3).

TABLA VI.3: Fecha de inicio, talla (mm) y peso (mg/ind) inicial, y densidades de la prueba con bolsas de luz de malla 1 mm.

Fecha inicio: 28/04/06	
Talla inicial: 3,85 mm	
Peso inicial: 6,74 mg/ind	
Sistema	Densidad kg/m ²
Batea	0,72
	1,44
	2,15

Posteriormente (a los 17 días de inicio), se tamizó cada uno de los lotes de semilla con un tamiz de luz de malla de 3 mm (T3), y los sublotés (>T3 y <T3) se estabularon separadamente para continuar el preengorde. De las dos densidades más

altas se mezclaron los sublotes mayores de T3. La semilla menor de T3 se mantuvo en las densidades iniciales (0,72; 1,44 y 2,15 kg/m²) y la semilla mayor de T3 se estabuló a las densidades estándar de 0,89 y 1,79 kg/m².

6.2.4 PARÁMETROS AMBIENTALES

Los datos de salinidad (‰), temperatura (°C) y clorofila (µg/l) de las zonas de preengorde han sido cedidos por el Instituto Tecnológico para el Control del Medio Mariño (INTECMAR). Los datos de la estación A7 están próximos a la batea y al intermareal de O Grove, los datos de la estación A6 están próximos al intermareal de Vilaxoán (Figura 6.16). Se presentan los datos desde enero de 2004 hasta diciembre de 2006.

Los datos de salinidad y temperatura del INTECMAR se recogieron mediante perfiles verticales realizados con un *CTD Seabird 25*. Los datos de clorofila se obtuvieron mediante análisis espectrofluorimétrico y se corresponden con los datos de clorofila *a* en la fracción mayor de 2,7 µm. Los datos de salinidad, temperatura y clorofila *a* son un promedio del perfil vertical entre 0 y 5 metros.

Además, durante los años 2004, 2005 y 2006, se colocó en la batea una sonda de temperatura *Tidbit Datalogger* con capacidad de registro de datos programada para efectuar la lectura de temperatura cada 15 minutos, colocada a 2,6 metros de profundidad. En el verano de 2006 se colocó el mismo tipo de sonda en las mesas de preengorde en el intermareal, tanto en O Grove como en Vilaxoán.

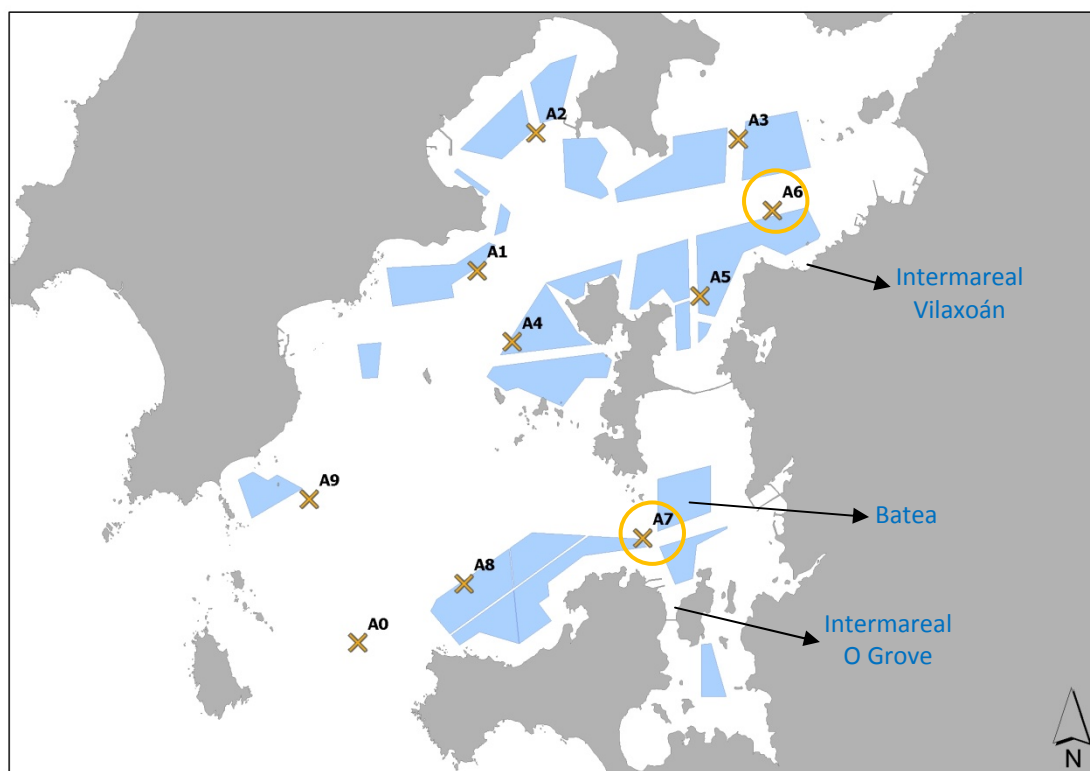


FIGURA 6.16: Localización de las estaciones de muestreo del INTECMAR en la Ría de Arosa.

6.2.5 CONTROL DE CRECIMIENTO Y MORTALIDAD

En todas las pruebas se realizaron muestreos quincenales o mensuales, dependiendo de las condiciones meteorológicas en las diferentes épocas del año. Se registraron los datos de talla, peso húmedo individual y porcentaje de mortalidad de una muestra de 100 individuos de cada lote.

La supervivencia final del cultivo se obtuvo en base a la mortalidad observada en cada uno de los muestreos, extrapolándola al total de la población de la prueba.

Con todos estos datos se elaboraron las gráficas de crecimiento y se calcularon las tasas instantáneas de crecimiento en longitud y en peso (Winberg, 1971), en base a la siguiente expresión (ln: logaritmo neperiano):

$$G_{L30} = (\ln \text{ talla final} - \ln \text{ talla inicial}) \times 30 \times 100 / n^{\circ} \text{ días}$$

$$G_{W30} = (\ln \text{ peso final} - \ln \text{ peso inicial}) \times 30 \times 100 / n^{\circ} \text{ días}$$

La tasa de crecimiento mensual es un índice que representa la velocidad de crecimiento de una especie en un mes, referido a peso (G_{W30}) o a longitud (G_{L30}). Se utiliza para comparar crecimientos diferenciales cuando se realizan pruebas en distintas condiciones de cultivo (distintos sistemas, duración de los cultivos o diferentes épocas).

6.2.6 ESTUDIO HISTOLÓGICO DE LA SEMILLA

Se realizó el control patológico y de madurez reproductiva de la semilla de *V. pullastra* que se utilizó en las cinco experiencias de preengorde realizadas en paralelo en batea y en intermareal: otoño 2004, primavera 2005, verano 2005, invierno 2006 y primavera 2006.

Se efectuó un control inicial y otro al finalizar el preengorde y en cada uno de los muestreos se diseccionaron entre 25-30 almejas. A cada individuo se le diseccionó una porción de tejido branquial, de reborde del manto y de masa visceral con gónada, glándula digestiva y pie. Las muestras se fijaron con solución Davidson, se deshidrataron en alcoholes de graduación creciente y se incluyeron en parafina. Se realizaron cortes de 5 μm que se tiñeron con Hematoxilina-Eosina para su examen al microscopio óptico. Las almejas que por su pequeño tamaño no se podía separar la vianda de la concha, se fijaron enteras en solución Davidson y posteriormente se eliminó la concha descalcificándola con solución EDTA. Al finalizar la descalcificación, se siguió el mismo procedimiento que para las almejas de mayor tamaño. Los métodos utilizados para el análisis histológico de la semilla coinciden con los empleados para el estudio del ciclo gametogénico, por lo que están descritos con más amplitud en el capítulo I.

Tras una observación minuciosa al microscopio óptico se asigna el estadio gametogénico a cada uno de los individuos, utilizando la escala descrita en el capítulo I y que comprende las siguientes fases: E1, inicio de la gametogénesis; E2, gametogénesis avanzada; E3, madurez y puesta y E4, renovación gonadal. Además de

estos estadios, se considera el E0 para los individuos que aún no se han desarrollado gametogénicamente.

Se estudia también la presencia/ausencia de los diversos parásitos y alteraciones patológicas en cada uno de los individuos. Se calcula la prevalencia de cada muestreo según la siguiente fórmula:

$$\text{Prevalencia} = (\text{n}^\circ \text{ almejas parasitadas} / \text{n}^\circ \text{ almejas examinadas}) \times 100$$

6.2.7 CRECIMIENTO DIFERENCIAL

Para el estudio del crecimiento diferencial entre machos y hembras se realizaron dos experiencias controladas.

6.2.7.1 SEGUIMIENTO EN BATEA

En febrero de 2006 se obtuvo una puesta de *V. pullastra* que se cultivó en criadero, manteniendo controlado la totalidad del cultivo durante toda la prueba.

A mediados de abril, cuando el tamaño de las almejas estaba entre 0,6 y 2,1 mm, se realizó una separación de tamaños con un tamiz de luz de malla 750 μm . Se originaron entonces dos subpartidas: la cabeza de la puesta (entre 1,2 y 2,1 mm) y la cola de esta puesta (de entre 0,6 y 1,2 mm), originándose de esta forma dos sublotes denominados cabeza (CB) y cola (CL), que se cultivaron de forma separada.

En mayo, cuando el tamaño de las almejas ya lo permitía, se muestreó con histología la composición sexual de las distintas clases de talla de la cabeza. Seguidamente se realizó un segundo tamizado para separar las más grandes de las pequeñas de la cabeza y se introdujeron separadamente en el sistema de preengorde. Se originaron así otros dos sublotes de la cabeza: cabezas+ y cabezas-.

6. Cultivo en el medio natural

Un mes más tarde, previo a su introducción en el sistema de preengorde en batea, se realizó un tamizado de la cola para separar a su vez las más grandes y las más pequeñas de la cola. Se originaron otros dos sublotos de la cola: colas+ y colas -.

Finalmente se habían originado 4 subpartidas controladas: CB+, más grandes de la cabeza; CB-, más pequeñas de la cabeza; CL+, más grandes de la cola y CL- más pequeñas de la cola. Se pretendía conocer en qué punto de desarrollo se manifiesta este crecimiento diferencial, ocupando las hembras mayoritariamente las clases de mayor talla. Estas cuatro fracciones se muestrearon en repetidas ocasiones a lo largo del preengorde para estudiar el comportamiento en cultivo de cada subpartida. Al final del preengorde se determinó por histología la composición sexual de cada sublote. En la figura 6.17 se muestra un esquema de la experiencia.

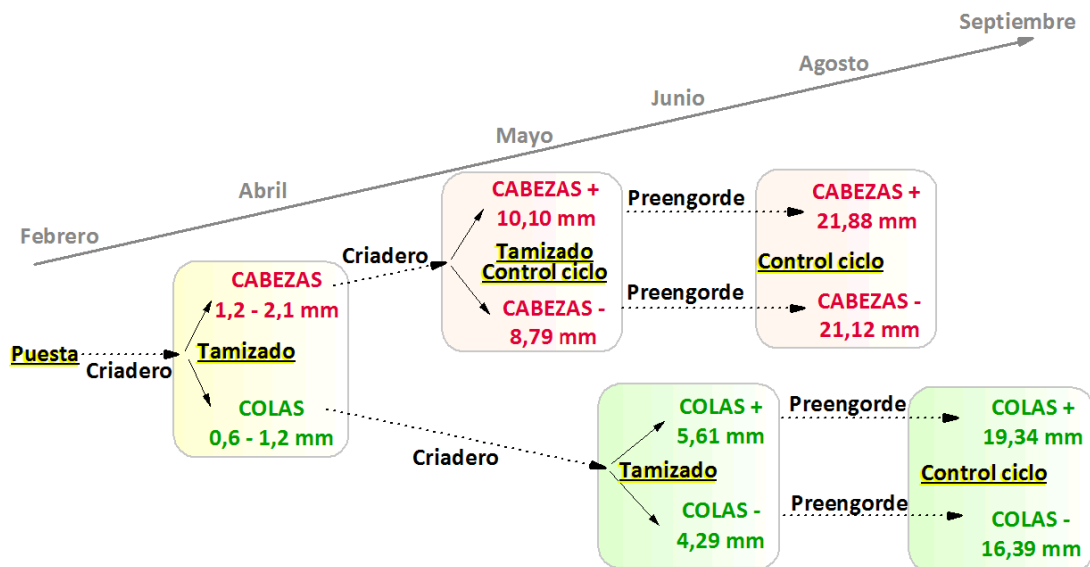


FIGURA 6.17: Esquema del seguimiento de una puesta completa de *V. pullastra* en batea.

6.2.7.2 SEGUIMIENTO EN CRIADERO

Se realizó el seguimiento de la semilla obtenida en dos desoves controlados en el criadero y cultivados según lo explicado en el capítulo III. La semilla no se llevó a ningún sistema de preengorde en el medio natural y se mantuvo en el semillero alimentada con fitoplancton cultivado hasta que el tamaño de las almejas permitió diseccionarlas sin mayor complejidad. Las puestas de los dos cultivos se realizaron en febrero de 2008 y un año después, todos los individuos del cultivo se encontraban en un rango de tallas entre 8 y 18 mm. En ese momento se realizó el estudio de maduración reproductiva y de composición sexual de la semilla obtenida a partir de las dos puestas.

Para el estudio del sex-ratio en las distintas partidas de preengorde se realizó un test Chi-cuadrado.

6.2.8 BIOMETRÍA Y COMPOSICIÓN BIOQUÍMICA DE LA SEMILLA

En cada uno de los desoves controlados en criadero, del cual se obtuvo la semilla para el estudio gametogénico, se llevó a cabo también un estudio de las relaciones biométricas y de su composición bioquímica.

De cada desove se obtuvo una muestra de 100 individuos y a cada uno de ellos se le tomaron las siguientes medidas: longitud máxima del eje antero-posterior, altura máxima del eje dorso-ventral, anchura máxima (utilizando un calibre digital *Mitutoyo* de precisión 0,01 mm) y peso fresco total (con balanza *Gram Precision* de resolución 0,01 g).

Para el estudio de composición bioquímica de la semilla se procesaron tres sublotes en cada cultivo: almejas pequeñas (entre 8 y 10 mm), almejas medianas (entre 12 y 14 mm) y almejas grandes (entre 16 y 18 mm). A cada sublote se le calculó: peso fresco, peso seco y la cantidad de carbohidratos, lípidos y proteínas de la vianda.

Se calculó el peso seco de la vianda liofilizando una muestra de tejido durante 24 horas y para el peso seco de la concha se mantuvieron en estufa a 100°C durante 24 horas.

El estudio de composición bioquímica se realizó según los siguientes métodos. La determinación de proteínas se realizó a partir del método de Lowry *et al.* (1951), la cuantificación de los lípidos según el método de Marsh y Weinstein (1966) y los carbohidratos se utilizó el método de la Antrona (Fraga, 1956).

Los métodos utilizados para la determinación de proteínas y carbohidratos son los mismos que los utilizados para el análisis de los progenitores, descritos ampliamente en los apartados 3.2.6.2 (proteínas) y 5.2.7 (carbohidratos).

Los lípidos totales se hallaron por el método de Marsh y Weinstein (1966), utilizando como estándar la tripalmitina en un rango de concentraciones de 5-50 µg para hacer la recta de calibración.

Se partió de una muestra de tejido liofilizado (entre 1-2 mg), a la cual se le añadió 400 µl de agua *Milli-Q* y se sonicó durante 30 segundos. Posteriormente, se añadió 1 ml de metanol y 500 µl de cloroformo, manteniéndola durante 10 minutos en baño de hielo y agitándola a continuación durante 2 minutos. Se centrifugó y se recogió el sobrenadante en otro tubo, al que se le añadió 500 µl de cloroformo y 500 µl de agua *Milli-Q*; se mantuvieron en baño de hielo durante 5 minutos y a continuación se agitaron.

Tras centrifugar, se eliminó el sobrenadante y la parte inferior se evaporó a 60°C, para seguidamente redissolverla en 2 ml de cloroformo. Se tomaron 3 alícuotas de 100 µl en tubos de reacción y se evaporaron a 60°C. Se añadió 500 µl de ácido sulfúrico a los tubos de reacción y se prepararon 3 blancos de ácido sulfúrico. Los tubos se agitaron y se mantuvieron a 200°C durante 30 minutos para luego enfriarlos en hielo, añadir 1,5 ml de agua *Milli-Q* y leer la absorbancia a 375 nm en espectrofotómetro.

El análisis estadístico de los resultados se realizó utilizando el paquete estadístico SPSS® para Windows versión 15.0.

La comparación bioquímica de los dos cultivos se realizó mediante un test de análisis de varianza (ANOVA). Se utilizó el test de Kolmogorov-Smirnov para el estudio de la normalidad. La homogeneidad de varianzas se ha comprobado mediante el test de Barlett.

La comparación de la composición bioquímica entre las distintas tallas en cada cultivo se realizó con tests no paramétricos debido al tamaño muestral, al incumplimiento por parte de algunos grupos de datos de la distribución normal y que no presentaron homogeneidad de varianzas. Para el contraste de más de dos muestras se aplicó el test H de Kruskal-Wallis y para el contraste dos a dos se usó el test de contraste de dos muestras independientes U de Mann-Whitney.

6.2.9 CULTIVO INTEGRAL: CRIADERO, PREENGORDE Y ENGORDE

En febrero de 2006 se recogió un lote de reproductores de *V. pullastra* de talla comercial de Vilaxoán (Ría de Arousa). Los progenitores se llevaron al Centro de Cultivos Mariños de Ribadeo donde desovaron espontáneamente al llegar al criadero. El cultivo larvario y postlarvario hasta la obtención de semilla se realizó siguiendo el método descrito en el capítulo III.

La semilla se mantuvo en el criadero hasta que alcanzó una talla de 4,7 mm en junio de 2006, momento en el que se trasladó a la Cofradía de Barallobre para realizar el preengorde.

Para el preengorde, la semilla fue colocada en bolsas ostrícolas en mesas situadas en la playa de Maniños en Barallobre (zona media de la Ría de Ferrol), en el intermareal bajo (Figura 6.18). La densidad de la semilla en las bolsas varió entre 2 y 6 kg/m². Las dimensiones de las bolsas fueron de 100 x 40 cm e inicialmente la semilla se colocó en bolsas de 2 mm de luz de malla. Se hicieron desdobles mensuales cambiando

6. Cultivo en el medio natural

las bolsas por otras de 3, 4 y 6 mm de luz de malla, hasta alcanzar la talla de 13,90 mm en octubre de 2006, momento en el que se sembraron para realizar el engorde.

El parque para el engorde de la semilla estaba situado en una zona del intermareal bajo de la misma playa (Figura 6.18). El substrato estaba compuesto por arena fina y la densidad sembrada fue de 100 indiv/m². El parque se cubrió con una red de 4 mm de luz de malla que se retiró en la primavera, cuando la talla media de los individuos estaba en torno a 25 mm.

A partir de los datos obtenidos en los controles efectuados, se construyeron curvas de crecimiento y se calculó la tasa de supervivencia en cada una de las fases. Así mismo, durante el preengorde y engorde se obtuvo la tasa de crecimiento instantánea en longitud y en peso.



FIGURA 6.18: Situación de las mesas de preengorde y del parque de cultivo en la playa de Maniños (Barallobre), donde se realizó el preengorde y engorde de la semilla de almeja babosa.

6.3 RESULTADOS

6.3.1 PREENGORDE EN BATEA E INTERMAREAL

6.3.1.1 ÉPOCAS DE CULTIVO

En la tabla VI.4 se muestran los resultados obtenidos en las pruebas de preengorde, en paralelo en batea y en intermareal, en distintas épocas del año. En las dos primeras el sistema intermareal se localizó en O Grove, en las dos últimas se utilizó una playa de Vilaxoán y en la tercera se utilizaron ambas localizaciones, la densidad empleada en todas las pruebas fue la misma ($1,79 \text{ kg/m}^2$). Se presenta la talla y el peso en el que se inició el preengorde, las fechas y días de cultivo, la talla y el peso alcanzado al final del preengorde y la mortalidad.

En la prueba donde se obtuvieron peores resultados, otoño 2004, para una semilla de talla inicial 7,14 mm, se necesitaron 161 días en batea para alcanzar 15,46 mm y 239 días en intermareal para llegar a 12,2 mm; siendo la tasa de crecimiento mensual en longitud de 14,3 para la batea y 6,7 para el intermareal. Los mejores resultados se obtuvieron en la prueba de verano de 2005, en 49 días en batea la semilla con talla inicial de 5,71 mm llegó a 14,7 mm (G_{L30} : 58); necesitándose 89 días para que en intermareal llegara a alcanzar 10,7 mm (G_{L30} : 21,1).

En todas las pruebas se obtuvieron mayores tasas de crecimiento en el sistema en batea que en el intermareal. En batea la G_{L30} en longitud osciló entre un 14,3 en otoño del 2004 y 60,1 en primavera del 2006. En el sistema de preengorde intermareal la tasa osciló entre un 6,7 (otoño 2004) y 21,1 (verano de 2005).

TABLA VI.4: Talla inicial y final (mm), peso inicial y final (mg/ind), días de cultivo, tasa de crecimiento en peso (G_{W30}) y en longitud (G_{L30}), y porcentaje de mortalidad (%) en cada una de las pruebas de preengorde de *V. pullastra*.

Estación	Fecha inicio	Talla inicial (mm)	Peso inicial (mg/ind)	Sistema	Fecha final	Días	Talla final (mm)	Peso final (mg/ind)	G_{L30}	G_{W30}	Mort.
Otoño 2004	27/10/04	7,14 ± 0,84	52,40 ± 1,15	Batea	06/04/05	161	15,46 ± 0,2	592,22 ± 3,50	14,3	45,2	0,33
				Intermareal O Grove	23/06/05	239	12,2 ± 0,3	372,59 ± 20,16	6,7	24,6	25,33
Primavera 2005	08/04/05	7,87 ± 1,21	78,92 ± 5,01	Batea	26/05/05	48	12,99 ± 2,03	322,45 ± 5,39	31,8	88	3,70
				Intermareal O Grove	21/07/05	104	12,06 ± 1,91	258,43 ± 16,76	12,3	34,2	31,71
Verano 2005	06/07/05	5,71 ± 0,79	31,43 ± 1,92	Batea	24/08/05	49	14,7 ± 0,2	443,76 ± 39,20	57,9	162,1	0
				Intermareal O Grove	03/11/05	89	10,67 ± 1,81	183,50 ± 21,77	21,11	59,5	5,35
				Intermareal Vilaxoán	03/11/05	89	10,80 ± 1,78	235,00 ± 15,51	21,15	67,8	7,26
Invierno 2006	01/02/06	6,30 ± 1,23	47,52 ± 4,50	Batea	20/04/06	78	13,61 ± 1,88	373,98 ± 10,40	29,6	79,3	2,16
				Intermareal Vilaxoán	26/05/06	114	10,86 ± 1,73	182,12 ± 12,61	14,3	35,4	4,04
Primavera 2006	27/04/06	5,91 ± 0,80	26,32 ± 0,42	Batea	05/06/06	39	12,90 ± 1,03	301,50 ± 12,68	60,1	187,6	0
				Intermareal Vilaxoán	29/06/06	64	8,04 ± 1,12	70,12 ± 3,51	14,4	45,9	5,03

La mortalidad total en las pruebas de preengorde en intermareal fue siempre superior que en batea, ya que en ésta no se alcanzaron mortalidades superiores al 4%. En intermareal las mayores mortalidades se presentaron en la prueba desarrollada en otoño del 2004 (25,3%) y de primavera de 2005 (31,71%); en el resto de las pruebas de intermareal la mortalidad fue en torno al 5%.

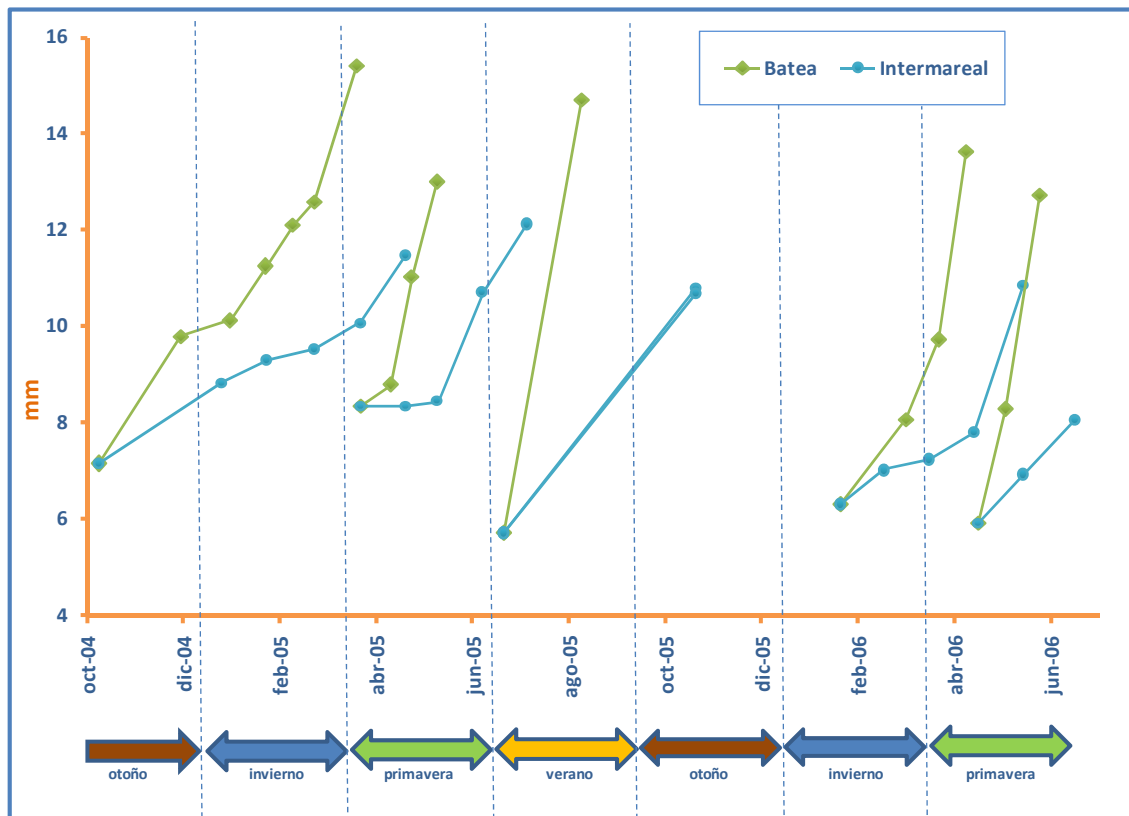


FIGURA 6.19: Evolución del crecimiento en longitud en cada una de las pruebas de preengorde en relación con las distintas épocas del año.

En la figura 6.19 se observa el crecimiento en longitud en todas las pruebas ensayadas. En la gráfica se observa como los lotes preengordados en batea crecen mucho más rápido que los del intermareal, y en ambos sistemas el crecimiento es más lento entre los meses de noviembre y marzo. Tanto en la prueba de otoño de 2004 como en la de invierno de 2006, la semilla presenta un crecimiento relativamente lento hasta el mes de abril, momento en el cual se acelera respecto a los meses anteriores. Los lotes preengordados a partir del mes de abril, tanto en batea como intermareal, presentan mayores tasas de crecimiento (pendiente de la línea) que los preengordados en meses anteriores.

6. Cultivo en el medio natural

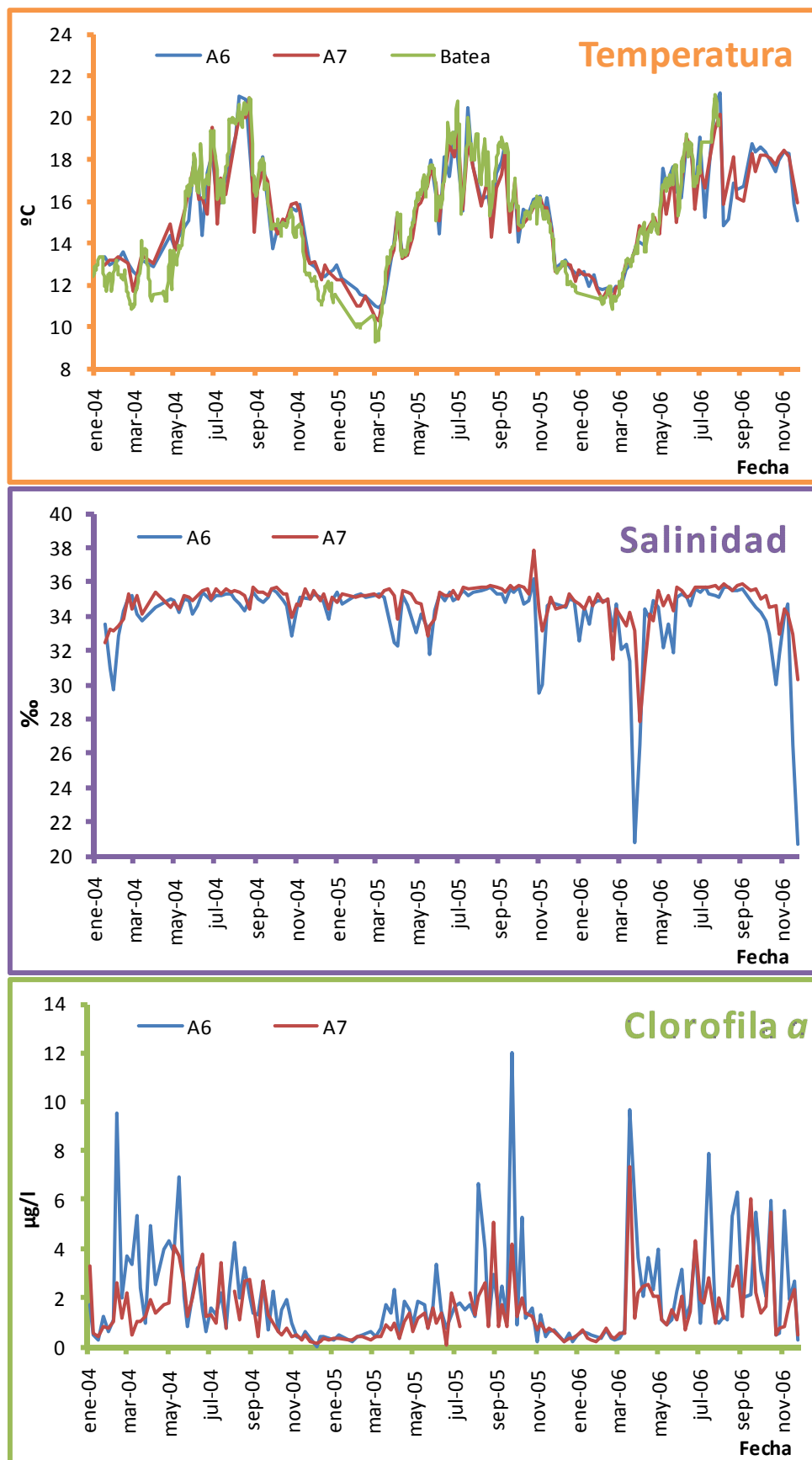


FIGURA 6.20: Evolución de la temperatura (°C), concentración de clorofila *a* (µg/l) y salinidad (‰) entre los años 2004 y 2006. La estación A6 se corresponde con el intermareal de Vilaxoán, la A7 con la batea y el intermareal de O Grove (datos cedidos por el INTECMAR). Los datos de temperatura del agua en la batea se tomaron y registraron con una sonda permanente.

El potencial de crecimiento se ve afectado por diversos factores, entre ellos la época de cultivo y el sistema empleado. Como se observa en la figura 6.20, en la evolución anual de la temperatura, se pueden diferenciar dos épocas diferentes, que determinan la evolución de la tasa de crecimiento. A finales de otoño y en invierno la temperatura del agua de mar es baja (entre 10 y 14°C) y a su vez la disponibilidad de fitoplancton también es menor, por lo que la tasa de crecimiento se ralentiza en ambos sistemas. En primavera y principios de verano, coincidiendo con el aumento de temperatura y fitoplancton, la tasa de crecimiento aumenta progresivamente. Durante los meses de verano las temperaturas del agua son más elevadas que en invierno, aunque como se ve en la figura 6.20, durante el mes de julio de 2005 la temperatura del agua en la batea osciló entre 15 y 20°C.

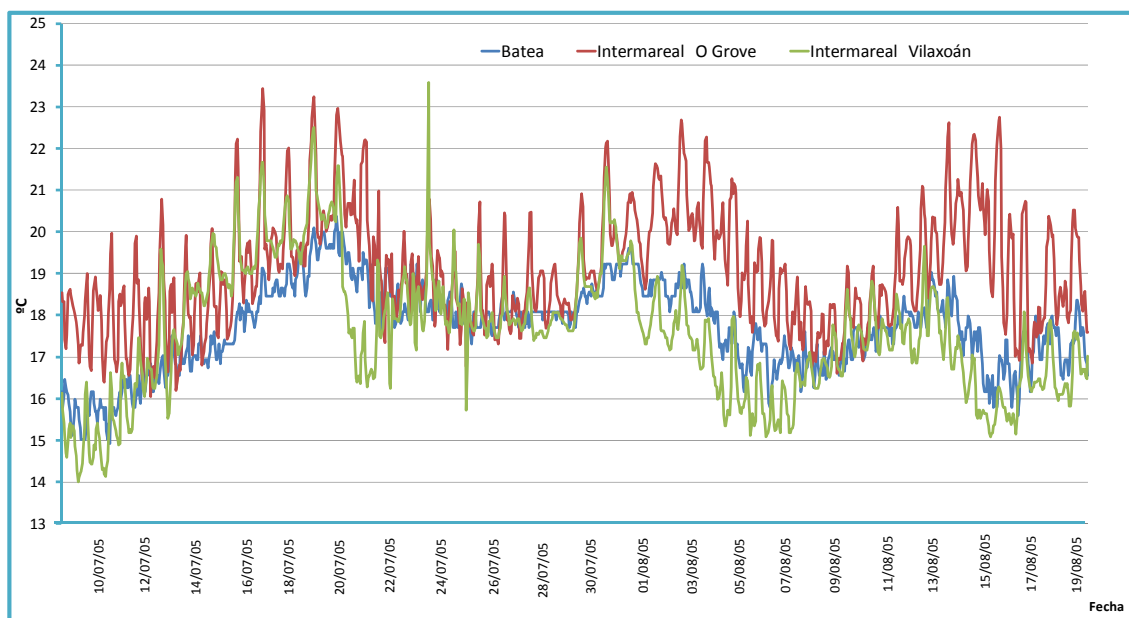


FIGURA 6.21: Evolución de la temperatura (°C) en el verano de 2005 en el intermareal de Vilaxoán y O Grove y en la batea.

Comparando las condiciones ambientales de ambos sistemas, en la batea la temperatura es más estable que en el sistema intermareal (Figura 6.21). En la batea, durante los meses de verano, la temperatura a lo largo del día oscila alrededor de 1°C, mientras que en el intermareal, por el efecto de las mareas, la oscilación de temperatura es entre 3 y 5°C. En el intermareal, durante la marea baja, se llegan a alcanzar temperaturas de 23°C.

Esta subida de la temperatura se debe a que en las épocas estivales, donde la insolación tiene una importancia considerable, la capa de agua que cubre la semilla en el intermareal es relativamente escasa. En determinados días, con ausencia de viento, esta insolación provoca un sobrecalentamiento que queda reflejado en el registro de la sonda. En mareas muy vivas (inferiores a cota +0,50) las bolsas que contienen la semilla a preengordar quedan en seco, con lo que la incidencia de la insolación todavía puede acrecentar aún más este fenómeno de aumento de temperatura.

Si cuando ocurren estas mareas vivas sobre la parte superior de las bolsas hay fijadas epibiontes, especialmente algas filamentosas del tipo *Enteromorpha* sp., éstas mitigan el efecto de la insolación, protegiendo la semilla ubicada en el interior de las bolsas de preengorde. Por ello, como práctica habitual para realizar el desdoble y cambio de bolsas de cultivo de la semilla preengordada en intermareal, éste debe hacerse en los últimos días de las mareas vivas, ya que al reubicarlas en bolsas limpias, exentas de dichas algas, la semilla se encuentra desprotegida frente a la insolación.

6.3.1.2 EFECTO DE LA DENSIDAD EN EL CRECIMIENTO

Con el fin de estudiar el efecto de la densidad de cultivo en el crecimiento durante la fase de preengorde se realizó una prueba ensayando con distintas densidades, en paralelo en batea e intermareal. En la tabla VI.5 se muestran los resultados.

TABLA VI.5: Talla inicial y final (mm), peso inicial y final (mg/ind), días de cultivo, tasa de crecimiento en peso (G_{W30}) y en longitud (G_{L30}), y porcentaje de mortalidad (%) en cada una de las densidades.

BATEA			PRUEBA DENSIDAD					
Fecha inicio: 28/04/06			Fecha final: 5/06/06					
Talla inicial (mm)	Peso inicial (mg/ind)	Densidad kg/m^2	Días	Talla final (mm)	Peso final (mg/ind)	G_{L30}	G_{W30}	Mort.
5,91	26,32	0,89	38	13,68	380,20	70,01	222,45	0
		1,79		12,72	301,52	61,33	194,73	0
		3,58		9,44	116,96	35,36	112,83	0

INTERMAREAL			PRUEBA DENSIDAD					
Fecha inicio: 28/04/06			Fecha final: 27/06/06					
Talla inicial (mm)	Peso inicial (mg/ind)	Densidad kg/m^2	Días	Talla final (mm)	Peso final (mg/ind)	G_{L30}	G_{W30}	Mort.
5,91	26,32	0,89	60	9,19	107,17	24,06	76,36	2,73
		1,79		8,04	70,12	14,06	44,51	5,03

En ambos sistemas se obtuvieron mejores resultados de crecimiento en las densidades más bajas. El valor de las tasas de crecimiento a menor densidad en batea, tanto en longitud como en peso, fue el doble que a mayor densidad. En el preengorde realizado en batea, las diferencias de crecimiento entre la densidad baja y media, si se tiene en cuenta el rendimiento que se obtiene al utilizar menos material de preengorde, menor disponibilidad de espacio y una reducción en la mano de obra necesaria, se aconseja la utilización de la densidad de trabajo de $1,79 \text{ kg/m}^2$.

En intermareal las tasas de crecimiento también son mayores a menor densidad, aunque menores que en batea; con todo ello, el crecimiento se muestra más favorable a alta densidad en batea ($3,58 \text{ kg/m}^2$) que a densidad más baja en intermareal ($0,89 \text{ kg/m}^2$). En la figura 6.22 se muestran los resultados de crecimiento de las diversas subpartidas.

6. Cultivo en el medio natural

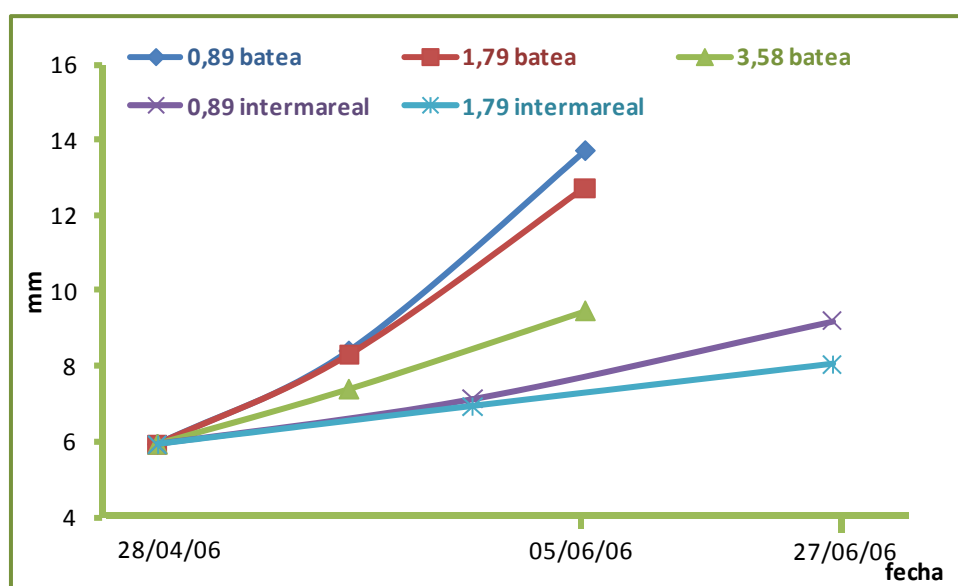


FIGURA 6.22: Evolución del crecimiento de la semilla de *V. pullastra* en la prueba de preengorde utilizando distintas densidades de cultivo.

6.3.1.3 TALLA INICIAL DE PREENGORDE

Para el estudio de la viabilidad del sistema de preengorde con semilla de menor tamaño al utilizado en las pruebas anteriores, se llevaron a cabo pruebas en batea utilizando el mismo sistema de bolsas pero con luz de malla de 1 mm. El tamaño medio inicial de la semilla fue de 3,85 mm y con una edad de tres meses. La semilla previamente fue tamizada por un tamiz de 2 mm y se optó por realizarla a tres densidades diferentes (0,72; 1,44 y 2,15 kg/m²). En la tabla VI.6 se muestran los resultados obtenidos.

TABLA VI.6: Prueba de preengorde con semilla de pequeño tamaño, estabulada en diferentes densidades en bolsas de luz de malla 1 mm.

BATEA			MALLA 1 mm					
Fecha inicio: 28/04/06			Primer control: 15/05/06					
Densidad kg/m ²	Talla inicial (mm)	Peso inicial (mg)	Días	Talla (mm)	Peso (mg)	G _{L30}	G _{W30}	Mort.
0,72	3,85	6,74	17	5,71	23,59	69,56	221,08	0,61
1,44				5,10	16,47	49,52	157,67	0,60
2,15				4,78	13,41	39,18	121,40	3,17

Se obtuvieron buenos resultados de crecimiento, especialmente a menor densidad de cultivo. Se alcanzaron tasas de crecimiento en longitud superiores a 60 en la densidad más baja, pasando en 17 días de 3,85 a 5,71 mm. Las mortalidades fueron prácticamente nulas (Tabla VI.6). Estos resultados avalan que es viable el preengorde en batea con semilla de pequeño tamaño. Con malla de 1 mm de luz, las almejas estabuladas en su interior extienden sus sifones a través de los huecos de la malla, aprovechando el alimento y el oxígeno disuelto del agua que circula por el exterior de la bolsa. Con este sistema se consiguen buenos resultados de crecimiento.



FIGURA 6.23: Aspecto de la semilla de *V. pullastra* preengordada en bolsas de luz de malla de 1 mm.

En este caso, el preengorde realizado a menor densidad es el que se muestra más favorable, ya que al ser semilla de tan pequeño tamaño, el número de unidades que pueden introducirse en cada bolsa es muy elevado. Para preengordar una gran cantidad de semilla no se requiere de muchos elementos de estabulación y tan solo es necesario realizar un desdoble para pasarla ya a malla de mayor luz. Con la densidad más baja se acorta bastante el período del primer preengorde.

A los 17 días de cultivo, se tamizó cada uno de los lotes de semilla con un tamiz de luz de malla de 3 mm (T3), y los sublotes (>T3 y <T3) se estabularon separadamente para continuar el preengorde. Los sublotes mayores de T3 se estabularon a las densidades habituales de preengorde para este tamaño, es decir de 0,89 y 1,79 kg/m². En la tabla VI.7 se muestran los resultados.

6. Cultivo en el medio natural

TABLA VI.7: Desdoble de los distintos sublotes de la prueba con malla de 1 mm.

BATEA			MALLA 2 mm					
Fecha inicio: 15/05/06			Fecha final: 21/06/06					
Densidad kg/m ²	Talla (mm)	Peso (mg/ind)	Días	Talla (mm)	Peso (mg/ind)	G _{L30}	G _{W30}	Mort.
0,72 < T3	4,82	13,76	37	11,78	235,98	70,69	224,78	4,22
1,44 < T3	4,89	14,48		9,53	120,32	66,06	209,56	2,81
2,15 < T3	4,61	11,97		8,48	83,09	63,93	202,88	1,39
0,89 > T3	5,91	26,44	37	14,05	413,4	59,85	190,42	1,15
1,79 > T3	5,52	21,18		14,06	414,71	63,33	201,48	3,80

Las tasas de crecimiento se mantuvieron al pasar la semilla a bolsas de mayor luz de malla, aunque entre las distintas densidades no se aprecia tanta diferencia como se observó en la semilla de menor tamaño.

En las siguientes figuras se muestra la evolución del crecimiento de la semilla establecida a distintas densidades.

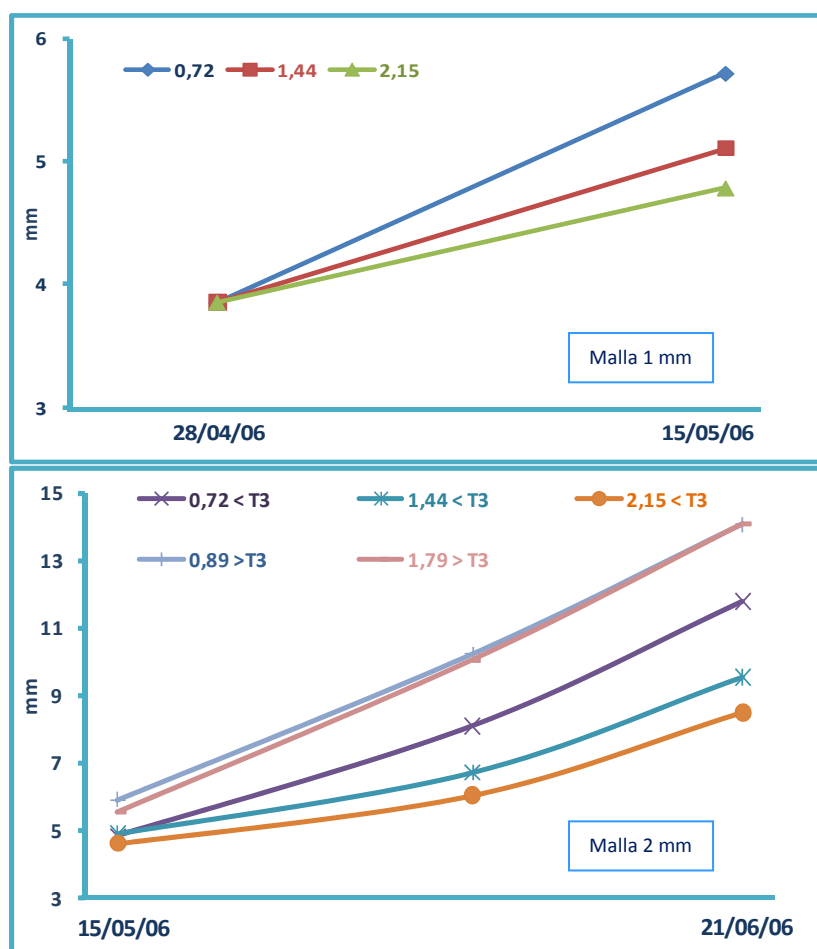


FIGURA 6.24: Evolución del crecimiento en mm en cada una de las densidades.

6.3.2 CONTROL PATOLÓGICO Y MADURACIÓN REPRODUCTIVA DE LA SEMILLA

Se realizó el estudio histológico de la semilla de *V. pullastra* que se utilizó en las experiencias de preengorde del apartado 6.3.1.1.

6.3.2.1 CONTROL PATOLÓGICO

En la tabla VI.8 se muestran los resultados del estudio patológico de la semilla antes de ser introducida en el sistema de preengorde y después de finalizada esta fase.

TABLA VI.8: Prevalencias (%) de los organismos parásitos y comensales observados en cada una de las muestras.

	Fecha	Talla	Colonias tipo rickettsiano en dig.	<i>Nematopsis</i> sp.	Ciliados en branquia	Ciliados en digestivo	Haplosporidio	<i>Steinhausia</i> sp.	<i>Paravortex</i> sp.	Metazoo en digestivo	Metacercaria en pie	
Control inicial	04/11/04	7,2 ± 0,1	0	0	4	15	0	0	0	0	0	
Control final	Batea	11/04/05	16,0 ± 0,2	0	23	17	10	3	3	7	0	0
	Intermareal	23/06/05	12,2 ± 0,3	0	10	10	0	0	0	3	0	0
Control inicial	21/04/05	8,4 ± 0,2	0	0	4	0	0	0	0	0	0	
Control final	Batea	26/05/05	13,1 ± 0,3	0	0	3	0	0	0	0	0	
	Intermareal	21/07/05	11,8 ± 0,6	0	3	48	7	0	0	10	0	0
Control inicial	06/07/05	7,2 ± 0,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Control final	Batea	24/08/05	14,7 ± 0,2	0	0	8	0	3	0	0	13	0
	Int. O Grove	03/11/05	11,5 ± 0,4	3	23	60	0	0	0	13	0	3
	Int. Vilaxoán	03/11/05	12,0 ± 0,2	3	7	33	27	0	3	27	0	0
Control inicial	01/02/06	7,0 ± 0,2	0	3	0	3	0	0	3	0	0	
Control final	Batea	20/04/06	18,1 ± 0,2	0	0	10	0	0	0	7	0	0
	Intermareal	26/05/06	11,8 ± 0,1	0	0	13	4	5	0	16	0	0
Control inicial	27/04/06	6,8 ± 0,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Control final	Batea	05/06/06	12,7 ± 0,2	0	16	0	0	0	8	0	0	0

En los controles iniciales de dos de los lotes no se encontró ningún parásito, en otros dos sólo se observaron ciliados y en otro lote, además de ciliados, se encontraron quistes de *Nematopsis* sp. e individuos de *Paravortex* sp.

En los controles finales las almejas estaban afectadas por varios parásitos y comensales. En algunas experiencias se observaron individuos de la gregarina *Nematopsis* sp., aisladamente se detectaron plasmodios de haplosporidio en el epitelio del digestivo y quistes de *Steinhausia* sp. en ovocitos. En la experiencia que se inició en verano de 2005 se observaron algunos metazoos indeterminados en digestivo y metarcarias de trematodo en pie. En casi todas las experiencias se detectaron individuos de *Paravortex* sp. al final de las experiencias. Se encontraron colonias de tipo rickettsiano en branquia al final de la experiencia de verano de 2005 que en el sistema intermareal finalizó en noviembre. Aunque no tiene importancia patológica, los ciliados en branquia presentaron las mayores prevalencias.

Con relación a los sistemas de cultivo, las almejas preengordadas en batea están menos parasitadas que las del intermareal. Dependiendo de la época del año en que se realice el preengorde también hay diferencias, así las almejas que se preengordaron en verano estaban más parasitadas que las de primavera. Las almejas del preengorde de otoño de 2004 acabaron también más parasitadas que en primavera.

Ninguno de los parásitos detectados en la semilla tiene importancia patológica, pues como mucho, desencadenaban una reacción hemocitaria ligera alrededor del parásito.

6.3.2.2 MADURACIÓN REPRODUCTIVA

En la tabla VI.9 se muestran las tallas medias en longitud de las partidas ensayadas en preengorde realizadas en paralelo tanto en batea como en intermareal, y el nivel de diferenciación sexual encontrada en cada una de ellas mediante técnica histológica, al inicio y final del preengorde.

TABLA VI.9: Porcentaje (%) de individuos de cada lote en cada estadio. E1: Inicio de la gametogénesis; E2: Gametogénesis avanzada; E3: Madurez y puesta y E4: Renovación gonadal. I: Indeterminado; H: Hembra y M: Macho.

	Fecha	Talla	E 1		E 2		E 3		E 4		% total				
			I	H	M	H	M	H	M	H	M	I	H	M	
Control inicial	04/11/04	7,2 ± 0,1	29	67	4	0	0	0	0	0	0	29	67	4	
Control final	Batea	11/04/05	16,0 ± 0,2	0	0	0	100	0	0	0	0	0	100	0	
	Intermareal	23/06/05	12,2 ± 0,3	0	0	0	100	0	0	0	0	0	100	0	
Control inicial	21/04/05	8,4 ± 0,2	18	53	18	0	11	0	0	0	0	18	53	29	
Control final	Batea	26/05/05	13,1 ± 0,3	0	0	0	52	31	7	10	0	0	59	41	
	Intermareal	21/07/05	11,8 ± 0,6	0	0	0	0	0	55	31	14	0	69	31	
Control inicial	06/07/05	7,2 ± 0,2	50	50	0	0	0	0	0	0	0	50	50	0	
Control final	Batea	24/08/05	14,7 ± 0,2	0	3	0	50	13	27	7	0	0	80	20	
	Int. O Grove	03/11/05	11,5 ± 0,4	10	10	0	0	0	0	3	67	10	10	77	13
	Int. Vilaxoán	03/11/05	12,0 ± 0,2	14	7	0	0	0	3	3	73	0	14	83	3
Control inicial	01/02/06	7,0 ± 0,2	0	47	7	13	13	7	13	0	0	0	67	33	
Control final	Batea	20/04/06	13,1 ± 0,2	0	13	3	30	47	7	0	0	0	50	50	
	Intermareal	26/05/06	11,8 ± 0,1	0	8	4	0	0	20	64	0	0	28	72	
Control inicial	27/04/06	6,8 ± 0,2	43	21	0	7	29	0	0	0	0	43	28	29	
Control final	Batea	05/06/06	12,7 ± 0,2	0	16	0	52	20	8	4	0	0	76	24	

Las diversas partidas que se colocaron tanto en la batea como en intermareal para proceder a la fase de preengorde, presentaron un cierto nivel de diferenciación sexual (Figura 6.25), indicando que ésta se inició ya en el criadero. La mayoría de los individuos al iniciar el preengorde (entre 6,8 y 8,6 mm) se encontraban en estadio de inicio de gametogénesis, aunque también se encontraban individuos en estadio de reposo, en gametogénesis avanzada y en madurez. La talla mínima en la que se detectó el inicio de la gametogénesis dentro de estas partidas fue de 4,9 mm.

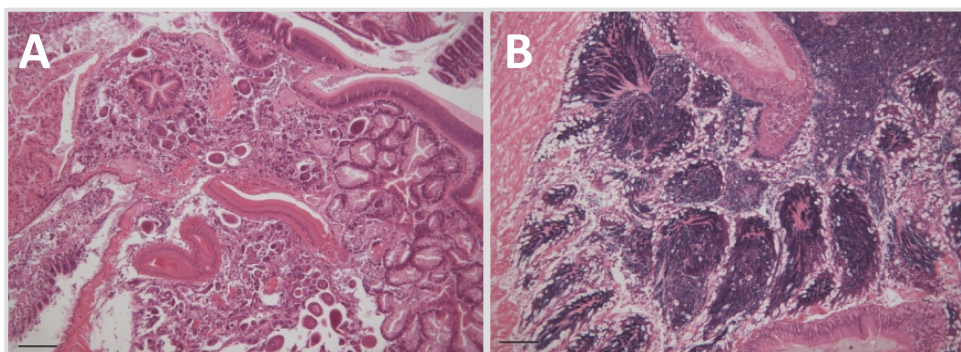


FIGURA 6.25: Imágenes de microscopía óptica de semilla de *V. pullastra* al inicio del preengorde. A: Hembra en inicio de gametogénesis. B: Macho en gametogénesis avanzada. Barra de escala 100 μ m.

6. Cultivo en el medio natural

A lo largo de la fase de preengorde la semilla va avanzando dentro de su ciclo reproductivo (Figura 6.26). Al finalizar el preengorde ya se encuentra mayor porcentaje de individuos en madurez que al inicio, e incluso se observan algunos individuos en renovación gonadal para comenzar otro ciclo de gametogénesis.

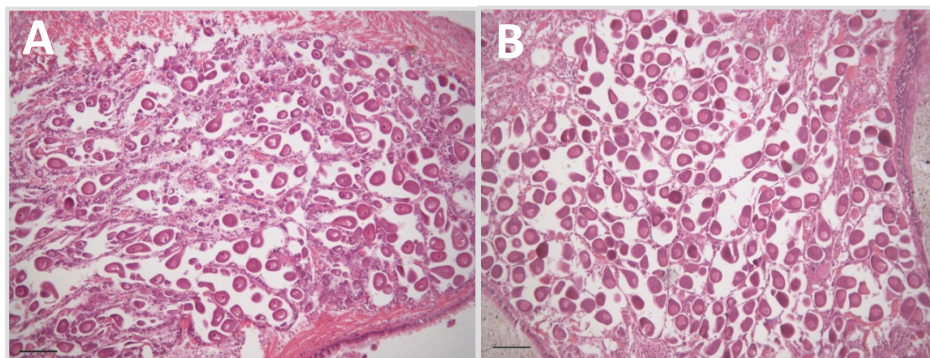


FIGURA 6.26: Imágenes de microscopía óptica de semilla de *V. pullastra* al finalizar el preengorde. A: Hembra en gametogénesis avanzada en batea. B: Hembra en madurez en intermareal. Barra de escala 100 µm.

6.3.3 CRECIMIENTO DIFERENCIAL

Al realizar el estudio histológico de maduración reproductiva de la semilla utilizada en las pruebas de preengorde en las distintas épocas del año, se observó que en la mayoría de las partidas estudiadas había un elevado porcentaje de hembras. Se presenta en la siguiente tabla el porcentaje de sexos que se observó en cada una de las partidas al finalizar la fase de preengorde.

TABLA VI.10: Porcentaje de individuos de cada sexo encontrados en las distintas pruebas al finalizar el preengorde y relación hembras:machos (H:M) en cada subpartida. I: Indeterminado; H: Hembra y M: Macho. Diferencias significativas en negrita.

Inicio prueba	Final prueba	Talla (mm)	% I	H% M	H:M		
Otoño 2004	Batea (11/04/05)	16,0 ± 0,2	0	100	0	1:0	-
	Intermareal (23/06/05)	12,2 ± 0,3	0	100	0	1:0	-
Primavera 2005	Batea (26/05/05)	13,1 ± 0,3	0	59	41	1,4:1	($\chi^2=1,200$; g.l.=1; p>0,050)
	Intermareal (21/07/05)	11,8 ± 0,6	0	69	31	2,2:1	($\chi^2=4,800$; g.l.=1; p=0,028)
Verano 2005	Batea (24/08/05)	14,7 ± 0,2	0	80	20	4:1	($\chi^2=10,800$; g.l.=1; p=0,001)
	Int. O Grove (03/11/05)	11,5 ± 0,4	10	77	13	5,9:1	($\chi^2=13,370$; g.l.=1; p=0,000)
	Int. Vilaxoán (03/11/05)	12,0 ± 0,2	14	83	3	27,6:1	($\chi^2=21,160$; g.l.=1; p=0,000)
Invierno 2006	Batea (20/04/06)	13,1 ± 0,2	0	50	50	1:1	($\chi^2=0,040$; g.l.=1; p>0,050)
	Intermareal (26/05/06)	11,8 ± 0,1	0	28	72	1:2,57	($\chi^2=6,533$; g.l.=1; p=0,011)
Primavera 2006	Batea (05/06/06)	12,7 ± 0,2	0	76	24	3,16:1	($\chi^2=6,533$; g.l.=1; p=0,011)

En siete de las diez partidas se observó que la proporción de hembras era significativamente mayor que la de los machos y sólo en una de las partidas se desviaba significativamente en favor de los machos, en la prueba de intermareal iniciada en invierno de 2006. En dos de las pruebas la relación hembras:machos no se desviaba significativamente de una proporción 1:1, las pruebas de batea iniciadas en primavera de 2005 e invierno de 2006.

Al analizar la partida de *V. pullastra*, que había iniciado el proceso de preengorde en otoño de 2004, con una talla media de 7,2 mm, al finalizar el preengorde, con una talla final de 16 mm en batea y 12,2 mm en intermareal, presentaba el 100% de hembras y ningún macho. La partida había sido suministrada por el criadero de A´Ostreira, S.L. Según información proporcionada por los responsables del criadero, procedía de la cabeza de una puesta de almeja babosa obtenida durante el verano del año 2004. En función de estos resultados, se mantuvo el lote preengordado en batea hasta el mes de septiembre, momento en el cual la semilla tenía una talla media de 28 mm, realizando repetidos análisis histológicos. De un total de 372 individuos analizados durante estos meses posteriores al preengorde, solamente se detectaron 4 machos.

Una hipótesis que podría explicar los resultados anteriores sería que las hembras presenten un crecimiento mayor que los machos. La presencia de más hembras en estas partidas, vendría favorecida por las prácticas habituales de tamizado y clasificación de cabezas y colas que se realizan en los criaderos, y que se supone que es la causa que origina esta anomalía final de proporción de sexos en los lotes de preengorde. Estos lotes de semilla procedían de criaderos industriales, por lo que no se conoce la evolución de los mismos durante la fase de criadero. Probablemente, a excepción de la prueba de invierno de 2006, el resto de las pruebas se realizó con partidas de semilla que se correspondían con las cabezas de las puestas.

Para confirmar esta hipótesis se pusieron en marcha dos experiencias. En la primera se controlaron los desdobles de una puesta completa durante la fase de criadero, y posteriormente se preengordaron todos los lotes en batea. En la segunda

6. Cultivo en el medio natural

prueba se utilizaron dos puestas, que se mantuvieron en criadero hasta que la semilla alcanzó un tamaño adecuado para ser estudiada.

6.3.3.1 SEGUIMIENTO EN BATEA

De forma exhaustiva se controlaron los diversos desdobles de una puesta de almeja babosa del día 22/02/2005 para su posterior preengorde en batea a partir del 26/05/05.

La primera separación se realizó en el criadero: Cabezas (1,2-2,1 mm) y Colas (0,6-1,2 mm). La segunda separación fue previa a la introducción en el sistema de preengorde en batea: Cabezas+ (10,10 mm), Cabezas- (8,79 mm), Colas+ (5,61 mm) y Colas- (4,29 mm).

En la tabla VI.11 se exponen los resultados en términos de porcentajes de hembras y machos en las diferentes subpartidas originadas.

TABLA VI.11: Porcentajes de hembras y machos en las cuatro subpartidas: (CB+) más grandes de la cabeza, (CB-) más pequeñas de la cabeza, (CL+) más grandes de la cola y (CL-) más pequeñas de la cola. Relación hembras: machos en cada subpartida. Diferencias significativas en negrita.

Subpartida	% H	% M	H:M	
CB+	65,10	34,90	1,94:1	($\chi^2=5,120$; g.l.=1; p=0,024)
CB-	40,90	59,10	1:1,15	($\chi^2=2,000$; g.l.=1; p>0,050)
CL+	82,90	17,10	4,5:1	($\chi^2=20,480$; g.l.=1; p=0,000)
CL-	50,00	50,00	1:1	($\chi^2=0,000$; g.l.=1; p>0,050)

Los resultados parecen indicar que, en la primera división que se realizó en el criadero (con un tamiz de 750 μ m), el posible crecimiento diferencial existente a esta talla no permite una separación física. Sin embargo, la segunda división previa al preengorde en batea, sí origina esa separación física entre hembras y machos. Las más grandes de cada una de las fracciones separadas en el criadero, más grandes de la cabeza (CB+) y más grandes de la cola (CL+), ya contienen mayoritariamente hembras,

mientras que en las muestras correspondientes a las más pequeñas de la cabeza (CB-) y de la cola (CL-) contienen machos y hembras, confirmando el mayor crecimiento de las hembras en relación con los machos en esta fase.

La composición sexual de las diversas marcas de clase: 14,5 > x > 11,5 mm; 11,5 > x > 8,5 mm y 8,5 > x > 5,5 mm de la cabeza, que se muestrearon el 26/05/2005 (Tabla VI.12) apuntan en la misma dirección.

TABLA VI.12: Porcentajes de hembras (% H) y machos (% M), valores de peso húmedo individual (Ph) y talla media (L) de cada clase de talla. Relación hembras:machos en cada subpartida. Diferencias significativas en negrita.

Marca de clase	Ph (mg)	L (mm)	% H	% M	H:M
14,5 > x > 11,5	147,7	10,2	87,5	12,5	6,5:1 ($\chi^2=16,133$; g.l.=1; p=0,000)
11,5 > x > 8,5	93,2	8,8	85,7	14,3	6,5:1 ($\chi^2=16,133$; g.l.=1; p=0,000)
8,5 > x > 5,5	48,0	7,1	14,3	85,7	1:6,5 ($\chi^2=16,133$; g.l.=1; p=0,000)

En la tabla VI.13 se muestran los resultados de crecimiento de las diversas subpartidas.

A medida que la semilla va creciendo la tasa de crecimiento disminuye y tienden a igualarse aquellos individuos que partieron del mismo grupo en la primera división. Así, al inicio del preengorde la diferencia entre CB+ y CB- es de 1,31 mm, lo que representa un 13% de la talla mientras que al final del preengorde, la diferencia entre las dos es de tan sólo 0,76 mm, un 4% de la talla final.

En los dos grupos de las colas esta diferencia todavía es más perceptible. Al inicio del preengorde había un 23% de diferencia entre las dos tallas (1,32 mm) y en la fecha final se redujo hasta un 15% (2,95 mm).

Las hembras presentan, en teoría, un mayor crecimiento que las coloca en las partidas más grandes de la cabeza y la cola (CB+ y CL+). Sin embargo, la maduración sexual les provoca una posterior ralentización del crecimiento respecto de la fracción

6. Cultivo en el medio natural

más pequeña (CB- y CL-), por lo que si dejáramos crecer la semilla durante más tiempo posiblemente las dos fracciones se solaparían (CB+ con CB- y CL+ y CL-).

TABLA VI.13: Parámetros de longitud L (mm), peso húmedo individual Ph (mg) y tasa de crecimiento mensual en longitud G_{L30} y en peso G_{W30} de las diversas subpartidas.

Fecha	26/05/05	08/06/05	21/06/05	07/07/05	19/07/05	09/08/05	24/08/05	07/09/05
CB+								
L (mm)	10,10	12,98	16,24	18,65	21,11	21,88		
G_{L30}		57,89	51,71	25,94	30,98	6,38		
Ph (mg)	144,73	321,78	655,34	1.017,47	1.507,21	1.689,11		
G_{W30}		184,38	164,14	82,49	98,24	17,99		
CB-								
L (mm)	8,79	11,79	14,58	17,74	19,58	21,12		
G_{L30}		67,76	49,02	36,78	24,67	11,95		
Ph (mg)	93,16	236,61	465,04	867,52	1.187,21	1.509,92		
G_{W30}		215,10	155,93	116,91	78,43	37,97		
CL+								
L (mm)			5,61	9,39	11,69	16,33	18,01	19,34
G_{L30}				96,58	54,77	52,78	19,58	15,27
Ph (mg)			22,30	114,75	230,77	667,28	909,99	1.141,06
G_{W30}				307,16	174,67	167,65	62,04	48,49
CL-								
L (mm)			4,29	5,47	7,60	12,32	14,53	16,39
G_{L30}				45,56	82,22	76,28	33,00	26,25
Ph (mg)			9,55	20,65	58,55	272,46	459,57	674,00
G_{W30}				144,60	260,54	242,78	104,56	82,06

Las tasas de crecimiento en los dos lotes de la cola son mayores que los dos lotes de la cabeza, debido a que éstas empezaron el preengorde con menor talla que las otras. Sin embargo, al ir avanzando el preengorde, la tasa de crecimiento disminuye y a igual talla se observan las mismas tasas.

En ninguno de los lotes la mortalidad, durante la fase del preengorde, superó al 3%.

6.3.3.2 SEGUIMIENTO EN CRIADERO

Se ha realizado el seguimiento de la semilla obtenida en dos desoves controlados en el criadero y cultivados según lo explicado en el capítulo III. Los dos cultivos partieron de larvas nacidas en febrero de 2008 y un año después, todos los individuos del cultivo se encontraban en un rango de tallas entre 8 y 18 mm. Fue en este momento cuando se realizó el estudio histológico gonadal y se calculó el porcentaje de machos y hembras en la semilla. Para ello se hicieron tres sublotes en cada cultivo: almejas pequeñas (entre 8 y 10 mm), almejas medianas (entre 12 y 14 mm) y almejas grandes (entre 16 y 18 mm).

La supervivencia de la semilla durante la fase de preengorde que se realizó en criadero fue diferente comparando los dos cultivos. En el cultivo 1, la supervivencia desde que la semilla presentaba una talla con valores comprendidos entre 2,5 y 5,5 mm hasta el final de la experiencia (entre 8 y 18 mm) fue del 65%, mientras que en el cultivo 2 fue tan sólo del 10%.

En la tabla VI.14 se presentan los datos del estudio de sexos de cada uno de los cultivos. En cuanto a la proporción de sexos, en la puesta 1 hay mayor número de individuos hembra en los sublotes grande y mediano, mientras que en el pequeño hay mayor proporción de machos. En todo el cultivo se encontró un 55% de hembras y un 45% de machos. En la puesta 2 se encontró mayor número de individuos hembra en todos los sublotes, en la totalidad del cultivo sólo se encontró un 19% de machos, frente al 81% de hembras.

Como se vio en la prueba realizada en batea, los machos parece que tienen un crecimiento menor durante esta fase de preengorde. Esto podría explicar que en el cultivo 2, con una baja supervivencia (10%), al final de la experiencia se encontrara un elevado porcentaje de hembras (81%), indicando que los machos podrían haber quedado eliminados por mortalidad.

6. Cultivo en el medio natural

TABLA VI.14: Porcentaje de individuos machos y hembras en cada uno de los cultivos. Ph: peso húmedo individual, Lm: longitud media. Relación hembras:machos en cada cultivo. Diferencias significativas en negrita.

Cultivo 1						
Marca de clase	Ph (mg)	Lm (mm)	% H	% M	H:M	
18 > x > 16	784,3	16,9	67	33	2:1	($\chi^2=3,667$; g.l.=1; $p>0,050$)
14 > x > 12	374,1	13,6	64	36	1,75:1	($\chi^2=2,455$; g.l.=1; $p>0,050$)
10 > x > 8	142,5	9,3	34	66	1:2	($\chi^2=3,667$; g.l.=1; $p>0,050$)
Total			55	45	1,22:1	($\chi^2=1,000$; g.l.=1; $p>0,050$)

Cultivo 2						
Marca de clase	Ph (mg)	L (mm)	% H	% M	H:M	
18 > x > 16	770,8	16,8	66	34	2:1	($\chi^2=3,667$; g.l.=1; $p>0,050$)
14 > x > 12	385,0	12,9	87	13	7,25:1	($\chi^2=18,939$; g.l.=1; $p=0,000$)
10 > x > 8	130,8	8,9	91	9	10:1	($\chi^2=22,091$; g.l.=1; $p=0,000$)
Total			81	19	4,26:1	($\chi^2=36,000$; g.l.=1; $p=0,000$)

En cuanto al estudio gametogénico se encontró que todos los individuos presentaban gónada diferenciada, observándose individuos entre 8 y 10 mm en estadio de madurez, 56% en el cultivo 1 y 67% en el cultivo 2.

En ambos cultivos, en los lotes más pequeños (8-10 mm), se encuentran la mayoría de los individuos en madurez. En los lotes más grandes (16-18 mm) aumenta el número de individuos en gametogénesis para la generación de una segunda madurez sexual. En la siguiente tabla se muestra el porcentaje de individuos de cada sublote que se observaron en cada estadio.

TABLA VI.15: Porcentaje de individuos machos y hembras en cada estadio con respecto al total en los diferentes sublotos.

		E 1		E 2		E 3		E 4	
Puesta 1	Talla (mm)	H	M	H	M	H	M	H	M
Grandes	16-18	24	5	9	14	34	9	0	5
Medianas	12-14	17	4	9	20	38	12	0	0
Pequeñas	8-10	11	11	0	22	23	33	0	0

		E 1		E 2		E 3		E 4	
Puesta 2	Talla (mm)	H	M	H	M	H	M	H	M
Grandes	16-18	33	9	8	0	25	25	0	0
Medianas	12-14	41	5	13	8	33	0	0	0
Pequeñas	8-10	16	0	8	9	67	0	0	0

6.3.4 RELACIONES BIOMÉTRICAS Y COMPOSICIÓN BIOQUÍMICA DE LA SEMILLA

Se presenta a continuación los resultados del estudio de la semilla obtenida en los dos desoves controlados en el criadero y presentados en el apartado anterior.

6.3.4.1 RELACIONES BIOMÉTRICAS

En la figura 6.27 se muestran los resultados del estudio biométrico de cada lote de semilla.

Las ecuaciones de regresión de la relación longitud-peso en ambas puestas siguen un modelo potencial. En la puesta 1 se manifiesta una alometría negativa, es decir, la longitud aumentó relativamente más que el peso con la edad. La puesta 2 presentó una relación isométrica.

$$\text{Puesta 1: } \text{Peso} = 0,0002 \times \text{longitud}^{2,9010} \quad R^2 = 0,9848$$

$$\text{Puesta 2: } \text{Peso} = 0,0002 \times \text{longitud}^{2,9872} \quad R^2 = 0,9874$$

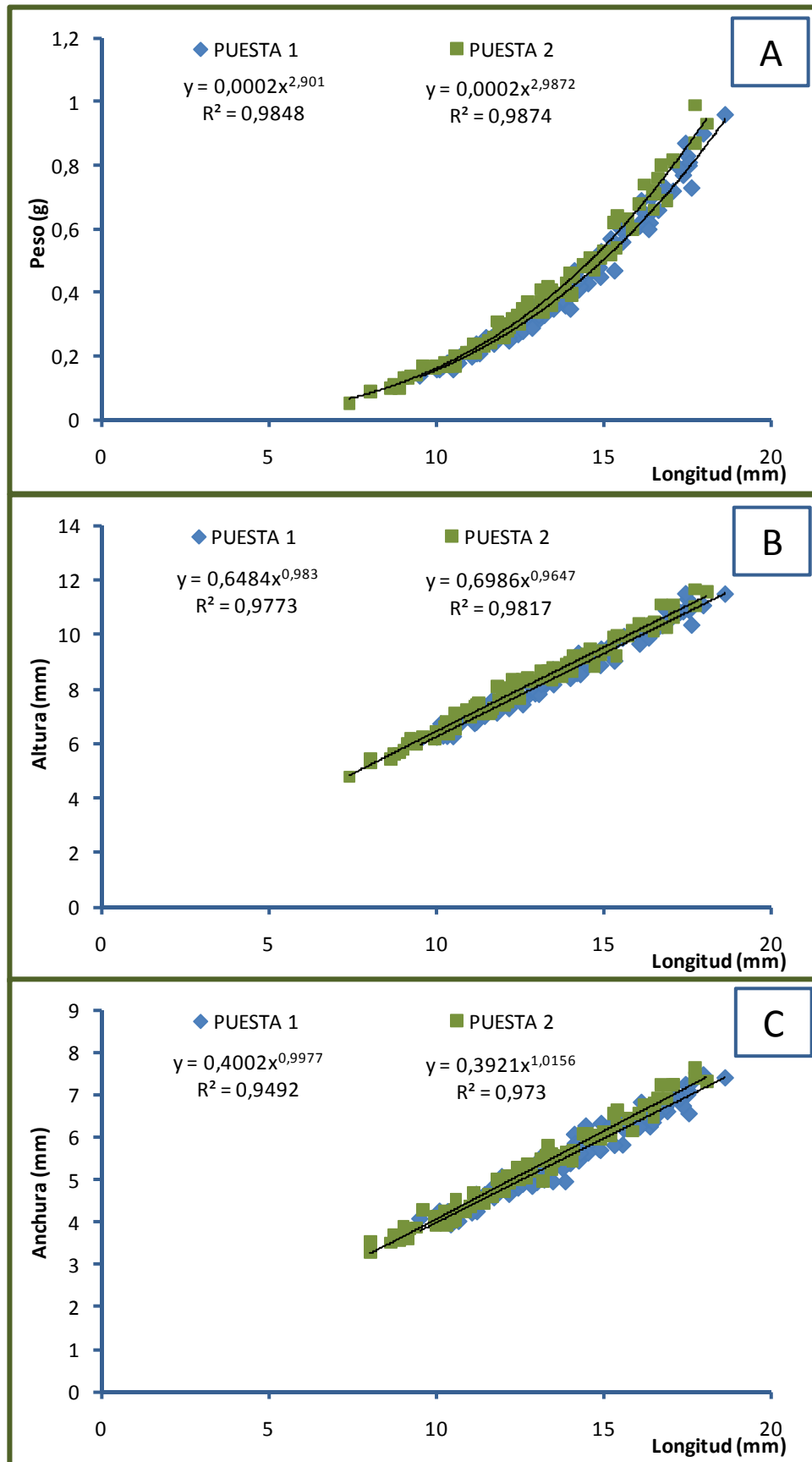


FIGURA 6.27: Relaciones biométricas en cada una de las puestas. A: Relación longitud-peso; B: Relación longitud-altura; C: Relación longitud-anchura. Número de individuos en cada puesta= 100.

Las relaciones longitud-altura y longitud-anchura en ambas puestas siguen un modelo de regresión potencial, presentando una relación isométrica.

$$\text{Puesta 1: Altura} = 0,6484 \times \text{longitud}^{0,9830} \quad R^2 = 0,9773$$

$$\text{Puesta 2: Altura} = 0,6986 \times \text{longitud}^{0,9647} \quad R^2 = 0,9817$$

$$\text{Puesta 1: Anchura} = 0,4002 \times \text{longitud}^{0,9977} \quad R^2 = 0,9492$$

$$\text{Puesta 2: Anchura} = 0,3921 \times \text{longitud}^{1,0156} \quad R^2 = 0,9730$$

6.3.4.2 COMPOSICIÓN BIOQUÍMICA

En las figuras 6.28 y 6.29 se muestran los resultados de la composición bioquímica de los dos cultivos.

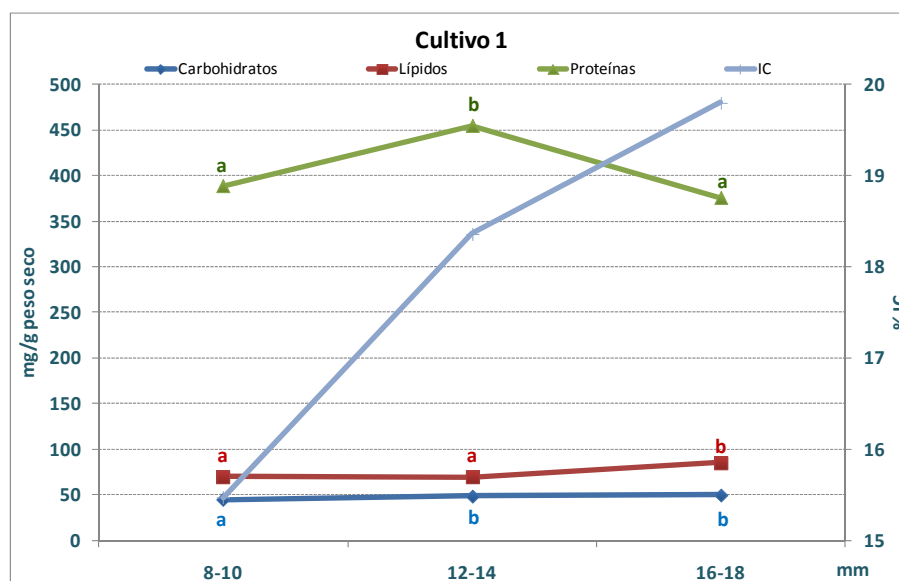


FIGURA 6.28: Índice de Condición (peso seco carne/peso seco concha) en %. Cantidad de carbohidratos, lípidos y proteínas en mg/g peso seco en el cultivo 1. Diferentes letras representan diferencias significativas entre los distintos grupos de talla.

El componente mayoritario de la semilla en todos los sublotos son las proteínas, encontrándose valores entre el 375 y 458 mg/g peso seco. Los valores de los lípidos oscilan entre 56 y 85 mg/g peso seco, y los carbohidratos entre 44 y 63 mg/g peso seco.

6. Cultivo en el medio natural

Entre los dos cultivos, sin diferenciar las clases de talla, sólo hay diferencias significativas ($p=0,00$) en la composición de carbohidratos. En el cultivo 1 la cantidad de carbohidratos oscila entre 44 y 50 mg/g peso seco, mientras que en el 2 los valores oscilan entre 61 y 63 mg/g peso seco. Ambos fueron cultivados paralelamente, empleando el mismo método de cultivo y con idéntica alimentación, la única diferencia entre los dos cultivos fue la procedencia de los progenitores (Cangas y O Barqueiro).

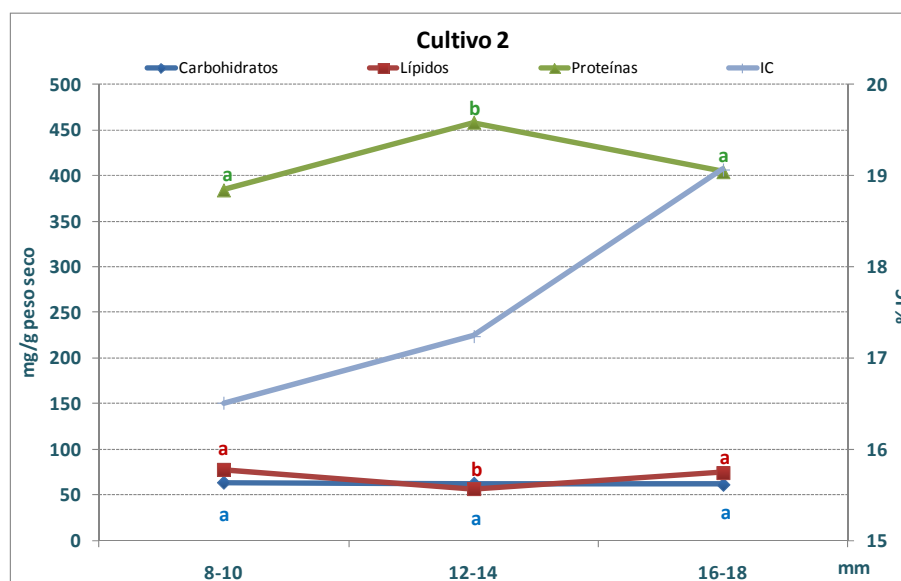


FIGURA 6.29: Índice de Condición (peso seco carne/peso seco concha) en %. Cantidad de carbohidratos, lípidos y proteínas en mg/g peso seco en el cultivo 2. Diferentes letras representan diferencias significativas entre los distintos grupos de talla.

En cuanto a la composición bioquímica de los distintos sublotes, en el cultivo 1 hay diferencias significativas entre éstos ($p<0,05$). La cantidad de proteínas es mayor en la clase mediana (12-14 mm) que en las otras dos clases. La cantidad de lípidos es mayor en la clase de talla más grande y hay mayor cantidad de carbohidratos en las clases de talla mayores (12-14 y 16-18 mm) con respecto a las más pequeñas (8-10 mm). En el cultivo 2 la composición bioquímica de la clase de talla 8-10 mm y 16-18 mm es la misma. En la clase de talla mediana (12-14 mm) hay mayor cantidad de proteínas y menor de lípidos con relación a las otras clases de talla.

El Índice de Condición aumenta en ambos cultivos al ir aumentando la talla de la semilla.

6.3.5 EXPERIENCIA DE CULTIVO INTEGRAL: CRIADERO, PREENGORDE Y ENGORDE

Se hizo el seguimiento de una puesta obtenida de forma controlada en el Centro de Cultivos de Ribadeo, preengordada en mesas en la playa de Maniños en Barallobre y engordada en la zona intermareal de la misma playa. El fin es obtener una estimación del tiempo necesario que se necesitaría para realizar el cultivo integral de esta especie, desde su fase en criadero hasta su engorde en el medio natural.

- **Reproductores.** A mediados del mes de febrero de 2006 se obtuvo un desove espontáneo de un lote de 260 progenitores de 38 mm de talla media que procedían del intermareal de una playa de Vilaxoán (Ría de Arousa). Los progenitores desovaron espontáneamente a su llegada al criadero. Se obtuvieron 2.000.000 de huevos de talla media 73 μm .

- **Larvario.** El desarrollo larvario duró 17 días alcanzando una talla de 235 μm y una supervivencia del 50%. En la figura 6.30 y en la tabla VI.16 se muestra la evolución del cultivo larvario en el criadero.

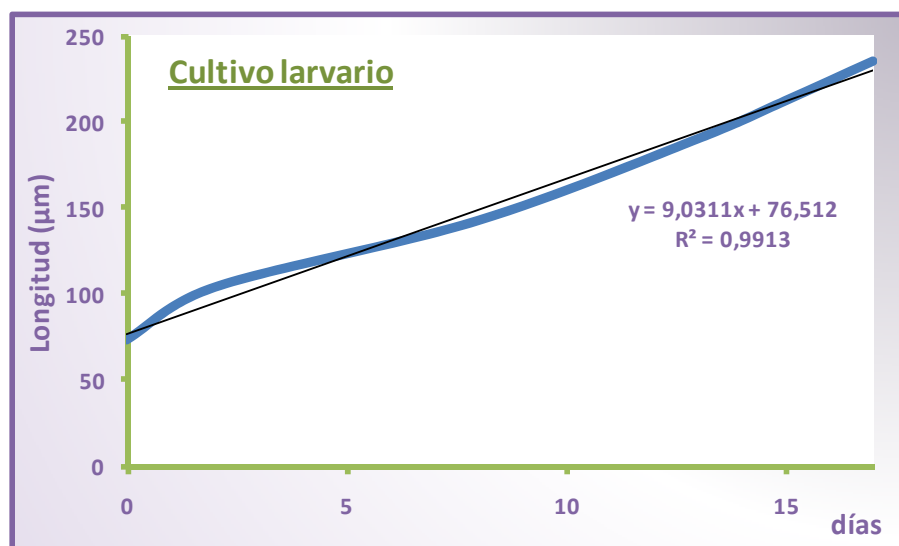


FIGURA 6.30: Evolución del desarrollo larvario en el criadero.

6. Cultivo en el medio natural

TABLA VI.16: Evolución del desarrollo larvario en el criadero.

	Huevo	Larva D	Umbonada	Pediveliger	Postlarva
Días	0	2	8	13	17
Tamaño	73±2,5 µm	103±5,2 µm	127±11,3 µm	190±22,5 µm	235±29,9 µm
Supervivencia	→				50%

- **Postlarvario.** En el desarrollo postlarvario hasta la obtención de semilla para preengorde, se obtuvo una supervivencia del 30% y a los 90 días de la puesta la semilla alcanzó una talla media de 4,70 mm, momento en el que se sacaron del criadero para su estabulación en el sistema de preengorde. En las figura 6.31 y en la tabla VI.17 se muestra la evolución del desove durante el desarrollo postlarvario.

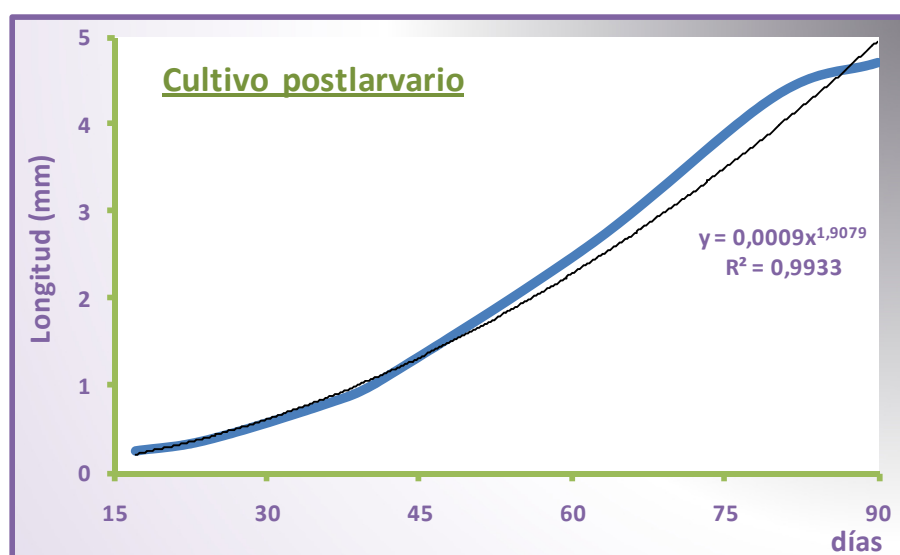


FIGURA 6.31: Evolución del desarrollo postlarvario.

TABLA VI.17: Evolución del desarrollo postlarvario en el criadero.

Días	17	24	36	41	62	90
Tamaño	235±29 µm	360±77 µm	786±76 µm	942±132 µm	2.360±428 µm	4.700±711 µm
Supervivencia	→					30%

- **Preengorde.** A finales de mayo se comenzó la fase de preengorde en Barallobre. Se partía de una semilla inicial de 4,70 mm y en 4 meses se llegó a una talla de 13,90 mm. La G_{L30} durante esta fase fue de 24,27 y la supervivencia fue del 83%. En la tabla VI.18 se muestran los datos y en la figura 6.32 la evolución del crecimiento durante el preengorde.

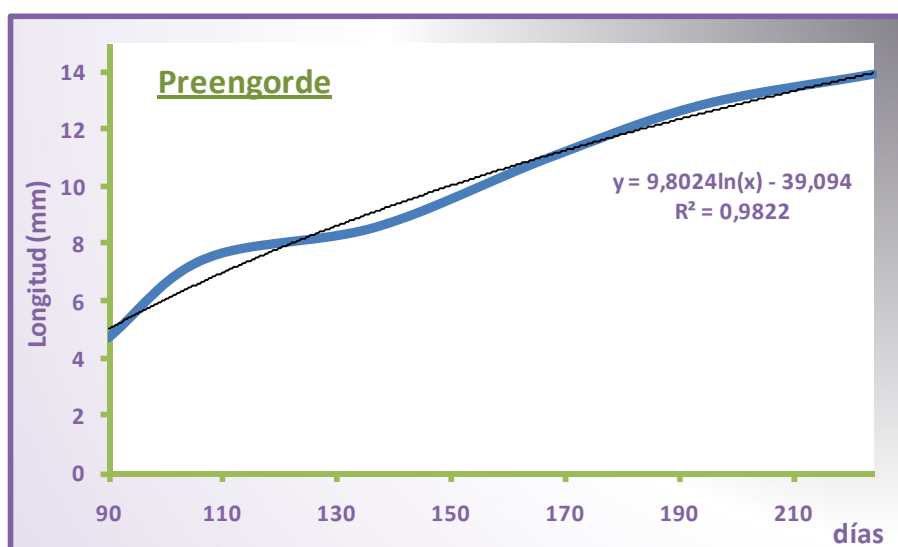


FIGURA 6.32: Crecimiento en longitud de la semilla durante la fase de preengorde.

TABLA VI.18: Crecimiento en longitud de la semilla durante la fase de preengorde.

	Talla Inicial (mm)	Talla Final (mm)	Peso Inicial (g)	Peso Final (g)	Días	G_{L30}	G_{W30}	Supervivencia
Preengorde	4,70±1,12	13,90±2,02	0,026	0,455	134	24,27	64,08	83%

- **Engorde.** En la fase de engorde, la semilla sembrada en el parque de cultivo con un tamaño medio de 13,90 mm alcanzó en 15 meses una talla media de 31,55 mm, con una G_{L30} de 5,59 y una supervivencia del 75%. Se ha estimado el tiempo que tardarían en llegar a la talla comercial (38 mm) en base a la tasa de crecimiento observada en esta fase de engorde, siendo de 18 meses.

En la tabla VI.19 se muestra el resumen de los datos obtenidos durante el engorde y en la figura 6.33 la evolución durante la fase de engorde.

TABLA VI.19: Tasa de crecimiento y supervivencia durante el engorde en Barallobre.

	Talla Inicial (mm)	Talla Final (mm)	Peso Inicial (g)	Peso Final (g)	Días	G_{L30}	G_{W30}	Supervivencia
Engorde	13,90±2,02	31,55±2,80	0,455	5,860	440	5,59	17,42	75%

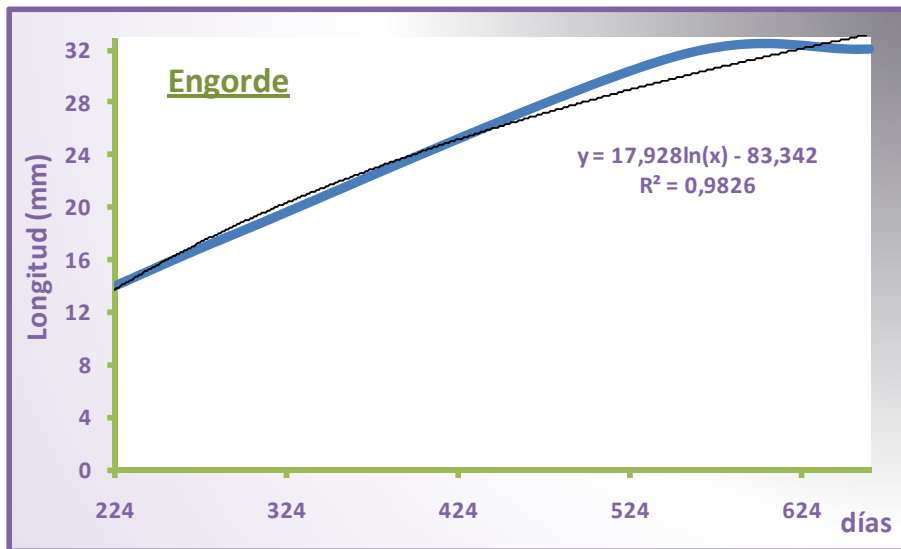


FIGURA 6.33: Crecimiento en longitud durante la fase de engorde.

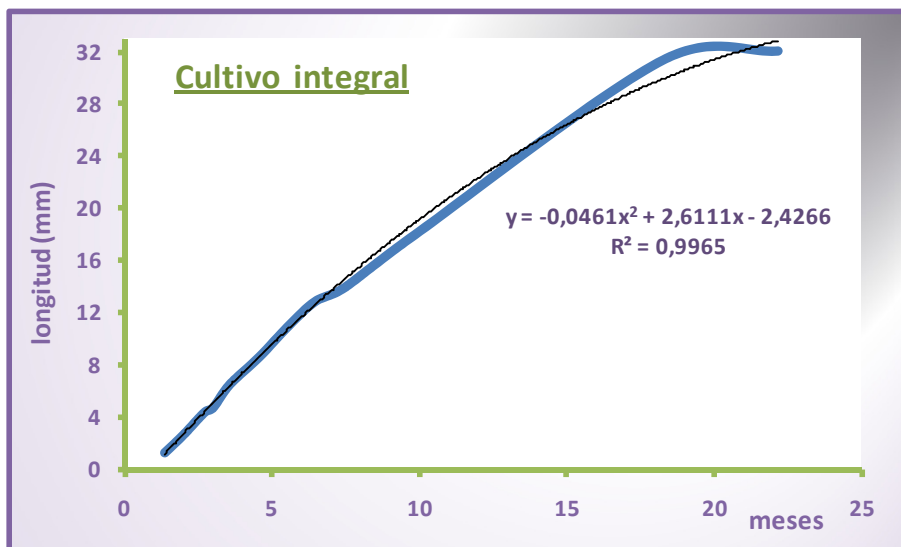


FIGURA 6.34: Evolución del desove desde su etapa en criadero hasta el preengorde y engorde en el medio natural.

En la figura 6.34 se muestra la evolución del desove desde su etapa en criadero, hasta el preengorde y engorde en el medio natural. La duración del cultivo integral de esta especie, en estas condiciones de cultivo, sería de 25 meses: 3 meses en criadero, 4 meses de preengorde en mesas en intermareal y 18 meses de engorde en un parque intermareal.

6.4 DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este trabajo confirman que **la ubicación más favorable para el preengorde de almeja babosa *Venerupis pullastra*, es la batea**. En todas las pruebas realizadas, en las que se utilizó el sistema de cultivo en minibolsas, **las mayores tasas de crecimiento se obtuvieron en los sistemas ubicados en la batea en relación con aquellos sistemas ubicados en zonas intermareales**. Además, **la mortalidad producida en los sistemas de minibolsas en la batea fue prácticamente nula** (entre 0 y 3,70%), mientras que **en intermareal la mortalidad registrada fue superior**, con valores entre 4,04 y 31,71%.

La diferencia de crecimiento entre las dos ubicaciones se debe a que en el intermareal el cultivo está sometido al régimen mareal, experimentando emersiones y como consecuencia parones de alimentación diarios, lo que se traduce en menores tasas de crecimiento que en la **batea**. En ésta, la estabilidad del medio es mayor, ya que la continua inmersión del sistema de cultivo hace que se produzca una **mayor disponibilidad del alimento y una mayor estabilidad de las condiciones ambientales**, lo que al final se traduce en una mejora del crecimiento. En el caso de la almeja babosa esta circunstancia es importante ya que desarrolla su vida natural de forma general en completa inmersión.

La temperatura óptima de crecimiento de la almeja babosa, estaría en torno a los 20°C (Albentosa *et al.*, 1994). En este trabajo se encontraron temperaturas de hasta 23°C en el sistema de preengorde en el intermareal durante el verano, mientras que en la batea, en esta misma época, no se sobrepasaron los 20°C.

El potencial de crecimiento en las dos ubicaciones varió dependiendo de la época de cultivo, ya que la temperatura y el alimento disponible ejercen una influencia directa en el crecimiento y desarrollo gametogénico de los moluscos bivalvos (Sastry, 1979 y Beninger y Lucas, 1984). **A finales de otoño y durante el invierno** la temperatura del agua de mar es baja y, a su vez, la disponibilidad de fitoplancton

también es menor, por lo que **la tasa de crecimiento se ralentiza** en cualquiera de las dos ubicaciones empleadas en nuestro caso. **Desde la primavera hasta principios del otoño, la tasa de crecimiento aumenta** coincidiendo con la subida de temperatura y la abundancia de fitoplancton.

Durante la primavera y verano, partiendo de una semilla de talla de 5 a 7 mm, se necesitan 2 meses en batea y 4 en intermareal para que la semilla alcance una talla entre 12-14 mm, que se considera óptima para efectuar las siembras en las zonas de engorde. Si la época de preengorde se realiza durante el otoño-invierno, la semilla precisa el doble de tiempo que en la primavera-verano para alcanzar la misma talla de siembra.

De entre las tres especies cultivadas en Galicia, la almeja babosa debido a su mayor metabolismo, es la que menos parón de crecimiento experimenta durante los meses de invierno y la que mayor tasa de crecimiento puede alcanzar. La almeja fina y japonesa presentan una tasa máxima semejante, diferenciándose en que la almeja japonesa ralentiza más tarde su crecimiento con la llegada del invierno e inicia más pronto el crecimiento post-invernal. Debido a su mayor tasa de crecimiento, la almeja babosa demanda menores densidades de cultivo en relación a las otras especies (García Fernández *et al.*, 2003).

Como se ve claramente, la tasa de crecimiento obtenida durante el preengorde, no sólo depende del sistema, la ubicación y la época de cultivo, sino que también de la densidad de cultivo y la talla inicial.

Dentro de los parámetros de cultivo la densidad es uno de los factores que más influencia tiene en el crecimiento y en la mortalidad; de tal forma que, a una densidad excesiva, el crecimiento puede llegar a detenerse y a producir altos porcentajes de mortalidad (Martínez *et al.*, 1997). En este trabajo **se obtuvieron los mejores resultados de crecimiento en las densidades más bajas** (0,89 kg/m²), obteniéndose doble tasa de crecimiento que a mayor densidad (3,58 kg/m²).

No obstante, **la densidad óptima** que admite un determinado sistema de cultivo **depende de diversos factores: la ubicación, la estación anual y la talla inicial de la semilla.**

Debido a las diferencias de crecimiento entre el intermareal y la batea, en el sistema de minibolsas empleado en este trabajo, **el crecimiento se mostró incluso más favorable a alta densidad en batea (3,58 kg/m²), que a densidad más baja en intermareal (0,89 kg/m²).**

Un cultivo admite densidades superiores en las épocas de menor crecimiento (otoño-invierno), mientras que en los meses de mayor crecimiento (primavera-verano) la densidad inicial puede llegar a cuadruplicarse en un mes. La periodicidad de las operaciones de desdoble y limpieza han de intensificarse en las épocas de mayor temperatura y con tallas más pequeñas. En líneas generales, con relación a las prácticas de manejo de la semilla, puede decirse que los desdobles deben realizarse cuando la biomasa estabulada en los sistemas de cultivo se duplica.

En cuanto a la talla inicial de la semilla, a menor tamaño la densidad utilizada debe ser menor, ya que al ser semilla de pequeño tamaño, el número de unidades que pueden introducirse en el sistema es más elevado.

Como hemos visto, **la ubicación, la estación anual y la talla inicial de la semilla, son factores importantes a la hora de escoger la densidad de cultivo; aunque ésta siempre dependerá de la disponibilidad de espacio, del sistema empleado y de la mano de obra necesaria.** En resumen, conviene tener en cuenta aquellos aspectos que pueden influir directamente en la rentabilidad del sistema de preengorde.

El preengorde realizado en las minibolsas de malla 1 mm para almeja de 3,8 mm, iniciado en la primavera en el sistema de minibolsas en batea, se ha demostrado viable, obteniéndose un buen crecimiento y no presentando problemas de mortalidad; indicando que es un sistema válido para el preengorde de semilla de tamaño muy pequeño. Una vez que alcanzan la talla adecuada, que en épocas

favorables de crecimiento puede ser del orden de 15/20 días, puede estabularse ya en mallas con luces de 2 mm y posteriormente de 3 mm, para seguir el proceso hasta el final de la etapa de preengorde, con resultados excelentes en cuanto a crecimiento y supervivencia. En un ensayo realizado por de Santiago *et al.* (2009) en un sistema de flujo forzado en Camariñas, la semilla de *V. pullastra* de una talla inicial de 3,3 mm alcanzaba en un período de 11 a 13 días una talla alrededor de 5 mm.

Los buenos resultados de supervivencia y crecimiento obtenidos con semilla de menor tamaño al habitual (retenida en tamiz 1,5-2 mm) permiten solucionar uno de los principales problemas en el cultivo de almeja, el paso del criadero al medio natural. A medida que la semilla crece en el criadero, aumentan las complicaciones de cultivarla en condiciones controladas. La biomasa se va multiplicando en poco tiempo de forma exponencial, lo que implica un considerable aumento en las necesidades de espacio, volumen de agua bombeada y producción de microalgas. Este sistema permite sacar del criadero almeja de pequeño tamaño (3-4 mm) para que se alimente directamente del mar, aumentando así la capacidad de producción de los criaderos.

Dados estos resultados de crecimiento de semilla durante el preengorde en batea mediante el sistema de minibolsas en jaulas, y utilizando una estrategia de entrada de diferentes partidas a lo largo del año, es perfectamente viable que en un vivero flotante de dimensiones normales con la instalación de unas 30 jaulas, pueda llevarse a cabo el preengorde de almeja babosa de una cantidad en torno a los 30/35 millones de unidades al año, partiendo de individuos alrededor de los 3 ó 4 mm de talla inicial (Cerviño, 2010).

En las tablas VI.20 y VI.21 se muestra una revisión los resultados obtenidos por otros autores en los sistemas de preengorde y engorde más comúnmente utilizados en Galicia.

TABLA VI.20: Comparación de los resultados obtenidos por otros autores en los diversos sistemas de preengorde ensayados con *V. pullastra*.
L1: Longitud inicial. L2: Longitud final. W1: Peso inicial. W2: Peso final. G_{L30} : Tasa de crecimiento mensual en longitud. G_{W30} : Tasa de crecimiento mensual en peso.

L1 (mm)	L2 (mm)	W1 (g)	W2 (g)	Meses	Fecha inicio	G_{L30}	G_{W30}	Sistema	Localización	Autor
4,7	13,9	0,026	0,45	4,5	Mayo 2006	24,3	64,1	Sacos intermareal	Barallobre	Este trabajo
7,8	15,0	0,078	0,514	1,5	Abril 2005	40,5	117,1	Minibolsas batea	Cambados	Este trabajo
	12,1		0,258	3,5		12,3	34,2	Minibolsas intermareal	O Grove	
6,30	13,6	0,047	0,373	2,6	Febrero 2006	29,6	79,3	Minibolsas batea	Cambados	Este trabajo
	10,4		0,182	3,8		13,2	35,4	Minibolsas intermareal	Vilaxoán	
-	-	86,6	225,32	1	Verano 2000	-	102,45	Cestillos en batea	Cambados	García Fernández <i>et al.</i> (2001)
5,0	15,0	-	-	3-4	Abril 1998	20,2	-	Sacos intermareal	Vilaxoán	Abellá <i>et al.</i> (2001)
5,8	12,9	0,025	0,269	4	Mayo 2007	19,8	59,4	Contenedores con flujo invertido	Camariñas	de Santiago <i>et al.</i> (2007)
	15,8		0,512			24,9	75,5			
7,1	10,6	0,058	0,186	2,3	Febrero 2006	17,2	49,9	Tambores de flujo invertido en efluente de piscifactoría (Insuíña)	O Grove	Guerra <i>et al.</i> (2007)
7,1	13,3	0,058	0,316	2,3	Febrero 2006	26,9	72,7	Tambores de flujo invertido en semillero tradicional (Remagro)	O Grove	Guerra <i>et al.</i> (2007)
10,4	24,8	-	-	3,3	Mayo 2006	26,3	-	Sistema de platillos en batea	Moaña	Pérez Corvacho y Pardo Vuelta (2007)
5,5	18,5	-	-	4	Mayo 2009	30,7	-	Sistema de platillos en batea	A Pobra do Caramiñal	Juan Manuel Paisal (Proameixa Fernández) Comunicación personal

TABLA VI.21: Comparación de los resultados obtenidos por otros autores en los diversos sistemas de engorde ensayados con *V. pullastra*.
 L1: Longitud inicial. L2: Longitud final. W1: Peso inicial. W2: Peso final. G_{L30} : Tasa de crecimiento mensual en longitud. G_{W30} : Tasa de crecimiento mensual en peso.

L1 (mm)	L2 (mm)	W1 (g)	W2 (g)	Meses	Fecha inicio	G_{L30}	G_{W30}	Sistema	Localización	Autor
13,9	31,5	0,450	5,860	14,5	Octubre 2006	5,6	17,4	Parque intermareal	Barallobre	Este trabajo
12,5	28	-	-	8	Abril 1996	4	-	Parque intermareal	Vilaxoán	de Coo <i>et al.</i> (1997)
12,8	35,5	-	-	17	Abril 2007	6,1	-	Parque intermareal	Carril	Santamaría <i>et al.</i> (2009)
9,2	31,6	0,120	6,024	12	Septiembre 2008	10,1	32,3	Parque intermareal	Vilaxoán	Otero <i>et al.</i> (2010)
15,0	38,0	-	-	13-16	Julio 1998	12,5-17,5	-	Parque submareal	Vilaxoán	Abellá <i>et al.</i> (2001)
8,0	38,1	-	-	11	-	13,8	-	Cajas con substrato en batea	A Pobra do Caramiñal	Parada (2007)
13,2	25,2	0,360	2,927	7	Abril 1996	9,4	30,4	Cajas sin substrato en batea	Noia	Rama Villar y Rey Méndez (1997)

Es difícil comparar los resultados obtenidos por otros autores ya que, las tasas de crecimiento obtenidas en cada uno de los sistemas, estarían influenciadas por la talla inicial y final de la semilla, o la época de inicio y duración del cultivo.

Aún así, se observa que los datos obtenidos de la tasa de crecimiento en el preengorde realizado en el intermareal, tanto en este trabajo como en el de Abellá *et al.* (2001), son inferiores a los obtenidos en los diversos sistemas realizados en completa inmersión: minibolsas (este trabajo), cestillos (García Fernández *et al.*, 2001), semillero tradicional y efluente de piscifactoría (Guerra *et al.*, 2007), contenedores de flujo forzado (de Santiago *et al.*, 2007) y sistema de platillos (Pérez Corvacho y Pardo Vuelta, 2007).

La tasa de crecimiento alcanzada en este trabajo en la fase de engorde en un parque intermareal de Barallobre, es parecida a la obtenida en un parque en Vilaxoán (de Coo *et al.*, 1997) y otro en Carril (Santamaría *et al.*, 2009), ambos también en intermareal. Estos resultados nos indican que se obtuvieron menores tasas de crecimiento que los obtenidos por diversos autores en submareal: Abellá *et al.* (2001) en un parque sumergido, Parada (2007) en cajas con substrato y Rama Villar y Rey Méndez (1997) en cajas sin substrato, ambos en batea. Igualmente, parecen confirmar que la fase de engorde, al igual que en el preengorde, se acorta si se realiza en un sistema permanentemente sumergido. **En un parque intermareal se necesitarían** alrededor de 18 meses de engorde, mientras que la talla comercial **en un sistema submareal se alcanzaría a los 12 meses** desde la finalización del preengorde.

En base a los resultados obtenidos en este trabajo y a los de otros autores, se estima que **el cultivo integral de esta especie**, desde la obtención del desove hasta la talla comercial, **se podría completar en 18 meses si se realiza el preengorde en un sistema en suspensión durante la primavera-verano, y se completa con el engorde en un sistema también sumergido. Si el preengorde y engorde se realizan en sistemas intermareales, el tiempo de cultivo aumentaría hasta los 26 meses.**

Los parásitos y simbioses observados en la semilla ya habían sido descritos en individuos adultos de los bancos naturales de las costas gallegas (Figueras *et al.*, 1992; López, 1995; Villalba *et al.*, 1993b y Ordás *et al.*, 2001).

Ninguno de los parásitos detectados en la semilla tiene importancia patológica. En este trabajo no se encontró ningún individuo afectado por *Perkinsus* sp.; al igual que Villalba *et al.* (2005) que tampoco observaron en un banco natural gallego individuos de *V. pullastra* menores de 20 mm de longitud infectados por *Perkinus* sp.; uno de los organismos más patógenos asociados con grandes mortalidades de individuos adultos en Galicia (Casas, 2001). En el trabajo realizado por Carballal *et al.* (2007) con semilla de *R. philippinarum* preengordada en Galicia, encontraron que la semilla que inicialmente sólo presentaba ciliados en branquia y glándula digestiva, al finalizar el preengorde, entre un 10 y un 20% estaba afectada por *Perkinus olseni*.

Con relación a los sistemas de cultivo **las almejas preengordadas en batea están menos parasitadas que las del intermareal**, ya que éstas finalizan el preengorde antes y por lo tanto **pasan menos tiempo en el sistema**. Dependiendo de la época del año en que se realice el preengorde también hay diferencias, así **las almejas que se preengordaron en verano estaban más parasitadas que las de primavera**, probablemente debido a la mayor presencia de parásitos en el medio en los meses de verano. Las almejas del preengorde de otoño de 2004 acabaron también más parasitadas que en primavera, seguramente debido a que el preengorde duró el doble de tiempo que en la primavera.

Las diversas partidas de semilla que se colocaron tanto en la batea como en intermareal para proceder a la fase de preengorde **presentaron un cierto nivel de diferenciación sexual, indicando que ésta se inició previamente en el criadero**. La mayoría de los individuos al iniciar esta etapa de preengorde en el medio natural, con tallas comprendidas entre 6,8 y 8,6 mm, se encontraban en estadio de inicio de gametogénesis; aunque también se encontraban individuos en estadio de reposo, en gametogénesis avanzada y en madurez. La talla mínima en la que se detectó el inicio de la gametogénesis dentro de estas partidas fue de 4,9 mm.

A lo largo de la fase de preengorde la semilla fue avanzando dentro de su ciclo reproductivo, encontrándose al finalizar ésta mayor porcentaje de individuos en madurez que al inicio. Con los datos obtenidos en este trabajo, se puede afirmar que la almeja babosa nacida en criadero en el invierno, madura sexualmente durante el preengorde en primavera, observando individuos de 6 meses de edad con una gónada totalmente desarrollada.

Este resultado coincide con Jara Jara (1995), quien en un estudio de maduración de la semilla durante la fase de preengorde en efluente de piscifactoría, encontró individuos de 170 días de edad y 11,5 mm de longitud con una estructura gonadal desarrollada y con algunos gametos maduros.

Todos estos resultados se refieren a semilla cultivada en criadero y preengordada en un tipo específico de sistema; por lo que estos datos nunca deben ser extrapolables a las poblaciones naturales. Éstas se encuentran sometidas a condiciones ambientales diferentes, ubicadas en diversas zonas y sometidas a un régimen de explotación en particular.

En un estudio realizado sobre la reproducción de esta especie en el medio natural, Pérez Camacho (1980) afirma que el desarrollo sexual de la almeja babosa es muy precoz. Los ejemplares nacidos en primavera se desarrollarían sexualmente durante el invierno, realizando su primera puesta en la siguiente primavera, con un año de vida y aproximadamente 30 mm de longitud.

En este trabajo se confirma la **existencia de un crecimiento diferencial entre hembras y machos en los primeros estadios de vida, de modo que las hembras alcanzan porcentajes mayoritarios en las cabezas de las puestas** de almeja babosa producidas en criadero. De acuerdo con las técnicas de tamizado usualmente utilizadas en los criaderos industriales, se puede considerar que el punto en el que el crecimiento diferencial se manifiesta como consecuencia de las operaciones de tamizado suele ser a partir del tamaño T2 (3-4 mm), y que **este crecimiento diferencial se mantiene mientras las hembras de las cabezas van alcanzando la maduración sexual. A partir**

de este momento reducen su tasa de crecimiento, por lo que las diferencias de talla y peso entre las cabezas (mayoritariamente hembras) y las colas (compuestas por machos) se va reduciendo.

Esta fase de crecimiento diferencial y los resultados obtenidos hasta este momento plantean diversas cuestiones. Previamente, habría que tener en cuenta este fenómeno a la hora de validar ensayos comparados entre partidas de semilla que se desconozca su composición sexual. Por otro lado, si las hembras mantuvieran su ventaja en talla sobre los machos, abriría nuevas expectativas en los métodos y tecnologías de engorde de estos moluscos bivalvos. Del mismo modo obligaría a replantear ciertas prácticas habituales de desechar las colas de menor crecimiento en los criaderos y plantas de preengorde; ante estos datos, podrían ser la mayor parte de la dotación de machos de una puesta.

Este crecimiento diferencial podría suceder en otras especies, ya que en un estudio de la reproducción de *Ruditapes decussatus* durante el crecimiento de un lote de semilla procedente de criadero en un parque de cultivo, Rodríguez Moscoso (2000) encontró un porcentaje de hembras notablemente superior (80,3%) al de machos (12,5%), apuntando a que podía ser debido al efecto fundador de la semilla.

Por todo ello, habría que realizar una valoración de las repoblaciones que se llevan a cabo con semilla de criadero y su efecto en la composición sexual de la población general de la zona repoblada.

El componente bioquímico mayoritario de la semilla (de entre 8 y 18 mm) analizada en este trabajo, es al igual que en los individuos adultos, las proteínas. Durante esta etapa la semilla tiene un crecimiento exponencial, por lo que ésta es **indispensable para la generación de nuevas estructuras.** En un estudio realizado con semilla de almeja babosa y japonesa cultivada en varios sistemas de preengorde (semillero tradicional y efluente de piscifactoría), Guerra *et al.* (2007) también encontraron que la proteína es el componente mayoritario de la semilla.

La cantidad de los otros dos componentes, lípidos y carbohidratos (5-6% y 7-9%, respectivamente), es menor que en los individuos adultos, a pesar de que la semilla de almeja analizada estaba en la fase de desarrollo gametogénico y madurez, época en la que los individuos adultos poseen mayor cantidad de estos dos componentes. Todo ello podría indicar que el efecto de la reproducción no incidió en los resultados de la composición bioquímica de la semilla; indicando que ésta no acumuló reservas y la gametogénesis se desarrolló a expensas de la alimentación diaria aportada al cultivo. La semilla analizada en este trabajo fue durante todo el momento alimentada con fitoplancton cultivado.

7. CONCLUSIONES



7. CONCLUSIONES

Ciclo reproductivo de *Venerupis pullastra* en el medio natural:

1.- La característica principal es la presencia de gametos maduros durante todo el año. Esto es debido a que posee un gran período de madurez y puesta, abarcando principalmente los meses desde febrero a julio, a la ausencia de un período de reposo, a la asincronía folicular dentro de un mismo individuo y a la heterogeneidad de estadios dentro de un mismo muestreo.

2.- La cantidad de glucógeno y lípidos en gónada aumenta en los meses de verano y otoño coincidiendo con la gametogénesis, disminuyendo en invierno y primavera durante la época de máxima madurez. La evolución de las proteínas en gónada es inversa a la del resto de componentes. La cantidad de proteínas y de lípidos totales en el resto del individuo, no presenta ninguna relación con la evolución del ciclo gametogénico. En cuanto al glucógeno, presenta una evolución paralela en la gónada y en el resto del individuo.

3.- Las tres poblaciones estudiadas presentan un patrón de desarrollo similar. Las mayores diferencias se dan entre las dos poblaciones de O Grove, ya que en la del banco intermareal el número de individuos en madurez durante todo el año, es menor que en la submareal. Destaca también la mayor prevalencia de *Perkinsus olseni* en la zona intermareal de O Grove con relación a las zonas submareales.

Desarrollo embrionario y larvario de *V. pullastra*:

4.- El estudio del desarrollo embrionario mediante microscopía electrónica, permite observar que la invaginación de la glándula de la concha se desarrolla en el estadio de gástrula y que en la trocófora se observa como una hendidura abierta en la parte dorsal, a partir de la cual se secreta el periostraco. Treinta horas después de la fertilización, éste acaba envolviendo las partes blandas de la larva formando la larva D,

7. Conclusiones

aunque tendrán que pasar cuarenta y ocho horas tras la fecundación para que las valvas estén totalmente calcificadas.

5.- En la postlarva, además de la prodisoconcha I de aspecto punteado y la prodisoconcha II con anillos concéntricos, se distingue la disoconcha, con unas líneas de crecimiento más marcadas y, a diferencia de otros bivalvos, la presencia de microvellosidades.

Protocolo de cultivo de *V. pullastra* en criadero:

6.- Se pueden recoger reproductores en cualquier banco natural gallego y estación del año. La calidad de las puestas no está relacionada con los valores del Índice de Condición, la composición bioquímica y el índice de madurez de los distintos lotes usados como reproductores.

7.- Un método efectivo para la inducción a la puesta es la estimulación con choques térmicos, con una temperatura mínima de 12°C y máxima de 20°C. Se pueden mantener los reproductores acondicionados en el criadero, durante un mes o más, para obtener varias puestas de un mismo lote, no mermando la calidad de las mismas.

8.- El cultivo larvario comienza 48 h después de la puesta y finaliza aproximadamente a los 18 días, con un crecimiento medio diario entre 7-8 µm/día y una supervivencia media del 56%. A los 25 días del inicio del cultivo finaliza la metamorfosis y las postlarvas de unos 40 días, con una supervivencia del 49% desde la fijación, presentan un talla de 600-700 µm. Estos resultados se consiguen con una temperatura de cultivo de 18±1°C y una dieta mixta a base de diatomeas y flagelados.

Cultivo de *V. pullastra* en el medio natural:

9.- El preengorde en el medio natural se muestra viable con semilla a partir de 3,5 mm de longitud retenida en tamiz de 2 mm. Los resultados son distintos según los sistemas y la ubicación; así, se obtuvieron mayores tasas de crecimiento en el sistema ubicado en batea que en el mismo sistema en la zona intermareal. Durante el invierno

la tasa de crecimiento se ralentiza, necesitando el doble de tiempo que en el resto del año para alcanzar la misma talla de siembra. En batea las almejas finalizan el preengorde menos parasitadas que las del intermareal.

10.- Las diversas partidas de semilla utilizadas en la fase de preengorde presentaron un cierto nivel de diferenciación sexual, indicando que ésta se inició en el criadero. La almeja babosa nacida en criadero en el invierno, madura sexualmente durante el preengorde en primavera, observando individuos de 6 meses de edad con una gónada totalmente desarrollada.

11.- Existe un crecimiento diferencial en los primeros estadios de vida, alcanzando las hembras mayores porcentajes en las cabezas de las puestas. El punto en el que el crecimiento diferencial se manifiesta suele ser a partir del tamaño T2 (3-4 mm) y se mantiene hasta que las hembras reducen su tasa de crecimiento, por lo que las diferencias de talla y peso entre las cabezas (mayoritariamente hembras) y las colas (compuestas por machos) al final del preengorde se va reduciendo.

12.- El cultivo integral de esta especie, desde la obtención del desove hasta la talla comercial, realizando el preengorde y engorde en un sistema intermareal, se completaría en 26 meses. En condiciones óptimas, es decir si se comienza el preengorde en primavera en un sistema en suspensión y se realiza el engorde también en suspensión, el tiempo de cultivo sería de 18 meses.

8. BIBLIOGRAFÍA



8. BIBLIOGRAFÍA

- ABELLÁ, E.; MARTÍNEZ, M.; SEBE, M.P.; ALCALDE, A.; MOSQUERA, P. y PARADA, J.M. 2001. Experiencia de cultivo de almeja babosa (*Venerupis pullastra*): preengorde y engorde en la Ría de Arousa, Galicia. Monografías del Instituto Canario de Ciencias Marinas. 4: 118-123.
- ACKMAN, R.G. 1989. Fatty acids. En: Ackman, R.G (ed). Marine biogenic lipids, fats and oils. CRC Press, Florida. 1: 103-138.
- ADACHI, K. 1979. Seasonal changes of the protein level in the adductor muscle of the clam, *Tapes philippinarum* (Adams and Reeve, 1850) with reference to the reproductive seasons. Comp. Biochem. Physiol. 64A: 85-89.
- AGUIRRE, P. 1973. Guía del mariscador. Plan marisquero de Galicia (ed).
- ALBENTOSA, M.; BEIRAS, R. y PÉREZ CAMACHO, A. 1994. Determination of optimal thermal conditions for growth of clam (*Venerupis pullastra*) seed. Aquaculture. 126: 315-326.
- ÁLVAREZ FARIÑA, P. 2005. Dinámica reproductora de dos especies de almejas autóctonas de las Rías Gallegas, *Venerupis aurea* (Gmelin, 1790) y *Venerupis pullastra* (Montagu, 1803); estudio histológico, histoquímico y estereológico. Tesis doctoral. Univ. de Santiago de Compostela.
- ÁLVAREZ SEOANE, G. 1960. Variación estacional de la composición química de la almeja babosa *Tapes pullastra* Mont. Inv. Pesq. 18: 3-32.
- ANDRÉ, C.; LINDERGARTH, M.; JONSSON, P.R. y SUNDBERG, P. 1999. Species identification of bivalve larvae using random amplified polymorphic DNA (RAPD): differentiation between *Cerastoderma edule* and *C. lamarcki*. J. Mar. Biol. Ass. U.K. 79: 563-565.
- ANSELL, A.D.; LOOSMORE, F.A. y LANDER, K.F. 1964. Studies on the hard-shell clam, *Venus mercenaria*, in the British waters. Vol II. Seasonal cycle in condition and biochemical composition. J. Appl. Ecol. 1: 83-95.
- ARANDA, J.A. 2010. Desarrollo embrionario y larvario de almeja fina, *Ruditapes decussatus* (Linné, 1758): estudio al microscopio óptico y electrónico de barrido. Trabajo Fin de Master. Univ. de Santiago de Compostela.
- ARANDA, J.A.; OJEA, J.; NÓVOA, S. y MARTÍNEZ PATIÑO, D. 2009. Primeros datos de la calidad de las puestas, en relación al estado de los reproductores de dos especies de almejas: *Ruditapes decussatus* y *Ruditapes philippinarum*. Foro Ac. Rec. Mar. Rías Galegas. 12: 617-624.

8. Bibliografía

- AVENDAÑO, M. y LE PENNEC, M. 1997. Intraspecific variation in gametogenesis in two populations of the Chilean molluscan bivalve, *Argopecten purpuratus* (Lamarck). *Aquaculture Res.* 28: 175-182.
- BARBER, B.J. y BLAKE, N.B. 1991. Reproductive Physiology. En: *Scallops: Biology, Ecology and Aquaculture, Developments in Aquaculture and Fisheries Science.* Elsevier, Amsterdam. 21: 377-428.
- BAYNE, B.L. 1965. Growth and delay of metamorphosis of the larvae of *Mytilus edulis* (L). *Ophelia.* 2: 1-47.
- BAYNE, B.L. 1983. The physiological ecology of marine molluscan larvae. En: Verdonk, N.H.; Van den Biggelaar, J.A.M. and Tompa, A.S. (ed). *The Mollusca.* Vol. 3. Development. Academic Press, Nueva York, USA.
- BAYNE, B.L.; GABBOT, P.A. y WIDDOWS, J. 1975. Some effects of stress in the adults on the eggs and larvae of *Mytilus edulis*. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 675-689.
- BELLOLIO, G.; LOHRMANN, K. y DUPRÉ, E. 1993. Larval morphology of the scallop *Argopecten purpuratus* as revealed by scanning electron microscopy. *The Veliger.* 36: 332-342.
- BENINGER, P.G. y LUCAS, A. 1984. Seasonal variations in condition, reproductive activity and gross biochemical composition of two species of adult clam reared in a common habitat: *Tapes decussatus* L. (Jeffreys) and *Tapes philippinarum* (Adams and Reeve). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 79: 19-37.
- BESNARD, J.Y.; LUBET, P. y NOUVELOT, A. 1989. Seasonal variations of the fatty acid contents of the neutral lipids and phospholipids in the female gonad of *Pecten maximus* L. *Comp. Biochem. Physiol.* 93B(1): 21-26.
- BORRERO, F.J. 1987. Tidal height and gametogenesis: reproduction variation among populations of *Geukensia demissa*. *Biol. Bull.* 173: 160-168.
- BOUCHET, P. y ROCROI. 2010. Nomenclator of Bivalve Families; with a classification of bivalve families by R. Bieler, J. G. Carter and E. V. Coan. *Malacologia.* 52(2): 1-184.
- BREESE, W.P. y ROBINSON, A. 1981. Razor clams, *Siliqua patula* (Dixon): Gonadal development, induced spawning and larval rearing. *Aquaculture.* 22: 27-33.
- CANNUEL, R.; BENINGER, P.G.; McCOMBIE, H. y BOUDRY, P. 2009. Gill development and its functional and evolutionary implications in the Blue Mussel *Mytilus edulis* (Bivalvia: Mytilidae). *Biol. Bull.* 217: 173-188.

- CARBALLAL, M.J.; LÓPEZ, C.; CERVIÑO OTERO, A. y MARTÍNEZ PATIÑO, D. 2006. Pathological analysis of seed clam *Ruditapes decussatus*, *Venerupis pullastra* and *Ruditapes philippinarum* pre-fattening in the Ría de Arousa (Spain). Congreso Internacional de Acuicultura AQUA2006. Florencia. Italia. 136.
- CARBALLAL, M.J.; CERVIÑO OTERO, A. y MARTÍNEZ PATIÑO, D. 2007. Parasites and gonad development in clams pre-fattened in three different systems. Congreso Internacional de Acuicultura AQUA2007. Estambul. Turquía. 100.
- CASAS, S.M. 2001. Estudio de la Perkinsosis en la almeja fina, *Tapes decussatus* (Linnaeus, 1758), de Galicia. Tesis doctoral. Univ. de Santiago de Compostela.
- CASAS, S.M.; VILLALBA, A. y REECE, K.S. 2002. Study of Perkinsosis in the carpet shell clam *Tapes decussatus* in Galicia (NW Spain). I. Identification of the aetiological agent and *in vitro* modulation of zoosporulation by temperature and salinity. Dis. Aquat. Org. 50: 51-65.
- CASSE, N.; DEVAUCHELLE, N. y LE PENNEC, M. 1998. Embryonic shell formation in the Scallop *Pecten maximus* (Linnaeus). The Veliger. 41: 133-141.
- CERVIÑO, A. 1996. Programa de desarrollo productivo, económico, profesional y organizativo del marisqueo a pie. Xunta de Galicia.
- CERVIÑO, A. 2010. Preengorde de semilla de almeja. En: Guerra, A. (ed). Jornadas sobre criaderos, semilleros y cultivos de semilla. 43-51.
- CERVIÑO, A.; GUERRERO, S. y ASKEW, C. 1989. Over-wintering of *Venerupis decussata* in Ría de Arousa. Galicia. EAS Special Publication. 10: 59-60.
- CHÁVEZ VILLALBA, J.; POMMIER, J.; ANDRIAMISEZA, J.; POUVREAU, S.; BARRET, J.; COCHARD, J.C. y LE PENNEC, M. 2002. Broodstock conditioning of the oyster *Crassostrea gigas*: origin and temperature effect. Aquaculture. 214: 115-130.
- COFFROTH, M.A. y MULAWKA III, J.M. 1995. Identification of marine invertebrate larvae by means of PCR-RAPD species-specific markers. Limnol. Oceanogr. 40: 181-189.
- CRAGG, S.M. 1985. The adductor and retractor muscles of veliger of *Pecten maximus* (Bivalvia: Pectinidae). J. Moll. Stud. 51: 276-283.
- CRAGG, S.M. 1989. The ciliated rim of the velum of larvae of *Pecten maximus* (Bivalvia: Pectinidae). J. Moll. Stud. 55: 492-508.
- CRESPO, C.A. 1989. Histofisiología de las reservas bioenergéticas del manto de *Mytilus galloprovincialis* Lmk. Tesis doctoral. Univ. de Santiago de Compostela.

8. Bibliografía

- DA COSTA, F. 2009. Optimización del cultivo en criadero de navaja (*Ensis arcuatus* Jeffreys, 1865), longueirón (*E. siliqua* Linneo, 1758) y longueirón vello (*Solen marginatus* Pennánt, 1777): composición bioquímica y de ácidos grasos en los desarrollos larvarios. Tesis doctoral. Univ. de Santiago de Compostela.
- DA COSTA, F.; NÓVOA, S.; OJEA, J. y MARTÍNEZ PATIÑO, D. 2005. Acondicionamiento del solénido *Ensis arcuatus* en 2 regímenes de temperatura: relación con las proteínas y el glucógeno. Actas del X Congreso Nacional de Acuicultura. Gandía. 608-609.
- DA COSTA, F.; DARRIBA, S. y MARTÍNEZ PATIÑO, D. 2008. Embryonic and larval development of *Ensis arcuatus* (Jeffreys, 1865) (Bivalvia: Pharidae). J. Moll. Stud. 74: 103-109.
- DA COSTA, F. y MARTÍNEZ PATIÑO, D. 2009. Culture potential of the razor clam *Solen marginatus* (Pennánt, 1777). Aquaculture. 288: 57-64.
- DA COSTA, F.; DARRIBA, S.; MARTÍNEZ PATIÑO, D. y GUERRA, A. 2010a. Culture possibilities of the razor clam *Ensis arcuatus* (Pharidae: Bivalvia). Aquaculture Res. doi: 10.1111/j.1365-2109.2010.02747.x
- DA COSTA, F.; MARTÍNEZ PATIÑO, D.; OJEA, J. y NÓVOA, S. 2010b. Larval rearing and spat production of the razor clam *Ensis siliqua* (Bivalvia: Pharidae). J. Shellfish Res. 29(2): 347-351.
- DARRIBA, S. 2001. Biología de la navaja (*Ensis arcuatus* Jeffreys, 1865) de la Ría de Vigo (N.O. de España): Crecimiento y Reproducción. Tesis Doctoral. Univ. de Vigo.
- DAVIS, H.C. 1953. On the food and feeding of the larvae of the american oyster *Crassostrea virginica*. Biol. Bull., Woods Hole. 104: 334-350.
- DAVIS, H.C. y CHANLEY, P.E. 1956. Spawning and egg production of oysters and clams. Biol. Bull. 110: 117-128.
- DE COO, A. 2008. Revisión a dez anos de marisqueo. Foro Ac. Rec. Mar. Rías Galegas. 10: 41-128.
- DE COO, A.; CERVIÑO, A.; GARCÍA, A.; MARTÍNEZ, M.; ALCALDE, A.; MARTÍNEZ, A.; FARIÑA, J.; MOSQUERA, P.; RODRÍGUEZ, R. y CASAL, A. 1997. Primeiros datos do cultivo de ameixa babosa (*Venerupis pullastra*) nas praias de Vilanova (Ría de Arousa). Xornadas sobre o Desenvolvemento Produtivo do Marisqueo a Pé. Santiago de Compostela.
- DELGADO, M. 2001. Maduración sexual en *Ruditapes decussatus* (L.): implicaciones energéticas y bioquímicas. Tesis Doctoral. Univ. de Santiago de Compostela.

- DEMERS, A.; LAGADEUC, Y.; DODSON, J.J. y LEMIEUX, R. 1993. Immunofluorescence identification of early life history stages of scallops (Pectinidae). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 97: 83-89.
- DE SANTIAGO, J.A.; ANDRÉS, M.C. y GUERRA, A. 2007. Preengorde de almeja babosa *Venerupis pullastra* (Montagu, 1803), mediante un sistema de flujo invertido forzado por "air lift", en la Ría de Camariñas (A Coruña). *Actas del XI Congreso Nacional de Acuicultura*. Vigo. 423-426.
- DE SANTIAGO, J.A.; POUSO, O.; GRAÑA, L.; LAMPÓN, V.; POMBAL, M. y GUERRA, A. 2009. Sistema de bandejas, aplicado al preengorde de almeja babosa *Venerupis pullastra* (Montagu, 1803), en un sistema de flujo invertido por "air lift", en la Ría de Camariñas (A Coruña). *Foro Ac. Rec. Mar. Rías Galegas*. 11: 589-596.
- DEVAUCHELLE, N. y MINGANT, C. 1991. Review of the reproductive physiology of the scallop, *Pecten maximus*, applicable to intensive aquaculture. *Aquat. Living Resour.* 4: 41-51.
- DINAMANI, P. 1973. Embryonic and larval development in the New Zealand rock oyster, *Crassostrea glomerata* Gould. *The Veliger*. 154: 295-299.
- DORANGE, G.; PAULET, Y.; LE PENNEC, M. y COCHARD, J. 1989. Critères histologiques d'évaluation de la qualité des ovocytes émis par *Pecten maximus* (Mollusque Bivalve). *C. R. Acad. Sci. Paris*. 309: 113-120.
- DRUMMOND, L.; MULCAHY, M. y CULLOTY, S. 2006. The reproductive biology of the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, from the North-West of Ireland. *Aquaculture*. 254: 256-340.
- ELSTON, R.A. 1980. Functional anatomy, histology and ultrastructure of the soft tissues of the larval american oyster *Crassostrea virginica*. *Proc. Nat. Shellfish. Ass.* 70: 65-93.
- ELSTON, R.A. 1999. Anatomy of metamorphosis. En: Browdy, C.L. (ed). *Health management, development and histology of seed oysters*. World Aquaculture Society. Baton Rouge, Louisiana, USA. 19-22.
- EPIFANIO, C.E. 1976. Culture of bivalve molluscs in recirculating systems: Nutrition. En: Price, K.S.; Shaw, W. y Dunberg, K. (ed). *Proceedings 1st International Conference on Aquaculture Nutrition*. Newark, Delaware, USA. 173-194.
- EVERSOLE, A.G. 2001. Reproduction in *Mercenaria mercenaria*. En: Kraeuter, J.N. y Castagna M. (ed). *The Biology of the hard clam*. Elsevier. 31: 221-260.

8. Bibliografía

- EVERSOLE, A.G.; MICHENER, W.K. y ELDRIDGE, P.J. 1980. Reproductive cycle of *Mercenaria mercenaria* in a South Carolina estuary. Proc. Natl. Shellfish. Assoc. 70: 20-30.
- EVSEEV, G.A.; KOLOTUKHINA, N.K. y SEMENIKHINA, O.Y. 2001. Shell morphogenesis of several venerid bivalves. J. Shellfish Res. 20: 1279-1284.
- FABIOUX, C.; HUVET, A.; LE SOUCHU, P.; LE PENNEC, M. y POUVREAU, S. 2005. Temperature and photoperiod drive *Crassostrea gigas* reproductive internal clock. Aquaculture. 250: 458-470.
- FERNÁNDEZ REIRIZ, M.J.; PÉREZ CAMACHO, A.; PETEIRO, L.G. y LABARTA, U. 2011. Growth and kinetics of lipids and fatty acids of the clam *Venerupis pullastra* during larval development and postlarvae. Aquaculture Nutr. 17: 13-23.
- FIGUERAS, A. 1957. Moluscos de las playas de la ría de Vigo. II. Crecimiento y reproducción. Inv. Pesq. 7: 49-97.
- FIGUERAS, A.; ROBLEDO, J.A.F. y NÓVOA, B. 1992. Occurrence of haplosporidian and *Perkinsus*-like infections in carpet-shell clams, *Ruditapes decussatus* (Linnaeus, 1758), of the Ría de Vigo (Galicia, NW Spain). J. Shellfish Res. 11: 377-382.
- FOLCH, J.; LEES, M. y STANLEY, G.H. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from the animals tissues. J. Biol. Chem. 226: 497-509.
- FRAGA, F. 1956. Determinación de glucógeno en moluscos con el reactivo de la antrona. Inv. Pesq. VII: 49-97.
- FRANZ, D.R. 1996. Size and age at first reproduction of the ribbed mussel *Geukensia demissa* (Dillwyn) in relation to shore level in a New York salt marsh. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 205: 1-13.
- FULLER, C.S. y LUTZ, R.A. 1989. Shell morphology of larval and post-larval mytilids from the north-western Atlantic. J. Mar. Biol. Ass. U.K. 69: 181-218.
- GABBOTT, P.A. 1975. Storage cycle in marine bivalve molluscs: a hypothesis concerning the relationships between glucogen metabolism and gametogenesis. En: Proceedings of the 9th European Marine Biology Symposium, Oban, Scotland. Aberdeen Univ. Press. 191-211.
- GABBOTT, P.A. 1983. Development and seasonal metabolic activities in marine mollusca. En: Hochachka, P.W. (ed). The Mollusca. Vol. 2. Environmental biochemistry and physiology. Academic Press, New York. 165-219.
- GABBOTT, P.A. y BAYNE, B.L. 1973. Biochemical effects of temperature and nutritive stress on *Mytilus edulis* L. J. Mar. Biol. Ass. U.K. 53: 269-286.

- GALLAGER, S.M. y MANN, R. 1986. Growth and survival of larvae of *Mercenaria mercenaria* (L.) and *Crassostrea virginica* (Gmelin) relative to broodstock conditioning and lipid content eggs. *Aquaculture*. 56: 105-121.
- GALTSOFF, P.S. 1930. The fecundity of the oyster. *Science*. 72: 97-98.
- GARCÍA FERNÁNDEZ, A.; DE COO MARTÍN, A.; CERVIÑO EIROA, A.; BAO IGLESIAS, M. y DOMÍNGUEZ, M. 2001. Primeros resultados de crecimiento de semilla de moluscos en batea con circulación de agua por sistema forzado en la Ría de Arousa. Galicia. España. Actas del VIII Congreso Nacional de Acuicultura. Santander. 302-303.
- GARCÍA FERNÁNDEZ, A.; CERVIÑO EIROA, A.; DE COO MARTÍN, A.; BAO IGLESIAS, M. y DOMÍNGUEZ, M. 2003. Tasa de crecimiento y mortalidad en el preengorde de la almeja fina, *Ruditapes decussatus* (Linné, 1758), la almeja babosa, *Venerupis pullastra* (Montagu, 1803) y la almeja japonesa, *Ruditapes philippinarum* (Adams y Reeve, 1850), en batea en las Rías Bajas de Galicia. Su relación con las densidades de cultivo y las operaciones de manejo. Actas del IX Congreso Nacional de Acuicultura. Cádiz. 211-213.
- GARLAND, E.D. y ZIMMER, C.A. 2002. Techniques for the identification of bivalve larvae. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 225: 299-310.
- GIESE, A.C. 1966. Lipids in Economy of Marine Invertebrates. *Physiol. Rev.* 46: 244-298.
- GIESE, A.C. 1967. Some methods for study of the biochemical constitution of marine invertebrates. *Oceanog. Mar. Ann. Rev.* 5: 159-186.
- GIMENO, S.; SARASQUETE, M.C. y GONZÁLEZ DE CANALES, M.L. 1990. Histoquímica de proteínas y carbohidratos en la gónada de *Ruditapes philippinarum* (Adams y Reeve, 1850) durante la gametogénesis. *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.* 6(1): 81-86.
- GLEMAREC, M. y BOURON, D. 1978. Evolution de la maturité sexuelle chez six espèces de bivalves des Glénan. *Haliotis*. 9(1): 45-48.
- GONZÁLEZ, N. 1975. Composición bioquímica y medio ambiente de *Venerupis decussata* y *Venerupis pullastra* en la ría del Pasaje, La Coruña. *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.* 194.
- GOODSELL, J.G.; FULLER, S.C.; EVERSOLE, A.G.; CASTAGNE, M. y LUTZ, R.A. 1992. Larval and early postlarval shell morphology of several venerid clams. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 72: 231-255.
- GOULLETQUER, P.; NEDHIF, M. y HERAL, M. 1988. Production de palourdes japonaises *Ruditapes philippinarum* (Adams et Reeve) en bassin semi-fermé: Approche énergétique et relations trophiques. *Aquaculture*. 74: 331-348.

8. Bibliografía

- GRIBBEN, P.E. y HAY, B.E. 2003. Larval development of the New Zealand geoduck *Panopea zelandica* (Bivalvia: Hiatellidae). *New Zealand J. Mar. Freshw. Res.* 37: 231-239.
- GROS, O.; FRENKIEL, L. y MOUËZA, M. 1997. Embryonic, larval and post-larval development in the symbiotic clam, *Codakia orbicularis* (Bivalvia: Lucinidae). *Invertebr. Biol.* 116: 86-101.
- GUERRA, A. 1979. Producción de semilla de ostra y almeja en la Planta de Cultivos Marinos de Ribadeo. Cuadernos Marisqueiros.
- GUERRA, A.; NÓVOA, S.; BESADA, M.; BÚA, I.; LASTRES, M.; FERNÁNDEZ, J. y ASELA, R. 2007. Crecimiento y composición bioquímica de semilla de almeja japonesa (*Tapes philippinarum*) y almeja babosa (*Venerupis pullastra*), obtenida en criadero y cultivada en diferentes sistemas de preengorde y parques de cultivo. *Actas del XI Congreso Nacional de Acuicultura*. Vigo. 467-470.
- GUERRERO, S. y GONZÁLEZ, X.O. 1991. Clam nursery (*Tapes decussatus*) in the effluent of a fish farm in Ría de Arosa, Spain. *EAS Special Publication*. 14: 132-133.
- HARE, M.P.; PALUMBI, S.R. y BUTMAN, C.A. 2000. Single-step species identification of bivalve larvae using multiplex polymerase chain reaction. *Mar. Biol.* 137: 953-961.
- HELM, M.M.; BOURNE, N. y LOVATELLI, A. 2004. Hatchery culture of bivalves. A practical manual. *FAO Fisheries Technical Paper*. Vol: 471.
- HENZLER, C.M.; HOAGLUND, E.A. y GAINES, S.D. 2010. FISH-CS a rapid method for counting and sorting species of marine zooplankton. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 410: 1-11.
- HODGSON, C.A. y BURKE, R.D. 1988. Development and larval morphology of the spiny scallop, *Chlamys hastata*. *Biol. Bull.* 174: 303-318.
- HOLLAND, D.L. 1978. Lipid reserves and energy metabolism in the larvae of benthic marine invertebrates. *Biochemical and biophysical perspectives in marine biology*. Academic Press. London. 85-123.
- HOLLAND, D.A. y CHEW, K.K. 1974. Reproductive cycle of the manila clam (*Venerupis japonica*), from Hood Canal, Washington. *Proc. Natl. Shellfish Assoc.* 64: 53-58.
- HOOKER, S.H. 1997. Larval and postlarval development of the New Zealand pipi, *Phapies australis* (Bivalvia: Mesodesmatidae). *Bull. Mar. Sci.* 61: 225-240.
- HU, Y.P.; LUTZ, R.A. y VRIJENHOEK, R.C. 1992. Electrophoretic identification and genetic analysis of bivalve larvae. *Mar. Biol.* 113: 227-230.

- IGLESIAS, D. 2006. Estudio patológico de las poblaciones de berberecho *Cerastoderma edule* (L) de Galicia. Tesis doctoral. Univ. de Santiago de Compostela.
- IGLESIAS, J.I.P.; CAMACHO, C.; NAVARRO, E.; LABARTA, U.; BEIRAS, R. y HAWKINS, A.J.S. 1996. Microgeographic variability in feeding, absorption and condition of mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lmk): a transplant experiment. J. Shellfish Res. 15(3): 673-680.
- IWATA, K.S. 1951a. Spawning of *Mytilus edulis*. IV. Discharge by KCl injection. Nippon Suis. Gak. 16: 393-394.
- IWATA, K.S. 1951b. Spawning of *Mytilus edulis*. VIII. Comparison of abilities of salts of alkali metals and of alkali earth metals to induce spawning. Nippon Suis. Gak. 17: 94- 95.
- JACUMAR. 2008. Desarrollo de la tecnología de producción y cultivo de almejas. Informe final.
- JARA JARA, R. 1995. Crecimiento de semilla de *Venerupis pullastra* M. y de *Ruditapes decussatus* L. en agua residual procedente de cultivo de rodaballo (*Psetta maxima* L.). Tesis Doctoral. Univ. de Santiago de Compostela.
- JOAQUIM, S.; MATIAS, D.; MARGARETE MATIAS, A.; VERA, C.; MOURA, P.; CHÍCHARO, L. y GASPAR, M. 2010. Oocytes quality criteria applied to hatcheries as an indicator of the pullet carpet shell *Venerupis senegalensis* (Gmelin, 1791) reproduction potential. Congreso Internacional de Acuicultura AQUA2010. Porto. Portugal. 624-625.
- JONES, W.J.; PRESTON, C.M.; MARIN III, R.; SCHOLIN, C.A. y VRIJENHOEK, R.C. 2008. A robotic molecular method for in situ detection of marine invertebrate larvae. Mol. Ecol. Resour. 8: 540-550.
- KEPPLER, D. y DECKER, K. 1984. Methods of Enzymatic Analysis. Ed. Bergmeyer. 4: 11-18.
- KINOSHITA, T. 1943. Induction of the spawning of the scallop, *Pecten yessoensis* Say. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 11: 168-170.
- KNIPRATH, E. 1980. Larval development of the shell and shell gland in *Mytilus* (Bivalvia). Wilhelm Roux's Arch. Dev. Biol. 188: 201-204.
- KRAEUTER, J.N.; CASTAGNA, M. y VAN DESSEL, R. 1982. Egg size and larval survival of *Mercenaria mercenaria* (L.) and *Argopecten irradians* (Lamarck). J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 56: 3-8.

8. Bibliografía

- 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.
- LARSEN, J.B.; FRISCHER, M.E.; RASMUSSEN, L.J. y HANSEN, B.W. 2005. Single-step nested multiplex PCR to differentiate between various bivalve larvae. *Mar. Biol.* 146: 1119-1129.
- LAUCKNER, G. 1983. Diseases of Mollusca: Bivalvia. En: Kinne, O. (ed). *Diseases of Marine Animals*. Vol. II. Biologische Anstalt Helgoland. Hamburg. 477-459.
- LE PENNEC, M. 1970. Elevages au laboratoire de Mollusque bivalves: morphogénèse de la coquille des Veneridae. Tesis 3^{er} ciclo. Paris, Francia.
- LE PENNEC, M. 1980. The larval and post-larval hinge of some families of bivalve molluscs. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 60: 601-612.
- LE PENNEC, M. 1981. Les méthodes expérimentales induisant la ponte chez les mollusques bivalves marins. *Haliotis*. 11: 139-155.
- LE PENNEC, M.; GUEGUEN, F.; COCHARD, J.; PAULET, Y. y DORANGE, G. 1990. Relations entre le contenu lipidique des ovocytes de *Pecten maximus* (Mollusque, bivalve) et les performances des larves en élevage. *Haliotis*. 10: 101-113.
- LE PENNEC, M.; BENINGER, P.G.; DORANGE, G. y PAULET, Y. 1991. Trophic sources and pathways to the developing gametes of *Pecten maximus* (Bivalvia:Pectinidae). *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 71: 451-463.
- LIVI, S.; CORDISCO, C.; DAMIANI, C.; ROMANELLI, M. y CROSETTI, D. 2006. Identification of bivalve species at an early developmental stage through PCR-SSCP and sequence analysis of partial 18S rDNA. *Mar. Biol.* 149: 1149-1161.
- LOOSANOFF, V. 1954. New advances in the study of bivalve larvae. *Am. Sci.* 42: 607-624.
- LOOSANOFF, V. y DAVIES, H.C. 1963. Rearing of bivalve larvae. *Avd. Mar. Biol.* 1: 1-136.
- LOOSANOFF, V.; DAVIES, H.C. y CHANLEY, P.E. 1966. Dimensions and shapes of larvae of some marine bivalve mollusks. *Malacologia*. 4: 351-435.
- LÓPEZ, C. 1995. Estudio patológico de la almeja *Ruditapes decussatus* (Linnaeus, 1758) cultivada en Galicia y sus mecanismos de defensa. Tesis Doctoral. Univ. de Santiago de Compostela.
- LORENZO, S.; FUENTES, J. y GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, A. 2003. Identification of *Mytilus galloprovincialis* larvae from the Galician Rías by mouse monoclonal antibodies. *Aquaculture*. 219: 545-559.

- LORENZO, S.; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, A.; DE MIGUEL, E. y FUENTES, J. 2005. Two monoclonal antibodies for the recognition of *Mytilus* spp. larvae: studies on cultured larvae and tests on plankton samples. *Aquaculture*. 250: 736-747.
- LOUZÁN, A. 2008. Ciclo reproductor, composición bioquímica y patología de los progenitores de *Donax trunculus* (Linné, 1758), de un banco natural de Valdoviño (NO Galicia), para la obtención de semilla en criadero. Diploma de Estudios Avanzados. Univ. de Santiago de Compostela.
- LOUZÁN, A.; CERVIÑO OTERO, A.; NÓVOA, S.; OJEA, J. y MARTÍNEZ PATIÑO, D. 2007. Seguimiento del ciclo reproductor y desarrollo larvario de una población de coquina *Donax trunculus* (Linné, 1758). *Foro Ac. Rec. Mar. Rías Galegas*. 10: 475-481.
- LOUZÁN, A.; DA COSTA, F.; NÓVOA, S.; OJEA, J. y MARTÍNEZ PATIÑO, D. 2009. Estudio del desarrollo larvario de una población de coquina *Donax trunculus* (Linné, 1758). *Actas del XII Congreso Nacional de Acuicultura*. Madrid. 572-573.
- LOWRY, H.O.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L. y RANDALL, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- LUBET, P. 1959. Recherches sur le cycle sexuel et l'émission des gamètes chez les *Mytilidae* et les *Pectinidae* (Moll. Bivalves). *Revue Trav. Inst (scient. tech). Pêch. Marit.* 23: 387-548.
- LUBET, P. 1986. The reproductive strategies of marine bivalve molluscs. En: *Advances in Invertebrate Reproduction 4*. Porchet, M.; Andries, J.C. y Dhainaut, A. (eds). Elsevier, Science Publishers. 401-408.
- LUCAS, A. 1965. Recherche sur la sexualité des mollusques bivalves. Thèses Univ. Rennes.
- MacARTHUR, R.H. y WILSON, E.O. 1967. *The Theory of Island Biogeography*. Princeton Landmarks in Biology.
- MAIA, F.; SOBRAL, M.P. y GASPAR, M. 2006. Ciclo reproductivo e primeira maturação de *Solen marginatus* e *Venerupis pullastra* na Ria de Aveiro. Bases científicas para a gestão destes recursos. *Relat. Cient. Téc. IPIMAR, Série digital* (<http://ipimar-iniap.ipimar.pt>) nº 30.
- MANN, R. 1979. Some biochemical and physiological aspects of growth and gametogenesis in *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis* sustained at elevated temperatures. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 59: 95-110.
- MARSH, J.B. y WEINSTEIN, D.B. 1966. Simple carrying method for determination of lipids. *J. Lipid Res.* 7: 574-576.

8. Bibliografía

- 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. Actas del X Congreso Nacional de Acuicultura. Gandía, Valencia. 520-521.
- MARTÍNEZ, M.; CERVIÑO, A.; COO, A.; GARCÍA, A.; MARTÍNEZ PATIÑO, D.; NÓVOA, S.; OJEA, J.; SEBE, M.P.; CASAL, A.; FARIÑA, J.; MOSQUERA, P. y RODRÍGUEZ, R. 1997. Parámetros biológicos y medioambientales del preengorde de almeja fina (*Venerupis decussata*) en sistemas sobreelevados. Xornadas sobre o Desenvolvemento Produtivo do Marisqueo a Pé. Santiago de Compostela.
- MARTÍNEZ PATIÑO, D. 2002. Estudio de los Solénidos, *Solen marginatus* (Pennánt, 1777) y *Ensis siliqua* (Linné, 1758), de los bancos naturales de la Ría de Ortigueira y Ría del Barquero: ciclo gametogénico, composición bioquímica y cultivo larvario. Tesis Doctoral. Univ. de Santiago de Compostela.
- MARTÍNEZ PATIÑO, D.; NÓVOA, S. y OJEA, J. 2001. Cultivo larvario y postlarvario de almeja fina (*Ruditapes decussatus*) y almeja babosa (*Venerupis senegalensis*) en criadero. Actas de VIII Congreso Nacional de Acuicultura. Santander. 304-306.
- MARTÍNEZ PATIÑO, D.; OJEA, J.; NÓVOA, S. y RODRÍGUEZ, J.L. 2002. The relation between the oocyte quality of four species of bivalve molluscs and their rates of larval growth. Abstracts Aquaculture Europe 2002. Special publication nº 32. 333-334.
- MARTÍNEZ PATIÑO, D.; NÓVOA, S.; OJEA, J. y RODRÍGUEZ, J.L. 2007. Efecto de la cantidad de alimento suministrado a los cultivos en el crecimiento y composición en ácidos grasos de las larvas de almeja babosa *Venerupis pullastra* (Montagu, 1803). Actas del XI Congreso Nacional de Acuicultura. Vigo. Pontevedra. 411-414.
- MARTÍNEZ PATIÑO, D.; CERVIÑO OTERO, A.; LOUZÁN, A.; DA COSTA, F.; OJEA, J. y NÓVOA, S. 2008. Producción de especies de interés marisquero en la Planta de Cultivos de Ribadeo. II Foro Iberoamericano de los Recursos Marinos y la Acuicultura. Cumaná. Venezuela. 629-633.
- MARTÍNEZ PATIÑO, D.; CERVIÑO OTERO, A.; ARANDA, J.A.; MONTES, J. y OJEA, J. 2010. Primeros resultados del proyecto: desarrollo del cultivo en criadero de la almeja rubia *Venerupis rhomboides*. Foro Ac. Rec. Mar. Rías Galegas. (pendiente publicación).
- MASSAPINA, C.; JOAQUIM, S.; MATIAS, D. y DEVAUCHELLE, N. 1999. Oocyte and embryo quality in *Crassostrea gigas* (Portuguese strain) during a spawning period in Algarve, South Portugal. Aquat. Living Resour. 12(5):327-333.

- MATIAS, D.; JOAQUIM, S.; LEITAO, A. y MASSAPINA, C. 2009. Effect of geographic origin, temperature and timing of broodstock collection on conditioning, spawning success and larval viability of *Ruditapes decussatus* (Linné, 1758). *Aquaculture Int.* 17: 257-271.
- MEDEIROS BERGEN, D.E.; OLSON, R.R.; CONROY, J.A. y KOCHER, T.D. 1995. Distribution of holoturian larvae determined with species-specific genetic probes. *Limnol. Oceanogr.* 40: 1225-1235.
- MEDHIOUB, M.N. 1986. Recherches cytologiques sur le cycle de reproduction et l'évolution des réserves chez la palourde japonaise *Ruditapes philippinarum* (Adams et Reeve), (Mollusque Lamelibranche). These Univ. Caen.
- MILLER, K.M.; JONES, P. y ROUGHGARDEN, J. 1991. Monoclonal antibodies as species-specific probes in oceanographic research: examples with intertidal barnacle larvae. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 1: 35-47.
- MORSE, D.; HOOKER, N. y MORSE, A. 1977. Hydrogen peroxyde induces spawning in mollusks with activation of Prostaglandin Endoperoxide synthetase. *Science.* 196: 298-300.
- MORVAN, C. y ANSELL, A.D. 1988. Stereological methods applied to reproductive cycle of *Tapes rhomboides*. *Mar. Biol.* 97: 355-364.
- MOUËZA, M.; GROS, O. y FRENKIEL, L. 1999. Embryonic, larval and postlarval development of the tropical clam, *Anomalocardia brasiliiana* (Bivalvia: Veneridae). *J. Moll. Stud.* 65: 73-88.
- MOUËZA, M.; GROS, O. y FRENKIEL, L. 2006. Embryonic development and shell differentiation in *Chione cancellata* (Bivalvia: Veneridae): an ultrastructural analysis. *Invertebr. Biol.* 125: 21-33.
- NÓVOA, S. 2007. Metabolismo lipídico, ácidos grasos en el cultivo larvario de almeja babosa, *Venerupis pullastra* (Montagu, 1803). "Calidad ovocitaria, larvaria y nutricional con una aproximación al uso de la microencapsulación lipídica". Tesis doctoral. Univ. de Santiago de Compostela.
- NÓVOA, S.; MARTÍNEZ PATIÑO, D.; OJEA, J.; SOUDANT, P.; SAMAIN, J.F.; MOAL, J. y RODRÍGUEZ, J.L. 2002. Ingestion, digestion and assimilation of gelatin-acacia microcapsules incorporating deuterium-labeled arachidonic acid by larvae of the clam *Venerupis pullastra*. *J. Shellfish Res.* 21(2): 649-658.
- NÓVOA, S.; MARTÍNEZ PATIÑO, D.; OJEA, J. y RODRÍGUEZ, J.L. 2003. Composición en ácidos grasos de larvas D de almeja fina *Ruditapes decussatus* (Linnè, 1787), obtenidas a partir de progenitores acondicionados en diferentes regímenes de temperatura y progenitores del medio natural. Actas del IX Congreso Nacional de Acuicultura. Cádiz.

8. Bibliografía

- NÓVOA, S.; OJEA, J.; MARTÍNEZ PATIÑO, D. y RODRÍGUEZ, J.L. 2007. Calidad ovocitaria de la almeja babosa *Venerupis pullastra* (Montagu, 1803), relacionada con su contenido en ácidos grasos $\omega 3$ y $\omega 6$. Actas del XI Congreso Nacional de Acuicultura. Vigo. 419-422.
- OJEA, J.; NÓVOA, S.; MARTÍNEZ PATIÑO, D. y RODRÍGUEZ, J.L. 1999. Evaluación de la calidad nutritiva del fitoplancton en tres sistemas de cultivo empleados en criaderos de moluscos. Actas del VII Congreso Nacional de Acuicultura. Gran Canaria. 317-322.
- OJEA, J.; MARTÍNEZ PATIÑO, D. y NÓVOA, S. 2001 Ciclo gametogénico de una población de almeja fina (*Ruditapes decussatus*) y relación con su contenido en glucógeno. Actas VIII Congreso Nac. Acuicultura. 309-311.
- OJEA, J.; MARTÍNEZ PATIÑO, D.; NÓVOA, S.; PAZOS, A.J. y ABAD, M. 2002. Contenido y distribución de glucógeno en relación con el ciclo gametogénico de *Ruditapes decussatus* (L., 1758) en una población natural de las lagunas de Baldaio (Galicia, noroeste de España). Bol. Inst. Esp. Oceanogr. 18(1-4): 1-7.
- OJEA, J.; MARTÍNEZ PATIÑO, D.; NÓVOA, S. y CERVIÑO OTERO, A. 2005. Ciclo gametogénico de una población de almeja japonesa *Ruditapes philippinarum* (Adams y Reeve, 1850) en la Ría de Camariñas (noroeste de España) y relación con la composición bioquímica mayoritaria. Bol. Inst. Esp. Oceanogr. 21(1-4): 337-342.
- OJEA, J.; SILVA, A.; MARTÍNEZ PATIÑO, D.; NÓVOA, S.; GARCÍA MARTÍNEZ, P. y ABAD, M. 2007. Condiciones óptimas para el acondicionamiento de la almeja fina, *Ruditapes decussatus* (Linnaeus, 1758) en criadero. Actas del XI Congreso Nacional de Acuicultura. Vigo. 391-394.
- OJEA, J.; PAZOS, A.J.; MARTÍNEZ PATIÑO, D.; NÓVOA, S.; GARCÍA MARTÍNEZ, P.; SÁNCHEZ, J.L. y ABAD, M. 2008. Effects of temperature regime on broodstock conditioning of *Ruditapes decussatus*. J. Shellfish Res. 27(5): 1093-1100.
- OJEA, J.; MARTÍNEZ PATIÑO, D.; NÓVOA, S. y CATOIRA, J.L. 2009. Cultivo del erizo de mar en criadero: desoves y desarrollos larvarios. Actas del XII Congreso Nacional de Acuicultura. Madrid. 582-583.
- OLSON, R.R.; RUNSTADLER, J.A. y KOCHER, T.D. 1991. Whose larvae? Nature. 351: 357-358.
- OTERO, M.; BUA, I. y GUERRA, A. 2010. Crecimiento y producción de tres especies de almejas procedentes de diferentes sistemas de preengorde. Foro Ac. Rec. Mar. Rías Galegas. 12: 299-305.

- ORDÁS, M.C.; GÓMEZ LEÓN, J. y FIGUERAS, A. 2001. Histopathology of the infection by *Perkinsus atlanticus* in three clam species (*Ruditapes decussatus*, *R. philippinarum* and *R. pullastra*) from Galicia (NW Spain). J. Shellfish Res. 20(3): 1019-1024.
- PARADA, J.M. 2007. Engorde a escala industrial de almeja babosa (*Venerupis senegalensis*) y almeja fina (*Tapes decussatus*) en batea hasta la talla comercial. XI Congreso Nacional de Acuicultura. Vigo. 415-418.
- PATIL, J.; GUNASEKERA, R.; DEAGLE, B. y BAX, N. 2005. Specific detection of Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*) larvae in plankton samples using nested polymerase chain reaction. Mar. Biotechnol. 7: 11-20.
- PAUGAM, A.; LE PENNEC, M. y GENEVIÉVE, A.F. 2000. Immunological recognition of marine bivalve larvae from plankton samples. J. Shellfish Res. 19: 325-331.
- PÉREZ, D.; LORENZO ABALDE, S.; GONZÁLEZ FERNÁNDEZ, A. y FUENTES, J. 2009. Inmunodetección de *Mytilus galloprovincialis* larvas usando anticuerpos monoclonales para monitorizar la abundancia larval en la costa gallega: Optimización del método y comparación con la identificación por rasgos morfológicos. Aquaculture. 156(5): 991-1006.
- PÉREZ CAMACHO, A. 1980. Biología de *Venerupis pullastra* (Montagu, 1803) y *Venerupis decussata* (Linné, 1767) (Mollusca, Bivalvia), con especial referencia a los factores determinantes de la producción. Bol. Inst. Esp. Oceanogr. 281: 43-76.
- PÉREZ CAMACHO, A. y ROMÁN CABELLO, G. 1973. El desarrollo larvario de *Venerupis pullastra*. Bol. Inst. Esp. Oceanogr. 165: 215-268.
- PÉREZ CAMACHO, A.; ROMÁN CABELLO, G. y TORRE CERVIGÓN, M. 1977. Experiencias en cultivos de larvas de tres especies de moluscos bivalvos: *Venerupis pullastra* (Montagu), *Venerupis decussata* (Linnaeus) y *Ostrea edulis* (Linnaeus). Bol. Inst. Esp. Oceanogr. 235: 215-268.
- PÉREZ CAMACHO, A. y ROMÁN, G. 1987. La reproducción en los moluscos bivalvos. pp: 133-184. En: Espinosa, J. y Labarta, U. (ed). Reproducción en la Acuicultura. Plan de Formación de Técnicos Superiores en Acuicultura (FEUGA). Madrid.
- PÉREZ CORVACHO, E. y PARDO VUELTA, M.J. 2007. O cultivo de ameixa en batea: a experiencia da confraría de Moaña. Foro Ac. Rec. Mar. Rías Galegas. 9: 263-269.
- PHILLIPS, N.E.; WOOD, A.R. y HAMILTON, J.S. 2008. Molecular species identification of morphologically similar mussel larvae reveals unexpected discrepancy between relative abundance of adults and settlers. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 362(2): 90-94.

8. Bibliografía

- RALEIGH, J. y KEEGAN, B.F. 2007. Embryonic development in the bivalve *Scrobicularia plana* (Semelidae) using scanning electron microscopy. *Invert. Reprod. Develop.* 50: 139-144.
- RAMA VILLAR, A. y REY MÉNDEZ, M. 1997. Preengorde en batea de semente de ameixa fina (*Tapes decussatus*) e babosa (*Venerupis pullastra*). Xornadas sobre o Desenvolvemento Produtivo do Marisqueo a Pé. Santiago de Compostela.
- ROBERT, R.; TRUT, G. y LABORDE, J.L. 1993. Growth, reproduction and gross biochemical composition of the Manila clam *Ruditapes philippinarum* in the bay of Arcachon. France. *Mar. Biol.* 116: 291-299.
- RODRÍGUEZ, S.; QUINTANA, R.; LAMAS, L.; AYENSA, G.; VELASCO, F.J. y PASCUAL, C. 1993. Etude comparative du cycle gamétogénique et composition biochimique de *Tapes decussatus* et *Ruditapes philippinarum* dans la Ría de Muros y Noya. Production, Environment and Quality, Bordeaux Aquaculture 92. European Aquaculture Society. Special Publication N° 18, Ghent, Belgium.
- RODRÍGUEZ MOSCOSO, E. 2000. Histofisiología de la reproducción de almeja fina *Ruditapes decussatus* (Linné, 1758), en la Ría de Arosa (Población natural y población de cultivo). Tesis Doctoral. Univ. de Santiago de Compostela.
- RODRÍGUEZ MOSCOSO, E.; PAZO, E.J.; GARCÍA, A. y FERNÁNDEZ CORTÉS, F. 1992. Reproductive cycle of Manila clam, *Ruditapes philippinarum* (Adams and Reeve 1850) in Ría de Vigo (NW Spain). *Sci. Mar.* 56(1): 61-67.
- RODRÍGUEZ MOSCOSO, E.; ARNAIZ, R; COO, A.; MARTÍNEZ PATIÑO, D.; SILVA, A. y VARELA, J.A. 1993. Proceso de maduración y acondicionamiento de *Tapes decussatus* (Linné, 1787) fuera de la época natural. Actas IV Congreso Nac. Acuicultura. 335-340.
- RODRÍGUEZ MOSCOSO, E. y ARNAIZ, R. 1998. Gametogenesis and energy storage in a population of the grooved carpet-shell clam, *Tapes decussatus* (Linné, 1787), in northwest Spain. *Aquaculture.* 162: 125-139.
- ROMÁN, G. 1989. Efecto del ciclo reproductivo y acondicionamiento en el desarrollo larvario, fijación y posterior crecimiento de semilla de *Ostrea edulis* Linné 1758. Tesis Doctoral. Univ. de Santiago de Compostela.
- ROMÁN, G. y PÉREZ CAMACHO, A. 1976. Cultivo de larvas de vieira, *Pecten maximus* (Linnaeus), en laboratorio. *Bol. Inst. Esp. Océano.* 223. 1-17.
- RUIZ, C. 1992. Composición bioquímica y ciclo reproductor en *Ostrea edulis* L., y *Crassostrea gigas* Th. Tesis Doctoral. Univ. de Santiago de Compostela.

- SANTAMARÍA, I.; OTERO, M.; FERNÁNDEZ, M. y GUERRA, A. 2009. Engorde de almeja babosa, *Venerupis pullastra* (Montagu, 1803), en los parques de Carril, Ría de Arousa (Pontevedra). Foro Ac. Rec. Mar. Rías Galegas. 11: 371-376.
- SASTRY, A.N. 1979. Pelecypoda (excluding Ostridae). En: Reproduction of Marine Invertebrates. Academic Press, New York. 5: 113-292.
- SEDANO, F.J. 1992. Contribución al estudio del metabolismo energético durante los desarrollos embrionario y larvario en *Mytilus galloprovincialis* Lamark. Tesis Doctoral. Univ. de Santiago de Compostela.
- SEMENIKHINA, O.Y.; KOLOTUKHINA, N.K. y EVSEEV, G.A. 2006. Morphology of venerid (Bivalvia, Veneridae) larval shells from the Sea of Japan. Zool. Zhurnal. 85(9): 1067-1075.
- SILBERFELD, T. y GROS, O. 2006. Embryonic development of the tropical bivalve *Tivela mactroides* (Born, 1778) (Veneridae: subfamily Meretricinae): a SEM study. Cah. Biol. Mar. 47: 243-251.
- TARDY, J. y DONGARD, S. 1993. Le complexe apical de la véligère de *Ruditapes philippinarum* (Adams et Reeve, 1850) Mollusque Bivalve Vénéridé. C. R. Acad. Sci. Ser. 3. 316: 177-184.
- THOMPSON, R.J.; RATCLIFFE, N.A. y BAYNE, B.L. 1974. Effects of starvation on structure and function in the digestive gland of the mussel (*Mytilus edulis* L.). J. Mar. Biol. Ass. U.K., 54: 699-712.
- TORO, J.E. 1998. Molecular identification of four species of mussels from southern Chile by PCR-based molecular markers: the potential use in studies involving planktonic surveys. J. Shellfish Res. 17: 1203-1205.
- VILLALBA, A.; CARBALLAL, M.J. y LÓPEZ, M.C. 1993a. Estudio del ciclo gonadal de tres especies de almeja, *Ruditapes decussatus*, *Venerupis pullastra* y *Venerupis rhomboides*, de las rías gallegas. Actas IV Congreso Nac. Acuicultura. 341-346.
- VILLALBA, A.; LÓPEZ, M.C. y CARBALLAL, M.J. 1993b. Parásitos y alteraciones patológicas de tres especies de almejas, *Ruditapes decussatus*, *Venerupis pullastra* y *Venerupis rhomboides*, en las rías gallegas. Actas IV Congreso Nac. Acuicultura. 551-556.
- VILLALBA, A.; CARBALLAL, M.J.; LÓPEZ, C.; CABADA, A.; CORRAL, L. y AZEVEDO, C. 1999. Branchial rickettsia-like infection associated with clam *Venerupis rhomboides* mortality. Dis. Aquat. Org. 6: 53-60.

8. Bibliografía

- VILLALBA, A.; CASAS, S.M.; LÓPEZ, C. y CARBALLAL, M.J. 2005. Study of perkinsosis in the carpet shell clam *Tapes decussatus* in Galicia (NW Spain). II: Temporal pattern of disease dynamics and association with clam mortality. *Dis. Aquat. Org.* 65: 257-267.
- WALKER, R.L. y HEFFERMAN, P.B. 1994. Temporal and spatial effects of tidal exposure on the gametogenic cycle of the northern quahog, *Mercenaria mercenaria* (Linnaeus, 1758), in coastal Georgia. *J. Shellfish Res.* 13: 479-486.
- WALNE, P.R. 1966. Experiments in the large-scale culture of the larvae *Ostrea edulis* L. *Fish. Invest. Min. Agric. Fish. Food (G.B.). Ser 2.* 25.
- WILSON, J. y SEED, R. 1974. Reproduction in *Mytilus edulis* L. (Mollusca: Bivalvia) in Carlingford Lough, Northern Ireland. *Irish Fisheries Investigations B.* 15: 1-30.
- WINBERG, G.G. 1971. Methods for the estimation of production of aquatic animals. Academic Press, London.
- XIE, Q. y BURNELL, G.M. 1994. A comparative study of the gametogenic cycles of the clams *Tapes philippinarum* (Adams and Reeve, 1850) and *Tapes decussatus* (Linnaeus) on the south coast of Ireland. *J. Shellfish Res.* 13(2): 467-472.
- YAN, X.; ZHANG, G. y YANG, F. 2006. Effects of diet, stocking density, and environmental factors on growth, survival, and metamorphosis of Manila clam *Ruditapes philippinarum* larvae. *Aquaculture.* 253: 350-358.
- ZAR, J.H. 1996. Biostatistical analysis. Third edition. Prentice Hall Inc. Nueva Jersey. USA.
- ZHANG, G. y YAN, X. 2006. A new three-phase culture method for Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, farming in northern China. *Aquaculture.* 258: 452-461.